

SUBSTANTIATION OF THE CRITERIA THE SET OF GENOTOXIC AND IMMUNOLOGICAL INDICATORS FOR RAPID ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL CARCINOGENS

CHERNICHENKO I.A., BALENKO N.V., OSTASH O.M.

ОБҐРУНТУВАННЯ КРИТЕРІАЛЬНОЇ ЗНАЧУЩОСТІ КОМПЛЕКСУ ГЕНОТОКСИЧНИХ ТА ІМУНОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ДЛЯ ЕКСПРЕС-ОЦІНКИ КАНЦЕРОГЕНІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА



**ЧЕРНИЧЕНКО І.О.,
БАЛЕНКО Н.В., ОСТАШ О.М.**

ДУ "Інститут гігієни
та медичної екології
ім. О.М. Марзєєва НАМН
України",
м. Київ

УДК 576.385.5:57.083.3

Ірвинна профілактика еко-залежних форм злоякісних новоутворень серед населення, як відомо, передбачає своєчасне виявлення канцерогенних факторів і розробку заходів з попередження їхнього шкідливого впливу на людину.

За даними Національної токсикологічної програми США, загальна кількість хімічних речовин, з якими людина стикається у побуті, виробничому середовищі та доквіллі, перевищує 100 тис., серед яких 5-10% складають канцерогени [1, 2].

Особливу актуальність цієї проблеми ілюструє та обставина, що з усієї кількості хімічних сполук, які використовуються у різних сферах життєдіяльності людей, досліджено лише близько 3000. Майже 1000 з них є канцерогенонебезпечними, при цьому 166 сполук експертами Міжнародного агентства з вивчення раку на сьогодні розцінюються як канцеро-

генні безпосередньо для людини, а 267 — канцерогени, що є ймовірно небезпечними для людини. Між тим контроль і оцінка їх ускладнюється через відсутність у вітчизняній базі відповідних гігієнічних стандартів. Донині гігієнічні нормативи затверджено лише для 17 сполук, до того ж тільки для 5 — з урахуванням канцерогенних критеріїв шкідливості [3].

Зазначене свідчить про нагальну необхідність інтенсифікації цього процесу. У зв'язку з цим нами пропонується один з підходів, що має сприяти вирішенню питання прискореного гігієнічного нормування. З метою визначення такого підходу нами проведено експериментальне дослідження, яке передбачало вивчення комплексу поєднаних імунологічних реакцій організму, патоморфологічних і генотоксичних змін в органах експериментальних тварин за дії канцерогенної та токсичної

ОБОСНОВАНИЕ КРИТЕРИАЛЬНОГО ЗНАЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ КАНЦЕРОГЕНОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Черниченко И.А., Баленко Н.В., Осташ О.М.

Цель работы. Проведение комплекса биологических исследований путем изучения и определения спектра иммунологических реакций организма, патоморфологических и генотоксических изменений в органах при воздействии канцерогенного и токсического вещества.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на белых беспородных мышах, включавший 2 серии исследований:

1 — кожные аппликации БП в разных дозах (10,5 мкг; 2,1 мкг; 0,21 мкг); 2 — пероральное введение БП и фенола (разовая доза 0,1 мг).

Результаты. Установлено параллельность развития и однонаправленность относительно канцерогенеза проявления генотоксических и иммунологических изменений и наличие достоверной корреляционной связи между ними, которая наиболее выражена в первый

месяц эксперимента. Выявлена зависимость этих изменений от дозы и времени действия канцерогена. Полученные результаты стали основанием для рассмотрения генотоксических и иммунологических показателей как возможных ранних прогностических критериев канцерогенности при тестировании и скрининге химических соединений и их доз. Сформулированы основные этапы ускоренного тестирования и гигиенического регламентирования генотоксических канцерогенов, которые включают, в частности, определение дозо-эффектной зависимости ранних генотоксических и иммуносупрессивных изменений (угнетение Т-клеток иммунитета, гуморальной системы); определение минимально эффективных и максимально недействующих доз; расчет ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ), а при наличии данных о канцерогенном потенциале — расчет шкалы показателей канцерогенного риска и определение на его основе ПДК (предельно допустимой концентрации).

