

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

УДК 615.9:616-006.6:632.95

ОТСУТВИЕ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ТЕРБУТИЛАЗИНА НА КАНЦЕРОГЕНЕЗ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕ- ЗЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМ УГЛЕВОДОРОДОМ - 7,12 ДИМЕТИЛ- БЕНЗАНТРАЦЕНОМ У КРЫС

**Н.Н. Недопитанская, Е.А. Баглей,
Е.В. Решавская, Л.В. Ткаченко**

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

РЕЗЮМЕ. Цель работы – изучить возможность промоторного эффекта Тербутилазина на канцерогенез молочной железы, индуцированный полициклическим углеводородом 7,12 дибензантраценом (ДМБА) у крыс-самок Wistar Han.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 60 крысах-самках Wistar Han, массой 105-125 г, 45 из которых были иницированы ДМБА, а 15 служили контролем для изучения влияния Тербутилазина. Инициацию проводили в соответствии с протоколом Anderson L.E., 1999. Животным внутривенно, еженедельно, на протяжении 4 недель вводился ДМБА в виде 2,5 % масляного раствора в дозе 50 мг/кг массы тела. После недельного перерыва вводили ежедневно, внутривенно Тербутилазин в дозах: 0,3 и 30,0 мг/кг массы тела, которые соответствовали недействующему и действующему уровню по канцерогенному эффекту. В контрольной, к действию ДМБА, группе Тербутилазин вводился в дозе 30 мг/кг. Длительность введения Тербутилазина – 16 недель. На протяжении эксперимента проводились клинические исследования. Оценивались общее состояние животных, их масса и её прирост, время появления опухолевых узлов, их количество и площадь. После некропсии проводилось макроскопическое и гистологическое исследование. Определялись количество опухолей, их размеры, гистологический тип, наличие метастазов.

Результаты. Тербутилазин не оказывал токсического действия на организм крыс, которые не были иницированы ДМБА. В группах крыс, которым вводился инициатор, до появления опухолей наблюдалась равная гибель животных – 13 %. Тербутилазин в дозе 30 мг/кг вызывал большую гибель животных с опухолями и снижал длительность их жизни по сравнению с контролем и низкой дозой на 14 %. Общая динамика изменения средних групповых показателей массы тела, прироста массы тела и её кумулятивного прироста у крыс, получавших Тербутилазин, не отличалась от контроля. Статистически достоверных данных изменений частоты опухолей, длительности латентного периода их появления, количества опухолевых узлов, их роста, локализации и степени малигнизации, свидетельствующих о промоторном действии Тербутилазина на канцерогенез молочной железы, не выявлено.

Заключение. Тербутилазин не оказывает промоторного действия на канцерогенез молочной железы, индуцированный ДМБА у крыс.

Ключевые слова: канцерогенез, молочная железа, полициклические углеводороды 7,12 дибензантрацен, ДМБА, пестициды, Тербутилазин, промоторный эффект, крысы-самки Wistar Han

Препараты на основе Тербутилазина (N2-трет-бутил-6-хлор-N4-этил-1,3,5-триазин-2,4-диамин, IUPAC), как до- и послевсходовые гербициды начали применяться с 1967 года и используются в различных странах мира по настоящее время. Механизм действия этого вещества на растения заключается в торможении процессов фотосинтеза. Его токсикологические свойства хорошо изучены. Тербутилазин относится к умеренно опасным веществам. При изучении в хронических экспериментах на двух видах животных – крысах и мышах – получены ограниченные доказательства его канцерогенной активности, а именно: увеличение частоты опухолей молочной железы и лейдигом у

крыс. На основании этих данных эксперты ЕРА отнесли Тербутилазин к группе D – веществам, канцерогенный эффект которых для человека не обоснован. Эксперты ЕС отнесли Тербутилазин к группе веществ с ограниченными доказательствами канцерогенности - R40. В соответствии с действующей в Украине гигиенической классификацией опасности пестицидов это вещество относится к третьему классу опасности [1-3]. Тербутилазин вызывает нарушение функции эндокринной системы и репродуктивной функции [1, 2, 4].

По химической структуре Тербутилазин принадлежит к химическому классу хлортриазинов. Наиболее изученным представителем из этого класса соединений

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

является атразин, который также индуцировал опухоли молочной железы у крыс Спрей Доули [5]. Тщательное изучение механизма канцерогенеза в молочной железе этих крыс показало, что оно связано с видоспецифическим нарушением гормонального баланса. Эксперты IARC пришли к заключению, что выявленный онкогенный эффект не релевантен для организма человека [6]. Однако, вызываемые этими соединениями нарушения функции эндокринной системы [7] могут существенно влиять на развитие рака молочной железы, индуцированного другими факторами. Среди таких факторов в окружающей среде наиболее широко распространены канцерогенные полициклические углеводороды. Показано, что атразин ускоряет развитие и рост опухолей молочной железы, индуцированных 7,12 диметилбензантраценом. Авторы отмечают возможность воздействия атразина на другие звенья эндокринной системы [8].

Данная экспериментальная модель в различных модификациях широко используется как для определения факторов, препятствующих развитию опухолей молочной железы [9], так и в качестве среднесрочного теста для выявления потенциальных канцерогенов-промоторов рака молочных желез, особенно тех, которые действуют через нарушения эндокринной системы [10-13]. Учитывая, что рак молочной железы является наиболее распространённой опухолью у женщин, изучение влияния веществ эндокринных дизрапторов на канцерогенез в молочной железе — это приоритетное направление как в экспериментальной онкологии, так и в токсикологии. Результаты этих исследований позволяют уточнить идентификацию канцерогенной опасности при оценке риска использования таких соединений в деятельности человека [12,13].

