

УДК 615.015.12

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ АКРИЛАМИДА НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ГЕПАТОЦИТОВ МЫШИ

Каримов Д.Д., Кудояров Э.Р., Каримов Д.О., Мухаммадиева Г.Ф., Кутлина Т.Г., Валова Я.В.

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

Акриламид является широко распространённым токсикантом с генотоксической и прооксидантной активностью, способный нарушать функции почек, печени и нервной системы. Акриламид относится к группе токсикантов класса А2, однако эффекты генотоксического действия на клетки печени изучены недостаточно. В статье представлены результаты экспериментов на клеточной культуре гепатомы мышей с метаболической активацией микросомальных ферментов. Согласно полученным результатам, активация ферментов печени с использованием ПХБ не оказывает влияния на генотоксическую активность акриламида.

Ключевые слова: акриламид, ДНК-кометы, генотоксичность

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

EVALUATION OF ACRYLAMIDE GENOTOXICITY IN MOUSE HEPATOCYTE CELL CULTURE

Karimov D.D., Kudoyarov E.R., Karimov D.O., Mukhammadieva G.F., Kutlina T.G.,
Valova Ya.V.

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russia

Acrylamide is a widespread toxicant with genotoxic and prooxidant activity that can damage functions of kidneys, liver and nervous system. Acrylamide belongs to the A2 class of toxicants, however, genotoxic effects on liver cells are not well understood. The article presents the results of experiments on cell culture of mouse hepatoma with metabolic activation of microsomal enzymes. According to the results obtained, the activation of liver enzymes using PCB does not affect the genotoxic activity of acrylamide.

Key words: acrylamide, DNA comets, genotoxicity

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Акриламид (2-пропенамид, АА) – амид акриловой кислоты, относится к группе токсикантов класса А2. Акриламид способен связываться с белками, в т.ч. с ферментами антиоксидантной системы, что способствует развитию окислительного стресса клетки. Поражает нервную систему, почки, печень, попадая в кровоток связывается с гемоглобином [7].

В печени АА окисляется цитохромом СYP2E1 до эпоксида глицидамида (ГА), который в свою очередь гидролизует ферментом эпоксидгидролазой. ГА способен ковалентно связываться с ДНК [4]. По некоторым данным именно ГА опосредует токсичность АА. Например, было показано, что СYP2E1-дефицитные мыши значительно меньше страдают от отравления АА [2].

В природе АА не образуется. Основным источником загрязнения окружающей среды акриламидом является деятельность человека, источником загрязнения служат отходы промышленности и водоочистки. АА также широко используется в лабораторной практике [5]. В организм человека обычно попадает с пищей. АА образуется при термической обработке продуктов питания как побочный продукт реакции Майяра между аминок группой аспарагина и гидроксильными группами углеводов при температуре выше 180 градусов [6]. Основным продуктом реакции являются меланоидины, придающие характерный вкус и цвет жареным продуктам (мясо, рыба, хлеб) [Vandarra S. et al., 2013]. Ещё одним источником поступления АА в организм является сигаретный дым [10].

Материалы и методы исследования. В эксперименте использовалась культура клеток гепатоцитов мыши МН324. Культивирование осуществлялось в среде Игла (ИЕМ).

Для выявления генотоксического эффекта акриламида были приготовлены 0.1мМ, 0.2мМ, 1мМ и 10мМ растворы акриламида в питательной среде. Инкубация клеток в среде, содержащей акриламид проводилась в стандартных 24-луночных планшетах.

Выявление генотоксичности акриламида производилось как без активации ферментов микросомальной системы, так и с активацией. Инкубация клеток без активации микросомальной системы проводилась в двух повторностях в средах, содержащих 1мМ и 10мМ акриламида на протяжении 4х часов. Активация ферментов микросомальной системы производилась путём добавления в питательную среду клеток смеси ПХБ на 24 часа. После активации производилась замена среды на содержащую акриламид в концентрациях 0,2мМ, 1мМ и 10 мМ. Инкубация клеток в среде, содержащей акриламид проводилась также в течение 4х часов. Также был проведён эксперимент по длительной инкубации клеток (72 часа) в среде, содержащей 0.1мМ, 0.2 мМ и 1 мМ акриламида в отсутствие активации ферментов микросомальной системы.

