

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ АКТИВНОСТИ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ПРООКСИДАНТНОГО ЭФФЕКТА АКРИЛАМИДА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ *IN VITRO* И В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Михаил Михайлович ТАРСКИХ, Сергей Иванович КОЛЕСНИКОВ

ФГБУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН  
664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16

Прямое воздействие акриламида на антиокислительные ферменты клетки (каталазу, супероксиддисмутазу, глутатионпероксидазу) в субклеточных препаратах различных органов крыс приводило сначала к ингибированию, а затем к увеличению активности каталазы и супероксиддисмутазы к концу периода инкубации, что может быть причиной отсутствия прооксидантного эффекта при добавлении различных концентраций мономера к постмитохондриальной надосадочной жидкости печени опытных животных. Прооксидантный эффект был отмечен лишь вследствие острой интоксикации ядом в исследуемых органах.

**Ключевые слова:** акриламид, каталаза, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидаза.

Использование изолированных тест-систем *in vitro* в настоящее время широко практикуется для определения чувствительности различных типов клеток в разных органах к токсическому действию химических веществ, а также для определения обратимости вредного действия токсикантов на данные органы и клетки [5]. Они помогают установить механизмы токсичности ксенобиотиков в отношении органов-мишеней и выявить зависимость эффекта от дозы и времени воздействия. Данный подход был использован и для изучения механизмов токсичности акриламида, промышленного яда, широко используемого в различных отраслях промышленности. Контакт с ним имеют сотни тысяч людей во всем мире на производстве и в быту [10].

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 160 белых беспородных крысах-самцах массой 150–200 г. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755). Фракционирование субклеточных препаратов производили методом дифференциального центрифугирования [7].

Печень промывали при 0–4 °С через нижнюю полую вену холодным 1,15 % раствором KCl, содержащим 100 мМ трис-HCl буфер (pH 7,4), измельчали, гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса. Аналогичным образом готовились гомогенаты почек и головного мозга. Гемолиз эритроцитов достигался путем гипотонического лизиса суспензии клеток дистиллированной водой; перед этим, после удаления плазмы и клеток белой крови, эритроциты трижды отмывали смесью равных объемов 0,154 М раствора NaCl и 0,07 М фосфатного буфера (pH 7,4) с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут. При изучении спонтанного, ферментативного и аскорбатзависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ) *in vitro* и на экспериментальной модели острой интоксикации его активность определялась по скорости образования малонового диальдегида (МДА) [8]. Содержание белка в биологических препаратах измеряли биуретовым методом [3]. Активность каталазы определялась по уменьшению оптической плотности инкубационной смеси при длине волны 230 нм в результате разложения перекиси водорода ферментом [6], супероксиддисмутазы (СОД) – по уменьшению скорости восстановления нитросинего тетразолия до формазана, регистрируемой при длине волны 450 нм [2], глутатионпероксидазы – по максимуму поглощения окисленного глутатио-

Тарских М.М. – к.м.н., врач-невролог высшей категории, e-mail: mtarskih@mail.ru  
Колесников С.И. – советник Президиума РАМН, академик РАМН

на при длине волны 275 нм [6, 11]. Динамика активности ферментов выражалась в процентном отношении по сравнению с исходной активностью, принятой за 100 %. Для создания экспериментальной модели острого отравления акриламид вводился однократно внутривенно в дозе 4/5 от LD<sub>50</sub> (1,4 ммоль/кг) [4, 9].

Полученные результаты обрабатывались статистически с помощью вычисления средней арифметической ( $M$ ) и стандартной ошибки средней арифметической ( $m$ ). Достоверность различий сравниваемых параметров рассчитывали с использованием  $t$ -критерия Стьюдента. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая исключительную роль печени в метаболизме чужеродных соединений, а также мембран эндоплазматического ретикула в метаболических превращениях ядов [1], в том числе акриламида [9], нами исследовалась возможность развития проокислительного эффекта акриламида при инкубации *in vitro* в течение 30 мин различных его концентраций с постмитохондриальной надосадочной жидкостью печени крыс, содержащей микросомы и цитозоль (табл. 1). Опыты продемонстрировали отсутствие проокислительного эффекта при добавлении различных концентраций ксенобиотика при изучении как ферментативного (в присутствии НАДФН), так и неферментативного ПОЛ (в присутствии ас-

корбата) – скорость образования МДА, вторичного продукта ПОЛ, в инкубационной смеси за 30 мин не увеличивалась (табл. 1). Аналогичная картина имела место при инкубации 1 mM акриламида – в течение 30 и 60 мин (зависимость «время – эффект») как в присутствии 2 mM НАДФН, так и в присутствии 1,6 mM аскорбата (табл. 2).

