

Г.Б. Плисс¹, М.А. Забежинский¹, М.Г. Плисс²

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА БЕНЗИДИНСУЛЬФОНА, ВХОДЯЩЕГО В ГРУППУ ДИАМИНОДИФЕНИЛОВ С ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ КАНЦЕРОГЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ

¹ НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России,² Санкт-Петербургский 1-й государственный медицинский университет им. И.П. Павлова

Проведено изучение канцерогенности бензидинсульфона (4,4'-диаминодифенил сульфона) в опытах на крысах и мышах. Подопытные животные (99 крыс и 99 мышей, примерно равно разделенных по полу) получали препарат в течение всей жизни путем подкожных инъекций (раз в неделю) или добавления к корму (5 раз в неделю). Разовая доза препарата в расчете на животное в опытах на крысах составила: при подкожном введении – 50 мг (у самок была снижена из-за токсичности после начала эксперимента до 25 мг) в 0,5 мл масла, при скармливании – 20 мг в 0,5 мл масла; в опытах на мышах – соответственно 5 мг в 0,2 мл масла и 2 мг в 0,2 мл масла. Максимальное количество вещества при подкожном введении крысам-самцам составило 5,65 г, самкам – 2,68 г; при скармливании крысам – 12,44 г; при подкожном введении мышам – 380 мг; при скармливании – 737 мг. Выживаемость подопытных животных была статистически достоверно снижена по сравнению с интактным контролем из-за токсического эффекта препарата, преимущественно, хронического нефроза с нефритическим компонентом и вторичным нефросклерозом, а также, миокардиосклероза и склероза аорты. Частота и сроки обнаружения опухолей у подопытных животных существенно не отличались от наблюдавших в контроле, что свидетельствует об отсутствии канцерогенных свойств бензидинсульфона.

Ключевые слова: бензидинсульфон, отсутствие канцерогенности, токсичность, крысы, мыши.

Изучение биологического эффекта производных бензидина представляет интерес благодаря их широкому применению в химической промышленности и возможной канцерогенной опасности для человека. Ранее нами были проведены исследования возможных бластомогенных свойств значительной группы полупродуктов анилино-красочной промышленности, включая производные бензидина [3]. Целью данной ра-

боты явилось тестирование на канцерогенность бензидинсульфона (4,4'-диаминодифенил сульфона) (рис.1) в опытах на крысах и мышах. Сведений об испытаниях канцерогенной активности этого препарата в литературе нам обнаружить не удалось [4-6].

Материал и методика

В опытах использованы белые беспородные крысы весом 200-250 г и мыши линии СС57 коричневые обоего пола весом 16-18 г, полученные из питомника Рапполово РАМН. Животные содержались на натуральных смешанных кормах при стандартном световом и температурном режиме.

Подопытным животным вводили бензидинсульфон в виде химически чистого вещества, полученного из Института органических полупродуктов и красителей. Он был представлен порошком, имеющим нейтральную реакцию. Препарат вводили животным в виде взвеси в подсолнечном масле с кормом, либо подкожно.

Предварительно в острых опытах на токсичность при подкожном введении препарата крысам была установлена ЛД_{50/30}, составившая 1083 мг/кг. На основании этих данных были выбраны дозы препарата для хронических экспериментов.

Тестирование на канцерогенность проводилось путем введения бензидинсульфона 99 крысам и 99 мышам (по 49-50 экз. в группе, примерно равно разделенных по полу) подкожно (раз в неделю) и с помощью добавления к корму (5 раз в неделю). Разовая доза препарата в расчете на животное в опытах на крысах составила: при подкожном введении – 50 мг (у самок была снижена после начала эксперимента до 25 мг) в 0,5 мл подсолнечного масла, при скармливании – 20 мг в 0,5 мл масла; в опытах на мышах – соответственно 5 мг в 0,2 мл масла и 2 мг в 0,2 мл масла.

