

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

ВПЛИВ 2,4-Д КИСЛОТИ НА ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗ, ІНЦІДІЙОВАНІЙ НІТРОЗОСПОЛУКАМИ

Інститут екології та токсикології ім. Л. І. Медведя МОЗ України

2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (далі 2,4-Д), незважаючи на велику кількість досліджень, присвячених детальному вивченню можливих негативних ефектів дії на здоров'я людини та стан навколишнього середовища, що висвітлено у понад 40 000 наукових публікацій та звітів, досі залишається сполукою, навколо якої не зчує наукова полеміка. При тому, що 2,4-Д — це гербіцид №1 у світі як за обсягами виробництва, так і застосування.

Даними кількох епідеміологічних досліджень відмічено збільшення онкологічних захворювань у людей, що працюють із пестицидами на основі 2,4-Д. Зокрема, встановлена чітка кореляція між зростанням частоти не-Ходжкінської лімфоми та використанням 2,4-Д [1,2]. На відміну від цих даних, деякі автори [3] не знайшли залежності між показниками смертності від раку серед фермерів та застосуванням гербіциду 2,4-Д.

Не менш суперечливими є результати досліджень на лабораторних тваринах. Результати ряду експериментів щодо вивчення онкогенних властивостей 2,4-Д на щурах та мишах були проаналізовані Міжнародною Агенцією з Вивчення Раку (IARC): 2,4-Д класифіковано експертами IARC як канцероген групи 2Б [4]. Але результати подальших дослідів, проведених спеціалістами кількох компаній, доводять відсутність канцерогенного ефекту у хронічних експериментах. Між тим час від часу продовжують з'являтися повідомлення щодо канцерогенності препаратів на основі 2,4-Д [5].

Таким чином, дискусії навколо проблеми канцерогенної небезпеки

2,4-Д тривають, хоча в цілому вже склалася думка, що протиріччя в результатах як експериментальних, так і епідеміологічних досліджень пов'язані не з самою 2,4-Д, а з її забрудненням технологічними домішками діоксинів [6], що обумовило необхідність вдосконалення технології синтезу.

Суттєві зміни технології виробництва 2,4-Д забезпечують мінімальне утворення діоксинів та отримання 2,4-Д з прийнятним рівнем вмісту суперекотоксикантів [7]. Допустима добова доза діоксинів за російськими нормами складає 10 пг/кг, в Європі — 4 пг/кг, в США — 1 пг/кг. Така наднизька допустима добова доза пов'язана із надзвичайною токсичністю цих сполук, здатністю викликати рак, спричиняти імунодифіцит, пошкоджувати ендокринні гормональні системи тощо.

В світлі наведеного термін "прийнятний рівень вмісту" сприймається вже не так однозначно. Зокрема, якщо 2,4-Д кислота з прийнятним рівнем вмісту діоксинів не проявляє канцерогенних властивостей (або, скоріше, володіє ними в незначному ступені), то наскільки вона буде небезпечною в разі комбінованої або сумісної дії з іншими канцерогенними факторами як екзогенного, так і ендогенного походження; чи не стимулюватиметься виникнення та розвиток пухлин, спричинених іншими канцерогенами? Тим більше, що для 2,4-Д-вмісних пестицидів сьогодні вже відома здатність змінювати токсичні властивості в препаративній формі порівняно з діючою речовиною окремо. Наприклад, інертні інгредієнти формуляції можуть статистично вірогідно підвищувати часто-

ту сестринських хроматидних обмінів у ембріонів птахів на відміну від самої 2,4-Д [8]. Також зазначають, що складові препаративної форми (інертні інгредієнти) 3-х досліджених гербіцидів, серед яких і формуляція на основі 2,4-Д, підсилюють в умовах *in vitro* інгібування мітохондріального окислювання порівняно лише з діючою речовиною [9,10]. В іншому дослідженні знайшли [11], що дві формуляції 2,4-Д, на відміну від самої 2,4-Д чинять естрогенподібну дію на формування хітинового панциру рака.

