

ВИВЧЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТІ ЦИПРОКОНАЗОЛУ У МІКРОЯДЕРНОМУ ТЕСТІ НА ГЕПАТОЦИТАХ ТА ЕРИТРОЦИТАХ КІСТКОВОГО МОЗКУ МИШЕЙ

Є.А.Баглій, доктор мед. наук, Н.М.Недопитанська, кандидат біол. наук, В.С.Лісовська
ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки
імені академіка Л.І.Медведя МОЗ України», м. Київ

РЕЗЮМЕ. Мета. Дослідити генотоксичність ципроконазолу при багаторазовому введенні у мікроядерному тесті на гепатоцитах та еритроцитах кісткового мозку мишей за умов модифікації активності ферментів, які метаболізують ксенобіотики.

Матеріали і методи. Експерименти виконані на мишах лінії C57BL/6J. Внутрішньошлункове введення впродовж 14 діб у дозах: ципроконазол – 2,5 та 50 мг/кг, карбендазім (анеуген – позитивний контроль щодо мікроядер гепатоцитів) – 75 мг/кг. Одноразова інтраперитоніальна ін'єкція у дозах: циклофосфан, кластоген (позитивний контроль щодо мікроядер еритроцитів кісткового мозку) – 20 мг/кг, нітрозодіетиламін – 56 мг/кг. Через 24 години після останнього введення проводилась часткова гепатектомія, через 96 годин після операції – евтаназія та приготування цитологічних препаратів. На мазках кісткового мозку аналізували по 2000 поліхроматофільних еритроцитів (ПХЕ), печінки – по 1000 гепатоцитів на скло.

Результати. Кластогени циклофосфан і нітрозодіетиламін більше ніж утричі підвищували мікронуклеогенез у ПХЕ та у 2,3 раза в гепатоцитах порівняно з контролем, ауеноген карбендазім – у півтора раза, відповідно ($p \leq 0,05$). Ципроконазол у недіючій щодо онкогенного ефекту дозі (2,5 мг/кг) не індукував збільшення кількості як ПХЕ, так і гепатоцитів із мікроядрами. Натомість, в ефективній за канцерогенністю дозі (50 мг/кг) ципроконазол спричиняв зростання кількості ПХЕ з мікроядрами на 28% ($p \leq 0,05$), гепатоцитів – на 36% ($p \geq 0,05$).

Висновок. Модифікація метаболізму ципроконазолом в умовах повторних надходжень не спричиняє накопичення сталих порушень геному, які б виявились під час активації проліферації гепатоцитів. Отримані результати вкладаються у гіпотезу рецепторного механізму канцерогенної дії коназолів.

Ключові слова: Ципроконазол, мікроядерний тест, гепатоцити, поліхроматофільні еритроцити, миші.

Ципроконазол (2RS, 3RS; 2RS, 3SR) –2–(4–хлорфеніл)– α –(1циклопропіл–етил)–1Н–1,2,4–триазоло–1–етанол) належить до хімічного класу коназолів, які широко використовуються в якості протигрибкових лікарських засобів та пестицидів. Механізм їхньої фунгіцидної дії обумовлений гальмуванням біосинтезу ергостеролу. Для деяких з них встановлені онкогенні властивості для лабораторних тварин. Відомо, що ципроконазол індукує пухлини печінки у мишей і з-поміж коназолів є найбільш активним канцерогеном. Виникнення пухлин пов'язують із модифікацією активності мікосомальних оксидаз – ферментів, що забезпечують метаболізм ксенобіотиків. Актуальним залишається детальне вивчення механізму канцерогенної дії цих речовин взагалі, та ципроконазолу зокрема, а також визначення релевантності даного ефекту для людини [1–5]. Доведено, що активність ферментів, відповідальних за метаболізм ксенобіотиків, значно змінюється впродовж 14–30 діб. Не виключено, що в цей період накопичуються мутагенні метаболіти, відповідальні за трансформацію клітин. Між тим, в літературі вкрай обмежена кількість робіт, присвячених саме впливу ципроконазолу на генетичний апарат клітин органу–мішені канцерогенної дії. Визначення канцерогенної небезпеки хімічних факторів зазвичай ґрунтується на аналізі результатів хронічних

досліджень та експериментів із вивчення механізму канцерогенезу. Тому поряд з обов'язковими тестами широко використовують додаткові тести [6–8], в тому числі мікроядерний тест [9–10]. Модифікації мікроядерного тесту [11–14] дозволяють вивчати органну специфічність генотоксичної дії, власне кажучи, генотоксичну дію короткоіснуючих метаболітів, які утворюються в цьому органі. Тому мета даної роботи – дослідити генотоксичність ципроконазолу при багаторазовому введенні у мікроядерному тесті на гепатоцитах та еритроцитах кісткового мозку мишей за умов модифікації активності ферментів, які метаболізують ксенобіотики.

