

МОДИФИЦІРУЮЩИЙ ЕФФЕКТ ТРИАДИМЕФОНА НА РАЗВИТИЕ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ СОСТОЯНИЙ И ОПУХОЛЕЙ В МУЛЬТИОРГАННОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ У КРЫС

Н.Н.Недопитанская, Е.А.Баглей, Е.В.Решавская, В.С.Лисовская, Л.В.Ткаченко

ГП «Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л.И.Медведя МЗ Украины», г. Киев, Украина

РЕЗЮМЕ. На протяжении жизни организм человека подвергается воздействию множества канцерогенов окружающей среды, которые могут иницировать канцерогенез в различных органах. Значительное место среди этих канцерогенов принадлежит нитрозосоединениям. Триадимефон относится к химическому классу триазолов, которые широко используются как фунгициды в пестицидах и лекарственных средствах.

Цель работы – изучить влияние триадимефона на развитие предопухолевых состояний тканей и опухолей при канцерогенезе, инициированном в различных органах нитрозосоединениями.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на крысах-самцах Wistar Han, у которых нитрозосоединениями – нитрозодизетиламином, метилнитрозомочевинной, нитрозобис(2-гидроксипропил)-амином был инициирован мультиорганный канцерогенез согласно протоколу N.Ито. Триадимефон в дозах: 16,0 и 80,0 мг/кг массы тела, которые соответствовали недействующему и действующему уровню по канцерогенному эффекту, внутривенно вводили ежедневно в течение 20 недель. На протяжении эксперимента проводились клинические исследования. Оценивались общее состояние животных, их масса и её прирост. После некропсии проводилось макроскопическое, включая аберрантные мультикрипты слизистой толстой кишки, и гистологическое исследование. В печеночной ткани гистохимически определялись положительные на γ -глутамилтранспептидазу (γ -ГТП) узелки.

Результаты. Клинических признаков токсического действия триадимефона на организм крыс, инициированных к канцерогенезу нитрозосоединениями, не установлено. По изменению массы внутренних органов, за исключением печени, не выявлено специфического органотропного действия триадимефона. В высокой дозе обнаружено увеличение массы печени, а также количества и размеров γ -ГТП-положительных узелков, что свидетельствует об увеличении пула трансформированных гепатоцитов.

При гистологическом исследовании внутренних органов были выявлены пролиферативные процессы, которые являются критериями маркерами канцерогенности химических веществ при изучении их на мультиорганной модели. Установлена тенденция увеличения частоты аденом щитовидной железы в зависимости от дозы. Выявлено увеличение случаев гиперплазии эпителия пищевода и преджелудка, предстательной железы, а также общей частоты доброкачественных опухолей различных органов у животных, которые получали триадимефон в опухолеобразующей дозе. Частота злокачественных опухолей у этих животных не отличалась от контроля.

Выводы. Триадимефон в опухолеобразующей дозе проявляет слабый промоторный эффект развития предопухолевых состояний тканей щитовидной железы, печени, пищевода и преджелудка, предстательной железы, а также развития доброкачественных опухолей у крыс, инициированных канцерогенными нитрозосоединениями. Установленный в хронических экспериментах недействующий уровень триадимефона по онкогенному эффекту обеспечивает его безопасность при воздействии на организм инициированных канцерогенными нитрозосоединениями крыс. Разработанные на основании этого показателя регламенты обеспечивают онкобезопасность его применения человеком.

Ключевые слова: мультиорганный канцерогенез, канцерогенные нитрозосоединения, триадимефон, триазолы, пролиферативные процессы, предопухолевые состояния, крысы-самцы Wistar Han.

Ежегодный рост онкологической заболеваемости и смертности населения остается актуальной проблемой в мире, которая в той или иной степени связана с действием канцерогенных факторов окружающей среды, в быту и производстве. Среди этих факторов, по эпидемиологическим данным, также и применение пести-

цидов [1, 2]. Согласно международным и национальным стандартам действующие вещества проходят обширные и тщательные испытания, в том числе и на канцерогенность, с целью их безопасного использования [3]. Можно полагать, что выявленный в эпидемиологических исследованиях канцерогенный эффект возни-

кает при обстоятельствах, которые были не учтены протоколом этих испытаний, а именно — совместном воздействии на организм человека пестицидов и других веществ.

В настоящее время доказано, что канцерогенез — многостадийный процесс, в котором наиболее обобщёнными стадиями являются: инициация, промоция и прогрессия. Трансформация нормальных стволовых клеток в опухолевые происходит на стадии инициации под влиянием различных экзогенных и эндогенных факторов. Среди экзогенных факторов значительное место занимают химические вещества. Такие вещества могут инициировать канцерогенез в различных органах, а пестициды действовать на других стадиях, в качестве промоторов этого процесса, создавая условия для селекции и пролиферации стволовых клеток опухолей [4, 5].

Огромный ассортимент токсикантов и масштабов их применения в деятельности человека, а также загрязнение окружающей среды усложняет идентификацию инициаторов. Поэтому была предложена экспериментальная модель, в которой инициация проводилась в различных органах хорошо изученными канцерогенными нитрозосоединениями, как наиболее вероятными факторами, которые могут образоваться при выращивании сельскохозяйственной продукции и приготовлении продуктов питания [6, 7].

Триадимефон (1-(4-хлорфенокси)-3,3-диметил-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил) бутанон, CAS 43121-43-3) принадлежит к химическому классу триазолов. Биологическое действие этого вещества заключается в ингибировании синтеза стероидов, нарушении функции клеточных мембран, что обеспечивает лечебный и длительный защитный фунгицидный эффект [8].

Целью настоящей работы было изучить влияние триадимефона на развитие предопухолевых состояний тканей и опухолей при канцерогенезе, инициированном в различных органах нитрозосоединениями.

Материалы и методы. Эксперимент проведен в Центре превентивной и регуляторной токсикологии Государственного предприятия «Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л.И.Медведя Министерства здравоохранения Украины» в соответствии с требованиями GLP. Исследования соответствуют требованиям комиссии биоэтики о гуманном обращении с животными, законодательству Украины и международных организаций.

В эксперименте использовались 45 белых крыс-самцов Wistar Han (SPF), массой $130 \pm 5,8$ г, которые были получены из питомника центра. После карантина и рандомизации животные были разделены на три группы. Контрольная группа (1) и подопытные группы (2, 3) по 15 особей каждая.