Відомо, що 2,4-Д проявляє гербіцидну дію у високих дозах, а в низьких являє собою регулятор росту рослин завдяки структурній подібності до ендогенних гормонів [12]. Низькі концентрації 2,4-Д стимулюють синтез РНК полімерази та протеїновий синтез; рістстимулюючі властивості можуть реалізуватися через активацію аутолітичних та синтетичних ензимів, які впливають на пластичні процеси клітинних мембран, синтез нових пластичних речовин для їх побудови [13]. Виникає питання — як такі рістстимулюючі властивості речовини можуть впливати на перебіг ініційованого іншими факторами канцерогенезу?

Найвірогіднішим "іншим" канцерогенним фактором можуть бути нітрозосполуки, зокрема нітрозодіметиламін і нітрозодіетиламін. Ці речовини легко утворюються як екзогенно, так і ендогенно з нітратів мінеральних добрив у доквіллі та організмі людини [14,15]. Вірогідність ініціації канцерогенезу нітрозосполуками у людини залежить від їх концентрації у тканинах організму. Здебільшого це незначні концентрації, що не мають суттєвого значення для виникнення онкологічних захворювань. Але збільшення рівня нітратів та інших азотвміщуючих речовин у навколишньому середовищі, і особливо діметил- і діетиламінів, значно підвищує вірогідність ініційованого ними канцерогенезу.

В лабораторних дослідженнях нітрозосполуки ініціюють гепатоканцерогенез у щурів. Ці властивості були використані при створенні багатьох експериментальних моделей для вивчення канцерогенезу [16,17].

Метою даної роботи було експериментальне дослідження по-

тенційного промоторного ефекту 2,4-Д кислоти на ініційований нітрозосполуками гепатоканцерогенез.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведені на щурах-самцях лінії Wistar з середньою масою тіла 200-250 г, отриманих із розплідника фірми ООО "Три-Ю" (Київ). До початку експерименту тварини пройшли 14-денний карантин та ветеринарний огляд у віварії Інституту екології та токсикології ім. Л.І.Медведя. Після рандомізації їх було поділено на групи відповідно до протоколу експерименту та ідентифіковано за допомогою індивідуальних позначок.

Тварин розсадили в клітки типу Т4, підстилкою слугувала дерев'яна тирса, яку замінювали тричі на тиждень. Температура у приміщеннях підтримувалась у межах 21 ± 2 °C, відносна вологість повітря — 40-60 %, освітлення — природне, кімната оснащена припливною вентиляцією, що виключала можливість рециркуляції повітря.

Дослідні і контрольні тварини утримувались в однакових умовах і отримували стандартний раціон віварію, що складався із концентрованого гранульованого комбікорму і овочів. Упродовж всього терміну перебування у віварії тварини споживали відстояну водогінну воду (ГОСТ 2874-82) із скляних поїлок.

Для досліджень було взято 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту (98,2%) виробництва фірми China Chemical Industrial & Research Co. (Китай). В експерименті використано нітрозодіетиламін (НДЕА) та фенобарбітал, n-(гаммаглутаміл-1-нафтил амід моногідрат) фірми Sigma-Aldrich (США).

Вплив 2,4-Д на перебіг ініційованого канцерогенезу вивчали за допомогою моделі "НДЕА-гепатектомія" у модифікації [16].

Тварин розподілили на 3 рівновеликі групи (по 10 в кожній): дві контрольні (негативний та позитивний контроль) та дослідну, тварини якої отримували 2,4-Д кислоту у максимально витривалій дозі (МВД). МВД 2,4-Д кислоти при пероральному введенні була встановлена для щурів на рівні 75 мг/кг маси тіла за методом згідно [18]. Схема експеримента представлена на рис 1. Оскільки 2,4-Д кислота погано розчиняється у воді, то розчин для

введення готували з використанням емульгатора ОП-7 на відстояній водогінній воді. Тварини з групи "негативного контролю" отримували воду з емульгатором ОП-7, тварини з групи "позитивного контролю" завідомий промотор фенобарбітал (ФБ).