Дослідження органотропної генотоксичності ципроконазолу поряд із розширенням інформації щодо його канцерогенних властивостей сприятиме також накопиченню даних про можливість використання мікроядерного тесту для прогнозування канцерогенного ефекту.

Матеріали і методи

Ципроконазол (ISO), CAS №: 94361–06–5. Хімічна назва (IUPAC) – (2RS,3RS;2RS,3SR) –2–(4–хлорфеніл)– α –(1циклопропіл–етил)–1Н–1,2,4–триазоло–1–етанол, належить до хімічного класу коназолів.

У роботі використовувався Ципроконазол, 95 %, технічний, виробництва фірми “Yangzhou National Chemical Westzhong Company” (КНР).

Речовина зберігалась у темному, сухому та прохолодному місці.

В якості експериментальної моделі були взяті миші лінії C57BL/6J, 60 самців масою тіла 19,5 – 21,5 г, оскільки саме у таких тварин цієї лінії виявлено канцерогенний ефект ципроко-назолу [2]. В усіх загиблих тварин, а також тварин після евтаназії, шляхом цервікальної дислокації, відповідно до плану експерименту проводили патологоанатомічний розтин.

Програма представлених експериментальних досліджень враховує гуманне ставлення до тварин [15].

Піддослідні та контрольні лабораторні тварини знаходились в однакових умовах в клітках типу Т4, по 6–9 голів. Корпус кліток (40 x 30 x 15 см³) виготовлений з міцної пластмаси та накритий металевою ґратованою кришкою. Підстилка – деревна тирса, що змінювалась тричі на тиждень. Клітки мились та стерилізувались двічі на місяць. Раціон віварію стандартизований, корм для тварин збалансований, з усіма необхідними компонентами та складений відповідно до норм, встановлених Наказом МОЗ України. Вода з міського водогону, відстояна, кімнатної температури. Поїлки – скляні 0,5 літрові пляшки зі скляними наконечниками. Пиття – без обмежень. Температура повітря – від 20 до 22°С, відносна вологість – від 40 до 45 %. Освітлення в кімнатах природне. Щодня проводився огляд тварин, оцінювалась поведінка, рухливість, апетит, стан волосяного покриву, шкіри та слизових оболонок. Щотижнево визначалась маса тіла та її приріст.

Досліджувані дози речовини: Ципроко-назол (2,5 та 50 мг/кг), внутрішньошлункове введення; Циклофосфан (Україна, ВАТ «Київмедпрепарат») – доза 20 мг/кг (позитивний контроль щодо мікроядер кісткового мозку), одноразова інтраперитоніальна ін'єкція [9]. Через 24 години проводилась евтаназія тварин. Карбендазим (Sharda, Індія) у дозі 75 мг/кг був взятий в якості позитивного контролю щодо гепатоцитів: як гепатоканцероген у мишей та індуктор мікроядер через ауеногенний ефект [16–17]. Тварини контрольної групи отримувала воду з ОП–10 (0,05%).

Схема експерименту: внутрішньошлункове введення за допомогою зонду 5 разів на тиждень упродовж 14 діб, після чого проводилась гепатектомія. Через 96 годин після операції проводилась евтаназія тварин (дислокація шийних хребців). Розчини готувались щоденно, *ex tempore* на відстояній водогінній воді з ОП–10. Корекція доз з урахуванням маси тіла тварини проводилась щотижня.

У додатковому експерименті було використано 20 мишей – самців лінії C57BL/6J з

масою тіла 19,5 – 21,5 г. Десяти мишам вводили інтраперитонеально гепатоканцероген нітрозодіетиламін (Sigma) у дозі 56 мг/кг, однократно [18]. На другу добу робили гепатектомію. А через 72 години після операції – евтаназію тварин. Розчини готувались щоденно, *ex tempore* на стерильній дистильованій воді. Тварини контрольної групи отримували воду з ОП–10, як і у попередньому дослідженні.

На розтині макроскопічному обстеженню підлягали всі внутрішні органи і тканини. Для приготування цитологічних препаратів гепатоцитів вилучали шматочок печінки розміром 0,3x0,3 см та фіксували в 10 % забуференому нейтральному формаліні. Через 2 тижні фіксації готували суспензію клітин та робили мазки, які фіксували в суміші етилового спирту з льодяною оцтовою кислотою (3:1), фарбували 2,5% ацеторсеїном із дофарбовуванням цитоплазми клітин 1% спиртовим розчином світлого зеленого.

Для приготування препаратів кісткового мозку із стегнової кістки видаляли мозок та робили мазки, які фарбували по Паппенгейму–Крюкову.