Для визуализации целостности ДНК использовали метод ДНК-комет [8]. Анализ проводился в соответствии с методическими рекомендациями МР 4.2.0014-10 «Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет IN VITRO». Микропрепараты исследовали под 100-кратным увеличением на флуоресцентном микроскопе Zeiss Axio Imager.D2 с камерой Axio Cam MRc5, подключенной к компьютеру для сохранения изображений. Оценку процентной доли (среднего содержания) ДНК в хвосте кометы проводили с использованием программы ImageJ 1.48 (Wayne Rasband). Статистическая обработка результатов проводилась в программе StatSoft Statistica 10.0.

Результаты и обсуждение. В эксперименте без активации фракции микросомальных ферментов в контрольной группе среднее содержание ДНК в хвосте кометы составило $9,07 \pm 0,2\%$, в экспериментальных группах, экспонированных в среде, содержащей 1мМ и 10мМ АА среднее содержание ДНК в «хвосте кометы» составило $9,62 \pm 0,35\%$ и $16,22 \pm 0,42\%$ соответственно; показатель хвостового момента для всех групп составлял $4,87 \pm 0,24$, $5,14 \pm 0,4$ и $17,24 \pm 0,87$ соответственно (рис.1). Сравнение групп проводилось с использованием Н-критерия Краскала-Уоллиса, значение критерия при сравнении групп по содержанию ДНК в хвосте составило 200,31, $p < 0,001$, при сравнении момента хвоста составило 187,97, $p < 0,001$. Результаты попарного сравнения групп представлены в таблице 1.

В эксперименте с наличием активации фракции микросомальных ферментов в контрольной группе среднее содержание ДНК в хвосте кометы составило $7,24 \pm 0,35\%$, в экспериментальных группах, экспонированных в среде, содержащей 0,2мМ, 1мМ и 10мМ АА среднее содержание ДНК в «хвосте кометы» составило $7,35 \pm 0,37\%$,

5,82±0,22% и 15,27±0,44% соответственно; показатель хвостового момента для всех групп составлял 3,1±0,69, 3,25±0,45, 2,07±0,21 и 12,09±0,7 соответственно (рис.2). Сравнение групп проводилось с использованием Н-критерия Краскала-Уоллиса, значение критерия при сравнении групп по содержанию ДНК в хвосте составило 443,59, $p < 0,001$, при сравнении момента хвоста составило 556,07, $p < 0,001$. Результаты попарного сравнения групп представлены в таблице 2.

Рис. 1. Оценка содержания ДНК в хвосте «кометы» при краткосрочной экспозиции клеток в среде, содержащей акриламид в отсутствие активации ферментов митохондриальной системы. Показаны средние значения и стандартная ошибка