Исследуемое вещество вводили в течение всей жизни животных: максимально крысам подкожно – 828 дней, с кормом – 835 дней; мышам – соответственно 526 дней и 507 дней. Максимальное количество вещества при подкожном введении крысам-самцам составило 5,65 г, самкам – 2,68 г; при скармливании крысам – 12,44 г; при подкожном введении мышам – 380 мг; при скармливании – 737 мг.

Контролем служили интактные животные: 139 крыс (71 самец и 68 самок) и 131 мышь (70 самцов и 61 самка).

За подопытными и контрольными животными вели ежедневное наблюдение. Периодически измеряли кровяное давление в связи с обнаруженной сосудистой патологией. По ходу опыта убивали только животных в состоянии крайней слабости. Павших и убитых животных вскрывали. Гистологическому исследованию подвергали основные внутренние

органы (печень, почку, селезенку, легкие), опухоли, а также остальные органы и ткани при обнаружении в них при аутопсии патологических изменений. Классификацию опухолей производили согласно критериям Международного агентства по изучению рака [7,8]. Полученные результаты подвергали статистической обработке с помощью параметрических и непараметрических критериев [1].

Результаты и обсуждение

Опыты на крысах

В экспериментах с подкожным введением препарата после 9 инъекций отмечено падение веса самок и гибель 4 крыс на 54 дне эксперимента. На вскрытии у самок выявлено поражение почек (отечность, напряженность капсулы). Из-за обнаруженного токсического эффекта разовая доза вещества у самок была снижена вдвое. Самцы инъекции переносили удовлетворительно. У всех подопытных животных отмечали интенсивный диурез и жажду.

Первая опухоль в группе крыс, получавших инъекции бензидинсульфона, обнаружена через 375 дней опыта. Она представляла собой остеосаркому левой голени у подопытной самки. До этого срока дожили 34 крысы (20 самцов и 14 самок). Через 1,5 года в живых оставалось 13 крыс (7 самцов и 6 самок). В дальнейшем выявлены опухоли у двух самцов: остеогенная саркома, занимавшая лобную и теменную области черепа (на 380 дне опыта) и разрушавшая исходную ткань с замещением ее опухолевыми клетками, и остеосаркома левого бедра (на 606 дней эксперимента). Опухоли костей конечностей распространялись в окружающие ткани.

В опытах со скормливанием бензидинсульфона к концу первого года эксперимента под наблюдением было 33 крысы, через 1,5 года — 17 крыс. Новообразования отмечены у 3 крыс. Первая опухоль (ретикулосаркома переднего средостения) была обнаружена у самца на 707 дне опыта. Опухоль занимала прикорневую зону легкого и врастала в ткань органа. К моменту ее обнаружения под опытом находилось 9 крыс. Новообразования выявлены также у двух самок: аденокарцинома левого рога матки, враставшая в прилежащие ткани (на 813 дне опыта, и фиброма молочной железы (на 900 дне эксперимента).

Наряду с опухолями, у подопытных крыс обнаруживали неопухолевые заболевания, преимущественно поражения почек и сосудов. Они отмечены при подкожном введении препарата у 19 самцов и 16 самок после 52 дней опыта; при скормливания — у 11 самцов и 11 самок после 165 дней. Почки этих животных увеличивались в размерах, их поверхность становилась зернистой или бугристой (рис.2). При микроскопическом исследовании в канальцах обнаруживали кристаллы вещества, в межклеточной ткани — вос-

палительную реакцию. Отмечалось кистозное расширение канальцев с атрофией эпителия, а также атрофия клубочков. На этом фоне развивался фиброз межуточной ткани и рубцовые изменения. На основании описанной картины был поставлен диагноз токсического хронического нефроза с нефритическим компонентом и вторичным нефросклерозом (рис.3, 4).

