

УДК 577. 044 : 577. 053 : 577. 085. 21

© Т. А. Романова

УЧАСТИЕ ЦИТОХРОМ Р450-ЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ В РЕАЛИЗАЦИИ ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АКРИЛАМИДА

Т. А. РОМАНОВА

Красноярский государственный аграрный университет,
660049, пр. Мира 88, факс: (+3912) 27-86-52

Проведен сравнительный анализ нейро-, гепато- и генотоксических эффектов промышленного ксенобиотика акриламида при его однократном введении в организм интактных крыс и в условиях предварительной индукции фенобарбитал (ФБ)- и 3-метилхолантрен (3-МХ)-зависимых изоформ цитохрома Р450. Установлено, что индукция (ФБ)-зависимого цитохрома Р450 усиливает нейро- и гепатотоксические эффекты акриламида, но снижает степень повреждения клеточного генома. В то же время, активация (3-МХ)-зависимого цитохрома не оказывает выраженного влияния на степень токсичности этого ксенобиотика. Токсические эффекты АА реализуются, помимо прочих механизмов, через снижение интенсивности углеводного и энергетического обменов в гепатоцитах. Но в интактном организме эти процессы активизируются раньше, чем в условиях индукции (ФБ)- зависимого цитохрома Р450.

Ключевые слова: акриламид, цитохром Р450, мутагенез, нераспределенная перфузия печени *in situ*, энергетический обмен.

ВВЕДЕНИЕ. Широко применяемый в производстве ряда сополимеров и синтетического каучука амид акриловой кислоты – акриламид (АА) представляет собой мономер высокоэффективного флокулята полиакриламида, который используется в химической, горной, нефтяной, целлюлозно-бумажной, текстильной и других отраслях промышленности. На основе АА и других акрилатов производятся краски, лаки, смолы, органическое стекло, водорастворимые резины и ряд других материалов [1]. По данным ВОЗ [2], в окружающую среду мономер поступает со сточными водами предприятий, выбросами в атмосферу, а также в составе полиакриламида который в ряде случаев применяется для очистки воды.

Результатом поступления АА в организм человека является острое или чаще хроническое отравление (при долговременном поступлении АА в окружающую среду или при нарушениях технологического процесса). ПДК АА в воде составляет 0,01 мг/л, в некоторых странах Европы допускается его миграция в пищевые продукты на уровне 0,2 мг/кг [1].

В основе патогенеза повреждающего действия АА на организм лежат нарушения локального и системного характера. При этом локальному проявлению присущ воспалительный процесс в местах контакта с мономером, а системному - нарушения окислительно-восстановительных реакций в клетках организма, наиболее часто проявляющиеся симптомами повреждения центральной и периферической нервной системы, иммунной системы и ряда функций печени [3]. Как результат системного токсического воздействия АА развивается комплекс клинических проявлений, находящихся в зависимости от дозы, путей и длительности поступления этого вещества в организм.

Ведущим звеном в патогенезе системных повреждений является печеночный метаболизм АА, основанный на стереохимических свойствах его молекулы. Первая стадия биотрансформации этого ксенобиотика в клетке происходит с участием фенобарбитал (ФБ) - зависимого цитохрома (цит) Р450 [4]. Предварительная индукция этого гемопротейна ведет к изменению повреждающих эффектов АА и уменьшению порога связывания с ним мономера. Акриламид, как и все субстраты первого типа, обладает большим сродством к ФБ-индуцируемой изоформе цит Р450, чем к 3-метилхолантрен-(3-МХ) индуцируемой изоформе цит Р448 [5]. Прооксидантное действие АА связано с гидроксилированием последнего до эпоксидного производного - глицидамида [3].