Согласно протокола (рис. 1) всем животным вводился нитрозодиэтиламин (NDEA) 98 %, в дозе 100 мг/кг м.т., затем 4кратно — N-метил- N-нитрозо мочевины (MNU) 98%, в дозе 20 мг/кг м.т. N-нитрозобис(2-гидроксипропил)амин (NDHPA) 98 %, с питьевой водой в виде 0,1 % раствора. Все канцерогены производства компании TRC, Канада.

Триадимефон 97% — генерик производства компании China Communications Import & Export Corporation, China, предоставленный частным предприятием «Кемилайн Агро», Украина, соответствовал существующим международным стандартам [9]. Вещество вводилось крысам внутривентрикулярно в дозах 16,0 и 80,0 мг/кг м.т. в сутки в течение 20 недель. В соответствии с литературными данными токсикологической оценки прототипа этого вещества выбранные дозы соответствуют недействующей и действующей дозам по онкогенному эффекту [8].

Растворы исследуемого продукта готовились ежедневно, *ex tempore*, в виде водной суспензии триадимефона с ОП-10. Концентрация растворов: для низкой дозы готовился 0,16%-й водный раствор, для

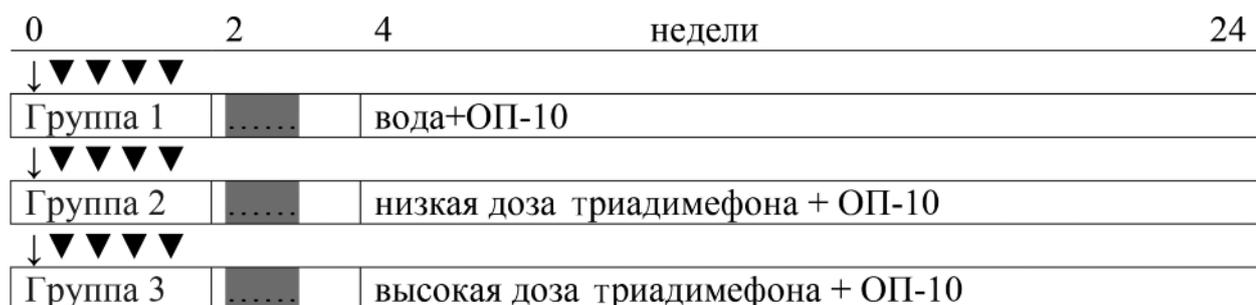


Рис. 1. Схема опытов, где ↓ – внутрибрюшинная инъекция 100 мг/кг NDEA;
▼ – внутрибрюшинная инъекция 20 мг/кг MNU;
..... – добавление в питьевую воду 0,01 %-ного раствора NDHPA;
..... – внутрижелудочное введение тест-субстанции.

высокой – 8,0 %-й. Концентрация растворов подбиралась с учетом вводимого объема жидкости в желудок крысы. Контрольным животным вводили воду с ОП-10 (0,05%).

Животные содержались в «чистой» зоне вивария барьерного типа по 5 особей в клетке. Для подстилки использовалась стерильная не хлорированная пищевая бумага. Комната была обеспечена принудительной вентиляцией (12 объемов в час) подготовленным воздухом. Температура и относительная влажность воздуха соответствовали 19-21°C и 53-56 %. Освещение комнат – лампы дневного света (12 часов света, 12 часов темноты). На протяжении эксперимента животные получали сбалансированный гранулированный корм Альтромин (Германия) и обеззараженную фильтрованную воду.

В ходе эксперимента проводился ежедневный осмотр животных с целью выявления каких-либо отклонений, связанных с действием вещества, а именно: поведение, подвижность, аппетит, состояние шерстного покрова, кожи и слизистых оболочек животных. Учитывались такие показатели, как выживаемость, динамика массы тела, прирост массы тела, которые регистрировались в течение экспозиции каждую неделю. Тогда же и проводилась коррекция доз триадимефона.

Через 24 часа после последнего введения исследуемого вещества проводилась

эвтаназия крыс в CO² камере. Все животные подвергались патологоанатомическому вскрытию. Для определения массы внутренних органов извлекались следующие органы: головной мозг, гипофиз, обе доли щитовидной железы с парашитовидной железой, легкие, сердце, печень, поджелудочная железа, пара надпочечников, пара почек, селезенка, предстательная железа и пара семенников. Определялась их абсолютная и относительная масса. Обе доли щитовидной железы взвешивались одновременно. Парные органы: почки, надпочечники и семенники взвешивались одновременно левый и правый орган пары. Легкие и печень взвешивались со всеми долями, каждый орган в отдельности. Относительная масса органа определялась по процентному отношению к массе тела животного и выражалась в % .

Все тонкостенные полостные органы, в частности: пищевод, желудок, кишечник и мочевой пузырь, предварительно промывались и фиксировались полностью. После необходимого уплотнения в растворе фиксатора вся слизистая с помощью бинокулярного стереомикроскопа исследовалась на наличие папиллом и других новообразований, а в толстой кишке – на предмет аберрантных мультикрипт, предварительно окрашивая слизистую метиленовым синим [10].

Для последующего гистологического исследования, независимо от изменений,

обязательно извлекались: щитовидная железа, образцы ткани легких, печени, надпочечных желез, почек, материал из двух отделов желудка, пищевода, прямой кишки, предстательной железы, мочевого пузыря. Гистологические препараты готовили общепринятыми в морфологических исследованиях методами с окрашиванием срезов гематоксилин-эозином.

Для гистохимического анализа сразу после вскрытия отбирались образцы печени. С отобранных образцов при помощи микротом-криостата готовились срезы толщиной 5 мкм. После фиксации срезов в холодном ацетоне проводилась гистохимическая реакция по определению γ -ГТП – маркера трансформированных гепатоцитов [12]. В ткани печени в ходе трансформации клеток образуются γ -глутамил-транспептидаза положительные узелки. Стандартизированные на условную единицу (см^2) общая площадь, количество и размеры данных узелков являются основными критериями в определении промоторной активности исследуемого продукта. После проведенной гистохимической реакции осуществлялась статистическая обработка выявленных узелков. Подсчитывались количество и площадь узелков на условную единицу (см^2) плоскости среза печени. Для определения количества и площади узелков на срезе печени использовалась специальная компьютерная программа.

Статистический анализ результатов эксперимента проведен для следующих показателей: масса тела и её прирост, масса внутренних органов, количество случаев выявленной патологии при макроскопических и гистологических исследованиях, а также показатели гистохимических исследований (стандартизированная на см^2 среза суммарная площадь и общее количество узелков, а также средняя площадь узелка). Определяли средние величины или медиану на группу и стандартное отклонение. Устанавливали закон распределения данных в выборке методами Колмогорова и Шапиро-Уилкинсона.

