

Рыжова Н.И., Дерягина В.П., Ильницкий А.П.

## ДЕЙСТВИЕ НИТРИТА НАТРИЯ НА КАНЦЕРОГЕНЕЗ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ НАКОЖНОЙ АППЛИКАЦИЕЙ БЕНЗ(А)ПИРЕНА

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва

Важной особенностью жизни современного человека является значительное загрязнение окружающей среды, создающее опасность одновременного воздействия на организм канцерогенных и токсических соединений. В эксперименте на 320 мышах-самках F1(CBAxС57BL/6) изучали комбинированное действие бенз(а)пирена (БП) и нитрита (НИ) – убиквитарно распространённых соединений. Мыши (6 групп по 50 животных) получали аппликацию БП на кожу в разовой дозе 6 или 9 мкг/мышь (дважды курсами по 12 недель каждый) или БП в этих же дозах в комбинации с нитритом натрия (НН), получаемым на протяжении всего эксперимента животными с водой в концентрации 50 мг/л или 500 мг/л (расчёт по молекуле  $\text{NaNO}_2$ ), т. е. на уровне 10 и 100 ПДК нитрита в воде. Исследование показало, что НН оказывает умеренное потенцирующее действие на канцерогенез, индуцированный накожным нанесением БП, увеличивая показатель множественности опухолей в 1,4 – 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), а также частоту опухолей кожи и гормонозависимых опухолей. При действии максимальных доз БП + НН (9 мкг + 500 мг/л) количество животных с опухолями кожи увеличилось в 2,4 раза ( $p < 0,01$ ). Количество животных с гормонозависимыми опухолями (суммарно: опухоли молочной железы, яичников и матки) при комбинированном действии на мышей БП + НН в обеих изученных концентрациях возросло в 2,8 – 3,5 раза ( $p < 0,01$ ) в сравнении с действием одного БП. Обсуждается возможный механизм стимулирования канцерогенного процесса за счёт повышенного образования активных форм кислорода, метаболитов оксида азота, а также угнетения фагоцитарной функции нейтрофилов крови.

Ключевые слова: канцерогенез; бенз(а)пирен; нитраты; нитриты; нитрит натрия; комбинированное действие; мыши; опухоли; фагоцитоз; активные формы кислорода; метаболиты оксида азота.

**Для цитирования:** Рыжова Н.И., Дерягина В.П., Ильницкий А.П. Действие нитрита натрия на канцерогенез, индуцированный накожной аппликацией бенз(а)пирена. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(5): 434-440. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-5-434-440>

**Для корреспонденции:** Дерягина Валентина Петровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России. E-mail: [derygina@inbox.ru](mailto:derygina@inbox.ru)

Ryzhova N.I., Deryagina V.P., Ilnitsky A.P.

## THE IMPACT OF SODIUM NITRITE ON CARCINOGENESIS INDUCED BY SKIN APPLICATION OF BENZO(A)PYRENE

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, 115478, Russian Federation

An important feature of the modern life is a significant environmental pollution, which creates the danger of simultaneous effects of carcinogenic and toxic compounds on the human organism. The combined effect of such ubiquitously common compounds as benzo(a)pyrene (BP) and nitrites (NI) was studied in the experiment, on 320 female mice F1 (CBAxС57BL/6). The mice (6 groups of 50 animals) received BP application on the skin at a dose of 6 or 9 µg/mouse (two cycles for 12 weeks each) or BP in the same doses in combination with sodium nitrite (SN) was administered to animals with water at a concentration of 50 mg/l or 500 mg/l throughout the entire experiment. The study revealed SN to have moderate potent effects on carcinogenesis induced by cutaneous application of BP, increasing tumor multiplicity index by 1.4-1.6 times ( $p < 0,05$ ), as well as the prevalence rate of skin tumors and hormone-dependent tumors. Under the action of the maximum doses of BP + SN (9 µg + 500 mg/l), the number of animals with skin tumors increased by 2.4 times ( $p < 0.01$ ). The number of animals with hormone-dependent tumors (total: breast, ovary, and uterus) increased by 2.8 – 3.5 times ( $p < 0.01$ ) under the combined effect on BP+SN compared with that of BP alone. There is discussed a possible mechanism of the stimulation the carcinogenic process due to the increased appearance of reactive oxygen species, nitric oxide metabolites, as well as the suppression of the phagocytic function of blood neutrophils.

Key words: carcinogenesis; benzo(a)pyrene; sodium nitrite; nitrates; nitrites; the combined action of the mouse; tumors; phagocytosis; reactive oxygen species; nitric oxide metabolites

**For citation:** Ryzhova N.I., Deryagina V.P., Ilnitsky A.P. The impact of sodium nitrite on carcinogenesis induced by skin application of benzo(a)pyrene. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(5): 434-440. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-5-434-440>

**For correspondence:** Valentina P. Deryagina, MD, Ph.D., senior researcher of the Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, 115478, Russian Federation. E-mail: [derygina@inbox.ru](mailto:derygina@inbox.ru)

*Conflict of interest.* The authors declare no conflict of interest.