Препарати аналізували у проникаючому світлі за допомогою об'єктиву з масляною імерсією при збільшенні 10x90. Аналізу підлягали лише цілі, неушкоджені клітини. На мазках гепатоцити виглядають як клітини полігональної форми з ядром бордового кольору та прозорою зелено-блакитною цитоплазмою. Поліхроматофільні еритроцити – клітини округлої форми, ядро бордового кольору, грубої структури з чергуванням темних та світлих ділянок, цитоплазма – сірувато-блакитна. Мікро-ядра – гомогенно зафарбовані хроматинові тільця бордового кольору, які за розміром не перевищують чверті діаметра основного ядра і знаходяться поряд з основним ядром (рис.1).

У мазках печінки нараховували 1000 гепатоцитів на кожну окрему тварину та визначали їх кількість з мікроядрами (‰). У мазках кісткового мозку нараховували 2000 ПХЕ на кожну окрему тварину та визначали їх кількість з мікроядрами (‰). Окрім цього, для контролю токсичної дії речовини визначали долю ПХЕ від загального числа еритроцитів при підрахунку 200 еритроцитів [11].

Статистична оцінка маси тіла та приросту маси тіла, а також результатів цитогенетичного аналізу проводилась шляхом порівняння визначених показників у піддослідних та контрольних групах за допомогою параметричних за *t*-критерієм Стьюдента і непараметричного критерію Манна–Уїтні після встановлення близькості розподілу даних до нормального за критерієм Шапіро–Уїлкса. В разі нормального розподілу використовувався параметричний *t*-критерій для незалежних виборок, при від-

Розподіл тварин по групах

Група	Речовина	Дози, мг/кг	Кількість мишей
1	Циклофосфан	20	6 самців
2	Вода	0	8 самців
3	Карбендазим	75	8 самців
4	Ципроконазол	50	9 самців
5	Ципроконазол	2,5	9 самців

сутності такого розподілу – непараметричний критерій Манна–Уїтні. Різниця кількості клітин з мікроядрами оцінювалась за критерієм χ^2 із поправкою Ейтса на безперервність.

Статистичні розрахунки проводились за допомогою пакету комп'ютерних програм «Statistica 6.0, Stat Soft».

Досліджуваний препарат вважається цитогенетично активним при статистично достовірному збільшенні кількості та частоти клітин з мікроядрами, хоча б в одній із підслідних груп у порівнянні з контролем.

Результати досліджень і їх обговорення. Протягом введення препарату не встановлено загибелі тварин і щонайменших клінічних ознак, які б свідчили про токсичний вплив Ципроконазолу, 95 %, технічного, виробництва фірми “Yangzhou National Chemical Westzhong Company” (КНР) на організм мишей. Не встановлено змін маси тіла при щотижневому зважуванні мишей (табл. 2), які отримували ципроконазол у дозі 2,5 мг/кг, тоді як у тварин, які отримували карбендазим і ципроконазол у дозі 50 мг/кг, спостерігалось зниження маси тіла на 3 %, а приросту маси тіла на другому тижні експерименту у два рази, у порівнянні з контролем.

Хоча загибелі тварин, пов'язаної з введенням речовин, не спостерігалось, невелике зниження маси тіла на 3% як з контролем, так і початковим рівнем цього показника, свідчать про загально токсичну дію карбендазиму і ципроконазолу у цих дозах. Після гепатектомії визначалась майже однакова смертність через післяопераційні ускладнення. Так, в групі тварин негативного і позитивного (карбендазим) контролю, а також в групах, які отримували Ципроконазол, загинуло по 2 миші (25 %). На розтині при патоморфологічному дослідженні мозку, серця, легенів, печінки, нирок, селезінки, шлунка, товстого і тонкого кишковика, тимуса, наднирників, підшлункової та щитовидної залоз, гіпофіза епідидимісу, простати, сім'яників й інших органів макроскопічних ознак патології не виявлено.

За допомогою класичного індуктора мікроядер у ПХЕ кісткового мозку Циклофосфану була перевірена придатність моделі для мікроядерного тесту.

Як видно з таблиці, однократне інтраперитоніальне введення мишам-самцям C57BL Циклофосфану у дозі 20 мг/кг спричинило статистично значиме підвищення кількості ПХЕ з мікроядрами більш як утричі порівняно з контролем. Слід зауважити, що проведення гепатектомії у контрольних тварин є фактором, який індукує збільшення частоти мікроядер в еритроцитах кісткового мозку, через те, що викликає стрес [19]. Таким чином, незважаючи на підвищення фонових значень кіль-

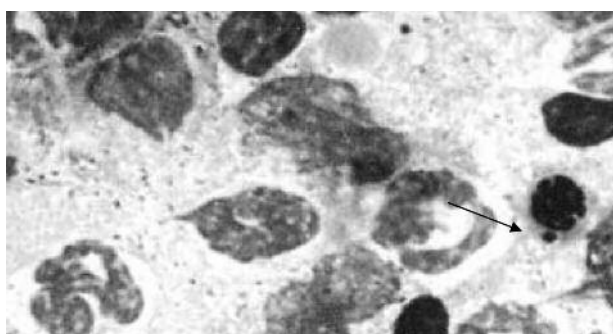


Рис.1. Поліхроматофільний еритроцит з мікроядром, дія циклофосфану в дозі 20 мг/кг, одноразова інтраперитоніальна ін'єкція. (Фарбування по Паппенгейму–Крюкову; імєрсія 10x90)