Отличительной особенностью АА является способность индуцировать окислительный стресс за счет усиления продукции свободных радикалов [6]. Пероксидация мембран под действием продуктов свободнорадикального окисления может приводить к нарушению структур и функций ряда мембраносвязанных ферментов. В частности, образующийся оксид азота может ингибировать энергетический метаболизм на уровне транспорта электронов, а также блокировать аконитазу [7]. Кроме того, обладая выраженной тиолотропной активностью, сам акриламид взаимодействует с SH-группами ряда ферментов гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и блокирует активность цит b_2 [8,9]. О генотоксичности АА в половых и соматических клетках млекопитающих в литературе имеются противоречивые данные [10,11].

В работе исследовали характер изменений энергетического метаболизма гепатоцитов под воздействием акриламида, а также роль предварительной индукции цит Р450 в реализации токсических эффектов данного ксенобиотика.

МЕТОДИКА. В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов (150 - 200 г). Акриламид вводили однократно, внутрибрюшинно в дозе 75, 100 и 120 мг/кг массы в виде 5% раствора. Индукцию ФБ-зависимых изоформ цит Р450 осуществляли двукратным внутрибрюшинным введением гексобарбитала в дозе 80 мг/кг массы, а подфракцию цит Р448 индуцировали, вводя подкожно раствор 3-метилхолантрена на растительном масле в дозе 40 мг/кг массы [5]. Состояние центральной нервной системы (клеток коры) и детоксикационной активности печени оценивали в гексеналовом тесте [12].

Степень повреждающего действия АА на хромосомный аппарат клеток оценивали по уровню хромосомных и хроматидных aberrаций в клетках костного мозга крыс при анализе пластинок митотических метафазных хромосом [13].

Скорость выхода лактата и пирувата из гепатоцитов в условиях нерезиркуляционной перфузии печени крыс *in situ* [14] с проведением функциональной нагрузки 10 мМ-ным раствором D-фруктозы (Ф), определяли энзиматически [15] на спектрофотометре "Spekol-122", скорость поглощения кислорода органом - полярографическим методом, концентрацию глюкозы в перфузате с помощью глюкозоанализатора "EKSAN-g" (Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Период снотворного действия гексобарбитала, являющегося субстратом микросомальных оксидаз гепатоцитов, зависит от уровня активности этой ферментной системы, т. е. от детоксикационной функции печени. Введение АА в дозе 75 мг/кг массы за 24 часа до проведения гексеналового теста не изменяло его параметров относительно контроля (табл. 1). Увеличение дозы ксенобиотика до 100 мг/кг ($2/3 LD_{50}$) характеризовалось снижением продолжительности гексеналового сна. Являясь субстратным индуктором цит Р450, АА в такой дозе способен индуцировать ферментную систему детоксикации чужеродных соединений, к которым относится и гексенал. Индукция цит Р450 является необходимым условием проявления гепатотоксичности АА. Уже к 4 часам после его поступления в организм на фоне предварительной индукции цит Р450-зависимой системы биотрансформации ксенобиотиков отмечалось увеличение продолжительности гексеналового сна относительно изолированного введения АА. К 24 часам после поступления АА в организм животных при таком режиме индукции цит Р450 по результатам гексеналового теста развивались не только гепатотоксические, но и нейротоксические эффекты.

Таблица 1. Изменение токсических свойств акриламида при его однократном внутривнутробрюшинном введении в условиях индукции ФБ-зависимой подфракции цит Р450 *in vivo*

| Серия | Время засыпания, мин | Время сна, мин |
|---|----------------------|------------------------|
| Контроль | $2,25 \pm 0,12$ | $17,7 \pm 1,67$ |
| АА, 75 мг/кг | $2,27 \pm 0,17$ | $21,6 \pm 3,17$ |
| АА, 100 мг/кг | $2,83 \pm 0,23$ | $10,25 \pm 3,33$ |
| цит Р450 | $2,69 \pm 1,73$ | $12,6 \pm 2,67$ |
| цит Р450 + АА, 100 мг/кг (тест через 24 ч) | $1,6 \pm 0,21^{**}$ | $33,5 \pm 3,69^{****}$ |
| цит Р450 + АА, 100 мг/кг (тест через 4 ч) | $2,32 \pm 0,13$ | $19,75 \pm 1,6$ |

Примечание: Здесь и далее цит Р450 (Р448) - предварительная индукция цитохромов субстратными индукторами, АА (24, 4 ч) - период между поступлением АА и проведением гексеналового теста. Достоверность различий с контролем * $P < 0,05$, ** $P < 0,02$, *** $P < 0,01$, **** $P < 0,001$.