*Acknowledgment.* The study had no sponsorship.

Received: 13/ February 2017

Accepted: 18 October 2017

## Введение

Сочетанное действие нескольких/многих химических (в том числе канцерогенных) соединений является характерной особенностью условий жизни современного человека. В связи с этим уже давно приобрели актуальность исследования по изучению комбинированного действия на организм канцерогенов и модифицирующих их действие факторов среды обитания, особенно если речь идёт о таких широко распространённых в окружающей человека среде соединениях как бенз(а)пирен и нитраты/нитриты. Бенз(а)пирен (БП) отнесён экспертами Международного агентства по изучению рака (МАИР) к первой группе канцерогенных факторов (т. е. канцерогенных для человека) [1], в нашей стране БП включён в СанПиН 1.2.2353-08\*. БП характеризуется значительной устойчивостью в окружающей среде, поступает в организм человека с загрязнённым полициклическими ароматическими углеводородами воздухом, пищевыми продуктами, табачным дымом и т. п. Реально его воздействие (особенно в производственных условиях) на кожу.

Нитраты (НА) и нитриты (НИ) – убиквитарно распространённые соединения, участвующие в круговороте азота в биосфере, а также в метаболических процессах живых организмов. При поступлении в избыточных количествах НА и НИ могут оказывать токсическое, иммуносупрессивное и др. действия на организм [2, 3]. В реакциях со вторичными аминами НИ могут эндогенно образовывать канцерогенные нитрозосоединения, а также восстанавливаться до оксида азота (NO) с последующим его превращением в реакционные окислы азота (NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, ONOO<sup>-</sup>) [2, 4]. Получено экспериментальное подтверждение возможности потенцирующего действия НИ на канцерогенез, индуцированный химическими, физическими и биологическими факторами [5–8].

Эффективность противоопухолевой защиты организма во многом зависит от функционального состояния клеточной системы естественной противоопухолевой резистентности организма: макрофагов, нейтрофилов, НК-клеток и др. Реализация их фагоцитарной и цитотоксической функций связана, в частности, с их способностью образовывать активные формы кислорода (АФК): супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород и оксид азота [9, 10]. В то же время избыточная продукция АФК и активных форм азота (АФА) в живых организмах может приводить к повреждениям ДНК, модифицировать ДНК-репарировочные ферменты, вызывать активацию онкогенных сигнальных путей, что может способствовать инициации и прогрессии опухолей [4, 11, 12]. Опухолевые клетки под влиянием интерлейкина 1β, интерферона-γ, фактора некроза опухоли-α, бактериального липополисахарида, белков теплового шока и др. факторов также способны продуцировать NO. Роль NO в патогенезе опухолей неоднозначна, более сложная, чем считали ранее. NO и его реакционные метаболиты оказывают влияние на регуляцию клеточного цикла, модулируют разные события канцерогенеза, включая апоптоз, ангиогенез, инвазию и метастазирование [12, 13].

Целью настоящего исследования является изучение модифицирующего действия нитрита натрия на химический канцерогенез, индуцированный бенз(а)пиреном, а также некоторых механизмов его реализации в экспериментах на мышах.

\* Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. СанПиН 1.2.2353-08М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2008. 31 с.

## Материал и методы

Исследование проведено на 320 самках мышей-гибридов F1(СВАхС57В1/6, далее F1). В опыте использовали 2-месячных животных разводки питомника «Столбовая» РАМН. Мыши были распределены на 6 групп по 50 животных в каждой, 20 мышей были использованы для определения иммунологических показателей в качестве контроля. Мыши I группы на протяжении всего эксперимента получали еженедельную аппликацию ацетона на кожу (предварительно выстриженную) в межлопаточной области двумя курсами, продолжительностью 12 недель каждый, и нитрит натрия (НН) с водой в концентрации 500 мг/л, (расчёт по молекуле NaNO<sub>2</sub>, т. е. на уровне 100 ПДК нитрита в воде). Мыши II группы получали только еженедельную аппликацию БП в ацетоне в дозе 6 мкг/мышь двумя курсами по 12 недель каждый, суммарная доза БП составила 144 мкг/мышь. Мыши III группы получали аппликацию БП в дозе 6 мкг/мышь в режиме II группы, а также НН с водой в концентрации 50 мг/л (10 ПДК нитрита в воде). Мыши IV группы получали только БП в дозе 9 мкг/мышь, суммарная доза канцерогена – 216 мкг/мышь. Мыши V группы получали БП в дозе 9 мкг/мышь (суммарная доза – 216 мкг/мышь) и НН в концентрации 50 мг/л. Мыши VI группы получали БП в дозе 9 мкг/мышь (суммарная доза – 216 мкг/мышь) и НН с водой в концентрации 500 мг/л. Животные I, III, V и VI групп получали НН до конца эксперимента. Растворы в поилках меняли через 3–4 дня. Продолжительность эксперимента составила 144 недели.