Для выявления различий между экспериментальными группами животных и контролем при нормальном распределении переменных использовался параметрический двусторонний t -критерий Стьюдента для независимых выборок, а при отсутствии такового – непараметрические критерии – Крускала-Уоллиса (ANOVA) и Манна Уитни.

Анализ частоты опухолей и других патогистологических изменений проводился с помощью критерия χ^2 или одностороннего точного критерия Фишера. Зависимость эффекта от дозы препарата определялась с помощью регрессионного анализа. Разница между показателями контрольных и экспериментальных животных была достоверной при $p \leq 0,05$ [3].

Статистические расчеты проводились с применением пакета компьютерных программ Excell 2010, «Statistica 2010».

Результаты и обсуждение. На протяжении всего периода экспозиции в подопытных группах не наблюдалось гибели животных. Поведение, внешний вид, двигательная активность у большинства крыс не изменялись. Животные охотно поедали корм и потребляли воду. В группе 3 у 4-х особей (27 %) за это время наблюдения была отмечена повышенная возбудимость и снижение массы тела. При сравнительной оценке динамики роста (рис.2) крысамцов Wistar Han в условиях эксперимента наблюдалось некоторое повышение массы тела животных, получавших тридимефон в дозе 16 мг/кг ($p \leq 0,05$). У тех особей, которые получали низкую дозу, начиная с 9 недели и до конца эксперимента масса тела была на 5-6% выше, чем в контрольной группе.

Статистически достоверных изменений массы тела животных, которые получали высокую дозу, не выявлено, хотя отмечается тенденция к её снижению на 1-4 %%. Кумулятивный прирост массы тела не опускался ниже контрольного значения.

После эвтаназии в ходе наружного осмотра животных в опытных группах не

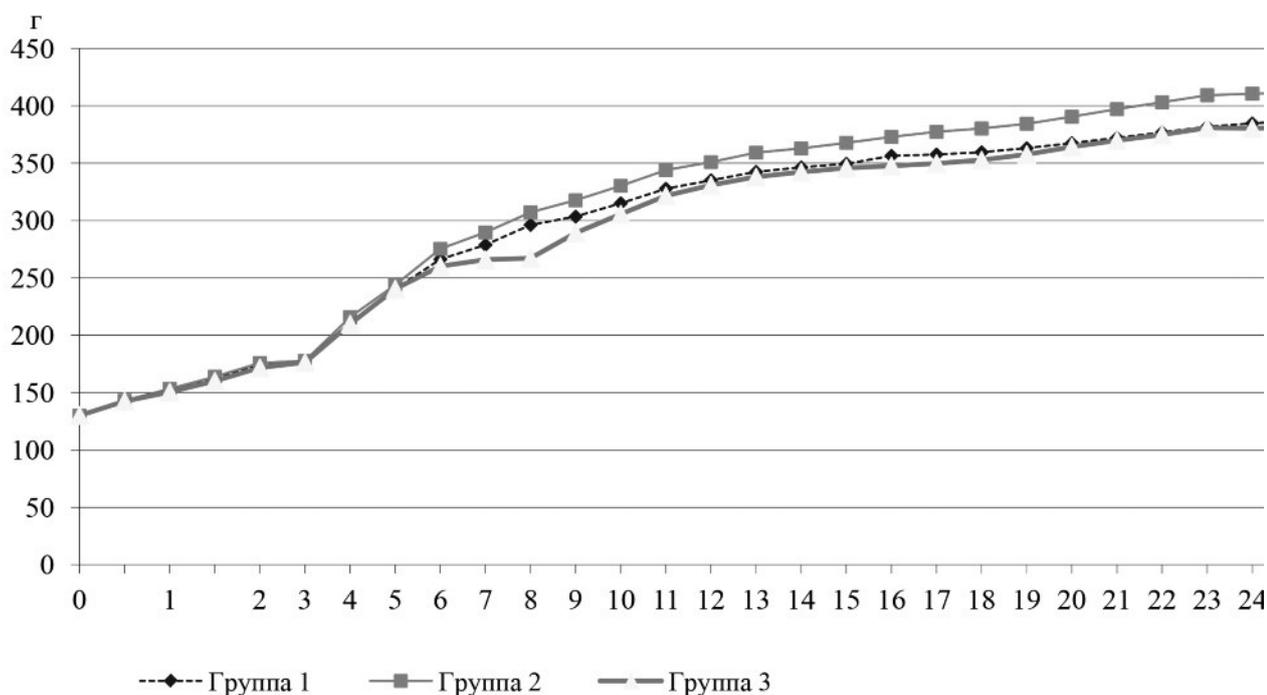


Рис. 2. График массы тела животных:
Группа 1 – контроль;
Группа 2 – доза триадимефона 16,0 мг/кг;
Группа 3 – доза триадимефона 80,0 мг/кг.

обнаруживались какие-либо отличия внешнего вида по сравнению с контролем. По данным аутопсии у крыс появились немногочисленные случаи макроскопических изменений состояния внутренних органов и тканей по сравнению с контролем. По одному случаю очагов aberrantных крипт в прямой кишке выявлено у животных первой и третьей групп.

При сравнительном анализе абсолютной и относительной массы головного мозга, сердца, лёгких, щитовидной, поджелудочной, предстательной желез, почек и семенников у подопытных крыс при сравнении с контролем статистически достоверных изменений не обнаруживалось (табл. 1).

Вместе с тем установлено статистически достоверное увеличение по сравнению с контролем абсолютной массы гипофиза в низкой и высокой дозах соответственно на 29 и 43 %, а также надпочечников – на 20 и 15 %. Изменений относительной массы гипофиза не наблюдалось. Относительная масса надпочечников изменялась

подобным образом. Увеличение абсолютной массы надпочечников не сопровождалось гистологическими изменениями в их структуре. Предполагается, что данный эффект связан со стрессом, обусловленным совместным введением канцерогенов и триадимефона.

Обнаружено статистически недостоверное дозозависимое увеличение абсолютной (5 и 10,5 %) массы печени. Однако относительная масса в низкой дозе не изменялась по сравнению с контролем, а в высокой – увеличилась на 12 % ($p \leq 0,05$).

Таким образом, изменения массы внутренних органов, за исключением печени, не выявили специфического органотропного действия триадимефона. Изменения массы печени свидетельствуют о гепатотоксическом эффекте триадимефона, который описан в литературе [8].