© Черниченко І.О., Баленко Н.В., Осташ О.М. СТАТТЯ, 2013.

№ 2 2013 ENVIRONMENT & HEALTH 4

речовин з різними шляхами надходження (нашкірні аплікації та пероральне введення).

Матеріали та методи дослідження. Експеримент складався з двох серій досліджень: 1 — нашкірних аплікацій бенз/а/пірену (БП); 2 — перорального введення БП.

Для нашкірних аплікацій було взято 160 мишей, розподілених на 5 груп. БП наносили у вигляді ацетонового розчину в об'ємі 0,1 мл на попередньо вистрижену шкіру міжлопаткової ділянки спини. Разові дози БП складали 0,21 мкг, 2,1 мкг, 10,4 мкг. Дві групи мишей були контрольними. Мишам однієї групи в аналогічному об'ємі наносили аплікації розчинника (ацетону). Друга група тварин являла собою інтактний контроль. Речовини наносили на шкіру 5 разів на тиждень протягом 11 місяців.

Пероральне введення здійснювали 195 мишам, розподіленим на 4 групи, які включали інтактний контроль, контроль розчинника — триетиленгліколь (ТЕГ) і 2 групи тварин, що отримували БП і фенол ізольовано у разових дозах 0,1 мг. Речовини вводили натщесерце внутрішньошлунково через зонд 1 раз на тиждень в об'ємі 0,2 мл до кінця дослідження, який тривав 14 місяців.

Періодично мишей умертвляли шляхом зміщення хребців шийного відділу хребта і відбирали біоматеріал для

ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

досліджень у різні терміни від початку дослідження — 8, 22, 90 день та 6 і 11 місяців при нашкірних аплікаціях, 9, 31, 95 день та 6, 11, 14 місяців при пероральному введенні.

Генотоксичність визначали за застосуванням мікроядерного (МЯ) тесту [4, 5], враховуючи дані літератури про його переваги [6]. Метод є цінним та достатньо інформативним короткостроковим тестом (КСТ) для визначення генотоксичності, до того ж порівняно простим, доступним, економічним, що дозволяє за короткий час дослідити значну кількість хімічних речовин. З урахуванням збігу органоспецифічності МЯ-тесту з локалізацією канцерогенного ефекту [7], з одного боку, і переважно місцевого характеру дії БП — з другого, для вивчення генотоксичних та морфологічних змін брали шкіру та передшлунок мишей.

Дослідження імунологічних порушень проводили одночас-

но за допомогою аналізу вмісту лейкоцитів у периферичній крові та їхнього клітинного складу; числа Т- та В-лімфоцитів, природних клітин-кілерів, а також реакції дегрануляції базофілів (за Шеллі), гальмування розпластування макрофагів, фагоцитозу, преципітації циркулюючих імунних комплексів розчином поліетиленгліколю.

Патоморфологічні дослідження шкіри і передшлунка проводили з застосуванням патогістологічної техніки виготовлення гістологічних препаратів шляхом заливання органів парафіном після фіксації їх у 10% забуференому розчині нейтрального формаліну. Для фарбування гістологічних препаратів використовували гематоксилін-еозин.