Опухоли кожи и опухоли молочных желёз учитывались при их появлении. Всех павших мышей, а также мышей, предназначенных для определения иммунологических показателей, забивали под эфирным наркозом, вскрывали для диагностирования новообразований. Все изменённые органы и ткани фиксировали в 10%-ном растворе формалина. Гистологическую обработку материала проводили по общепринятой методике [14]. При диагностике опухоли у мышей была использована классификация МАИР [15]. При оценке результатов использовали следующие показатели: количество животных с опухолями, количество всех опухолей (с учётом их морфологической характеристики), коэффициент множественности (количество опухолей на количество животных с опухолями в каждой группе), количество животных на время обнаружения первой опухоли (эффективное число).

В эксперименте использовали бенз(а)пирен (Fluka AG), Нб (Sigma, США), люминол (Merck, Германия), зимозан (Sigma, США) и реактивы отечественного производства классификации «хч» или «чда».

*Функциональную активность нейтрофилов крови (по образованию ими активных форм кислорода) определяли по люминолзависимой хемилуминесценции (ХЛ), регистрируемой прибором «Биолюмат», модель 9500 («Berthold», Германия). Известно, что хемилуминесцентный ответ крови генерируется в основном нейтрофилами и в меньшей степени моноцитами [16, 17]. В качестве активатора фагоцитоза использовали зимозан, опсонизированный сывороткой 10 – 12 здоровых доноров из расчёта 15 мг/мл в анализируемом образце. Количество лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева, лейкоцитарную формулу определяли в окрашенных мазках крови.*

Установлено, что НИ и НА, поступающие в организм экзогенно или образующиеся эндогенно, выводятся из организма преимущественно с мочой [18]. Для сбора мочи 5 мышей из каждой группы помещали в обменные клетки на 24 часа, лишая животных корма, при свободном досту-

## Влияние НН на частоту и множественность опухолей, индуцированных БП у самок мышей-гибридов F1(CBAxС57BL/6)

Группа	Доза веществ	Количество мышей	Эффективное число	Число животных с опухолями		Число опухолей (злокачественные)	Коэффициент множественности
				абс.	% <sup>1</sup>		
I	500 мг/л НН + ацетон	50	43	30	70	38(30)	1,27
II	БП (6 мкг/мышь)	50	50	44	88	58(51)	1,32
III	БП (6 мкг/мышь + 50 мг/л НН)	50	46	35	76	66(54)	1,89*
IV	БП (9 мкг/мышь)	50	45	38	84	50(44)	1,32
V	БП (9 мкг/мышь + 50 мг/л НН)	50	45	31	69	61(50)	1,97**
VI	БП (9 мкг/мышь + 500 мг/л НН)	50	40	31	78	66(52)	2,13**

Примечание. <sup>1</sup> – % рассчитывали по отношению к эффективному числу; \* – различие III группы со II группой статистически значимо ( $p < 0,05$ ); \*\* – различие V и VI групп с IV группой статистически значимо ( $p < 0,05$ ).

пе к бидистиллированной воде. Определение НИ в моче мышей осуществляли методом Грисса; НА предварительно восстанавливали до НИ свежеприготовленным кадмием [19].

Статистическую обработку осуществляли с использованием критериев Стьюдента, Вилкоксона – Манна – Уитни и  $\chi^2$  [20].

## Результаты

Результаты изучения эффекта комбинированного действия БП и НН на самок мышей-гибридов F1 приведены в табл. 1 и 2.

Показано, что количество животных с опухолями во всех группах составляло 69–88%, причём в группах мышей, на которых воздействовала комбинация БП + НН, число животных с опухолями было меньше, чем в группах мышей, получавших один БП, однако общее количество опухолей у животных, получавших комбинацию БП + НН, было на 13,8–32,0% больше, чем у животных, получавших только БП. При этом коэффициент множественности увеличивается лишь при воздействии на животных обоими веществами и не меняется при действии одного БП независимо от дозы (см. табл. 1). При действии БП (6 мкг/мышь) и НН (50 мг/л) показатель множественности увеличился

на 43,2% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с действием одного БП. У мышей, получавших максимальные дозы БП (9 мкг/мышь) и НН (500 мг/л), увеличение коэффициента множественности было ещё более значительным и составило 61,4% ( $p < 0,05$ ). Морфологическая характеристика опухолей приведена в табл. 3.