Цель работы. Изучение возможности промоторного действия Тербутилазина на канцерогенез молочной железы, индуцированный полициклическим углеводородом 7,12 дибензантраценом (ДМБА) у крыс-самок Wistar Han.

Материалы и методы. Программа представленных экспериментальных исследований согласована с требованиями комиссии по биоэтике и гуманном обращении с животными [14].

Обычно в данной модели используются крысы линии Спрей-Доули [8, 10-13], однако допускается использование крыс Wistar [9]. Крысы Wistar Han были получены из SPF питомника мелких лабораторных животных ГП «Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л.И. Медведя МЗ Украины» 60 особей, со средней массой тела 105-125 г. и размещены в «чистой» зоне вивария. После проведения акклиматизации животных в течение 7 суток была проведена рандомизация. Все животные по данным ветеринарного осмотра были здоровы.

После рандомизации крысы были распределены по 4 группам: Группа 1 - контрольная (15 особей в группе), Группа 2, 3 и 4 — экспериментальные группы (по 15 особей в каждой из групп).

Животные размещались в «чистой» зоне вивария барьерного типа. Экспериментальные животные находились в одинаковых условиях по 5 голов в клетке. Для подстилки использовалась стерилизованная нехлорированная пищевая бумага. Комната была обеспечена принудительной вентиляцией (12 объемов в час) подготовленным воздухом. Температура и относительная влажность воздуха регистрировались ежедневно, колебания температуры: 20–21°C, влажности: 40–50 %. Освещение в комнатах: лампы дневного света (12 часов света, 12 часов темноты). На протяжении эксперимента крысы получали сбалансированный гранулированный корм Альтромин (Германия) и обеззараженную фильтрованную воду.

В экспериментах для инициации канцерогенеза использовали — 7,12 диметилбензантрацен (ДМБА), 95 %. D3254-1G. CAS 57-97-6) производства фирмы Sigma-Aldrich Co., USA. ДМБА растворялось в кунжутном масле. Инициацию проводили в соответствии с протоколом [10]. Животным внутрижелудочно еженедельно на протяжении 4 недель вводился ДМБА в виде 2,5 %-го масляного раствора в дозе 50 мг/кг массы тела. После недельного перерыва начинали вводить изучаемый фактор.

В работе использовался Тербутилазин технический 95 %, производства фирмы Hangzhou Superagro Chemical Co., Ltd

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

(Китай), который соответствовал стандартам ФАО и ЕС и не содержал генотоксических и канцерогенных примесей [2,15]. Растворы Тербутилазина готовились ex tempore на питьевой воде для животных с добавлением эмульгатора ОП-10. Водный раствор с ОП-10 составлял 0,05 %.

Выбранные для эксперимента дозы Тербутилазина на уровне 0,3 и 30,0 мг/кг массы тела соответствуют недействующему и действующему уровню, установленному при токсикологической оценке влияния его на организм [1,2]. Концентрация растворов – для низкой дозы 0,003 %-й раствор, для высокой – 0,3 %. Способ введения: Тербутилазин вводился натошак в желудок крыс с помощью шприца с металлическим зондом в допустимом объеме для мелких лабораторных животных [16]. Контрольным животным (группа 1) вводилась питьевая вода с добавлением ОП-10 при тех же условиях, что и опытным.

Животные 2 и 3 групп получали тестируемый продукт в течение 16 недель – ежедневно подряд 5 дней в неделю. Длительность экспозиции на уровне 16 недель, а всего эксперимента – 20 недель была установлена на основании данных литературы – опухоли у животных начинают выявляться на 6 неделе и за оставшееся время достигают значительных размеров или являются причиной гибели животных [10-13].

В 4-й группе животные получали Тербутилазин в течение 20 недель – ежедневно подряд 5 дней в неделю. Данная группа была использована в качестве контроля в отношении токсического влияния ДМБА. Длительность эксперимента на уровне 20 недель для данной группы включала как период потенциальной инициации канцерогенеза Тербутилазином, так и период промоции.

На протяжении эксперимента проводился ежедневный клинический осмотр животных с целью выявления каких-либо отклонений, связанных с действием вещества, а именно: изменения поведения, подвижности, аппетита, состояния шерстного покрова, кожи и слизистых оболочек животных. Регистрировалась их гибель. В течение 21 недели каждые 7 дней определялась масса тела животных и её прирост. Через 4 недели после последнего введения

ДМБА и до конца жизни животного проводилась ежедневная пальпация крысы, для выявления припухлостей и/или опухолевых узлов молочных желез. Каждую неделю во время взвешивания и осмотра животных измерялись размеры выявленных опухолевых узлов и определялась их площадь. Анатомически у самок крысы имеется шесть пар молочных желез, соответственно, двенадцать сосков. Поэтому устанавливалась локализация узла, его подвижность и наружное состояние опухоли.

Эвтаназия животных (ЭТ) проводилась на следующий день после окончания экспозиции (на 142 день) в специальной камере способом ингаляционного поступления углекислого газа с соблюдением правил гуманного отношения к животным, согласно требованиям Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 ЕС [14].

Все животные подвергались патологоанатомическому исследованию. Перед вскрытием проводился осмотр трупа крысы и регистрировались все отклонения от нормы. При вскрытии проводилось макроскопическое обследование всех органов и тканей животных согласно методическим рекомендациям [17]. Уточнялась локализация, размеры, форма, цвет опухолевых узлов, отбирался материал для гистологической обработки. Все органы и ткани с обнаруженными визуальными изменениями также подвергались гистологической обработке, которая проводилась по общепринятой методике [18].

