

Н.М.Недопитанська, к.б.н., Є.А.Баглій, д.м.н., О.В.Решавська

ВИВЧЕННЯ ПРОМОТОРНОЇ АКТИВНОСТІ N-ОКСИДУ 2,6-ДИМЕТИЛПІРИДИНУ (ІВІН, 99% в.р.) НА ІНІЦІЙОВАНИХ ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ

Інститут екогігієни і токсикології ім.Л.І.Медведя, Київ

В Україні створено ряд біостимуляторів росту рослин широкого спектру дії на основі N-оксид похідних піридину, їх комплексів з протонодонорами та композицій із регуляторами росту рослин природного походження.

Похідні N-оксидів піридину мають широкий спектр біологічної дії як на рослини, так і на організм тварин та людини. Представники цієї групи речовин запатентовані як ефективні засоби для лікування різних запаланих та алергічних процесів, для впливу на імунну систему [1]. Препарати цієї групи здатні діяти на процеси живлення тварин і птахів з прискоренням їх росту і, таким чином, бути промоторами росту. Такі властивості актуалізують питання можливості промоції трансформованих клітин та виникнення пухлин.

Регулятор росту рослин Івін, в.р., синтезований ІБОНХ НАН України та АТ "Високий врожай", застосовують для передпосівної обробки насіння овочів (огірки, томати) для підвищення їх врожайності, прискорення дозрівання плодів та поліпшення якості продукції. Препарат випускають у ампулах по 1 і 2 мл, що містять 1 і 10 мг діючої речовини, відповідно. Застосовують Івін, в.р. з нормою витрат 1-2 ампули по 10 мг діючої речовини розчиняють у 2 л води для замочування 1 кг насіння.

Онкогенні властивості близького аналогу Івіну — регулятору росту рослин "Триман-1" досліджені нами раніше в умовах традиційного хронічного експерименту на лабораторних щурах в діапазоні доз від максимально витривалої (МВД) до близької тим, що можуть реально

потрапляти в довкілля. Не дивлячись на статистично не значиме збільшення частоти пухлин у піддослідних тварин (23% проти 17% в контролі), порівняльний аналіз частоти пухлин за статтю показав вірогідне підвищення кількості пухлин у самиць із піддослідної групи, що отримували максимальну дозу, за рахунок збільшення частоти аденом гіпофізу. Але загальний аналіз (за показниками спектру пухлин, їх частоти, терміну виявлення, латентного періоду, співвідношення доброякісних та злоякісних пухлин, їх множинності) показав відсутність канцерогенної активності препарату "Триман-1" для щурів [2].

Відомо, що хлор-гідрат-6-метил-2-етил-3-оксипіридин та 2,4,6-триметил-3-оксипіридин модифікують структуру мембран як нормальних, так і пухлинних клітин, змінюючи швидкість їх росту [3-5]. Тому не можна виключити можливість опосередкованої дії оксипіридинів на функціонування геному та модифікацію канцерогенезу в організмі ссавців через вплив на мембранний апарат клітин.

Рістстимулююча дія Івіну на рослинний організм обумовлена підвищенням проникливості клітинних мембран, що сприяє прискоренню транспортних процесів у мембранах і процесів живлення клітин. Одночасно активізується синтез біомаромолекул — РНК і білків [6].

В ряді фундаментальних дослідженнях вивчено окремі сторони механізму токсичної дії Івіну на клітини теплокровних організмів. Встановлено різноспрямований вплив на монооксигеназну систему, зниження інтенсивності перекисно-

го окислення ліпідів у печінці щурів. Івін не викликає пошкоджень та змін проникненості клітинних мембран еритроцитів та лімфоцитів. Ці дані в деякій мірі свідчать про переважність дії препарату на мембрани рослин, але вони не достатні для коректного порівняння дії препарату на мембрани клітин тварин та рослин хоча б тому, що еритроцити й лімфоцити є високодиференційованими клітинами, а клітини паростків — поліпотентними і проліферуючими. Про неспецифічність дії Івіну свідчить його вплив на овогенез дафній та ембріогенез риб [7-9]. Невідомо, як впливатиме препарат на трансформовані іншими, у тому числі й ендегенними факторами, клітини.