В многочисленных экспериментальных исследованиях установлено, что NDEA и MNU являются гепатоканцерогенами [6]. В ткани печени при пролиферации и селекции клонов, трансформированных

Масса внутренних органов крыс

Орган	Группа 1, доза 0,0 мг/кг (n = 15)		Группа 2, доза 16,0 мг/кг (n = 15)		Группа 3, доза 80,0 мг/кг (n = 15)	
	Абсолютная масса, г	Относитель- ная масса, %	Абсолютная масса, г	Относитель- ная масса, %	Абсолютная масса, г	Относитель- ная масса, %
Гипофиз	0,007±0,002	0,002±0,0005	0,009±0,001*	0,002±0,0004	0,010±0,002	0,003±0,0005*
Головной мозг	1,94±0,08	0,50±0,04	2,00±0,10	0,48±0,05	1,98±0,10	0,50±0,04
Щитовидная железа	0,026±0,005	0,007±0,007	0,030±0,007	0,007±0,007	0,029±0,006	0,007±0,007
Лёгкие	1,22±0,16	0,31±0,03	1,35±0,21	0,32±0,04	1,30±0,10	0,34±0,03
Сердце	1,01±0,13	0,26±0,03	1,06±0,12	0,25±0,03	1,01±0,13	0,26±0,04
Печень	14,56±2,02	3,69±0,37	15,28±1,94	3,65±0,35	16,10±2,20	4,15±0,38*
Надпочеч- ные железы	0,059±0,01	0,015±0,002	0,071±0,01*	0,017±0,002*	0,068±0,01*	0,018±0,002*
Почки	2,46±0,24	0,63±0,05	2,53±0,28	0,60±0,04	2,48±0,30	0,64±0,04
Селезенка	0,66±0,09	0,17±0,02	0,72±0,12	0,17±0,02	0,73±0,15	0,19±0,04
Поджелудоч- ная железа	0,57±0,19	0,15±0,03	0,61±0,12	0,16±0,02	0,60±0,08	0,16±0,02
Предстатель- ная железа	0,47±0,09	0,12±0,02	0,52±0,14	0,12±0,03	0,50±0,12	0,13±0,03

Примечание: * Статистически достоверное различие по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

канцерогеном клеток, образуются пренеопластические локусы, а впоследствии — гиперпластические узелки. Трансформированные канцерогенами клетки экспрессируют фермент γ -глутамилтранспептидазу (γ -ГТП), который является гистохимическим маркером пренеопластических изменений. Количество и размеры гиперпластических γ -ГТП положительных узелков в ткани печени — главные критерии в определении промоторной активности исследуемого соединения. В табл. 2 представлены данные о влиянии триадимефона на образование и рост γ -ГТП положительных узелков в ткани печени крыс.

При оценке показателей γ -ГТП-активных узелков в печени крыс использовались методы непараметрической статистики,

так как выборка полученных результатов не подчинялась закону нормального распределения. Для более точного сравнения показателей с контролем, наряду со средними значениями определялись медианы полученных данных. Сравняя медианы с контролем, обнаружено статистически достоверное увеличение средней площади положительных на γ -глутамилтранспептидазу узелков в печени на 51 % у животных, получавших триадимефон в дозе 80 мг/кг ($p \leq 0,01$). Средняя общая площадь узелков на см^2 и среднее количество узелков на см^2 статистически достоверно не изменялось, но увеличивалось по сравнению с контролем на 99 и 67 % соответственно. Такое увеличение, на наш взгляд, является биологически значимым. На фоне этих

Количество и размеры гиперпластических γ -ГТП-положительных узелков в печени крыс

Статистические параметры	Количество узелков/см ²	Площадь узелков, мм ² /см ²	Средняя площадь узелков, мм ²
<i>Группа 1, доза 0,0 мг/кг (n = 9)</i>			
M±SD	93,34±68,81	0,76±0,67	0,007±0,003
Медиана	76,08	0,64	0,007
<i>Группа 2, доза 16,0 мг/кг (n = 10)</i>			
M±SD	80,25±72,06	0,63±0,51	0,008±0,002
Медиана	71,01	0,48	0,008
% среднего от контроля	86	83	113
% медианы от контроля	93	75	112
p, тест Крускал Уоллиса	0,34	0,13	—
p, тест Манна-Уитни	—	—	0,22
<i>Группа 3, доза 80,0 мг/кг (n = 10)</i>			
M±SD	134,53±71,90	1,42±0,88	0,0102±0,002*
Медиана	126,87	1,27	0,0103
% среднего от контроля	144	187	151
% медианы от контроля	167	199	151
p, тест Крускал Уоллиса	0,34	0,13	—
p, тест Манна-Уитни	—	—	0,01*

Примечание: * Статистически достоверное различие по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

результатов у животных, получавших низкую дозу триадимефона, значения вышеприведенных показателей не отличались от контроля.

Таким образом, триадимефон в дозе 16 мг/кг не индуцировал увеличения количества γ -ГТП-положительных узелков и их размеров, что позволяет сделать заключение об отсутствии промоторного эффекта при канцерогенезе в печени у этих животных. Триадимефон индуцировал увеличение количества и размеров γ -ГТП-положительных узелков только в дозе 80 мг/кг. Ранее промоторный эффект триадимефона обнаружен на модели гепатоканцерогенеза крыс «НДЕА-гепатэктомия» [6].

При гистологическом исследовании отобранных внутренних органов были

выявлены пролиферативные процессы, которые стали критериальными маркерами канцерогенности химических веществ при изучении их на мультиорганной модели [6]. В табл. 3 представлены данные о пролиферативных процессах и опухолях, выявленных у контрольных и подопытных животных.

Так, в ткани щитовидной железы крыс экспериментальных и контрольной групп эти процессы находились на одном уровне. Однако появилась тенденция увеличения частоты аденом железы в зависимости от дозы. Установлено статистически достоверное дозозависимое увеличение случаев гиперплазии плоскоклеточного эпителия пищевода и преджелудка у животных, которые получали триадимефон. В низкой