Гистодиагностика изменений в отобранных образцах осуществлялась с учетом комплекса основных показателей, в частности, обращалось внимание на степень и характер повреждений, выразительность компенсаторных изменений, наличие предопухолевых и опухолевых изменений. Предопухолевые и опухолевые изменения ткани молочной железы диагностировались в соответствии с рекомендациями монографии IARC [19].

Количественными показателями канцерогенного эффекта служили: повышение частоты опухолей относительно эффективного числа (ЭЧ), увеличение коэффициента множественности, сокращение латентного периода появления опухолей и степень их малигнизации, скорости роста

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

опухолей, смертности животных с опухолями [20, 21]. Промоторное действие Тербутилазина оценивалось по изменению этих параметров канцерогенеза.

Статистическая оценка воздействия Тербутилазина на организм и канцерогенез проводилась путем сравнения показателей у испытуемых и контрольных групп несколькими методическими подходами. Близость распределения данных к нормальному устанавливалась с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилькинсона. В случае нормального распределения использовался параметрический, двусторонний, t-критерий для независимых выборок, при отсутствии такого распределения – непараметрический критерий Пирсона χ^2 или Манна-Уитни [20,21].

Для объективной оценки статистической достоверности различий между показателями использовался однофакторный анализ переменных ANOVA. Гомогенность переменных оценивалась по критериям Кохрана С., Хартли, Барлетта. Для проведения коррекции результатов относительно изменения показателей в зависимости от срока роста опухоли использовался ANCOVA. В качестве ковариационной переменной использовался период с 6 по 16 неделю (до проведения эвтаназии по гуманным соображениям). Частота опухолей в экспериментальных и контрольной группах также оценивалась с учетом эффективного числа, методики Каплана – Мейера, а значимость различий – лог-ранк-теста и теста Пето [20, 21].

Статистические расчеты проводились с применением пакета компьютерных программ Excel 2010, «Statistic 6.0, Stat Soft The product licensed to XP Game 2007 Russia 31415926535897».

Результаты и обсуждение. Введение Тербутилазина в дозе 30 мг/кг не оказывало токсического действия на организм, которое приводило бы к смерти животных. Как видно из рисунка 1, в группе 4 на протяжении эксперимента погибла одна крыса на 6-й неделе эксперимента. Причина смерти – механическая асфикция.

В группах крыс, которым вводился инициатор – канцероген ДМБА (рис.1), после четвертого введения, т.е. с 4-й по 10-ю, недели наблюдалась гибель части живот-

ных, что подтверждает сведения о токсической дозе данного вещества [20, 23, 24]. Так, за период инициации (до 5 недели) в этих группах погибло по 2 крысы. В дальнейшем по мере развития опухолевого процесса гибель животных увеличивалась. За этот период в контрольной (группа 1) погибло еще 3 крысы, в группе 2– 5 животных, а в группе 3 – 7. Несмотря на то, что представленные данные статистически не различаются ($p \geq 0,05$), можно говорить об увеличении смертности животных, которые получали высокую дозу тестируемого продукта. Вместе с тем в контрольной группе, получавшей Тербутилазин в высокой дозе без инициации ДМБА, погибло только одно животное, что свидетельствует о том, что причиной гибели животных является токсическое действие ДМБА и развитие опухолей. В период манифестации и роста опухолей с 7-а до 14-и недель эксперимента смертность животных во всех иницированных группах была одинаковой, погибло по 5 крыс. На последующих этапах опухолевого роста животные погибали только в экспериментальных группах. Среди животных, получавших Тербутилазин в дозе 0,3 мг/кг, погибло 2 крысы, а в дозе 30 мг/кг – 4. К концу эксперимента в контрольной группе погибло 5 животных, из которых 2 с опухолью – 2 (40 %), в группе 2 животных, получавших дозу 0,3 мг/кг, – 7 крыс, из которых с опухолью – 3 (33 %). В группе 3 животных, получавших дозу 30,0 мг/кг, – 9 крыс, из которых с опухолью – 6 (66 %). Средняя длительность жизни животных с опухолями составляла, соответственно в группе 1 – 124,4 суток, группе 2 – 126,7 суток, группе 3 – 116,4 суток. Таким образом, Тербутилазин в дозе 30 мг/кг вызывает большую гибель животных с опухолями. Однако при статистической обработке данных достоверных различий в смертности животных между контрольной и экспериментальными группами не установлено.

При клинических обследованиях не установлено какого-либо токсического действия Тербутилазина в группе 4. Во всех опытных группах на протяжении эксперимента животные, которые не имели новообразований или изъязвляющихся опухолей, охотно поедали корм и потребляли воду. Их поведение и двигательная актив-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