Наблюдалось также поражение сердца и сосудов, преимущественно, аорты. Изменения сердечной стенки обнаружены при подкожном введении БДС у 3 самцов и 4 самок после 415 дней опыта, при скормливания — у 2 самцов и 3 самок после 434 дней опыта. Поверхность сердца была неравномерно окрашенной, участки серого тусклого цвета чередовались с красно-вишневыми. При гистологическом исследовании отмечали миокардит с некрозом мышечных волокон, воспалительной реакцией и последующим миокардиосклерозом (рис.5). Обнаружено также пропитывание и набухание стенки коронарных сосудов. Изменения аорты выявлены только при подкожном введении БДС у 3 крыс-самок после 529 дней опыта. При аутопсии отмечался выраженный склероз аорты, стенки ее были уплотнены, местами с образованием плотных узелков, режущихся с хрустом. Микроскопические изменения выражались в белковом пропитывании стенки с разрушением эластического слоя, вторичным отложением извести (кальцинозом), нарушением целостности интимы и реакцией фибробластических элементов (рис.6). Из других изменений следует отметить единичные случаи пролиферации холангиолярного эпителия, отмечавшиеся как при подкожном введении, так и при скормливания вещества. Часть крыс погибала от интеркуррентных заболеваний, в основном, от пневмонии, наблюдавшейся и у интактных животных.

Учитывая обнаруженное у подопытных крыс токсическое поражение почек и сердечно-сосудистой системы, проводили выборочное измерение кровяного давления у подопытных и контрольных животных после 23 мес. опыта. С этой целью был использован «хвостовой метод непрямого измерения артериального давления» с использованием аппарата фирмы AD Instruments. В контроле диастолическое давление составляло 80-90 мм рт.ст., а у крыс, получавших БДС — 110-200 мм рт.ст. Выборочный анализ крови на холестерин не выявил его повышения по сравнению с контролем (67 мг%).

Среди контрольных крыс до конца первого года наблюдения дожили 122 животных, до 1,5 лет — 84 животных. До срока обнаружения первой опухоли (452 дня) дожили 113 крыс (55 самцов и 58 самок). Опухоли возникли у 11 самцов и 18 самок, в том числе, злокачественные

Таблица 1. Сведения о выживаемости и развитии опухолей (Оп) у крыс в экспериментах с бензидинсульфоном (БДС)

Группа	Пол	Число крыс в группе (а)			Срок обнаружения 1-й Оп. (дни)	ЭЧ. (б)	Число крыс с опухолями (в)		
		В начале	1 год	1,5 года			всего	с ЗО	ЛПО (дни)
БДС-п/к	самцы	25	20 (80%)	7 (28%)*	380	20	2 (10%)	2 (10%)	380, 606
БДС-ск.	самцы	24	18 (75%)	8 (33,4%)	707	18	1 (5,6%)	1 (5,6%)	707
ИК	самцы	71	58 (81,7%)	37 (52,2%)	452	58	11 (19%)	3 (5,2%)	452-938
БДС-п/к	самки	25	14 (56%)*	6 (24%)*	375	14	1 (7,2%)	1 (7,2%)	375
БДС-ск.	самки	25	15 (60%)*	9 (36%)*	813	15	2 (13,4%)	1 (6,7%)	813, 900
ИК	самки	68	64 (94,2%)	47 (69,2%)	542	64	18 (28,2%)	4 (6,3%)	542-1055

Примечания: БДС-п/к – подкожное введение БДС; БДС-ск. – скормливание БДС; ИК – интактный контроль; Оп. – опухоли; ЗО – злокачественные опухоли; ЛПО – латентный период развития опухолей. (а) – в скобках – процент выживших крыс по отношению к исходному количеству; (б) – эффективное число (ЭЧ) животных, доживших до срока обнаружения 1-й опухоли в сравниваемых группах (для самцов – 380 дней, для самок – 375 дней); (в) в скобках – процент крыс с опухолями по отношению к эффективному числу животных. (X) – $P < 0,05$ (по сравнению с контрольной группой того же пола).

опухоли — у 3 самцов (по 1 случаю генерализованного ретикулосаркоматоза, фибросаркомы легкого и хромофобной карциномы гипофиза, выявленных через 452, 776 и 670 дней наблюдения соответственно) и 4 самок (2 случая ретикулосаркомы легких, 1 оксифильная карцинома гипофиза и 1 аденокарцинома яичника через 673, 748, 843 и 542 дня). Среди доброкачественных опухолей преобладали аденомы гипофиза (у 3 самцов и 11 самок – через 491 — 1055 дней наблюдения) и фиброаденомы молочной железы (у 2 самцов и 7 самок через 542-1055 дней). Поражений почек, сердца, сосудов, а также случаев пролиферации холангиолярного эпителия, аналогичных обнаруженным у подопытных крыс, в контроле не выявлено.