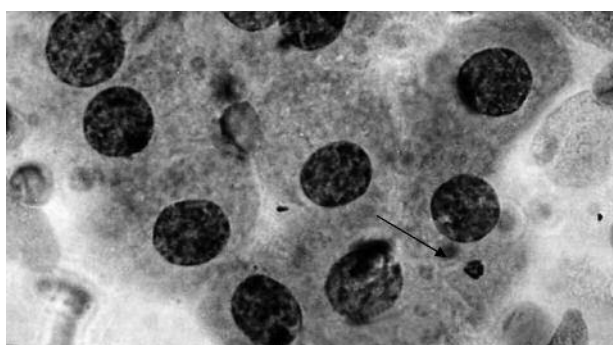


Рис.2. Гепатоцит з мікроядром, дія карбендазиму в дозі 75 мг/кг упродовж 2 тижнів. (Фарбування ацетоорсеїном та світлим зеленим; імєрсія 10x90)

Динаміка маси і приросту маси тіла щурів самців (г)

Термін дослідження (тижні)	Негативний контроль, вода (0 мг/кг) M ± SD n = 8	Позитивний контроль Карбендазим (75 мг/кг) M ± SD, n = 8	Ципроконазол (50 мг/кг) M ± SD, n = 9	Ципроконазол (2,5 мг/кг) M ± SD, n = 9
Маса тіла (г)				
0	21,7±0,8	21,4±1,1	21,4±1,0	21,3±0,8
1	21,7±0,8	21,3±1,1	21,5±0,9	21,7±0,8
2	21,8±0,8	21,2±1,0	21,2±1,0	22,1±0,8
Приріст маси тіла (г)				
1	0	0	0,2±0,2	0,3±0,2
2	0,1±0,1	-0,1±0,2*	-0,2±0,1*	0,4±0,1

Примітка: 1. n – Кількість тварин в групі, * p ≤ 0,05.

кості ПХЕ з мікроядрами референтний генотоксикант викликав суттєве підвищення індукції мікроядер у ПХЕ, тому обрана експериментальна модель на мишах C57BL придатна для вивчення генотоксичності.

Механізм утворення мікроядер під впливом Циклофосфану полягає у порушенні структури ДНК при взаємодії його метаболітів із нуклеотидами. Такі порушення призводять до розриву хромосом – кластогенний ефект. Але існує інший, опосередкований, механізм генотоксичності речовин – через їх взаємодію або їхніх метаболітів із білками, які забезпечують функціонування геному – анеугенний ефект. Саме до таких речовин належить карбендазим [20–21]. На відміну від Циклофосфану карбендазим блокує полімеризацію білка тубуліну, який бере участь в утворенні веретена поділу під час мітозу. Відомо, що карбендазим здатен індукувати мікроядра у ПХЕ за умов одноразового внутрішньошлункового введення у надвеликих дозах – понад 1646 мг/кг, недіюча доза у цьому дослідженні – 66 мг/кг [20].

Іншими дослідженнями виявлено індукцію мікроядер у сперматоцидах щурів за умов одноразового внутрішньошлункового введення у дозі 100 мг/кг [22]. Нашими попередніми дослідженнями встановлено цитотоксичний ефект у щурів і мишей за умов багаторазового внутрішньошлункового введення дози 75 мг/кг [23]. Тому дана доза була використана як максимально витривала для визначення чутливості моделі до таких генотоксикантів. Досліджено індукцію мікроядер у клітинах кісткового мозку – загальноприйнятого об'єкту при вивченні мутагенності [9] у мишей C57BL за умов надходження карбендазиму впродовж двох тижнів у дозі 75 мг/кг.

Карбендазим, як видно з таблиці 3, значно меншою мірою індукував мікроядра в ПХЕ. Кількість ПХЕ з мікроядрами була більшою тільки на 47,5 % (p ≤ 0,05). Через значні коливання цього показника (коефіцієнт варіації 49,3 проти 34,0 у контролі) середня частота ПХЕ з мікроядрами, хоч і була в 1,5 раза більшою, але ефект був статистично не достовір-

Таблиця 3

Результати оцінки генотоксичної активності ципроконазолу в клітинах кісткового мозку мишей в мікроядерному тесті