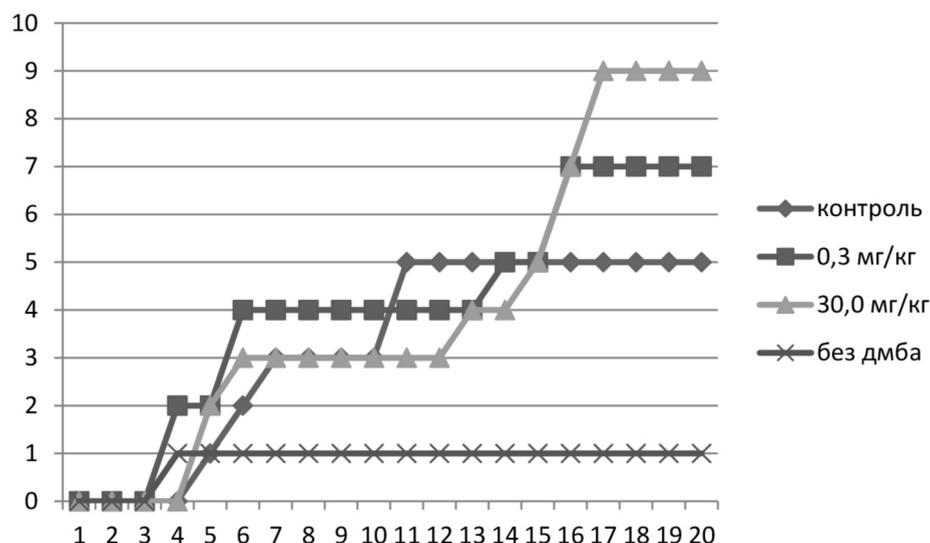


Рис. 1.
Кумулятивная смертность животных в течение индуцированного ДМБА канцерогенеза молочных желез и воздействия Тербутилазина.

ність не различалась. Вместе с тем, по мере роста опухолей молочных желез, особенно при изъязвлении новообразований, крысы начинали терять вес, слабели, становились апатичными. Каких-либо других клинических симптомов, связанных с введением Тербутилазина, не обнаружено.

Масса тела и ее прирост были статистически достоверно выше у животных, которые не были иницированы ДМБА и получали только Тербутилазин в дозе 30 мг/кг, по сравнению с животными других групп (рис. 2).

У животных, иницированных ДМБА, под влиянием Тербутилазина не выявлено статистически значимых изменений массы тела и ее прироста в сравнении с контролем. Общая динамика изменения средних групповых показателей массы тела крыс,

получавших Тербутилазин в дозе 0,3 мг/кг, была на 4 % выше, а в дозе 30,0 мг/кг – на 5 % ниже контроля ($p \geq 0,05$).

У животных, получавших ДМБА и Тербутилазин, выявлены статистически значимые кратковременные изменения прироста массы тела в сравнении с контролем, которые не имели токсикологического значения. Общая динамика изменения средних групповых показателей прироста массы тела и кумулятивного прироста крыс, получавших Тербутилазин, не отличалась от контроля ($p \geq 0,05$). Общетокического действия Тербутилазина по приросту массы тела также не установлено.

Пальпаторное обследование животных позволяло контролировать появление опухолей молочных желез на ранней стадии и проследить динамику их роста. Ново-

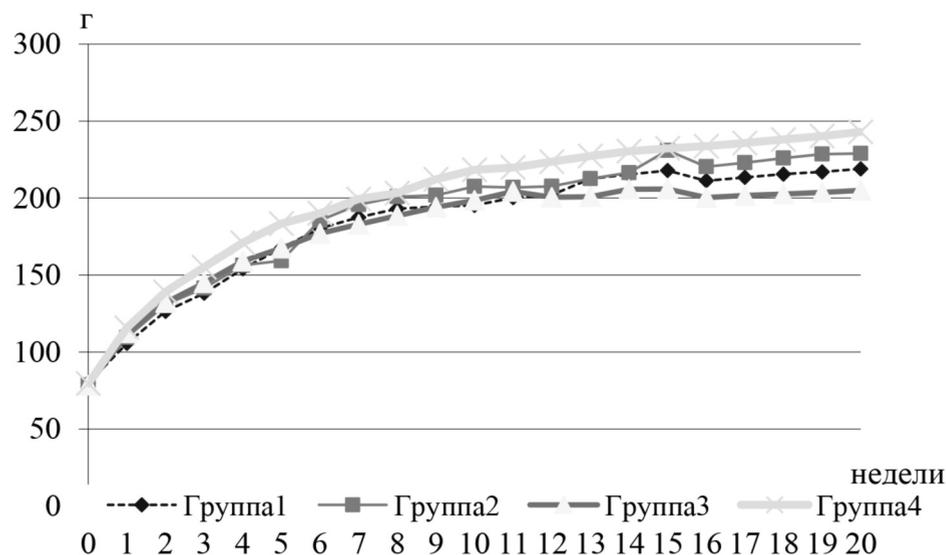


Рис. 2. Изменение массы тела животных при введении Тербутилазина. Группа 1- ДМБА и вода. Группа 2 – ДМБА и Тербутилазин в дозе 0,3 мг/кг. Группа 3 – ДМБА и Тербутилазин в дозе 30 мг/кг. Группа 4 – Тербутилазин в дозе 30 мг/кг.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

образования молочных желез были выявлены у крыс только в группах, инициированных ДМБА (группы 1, 2 и 3). Первые опухоли выявлены уже на 6 неделе эксперимента, что соответствует третьей неделе после последнего введения ДМБА.

На этой стадии процесса пальпаторно в молочной железе крыс выявлялся небольшой солитарный узелок мягкой, тестоватой консистенции, который в дальнейшем уплотнялся, увеличивался в размере и часто становился бугристым. Дальнейшее развитие процесса приводило к тому, что опухоль приобретала неподвижность и покрывающая новообразование кожа натягивалась. Часть обнаруженных опухолей плотно фиксировалась к прилегающим тканям. К концу эксперимента часто опухоли изъязвлялись, образуя свищи с некротическим распадом. Среднее количество узлов, выявленных у животных контрольной и экспериментальных групп, увеличивалось по мере длительности эксперимента.