Сравнительные данные о выживаемости и возникновении новообразований у подопытных и контрольных крыс приведены в табл. 1.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, выживаемость подопытных крыс была существенно ниже, чем у контрольных животных. Наименьшая выживаемость отмечена у подопытных самок при подкожном введении препарата, когда через 1,5 года опыта в живых оставалось почти в 3 раза меньше животных, чем в контроле. Это свидетельствует о повышенной чувствительности крыс-самок к токсическому действию препарата, по сравнению с самцами.

Что касается развития новообразований, то суммарная частота опухолей у подопытных крыс обоего пола была несколько ниже, чем в контроле ($P < 0,05$). Это может быть связано как с меньшей выживаемостью подопытных крыс, так и с тем, что при аутопсии крыс, получавших бензидинсульфон, полость черепа вскрывали только в случаях подозрений на наличие опухолей (экзофтальм, изменения в поведении), тог-

да как в контроле вскрытие черепа производили у всех животных. В результате у контрольных крыс были выявлены новообразования гипофиза (в основном, доброкачественные), не отмеченные в группах подопытных животных. В то же время значительных различий в частоте злокачественных опухолей в подопытных группах по сравнению с контролем выявить не удалось. Не отмечено также существенных различий в сроках обнаружения опухолей. При сравнительном анализе локализации и гистологического типа новообразований обнаружено, что у подопытных крыс в единичных случаях возникали остеосаркомы, не отмеченные в контроле. Однако, в других опытах, проведенных в лаборатории, мы наблюдали развитие подобных новообразований у интактных крыс, описаны такие случаи и в литературе [7]. В целом, представленные данные свидетельствуют об отсутствии канцерогенного эффекта бензидинсульфона у крыс.

Опыты на мышах

Мыши обоего пола инъекции и скормливание препарата переносили удовлетворительно. Повышенного диуреза, аналогичного тому, что имело место в опытах на крысах, не отмечено.

Среди мышей, которым бензидинсульфон вводили подкожно, первое новообразование (гемангиома печени) было обнаружена у самки на 296 дне эксперимента. К этому сроку под опытом находилось 39 мышей (18 самцов и 21 самка). К 12 мес. эксперимента в живых осталось 19 мышей (8 самцов и 11 самок). Кроме гемангиомы печени, опухоли обнаружены еще у 2 мышей: ретикулез со значительным увеличением печени и селезенки (у самки на 340 дне опыта), и трабекулярная аденома легкого у самца на 485 дне эксперимента.

В опытах со скормливанием вещества первая опухоль отмечена на 248 дне, когда под опытом находилось 38 мышей (19 самцов и 19 самок). К 12 мес. в эксперименте было 11 мышей (4 самца и 7 самок). Всего новообразования возникли у 3-х мышей: генерализованный лимфолейкоз — у 2 самок на 248 и 310 днях эксперимента и гемангиома печени — у самца на 356 дне опыта.

У части подопытных мышей (при подкожных инъекциях — у 14, при скормливании — у 17 животных), как и у крыс, обнаруживали изменения в почках. Макроскопически почки были бугристы, уплотнены. При гистологическом исследовании выявлен хронический нефроз с нефросклерозом. Склеротические поражения отмечены как в клубочках, так и в межуточной ткани. У некоторых мышей выявлены очаги дистрофии гепатоцитов. Кроме того, у подопытных животных, как и в контроле, обнаруживали пневмонию и энтерит.

В контрольной группе до срока обнаружения первой опухоли (249 дней) дожили 119 мышей (64 самца и 55 самок), до окончания первого года наблюдения — 106 мышей (58 самцов и 48 самок), до полутора лет — 33 мыши (18 самцов и 15 самок). Всего новообразования выявлены у 14 самцов и 14 самок.