Показники	Циклофосфан (20 мг/кг) M ± SD n = 6	Вода (0 мг/кг) M ± SD n = 6	Карбендазим (75 мг/кг) M ± SD n = 6	Ципроконазол (50 мг/кг) M ± SD n = 6	Ципроконазол (2,5 мг/кг) M ± SD n = 7
Кількість ПХЕ з мікроядрами, ‰	21,8±5,23	5,0±1,9	7,5±3,4	7,3±1,9	4,6±1,3
Частка ПХЕ від клітин еритроїдного ряду	0,49±0,04*	0,66±0,06	0,52±0,07*	0,62±0,04	0,66±0,06

Примітка: * p ≤ 0,05

ним. Слід зауважити, що дана доза карбендазиму виявилася цитотоксичною для клітин кісткового мозку, про що свідчить статистично достовірне зменшення співвідношення поліхроматофільних до нормохромних еритроцитів. Таким чином, на даній моделі генотоксичний ефект карбендазиму в клітинах кісткового мозку не проявляється, що збігається із даними літератури [17, 20–22].

Узагальнені результати визначення генотоксичності ципроконазолу за допомогою мікроядерного тесту у клітинах кісткового мозку мишей-самців C57BL представлені в таблиці 3. В ефективній дозі, яка при надходженні до організму викликає розвиток пухлин, 50 мг/кг, ципроконазол індукував збільшення кількості ПХЕ з мікроядрами на 46% ($p \geq 0,05$), але статистично незначиме через велике коливання індивідуальних показників (коефіцієнт варіації 53,1 проти 34 %% у контрольній групі). Вказана доза не чинила токсичного впливу на гемопоез, про що свідчить однакове з контролем співвідношення поліхроматофільних еритроцитів до нормохромних еритроцитів. У недіючій щодо онкогенного ефекту дозі, 2,5 мг/кг, ципроконазол не індукував збільшення кількості й частоти ПХЕ з мікроядрами.

Таким чином, генотоксичного ефекту Ципроконазолу у мікроядерному тесті на клітинах кісткового мозку мишей не виявлено.

Відомо, що особливості проявів канцерогенних ефектів залежить як від виду лабораторних тварин, так і від органу-мішені, що пов'язано з особливостями метаболічних перетворень проканцерогенів до їх кінцевих активних метаболітів, що зумовлюють генотоксичний ефект. Деякі канцерогени, зокрема нітрозаміни, не викликають генотоксичний ефект у мікроядерному тесті на клітинах кісткового мозку через те, що активні метаболіти, які утворюються в печінці, мають короткий час існування і не досягають клітин-мішеней [18]. Визначення ініціюючих властивостей ципроконазолу щодо гепатоканцерогенезу у мишей проведено за допомогою мікроядерного тесту.

Узагальнені результати цих досліджень на гепатоцитах мишей-самців C57BL представлені в таблиці 4.

Одержані дані, що наведені в таблиці 4, свідчать про збільшення клітин з мікроядрами в експериментальних групах мишей, які отримували карбендазим та ципроконазол у дозі 50 мг/кг, відносно контролю на 43,4 і 28,6 %% відповідно. Статистичний аналіз результатів за

Таблиця 4

Результати оцінки генотоксичної активності ципроконазолу в клітинах кісткового мозку мишей в мікроядерному тесті

Показники	Вода (0 мг/кг) M ± SD n = 6	Карбендазим (75 мг/кг) M ± SD n = 6	Ципроконазол (50 мг/кг) M ± SD n = 6	Ципроконазол (2,5 мг/кг) M ± SD n = 7	Вода (0 мг/кг) M ± SD n = 15
Кількість проаналізованих клітин	6000	6000	6000	7000	15 000
Кількість виявлених гепатоцитів з мікроядрами	14	20	18	16	33
χ^2/p^1	—	0,74/0,39	0,28/0,59	0,74/0,39	0,0/0,982
χ^2/p^2	—	1,76/0,18	0,83/0,36	0,00/0,98	
Частка гепатоцитів з мікроядрами, %%	2,33 ± 0,87	3,33 ± 0,87	3,00 ± 2,09	2,29 ± 0,95	2,2 ± 0,77
t/p ¹	—	2,12/0,059	0,72/0,49	0,095/0,92	
t/p ²		2,98/0,0076	1,31/0,21	0,23/0,82	
U/p ¹	—	7,0/0,063	13/0,41	21/1,0	
U/p ²	—	15/0,019	31/0,29	48/0,75	
CV ³	37,4 %	26,1 %	69,7 %	41,5 %	35 %

Примітка: 1. У порівнянні з контролем даного дослідження.

2. У порівнянні з об'єднаним контролем двох досліджень.

3. CV— коефіцієнт варіації, * $P \leq 0,05$.

допомогою як параметричного критерію Стьюдента, так і непараметричних критеріїв χ^2 та Манна–Уїтні не виявив достовірного збільшення кількості клітин з мікроядрами у жодній із експериментальних груп порівняно з негативним контролем.