Новообразования молочной железы с течением времени эксперимента характеризовались множественностью, и, как правило, у самок прощупывалось по несколько с одной или другой стороны и на уровне той или иной пары молочных желез. Наиболее часто опухоли молочных желез у крыс располагались в подключичной, паховой области и в районе живота. По локализации чаще всего у самок разных групп развивались новообразования третьей пары от 8 до 9 узлов, пятой и

шестой пар – от 3 до 9 узлов. Реже поражались вторая и четвертая пары.

Количество и скорость развития этих узлов характеризует интенсивность малигнизации ткани молочной железы и является показателем промоции канцерогенеза. На рис. 3 представлена динамика выявления опухолевых узлов в молочных железах крыс.

Как видно из рисунка форма кривых, показывающих выявление опухолевых узлов у крыс от времени воздействия Тербутилазина, не отличается от контроля.

Таким образом, Тербутилазин не влиял на общую закономерность канцерогенеза индуцированного ДМБА.

На 8, 9 и 10 неделях среднее количество опухолевых узлов у крыс 2 группы превышало этот показатель у контрольных животных соответственно на 28,6; 22,7 и 12,9 %%, а у животных 3 группы – на 78,5; 59,1 и 25,8 %%. Как видно из представленных данных, такая стимуляция развития опухолей имеет дозозависимый характер, хотя и не является статистически достоверной. В дальнейшем количество узлов в контрольной группе увеличивается с большей скоростью, достигает значений экспериментальных групп и даже их превосходит.

Интегральная площадь узлов в период опухолевого роста во всех группах статистически достоверно не изменяется и происходит по одному закону (рис. 4).

При визуальном исследовании внутренних органов и тканей во время патологоанатомического вскрытия крыс разных

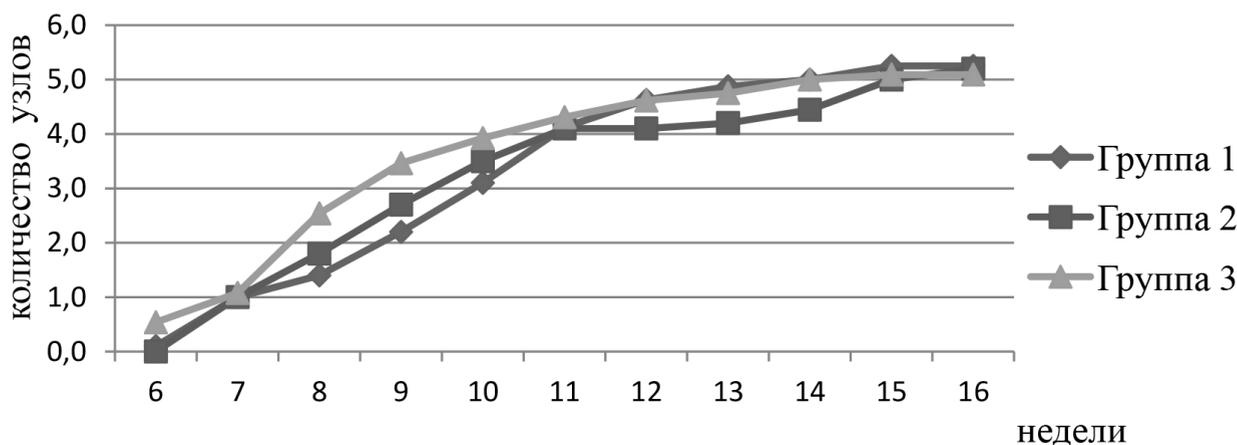


Рис. 3. Динаміка виявлення опухолевих вузлів у молочних железах крыс. Група 1 – контроль, ДМБА і вода. Група 2 – ДМБА і Тербутилазин в дозі 0,3 мг/кг. Група 3 – ДМБА і Тербутилазин в дозі 30 мг/кг.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

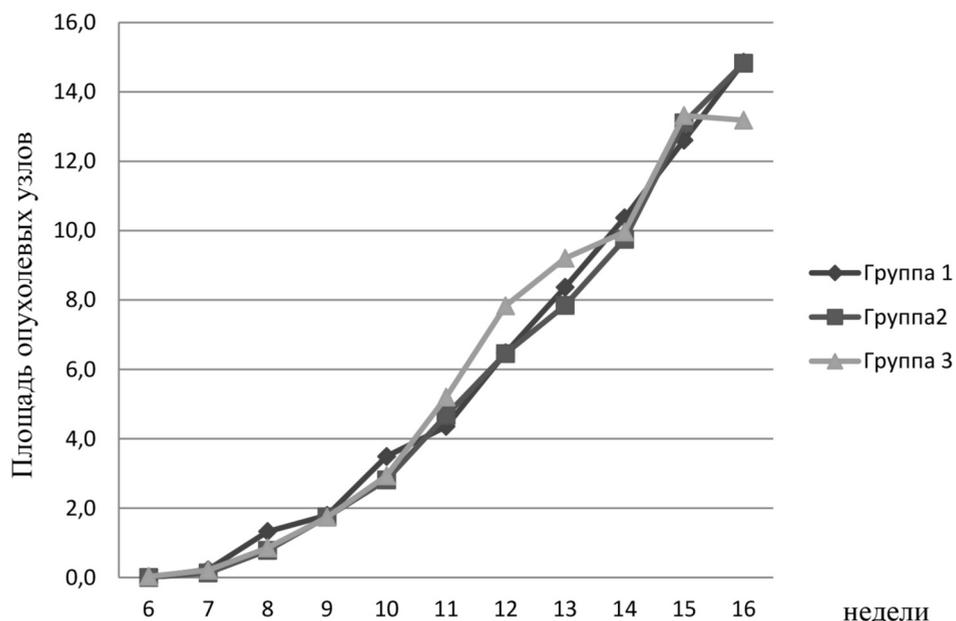


Рис. 4. Изменение средней общей площади опухолей молочной железы крыс, индуцированных ДМБА под воздействием Тербутилазина.

