

УДК 615.9:616-006.6:632.95

ПРОМОТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ГЕНЕРИКОВ S – МЕТОЛАХЛОРА С РАЗЛИЧНОЙ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТЬЮ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ У КРЫС

Е.А. Баглей, Н.Н. Недопитанская, В.С. Лисовская, 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. Метолахлор, а в настоящее время его биологически активный изомер S-метолахлор – один из наиболее широко применяемых гербицидов в мире. В хронических экспериментах на крысах был выявлен гепатоканцерогенный эффект метолахлора, а в эпидемиологических исследованиях – положительная зависимость между экспозицией фермеров к метолахлору и заболеваемостью их раком печени. Отмечается возможность влияния вредных примесей в технических продуктах на выявленные эффекты.

Цель работы – изучить промоторный эффект генериков S-метолахлора с различной гепатотоксичностью в канцерогенезе печени у крыс, иницированном нитрозодиэтиламином (НДЭА), и проанализировать потенциальный риск его реализации у человека.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на крысах-самцах Wistar Han, на модели гепатоканцерогенеза «НДЭА – гепатэктомия». Исследовались два образца генериков S-метолахлора, соотношение S/R энантиомеров – 87/13 %, с различной гепатотоксичностью. Вещества вводили внутривенно в дозах 1,5, 15 и 150 мг/кг массы тела в течение 8 недель. Животные группы отрицательного контроля получали воду, а положительного – фенобарбитал. Промоторный эффект оценивали по стандартизированным показателям общей площади и количеству фокусов гепатоцитов, экспрессирующих γ -глутамилтранспептидазу (ГТП).

Результаты. Клинических признаков токсического действия S-метолахлора на организм крыс, иницированных к канцерогенезу НДЭА, не установлено. Обнаружено увеличение количества и общей площади γ -ГТП-положительных фокусов в печени животных, получавших опухолеобразующую дозу обоих образцов S-метолахлора, а также фенобарбитал. Средняя площадь фокуса в печени крыс, получавших более токсический образец, была меньше. Установлен порог промоторного действия S-метолахлора на гепатоканцерогенез на уровне ≤ 15 мг/кг м.т. Анализ литературных данных о механизме гепатотоксического действия метолахлора позволил сделать заключение о фенобарбиталоподобном механизме промоторного действия, которое осуществляется через андростановый конституционный рецептор (CAR). Этот механизм видоспецифичен для грызунов, поэтому результаты эпидемиологических исследований о возможности развития рака печени у человека не могут быть подтверждены экспериментально.

Выводы. Генерики S-метолахлора с разной степенью гепатотоксичности в опухолеобразующей дозе оказывают промоторный эффект в канцерогенезе, иницированном НДЭА в печени крыс. Гепатотоксичность S-метолахлора тормозит рост γ -ГТП-положительных фокусов. Установлен порог промоции гепатоканцерогенеза на уровне ≤ 15 мг/кг м.т. Механизм выявленного эффекта не релевантен для человека.

Ключевые слова: S-метолахлор, нитрозодиэтиламин, промоторный эффект в гепатоканцерогенезе, крысы Wistar Han, γ -глутамилтранспептидаза.

Метолахлор, а в настоящее время его биологически активный изомер S – метолахлор – один из наиболее широко применяемых гербицидов в мире.

По химической структуре эти вещества относятся к классу хлорацетанилидов. Они ингибируют синтез белка в растениях. Рацемический метолахлор является смесью (50/50) правовращающих (R) и левовращающих (S) оптических изомеров. В 1997 году начал использоваться S – метолахлор, который состоял из 88 % S – изомера и 12 % R изомера. Этот продукт был

более активен как гербицид и поэтому начал вытеснять с рынка рацемический метолахлор [1, 3]

Большие объёмы использования метолахлора в сельском хозяйстве привлекли внимание эпидемиологов, которые изучают влияние пестицидов на здоровье человека [2, 3]. В эпидемиологических исследованиях, проведенных в США по проекту Agricultural Health Study (AHS), изучена связь между использованием метолахлора и онкологической заболеваемостью фермеров в штатах Айова и Северной