В якості ініціатора гепатоканцерогенезу тваринам вводили нітрозодіетиламін (НДЕА) у дозі 200 мг/кг (на фізіологічному розчині) у вигляді одноразової інтраперитоніальної ін'єкції. Через два тижні після ін'єкції тварини в залежності від групи отримували за допомогою металевого зонду воду, фенобарбітал та 2,4-Д, відповідно. Режим введення: щоденно 5 раз на тиждень, натщесерце, упродовж 8 тижнів.

Через 3 тижні від початку експерименту щурам була зроблена часткова (2/3) гепатектомія (ГЕ).

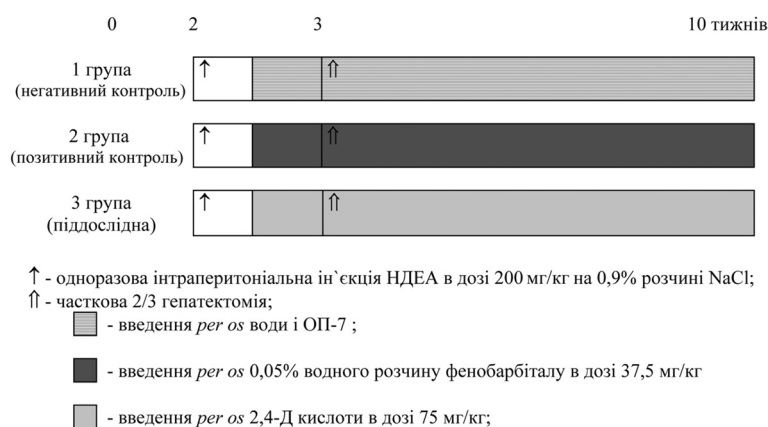


Рис. 1. Протокол проведення досліджень промоторних властивостей 2,4-Д

Наприкінці експерименту (через 10 тижнів) усі тварини підлягали евтаназії в парах етилового ефіру. У них вилучали зразок печінки, з якого готували кріостатні зрізи тканини, після фіксації яких у холодному ацетоні проводили гістохімічну реакцію визначення гама-глутамілтранспептидази (γ-ГТП) маркерного ферменту трансформованих гепатоцитів, проліферація яких призводить до утворення пренеопластичних гіперпластичних вузликів (ГВ) у тканині печінки. Поява ГВ, їх кількість та розміри є прямими показниками промоторної активності досліджуваної сполуки в даному експерименті. З метою оцінки ефекту підраховували кількість тварин, у печінці яких виявлено ГВ, кількість та розміри (площину) вузликів на 1 см² площини зрізу за допомогою комп'ютерної програми "Adobe Photoshop".

Результати досліджень оброблені

статистично за t-критерієм Стьюдента та інших методів [19,20].

Результати та їх обговорення

Суттєве порушення метаболічних процесів у клітинах, що відбувається при канцерогенезі та розвитку пухлин, проявляється в змінах активності та ізоензимного складу багатьох ферментів. З сучасних моделей прискореної оцінки потенційної канцерогенної та/або промоторної активності ксенобіотиків частіше за інші використовується модель "НДЕА-гепатектомія" [16], що апробована авторами на 313 хімічних сполуках: 97% мутагенних і 87% немутагенних гепатоканцерогенів дали позитивні результати; лише 1 з 48 неканцерогенів проявив дуже слабку позитивну активність. Навіть при тестуванні

негепатоканцерогенів модель виявилася чутливою для 23% сполук [21]. В якості критерія оцінки в даній моделі використовують ранні пренеопластичні зміни тканини печінки — гіперпластичні вузлики, що представляють собою пренеопластичні популяції гепатоцитів, маркером яких є фермент гамма-глутамілтранспептидаза, вона є раково-ембріональним ферментом і її активність значно підвищена в тканинах ембріону та гепатомах порівняно з дефінітивною печінкою.

Зрозуміло, що пренеопластичні утворення — це ще не пухлинні новоутворення. Проте, існує переконлива відповідність між здатністю багатьох сполук індукувати пренеопластичні вузлики або прискорювати їх ріст та їх канцерогенними або промоторними властивостями, встановленими у хронічних експериментах [20].