Для объяснения причин этого явления, а также с целью определения индивидуальной чувствительности органов и тканей к повреждающему действию акрилата в следующей серии экспериментов изучалась активность ферментов антиоксидантной защиты клетки в результате прямого его воздействия – СОД, каталазы и глутатионпероксидазы.

Эксперименты продемонстрировали снижение активности каталазы в гомогенате печени, почек, головного мозга и в гемолизате эритроцитов крыс на 40, 45, 48 и 50 % соответственно при прямом воздействии 10 mM акриламида *in vitro* уже через 5 минут после его добавления в инкубационную среду (рис. 1). Активность фермента была пониженной и через 15 минут после начала опыта, но имела тенденцию к повышению, которая сохранялась до 30-й минуты опыта. Характерно, что после 30-й минуты эксперимента активность каталазы в печени превышала контрольный уровень на 29 %, а в почках – на 12 % (см. рис. 1). Активность фермента в го-

**Таблица 1**

Влияние акриламида на аскорбат- и НАДФН-зависимую скорость образования МДА при инкубации с постмитохондриальной надосадочной жидкостью печени крыс (зависимость «доза – эффект»)

Стимулятор ПОЛ	Концентрация акриламида, mM	Скорость образования МДА, нмоль/мг белка за 30 мин
Аскорбат	0	1,42 ± 0,16
	1	1,70 ± 0,33
	3	1,67 ± 0,37
	10	1,49 ± 0,32
НАДФН	0	0,58 ± 0,12
	1	0,62 ± 0,22
	3	0,35 ± 0,17
	10	0,53 ± 0,28

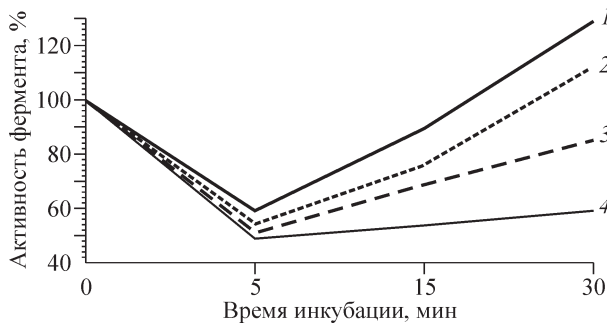
*Примечание.* Инкубационная смесь, термостатируемая при 37 °С в 2,1 мл объема, содержала 100 mM трис-НСI буфер (pH 7,4), 1 mM аскорбата или 1 mM НАДФН, постмитохондриальную надосадочную жидкость (1 мг/мл белка – в опытах с аскорбатом, 2 мг/мл белка – в опытах с НАДФН).

**Таблица 2**

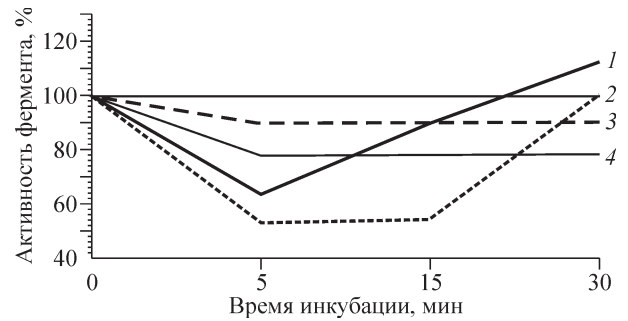
Влияние акриламида на аскорбат- и НАДФН-зависимую скорость образования МДА при инкубации с постмитохондриальной надосадочной жидкостью печени крыс (зависимость «время – эффект»)

Серия эксперимента	Время инкубации, мин	Контроль	Акриламид, 1 mM
Постмитохондриальная надосадочная жидкость	30	0,74 ± 0,06	0,69 ± 0,08
	60	1,02 ± 0,30	1,01 ± 0,21
Постмитохондриальная надосадочная жидкость + аскорбат	30	1,42 ± 0,06	2,36 ± 0,40
	60	2,51 ± 0,16	4,48 ± 0,67
Постмитохондриальная надосадочная жидкость + НАДФН	30	1,05 ± 0,07	1,04 ± 0,10
	60	1,39 ± 0,17	1,41 ± 0,08

*Примечание.* Инкубационная смесь, термостатируемая при 37 °С в 2,1 мл объема, содержала 100 mM трис-НСI буфер (pH 7,4), 1,6 mM аскорбата или 2 mM НАДФН, 4 мг/мл белка постмитохондриальной надосадочной жидкости.