Установлено, что НН в максимальной концентрации (500 мг/л) усиливает канцерогенный эффект от действия БП (9 мкг/мышь) на кожу на 57,9%. При этом частота опухолей кожи у мышей VI группы превысила в 2,1 раза ( $p < 0,01$ ) аналогичный показатель для мышей V группы, получавших ту же дозу БП, но потреблявших воду с концентрацией НН в 10 раз ниже (50 мг/л) (см. табл. 2). Число злокачественных опухолей кожи в группах мышей, получавших БП или его комбинацию с НН, составляло 60,0–77,8% от общего числа опухолей (см. табл. 3).

Количество животных с гормонозависимыми опухолями (опухоль молочной железы, яичников, матки – все 3 локализации суммарно), среди животных, получавших БП и НН, было достоверно выше (в 2,5–3,5 раза;  $p < 0,01$ ), чем среди животных, получавших только БП (см. табл. 2, табл. 4).

Сравнение латентного периода развития опухолей кожи и молочной железы не выявило статистически значимых различий между группами мышей при воздействии на них БП или его комбинации с НН. Сопоставление средней продолжительности жизни мышей в разных группах выявило отчётливую дозо-зависимую тенденцию к её сокращению у мышей, получавших НН, что может свидетельствовать о его токсическом действии (особенно в больших дозах), характерном для НИ. В частности, продолжительность жизни мышей, получавших комбинацию максимальных доз БП + НН была короче на 13% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с мышами, получавшими один БП (9 мкг/кг). Данные других авторов свидетельствуют о высокой частоте спонтанных опухолей, в том числе гормонозависимых (молочной железы, матки), у мышей-самок F1(CBAxС57BL/6). Так, в работе по онкологической характеристике мышей-гибридов показатель частоты опухолей составил 86,5%, коэффициент множественности – 1,34, частота гемобластозов – 70,0%, опухолей молочной железы – 22,0%, опухолей печени – 19,0%, опухолей лёгких – 7,0% и матки – 2% [21]. Продолжительность жизни мышей в этом исследовании изменялась от 9,5 (41 нед.) до 36 мес. (157 нед.). К сожалению,

Таблица 2

## Количество и локализация опухолей при комбинированном воздействии БП и НН у самок мышей-гибридов F1(CBAxС57BL/6)

Локализация опухолей	Экспериментальные группы					
	I	II	III	IV	V	VI
	Количество животных с опухолями (кол-во / % <sup>1</sup> )					
Кожа	1/2,3	5/10,0	5/10,9	9/20,0	10/22,2*	19/47,5*
Печень	6/13,9	9/18,0	12/26,0	8/17,7	8/17,7	11/27,5
Гормонозависимые органы (яичники, матка, молочная железа)	4/9,2	5/10,0	13/28,1**	4/8,8	14/31,1**	10/25,0***
Лёгкие	1/2,3	3/6,0	4/8,7	3/6,6	2/4,4	4/10,0
Почки	0/0	2/4,0	2/4,3	1/2,3	1/2,2	1/2,5
Гемобластозы	26/60,4	34/68,0	30/65,2	25/55,5	26/57,7	21/52,5
Всего животных с опухолями	30/70,0	44/88,0	35/76,0	38/84,0	31/69,0	31/78,0

Примечание. <sup>1</sup> – % рассчитывали по отношению к эффективному числу. I группа – 500 мг/л НН + ацетон; II группа – БП (6 мкг/мышь); III группа – БП (6 мкг/мышь) + 50 мг/л НН; IV группа – БП (9 мкг/мышь); V группа – БП (9 мкг/мышь) + 50 мг/л НН; VI группа – БП (9 мкг/мышь) + 500 мг/л НН; \* – различие между группами VI и V или VI и IV статистически значимое ( $p < 0,01$ ); \*\* – различие между группами III и II, V и IV статистически значимое ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – различие между группами VI и IV статистически значимое ( $p < 0,01$ ).