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

Каролине. Никаких статистически значимых связей с использованием метолахлора в исследованиях AHS по множественным факторам риска для конкретных видов рака: меланомы, рак поджелудочной железы и рак толстой кишки или прямой кишки, рак простаты у аппликаторов не наблюдалось. В работе [2] была установлена корреляционная связь между содержанием нитратов и метолахлора в грунтовых водах и онкологической заболеваемостью детей. Однако авторы не смогли дифференцировать роль других факторов в развитии этих опухолей. Вместе с тем установлена положительная связь между использованием метолахлора и заболеваемостью рака печени и фолликулярно-клеточной лимфомы [3]. В хронических экспериментах на крысах был выявлен гепатоканцерогенный эффект метолахлора. Обнаружение положительной зависимости между раком печени и экспозицией фермеров к метолахлору является первым сообщением, в котором показано, что вызываемое им повышение новообразований в печени крыс, а также гепатотоксическое действие на клетки печени человека *in vitro*, может наблюдаться у людей. Авторы исследований подчеркивают, что полученные ими результаты касаются только метолахлора, а не S-метолахлора [3], ссылаясь на возможные различия токсикологического эффекта их препаративных форм и наличия вредных примесей в технических продуктах [4].

В отличие от R-метолахлора канцерогенность S-метолахлора не изучалась в хронических экспериментах. Сравнив токсикологические параметры обоих изомеров, эксперты ЕРА сделали заключение: S-метолахлор по канцерогенности может классифицироваться как его гомолог.

Метолахлор по классификации ЕРА отнесен к возможным канцерогенам для человека, группе С. В хронических экспериментах на крысах, которые получали высокую дозу, обнаружено увеличение частоты опухолей печени у самок и положительный тренд их у самцов. Отсутствие

генотоксичности у обоих изомеров метолахлора позволило предположить промоторный механизм этого эффекта и установить его безопасный уровень [1]. В предыдущих наших исследованиях показана возможность индукции S-метолахлором предопухолевых состояний в печени крыс при гепатоканцерогенезе, инициированном нитрозодиэтиламином [5]. Однако отсутствие данных о механизме гепатоканцерогенного действия метолахлора, роли примесей в этом эффекте и его релевантности для человека требуют дополнительных исследований.

Целью работы было изучить промоторный эффект генериков S-метолахлора с различной гепатотоксичностью в канцерогенезе печени у крыс, нициированном нитрозодиэтиламином (НДЭА), у крыс и проанализировать возможность его реализации у человека.

Материалы и методы

Эксперимент проведен в Центре превентивной и регуляторной токсикологии ГП «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.

Эксперимент проведен в соответствии с протоколом, рекомендуемым N.Ito, для выявления гепатоканцерогенов с нашими модификациями [6,7]. Животные крысы-самцы Wistar Han SPF находились в «чистой» зоне вивария барьерного типа, в одинаковых условиях в клетках типа Т4 по 5 голов. Комната была обеспечена принудительной вентиляцией (12 объемов в час) подготовленным воздухом. Температура и относительная влажность воздуха регистрировались ежедневно, колебания температуры составляли 20-21°C, влажности – 45-46 %. Освещение в комнатах – лампы дневного света (12 часов света, 12 часов

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

темноты). В течение эксперимента крысы получали сбалансированный гранулированный корм Альтромин (Германия) и обеззараженную фильтрованную воду.

В эксперименте использовались крысы-самцы с массой тела 185 ± 10 г, которые были получены из питомника Центра. После карантина и рандомизации по массе тела животные были разделены на группы. Две контрольных группы – положительный и отрицательный контроль (1 и 5 группы) и подопытные группы (2, 3 и 4 группы) по 15 особей каждая. При наличии признаков какой-либо патологии или несоответствия при рандомизации животные отбраковывались.

После акклиматизации – на 5 день эксперимента всем животным была проведена однократная инъекция нитрозодиэтиламина (НДЭА), 98 %, (Sigma, USA) в дозе 200 мг/кг. Раствор НДЭА готовился на физрастворе в концентрации 5 % и вводился внутривентриально.

Исследовались два генерических образца S-метолахлора с предполагаемой различной гепатотоксичностью. Первый образец содержал 97,2 % основного вещества, из которых 87,2 % составлял S-энантиомер, второй – 97,7 % основного вещества, из которых 86,7 % составлял S-энантиомер. Таким образом, соотношение лево- и правовращающих энантиомеров, S/R было 87/13 %, что соответствует международным стандартам [1, 3]. Вещества начали вводить экспериментальным животным через 2 недели после инъекции НДЭА. Эксперимент со вторым веществом начали проводить на неделю позже, начальная масса крыс при этом была 205 ± 15 г.