Оцінку отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки медико-біологічних досліджень та t-критерію Ст'юдента. Наявність зв'яз-

Таблиця 1
Порівняльна характеристика дії БП і токсичних сполук (ацетону, фенолу) за даними генотоксичних та імунологічних досліджень

Шляхи введення	Речовина	Разова доза	Ефект					
			Генотоксичний			Імуносупресивний		
			8; 9 день	22; 31 день	90; 95 день	8; 9 день	22; 31 день	90; 95 день
Нашкірні аплікації	БП	0,21 мкг	-	-	-	-	Т-ланка	Т-ланка
	БП	2,1 мкг	+	+++	++	-	Т-ланка	Т-ланка; В-ланка
	БП	10,5 мкг	+	+++	++	-	Т-ланка	Т-ланка; В-ланка
	Ацетон	0,2 мл	-	-	-	-	Т-ланка; В-ланка	Нормалізація порушень
Перорально	БП	0,1 мг	+	+++	++	-	Т-ланка	Т-ланка; В-ланка
	Фенол	0,1 мг	-	-	-	-	Т-ланка; пригн. ф-рів несп. резист.	Нормалізація
	ТЕГ	0,2 мл	-	-	-	-	Ф-ри несп. резист.	Т-ланка; В-ланка

Примітки: "-" — ефект не спостерігався;
"+" — 1-2 клітини з МЯ на 1000 досліджених клітин;

"++" — 2-4 клітини з МЯ на 1000 досліджених клітин;
"+++ " — 2-7 клітин з МЯ на 1000 дослідж. клітин.

кликала; у подальшому між першим та третім місяцями спостерігалася стабілізація числа клітин з МЯ, навіть на дещо нижчому рівні.

Подібна динаміка прояву генотоксичної дії залежно від сумарної дози, часу та тривалості впливу мала місце також за перорального введення БП.

Якщо розглядати імунологічні показники, то можна бачити, що у ранній період дії канцерогену (на кінець першого місяця) найбільш чутливим раннім показником імуносупресії, яка притаманна хімічним канцерогенам, є Т-клітинна ланка імунітету. Зі збільшенням тривалості дії БП до трьох місяців, крім того, приєднується супресія В-ланки імунітету (зменшення числа В-лімфоцитів).

Порівнюючи виявлені показники, можна побачити, що зростання генотоксичного ефекту (числа клітин з МЯ) протягом першого місяця супроводжувалося паралельним розвитком імуносупресії (зменшенням відносної кількості Т-лімфоцитів) (табл. 1). Тобто ці два явища, які властиві дії хімічних канцерогенів, взаємопов'язані і мають односпрямований характер відносно канцерогенезу. Це підтверджують і результати кореляційного аналізу з використанням методу Пірсона, які свідчать про наявність достовірного зворотного кореляційного зв'язку між ними.

При цьому коефіцієнти кореляції становили для БП 10,5 мкг, $r=(-0,87)$ $p<0,01$; 2,1 мкг, $r=(-0,89)$ $p<0,01$ (нашкірні аплікації); для 0,1 мг, $r=(-0,80)$ $p<0,05$ (пероральне введення).

При порівнянні результатів генотоксичних та патоморфологічних досліджень (табл. 2) можна бачити збільшення кількості клітин з МЯ у пізній період (шостий місяць) у тварин після нашкірних аплікацій, в яких патоморфологічно встановлено розвиток проліферативно-гіперпластичних змін та пухлин шкіри, тобто у цей час зростання генотоксичності було пов'язане не з дозою, а з морфологічними передпухлинними змінами та пухлинами.

Аналогічні закономірності прояву генотоксичного ефекту відзначено також у разі перорального введення БП у період виникнення передпухлинних змін і пухлин у передшлунку експериментальних тварин за одинадцять і чотирнадцять місяців від початку досліджу.

Водночас гематологічні та імунологічні показники не відрізнялися від виявлених у мишей інтактного контролю.

На відміну від канцерогену, за дії токсичних речовин (зокрема фенолу і ацетону) генотоксичний та канцерогенний ефекти не спостерігалися, а пригнічення Т- та В-ланок імунітету, факторів неспецифічної рези-

ків між показниками частоти клітин з МЯ та імуносупресії визначали за допомогою коефіцієнта асоціації Пірсона.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті аналізу всіх досліджуваних реакцій організму нами виявлено найбільш інформативні показники, характер і рівень яких за дії канцерогенної (БП) та токсичних сполук (фенолу, ацетону) в узагальненому вигляді наведено у таблиці 1.