## Морфологическая характеристика опухолей у мышей-самок F1(CBAxС57BL/6) при воздействии БП или его комбинации с НН

Опухоли	Группы						Всего опухолей (по гистологическому типу)
	I 500 мг/л НН + + ацетон	II БП (6 мкг/м)	III БП (6 мкг/м) + + НН (50 мг/л)	IV БП (9 мкг/м)	V БП (9 мкг/м) + + НН (50 мг/л)	VI БП (9 мкг/м) + + НН (500 мг/л)	
Доброкачественные опухоли, кол-во:							
Гепатома	5	3	5	2	3	5	23
Аденома лёгких	1	2	2	1	1	2	9
Опухоли кожи (папилома)	1	2	2	2	4	7	18
Опухоли матки (лейомиома)	1	–	3	1	3	–	8
Всего по группам	8	7	12	6	11	14	58
Злокачественные опухоли, кол-во:							
Гепатоцеллюлярный рак	1	4	6	5	5	6	27
Гемангиоэндотелиома печени	–	2	1	1	–	–	4
Гемобласты	26	34	30	25	26	21	162
Рак кожи	0	3	3	7	6	12	31
Опухоли молочной железы (аденокарцинома)	1	2	5	2	5	4	19
Опухоли яичника, (цистоаденома)	2	2	3	1	3	3	14
Опухоли матки (саркома)	–	1	2	–	3	3	9
Другие опухоли (аденокарцинома лёгких, почки)	–	3	4	3	2	3	15
Всего по группам	30	51	54	44	50	52	281
Итого	38	58	66	50	61	66	339

Примечание. (–) – опухоли не обнаружены.

результаты немногочисленных исследований существенно варьируют, что не позволяет корректно сравнить наши данные с результатами «исторического контроля».

Параллельно с изучением модифицирующего действия НН на канцерогенез велось изучение некоторых механизмов, которые могли способствовать реализации потенцирующего эффекта НН. В частности, изучали изменение функциональной активности иммунных клеток крови и эндогенного образования метаболитов NO у мышей, получавших БП или его комбинацию с НН. Изучение клеточного состава крови выявило увеличение общего количества лейкоцитов у мышей, подвергнутых воздействию БП или БП + НН с картиной лейкоцитоза у мышей, получавших максимальную дозу БП по сравнению с интактными мышами. Результаты хемилюминесцентного определения спонтанной активности нейтрофилов крови показали увеличение в 1,5–5,5 раза образования АФК-клетками у мышей при воздействии БП или его комбинации с НН (табл. 5), однако достоверная разница определялась только у мышей III группы (6 мкг/мышь БП + 50 мг/л НН) при сравнении с показателем контрольных мышей. У

животных этой группы регистрировали увеличение в 2,9 раза ( $p < 0,01$ ) фагоцитозозависимой хемилюминесценции (ФЗХ) клеток крови при их стимулировании, тогда как у мышей других опытных групп этот показатель был близким к значению контроля. Сравнение коэффициентов стимуляции фагоцитоза (отношение величины ФЗХ к величине спонтанной хемилюминесценции (СХЛ)) выявило снижение коэффициента на 47,1–53,9% для нейтрофилов крови мышей, экспонированных к БП или БП + НН в сравнении с показателем контрольных животных. Изучение в динамике чувствительности нейтрофилов крови к стимулированию выявило более раннюю реакцию на стимулирование опсонизированным зимозаном клеток крови у мышей III, IV и V групп при сравнении с контролем. Так, максимум хемилюминесценции (ХЛ) крови у мышей контрольной группы регистрировали через 15–20 мин, в то время как этот показатель у мышей других опытных групп регистрировали уже через 10–15 мин с момента внесения в реакционную среду зимозана.

Количественное определение окисленных продуктов NO (НА и НИ) в суточной моче является интегральным

Таблица 4

## Количество гормонозависимых опухолей у самок мышей-гибридов F1(CBAxС57BL/6) при комбинированном действии БП и НН

Группа	Доза веществ	Эффективное число	Кол-во животных с опухолями				Всего, $n(\%)$
			молочной железы		яичников, матки		
			$n$	%	$n$	%	
I	500 мг/л НН + ацетон	43	1	2,3	3	6,9	4(9,2)
II	БП (6 мкг/мышь)	50	2	4,0	3	6,0	5(10)
III	БП (6 мкг/мышь) + 50 мг/л НН	46	5	10,8	8	17,3	13(28,1)*
IV	БП (9 мкг/мышь)	45	2	4,4	2	4,4	4(8,8)
V	БП (9 мкг/мышь) + 50 мг/л НН	45	5	11,1	9	20,0	14(31,1)**
VI	БП (9 мкг/мышь) + 500 мг/л НН	40	4	10,0	6	15,0	10(25)***

Примечание. \* различие со II группой статистически значимое ( $p < 0,01$ ); \*\* различие с IV гр. статистически значимое ( $p < 0,01$ ); \*\*\* различие с IV группой статистически значимое ( $p < 0,01$ ).