Животным из 2, 3 и 4 групп вещество вводилось в дозах 1,5, 15 и 150 мг/кг м.т., соответственно. Крысам из первой группы (отрицательный контроль) вводили воду с ОП 10 (0,05 % раствор), а второй (положительный контроль) – фенобарбитал натрия, 99 % (Alkaloida Chemical Company, Hangry) в дозе 37 мг/кг м.т. при тех же условиях, что и опытным. Растворы S-метолахлора и фенобарбитала готови-

лись ежедневно (ex tempore) на воде с добавлением ОП 10. Введение растворов осуществлялось 5 раз в неделю (экспозиция с 1 по 5 день, 6 и 7 день – ожидание), в утренние часы до кормления внутрижелудочно с помощью металлического зонда в допустимом объеме для мелких лабораторных животных [8].

Дозы выбраны на основании данных токсикологической оценки метолахлора и рекомендаций OECD [1, 3, 8]. Коррекция доз проводилась через каждые 7 дней с учетом динамики массы тела животных в течение экспозиции. Через 3 недели от начала эксперимента животным проводили частичную гепатэктомию по методу Higgins and Anderson, 1931. После гепатэктомии, через 2 дня, вещество продолжали вводить еще в течение 5 недель. Контроль состояния животных проводился ежедневно с целью выявления любых отклонений, связанных с воздействием изучаемого вещества. Оценивались поведение животных, их подвижность, аппетит, состояние шерстного покрова, кожи, слизистых. Через 24 часа после последнего введения исследуемого вещества была проведена эвтаназия животных. Эвтаназию осуществляли в CO₂ камере с соблюдением правил гуманного отношения к животным. После эвтаназии проводилось их вскрытие и макроскопическое обследование всех внутренних органов. Для выявления гепатотоксического действия определялась абсолютная и относительная масса печени. При необходимости проводились гистологические исследования.

Для гистохимического анализа отбирались образцы печени, из которых с помощью микротом-криостата готовились срезы толщиной 5-10 мкм. После фиксации срезов в холодном ацетоне проводилась гистохимическая реакция по определению γ -глутамилтранспептидазы (ГТП) – маркера трансформированных гепатоцитов методом Гленера [7]. В ткани печени в ходе пролиферации клеток образуется γ -глутамилтранспептидаза (ГТП) – положительные фокусы гепатоцитов. Количество и

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

размеры этих фокусов, являются основными критериями в определении промоторной активности исследуемого продукта.

После проведенной реакции статистически обрабатывались размеры выявленных фокусов гепатоцитов. Подсчитывались количество и площадь фокусов на условную единицу плоскости среза печени с использованием компьютерных программ.

Полученные значения вышеприведенных показателей обрабатывались с помощью методов математической статистики для выявления различий между экспериментальными группами животных и контролем. Первоначально устанавливали распределение данных в выборке. В случае нормального распределения и гомогенности переменных использовался параметрический двусторонний *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок, а при отсутствии такового – непараметрический *U*-критерий Манна Уитни. Разница между показателями контрольных и экспериментальных животных была достоверной при $p \leq 0,05$. Статистические расчеты проводились с применением пакета компьютерных программ Excel 2010.

Результаты и обсуждение

На протяжении всего периода экспозиции в подопытных группах не наблюдалось смертности животных, которая была бы связана с введением вещества, за исключением гибели крыс из-за послеоперационных осложнений после частичной гепатэктомии.

Поведение, внешний вид, двигательная активность крыс во всех группах на протяжении эксперимента не изменялись. Животные охотно поедали корм и потребляли воду. При сравнительной оценке динамики роста крыс-самцов Wistar Han в условиях эксперимента изменений массы тела и её прироста у подопытных животных по сравнению с негативным контролем не установлено. После введения НДЭА масса тела крыс во всех группах снижалась на 4-7%. Затем наблюдался период восстановления и повторное снижение массы тела

на 0-4 % после гепатэктомии. Введение веществ не влияло на изменение массы тела и её прироста в обоих экспериментах. В табл. 1 представлены данные о массе тела животных по окончании экспозиции к *S*-метолахлору перед эвтаназией.

Масса тела животных экспериментальных групп статистически не отличается от крыс группы как положительного, так отрицательного контроля в обоих экспериментах. После эвтаназии в ходе наружного осмотра животных в опытных группах не обнаружены какие-либо отличия внешнего вида крыс, экспонированных к *S*-метолахлору, от контрольных.

По данным патологоанатомического исследования крыс, которым вводили *S*-метолахлор, не обнаружено макроскопических изменений состояния внутренних органов и тканей по сравнению контролем. При сравнительном анализе изменений абсолютной и относительной массы печени у подопытных крыс относительно отрицательного контроля в первом эксперименте статистически достоверных различий не обнаружено (табл. 1). Во втором эксперименте у крыс, экспонированных к высокой дозе, обнаружено увеличение абсолютной и относительной массы печени на 18 и 15 %%, соответственно. У животных, которые получали фенobarбитал, установлено статистически достоверное увеличение относительной массы печени на 12 и 11%% соответственно.