Злокачественные опухоли отмечены у 8 самцов и 9 самок. Чаще всего (у 8 мышей) встречались новообразования системы крови (генерализованный ретикулосаркоматоз, миелолейкоз, лимфолейкоз, тимомы). В 4 случаях отмечены злокачественные опухоли кожи (плоскоклеточный рак, базальноклеточный рак, саркома), в 2 — опухоли легкого (аденокарцинома, ретикулосаркома). Обнаружено также по одному случаю аденокарциномы молочной железы, фибросаркомы печени и ретикулосаркомы тонкой кишки. Доброкачественные опухоли были представлены аденомами легких (в 13 случаях). Из неонколо-

гических заболеваний в большинстве случаев наблюдали пневмонии (у 75,6% животных) и энтериты (у 54,2% мышей).

Сравнительные данные о выживаемости и возникновении новообразований у подопытных и контрольных мышей приведены в табл. 2.

Из данных, представленных в табл. 2, видно, что подопытные мыши погибали значительно чаще и раньше, чем контрольные ($P < 0,05$), что объясняется токсическим действием исследуемого препарата. Через полтора года опыта все животные, получавшие БДС, уже пали, тогда как в контрольной группе под наблюдением оставалось более 20% животных. Основной причиной смерти подопытных мышей, так же, как и крыс, являлось токсическое поражение почек.

Количество мышей с опухолями в подопытных группах было ниже, чем в контроле (табл.2). Из-за существенно сниженной по сравнению с контролем выживаемости эффективное число животных в подопытных группах, по отношению к которым вычисляли частоту опухолей, было также низким. Поэтому, несмотря на то, что частота опухолей у подопытных мышей обоего пола была ниже, чем в контроле, выявленные различия не достигали уровня статистической достоверности. Спектр и сроки обнаружения новообразований у мышей, получавших БДС, также мало отличались от контроля и, в целом, соответствовали литературным данным [8]. Таким образом, у мышей, как и у крыс, не удалось выявить канцерогенный эффект бензидинсульфона, однако токсические свойства препарата (прежде всего, поражение почек) отмечено у обоих видов животных.

Отсутствие канцерогенных свойств у бензидинсульфона можно предположительно объяснить тем, что дополнительный сульфоновый «мостик» в молекуле этого соединения, меняющий его конфигурацию, препятствует метабо-

Таблица 2. Сведения о выживаемости и развитии опухолей (Оп) у мышей в экспериментах с бензидинсульфоном (БДС)

Группа	Пол В начале	Число мышей в группе(а)			Срок обнаружения 1-й Оп. (дни) всего		ЭЧ. (б) с 30 ЛПО (дни)	Число мышей с опухолями(в)	
		1 год	1,5 года						
БДС-п/к	самцы	24	8 (33,4%)*	0	485	11	1 (9,1%)	0	485
БДС-ск	самцы	24	4 (16,7%)*	0	356	4	1 (25%)	0	356
ИК	самцы	70	58 (82,9%)	18 (25,8%)	327	60	14 (23,4%)	8 (13,4%)	327-586
БДС-п/к	самки	26	11 (42,3%)*	0	296	14	2 (14,3%)	1 (7,2%)	296,340
БДС-ск.	самки	25	7 (28,0%)*	0	248	19	2 (19,6%)	2 (10,6%)	248,310
ИК	самки	61	48 (78,7%)	15 (24,6%)	249	64	14 (21,9%)	9 (14,1%)	249-528

Примечания: БДС-п/к — подкожное введение БДС; БДС-ск. — скормливание БДС; ИК — интактный контроль; Оп. — опухоли; 30 — злокачественные опухоли; ЛПО — латентный период развития опухолей. (а) — в скобках — процент выживших мышей по отношению к исходному количеству; (б) — эффективное число (ЭЧ) животных, доживших до срока обнаружения 1-й опухоли в сравниваемых группах (для самцов — 327 дней, для самок — 248 дней); (в) в скобках — процент мышей с опухолями по отношению к эффективному числу животных. (х) — $P < 0,05$ (про сравнению с контрольной группой того же пола).