Висока біологічна активність речовин цього класу забезпечується рядом унікальних фізико-хімічних характеристик їх молекул, зокрема здатністю до комплексоутворення, мембранотропними і модифікуючими клітинні мембрани властивостями. Саме тому ці препарати можуть проявляти ефект у низьких дозах. Такі модифікації структури мембран не виключають можливості порушень регуляторного гомеостазу організму та як наслідок цього — порушення своєчасної елімінації трансформованих канцерогенними факторами клітин, підвищення їх проліферативної активності та спричинення епігенетичного канцерогенезу [3-5, 10-17].

Тому метою даної роботи було вивчення промоторної активності діючої речовини Івіну, 99% в.р.: N-оксид-2,6-диметилпіридину. Виходячи із властивостей препаратів даної групи щодо модифікації структури клітинних мембран та припущення щодо порушення регуляторного гомеостазу із підвищенням проліферативної активності, для досліджень було обрано модель "NDEA-гепатектомія" у модифікації Ito N. [18], яка дозволяє вивчити вплив речовини на проліферацію трансформованих гепатоцитів. Враховуючи високу біологічну активність Івіну, а, відповідно, дуже низькі норми витрат, неможливість потрапляння у довкілля токсичних доз, максимальна доза для досліджень була обрана на рівні 1/50 ЛД₅₀ (ЛД₅₀ для щурів складає 1260 мг/кг), мінімальна — близька до недіючої в хронічних дослідах.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проведені на нелінійних білих самцях-щурах масою 100-130 г, виведених в розпліднику "Гліваха" АН України. 50 піддослідних тварин було поділено на 4 групи — дві контрольні (інтактний та позитивний) та дві піддослідні групи (табл.1). На початку експерименту всім тваринам одноразово інтраперитоніально вводили завідомий канцероген нітрозодіетиламін (НДЕА) в дозі 200 мг/кг в ізотонічному розчині. Через 3 тижні щурів прооперували: часткова (2/3) гепатектомія (ГЕ). За тиждень до ГЕ впродовж 6 тижнів щурам піддослідних груп внутрішньо шлуноково зондом вводили тестуєму речовину у водному розчині в дозах 26 мг/кг та 0,123 мг/кг (рисунок 1). Тваринам другої групи (позитивний контроль) за такою ж схемою замість речовини, що досліджувалась, перорально вводили водний розчин НДЕА в дозі 0,93 мг/кг.

Після закінчення терміну введення щурів знеживлювали передозуванням етилового ефіру. Вилучали зразок печінки, у камері кріостату готували гістологічні зрізи і після фіксації у холодному ацетоні проводили гістохімічну реакцію для визначення гама-глутамілтрансептидази (γ -ГТП) — маркерного ферменту трансформованих гепатоцитів, у ході проліферації яких утворюються гіперпластичні вузлики в тканині печінки. Наявність, кількість та розміри гіперпластичних вузликів (ГВ) — головні критерії для визначення промоторної активності в даній моделі.

Результати експерименту

Підрахунок кількості γ -ГТП-позитивних гіперпластичних вузликів, що виникли в печінці щурів, та вимірювання їх площі проведені з використанням окуляр-мікрометра. На кожному гістохімічному зрізі печінкової тканини вимірювали діаметр не менш як 30 вузликів та підраховували їх кількість не менш як у 30 полях зору.