Саме тому ми вважали адекватним вибір моделі "НДЕА-гепатектомія" для вивчення промоторних властивостей 2,4-Д кислоти. Дана модель ідеально підходила до поставлених завдань ще й тому, що ініціатором в ній використовується нітрозосполука — НДЕА.

Ініціація НДЕА та тривале впродовж 8 тижнів введення фенобарбіталу в умовах нашого експерименту призвело до виникнення гіперпластичних вузликів у печінці всіх 10-ти щурів "позитивний контроль".

Показник кількості гіперпластичних у-ГТП-позитивних вузликів на одиницю площі (1 см²) є досить варіабільним: від кількох одиниць до кількох десятків. В проведеному нами експерименті їх кількість на одиницю площі у тварин "позитивного контролю" складала 53,8±24.97 при середній площині 11,1±5,11 мм² (таблиця).

У групі тварин з "негативного контролю" гіперпластичні вузлики з'явилися лише у 3 із 10. Їх середня площа була дещо більшою за очікувану — 1,17±1,13 мм². За даними [16], в яких проаналізовано відмінності між площинами гіперпластичних вузликів, виявлених імуногістохімічно за допомогою маркера глутатіон-S-трансферази у щурів восьми різних ліній — для Wistar вона становила 0,38±0,13 мм². Отримане в нашому експерименті середнє значення площини виводилося лише з 3 дуже різних фактичних величин (3 вузлики площиною 3,0 мм² у першій тварини, лише 1 вузлик

розміром 0,096 мм² у другій та 4 вузлики площиною 0,409 мм² у третій). Зрозуміло, що такі дані важко порівнювати як за надзвичайно малою кількістю тварин з ефектом, так і за варіабельністю параметрів прояву самого ефекту.

Результати, що отримані на тваринах дослідної групи, показують, що під впливом 2,4-Д гіперпластичні вузлики з'явилися у кількості майже у 20 разів меншою, ніж в "позитивному контролі" і в такій самій кількості, як у тварин "негативного контролю". Як видно з таблиці, середня площа гіперпластичних ГТП вузликів в печінці щурів, що отримували 2,4-Д кислоту, була в 4 рази меншою, ніж у тварин "негативного контролю", і більш, як у 40 разів у порівнянні з тваринами "позитивного контролю". Це свідчить,

що 2,4Д кислота не тільки не стимулює проліферацію трансформованих клітин, а, навпаки, гальмує її.

Отриманий ефект може бути обумовлений різною загальнотоксичною дією на організм щурів введених доз фенобарбіталу та 2,4-Д. Прямим показником такої дії може слугувати зміна маси тіла тварин упродовж експерименту. На рис. 2 представлено динаміку маси тіла щурів, що отримували воду з емульгатором, 2,4-Д кислоту та фенобарбітал.

Статистично значимих змін маси тварин жодної з груп, що були в експерименті, не виявлено. Це дозволяє зробити висновок, що загальнотоксична дія речовин, які вводились, не впливала на результати експерименту.

Підсумовуючі отримані в результаті проведеного експерименту та

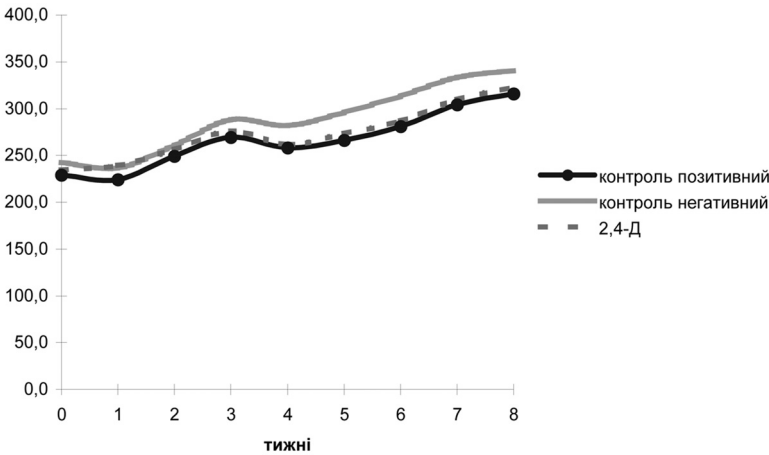


Рис. 2. Динаміка маси тіла (г) щурів упродовж випробувань 2,4-Д кислоти у тесті з визначення промоторної активності на моделі гепатоканцерогенезу НДЕА — гепатектомія