Відсутність достовірних змін у позитивному контролі поставив під сумнів можливість використання даної моделі для визначення генотоксичності вивчаємих речовин на гепатоцитах, тому був поставлений додатковий експеримент на цій моделі з використанням в якості позитивного контролю генотоксичного гепатоканцерогена – нітрозодіетиламіну. Клінічних ознак токсичного впливу речовини не виявлено. Після гепатектомії через післяопераційні ускладнення загинуло двоє мишей у контрольній групі і одна у дослідній. Результати експерименту наведені у таблиці 5.

Кількість гепатоцитів з мікроядрами у мишей, яким вводився нітрозодіетиламін, достовірно перевищувала показники контролю ($p \leq 0,05$). Частота гепатоцитів з мікроядрами також статистично достовірно збільшувалась у 2,3 рази.

Таким чином, за допомогою даної моделі добре виявляється гепатоканцероген, який порушує структуру ДНК. Ураховуючи те, що результати по виявленню гепатоцитів з мікроядрами у контрольних мишей наведеного експерименту збігаються з даними, отриманими у контрольних тварин попереднього дослідження, ми об'єднали дані обох дослідів у загальну контрольну групу з метою підвищення репрезентативності статистичної оцінки результатів попереднього дослідження, яка наведена в таблиці 3. За допомогою такого підходу доведено достовірність індукції мікроядер у гепатоцитах карбендазімом. Збільшення частоти гепатоцитів з мікроядрами в печінці мишей під впливом ципроконазолу в дозі 50 мг/кг було статистично недостовірним.

Таким чином, ципроконазол у умовах проведеного експерименту не проявив генотоксичних властивостей. Показано, що введення ципроконазолу самцям мишей лінії C57BL/6J у дозі 40,8 мг/кг протягом двох тижнів підвищує в гепатоцитах експресію множинних ізоформ цитохром Р-450 (СYP) залежних ферментів, а також інших ензимів, які метаболізують ксенобіотики [2]. Така модифікація метаболізму не призводить до накопичення сталих порушень геному, які б виявились під час активації проліферації гепатоцитів.

Статистично достовірного генотоксичного ефекту не виявлено на клітинах кісткового мозку мишей C57BL/6J при надходженні упродовж двох тижнів ципроконазолу в дозі 50 мг/кг. Отриманий результат свідчить про те, що за цей період стабільних генотоксичних метаболітів ципроконазолу в печінці, які б викликали віддалені ефекти, не утворюється.

Проте наявність статистично недостовірного зростання кількості як гепатоцитів із мікроядрами, так і ПХЕ з мікроядрами не виключає можливості утворення незначної кількості генотоксикантів за даних умов. Це може бути наслідком змін у генах окисного стресу, розвитком некрозу гепатоцитів і відповідно пероксидації ліпідів із генерацією вільних радикалів або накопиченням спонтанних мутацій у клітинах у результаті активації пропроліферативних і антиапоптозних генів. Виявлена кореляція (коефіцієнт кореляції 98,5 %; $p \leq 0,05$) між показниками частоти ПХЕ і гепатоцитів з мікроядрами свідчить про системний характер впливу карбендазіму і ципроконазолу на організм, а також про відсутність впливу модифікації метаболізму у гепатоцитах на генотоксичність ципроконазолу.

Результати проведених експериментів підтримують існуючу гіпотезу щодо рецепторного механізму канцерогенної дії коназолів і ципроконазолу, зокрема: ципроконазол або його

Таблиця 5

Вплив нітрозодіетиламіну на індукцію мікроядер у гепатоцитах мишей

Показники	Статистичні параметри	Негативний контроль, вода, 0 мг/кг	Позитивний контроль, НДЕА, 26 мг/кг
Кількість тварин	n	8	9
Кількість проаналізованих клітин	n	8000	9000
Кількість виявлених гепатоцитів з мікроядрами	n	16	41
Частка гепатоцитів з мікроядрами, %	M ± SD	2,0 ± 0,76	4,6 ± 0,84
	t/p ¹	—	2,39/0,03
	χ^2 /p	—	7,53/0,0061
	CV	38,0	18,3

метаболіти в умовах *in vivo* взаємодіють із конституційним андрогенним рецептором (CAR), який запускає транскрипцію близько 300 генів, серед них CYP2b, який забезпечує метаболізм ксенобіотиків, Gadd45 β – пропроліферативний і антиапоптотичний ген та інші. Наслідком цього є гепатомегалія, гіпертрофія і некроз гепатоцитів, зниження вмісту холесте-

рину, транс-ретиноїдних кислот та підвищення проліферації гепатоцитів. Зростання проліферативної активності на тлі гальмування апоптозу призводить до накопичення спонтанно трансформованих клітин, з яких формуються клони, гіперпластичні вузлики і в решті-решт – пухлини за типовим епігенетичним механізмом канцерогенезу [2].