груп відзначалося, що по локалізації неопухових змін статистически достовірної різниці між ініційованими групами не спостерігалося ($p \geq 0,05$). З загальної картини виділяються неініційовані тварини, отримували тільки Тербутилазин в високій дозі, у яких при макроскопічному дослідженні не виявлено видимих патологічних змін, як неопухової так і опухової етіології.

Виявлені у мишей пухли молочної залози часто розташовувалися безпосередньо під шкірою або неглибоко в рихлої підшкірній клітчатці. Розміри і консистенція виявлених во время пальпації опухових вузлів молочної залози не завжди відповідали описанню при візуальному дослідженні препаративаних мишей.

Новоутворення молочних залоз на строк закінчення експерименту були виявлені у 10 самок з групи 1 і 2 і у 12 особей – з групи 3. З них ізязвлення спостерігалося в 60 % випадків в групах 1 і 2 і 75 % – в групі 3.

Так, в середньому на тварину, що має пухли МЖ, в групі 1 площа вузла складала $3,6 \text{ см}^2$, в групі 2 – $2,5 \text{ см}^2$ і в групі 3 – $2,6 \text{ см}^2$. Гістологічне дослідження показало, що всі пухли молочних залоз у мишей, виявлені при відкритті померлих і умершвлених тварин, були злоякісними. Діагностуєми пухли молочних

залоз мишей-самок були верифіковані як внутріпротоковий рак з переважанням крибриформних і солідних структур. Ці результати збігаються з даними літератури, згідно з якими індуковані ДМБА пухли частіше були представлені мультифокальними протоковими карциномами або папілярними раками [11, 20].

Метастази виявлених пухолів виявлені в декількох випадках – в тимусі (інвазія судин) у одного тваринного в групі 1 і у одного в групі 2. По одному тваринному в групах 2 і 3 – метастази в печінці.

Таким чином, Тербутилазин не збільшував частоту метастазування індукованих ДМБА пухолів молочної залози в період проведеного експерименту.

Обобщенная оценка канцерогенного эффекта у мишей при введении ДМБА и Тербутилазина представлена в табл. 1. Как видно из таблицы, частота выявления животных с опухолями в группе, которая получала Тербутилазин в дозе 30 мг/кг , выше на 17 % по сравнению с контрольной. Однако это увеличение не было статистически достоверным при использовании различных статистических методов оценки. Латентный период появления этих опухолей также не отличался от контроля. Первые опухоли были выявлены во всех группах практически в одно и то же время с разницей в несколько дней.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

Длительность среднего латентного периода у животных, получавших ДМБА и Тербутилазин была даже больше на 5–8 дней по сравнению с контролем. Все исследованные опухоли были злокачественными. Количество метастазирующих опухолей во всех группах было низким. Статистически этот показатель не различался между группами. Суммарное количество опухолевых узлов в молочных железах различных локализаций было на 27 % выше у животных, получавших низкую дозу Тербутилазина. Тогда как у животных, которые получали высокую дозу Тербутилазина, этот показатель находился

на уровне контроля. Анализируя динамику увеличения опухолевых узлов в этой группе, следует отметить их появление на поздних стадиях эксперимента. Небольшие размеры этих узлов значительно снизили средний показатель площади опухолевых узлов в этой группе, который был статистически достоверно ниже на 31 % контроля. Средняя площадь опухолевого узла была ниже по сравнению с контролем и у животных, получавших Тербутилазин в высокой дозе на 28 % ($p < 0,05$).

Небольшие размеры этих узлов значительно снизили средний показатель площади опухолевых узлов в этой группе,

Таблица 1

Показатели канцерогенного эффекта

Показатели	Группа 1 – 0,0 мг/кг	Группа 2 – 0,3 мг/кг	Группа 3 – 30,0 мг/кг	Группа 4 – 30,0 мг/кг (без инициации ДМБА)
n	15	15	15	15
Эффективное число, абс. (%)	12 (80)	11 (73)	12 (80)	—
Число животных с опухолями, абс. (%)	10 (83)	10 (91)	12 (100)	н/о
$p - \chi^2$ с коррекцией Ейтса	—	1,0	0,46	—
p - точный критерий Фишера (односторонний)	—	0,50	0,24	—
p - по методу Пето	—	1,00	0,58	—
Латентный период 1-ой опухоли, недели (дни)	6 (45)	7 (49)	6 (45)	—
Средний латентный период опухолей, недели (дни)	11 (75)	12 (83)	11 (80)	—
Гистологический тип 1-ой опухоли	карцинома	карцинома	карцинома	—
Коэффициент множественности, R	4,7	6,0	4,8	—
Число злокачественных опухолей, абс. (%)	10 (100)	10 (100)	12 (100)	—
Соотношение добро-/злокачественных опухолей, абс. (%)	0/10 (0/100)	0/10 (0/100)	0/12 (0/100)	—
Количество животных с метастазирующими опухолями	1	2	1	—
Размер опухолей МЖ, см ²	3,6±1,3	2,5*±1,4	2,6±1,7	—
p/t	—	0,04	0,11	—
Погибло животных, абс. (%)	5 (33)	6 (40)	9 (60)	1 (7)**
Сох F-test	—	0,41	0,35	—
Погибло животных с опухолями по отношению к ЭЧ, абс. (%)	2 (17)	3 (27)	6 (50)	н/о
	—	—	0,19	—
Средняя продолжительность жизни погибших животных, недели (дни)	11 (77)	8 (60)	11 (76)	6 (28)**

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - случайная гибель

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

который был статистически достоверно ниже на 31 % контроля. Средняя площадь опухолевого узла была ниже по сравнению с контролем и у животных, получавших Тербутилазин в высокой дозе на 28 % ($p < 0,05$).