АА является выраженным индуктором окислительного стресса [4], что было подтверждено нами ранее [16] значительной скоростью образования малонового диальдегида - продукта перекисного окисления липидов при перфузии печени (данные не представлены). Высокая активность предварительно индуцированной системы цит Р450 делает этот процесс еще более интенсивным.

По имеющимся в литературе данным [5], роль цит Р448 в биотрансформации АА незначительна. В наших условиях предварительное введение 3-МХ (индуктора цит Р448) не оказывало влияния на токсичность этого ксенобиотика (данные не представлены).

Адекватно оценить степень токсического воздействия примененного ксенобиотика на организм можно с учетом его влияния на клеточный геном. При метафазном анализе костномозговых пластинок от животных, однократно затравленных АА были обнаружены основные типы aberrаций - хромосомные (прередупликативные) и хроматидные (постредупликативные).

Однократное введение АА в дозе 100 мг/кг веса приводило спустя 24 часа к возрастанию уровня aberrаций хроматидного типа в 3 раза, хромосомного - более чем в 4 раза относительно контроля (при $P < 0,02$) (рис. 1). К 8-м суткам эти показатели лишь незначительно превышали уровень контроля.

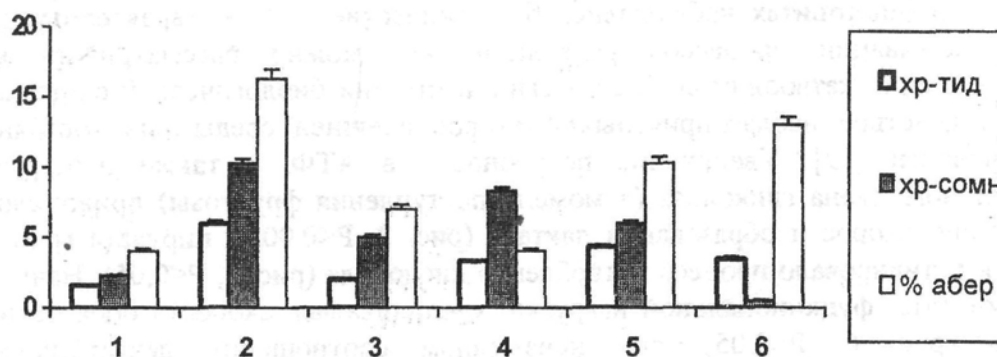


Рисунок 1.

Мутагенная активность акриламида при его поступлении в организм животных в дозах 100 и 120 мг/кг веса. Обозначения: АА-акриламид, 100 (120) мг/кг - доза акриламида в мг на вес животного, 1 сут, 3 сут - период времени между введением акриламида в организм и проведением анализа костномозговых пластинок от затравленных животных,

Хр-тид. - хроматидные aberrации, хр-сомн. - хромосомные aberrации.

По оси абсцисс - 1. Контроль, 2. АА (100 мг/кг) 1 сут, 3. АА (100 мг/кг) 8 сут, 4. АА (120 мг/кг) 1 сут, 5 АА (120 мг/кг) 3 сут, 6. АА (120 мг/кг) 8 сут; по оси ординат - % aberrаций хромосом на 100 исследованных клеток.

Увеличение дозы однократного введения АА до 120 мг/кг веса оказывало влияние иного характера на хромосомный аппарат клеток костного мозга. Через 24 часа уровень хроматидных aberrаций превышал контроль в 2 раза, хромосомных - в 3,6 раза, а общий процент aberrаций на 100 исследованных клеток - в 3 раза. На 3-и сутки число хроматидных aberrаций возрастало, а хромосомных наоборот снижалось, равно как и общий процент aberrаций. К 8-м суткам характер этих значений вновь изменился. Так, уровень хроматидных aberrаций снизился до значений, наблюдаемых на первые сутки после воздействия АА, а хромосомных возрос в 4 раза относительно контроля. При этом общий процент aberrаций превысил контрольное значение в 3 раза.