Таким образом, продукты с одинаковым содержанием *S*-металохлора в исследуемых дозах не оказывали общетоксического действия у крыс, инициированных НДЭА. Однако при экспозиции крыс ко второму продукту в высокой дозе выявлен гепатотоксический эффект.

В многочисленных исследованиях показано увеличение пролиферации клеток, экспрессирующих γ -ГТП и другие глутамилтрансферазы в печени при воздействии гепатоканцерогенов [6, 7]. Эти клетки образуют гиперпластические очаги, которые впоследствии превращаются в узелки и служат гистохимическими био-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

Таблиця 1

Абсолютная и относительная масса печени

Группы животных (n)	Масса тела (г)	Абсолютная масса (г)	Относительная масса (%)
Отрицательный контроль (вода ОП-10) (n=14) ¹	316,7±26,8	11,1±1,2	3,5±0,3
(n=14) ²	348,5±29,3	13,4±1,8	3,8±0,4
S-метолахлор, 1,5мг/кг (n=14)	318,9±21,3	11,3±0,9	3,6±0,3
(n=13)	348,2±11,2	13,0±1,4	3,7±0,4
S-метолахлор, 15 мг/кг (n=14)	326,0±17,7	11,4±1,3	3,5±0,3
(n=14)	348,4±31,8	13,9±1,6	4,0±0,2
S-метолахлор, 150 мг/кг (n=14)	306,9±25,7	10,3±1,6	3,4±0,3
(n=12)	355,8±19,6	15,9±2,0 ¹	4,4±0,4 ³
Положительный контроль (фенобарбитал, 37,5 мг/кг) (n=14) ¹	316,9±28,5	12,4±2,7	3,9±0,6 ³

Примечания: ¹ – первый эксперимент; ² – второй эксперимент; ³ – $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем.

маркерами канцерогенеза. Этот фермент в небольшом количестве экспрессируется холангиоцитами и овальными клетками в печени интактных животных. Значительное количество этого фермента экспрессируется эмбриональными гепатоцитами, а также клетками опухолей печени [9]. γ -ГТП является мембраносвязанным гликопротеином, активный центр которого локализуется на наружной поверхности клетки. Такая локализация позволяет расщеплять внеклеточный глутатион и увеличивать внутриклеточное содержание предшественников его синтеза. Поэтому в этих клетках образуется более высокое содержание глутатиона. Как известно, глутатион обеспечивает метаболизм и детоксикацию ксенобиотиков, в данном случае НДЕА, в ходе чего могут образовываться прямые канцерогены – генотоксиканты, которые трансформируют эти клетки, делая их устойчивыми к цитотоксическому воздействию метаболитов.

Глутатион обеспечивает не только детоксикацию ксенобиотиков, но и повышение редокс-потенциала и синтетических процессов в этих клетках, способствуя их пролиферации. Таким образом, создаются условия для пролиферации и селекции клонов трансформированных клеток, в ходе которой образуются стволовые клетки опухоли. Промоторы стимулируют пролиферацию трансформированных гепатоцитов и образуют очаги их скопления – фокусы, которые в дальнейшем превращаются в узелки.

Количество и размеры гиперпластических γ -ГТП положительных очагов в ткани печени являются главными критериями в определении промоторной активности исследуемого соединения. В табл. 2 представлены данные о влиянии S-метолахора на образование и рост γ -ГТП положительных фокусов в ткани печени крыс.