лической активации препарата с образованием канцерогенного бензидина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина. — 1978.
2. Плисс Г.Б. О некоторых закономерностях связи канцерогенной активности производных аминодифенила со структурой вещества. / Труды VIII Международного противоракового конгресса. – 1963. — Т. 2. — С. 312.
3. Плисс Г.Б. Итоги 25-летнего изучения бластомогенной активности продуктов анилиноокрасочной промышленности/ Практические и научные основы профилактики канцерогенных воздействий / Под ред. Н.П. Напалкова, Г.Б. Плисса, П.П. Дикуна, – Л. : НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова. — 1984. – С. 9 – 19.
4. Carcinogen List – www.naturallrussia.com/Carcinogen_list.pdf
5. Carcinogen Potency Database – www.potency.berkeley.edu/chempage
6. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 1972-2013. Vols.1-108 – <http://monographs.iarc.fr/PDFs/index.php>
7. Turusov V.S. , Mohr U. (Eds.). Pathology of Tumours in Laboratory Animals. Volume 1. Tumours of the Rat (2nd ed.). IARC Sci. Publ. No.99. – Lyon: IARC, 1990.
8. Turusov V.S. , Mohr U. (Eds.). Pathology of Tumours in Laboratory Animals. Volume 2. Tumours of the Mouse (2nd ed.). IARC Sci. Publ. No.111. – Lyon: IARC, 1993.

G.B. Pliss¹, M.A. Zabezhinsky¹, M.G. Pliss²

Experimental study of the effect of benzidinsulfon included in the group of diaminodifenils with potential carcinogenic features

1N.N.Petrov Research Institute of Oncology
2I.P.Pavlov State Medical University, St. Petersburg

There was performed a study of carcinogenicity of benzidinsulfon (4,4'-diaminodiphenyl sulfone) in rats and mice. Experimental animals (99 mice and 99 rats, approximately equally divided by sex) received the drug throughout the life by subcutaneous injections (once a week) or addition to food (5 times a week). A single dose per animal in rats was: subcutaneous administration — 50 mg (in females it was reduced due to the toxicity after beginning of the experiment to 25 mg) in 0.5 ml of oil, while feeding — 20 mg in 0.5 ml of oil; in mice — respectively 5 mg in 0.2 ml of oil, and 2 mg in 0.2 ml of oil. The maximum amount of a substance when administered subcutaneously to male rats was 5.65 g, to female rats — 2, 68 g, when fed to rats — 12.44 g, when injected subcutaneously in mice — 380 mg, when fed — 737 mg. The survival of experimental animals was significantly reduced as compared to the intact control because of the toxic effect of the drug, preferably chronic nephrosis with nephritic component and secondary nephrosclerosis and as well as miocardiosclerosis and aortic sclerosis. Frequency and timing of detection of tumors in experimental animals was not significantly different from that observed in the control that indicated the absence of carcinogenic features of benzidinsulfon.

Поступила в редакцию 11.10.2013 г.

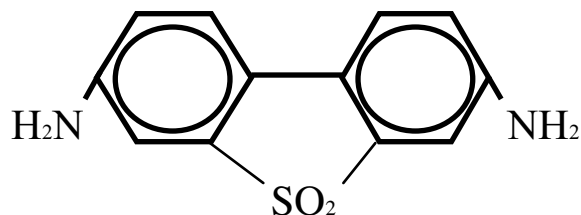


Рис.1. Структурная формула бензидинсульфона



Рис. 2. Макропрепарат, Система: сердце – аорта — почки. Склероз стенок аорты с образованием отдельных узелков. Поверхность почек мелкобугриста. Инъекции бензидинсульфона