Поступление АА в организм животных на фоне предварительной индукции цит Р450 гексobarбиталом не приводило к достоверным изменениям уровня контрольных значений данных параметров к 24 часам после токсического воздействия.

Нерециркуляционная безгемоглобиновая перфузия печени позволила выявить характер изменений метаболизма гепатоцитов крыс после однократного воздействия АА в дозе 100 мг/кг.

Так, спустя 4 часа с момента введения АА в гепатоцитах значительно снижалась интенсивность процессов энергетического обмена, а возникающий в момент подачи фруктозы дефицит АТФ [17], способствовал довольно медленной их активации. К окончанию периода функциональной нагрузки увеличивалась скорость образования лактата (рис. 2), пирувата (Рис. 3, $P < 0,05$), возрастало соотношение лактат/пируват (рис. 4, $P < 0,001$), отражающее редокс-потенциал клеток [18]. Но скорость потребления кислорода перфузируемой печенью значимо не менялась (рис. 5), что позволяло нам судить о более выраженных изменениях на участке электротранспортной цепи.

Полученные результаты вполне согласуются с описанными в литературе токсическими эффектами АА. В частности, обладая выраженной тиолотропностью, данный ксенобиотик блокирует активность ряда ферментов ЦТК и электронтранспортной цепи (в частности аконитазу и цит b_2) [7-9].

Через 24 часа после поступления АА в организм экспериментальных животных в гепатоцитах наблюдались биохимические сдвиги, характерные для периода активации процессов репарации, что можно рассматривать как проявление гиперкатаболической стратегии адаптации биологической системы в ответ на действие неблагоприятных факторов внешней среды или состояние резистентности [19]. Увеличение потребности в АТФ, а также перегрузка терминального звена гликолиза (в момент поступления фруктозы) приводило к возрастанию скорости образования лактата (рис. 2, $P < 0,001$), пирувата (рис. 3, $P < 0,02$) и активировало процесс потребления кислорода (рис. 5, $P < 0,05$). Начиная со 2-й минуты функциональной нагрузки, увеличивалась скорость образования глюкозы (рис. 6, $P < 0,05$), при неизменном соотношении лактат/пируват (НАДН/НАД) (рис. 5), что отражает высокие потенциальные возможности процессов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот.



Рисунок 2.

Скорость выделения лактата при перфузии печени крыс *in situ* (мкмоль мин⁻¹ на орган).

Здесь и далее: по оси абсцисс – время перфузии, по оси ординат – скорость выхода метаболита, к – контроль, АА(4) и АА(24) – исследуемые показатели через 4 и 24 часа после введения акриламида

Таким образом, если к 4 часам после поступления АА в организм на фоне предварительной индукции цит Р450 регистрировалась лишь тенденция к удлинению периода сна в гексеналовом тесте, то по результатам перфузии на этот период после воздействия, но без предварительной индукции ФБ-зависимой системы биотрансформации в гепатоцитах значительно снижается интенсивность процессов энергетического обмена. В тоже время, спустя 24 часа после введения АА в организм на фоне индукции цит Р450 проявлялись выраженные гепатотоксические эффекты (согласно параметрам гексеналового теста), а при перфузии печени крыс, получивших АА без предварительной индукции цитохрома, отмечалась повышенная активность процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования.