Таблиця

Кількісні показники потенційного канцерогенного та промоторного ефекту, отримані в експерименті при вивченні модифікуючої дії 2,4-Д кислоти на канцерогенез, ініційований НДЕА

Група	Кількість тварин з вузликами, абс. та (%)	Вірогідність різниці між групами	Середня кількість вузликів на 1 см ² (M±SD) ²	Вірогідність різниці між групами	Загальна середня площа вузликів, мм ² /см ² (M±SD) ²	Вірогідність різниці між групами
Негативний контроль	3/10, (30%)	—	2,66±1,5	—	1,17±0,5	—
Позитивний контроль	10/10, (100%)	x ² =10,7; p=0,001; за Фішером p=0,015;	53,±8 25	t =3,9; p=0,002; за Стьюдентом x ² =37,15; p<0,00001	11,1±5,11	t =3,53; p=0,004; за Стьюдентом x ² =218,3; p<0,000001
2,4-Д кислота	4/10, (40%)	x ² =0,22; p=0,63; за Фішером p=0,5;	3,0±1,4	t =1,18; p=0,29; за Стьюдентом x ² =4,13; p=0,12	0,25±0,04	t =0,5; p=0,6; за Стьюдентом x ² =35,88; p<0,0001

Примітка: різниця між контрольною групою щурів, та групами тварин, які отримували фенобарбітал і 2,4-Д кислоту.

наведені в таблиці результати досліджень, можна дійти висновку, що кількість тварин, в печінці яких були виявлені гіперпластичні вузлики, значно різнилася у контрольній (негативний контроль) та дослідній (2,4-Д) групах у порівнянні з позитивним контролем і становила 30; 40 і 100%, відповідно. Статистична обробка результатів за допомогою критерію χ^2 і точного критерію Фішера

для малих вибірок виявила високу вірогідність різниці між негативним і позитивним контролем, що свідчить про високу чутливість моделі в обраних умовах експерименту. Встановлено відсутність статистично вірогідної різниці між даними негативного контролю і дослідної групи.

Таким чином, внутрішньошлункове введення максимально витривалої дози 2,4-Д кислоти шурам

після ініціації гепатоканцерогенезу за допомогою НДЕА не призводить до збільшення кількості тварин із трансформованими гепатоцитами, не ініціює збільшення утворень пренеопластичних вузликів як за їх кількістю, так і за розмірами. На підставі чого можна зробити висновок про відсутність промоторного ефекту 2,4-Д кислоти на ініційований нітрозосполуками гепатоканцерогенез.