Пролиферативные процессы и опухоли, выявленные у крыс

Локализация, находки, абс. (%)	Группа 1, доза 0,0 мг/кг (n =15)	Группа 2, доза 16,0 мг/кг (n =15)	Группа 3, доза 80,0 мг/кг (n =15)
<i>Щитовидная железа:</i>	n =14	n =15	n =15
Гиперплазия	3 (21)	2 (13)	3 (20)
Аденома	1 (7)	2 (13)	3 (20)
<i>Лёгкие:</i>	n =6	n =13	n =13
Гиперплазия	0	0	1 (8)
Аденома	0	1 (8)	1 (8)
<i>Пищевод:</i>	n =9	n =8	n =9
Гиперплазия	0	1(13)	4(44)*
<i>Желудок:</i>	n =15	n =12	n =13
Гиперплазия преджелудка	3 (20)	4 (33)	10 (77)*
Гиперплазия фундальной части	0	1 (8)	0
Папиллома	0	1 (8)	3 (30)
<i>Тонкая кишка:</i>	n =15	n =15	n =15
Аденокарцинома	1 (7)	1 (7)	1 (7)
<i>Печень:</i>	n =15	n =15	n =15
Гиперплазия базофильноклеточная	2 (13)	0	1 (7)
Гиперплазия эозинофильноклеточная	0	0	2 (13)
<i>Надпочечники:</i>	n =15	n =15	n =15
Гиперплазия коры	2 (13)	0	2 (13)
Гиперплазия мозгового вещества	0	1 (7)	0
Аденома кортикальная	1 (7)	1 (7)	0
<i>Почки:</i>	n =15	n =15	n =15
Альтерация канальцев	1 (7)	0	0
Гиперплазия	1 (7)	0	0
Саркома	0	0	1 (7)
<i>Толстая кишка:</i>	n =15	n =15	n =15
Очаги аберрантных крипт	1 (7)	0	0
Гиперплазия	1 (7)	0	0
Папиллома	0	0	1 (7)
<i>Предстательная железа:</i>	n =15	n =14	n =15
Гиперплазия	4 (27)	6 (43)	10 (67)*
Аденокарцинома	0	1 (7)	0
Саркома	0	1 (7)	0
<i>Мочевой пузырь:</i>	n =14	n =14	n =15
Папиллярная гиперплазия	0	2(14)	2 (13)
Папиллома	0	1 (7)	0
Всего:			
Число животных с опухолями	3 (20)	4 (27)	8 (53)*
Доброкачественные опухоли	2 (13)	5 (30)	8 (53)*
Злокачественные опухоли	1 (7)	3 (20)	2 (13)
Коэффициент множественности	0,00	2,00	1,25

Примечание: * Статистически достоверное различие по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

дозе триадимефона статистических различий не выявлено ($p \geq 0,05$), тогда как в высокой дозе они были значимы ($p \leq 0,01$). Следует отметить, что степень выраженности этого эффекта также возрастает у животных, которые получали дозу 80 мг/кг. У крыс в преджелудке обнаружили 3 случая папиллом против 0 в контрольной группе. Эти данные свидетельствуют о дальнейшей прогрессии онкогенеза.

Среди пролиферативных процессов наблюдалась также дозозависимая тенденция увеличения случаев узелковой гиперплазии предстательной железы. В высокой дозе обнаружено их увеличение в 2,5 раза.

В целом у животных было выявлено 21 опухоль, из которых 15 доброкачественных и 6 злокачественных. Наибольшее число опухолей обнаружено у животных, которые получали высокую дозу триадимефона: в щитовидной железе и желудке – 3 случая, против 1 и 0 в контрольной группе, соответственно. У животных, получавших триадимефон в дозе 16 мг/кг в щитовидной железе выявлено 2 аденомы, а в предстательной железе – саркому и аденокарциному. В остальных органах опухоли были единичными. Поэтому опухолями, которые могут быть связаны с воздействием триадимефона, являются папиллома преджелудка и аденома щитовидной железы.

Частота опухолей в группе животных, получавших триадимефон в дозе 80 мг/кг, статистически значимо превышала значения контроля ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что опухолей у животных экспериментальных групп было больше по сравнению с контролем в 2,6 и 3,3 раза. Коэффициент множественности в этих группах также выше по сравнению с контролем. Наибольшее значение этого показателя установлено у животных, которые получали дозу 16 мг/кг. Количество злокачественных опухолей у этих животных больше. Однако соотношение злокачественных опухолей к доброкачественным в этой группе практически не отличается от контроля, тогда как у животных, получавших высокую дозу, этот показатель в два раза

ниже. Следовательно, выявленный онкогенный эффект обусловлен развитием доброкачественных опухолей, количество которых в экспериментальных группах увеличивается в зависимости от дозы триадимефона.

Таким образом, триадимефон в опухолеобразующей дозе 80 мг/кг м.т. проявляет слабый промоторный эффект развития предопухолевых состояний тканей щитовидной железы, печени, пищевода и преджелудка, предстательной железы, а также развития доброкачественных опухолей у крыс, иницированных NDEA, MNU, NDHPA.

Триадимефон принадлежит к химическому классу триазолов. Соединения этого класса используются в качестве фунгицидов. Это вещество является ингибитором синтеза стероидов и оказывает сильное фунгитоксическое действие. Как и все пестициды, триадимефон изучен в хронических экспериментах на крысах и мышах, в которых установлена индукция опухолей щитовидной железы у крыс самцов и опухолей печени у мышей [8]. Генотоксических свойств при изучении триадимефона в батарее стандартных тестов на мутагенность не обнаружено. Канцерогенная активность триадимефона изучена в среднесрочном тесте на модели гепатоканцерогенеза «НДЕА-гепатэктомия» у крыс. Выявлен позитивный эффект [8].

В настоящее время установлен общий фенотарбиталоподобный механизм канцерогенного действия триазолов у крыс и мышей, который заключается в активации семейства ядерных конститутивных рецепторов: андростанового (CAR) и прегнан X рецептора (PXR) [13-14]. Следствие этого – индукция ферментов цитохрома P-450, в частности у мышей соответственно Cyp2b 10 и Cyp3a 11, у крыс – Cyp2b 1 и Cyp3a 3, гепатоцеллюлярная гипертрофия, повышение синтеза ДНК, развитие окислительного стресса и гепатоцеллюлярных пролиферативных процессов, образование очагов изменённых гепатоцитов и, наконец, развитие опухолей. Развитие опухо-

лей щитовидной железы происходит как вторичный эффект вследствие нарушения функции печени. При этом происходит усиление выведения из организма гормонов щитовидной железы, что приводит к увеличению гипофизом секреции тиреотропного гормона, который стимулирует пролиферативные процессы в железе. Действительно, при изучении промоторного эффекта фенобарбитала на подобной модели обнаружено значительное увеличение случаев гиперплазии, аденом и карцином щитовидной железы [6]. Однако гипотеза о том, что триадимефон-индуцированные опухоли щитовидной железы возникают через специфический механизм увеличения тиреотропного гормона не нашли подтверждения в работе [5]. Авторы на крысах-самцах Wistar Han, которые получали триадимефон, а также пропиконазол и миклобутанил, не вызывающих опухолей щитовидной железы, показали, что активность фермента уридин-дифосфо-глюкуронозилтрансфераза, который метаболизирует тироксин, увеличивалась в такой же степени через месяц и 90 суток для всех трех коназолов. У крыс, получавших триадимефон в опухолеобразующей дозе, гипертрофия гепатоцитов появлялась только к концу эксперимента, тогда как гипертрофия, уменьшение коллоида и пролиферация фолликулярного эпителия щитовидной железы наблюдались раньше, чем у животных, получавших другие коназолы, уже через 30 дней. Дозозависимое снижение тироксина обнаружено через 4 суток экспозиции во всех 3 группах. Однако через 30 дней низкая концентрация тироксина была обнаружена только у крыс, получавших опухолеобразующую дозу триадимефона. Концентрация трийодтиронина дозозависимо снижалась только у животных, которые получали триадимефон с 4 по 90 сутки. Концентрация тиреотропного гормона в плазме крови животных на протяжении эксперимента не увеличивалась ни в одной группе [16].