**Хемилюминесцентное определение образования активных форм кислорода в крови мышей-гибридов F1(CBAxС57BL/6) при комбинированном действии БП и НН**

Группа	Доза веществ	Количество животных	Суммарная доза/мышь		Хемилюминесценция, импульс/мин, на 10 <sup>3</sup> нейтрофилов, M±SD		Коэффициент стимуляции фагоцитоза
			БП, мкг	НН, г	спонтанная	фагоцитозо-зависимая	
III	БП (6 мкг/мышь) + 50 мг/л НН	6	144	0,154	69,6 ± 12,4**	374,4 ± 51,5**	5,4
IV	БП 9 мкг/мышь	6	216	0	18,4 ± 3,5	85,8 ± 11,8	4,7
V	БП (9 мкг/мышь) + 50 мг/л НН	6	216	0,154	30,9 ± 11,6	146,4 ± 41,1	4,7
VII	Интактные, контроль	6	0	0	12,6 ± 2,5	128,2 ± 10,1	10,2

Примечание. \*\* –  $p < 0,01$  (в сравнении с контролем, по критерию Стьюдента).

показателем, включающим эндогенный биосинтез NO, необходимый для поддержания физиологических и иммунных реакций, а также биосинтез NO опухолевыми клетками. С мочой могут также экскретироваться остаточные, неметаболизированные количества НИ, поступившие в организм мышей с водой. Суточное выделение НА с мочой животных опытных групп (в контрольный срок 98 недель) в 2,8–10,0 раз ( $p < 0,01$ ) превышало аналогичный показатель для интактных мышей (табл. 6). На сроке 110 недель выделение НА достигло максимального значения –  $564,8 \pm 107,3$  мкг/кг м. т. ж. у мышей, получавших БП + НН. НИ были обнаружены в следовых или небольших количествах только в моче мышей, получавших комбинацию БП и НН (III и V группы).

**Обсуждение**

Проведённое исследование является заключительным в серии работ, проводившихся в течение ряда лет в лаборатории профилактики канцерогенных воздействий и профессионального рака (в настоящее время – группа профилактики канцерогенных воздействий) Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина Минздрава России с целью изучения возможного модифицирующего действия нитритов/нитратов на процесс бластомогенеза. В этих исследованиях были использованы 3 экспериментальные модели: химического (индукция опухолей уретаном, 1,2-диметилгидразином), вирусного (вирусиндуцируемый лейкоз) и трансплантационного (перевиваемые опухоли различных штаммов) бластомогенеза [5–8].

Установлено умеренное потенцирующее действие НН на канцерогенез, индуцированный уретаном и 1,2-диметилгидразином [6, 7]. Эффект проявлялся в увеличении частоты возникновения опухолей, в том числе локализаций, специфических для действия этих канцерогенов. На модели вирусного бластомогенеза (использованы экзогенные вирусы: вирус лейкоза Мазуренко и вирус лейкоза Раушера, а также эндогенный вирус Гросса) показано умеренное стимулирующее лейкозогенез действие НН с достоверным увеличением частоты развития лейкозов и сокращения сроков гибели животных [5]. В опытах с перевиваемыми опухолями различного происхождения («Акатол», «Карцинома-755», «РШМ-5» и «Меланома В-16») в первых трёх случаях наблюдали усиление роста опухолей по сравнению с контролем, однако в случае опухолевого штамма «Меланома-16», отличающегося большой агрессивностью, подобный эффект отсутствовал [8]. Таким образом, мы располагаем достаточным материалом, полученным на различных опухолевых моделях и линиях животных, который подтверждает способность НИ потенцировать канцерогенез. При этом дозо-зависимый эффект отмечали далеко не всегда [5]. В некоторых случаях потенцирующее действие зависело от пола животного и было выражено в большей степени у самок, чем у самцов [22].

Данные табл. 1, 2, 4 подтверждают сделанные ранее выводы об умеренном потенцирующем действии НН на канцерогенез, индуцируемый различными бластомогенными факторами [5–8]. Если в случае опухолей кожи ре-

Таблица 6

**Выделение нитратов и нитритов с суточной мочой у мышей F1(CBAxС57BL/6) при воздействии на них БП и НН**

Группа	Доза веществ	Количество животных	Суммарная доза, /мышь		Содержание NO <sub>2</sub> и NO <sub>3</sub> в суточной моче, мкг/кг м. т.	
			БП, мкг	НН, г	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>
I	500 мг/л НН+ ацетон	5 <sup>1</sup>	0	1,37	0	46,5 ± 7,9**
		10 <sup>2</sup>	0	1,54	0	110,3 ± 17,6
II	БП (6 мкг/мышь)	5 <sup>1</sup>	144	0	0	168,8 ± 28,7**
		10 <sup>2</sup>	0	0	0	176,9 ± 26,5
III	БП (6 мкг/мышь) + 50 мг/л НН	5 <sup>1</sup>	144	0,137	0	87,1 ± 13,1**
		10 <sup>2</sup>	0,154	0,02 + 0,03	0	158,4 ± 22,8
IV	БП (9 мкг/мышь)	5 <sup>1</sup>	216	0	0	60,0 ± 12**
		10 <sup>2</sup>	0	0	0	75,6 ± 16,7
V	БП (9 мкг/мышь) + 50 мг/л НН	5 <sup>1</sup>	216	0,137	0	72,1 ± 13,0**
		10 <sup>2</sup>	0,154	0,2 + 0,02	0	222,3 ± 40,0
VI	БП (9 мкг/мышь) + 500 мг/л НН	5 <sup>1</sup>	216	1,37	0	90,0 ± 20,7**
		10 <sup>2</sup>	1,54	0	0	564,8 ± 107,3
VII	Интактные, контроль	5 <sup>1</sup>	0	0	0	16,9 ± 2,5
		10 <sup>2</sup>	0	0	0	следы