ЛІТЕРАТУРА

1. Zahm S.H., Weisenburger D.D., Babbitt P.A., Saal R.C. et al. A case-control study of Non-Hodgkin's lymphoma and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in Eastern Nebraska // *Epidemiology*.-1990.-№1. — P. 349-356.
2. Saracci, R., Kogevinas, M., Bertazzi, P.A., et al. Cancer mortality in workers exposed to chlorophenoxy herbicides and chlorophenols // *Lancet*, — 1991 — V. 338, — P. 1027-1032.
3. Wigle, D.T., Semeciw, R.M., Wilkins, K., et al. Mortality study of Canadian male farm operators: Non-Hodgkin's lymphoma mortality and agricultural practices in Saskatchewan. // *J. Natl. Cancer Inst.* — 1990. — V. 82. — P. 575-582.
4. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Supplement 7. — Lyon, 1987.
5. Kato I., Watanabe-Meserve H., Koenig K.L., et al. Pesticide product use and risk of non-Hodgkin lymphoma in women. // *Environ Health Perspect.* — 2004. — V.112, №13. — P. 1275-1278.
6. Проданчук Н.Г., Чмиль В.Д. Химико-аналитические аспекты полихлорированных дибензо-пара-диоксинов и других стойких органических загрязнителей // *Соврем. пробл. токсикол.* — 2006. — №1. — С.4-14.
7. Сафаров М.Г. Гербициды: 2,4-Д // *Соросовский образовательный журнал.* — 2001. — №9. — С. 57-62.
8. Arias E. Sister chromatid exchange induction by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in chick embryos // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2003. — № 55. — P. 338-343.
9. Oakes D.J., Pollak J.K. Effects of a herbicide formulation, Tordon 75D, and its individual components on the oxidative functions of mitochondria // *Toxicology*. — 1999. — №136. — P. 41-52.
10. Oakes D.J., Pollak J.K. The in vitro evaluation of the toxicities of three related herbicide formulations containing ester derivatives of 2,4,5-T and 2,4-D using sub-mitochondrial particles // *Toxicology*. — 2000. — №151. — P. 1-9.
11. Lin N., Garry V.F. 2000. In vitro studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in Red River Valley, Minnesota // *J. of Toxicology and Environmental Health*. -2000. -Part A, № 60.-P. 423-439.
12. Богорад В.С. Комплексная гигиеническая регламентация нового регулятора роста растений фумара в объектах окружающей среды: Дис. ...канд. мед. наук. — Киев, 1991. — 322 с.
13. Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology.-Vol.6: Herbicides / Edited by D.H.Hutson and T.R.Roberts // Shell Research Limited, Sittingbourne. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. Copyright 1987 by John Wiley & Sons Ltd. — 372 p.
14. Соверткова, Л.С., Черниченко І.О., Бабій В.Ф., Кондратенко О.Є. До питання фонового рівня вмісту канцерогенних сполук у продуктах харчування рослинного походження // *Гігієна населених місць.* — 2004. — Вип.44. — С. 158-167.
15. Черниченко І.О., Соверткова, Л.С., Баленко Н.В., Кондратенко О.Є. Експериментальне вивчення кількісних параметрів синтезу канцерогенних N-нітрозамінів із їх хімічних попередників // *Гігієна населених місць.* — 2005.- Вип.45. — С. 169-174.
16. Ito N., Shirai, Hasegawa R. Medium-term bioassays for carcinogens // Mechanism of carcinogenesis in risk identification. The IARC Scientific Publications No.93 / Ed. H.Vainio, P.N.Magee, D.B.McGregor & Mc Michael. — Lyon, IARC, 1992. — P. 353-388.
17. The Use of Short- and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation. The IARC Scientific Publications No. 146 / Edited by D.B. McGregor, J.M. Rice, S. Venitt. — Lyon, IARC, 1999. — 458 p.
18. Вивчення канцерогенних властивостей нових речовин та лікарських засобів. Методичні рекомендації /Укладачі: В.Ф.Чехун, Г.І.Кулик, Н.І.Шарикіна та ін.- Київ, 2001. — 19 с.
19. Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — Киев: Морион, 2001. — 408 с.
20. Турусов В.С., Парфенов Ю.Д. Методы выявления и регламентирования химических канцерогенов. -М.: "Медицина", 1986. — 150 с.
21. Nobuyuki Ito, Seiko Tamano, Tomoyuki Shirai. A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals// *Cancer Science.* — 2003. — V. 94, №1. — P. 3-8.

*Н. Н. Недопитанская, В. С. Лисовская,
О. В. Решавская, Е. А. Баглей*

ВЛИЯНИЕ 2,4- Д КИСЛОТЫ НА ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗ, ИНИЦИИРОВАННЫЙ НИТРОЗОСОЕДИНЕНИЯМИ

При внутривенном введении в максимально переносимой дозе (75 мг/кг м.т.), 2,4-Д кислоты крысам Вистар, у которых был инициирован гепатоканцерогенез, коканцерогенный и промоторный эффекты не выявлены.

*N. N. Nedopitanskaya, V. S. Lisovskaya,
O. V. Reshavskaia, E. A. Bagley*

INFLUENCING OF 2,4- D ACID ON HEPATOCARCINOGENESIS INITIATED BY NITROSAMINES

2,4-D acid at the level of maximal tolerable dose (75 mg/kg b.w.) cocarcinogenic and promoter effects were did not produced on the rats Wistar with initiated hepatocarcinogenesis.