В условиях такого же эксперимента S.D. Nester с соавторами [16,17] изучили экс-

прессию генов печени и щитовидной железы крыс-самцов Wistar Han. Количество измененных генов варьировало в зависимости от дозы и времени экспозиции к триазиолам.

Наибольшее количество измененных генов, индуцированных триадимефоном и пропиконазолом в печени, обнаружено в конце эксперимента на 90 сутки, тогда как в щитовидной железе на 30 сутки. Миклобутанил, который не обладал онкогенным эффектом, при этом проявлял минимальные эффекты.

Значительное количество измененных генов было связано с сигнальными путями, которые контролировали метаболизм холестерина, активацию ядерных рецепторов и передачу сигналов N-ras и K-ras, рост и метаболизм. Чётко разделялась разница в экспрессии генов при недействующих и опухолеобразующих дозах. Таким образом, все вышеперечисленные изменения в печени и щитовидной железе могут быть объяснены изменениями экспрессии генов в клетках этих органов, которые возникли вследствие воздействия на организм триадимефона.

При изучении промоторного эффекта фенобарбитала на подобной модели отсутствовали пролиферативные процессы в пищеводе и преджелудке крыс и других органах, которые являлись мишенями канцерогенов-инициаторов. Статистически достоверное увеличение случаев гиперплазии пищевода и преджелудка у крыс выявлено при воздействии триадимефона в высокой дозе и могло быть связано с его раздражающим действием. По данным литературы, триадимефон обладает очень слабым раздражающим слизистые действием, а при субхроническом и хроническом введении изменений со стороны эпителия пищевода и преджелудка у крыс не выявлено [8,15]. Однако при внутрижелудочном введении этот слабый эффект мог оказаться достаточным для развития хронического воспалительного процесса и соответственно гиперплазии и папиллом [18].

На подобной модели гиперплазии пищевода и преджелудка выявлены при введении крысам таких канцерогенов: нитрозодибутиламина, метил-нитро-нитрозогуанидина, диметилбензантрацена, а также катехола [6]. Нитрозодибутиламин в хронических экспериментах индуцировал опухоли печени, мочевого пузыря и преджелудка у крыс. Метил-нитро-нитрозогуанидин является прямым канцерогеном, который у крыс индуцирует опухоли пищевода, преджелудка, кишечника и других локализаций. Диметилбензантрацен индуцирует опухоли молочной железы, а также эпителиальные опухоли различных локализаций. Катехол также индуцирует опухоли желудка. Поэтому авторы считают данный эффект прогностическим в отношении развития опухолей желудка у крыс.

Следует отметить, что триадимефон, также как нитрозодибутиламин, диметилбензантрацен, а также катехол индуцировал не только гиперплазии, но способствовал развитию папиллом.

Таким образом, триадимефон в опухолеобразующей дозе усиливает пролиферативные процессы слизистой пищевода и желудка крыс, которые подверглись воздействию канцерогенов.

Триадимефон вызывал у крыс-самцов доза зависимое увеличение гиперплазий предстательной железы. Такой эффект, вероятно, обусловлен общим механизмом действия триазолов – снижением синтеза стероидов и связанным с этим нарушением регуляции гомеостаза уровня тестостерона [19]. Действительно, в нашем эксперименте развитие гиперплазий простаты у крыс развивалось на фоне атрофических процессов в семенниках, которые могли быть индуцированы введением канцерогенов. Вместе с тем, на модели полового созревания крыс-самцов Wistar Han показано, что высокие дозы триадимефона и других триазолов могут оказывать стимулирующий эффект на ткани половых органов, в частности вызывать увеличение массы тестикулов и вентральной простаты, содержания тестостерона в сыворотке крови и тестикулах [19].

Канцерогены, которые были использованы как инициаторы канцерогенеза, – это сильные генотоксиканты широкого спектра действия. Введение их в организм должно увеличить пул мутированных стволовых клеток не только в органах-мишенях, но и других тканях организма [20]. Поэтому было проанализировано суммарное количество животных с опухолями в экспериментальных группах и контрольной. Количество животных с опухолями в группе, получавшей триадимефон в дозе 80 мг/кг, статистически значимо превышало значения контроля ($p \leq 0,05$). Коэффициент множественности в группах, получавших триадимефон, также выше по сравнению с контролем. Выявленный онкогенный эффект обусловлен развитием доброкачественных опухолей, количество которых в экспериментальных группах увеличивается в зависимости от дозы триадимефона, тогда как частота злокачественных опухолей практически не изменяется.

Резюмируя выше приведенные данные, можно сделать заключение, что триадимефон в опухолеобразующих дозах оказывает промоторный эффект развития предопухолевых состояний и опухолей согласно общего для триазолов механизма действия – активации семейства ядерных конститутивных рецепторов, нарушения гомеостаза половых гормонов. Этот эффект обеспечивается через изменение экспрессии генов, связанных с сигнальными путями, контролирующими метаболизм холестерина, активацию ядерных рецепторов и передачу сигналов N-ras и K-ras, рост и метаболизм клеток, которое происходит в организме крыс при воздействии опухолеобразующих доз. Увеличение частоты предопухолевых состояний и опухолей пищевода и желудка, по-видимому, связано с раздражающим слизистые действием триадимефона. Отсутствие промоторного эффекта в недействующей по онкогенному эффекту дозе, установленной в хронических экспериментах на грызунах, позволяет её использовать при оценке комбинирован-

ного воздействия на организм канцерогенных нитрозосоединений и триадимефона. Разработанные ранее на основании этого показателя регламенты обеспечивают онкобезопасность его применения человеком.