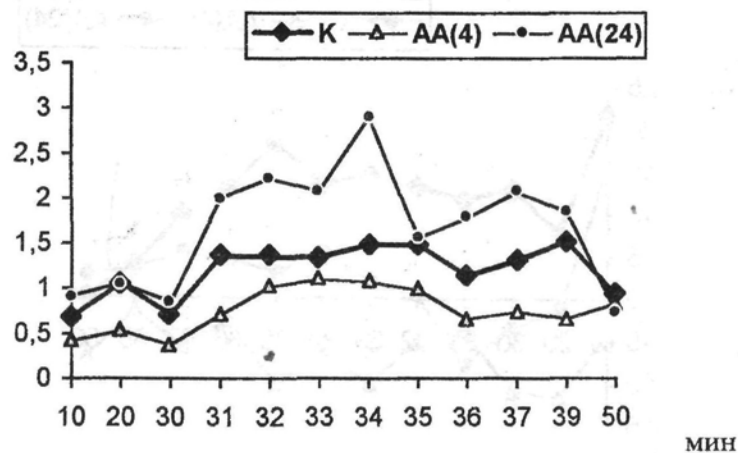


Рисунок 3.
Скорость выделения пирувата при перфузии печени крыс *in situ* (мкмоль · мин⁻¹ на орган).

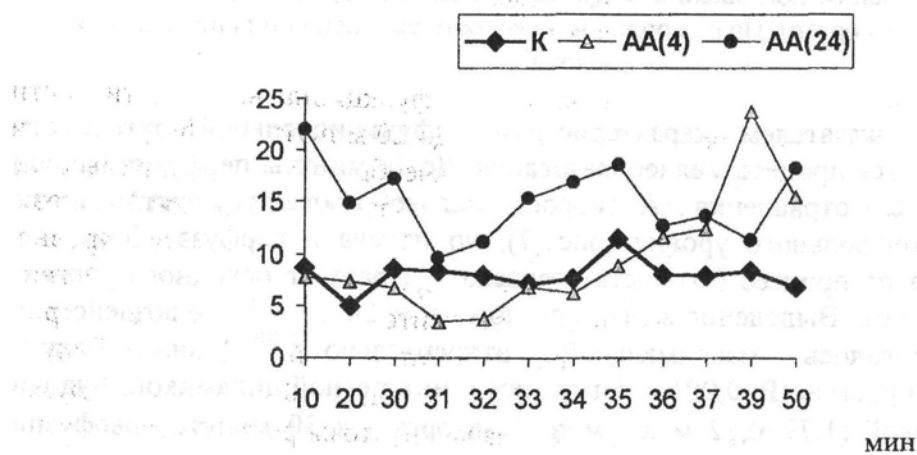


Рисунок 4.
Динамика соотношения лактат/пируват при перфузии печени крыс *in situ*
По оси ординат – соотношение лактат/пируват

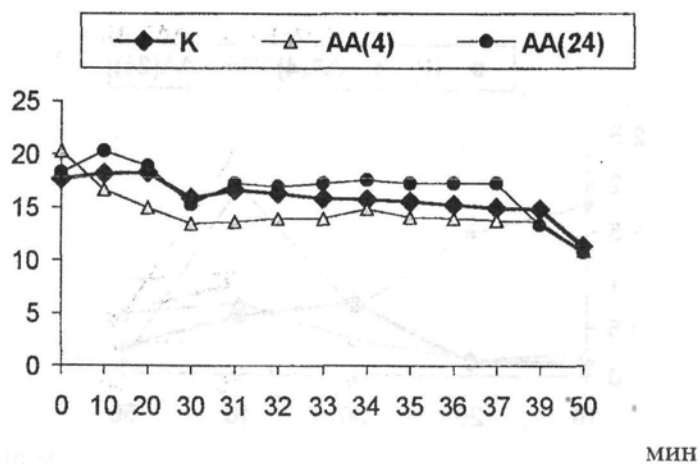


Рисунок 5.
Скорость потребления кислорода печенью *in situ* (мкмоль · мин⁻¹ на орган)
По оси ординат – скорость потребления кислорода