ЛІТЕРАТУРА

1. Toxicity profiles in mice treated with hepatotumorigenic and non-hepatotumorigenic triazole conazole fungicides: Propiconazole, triadimefon, and myclobutanil/ J.W. Allen, D.C. Wolf, M.H. George [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2006. – №34,7. – P.853–862.
2. Mouse Liver Effects of Cyproconazole, a Triazole Fungicide: Role of the Constitutive Androstane Receptor / R.C. Peffer, J.G. Moggs, T. Pastoor [et al.] // *Toxicol Sci.* – 2007 – №99,1. – P. 315–325.
3. The hepatocarcinogenic conazoles: cyproconazole, epoxiconazole, and propiconazole induce a common set of toxicological and transcriptional responses. / S. Hester, T. Moore, W.T. Padgett [et al.] // *Toxicol Sci.* – 2012 – №127,1. – P.54–65.
4. Concordance of transcriptional and apical benchmark dose levels for conazole-induced liver effects in mice / V.S. Bhat, S.D. Hester, S. Nesnow, D.A. Eastmond // *Toxicol Sci.* – 2013 – №136, 1. – P. – 205–215.
5. Dose-response involvement of constitutive androstane receptor in mouse liver hypertrophy induced by triazole fungicides. / K. Tamura, K. Inoue, M. Takahashi [et al.] // *Toxicol Lett.* – 2013 – №221, 1–. P.47–56.
6. OECD Carcinogenicity Studies. Test Guideline 451, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris. 2009 – 15p.
7. 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. – 2012. – 156 p.
8. USEPA Guidelines for Carcinogen Risk Assessment, Risk Assessment Forum, U.S.Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA –2005.
9. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 4: Health Effects Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test // OECD, Paris. – 1997.
10. Eastmond D.A. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme/ D.A. Eastmond, A. Hartwig, D. Anderson // *Mutagenesis* – 2009 – №24, 4 – P. 341–349
11. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом/ Л.П. Сычева, В.С. Журков [и др.] // *Метод. рекомендации.* – Москва – 2001
12. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях / Ред. Ю.А. Рахманин, Л.П. Сычева – М.: Гениус, 2007. 312 с.
13. Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing./ A. Rothfuss, M. Honma, A. Czich [et al.] // *Mutat Res.* –2011. – №723, 2. – P.108 –120
14. Structural and numerical chromosome aberration inducers in liver micronucleus test in rats with partial hepatectomy./ S. Ito, C. Hattori, M. Nagata, A. Sanbuissho [et al.] // *Mutat Res.* –2012. – 747, 1. – P. 98–103.
15. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. – 1986. – 51 p.
16. IPCS. Environmental Health Criteria 149. Carbendazim.– WHO, 1993 – 132 p.
17. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim / M.E. McCarroll [et al.] // *Mutation Research* – 2002. – №512. – P. 1–35.
18. Persistence of preclastogenic damage in hepatocytes of rats exposed to ethylnitrosourea, diethylnitrosamine, dimethylnitrosamine and methyl methanesulphonate. Correlation with DNA O-alkylation. / A.D. Tates, I. Neuteboom, A.H. Rotteveel [et al.] // *Carcinogenesis.* – 1986. – №7 – P.1053–1058.
19. Ингель Ф. И. Модификация эмоциональным стрессом мутагенных эффектов ксенобіотиков у животных и человека / Ф.И. Ингель, Ю.А. Ревазова // *Исследования по генетике.* Вып. 12. – СПб.: Изд-во С.–Петербург. ун-та, – 1999. – С. 86–103.
20. Evaluation of benomyl and carbendazim in the *in vivo* aneuploidy/micronucleus assay in BDF1 mouse bone marrow / A.M. Sarraf, K.S. Bentley, L.J. Fu [et al.] // *Mutat Res.* – 1994. – 310,1. – P.143–149.
21. Cytogenetic effects of benzimidazoles in mouse bone marrow /R. Barale, C. Scapoli, C. Meli [et al.] // *Mutat Res.* –1993. – 300, 1. – P.15–28.
22. Fusako Matsuo The Fungicide Carbendazim Induces Meiotic Micronuclei in the Spermatids of the Rat Testis / Matsuo Fusako, Nakai Masaaki and Nasu Tetsuo // *J. Vet. Med. Sci.* – 1999. – №61,5. – P. 573–576
23. Лісовська В.С. Вплив карбендазиму на органи репродуктивної системи самців в умовах хронічного експерименту / В.С. Лісовська // *IV міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених: Матеріали конгресу 21–23 травня 2002 року.* – Тернопіль, 2002, Україна.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ЦИПРОКОНАЗОЛА В МИКРОЯДЕРНОМ ТЕСТЕ НА ГЕПАТОЦИТАХ И ЭРИТРОЦИТАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