Примечание. <sup>1</sup> – результаты получены на 98-й неделе эксперимента; <sup>2</sup> – результаты получены на 110-й неделе эксперимента; \*\* – различие с группой VII (<sup>1</sup>) статистически значимое ( $p < 0,01$  по критерию Стьюдента).

зультат можно считать ожидаемым, то увеличение количества гормонозависимых опухолей в группах животных, получавших кроме БП также НН, может иметь свое объяснение. В ранее проведенном исследовании было показано, что НН прямо или опосредованно может влиять на концентрацию и активность ряда гормонов репродуктивной системы, в частности, фолликулостимулирующего гормона, хорионического гонадотропина, тестостерона и др. у крыс [23]. НН может оказывать генотоксическое действие на клетки млекопитающих. Так, при инкубации клеток лёгких у крыс с НН в культуре отмечали нарушения нормального течения митоза, повреждение хромосом в клетках, появление фокусов многослойного роста с морфологически изменёнными клетками, на основе которых была получена перевиваемая линия опухоли [24].

При сочетанном воздействии НН с ионизирующим излучением существенно повышался уровень индуцированных излучением хромосомных перестроек в половых клетках мышей. [25]. Можно предположить существование ещё нескольких механизмов, определяющих потенцирующее действие нитритов на канцерогенез, так как НИ и НА оказывают неблагоприятное воздействие на многие системы организма [3].

Цитотоксическое действие НИ проявляется в возникновении гемической гипоксии, при которой отмечают нарушение окислительно-восстановительных процессов, обусловленных блокадой окисления и восстановления никотинамиднуклеотидов, являющихся коферментами большого числа дегидрогеназ [26]. Ранее нами были получены данные, которые подтверждают способность НИ индуцировать образование соединений со свойствами радикалов [27]. Исследование механизма взаимодействия НИ с гемоглобином выявило образование промежуточных радикальных продуктов реакции: супероксидного анион-радикала, нитрозильного- и феррил-радикала. Возможно также образование NO при восстановлении НИ с помощью гемсодержащих белков (дезоксигемоглобина, миоглобина в дезоксиформе, цитохромоксидазы, цитохрома P-450) [28, 29]. Радикальные соединения, а также высоко-реакционные окислы азота могут повреждать ДНК, а также проявлять выраженные нитрозирующие свойства, что может повышать частоту мутаций ДНК и/или вызывать биохимическую модификацию многочисленных белков, способствуя прогрессии опухоли [12, 13]. Следует дополнить, что НИ могут оказывать супрессорное действие на фагоцитарную активность иммунных клеток – нейтрофилов и макрофагов [17].

В настоящей работе у животных, которым вводили БП или его комбинацию с НН, зарегистрировано увеличение спонтанного образования нейтрофилами крови АФК, способных также инициировать свободнорадикальные процессы. Однако фагоцитарная функция нейтрофилов крови у этих мышей, по-видимому, была нарушена, о чём свидетельствует снижение абсолютного значения расчётного коэффициента стимуляции фагоцитоза.

Наряду с этим зарегистрирована стимуляция образования окисленных продуктов оксида азота – НА и НИ в организме мышей с опухолями. Эффект повышенного образования NO и его метаболитов у мышей с опухолями исследователи преимущественно объясняют активацией фермента, участвующего в образовании оксида азота – индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в иммунных клетках, а также в опухолевых клетках в ответ на действие провоспалительных цитокинов и др. факторов [8, 12, 13]. В зависимости от концентрации, длительности воздействия и природы секретирующих радикал клеток NO проявляет

про- или антиопухолевое действие [4, 12]. Так, NO, продуцируемый макрофагами и нейтрофилами, оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки, но если же образуется в опухолевых клетках, то может выступать в роли медиатора роста опухолей. Имеются доказательства об участии NO в образовании новых сосудов в опухоли и близлежащих тканях, дезагрегирующем действии NO на клетки опухоли и метастазировании [30]. Наряду с этим в ряде работ выявлен терапевтический потенциал доноров NO, способных повышать эффективность радио- и химиотерапии [31].