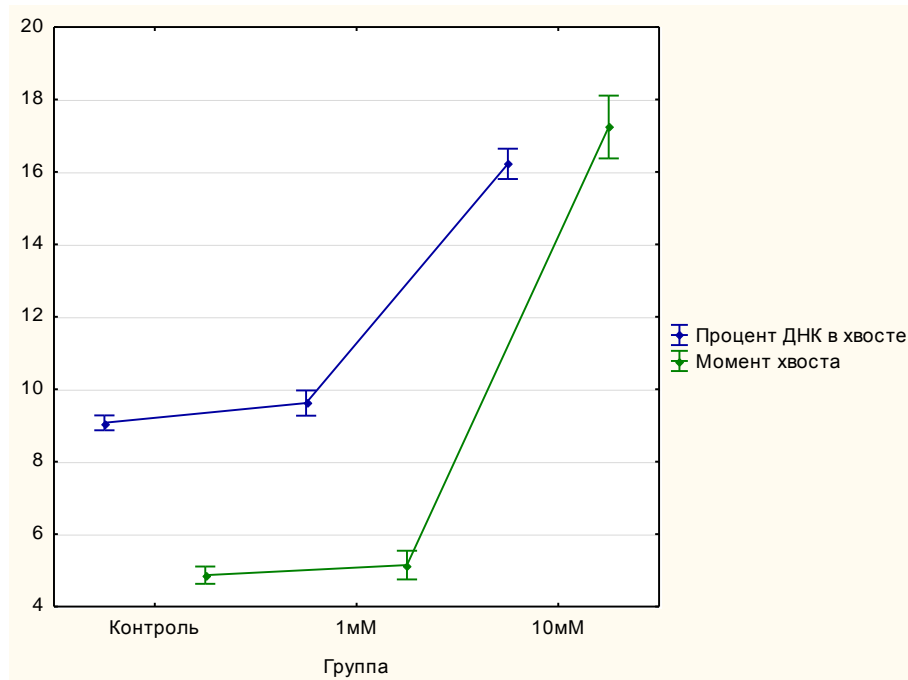


Таблица 1

Оценка значимости различий в содержании ДНК в хвосте «кометы» и хвостового момента между группами при краткосрочной экспозиции клеток в среде, содержащей акриламид в отсутствие активации ферментов митохондриальной системы

Сравниваемые показатели	Момент хвоста		
	Процент ДНК в хвосте	Контроль	0,006018
0,544856		1 мМ	<0,001
<0,001		<0,001	10Мм

При экспозиции клеток в среде, содержащей акриламид, в течение 72 часов в контрольной группе среднее содержание ДНК в хвосте кометы составило 23,78±0,65%, в экспериментальных группах, экспонированных в среде, содержащей 0,1 мМ, 0,2 мМ и 1 мМ АА среднее содержание ДНК в «хвосте кометы» составило 34,19±0,89%, 35,59±1,18% и 30,17±1,43% соответственно; показатель хвостового момента для всех групп составлял 21,2±0,89, 34,41±1,96, 30,39±2,07 и 23,09±0,7 соответственно (рис.3). Сравнение групп проводилось с использованием Н-критерия Краскала-Уоллиса,

значение критерия при сравнении групп по содержанию ДНК в хвосте составило 113,14, $p < 0,001$, при сравнении момента хвоста составило 67,19, $p < 0,001$. Результаты попарного сравнения групп представлены в таблице 3.

Рис. 2. Оценка содержания ДНК в хвосте «кометы» при краткосрочной экспозиции клеток в среде, содержащей акриламид при наличии активации ферментов микросомальной системы. Показаны средние значения и стандартная ошибка