При оценке показателей γ -ГТП-активных фокусов печени крыс использовались

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

Таблиця 2

**Площадь и количество гиперпластических γ -ГТП фокусов
в печени животных по группам**

Группы животных	Площадь фокусов (мм ² /см ²)	Количество фокусов на см ²	Средняя площадь фокусов (мм ²)
Отрицательный контроль (вода ОП-10) (n=14) ¹	0,80±0,85 ³ (0,36) ⁴	16,77±17,24 (8,17)	0,047±0,007 (0,047)
(n=14) ²	0,20±0,17 (0,11)	6,38±5,13 (5,90)	0,028±0,01 (0,025)
S-метолахлор, 1,5 мг/кг (n=14)	0,71±0,84 (0,35)	14,20±16,16 (7,47)	0,053±0,015 (0,052)
(n=13)	0,13±0,11 (0,12)	5,94±6,00 (4,89)	0,02±0,01 (0,02)
S-метолахлор, 15 мг/кг (n=14)	2,20±1,66 ⁵ (1,69)	43,98±30,20 (39,47)	0,048±0,008 (0,048)
(n=14)	0,22±0,17 (0,16)	9,85±7,34 (8,70)	0,023±0,008 (0,022)
S-метолахлор, 150 мг/кг (n=14)	4,52±3,24 ⁶ (3,94)	77,25±42,97 ⁶ (72,44)	0,055±0,010 ⁵ (0,053)
(n=12)	0,62±0,34 ⁵ (0,53)	30,12±17,80 ⁵ (24,96)	0,022±0,01 (0,020)
Положительный контроль (фенобарбитал, 37,5 мг/кг)	2,96±3,25 ⁵ (1,84)	51,41±44,16 ⁶ (40,34)	0,051±0,01 (0,05)

Примечания: ¹ – первый эксперимент; ² – второй эксперимент; ³ – $M \pm SD$; ⁴ – медиана; ⁵ – $p \leq 0,05$; ⁶ – $p \leq 0,01$ по сравнению с отрицательным контролем, тест Манна – Уитни.

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.

Анализируя результаты действия первого образца касательно образования и роста положительных на γ -ГТП фокусов гепатоцитов в печени крыс, обнаружено статистически достоверное увеличение их средней общей площади в 4,7 раза и в 11 раз у животных, получавших S-метолахлор, соответственно в дозах 15 и 150 мг/кг. Среднее количество фокусов на см² в печени крыс этих групп также увеличивалось по сравнению с контролем соответственно в 4,8 и 8,3 раза.

При воздействии второго образца статистически достоверное увеличение средней общей площади γ -ГТП фокусов гепатоци-

тов в 4,8 раза наблюдалось только в печени крыс, получавших высокую дозу. В средней дозе также наблюдалось увеличение этого показателя только в 1,4 раза ($p \geq 0,05$).

Несмотря на различия в способности к индукции фокусов гепатоцитов, экспрессирующих γ -ГТП в печени крыс в обоих экспериментах, можно сделать вывод о том, что изменение общей средней площади происходит за счёт увеличения количества фокусов. Дополнительное образование таких очагов в печени крыс может происходить, прежде всего, за счёт мутаций в гепатоцитах, индуцируемых изучаемым агентом. Однако S-метолахлор не обладает генотоксическим потенциалом [1, 3, 4]. Следовательно, можно предполагать, что увеличение количества этих фокусов обусловлено пролиферацией инициированных НДЕА гепатоцитов до детектируемых размеров. Данных о влиянии S-метолахлора на пролиферацию гепатоцитов в доступ-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

ной литературе мы не обнаружили. Однако существуют данные о том, что метолахлор тормозил пролиферацию клеток печени человека HepG2 *in vitro* путём изменения клеточного цикла. Анализ результатов проточной цитометрии распределения клеток в цикле показал, что обработка метолахлором приводила к уменьшению количества клеток в фазе G2/M и накоплению их в S-фазе. Авторы не наблюдали увеличения некрозов и апоптоза гепатоцитов [10, 11].

Снижение синтетических процессов в гепатоцитах связано с угнетением энергетического обмена метолахлором [12]. Цитотоксичность метолахлора для гепатоцитов крыс резко возрастает на фоне снижения содержания внутриклеточного глутатиона [13]. Угнетение роста нормальных гепатоцитов создает преимущества для пролиферации инициированных НДЕА клеток, экспрессирующих γ -ГТП. Известно, что клоны таких клеток, для которых характерна пониженная чувствительность к антипролиферативному действию ксенобиотиков и повышенная чувствительность к митогенам или сигналам регенерации, образуют стволовые клетки опухолей. Показателем появления таких клонов в данном случае может служить площадь фокуса. Средняя площадь фокуса у животных, получавших первый образец вещества в дозах 1,5 и 15 мг/кг, статистически не отличалась от контроля, тогда как в дозе 150 мг/кг наблюдалось ее статистически достоверное увеличение на 12,8 %. Однако во втором эксперименте этот показатель во всех группах практически не изменялся. На наш взгляд, это связано с более высокой гепатотоксичностью данного образца.

Фенобарбитал, который был использован в качестве положительного контроля, увеличивал среднюю общую площадь и количество положительных γ -ГТП фокусов в печени в 5 раз. Средняя площадь узелка также увеличивалась, но только на 6,4 %, что связано с гепатотоксичностью данной дозы.