Средняя продолжительность жизни погибших животных контрольной и группы животных, получавших Тербутилазин одинаковы, что позволяет сравнить количество погибших животных с опухолями. В группе крыс, получавших Тербутилазин в большой дозе, доля таких животных составляет 50% по сравнению с контролем 17% ($p \geq 0,05$).

Поскольку выявленные изменения не подтверждены статистически, их нельзя

считать достаточными доказательствами эффекта воздействия Тербутилазина на ход канцерогенеза, индуцированного ДМБА у крыс самок Wistar Han. Однако следует отметить, что выявленные тенденции положительного влияния Тербутилазина в дозе 30,0 мг/кг в канцерогенез молочной железы могут быть расценены, как слабый эффект, обусловленный токсическим действием вещества на организм животных-опухоленосителей. По доступным данным литературы в хронических экспериментах также не обнаружено четкого канцерогенного эффекта [1]. В связи с этим эксперты US EPA отнесли Тербутилазин в группу D, веществ для которой нет достаточных доказательств канцерогенности для человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. US EPA. Carcinogenicity Peer Review of Terbutylazine/ US EPA, 1994. — 17 p.
2. European Food Safety Authority; Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance terbutylazine// EFSA Journal 2011. 9(1), 1969. — P. 133.
3. Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential. Science Information Management Branch. Health Effects Division. Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency. 2014. — 29 p.
4. Kjeldsen L.S. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity / L.S. Kjeldsen, M. Ghisari, E.C. Bonefeld-Jørgensen // *Toxicol Appl Pharmacol.* — 2013. — V.272, № 2. — P. 453–464.
5. Atrazine and breast cancer: A framework assessment of the toxicological and epidemiological evidence/ J.W. Simpkins, J.A. Swenberg, N.Weiss [et al.]// *Tox. Sci.* 2011. — V.123, № 2. — P. 441–459.
6. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, V. 73. Some Chemicals That Cause Tumors of the Kidney and Urinary Bladder in Rodents and Some Other Substances. Lyon: IARC. — 1999. — P. 59–113
7. Understanding the effects of atrazine on steroidogenesis in rat granulosa and H295R adrenal cortical carcinoma cells / N.S. Tinfo, M.G. Hotchkiss, A.R. Buckalew [et al.] // *Reprod Toxicol.* — 2011. — V. b 31. — № 2. — P. 184–93.
8. Possible enhancing effects of atrazine on growth of 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague–Dawley rats / Ueda Makoto, Imai Toshio, Takizawa Tamotsu [et al.] // *Cancer Science.* — 2005. — V. 96, — № 1. — P.19–25.
9. Chinnadurai K. Influence of conjugated linoleic acid enriched ghee feeding on cancer incidence and histopathological changes in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced mammary gland carcinogenesis in rats / K. Chinnadurai, A. K. Tyagi, P. Krishnamoorthy. // *Vet. Arhiv.* — 2008. — V. 78. — № 6. — P. 511–520.
10. Effect of 13 week magnetic field exposures on DMBA-initiated mammary gland carcinomas in female Sprague–Dawley rats / L.E. Anderson, G.A. Boorman, J.E. Morris [et al.] // *Carcinogenesis.* — 1999. — V. 20, — № 8. — P. 1615–1620.
11. Costa I. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz (alpha)anthracene in the rat: A comparative analysis with human breast tumors. / I. Costa, M. Solanas, E. ESCRICH // *Arch Path Lab Med.* — 2002. — V.126. —P.915–927.
12. Rudel R. A. Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention / R.A.Rudel, K.R. Attfield, J.N. Schifano, J.G. Brody // *Cancer.* — 2007. — №109. — P. 2635–2666.
13. Evaluation of Carcinogenic Potential of Diuron in a Rat Mammary Two-Stage Carcinogenesis Model / T.F. Grassi, M.A.M. Rodrigues, J.L. Viana de Camargo, L.F. Barbisan // *Toxicol Pathol* — April 2011 — VI. 39. — №. 3 — P. 486–495.
14. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. — 1986. — 51 p.
15. FAO specifications for plant protection products. Terbutylazine (AGP: CP/304). Rome: Food and Agriculture Organisation of United Nations . — 1992. — 14 p.
16. Сидоров К.К. Введение веществ в желудок, в трахею, под кожу, в вену и другие пути введения ядов лабораторным животным/ К.К. Сидоров// *Методы определения токсичности и опасности химических веществ.* — М. — 1976. — 87 с.
17. OECD Carcinogenicity Studies. Test Guideline 451, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris. — 2009. — 15 p.
18. Волкова О.В. Основы гистологии с гистохимической техникой / О.В. Волкова. — М.: «Медицина» 1982. — 304 с.
19. 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. — N. 99. —1990. —754 p.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

20. Турусов В.С. Методы выявления и регламентирования химических канцерогенов / В.С. Турусов, Ю.Д. Парфенов. – М.: – Медицина. – 1986. – 125 с.
21. 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.