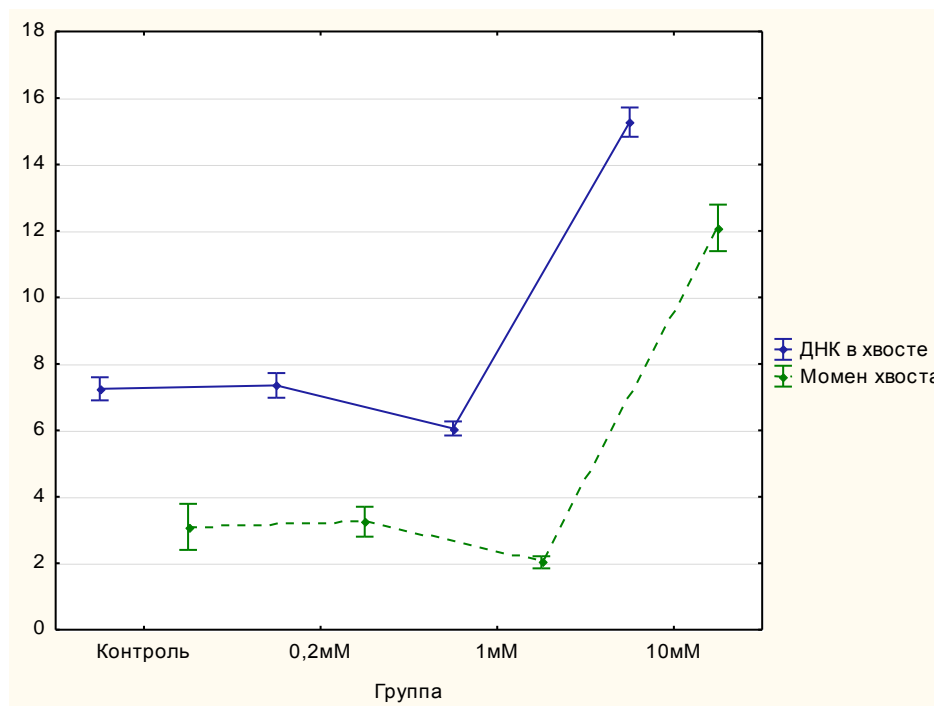


Таблица 2

Оценка значимости различий в содержании ДНК в хвосте «кометы» и хвостового момента между группами при краткосрочной экспозиции клеток в среде, содержащей акриламид при наличии активации ферментов микросомальной системы

Сравниваемые показатели	ДНК в хвосте			
	Момент хвоста	Контроль	1,0000	0,3497
0,0028		0,2Мм	0,1888	$p < 0,001$
0,0136		1,0000	1 мМ	$p < 0,001$
$p < 0,001$		$p < 0,001$	$p < 0,001$	10 мМ

Согласно полученным результатам, акриламид при краткосрочной экспозиции (4 часа) оказывает генотоксическое действие в концентрации 10мМ, независимо от наличия/отсутствия активации ферментов микросомальной системы. При длительной экспозиции (72 часа) в отсутствие метаболической активации генотоксическое действие акриламида наблюдается уже при концентрации 0,1 мМ.

Рис. 3. Оценка содержания ДНК в хвосте «кометы» при долгосрочной экспозиции клеток в среде, содержащей акриламид. Показаны средние значения и стандартная ошибка

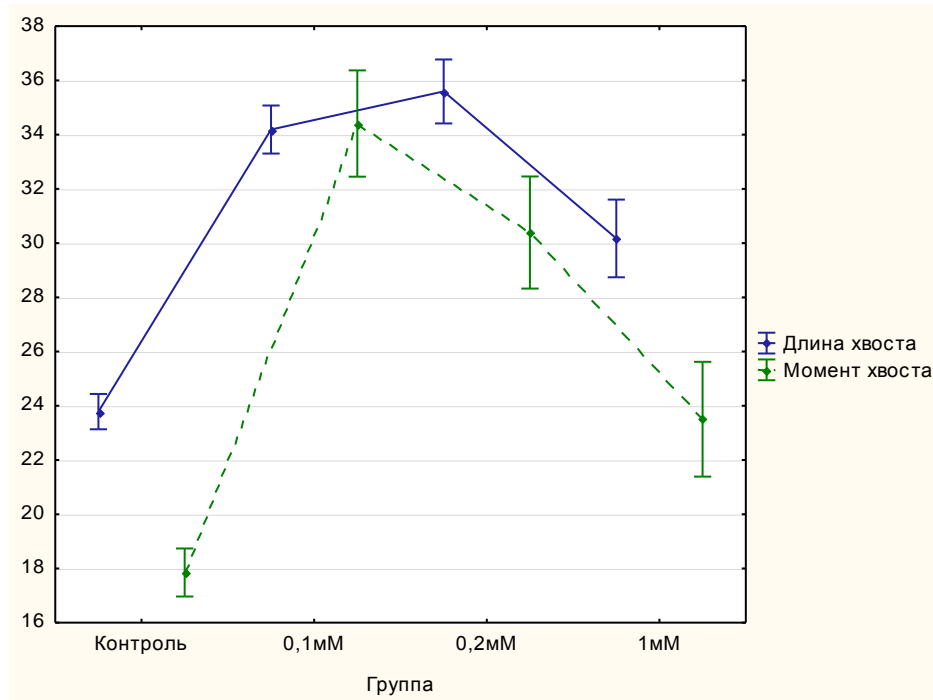


Таблица 3

Оценка значимости различий в содержании ДНК в хвосте «кометы» и хвостового момента между группами при долгосрочной экспозиции клеток в среде, содержащей акриламид