Представленные выше данные показывают, что генерический S-метолахлор с

разной степенью гепатотоксичности в опухолообразующих дозах проявляет промоторное действие на гепатоканцерогенез, инициированный у крыс НДЭА.

Согласно современным представлениям, увеличение пролиферативной активности гепатоцитов, следствие которого образование ГТП фокусов, а впоследствии – аденом и карцином, является ключевым событием в механизме гепатоканцерогенеза. Стимуляция пролиферативной активности гепатоцитов осуществляется через рецепторный механизм, который включает индукцию ферментов, индукцию образования пероксисом, а также взаимодействие с эстрогенами, статинами. Цитотоксический эффект, как и влияние на апоптоз, может осуществляться как через прямое воздействие химических веществ с макромолекулами, так, и опосредовано, через рецепторный механизм. Вследствие этого эффекта происходит гибель гепатоцитов и развивается их компенсаторная регенерация [14]. Гепатэктомия в данной модели является фактором усиления пролиферации гепатоцитов. Поэтому цитотоксическое действие метолахлора, которое приводило бы к гибели гепатоцитов, вызывало бы торможение регенерации печени, чего не выявлено в наших экспериментах (табл. 1). Отсутствие влияния метолахлора на развитие некроза и апоптоз показано в работе [11]. Снижение содержания внутриклеточного глутатиона в гепатоцитах увеличивает цитотоксичность метолахлора [13]. Экспрессия на поверхности трансформированных гепатоцитов ГТП увеличивает в них содержание внутриклеточного глутатиона и создаёт локальное преимущество для их пролиферации перед нормальными гепатоцитами в печени крыс, экспонированных к метолахлору.

Вместе с тем, индукция метолахлором, подобно фенобарбиталу, в печени крыс цитохромов P-450, Cyp2b 1 и Cyp3a 1, а также увеличение активности ферментов – 7-пентоксирезорурфин-О-депентилазы и 7-этоксирезорурфин-О-диэтилазы [12, 13]

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

говорит о рецепторном механизме промоторного эффекта через андростановый конституционный рецептор (CAR). Этот механизм и его видоспецифичность для грызунов хорошо изучены на примере фенобарбитала [14].

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать заключение: генерики S-метолахлора с разной степенью гепатотоксичности в опухолеобразующей дозе оказывают промоторный эффект в канцерогенезе, инициированном НДЭА в печени крыс. Гепатотоксичность S-метолахлора тормозит рост γ -ГТП-положительных фокусов. Установлен порог промоции гепатоканцерогенеза на уровне ≤ 15 мг/кг м.т. Анализ потенциального механизма канцерогенного действия этих веществ подобен фенобарбиталу и осуществляется через конституционный андростановый рецептор (CAR). Эти данные не подтверждают выводов авторов эпидемиологических исследований о возможности развития рака печени у человека.

В последнее время на сайте US EPA опубликована краткая аннотированная информация об исследовании оригинального образца S-метолахлора, результаты которого согласуются с нашими выводами. На основании этих исследований эксперты US EPA классифицировали S-метолахлор, как вещество, механизм канцерогенного действия которого не релевантен для человека [15].

Работа выполнена в рамках НИР ГП «Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л. И. Медведя Министерства здравоохранения Украины» по теме «Научное обоснование современных нормативных требований к применению пестицидов и агрохимикатов: прогнозирование отдаленных эффектов действия (канцерогенного, мутагенного, тератогенной активности, репродуктивной токсичности, хронических интоксикаций)», № государственной регистрации 0108U007458.