Отримані дані обробляли статистичними методами, зокрема методами варіаційної статистики для малої виборки. Оцінювали розміри (площину) та кількість ГВ на умовну одиницю площини (1 см²) зрізу печінки. Порівняння отриманих результатів в піддослідних та конт-

Таблиця 1
Умови експерименту з вивчення промоторної активності регулятора росту рослин Івіну, 99% в.р. на моделі "НДЕА-гепатектомія"

№	Характер досліду	Доза Івіну, мг\кг	Кількість тварин
1	ДЕНА + ГЕ	—	15
2	ДЕНА + ГЕ + ДЕНА	—	15
3	ДЕНА + ГЕ + Івін	26	10
4	ДЕНА + ГЕ + Івін	0,123	10

Примітки: НДЕА — нітрозодіетиламін, ГЕ — гепатектомія.

рольних групах проводили за допомогою t-критерію Стюдента.

Результати дослідів наведені в табл. 2. Як і очікувалось, γ -ГТП найбільш виразно проявилася у вигляді чітких добре сформованих вузликів в печінці тварин із групи позитивного контролю, ініційованій НДЕА та гепатектомією, тоді як у щурів 1-ої групи гіперпластичних вузликів було значно менше. У тварин, що отримували діючу речовину Івіну (3 і 4 групи), реакція проявлялася лише в поодиноких вузликах або клітинах та їх невеликих скупченнях, що були розташовані біля жовчних протоків часточок печінки.

Як видно з представлених даних, частота виявлення вузликової

гіперплазії у печінці щурів 3-ої і 4-ої груп не перевищує показників інтактного контролю. Не змінюються також у піддослідних тварин кількість вузликів на 1см² площі порівняно зі щурами із групи, що підлягали "чистій ініціації" канцерогеном та гепатектомією, в той же час їх кількість майже на порядок менша ($p < 0,05$) за таку в позитивному контролі (2 група). Середня площа гіперпластичних вузликів у печінці тварин, що отримували Івін, також не відрізняється від їх розмірів при лише ініціації канцерогеном та гепатектомією (0,8 і 0,7 мм²/см² проти 0,9 мм²/см², відповідно), тоді як порівняно з показниками позитивного контролю вони у півтора рази були меншими.

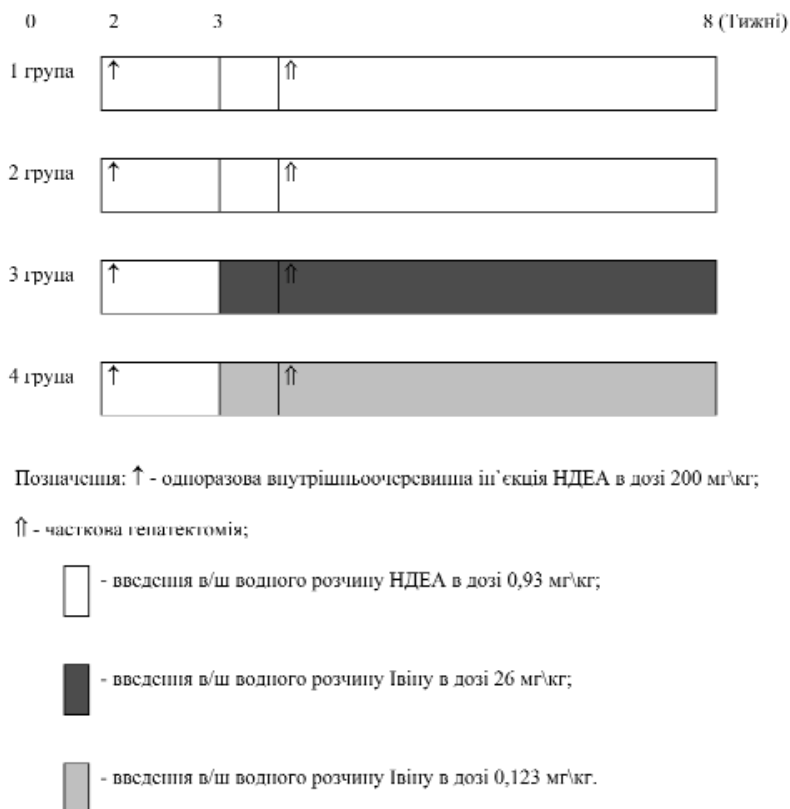


Рис.1. Схема експерименту з вивчення промоторної активності регулятора росту рослин Івіну, 99% в.р. на моделі "НДЕА-гепатектомія".