Полученные данные подтверждают значительную роль внешних факторов в развитии опухолей различных органов в рамках современной дискуссии [21].

Выводы

1. Триадимефон в опухолеобразующей дозе — 80 мг/кг м.т. проявляет слабый промоторный эффект развития предопухолевых состояний тканей щитовидной железы, печени, пищевода и преджелудка, предстательной железы, а также развития доброкачественных опухолей у крыс, у которых канцерогенез инициирован нитрозодиэтиламином (NDEA), N-метил-N-нитрозомочевинной (MNU) N-нитрозобис(2-гидроксипропил)амином (NDHPA)

- канцерогенными нитрозосоединениями широкого спектра действия.

2. Обнаружено увеличение общей частоты доброкачественных опухолей у животных, у которых канцерогенез инициирован нитрозосоединениями, экспонированных к триадимефону в опухолеобразующей дозе. Частота злокачественных опухолей у этих животных не отличалась от контроля.

3. Частота выявленных предопухолевых состояний тканей и опухолей не увеличивалась по сравнению с контролем у крыс, у которых канцерогенез инициирован нитрозосоединениями, экспонированных к триадимефону в дозе, не индуцирующей опухоли в хроническом эксперименте.

4. Установленный в хронических экспериментах недействующий уровень по онкогенному эффекту триадимефона обеспечивает его безопасность при воздействии на организм крыс, у которых канцерогенез инициирован нитрозосоединениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. – 2017. – V. 112. – [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.iarc.fr/en/pdf/MonographVolume112.pdf>.
2. Silver S.R. Cancer incidence and Metolachlor use in the Agricultural Health Study: An update / S.R. Silver, S.J. Bertke, C.J. Hines [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2015. – V. 137. – №11. – P. 2630–2643.
3. OECD, Guidance Document 116 on the Conduct and Design of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453. 2nd Edition. Series on Testing and Assessment, Paris, OECD. – P. 2012–156.
4. Miller M.F. Low-Dose Mixture Hypothesis of Carcinogenesis Workshop: scientific underpinnings and research recommendations / M.F. Miller, W.H. Goodson, M.H. Manjili [et al.] // *Environ. Health. Perspect.* – 2017. – V. 125. – P. 163–169.
5. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead / W.H. Goodson, L. Lowe, D.O. Carpenter [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2015. – V. 36. – P. S254–296.
6. Ito N. Medium-term bioassays for carcinogens / N.Ito, T.Shirai, R.Hasegawa // *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification.* Lyon: - IARC Scientific Publication. – 1992 – № 116. – P. 353–388.
7. Park J. Distribution of Seven N-Nitrosamines in Food/ Jong-eun Park, Jung-eun Seo, Jee-yeon Lee, and Hoonjeong Kwon // *Toxicol. Res.* – 2015. – V. 31. – №3. – P. 2630–2643. doi: 10.5487/TR.2015.31.3.279
8. Triadimefon: National Library of Medicine HSDB Database. [Электронный ресурс]. – Toxnet. – Режим доступа: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs>
9. FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR AGRICULTURAL PESTICIDES. Triadimefon.(RS)-1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-one FAO/WHO. - 2011.[Электронный ресурс]. - FAO/WHO – Режим доступа: <http://www.fao.org>.
10. Bilbin M. Induction of Aberrant Crypts in the Colons of Rats by Alkylating Agents/ M. Bilbin, B. Tudek, H. Cze-czot // *Acta Biochimica Polonica.* – 1992. – V.39. – № 1. – P.113–117.
11. Pathology of tumors in laboratory animals. Vol. 1 - Tumours in the rat. Second Edition. Edited by V.S. Turusov and U. Mohr. – Lyon: IARC Scientific Publications. – 1990. – № 99. – 754 p.
12. Лойда З. Гистохимия ферментов / З.Лойда, Р.Госспрай, Т.Шиблер // *Лабораторные методы.* – М.: Мир. – 1982. – 270 с.
13. Nesnow S. Integration of toxicological approaches with omic and related technologies to elucidate mechanisms of carcinogenic action: propiconazole, an example / S.Nesnow // *Cancer Lett.* – 2013. – V. 334. – P. 20–27.
14. Phenobarbital and propiconazole toxicogenomic profiles in mice show major similarities consistent with the key role that constitutive androstane receptor (CAR) activation plays in their mode of action/ R.A. Currie, R.C. Peffer, K. Amber [et al.] // *Toxicology* – 2014 – V. 321. – Issue null, – P. 80–88.
15. Toxicity profiles in rats treated with tumorigenic and non-tumorigenic triazole conazole fungicides: Propiconazole, triadimefon, and myclobutanil / D.C. Wolf, J.W. Allen, M.H. George [et al.] // *Toxicol. Pathol.* – 2006. – V. 34. – № 7. – P.895–902.

16. Transcriptional profiles in liver from rats treated with tumorigenic and non-tumorigenic triazole conazole fungicides: Propiconazole, triadimefon, and myclobutanil / S.D. Hester, D.C. Wolf, S.Nesnow, [et al.] // Toxicol. Pathol. – 2006 - V. 34. – № 7. – P.879–894.
17. Hester S.D. Transcriptional responses in thyroid tissues from rats treated with a tumorigenic and a non-tumorigenic triazole conazole fungicide / S.D. Hester, S. Nesnow // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2008. – V. 227. – № 3. – P. 357–369.
18. Chandra S. A. Chemical Carcinogenesis of the Gastrointestinal Tract in Rodents: An Overview with Emphasis on NTP Carcinogenesis Bioassays / S. A. Chandra, M.W. Nolan, D.E. Malarkey // Toxicol. Pathol. – 2010 – V. 38. – № 1. – P. 188–197.
19. Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat / A.K. Goetz, H. Ren, J.E. Schmid [et al.] // Toxicol. Sci. – 2007. – V. 95. – № 1. – P. 227-239.
20. Multi-organ mapping of cancer risk/ L. Zhu, D. Finkelstein, C. Gao [et al.] // Cell. – 2016. – V. 166. – № 1. – P. 1132–1146.
21. Thomas F. Intrinsic versus Extrinsic Cancer Risks: The Debate Continues /.
22. Thomas F. Trends Cancer // F. Thomas, B. Roche, B. Ujvari. – 2016. – V. 2. – № 2. – P. 68–69.