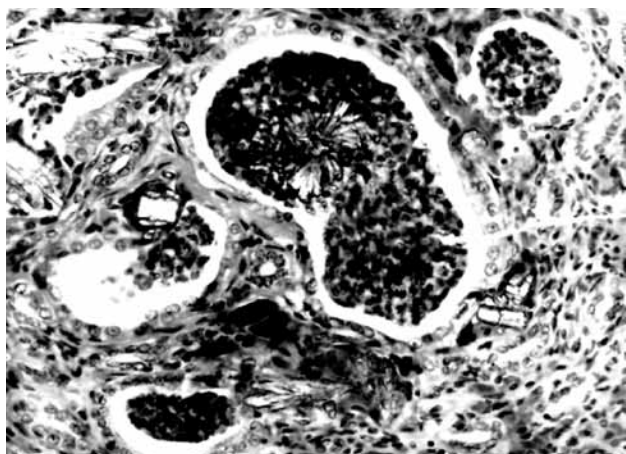


Рис. 3. Хронический нефроз. В просвете канальцев кристаллы веществ, воспалительная реакция межуточной ткани

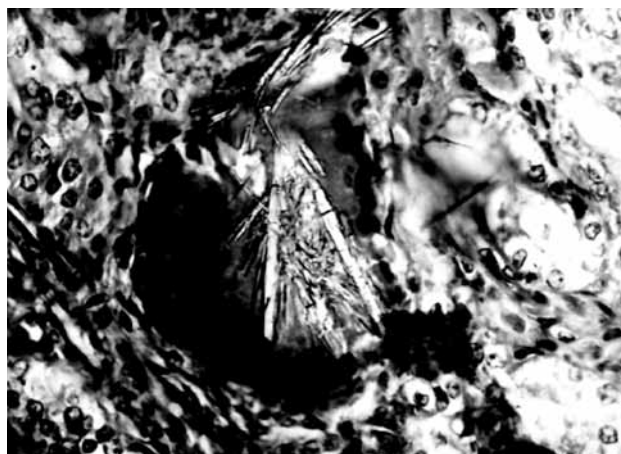


Рис. 4. Почка. Гигантская многоядерная клетка, содержащая кристаллы бензидинсульфона

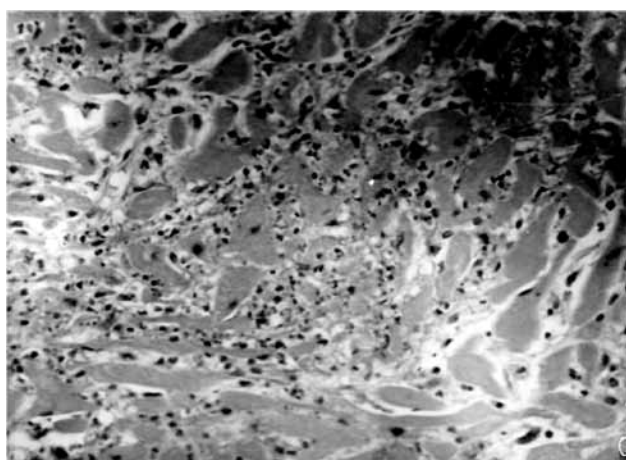


Рис. 5. Миокардит. Некроз мышечных волокон, лейкоцитарная реакция

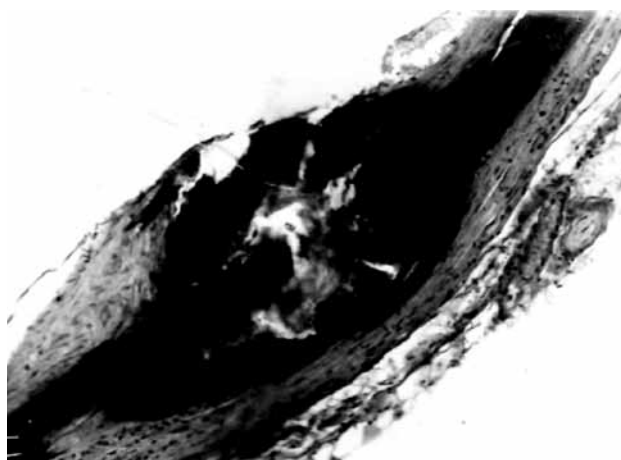


Рис. 6. Поперечный срез стенки аорты. Белковая инфильтрация всех слоев. Кальциноз стенки с разрушением интимы аорты