ЛИТЕРАТУРА

1. US EPA S-Metolachlor; Pesticide Tolerances. Federal Register. – V.79, № 60 (Friday, March 28, 2014). – Rules and Regulations. – P. 17436–17441.
2. Thorpe N. Herbicides and nitrates in groundwater of Maryland and childhood cancers: a geographic information systems approach. / N. Thorpe, A. Shirmohammadi // *Environ Sci Health*. – 2005. – №23. – P.261–78.
3. 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.
4. Nikoloff N. Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold(R) in human hepatoma (HepG2) cells/ N. Nikoloff, L. Escobar, S. Soloneski, ML. Larramendy // *Food Chem Toxicol*. – 2013. – №62. – P.777–81.
5. Bahliy Ye.A., Nedopytans'ka N.M., Lisovs'ka V.S., Reshavs'ka O.V., Tkachenko L.V. Inductiya S-metolachlorom peredpuhlinnoho stanu v pechiniy shchuriv initsiyovanih do cantserogenezu nitrozodimetylaminom // *Visnik problem biologii i meditsini*. – 2019. – № 2,1 (150). – P. 270–75.
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. Nedopytanskaya N.N. Modifitsiruyshiy effekt triadimefona na razvitie predopuholevih sostoyanii i opuholey v multiorganom cantserogeneze u kris / N.N. Nedopytanskaya, Ye.A. Bahley, V.S. Lisovskaya [et al.] // *Ukrainskyi zhurnal suchasnykh problem toksykologhii*. – 2018. – № 84 (4). – P.22–6 (in Russian).
8. OECD, Guidance Document 116 on the Conduct and Design of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453. Series on Testing and Assessment. Paris: OECD, 2012. – 156 p.
9. Kiyasov A.P. Ovalnye kletki – predpolagaemye stvolovyye kletki pecheni ili hepatoblasty?/ A.P. Kiyasov, A.A. Humerova, M.A.Titova // *Geny & kletki*. – 2006. – №1(2). – P.55–58.
10. Lowry D.M. Mechanism of Metolachlor action due to alterations in cell cycle progression / D.M. Lowry, D. Greiner, M. Fretheim [et al.] // *Cell Biol Toxicol*. – 2013 Aug. – №29(4). – P.283–91. Doi: 10.1007/s10565-013-9256-z.
11. Hartnett S. Cellular effects of Metolachlor exposure on human liver (HepG2) cells / S Hartnett, S Musah, KR Dhanwada // *Chemosphere*. – 2013. – № 90(3). – P.1258–66.
12. Dalton S.R. The herbicide metolachlor induces liver cytochrome P450s 2B1/2 and 3A1/2, but not thyroxine-uridine dinucleotide phosphate glucuronosyltransferase and associated thyroid gland activity / S.R. Dalton, R.T. Miller, S.A. Meyer // *International Journal of Toxicology*. – 2003. – № 22(4). – P.287–95
13. Dierickx P.J. Glutathione-dependent cytotoxicity of the chloroacetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor in rat and human hepatoma-derived cultured cells // *Cell Biol Toxicol*. – 1999. – № 15(5). – P.325–32.
14. Lake B.G. Human relevance of rodent liver tumour formation by constitutive androstane receptor (CAR) activators // *Toxicol Res (Camb)*. – 2018. – № 7(4). – P.697–717.
15. US EPA S-Metolachlor; Pesticide Tolerances Rule on 03/11/2019. – 40 CFR 180, 84 FR 8611. – P.8611–8617.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЯ ПЕСТИЦИДІВ

ПРОМОТОРНИЙ ЕФЕКТ ГЕНЕРИКІВ S-МЕТОЛАХЛОРУ З РІЗНОЮ ГЕПАТОТОКСИЧНІСТЮ У КАЦЕРОГЕНЕЗІ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

Є.А. Баглій, Н.М. Недопитанська, В.С. Лісовська,
О.В. Решавська, Л.В. Ткаченко

ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя
Міністерства охорони здоров'я України», Київ, Україна

РЕЗЮМЕ. Метолахлор, а на даний час його біологічно активний ізомер S-метолахлор, є одними з гербіцидів, який найбільш широко застосовується у світі. У хронічних експериментах на щурах було виявлено гепатоканцерогенний ефект метолахлору, а в епідеміологічних дослідженнях — позитивну залежність між експозицією фермерів до метолахлору і захворюваністю на рак печінки. Відзначається можливість впливу шкідливих домішок у технічних продуктах на виявлені ефекти.

Мета — вивчити промоторний ефект генериків S-метолахлору з різною гепатотоксичністю щодо канцерогенезу печінки у щурів, ініційованого нітрозодіетиламіном (НДЕА), і проаналізувати можливість його реалізації у людини.

Матеріали та методи. Експерименти виконані на щурах-самцях Wistar Han, на моделі гепатоканцерогенезу «НДЕА — гепатектомія». Вивчалися два зразки генериків S-метолахлору, співвідношення S / R енантіомерів — 87/13 %, з різною гепатотоксичністю. Речовини вводили внутрішньошлунково у дозах 1,5; 15 і 150 мг / кг маси тіла (м.т.) протягом 8 тижнів. Тварини групи негативного контролю отримували воду, а позитивного — фенобарбітал. Промоторний ефект оцінювали за стандартизованими показниками загальної площі і кількості фокусів гепатоцитів, які експресують γ -глутаміл-транспептидазу (ГТП).