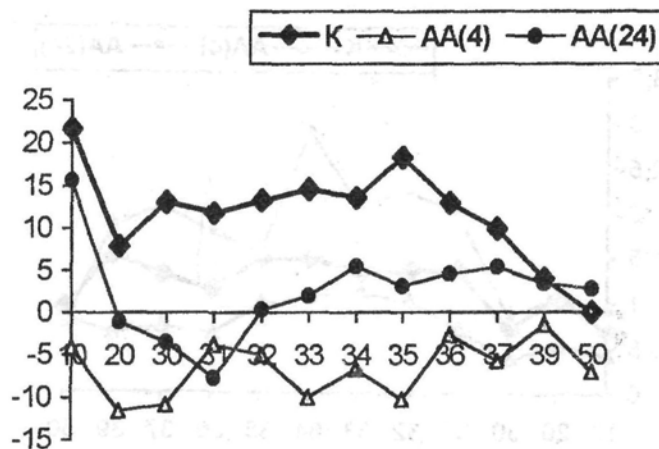


Рисунок 6.

Скорость выделения/поглощения глюкозы печенью крысы при перфузии *in situ* ($\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1}$ на орган). По оси ординат – скорость выделения или поглощения глюкозы

Важным показателем характеристики функциональной активности гепатоцитов является процесс желчеобразования. До 20 минуты перфузии печени крыс на 4 часа после отравления АА, скорость желчеобразования значительно не отличалась от контрольного уровня (рис. 7), но подача в перфузат фруктозы активизировала этот процесс (скорость возросла в 3 раза от исходного уровня, $P < 0,001$ к контролю). Выделение желчи органом через 24 ч после воздействия АА характеризовалось максимальной, относительно минимальных серий эксперимента, скоростью ($P < 0,001$ к контролю) и интересной динамикой. Будучи изначально высокой ($1,79 \pm 0,12$ $\mu\text{мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ на орган) к 30 минуте перфузии выделение желчи снижалось в 2,6 раза, но подача фруктозы резко стимулировала этот процесс. К 50 минуте желчеотделение практически прекращалось. Поступление фруктозы активизировало желчеобразование в гепатоцитах крыс как к 4, так и к 24 часам после поступления АА в организм.

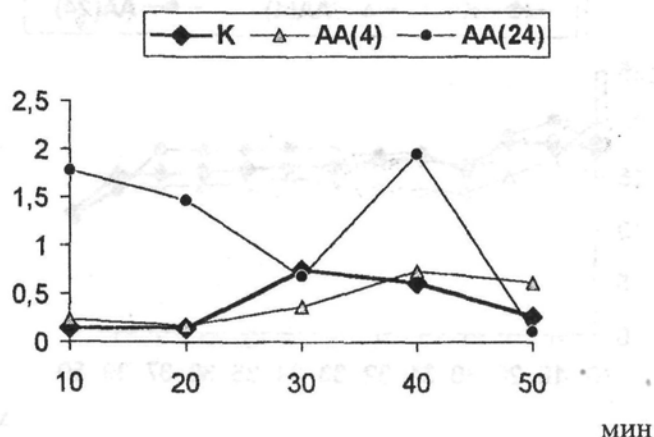


Рисунок 7.

Динамика желчепродукции при перфузии печени крыс *in situ*
По оси ординат - скорость выделения желчи ($\mu\text{мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ на орган).

Следовательно, индукция цит Р450-зависимой системы микросомальных оксидаз играет ведущую роль в токсификации акриламида, в результате чего поступление этого ксенобиотика в организм в дозе 2/3 от LD₅₀ приводит спустя 24 часа к развитию функциональных нарушений центральной нервной системы и снижению детоксикационной активности печени. В тоже время, активация цит Р448 не оказывает выраженного влияния на степень токсичности этого ксенобиотика.

В отношении мутагенности акриламида, предварительная индукция цит Р450 снижает уровень aberrаций хромосомного и хроматидного типов, за счет более быстрой его биотрансформации до менее генотоксичных метаболитов, в то время как исходное вещество обладает значительно большей способностью к повреждению клеточного генома [11], что и было подтверждено нашими исследованиями.