При цьому за обох шляхів введення БП встановлено спільні закономірності: генотоксичний ефект в усіх експериментальних тварин реєструється вже у перші дні експерименту (8 день) і зростає у подальшому протягом місяця; встановлено залежність числа клітин з МЯ від разової дози: максимальний ефект спостерігався за дії найбільшої дози 10,5 мкг, у той час як мінімальна доза 0,21 мкг ефекту не ви-

Таблиця 2
Показники генотоксичних та патоморфологічних змін за нашкірних аплікацій та перорального введення білим аутбредним мишам канцерогену (БП) і токсичних сполук (ацетону, фенолу)

Шляхи введення	Речовина	Разова доза	Ефект						
			Генотоксичний				Канцерогенний		
			8, 9 день	22, 31 день	90, 95 день	6-14 місяців	6 місяців	11 місяців	14 місяців
Нашкірні аплікації	БП	0,21 мкг	0	0	0	0	0	0	-
	БП	2,1 мкг	+	+++	++	++++	Папіломи, рак шкіри	Рак шкіри	-
	БП	10,5 мкг	+	+++	++	++++	Папіломи, рак шкіри	-	-
	Ацетон	0,2 мл	0	0	0	0	0	0	-
Перорально	БП	0,1 мг	+	+++	++	++++	0	Папіломи передшлунка	Папіломи передшлунка
	Фенол	0,1 мг	0	0	0	0	0	0	0
	ТЕГ	0,2 мл	0	0	0	0	0	0	0

Примітки: "0" — ефект не спостерігався;
 "-" — дослідження не проводилися;
 "+" — 1-2 клітини з МЯ на 1000 досліджених клітин;
 "++" — 2-4 клітини з МЯ на 1000 досліджених клітин;

"+++" — 2-7 клітин з МЯ на 1000 досліджених клітин;
 "++++" — 10-16 клітин з МЯ на 1000 досліджених клітин.

SUBSTANTIATION OF THE CRITERIA THE SET OF GENOTOXIC AND IMMUNOLOGICAL INDICATORS FOR RAPID ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL CARCINOGENS

Chernichenko I.A., Balenko N.V., Ostash O.M.

The objective of the work. Performance of the complex of biological investigations by means of the study and determination of the spectrum of immunological reactions of the organism, pathomorphological and genotoxic changes in organs under the influence of carcinogens and toxic substances.

Materials and methods. The experiment were performed on white outbred mice. It included 2 series of investigation: I – dermal applications in various doses of benz/a/pyrene (BP) (0,21; 2,1; 10,5 mg); II – peroral administration of BP and phenol (a single dose of 0,1 mg).

Results. Parallel development and one-directed manifestation of genotoxic and immunological changes concerning carcinogenesis has been

determined. Presence of valid correlative connection between them is most expressed in the first month of the experiment. A dependence of these changes from a dose and time of carcinogene has been revealed. The obtained data were a base to consider genotoxic and immunological indices as possible early prognostic criteria for carcinogenesis at testing and screening of the chemical compounds and their doses. The main stages of the accelerated testing and hygienic regulation of the genotoxic carcinogenes have been formulated. They include the establishment of dose-effect dependence of the early genotoxic and immunosuppressive changes (suppression of the T-cell immunity, humoral system); determination of minimum effective and maximum uneffective doses; calculation of tentative safe exposure levels (TSEL) have been formulated. At the presence of carcinogenic potential data a scale for carcinogenic risk indices and determination of the PAC (permissible allowable concentration) on its base may be calculated.

стентності, які відзначалися у ранній період, мали транзиторий характер і вже наприкінці 3 місяця не проявлялися.