Таблиця 2

Кількість та площа γ -ГТП -позитивних вузликів в печінці шурів у досліді з вивчення промоторної активності регулятора росту рослин Івіну, 99% в.р. на моделі "НДЕА-гепатектомія"

№	Характер досліджу	Кількість тварин з вузликами, %	Кількість вузликів на см ²	Середня площа вузликів, мм ² /см ²
1	НДЕА + GE	22	39±5,6	0,9±0,2
2	НДЕА +GE+ НДЕА	42	79±39*	1,3±0,7
3	НДЕА +GE+Івін (26мг\кг)	20	11±5,2	0,8±0,7
4	НДЕА +GE+Івін (0,123мг\кг)	14	9±0,0	0,7±0,0

Примітка: * $p < 0,05$ по відношенню до 1, 3 та 4 групам

ЛИТЕРАТУРА

1. Аналітичний звіт про науково-дослідну роботу по створенню регуляторів росту рослин на основі N-оксидів похідних піридину та дослідження їх фізико-хімічних, фізіологічних та токсикологічних властивостей (Сост.С.П. Пономаренко, Г.С.Боровикова): ІБОНХ НАН України. — Київ. — 1996. — 30 с
2. Баглій С.А., Недопитанська Н.М., Решавська О.В., Лісовські В.С. Вивчення канцерогенної активності регулятора росту рослин "Триман-1" // Сучасні проблеми токсикології. — 2002. -№2. -С.62-66.
3. Lucier G.W. Receptor-mediated carcinogenesis // Mechanism of carcinogenesis in risk identification / Ed. H.Vainio, P.N.Magee, D.B.McGregor & A.J.McMichael. — Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1992. — P. 353-388.
4. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Буракова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М. и др. — М.: Наука, 1975. — 211с.
5. Голощанов А.Н. Физико-химические характеристики липидов и белков в процессе роста экспериментальных опухолей. / Автореф. дис.... канд. биол. наук. — Черноголовка, 1976. — 20 с.
6. Пономаренко С.П., Николаенко Т.К., Боровиков Ю.Я. Протоно-акцепторная способность N- оксида 2,6- диметил-пиридина // Укр. хим. журн. — 1990. — Т. 56, №7. — С.773 — 777.
7. Пономаренко С.П., Николаенко Т.К., Боровиков Ю.Я., Боровикова Г.С. Исследование электрических свойств пиридин — N — оксида и его метильных производных в твердой фазе // Ж. органической химии. — 1993. — Т. 63, вып. 5. — С.1026-1033.
8. Пономаренко С.П., Боровиков Ю.Я., Николаенко Т.К., Боровикова Г.С. Исследование электронных взаимодействий в 4 — замещенных пиридинах и пиридин — N — оксидах // Укр. хим. журн. — 1993. — Т. 59, вып. 8. — С. 883-888.
9. Пономаренко С.П., Боровиков Ю.Я., Пивоварова Н.С., Боровикова Г.С. Исследование комплексообразования N — оксидов производных пиридина с протонодонорами // Ж. органической химии. — 1994. — Т. 63, вып. 8. — С.1872-1877.
10. Growth hormone regulation of plasma membrane structure and function/ Sonenberg M., Swislocki N., Aizono J. et al. / В кн.: Структурная лабильность мембран и ее роль в регуляции функциональной активности клеток. — Минск, 1974. — С.115-116.
11. Ligand-induced transformation by a non-internalising thsdermal growths factor receptor/Wells A., Welsh J.B., Lasar C. S. et al.//Science. — 1990. — V.247. — P.962-964.
12. Трансформированная клетка/ред. И.Камерон. — Киев: Наукова думка, 1988. — 388 с.
13. Палладина Т.А., Беляева Н.В., Пономаренко С.П., Кухарь В.П. Влияние регулятора роста Ивина на активность H⁺ — АТФазы плазматических мембран клеток корнев кукурузы // Докл. АН УССР, сер. Б. — 1991. — С. 96-99.
14. Троян В.М., Яворська В.К., Пономаренко С.П., Николаенко Т.К. Теоретичні основи застосування регулятора росту 2,6 — диметилпіридин — N — оксиду // Фізіол. культ.рослин. — 1991. — Т. 23, №5. — С. 468-473.
15. К механизму избирательного действия регулятора роста растений N-оксид-2,6-лутидина / Жминько П.Г., Лысенко Е.А., Янкевич М.В., Каган Ю.С. Тез.докл. III междунар. конф. "Регуляторы роста и развития растений", Москва, 27-28 июня 1995 г.). - М., 1995. -С.68-69.
16. Ashendel, C.L., Baudoin, P.A., Minor, P.L.// Protein phosphorylation and signal transduction in tumour promotion. In: Langenbach, R., Elmore, E., Barrett, J.C., eds, Tumor Promoters: Biological Approaches for Mechanistic Studies and Assay Systems. -New York: Raven Press, 1988. -P.331-342.
17. Bomdick, D.W., Jancun, J., Tullis, K., Matsumura, F. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes increases in expression of c-erb-A and levels of protein-tyrosine kinases in selected tissues of responsive mouse strains // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 1988. — Vol. 85. — P.4128-4132.
18. Ito N., Shirai, Hasegawa R. Medium-term bioassays for carcinogens // Mechanism of carcinogenesis in risk identification / Ed. H.Vainio, P.N.Magee, D.B.McGregor, McMichael. — Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1992. — P. 353-388.