**Рис. 1.** Влияние акриламида на активность каталазы в постмитохондриальной надосадочной жидкости печени (1), почек (2), головного мозга (3) и в гемолизате эритроцитов (4) крыс



**Рис. 2.** Влияние акриламида на активность супероксиддисмутазы в постмитохондриальной надосадочной жидкости печени (1), почек (2), головного мозга (3) и в гемолизате эритроцитов (4) крыс

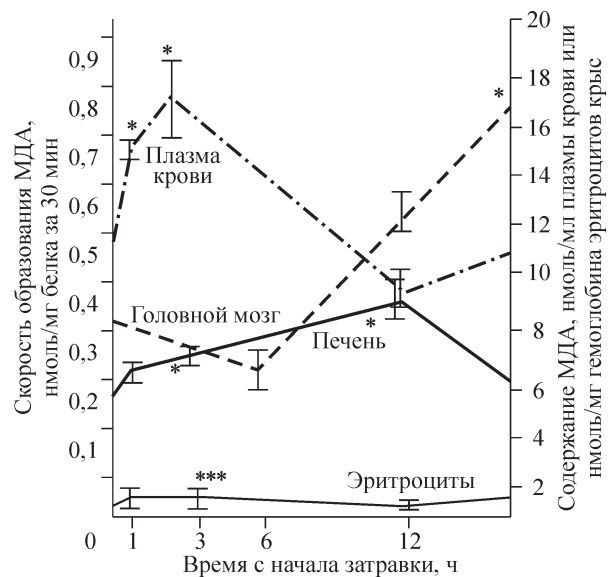
ловном мозге и гемолизате эритроцитов хотя и возрастала, но к 30-й минуте эксперимента не превышала контрольного уровня, оставаясь более низкой в эритроцитах (см. рис. 1).

Несколько иная картина наблюдалась при изучении активности СОД при воздействии акриламида: отмечалось падение активности фермента на 5-й минуте инкубации на 37, 47, 10 и 20 % в печени, почках, головном мозге и в эритроцитах соответственно (рис. 2). Далее имела место тенденция к возрастанию активности СОД в печени к 15-й минуте инкубации, а через 30 мин с начала эксперимента в печени активность фермента повышалась на 12 %, а в почках – до контрольного уровня (см. рис. 2). Активность СОД в головном мозге и в эритроцитах оставалась стойко сниженной до окончания опыта (см. рис. 2). Вышеуказанные результаты могут объяснить отсутствие проокислительного эффекта акриламида при инкубации его с постмитохондриальной надосадочной жидкостью печени крыс: через 30 мин с начала опыта активность ферментов антиоксидантной защиты клетки каталазы и СОД превышает контрольный уровень, что и может быть причиной отсутствия стимуляции образования малонового диальдегида при воздействии акриламида в предыдущей серии экспериментов (см. табл. 1, 2). Следует отметить, что активность глутатионпероксидазы в исследуемых субклеточных препаратах при воздействии акриламида не изменялась ни в одном из органов.

В экспериментальных исследованиях следующего раздела работы для лучшего понимания патогенетического механизма токсичности акриламида создавалась экспериментальная модель острой интоксикации опытных крыс.

Из рис. 3, где дана временная развертка проокислительного эффекта акриламида в различных органах и тканях, видно, что острое отравле-

ние акриламидом вызывало стимуляцию ПОЛ в плазме крови опытных животных уже через 1 ч после его введения ( $p < 0,05$ ). Эффект сохранялся и через 3 ч с начала опыта, причем он сопровождался усилением накопления МДА в эритроцитах ( $p < 0,001$ ) и стимуляцией образования этого продукта в печени затравленных крыс. Максимальный эффект приходился на 12 ч с начала затравки, о чем свидетельствует наибольшая скорость образования МДА в этом органе в



**Рис. 3.** Динамика скорости образования МДА в органах и содержания МДА в крови крыс при остром отравлении акриламидом. Инкубационная смесь, термостатируемая при 37 °С в 2,1 мл объема, содержала 100 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), 4 мг/мл белка гомогената печени или 1 мг/мл белка гомогената головного мозга контрольных и отравленных животных; 0,1 мл упакованных эритроцитов (1000 г в течение 10 мин) и 0,5 мл плазмы разводились равными объемами физиологического раствора, после чего без инкубации определялось содержание МДА

данный период времени ( $p < 0,05$ ). Увеличение скорости образования МДА в гомогенате головного мозга крыс отмечалось лишь через 24 ч после введения мономера ( $p < 0,05$ ). Полученные результаты указывают на роль ПОЛ в патогенезе токсического действия акриламида.

Затем, учитывая существующие в литературе данные о развитии поражений почек при острой интоксикации акриламидом [10], была предпринята попытка оценить роль ПОЛ в патогенезе нефротоксического действия мономера. Следует отметить, что острое отравление акриламидом не вызвало стимуляции ПОЛ в почках опытных животных ни на одном из временных этапов острой интоксикации, что оставляет спорной возможность участия данного механизма в патогенезе вызываемого ксенобиотиком поражения почек.