МОДИФІКУЮЧИЙ ЕФЕКТ ТРИАДИМЕФОНУ ЩОДО РОЗВИТКУ ПЕРЕДПУХЛИННИХ СТАНІВ ТА ПУХЛИН ЗА МУЛЬТИОРГАННОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ У ЩУРІВ

*Н.М.Недопитанська, Є.А.Баглій, О.В.Решавська, В.С.Лісовська, Л.В.Ткаченко
ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки
імені академіка Л.І.Медведя МОЗ України», м. Київ, Україна*

РЕЗЮМЕ. Протягом життя організм людини піддається впливові багатьох канцерогенів довкілля, які можуть ініціювати канцерогенез у різних органах. Значне місце серед цих канцерогенів посідають нітрозосполуки. Триадимефон відноситься до хімічного класу триазолів, які широко використовуються як фунгіциди в пестицидах і лікарських засобах.

Мета роботи - вивчити вплив триадимефону на розвиток передпухлинних станів тканин і пухлин за канцерогенезу, ініційованого у різних органах нітрозосполуками.

Матеріали і методи. Експерименти виконані на щурах-самцях *Wistar Han*, у яких було ініційовано мультиорганний канцерогенез нітрозосполуками - нітрозодіетіламіном, метилнітрозосечовиною, нітрозобіс (2-гідроксипропіл) аміном згідно з протоколом Н.Ію. Триадимефон у дозах: 16,0 і 80,0 мг/кг маси тіла, які відповідали недіючому і діючому рівню за канцерогенним ефектом, вводили внутрішньошлунково щодня протягом 20 тижнів. За час експерименту проводилися клінічні дослідження. Оцінювалися загальний стан тварин, їх маса та її приріст. Після некропсії здійснювалося макроскопічне і гістологічне дослідження. У печінці за допомогою гістохімічної реакції визначалися позитивні на γ -глутамілтранспептидазу пренеопластичні вузлики.

Результати. Клінічних ознак токсичної дії триадимефону на організм щурів, ініційованих до канцерогенезу нітрозосполуками, не встановлено. Зміни маси внутрішніх органів, за винятком печінки, не виявили специфічного органотропного впливу триадимефону. У високій дозі виявлено збільшення маси печінки, а також кількості та розмірів γ -ГТП-позитивних вузликів, що свідчить про збільшення пулу трансформованих гепатоцитів.

Під час гістологічного дослідження внутрішніх органів були виявлені проліферативні процеси, які є критеріальними маркерами канцерогенності хімічних речовин при вивченні їх на мультиорганній моделі. Виявлено тенденцію збільшення частоти аденом щитоподібної залози залежно від дози. Встановлено збільшення випадків гіперплазії епітелію стравоходу, передшлунка та передміхурової залози, а також загальної частоти доброякісних пухлин різних органів у тварин, які отримували триадимефон у високій дозі. Частота злоякісних пухлин у цих тварин не відрізнялася від контролю.

Висновки. Триадимефон у пухлиноутворюючій дозі проявляє слабкий промоторний ефект щодо розвитку передпухлинних станів тканин щитовидної залози, печінки, стравоходу, передшлунка та передміхурової залози, а також розвитку доброякісних пухлин у щурів, ініційованих до канцерогенезу нітрозосполуками. Встановлений у хронічних експериментах недіючий рівень триадимефону за онкогенного ефекту забезпечує його безпеку при впливові на організм ініційованих нітрозосполуками до мультиорганного канцерогенезу щурів. Розроблені на підставі цього показника регламенти забезпечують онкобезпеку застосування триадимефону людиною.

Ключові слова: мультиорганний канцерогенез, триадимефон, триазоли, канцерогенні нітрозосполуки, передпухлинні стани, щури.

MODIFYING EFFECT OF TRIADIMEFON ON THE DEVELOPMENT OF PRENEOPLASTIC LESIONS AND TUMOURS IN RAT MULTI-ORGAN CARCINOGENESIS

*N. Nedopitanskaia, Ye. Bahlei, Ye. Reshavskaia, V. Lisovskaia, L. Tkachenko
State Enterprise "L. I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology,
Food and Chemical Safety of the Ministry of Health of Ukraine", Kyiv, Ukraine*

ABSTRACT. Throughout life, the human body is exposed to multiple environmental carcinogens that may stimulate carcinogenesis in different organs. Critical place among these carcinogens belongs to nitroso compounds. Triadimefon belongs to the chemical class of triazoles that are widely used as fungicides in pesticides and medicinal products.

Objective is to investigate the effect of triadimefon on the development of preneoplastic lesions of the tissues and tumours in carcinogenesis induced in different organs by nitroso compounds.

Materials and Methods. Experiments were performed in male Wistar Han rats in which nitroso compounds - N-nitrosodiethylamine, N-methylnitrosourea, N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine induced multi-organ carcinogenesis according to the N.Ito. protocol. Triadimefon at the doses: 16.0 and 80.0 mg/kg body weight that corresponded to the no-observed-effect and observed effect level by carcinogenic effect were administered intragastrically on a daily basis for 20 weeks. Clinical studies were conducted throughout the experiment. The general condition of animals, their body weight and body weight gain were assessed. After necropsy, gross examination, including aberrant multiple crypts of the colonic mucosa, and histological examinations were conducted. Nodules positive for γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) were determined by histochemistry in the hepatic tissue.

Results. No clinical signs of toxic action of triadimefon in rat body induced by nitroso compounds to carcinogenesis were established. No specific organotrophic action of triadimefon was found by changes in the internal organ weight, except for liver. High dose resulted in the increase of liver weight, as well as in the number and size of γ -GTP positive nodules suggesting an increase in the pool of transformed hepatocytes.

Histological examination of internal organs allowed detecting proliferative processes that are criterial markers of carcinogenicity of chemical substances upon their study in multi-organ model. The tendency to the increase in the rate of dose-dependent thyroid adenoma has been established. Increase in the rate of epithelium hyperplasia of oesophagus and forestomach, prostatic gland, as well as the total rate of benign tumours in different organs of animals on the tumour-inducing dose of triadimefon was found. The rate of malignancies in these animals do not differ from the control.

Conclusion. The tumour-inducing dose of triadimefon shows weak promotor effect on the development of preneoplastic lesions of tissues of the thyroid gland, liver, oesophagus and forestomach, prostatic gland, as well as on the development of benign tumours in rats induced by carcinogenic nitroso compounds. No-observed-effect level of triadimefon by oncogenic effect established in chronic experiments ensures its safety upon exposure in the body of rats initiated by carcinogenic nitroso compounds. Regulations developed on this parameters ensure oncological safety of its use in human.

Key words: multi-organ carcinogenesis, carcinogenesis by nitroso compounds, triadimefon, triazoles, proliferative processes, preneoplastic lesions, male Wistar Han rats.

Надійшла до редакції 8.11.2018 р.