Отже, отримані результати — паралелізм розвитку та односпрямованість змін відносно канцерогенезу показників генотоксичного ефекту та імунологічних реакцій, наявність кореляційного зв'язку між ними у ранній період (протягом 1 місяця) лише за дії доз БП, що індукували пухлини шкіри та передшлунка, свідчать, на нашу думку, про можливість використання комплексу цих показників за дії досліджуваної речовини як ранніх критеріїв канцерогенності генотоксичних хімічних сполук. При цьому експеримент доцільно проводити протягом 3-х місяців, що забезпечує, з одного боку, визначення характерних для хімічного канцерогенезу змін генотоксичного ефекту та імунних реакцій, а з іншого — диференціювання з токсичними речовинами.

Матеріали проведених досліджень стали підґрунтям для розробки методичних схем прискороного тестування вперше досліджуваних хімічних речовин на канцерогенність (рис. 1) та регламентації хімічних генотоксичних канцерогенів за наявності даних про канцерогенний потенціал (рис. 2).

Розроблені схеми передбачають проведення експерименту з метою виявлення дозо-ефектних залежностей прояву комплексу ранніх генотоксичних та супресивних змін імунної системи з наступною

оцінкою канцерогенних властивостей речовин та їхніх доз.

Використання зазначеного комплексу, на нашу думку, дозволяє перейти на новий рівень якості даних експериментальних досліджень як з точки зору прискороення та підвищення надійності тестування та скринінгу канцерогенних хімічних сполук з генотоксичним механізмом дії, так і прискороеної оцінки канцерогенної активності їхніх доз. Запропоно-

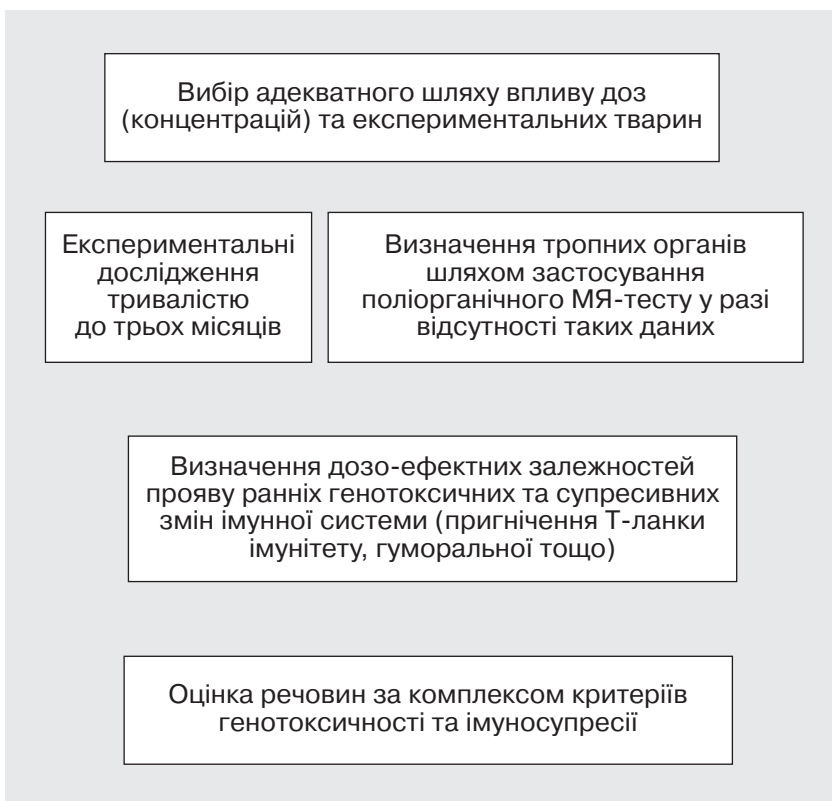
вані системи оцінки можуть бути покладені в основу розробки методичних рекомендацій щодо прискороеного нормування канцерогенонебезпечних речовин у різних елементах навколишнього середовища.