Результати. Клінічних ознак токсичної дії S-метолахлору на організм щурів, ініційованих до канцерогенезу НДЕА, не встановлено. Виявлено збільшення кількості та загальної площі γ -ГТП-позитивних фокусів гепатоцитів у печінці тварин, які отримували пухлиноутворюючу дозу S-метолахлору, а також фенобарбітал. Середня площа фокуса в печінці щурів, які отримували більш токсичний зразок, була меншою. Встановлено поріг промоторної дії S-метолахлору щодо гепатоканцерогенезу на рівні ≤ 15 мг / кг м.т. Аналіз літературних даних щодо механізму гепатотоксичної дії метолахлору дозволив зробити висновок про фенобарбіталоподобний механізм його промоторної дії, який реалізується через андростановий конституційний рецептор (CAR). Цей механізм є видоспецифічним для гризунів, і тому результати епідеміологічних досліджень про можливість розвитку раку печінки у людини не можуть бути підтверджені експериментально.

Висновки. Генерики S-метолахлору з різним ступенем гепатотоксичності в пухлиноутворюючій дозі проявляють промоторний ефект щодо канцерогенезу, ініційованого НДЕА у печінці щурів. Гепатотоксичність S-метолахлору гальмує ріст γ -ГТП-позитивних фокусів. Встановлено поріг цього ефекту на рівні ≤ 15 мг / кг м.т. Механізм виявленого ефекту є не релевантним для людини.

Ключові слова: S-метолахлор, нітрозодіетиламін, промоторний ефект щодо гепатоканцерогенезу, щури Wistar Han, γ -глутаміл-транспептидаза.

PROMOTOR EFFECT OF S-METOLACHLOR GENERICS WITH DIFFERENT HEPATOTOXICITY IN LIVER CARCINOGENESIS IN RATS

Ye. Bahley, N. Nedopytanska, V. Lisovska, Ye. Reshavska, L. Tkachenko
“L.I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety,
Ministry of Health, Ukraine (State Enterprise)”, Kyiv, Ukraine

ABSTRACT. Metolachlor and currently its biological active isomer S-metolachlor is one of the most widely used herbicides in the world. Chronic experiments in rats have found hepatocarcinogenic effect of metolachlor, and epidemiological studies have found positive relationship between enzyme exposure to metolachlor and prevalence of liver cancer. Possibility of the influence of harmful impurities contained in technical products on the detected effects is emphasized.

Objective is to study promotor effect of S-metolachlor generics with different hepatotoxicity in carcinogenesis of liver in rats induced by nitrosodiethylamine (NDEA) and analyse possibility of its realisation in human.

Materials and Methods. Experiments were performed in male Wistar Han rats on hepatocarcinogenesis model “NDEA — hepatectomy”. Two specimens of S-metolachlor generics were studied; and their ratio of S/R enantiomers was 87/13 % with different hepatotoxicity. Substances were administered intragastrically in the doses of 1.5, 15 and 150 mg/kg body weight for 8 weeks. Animals of the negative control group received water, and positive control — phenobarbital. Promotor effect was evaluated by the standardised parameters of the total area and number of hepatocyte foci expressing γ -glutamyl transpeptidase (GTP).

Results. No clinical signs of the toxic action of S-metolachlor on the rat body induced to carcinogenesis by NDEA were found. Increase in the number and total area of γ -GTP positive foci in the liver of animals on tumorigenic dose of both specimens of S-metolachlor as well as phenobarbital was found. Mean area of focus in the liver of rats on more toxic specimen was lower. The threshold of promotor action of S-metolachlor on hepatocarcinogenesis has been established at the level of ≤ 15 mg/kg body weight. Analysis of literature data on the mechanism of hepatotoxic action of metolachlor allowed to make a conclusion about phenobarbital-like mechanism of promotor action that is realised through constitutive androstane receptor (CAR). This mechanism is species-specific for rodents; therefore, the results of epidemiological studies on the possibility of liver cancer in human cannot be confirmed experimentally.

Conclusion. Tumorigenic dose of S-metolachlor generics with different degree of hepatotoxicity shows promotor effect in NDEA induced carcinogenesis in rat liver. Hepatotoxicity of S-metolachlor inhibits growth of γ -GTP positive foci. The threshold of hepatocarcinogenesis promotion has been established at the level of ≤ 15 mg/kg body weight. The mechanism of the observed effect is not relevant for human.

Key Words: S-metolachlor, hepatocarcinogenesis initiated by nitrosodiethylamine, Wistar Han rats, γ -glutamyltranspeptidase.

Надійшла до редакції 11.06.2019 р.