Таким образом, совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что острое отравление акриламидом ведет к повышению активности процессов ПОЛ в ряде органов (печени, крови, головном мозге животных). Это, в принципе, находится в соответствии с имеющимися литературными данными о динамике распределения меченого акриламида в органах отравленных крыс [10] и, кроме того, подтверждается ранее полученными результатами на уровне целого организма – увеличением содержания этана в выдыхаемом воздухе крыс, отравленных акриламидом, по сравнению с интактными животными [4], что является серьезнейшим аргументом в пользу проокислительного действия последнего. Вышеуказанный показатель интенсивности процессов ПОЛ вместе с результатами острой затравки акриламидом доказательно подтверждает реальность участия окислительного метаболизма в развитии его мембрано-повреждающего эффекта, что важно также и с методической точки зрения, учитывая одинаковую (в сторону повышения) направленность изменения содержания МДА, промежуточного продукта ПОЛ, а также этана – короткоцепочечного углеводорода, являющегося конечным продуктом ПОЛ.

#### ВЫВОДЫ

1. Акриламид при инкубации с постмитохондриальной надосадочной жидкостью органов и гемолизатом эритроцитов крыс вызывает сначала уменьшение, а затем увеличение активности каталазы и супероксиддисмутазы к концу периода инкубации, что может быть причиной отсутствия проокислительного эффекта при добавлении различных его концентраций к постмитохондриальной надосадочной жидкости

печени опытных животных в исследуемые периоды времени.

2. Острое отравление акриламидом приводит к развитию проокислительного эффекта ранее всего в плазме крови экспериментальных животных, вызывая затем повреждение биомембран эритроцитов и гепатоцитов; позднее всего развивается проокислительное действие ксенобиотика в головном мозге опытных крыс. Эффект обусловлен, по всей видимости, действием метаболитов акриламида, учитывая факт стимуляции ПОЛ в органах опытных животных лишь вследствие острой интоксикации акриламидом и отсутствие его в опытах *in vitro*.

3. Акриламид при остром отравлении животных не оказывает проокислительного действия в почках, что дает основание считать маловероятным данный механизм в патогенезе его нефротоксичности.

4. Проокислительное действие акриламида играет значительную роль в патогенезе его нейротоксичности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. М., 1975.
2. Гевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. 1985. (11). 678–681.
3. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1976. 69.
4. Иванов В.В., Тарских М.М., Яманова М.В. Этан выдыхаемого воздуха в оценке стабилизации мембран клеток печени при интоксикации акрилатами // Реконструкция, стабилизация и репарация биомембран. Благовещенск, 1989. 126.
5. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб.: Фолиант, 2004. 720 с.
6. Медицинские лабораторные технологии / Ред. А.И. Карпищенко. Т. 2. СПб.: Интермедика, 1999.
7. Мэдди Э. Биохимическое исследование мембран. М., 1979. 5–57.
8. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. М., 1977. 63–64.
9. Тарских М.М. Промышленный мономер акриламид: взаимосвязь окислительного метаболизма, гепатотоксических эффектов и механизмов развития // Сиб. мед. журн. 2004. (4). 35–40.
10. Acrylamide. Environmental Health criteria 49. Geneva: WHO, 1989. 120 p.
11. Bartosr G., Bartkowiak A. Aging of the erythrocyte. II. Activities of peroxide-detoxifying enzymes // Experientia. 1981. 37. (7). 722–723.

**A STUDY OF THE DYNAMICS OF THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT  
FERMENTS AND LIPIDS PEROXIDATION EFFECT OF ACRYLAMIDE  
IN THE ISOLATED TEST- SYSTEMS *IN VITRO* AND IN THE PATHOGENESIS  
OF THE ACUTE INTOXICATION**

**Mikhail Mikhaylovich TARSKIKH, Sergey Ivanovich KOLESNIKOV**

*Scientific Centre for Problem of Family Health and Human Reproduction SB RAMS  
664003, Irkutsk, Timirazev str., 16*

---

The direct action of acrylamide on the antioxidant ferments cell - catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase in the subcellular preparations of different organs of rats leads first to the inhibition, and then to the increase in the activity of catalase and superoxide dismutase toward the end of the period of incubation, that can be the reason for the absence of lipids peroxidation effect during the addition of different concentrations of monomer to the postmitochondrial supernatant liquid of the liver of experimental animals. Stimulation of the lipids peroxidation effect was noted only as a result of the acute intoxication by poison in investigated organs.

---

**Keywords:** acrylamide, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase.

*Tarskikh M.M. – candidate of medical sciences, neurologist of the highest category, e-mail: mtarskih@mail.ru  
Kolesnikov S.I. – counselor of the Presidium of SB RAMS, academician of RAMS*