Висновки

1. У досліді на мишах за обох шляхів введення (нашкірних аплікацій та перорального введення) бенз/а/пірену та токсичних сполук (ацетону, фенолу) виявлено певні закономір-

Рисунок 1

Етапи прискороеного тестування генотоксичних канцерогенів



токсичний ефект був відсутнім, і кількість клітин з мікроядрами не відрізнялася від величин спонтанного рівня в інтактних тварин, а показники супресії Т-ланки та неспецифічної резистентності організму, що спостерігалися протягом першого місяця, мали транзиторний характер і за 3 місяці відновлювалися до рівнів, відзначених в інтактних тварин.

4. Виявлені відмінності у дії канцерогену та токсичних речовин дозволяють розглядати комплекс показників генотоксичності та імуносупресії як можливі ранні критерії канцерогенності хімічних речовин. Використання цього комплексу забезпечує можливість визначення канцерогенних властивостей хімічних сполук і диференціювання їх від токсичних сполук в експерименті протягом 3 місяців.

5. Отримані дані стали підґрунтям для розробки методичних схем прискореного тестування досліджуваних хімічних речовин на канцерогенність та регламентації генотоксичних канцерогенів.

ЛІТЕРАТУРА

1. National Toxicology Program (NTP). Technical Report Series 1-567, 1976-2011. — <http://ntp.niehs.nih.gov>.

2. Сычева Л.П. Оценка мутагенных факторов окружающей

среды полиорганным микроядерным тестом / Л.П. Сычева // Вестник Российской АМН. — 2006. — № 7. — С. 27-32.

3. Перелік речовин, продуктів, виробничих процесів, побутових та природних факторів, канцерогенних для людини / Гн 1.1.2.123. — К., 2006. — 16 с.

4. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом: метод. рек. / Межведомственный науч. совет по экологии человека и гигиене окружающей среды РФ. — М., 2001. — 21 с.

5. Патент 54040 України, МПК G01N 1/28. Спосіб отримання ізольованих клітин з мікроядрами із епітелію шкіри / І.О. Черниченко, Н.В. Баленко, О.М. Осташ, Л.С. Соверткова. — Заявл. 22.04.2010; опубл. 25.10.2010. — Бюл. № 20.

6. Рахманин Ю.А. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях / Под ред. Л.П. Сычевой, Ю.А. Рахманина. — М.: Гениус, 2007. — 150 с.

7. Новый подход к диагностике мутагенных и канцерогенных свойств окружающей среды / Л.П. Сычева, В.С. Журков, Ю.А. Рахманин [и др.] // Гиг. и сан. — 2003. — № 6. — С. 87-91. *Надійшла до редакції 12.11.2012.*

ності змін генотоксичних та імунологічних показників, про яких залежить від дози, тривалості спостереження і характеру діючих речовин.

2. За дії канцерогену встановлено зростання генотоксичного ефекту і супресію Т-ланки імунної системи протягом першого місяця, які характеризуються паралелізмом розвитку, односпрямованістю відносно канцерогенезу та наявністю достовірного зворотного кореляційного зв'язку між ними. У період між 1 та 3 місяцями спостерігалася стабілізація числа клітин з мікроядрами та поглиблення імуносупресії за рахунок пригнічення гуморальної ланки імунітету.

3. Динаміка виявлених змін за дії токсичних сполук (ацетону, фенолу) має інші закономірності проявів генотоксичності та імунологічних реакцій. Генотоксичний ефект був відсутнім, і кількість клітин з мікроядрами не відрізнялася від величин спонтанного рівня в інтактних тварин, а показники супресії Т-ланки та неспецифічної резистентності організму, що спостерігалися протягом першого місяця, мали транзиторний характер і за 3 місяці відновлювалися до рівнів, відзначених в інтактних тварин.

Рисунок 2

Основні етапи прискореного гігієнічного регламентування генотоксичних канцерогенів