ВІДСУТНІСТЬ МОДИФІКУЮЧОГО ЕФЕКТУ ТЕРБУТИЛАЗИНУ НА КАНЦЕРОГЕНЕЗ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ, ІНДУКОВАНИЙ ПОЛІЦИКЛІЧНИМ ВУГЛЕВОДНОМ — 7,12 ДИМЕТИЛБЕНЗ-АНТРАЦЕНОМ У ЩУРІВ

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

РЕЗЮМЕ. Мета роботи. Вивчити можливість промоторного ефекту Тербутилазину на канцерогенез молочної залози, індукований поліциклічним вуглеводнем 7,12 дибензантраценом (ДМБА) у щурів-самиць Wistar Han.

Матеріали та методи. Експерименти виконані на 60 щурах самицях Wistar Han, масою 105-125 г, 45 з яких були ініційовані ДМБА, а 15 слугували контролем для вивчення впливу Тербутилазину. Ініціацію проводили за протоколом згідно з Anderson LE, 1999. Тваринам внутрішньошлунково, щотижня, протягом 4 тижнів вводився ДМБА у вигляді 2,5% масляного розчину, дозою 50 мг / кг маси тіла. Після тижневої перерви вводили щодня, внутрішньошлунково Тербутилазин в дозах: 0,3 і 30,0 мг / кг маси тіла, що відповідали недіючому і діючому рівням за канцерогенним ефектом. У контрольній, до дії ДМБА, групі Тербутилазин вводився в дозі 30 мг / кг. Тривалість введення Тербутилазина становила 16 тижнів. Протягом експерименту проводилися клінічні дослідження. Оцінювалися загальний стан тварин, їх маса і приріст, час появи пухлинних вузлів, їх кількість і площа. Після некропсії проводилося макроскопічне і гістологічне дослідження. Визначалися кількість пухлин, їх розміри, гістологічний тип, наявність метастазів.

Результати. Тербутилазин не чинив токсичної дії на організм щурів, які не були ініційовані ДМБА. У групах щурів, котрим вводився ініціатор, до появи пухлин спостерігався однаковий рівень загибелі тварин – 13%. Тербутилазин у дозі 30 мг / кг підвищував рівень загибелі тварин з пухлинами і скорочував тривалість їхнього життя у порівнянні з контролем та щурами, які отримували низьку дозу на 14%. Загальна динаміка зміни середніх групових показників маси тіла, приросту маси тіла та її кумулятивного приросту у щурів, які отримували Тербутилазин, не відрізнялася від контролю. Статистично достовірних даних змін частоти пухлин, тривалості латентного періоду їх появи, кількості пухлинних вузлів, їх росту і локалізації, ступеня малігнізації, що свідчили б про промоторну дію Тербутилазину на канцерогенез молочної залози не виявлено.

Висновок: Тербутилазин не має промоторної дії за канцерогенезу молочної залози, індукованого ДМБА у щурів.

Ключові слова: канцерогенез, молочна залоза, поліциклічні вуглеводні 7, 12 дибензантрацен, ДМБА, пестициди, Тербутилазин, промоторний ефект, щури-самиці Wistar Han.

THE LACK OF A MODIFYING EFFECT OF TERBUTHYLAZINE ON MAMMARY CARCINOGENESIS INDUCED BY POLYCYCLIC HYDROCARBON — 7,12-DIMETHYL- BENZ[A]ANTHRACENE IN RATS

N.M. Nedopytanska, E.A. Bagley, O.V. Reshavskaya, L.V. Tkachenko
SI «L. I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety,
Ministry of Health of Ukraine», Kyiv, Ukraine

ABSTRACT. Objective. To evaluate the possibility of promoter Terbutylazine action on mammary carcinogenesis induced by polycyclic hydrocarbon — 7,12-dibenz[a]anthracene (DMBA) in female Wistar Han rats.

Materials and Methods. The experiments were performed in 60 Wistar Han female rats with a body weight of 105–125 g, 45 of which were initiated by DMBA, and 15 served as a control for study of the effect of Terbutylazine. Initiation was performed in accordance with the protocol of Anderson L.E., 1999. DMBA was administered intragastrically as a 2.5 % oil solution in a dose of 50 mg/kg of body weight daily for 4 weeks. After a one-week break, Terbutylazine was administered intragastrically on a daily basis in the doses of 0.3 mg/kg and 30.0 mg/kg of body weight, corresponding to the inactive and active level by a carcinogenic effect. In the control group, Terbutylazine was administered in the dose of 30 mg/kg for DMBA effect. Terbutylazine administration duration — 16 weeks. During the experiment, clinical studies were conducted. The general condition of animals, their body weight and weight gain, the time of tumour nodes appearance, their number and area were estimated. After necropsy, a macroscopic and a histological examination was performed. Tumours number, their sizes, histological type and metastases presence were determined.

Results. Terbutylazine had no toxic effect on the body of rats, which had not been initiated by DMBA. In groups of rats initiated by DMBA, equal mortality of animals (13 %) was observed before tumours appearance. Terbutylazine at a dose of 30 mg/kg caused higher mortality (14 % higher) of animals with tumours and reduced their lifetime in comparison with the control and a low dose. There was no difference in the overall dynamics of changes in the mean group parameters of body weight, body weight gain, and its cumulative gain in rats on Terbutylazine compared to the control. Statistically significant data on changes in tumour incidence, duration of the latent period of their appearance, the number of tumour nodes, their growth, localisation, and degree of malignancy, indicative of a promoter Terbutylazine action on mammary carcinogenesis, were not observed.

Conclusion. Terbutylazine has no promoter action on DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats.

Key words: carcinogenesis, mammary gland, polycyclic hydrocarbons, 7,12-dibenz[a]anthracene, DMBA, pesticides, Terbutylazine, promoter action, Wistar Han female rats

Надійшла до редакції 17.02.2017 р.