Е.А.Баглей, Н.Н.Недопитанская, В.С.Лисовская

РЕЗЮМЕ. Цель. Изучить генотоксичность ципроконазола в микроядерном тесте на гепатоцитах и эритроцитах костного мозга мышей в условиях модификации активности ферментов, метаболизирующих ксенобіотики, при многократном введении вещества.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на мышах линии C57BL/6J при введении в желудок в течение 14 суток в дозах: ципроконазол – 2,5 и 50 мг/кг, карбендазим (ауэноген, положительный контроль на микроядра гепатоцитов) – 75 мг/кг. Одноразовая интраперитонеальная инъекция в дозах: циклофосфан (положительный контроль на микроядра эритроцитов костного мозга) – 20 мг/кг, нитрозодизетилламин – 56 мг/кг. Через 24 после окончания введения веществ проводилась частичная гепатэктомия, через 96 часов после операции – этаназия животных. На цитологических мазках костного мозга анализировали 2000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ), печени – 1000 гепатоцитов на препарат.

Результаты. Кластогены циклофосфан и нитрозодиэтиламин, более чем в три раза повышали микронуклеогенез в ПХЭ и в 2,3 раза в гепатоцитах по сравнению с контролем, аутоген карбендазим – в полтора раза ($p \leq 0,05$) соответственно. Ципроконазол в недействующей по канцерогенному эффекту дозе (2,5 мг/кг) не индуцировал увеличения количества как ПХЭ, так и гепатоцитов с микроядрами. Тогда как в эффективной по канцерогенному эффекту дозе (50 мг/кг) ципроконазол вызывал статистически недостоверное увеличение количества ПХЭ с микроядрами на 28 %, гепатоцитов – на 36% ($p \geq 0,05$).

Вывод. Модификация метаболизма ципроконазола при многократном поступлении в организм не приводит к накоплению устойчивых нарушений генома, которые могли быть выявлены во время активации пролиферации гепатоцитов. Полученные результаты поддерживают существующую гипотезу о рецепторном механизме канцерогенного действия коназолов.

Ключевые слова: Ципроконазол, микроядерный тест, гепатоциты, полихроматофильные эритроциты, мыши

GENOTOXICITY STUDY OF CYPROCONAZOLE IN THE BONE MARROW ERYTHROCYTE AND HEPATOCYTES MICRONUCLEUS ASSAY IN MICE

E.A.Bagley, N.M.Nedopitanska, V.S.Lisovska

SUMMARY. Cyproconazole are conazole chemical class and is used as an active ingredient of antifungal drugs and pesticide preparations. Their mechanism of fungicidal action is due to inhibition of fungal ergosterol biosynthesis. Some conazoles induce hepatocarcinogenesis. Cyproconazole induces liver tumors in mice and is the most active among them carcinogenic substances. The development of tumors associated with the modification of the activity of microsomal oxidase enzymes, which provide the metabolism of xenobiotics. In the literature is extremely limited data on the impact of Cyproconazole on the genetic apparatus of cells and in particular target organ carcinogenic effects – hepatocytes.

The aim of the present work was to study the genotoxicity Cyproconazole micronucleus test in hepatocytes and bone marrow cells of mice under conditions of multiple administration of the substance, which provide the modification of the activity of microsomal oxidase enzymes.

Methods of Research. Male C57BL/6J mice were administered by gavage using a stomach tube in 14 days in doses: Cyproconazole – 2.5 and 50 mg/kg, Carbendazim (positive control) – 75 mg/kg. Single intraperitoneal injection in doses: cyclophosphamide 20 mg/kg, nitrosodietilamin 56 mg/kg. Partial hepatectomy was performed at 24 and 96 hours after surgery were euthanized animals. On cytological smears of bone marrow was analyzed in 2000 polychromatic erythrocytes (PCE), and in 1000 hepatocytes to the drug.

Results. Klastogenes – cyclophosphamide and nitrosodietilamin caused an increase in the number of cells with micronuclei, respectively in PCE is more than three times, and hepatocytes by 2.3 times compared to the control. Aneugen carbendazim induced micronuclei in PCE and in hepatocytes only 1.5-fold compared with controls ($p \leq 0,05$).

In the ineffective with oncogenic effect dose of 2.5 mg/kg, Cyproconazole not induced micronuclei any increase in mouse bone marrow cells, or hepatocytes. While effective in a carcinogenic effect dose of 50 mg/kg caused an increase of the amount of micronucleated PCE on 28 % and micronucleated hepatocytes – 36% ($p \geq 0,05$). Increasing the frequency of hepatocytes with micronuclei under the 50 mg/kg Cyproconazole influence was not statistically significant.

Conclusions. Therefore, modification of its metabolism during prolonged intake does not involve the accumulation of stable violations of the genome that have been activated during hepatocyte proliferation. Results support the existing hypothesis about the receptor mechanism of action of carcinogenic conazole.

Key words: Cyproconazole, micronucleus test, hepatocytes, polychromatic erythrocytes, mice