Н.Н.Недопитанская, Е.А.Баглей, Е.В.Решавская

ИЗУЧЕНИЕ ПРОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ N-ОКСИДА 2,6-ДИМЕТИЛ-ПИРИДИНА (ИВИН, 99% В.Р.) НА ИНИЦИИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС

Проведены исследования промоторной активности регулятора роста растений Ивина на модели "НДЕА-гепатэктомия" на нелинейных белых крысах, которые получали препарат с питьевой водой в дозах 26 мг\кг и 0,123 мг\кг массы тела. На основании анализа частоты и площади γ -глутамилтранспептидаза-положительных гиперпластических узелков печени сделан вывод об отсутствии онкогенного потенциала действующего вещества препарата Ивин, 99% в.р. (N-оксид-2,6-диметилпиридин).

ВИСНОВОК

Дія регулятора росту рослин Івіну, 99% в.р. на ініційовані гепатектомією та завідомим гепатоканцерогеном гепатоцити не призводить до збільшення кількості та розмірів γ -глутамилтранспептидаза-позитивних гіперпластичних вузликів в печінці шурів в умовах проведеного експерименту на моделі "НДЕА-гепатектомія", що дозволяє зробити висновок про відсутність промоторного ефекту Івіну щодо трансформованих гепатоцитів шурів у дозах 0,123 і 26 мг\кг маси тіла і, таким чином, про відсутність онкогенного потенціалу.

N.M.Nedopytanska, E.A.Bagliy, O.V.Reshavska

STUDY OF PROMOTION ACTIVITY N-OXIDE-2,6-DEMETHYLPYRIDINE (IVIN, 99% WS) IN RAT'S INITIATION HEPATOCYTES

Study have been carried in non-bread albino rat, which was administering by compound with drinking water in dose 26 mg/kg and 0,123 mg/kg body weight in "NDEA-hepatectomy" model. On the base of analyze the number and area of γ -glutamyl- transpeptidase-positive preneoplastic hepatocytes foci have been conclusion according to non-oncogenic potential of active ingredient of Ivin, 99% WS (N-oxide-2,6-demethylpyridine).