Сравниваемые показатели	ДНК в хвосте			
	Момент хвоста	Контроль	p<0,001	p<0,001
	p<0,001	0,1 мМ	1,0000	0,1638
	0,000003	0,0960	0.2мМ	0,0421
	0,0438	0,0808	1,0000	1 мМ

Проведённое нами исследование показало значительный (в 2 раза) рост повреждений ДНК при экспозиции клеток гепатомы мыши в среде, содержащей 10 мМ акриламида в течение четырех часов. Экспозиция клеток в среде с меньшей концентрацией акриламида не выявило значимого увеличения количества разрывов в ДНК. Длительная экспозиция клеток в среде, содержащей акриламид показала увеличение степени повреждённости ДНК при всех дозах, однако на данный результат повлияло то, что образцы подвергались замораживанию, что не позволяет рассматривать результат как надёжный.

В литературе описана методика получения фракции ферментов микросомальной системы печени S9 из печени грызунов, предварительно обработанных полихлорированными бифенилами. Для исключения трудоемкого этапа выделения фракции, была предпринята попытка активации ферментной системы клеточной линии

гепатоцитов. Метаболическая активация цитохромов не привела к увеличению генотоксичности акриламида. Поскольку значение цитохрома Cyp2E1 для метаболизма акриламида в его более токсичный метаболит глицидамид показана экспериментально [8], можно предположить, что метаболическая активация недостаточно повышает уровень фермента в выбранной клеточной линии.

Выводы: Таким образом, результаты экспериментов показали неэффективность активации микросомальных ферментов культуры гепатоцитов с помощью ПХБ в изучении генотоксического действия акриламида.

Список литературы:

- 1 Информационная записка ИНФОСАН №2/2005 от 1 марта 2005 г. –Акриламид.– 6 с.
- 2 МР 4.2.0014-10. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет in vitro. Методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 15 с.
- 3 Мышкин, В.А., Бакиров А.Б. Оксиметилурацил (очерки экспериментальной фармакологии) / В. А. Мышкин, А. Б. Бакиров. – Уфа, 2001 – 218 с.
- 4 Тарских, М. М. Исследование нейротоксичности акрилатов, акрилонитрила и акриламида / М.М. Тарских // Международный научно-исследовательский журнал. – 2013. – №. 7-5 (14).
- 5 Mechanistic insights into the cytotoxicity and genotoxicity induced by glycidamide in human mammary cells / S. Bandarra, A.S. Fernandes, I. Magro et al // Mutagenesis. – 2013. – Т. 28, №. 6. – С. 721-729.
- 6 Bergmark, E. Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers / E. Bergmark // Chemical research in toxicology. – 1997. – Т. 10, №. 1. – С. 78-84.
- 7 Friedman, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review / M. Friedman // Journal of agricultural and food chemistry. – 2003. – Т. 51, №. 16. – С. 4504-4526.
- 8 Ghanayem, B. I. Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect / B.I. Ghanayem, K.L. Witt, L. El-Hadri et al // Biology of reproduction. – 2005. – Т. 72, №. 1. – С. 157-163.
- 9 <http://toxi.dyndns.org/base/Amid/Amid2/Akrilamid.htm>
- 10 <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/90.html>
- 11 IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS Some Industrial Chemicals VOLUME 60.

Поступила/Received: 05.10.2018
Принята в печать/Accepted: 15.10.2018