Сравнение результатов, полученных в гексеналовом тесте и при перфузии печени позволяет заключить, что токсические эффекты АА реализуются, помимо прочих механизмов, через снижение интенсивности углеводного и энергетического обменов в гепатоцитах. Но, в интактном организме эти процессы активизируются раньше, чем в условиях предварительной индукции ФБ-зависимого цх Р450 и к 24 часам интенсивность энергетического метаболизма достигает высокого уровня, что может обеспечить эффективную репарацию поврежденных структур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Румянцев Г. И., Козеева Е. Е., Новикова С. М. (1981) Гигиена и санитария № 12, 58-60 (58)
2. Акриламид. Всемирная организация здравоохранения (1989) - Женева.
3. C. J. Calleman, E. Bergmark et al. (1990) Chem. Res. Toxicol. **3**, 406-411
4. Котловский Ю.В., Иванов В.В. (1987) Вопр. мед. химии. **33**. № 1, 96-100
5. Котловский Ю.В. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. (1990) Красноярск, 27 с.
6. Тарских М.М., Большаков С.В., Лужнов Ю.П. и др. (1988) В кн Механизмы патологических реакций. Томск: Изд-во томского ун-та. **5**. С. 156-159
7. В. С. Новикова (ред.) Программированная клеточная гибель / Спб.: Наука, (1996).
8. Aydin O., Ari G. (1990) Photochem. and Photobiol. **51**. N 6. P. 725-731
9. Кулис Ю.Ю., Швирмицкас Г.-Ю.С., Антанавичус В.С. (1982) Биохимия **Вып. 4**, 582-586.
10. Barfknecht T. R., Mecca D. J., Naismith R. W. (1988) Environ. Mol. Mutagens., **11**. Suppl. N 11, 9-17
11. Calleman C.J., Bergmark E., et al. (1993) Environ. Health Perspect. **99**. 221- 225
12. Сперанский С.В. (1980) Гигиена и санитария. № 7. 50-52
13. МакГрегор Г., Варли Д. (1986) Методы работы с хромосомами животных / Пер. с англ. - М.: Медицина.
14. Hems R., Ross B. D., Berry M. N., Krebs H. A. (1966) Biochem. J., **101**, 284-292

15. М.И.Прохорова (ред) Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен).. (1982) Л.: Изд-во Ленинградского университета, 327 с.
16. Винокуров А.П., Рупенко А.П., Романова Т.А. и др. (1996) В сб. Коррекция гомеостаза: Матер. 7-го Всерос. симпоз., Красноярск, март, 1996. Красноярск, С. 148-149
17. Ньюсхолм Э., Старт К. (1977) Регуляция метаболизма. М.: Мир.
18. Singh S.P., Snyder A.K. (1982) J. Lab. Clin. Med. **99**, 746-754.
19. Кулинский В. И., Ольховский И.А. (1992) Успехи соврем. биологии. **112**, 697-714

Поступила 11.05.99.

INVOLMENT OF CYTOCHROME P-450 BIOTRANSFORMATION SYSTEM IN THE MECHANISMS OF TOXIC EFFECTS OF ACRYLAMIDE.

T.A. ROMANOVA

Krasnoyarsk State Agricultural University,
Prospekt Mira 88, Krasnoyarsk, 660049, Russia, fax: (+3912) 27-86-52

Neuro-, hepato- and geno-toxic effects of the industrial xenobiotic, acrylamide, were studied in intact rats and in rats with induced phenobarbital- and 3-methylholanthren-dependent isoforms of cytochrome P-450. The induction of the first isoform increased neuro- and hepato-toxic effects of acrylamide and decreased the extent of cell genome damage. Activation of the 3-methylholanthren-dependent cytochrome had no influence on the toxicity of this xenobiotic. Realisation of toxic effects of acrylamide may involve a decrease of the carbohydrate energy metabolism, but in the intact organism these processes precede the induction of the phenobarbital-dependent cytochrome P450.

Key words: acrylamide, P450, mutagenesis, nonrecirculating perfusion of the liver *in situ*.