## Заключение

НН, поступавший в организм мышей с водой, в концентрациях, соответствующих 10 и 100 ПДК нитрита в воде, оказывал умеренное потенцирующее действие на канцерогенез, индуцированный накожным нанесением БП. Во всех группах животных, получавших комбинацию БП + НН, частота и коэффициент множественности гормонозависимых опухолей (молочная железа, яичники и матка суммарно) были статистически значимо выше, чем в группах, получавших один БП. Количество опухолей кожи было значимо выше в группе животных, получавших максимальные дозы БП и НН (100 ПДК). Увеличение образования АФК, метаболитов оксида азота, а также угнетение фагоцитарной функции нейтрофилов крови могут вносить свой вклад в потенцирование канцерогенеза под воздействием НН.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.  
**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература

(пп. 1, 2, 4–6, 12, 13, 15, 18, 19, 30, 31 см. References)

- Опополь М.И., Добрянская Е.В. Нитраты. Кишнев: ШТИНЦа; 1986: 113.
- Ильницкий А.П., Рыжова Н.И., Чудина А.П., Невзорова Н.И., Некрасова Е.А. Потенцирующее действие нитрита натрия на развитие спонтанных и индуцированных 1,2-диметилгидразинном опухолей у мышей-самцов F1(C57BlxСВА). Вопросы онкологии. 2004; 50 (6): 683-8.
- Ильницкий А.П., Андрианов А.П., Колпакова А.С., Князев Д.К., Щербак Н.П. Нитрит натрия как модификатор blastomogenesis. *Вестник ОНЦ РАМН*. 1993; Приложение 1: 13-18.
- Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. Киев: Наукова думка; 2005: 791.
- Поцелуева М.М., Пустовидко А.В., Ковалева Е.В., Шаталин Ю.В., Евтодченко Ю.В. Цитотоксическое действие полиморфноядерных лейкоцитов на опухолевые и нормальные клетки *in vitro* и *in vivo*. *Цитология*. 2005; 47 (1): 57-63.
- Беда Н.В., Недоспасов А.А. NO-зависимые модификации нуклеиновых кислот. *Биоорганическая химия*. 2007; 33 (2): 195-228.
- Меркулов Г.А. Курс патологической техники. Москва: Медицина; 1969: 422.
- Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО; 1995: 219.
- Дерягина В.П., Машковцев Ю.В., Ильницкий А.П. Экспериментальное изучение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов в условиях воздействия нитрита натрия. *Биомедицинская химия*. 2003; 49 (1): 19-26.
- Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Москва: Медицина; 1978: 288.
- Краснова Т.А., Клепиков Н.Н., Харьковская Н.А., Шевякова Л.Я., Хрусталева С.А. Онкологическая и генетическая характеристика мышей гибридов первого поколения (СВАxС57BL/6)F1. *Вестник Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина*. 2005; 1-2: 3-6.

22. Юрченко В.А., Линник А.Б., Ильницкий А.П. Канцерогенная опасность малых доз нитрита в связи с эндогенным синтезом нитрозосоединений. Экспериментальная онкология. 1986; 1: 41-3.
23. Савицкий И.В. Патфизиологические механизмы участия оксида азота в формировании экзависимой патологии репродуктивной системы. Дисс. докт. мед. наук. Москва; 2003.
24. Осиньковская Н.Д. Оценка повреждающего и трансформирующего действия нитрита натрия на клетки легких в культуре. Экспериментальная онкология. 1987; 9 (6): 37-9.
25. Сушко С.Н., Маленченко А.Ф. Индуцирование хромосомных аббераций в сперматоцитах мышей. Радиобиология. 1992; 32 (4): 500-5.
26. Митченков В.Т. Токсиколого-гигиеническая оценка нитратно-нитритной нагрузки на организм человека и методические основы ее профилактики: Дисс. докт. мед. наук. Москва; 1992: 245.
27. Дерягина В.П. Образование свободнорадикальных соединений при действии нитрита натрия на организм животных и в условиях in vitro. Токсикологический вестник. 2003; 6: 20-5.
28. Степура И.И., Чайковская Н.А., Солодунов А.А., Арцукевич А.Н. Образование NO в процессе окисления феррохром гемоглобина нитритом. Биохимия. 1997; 62 (9): 1122-9.
29. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М: Наука; 1997:156.
11. Beda N.V., Nedospasov A. A. NO dependent modifications of nucleic acids. *Bioorganicheskaya himiya*. 2007; 33 (2): 195-228 (in Russian).
12. Muntane J. and De la Mata M. Nitric oxide and cancer. *World J. Hepatol*. 2010; 2(9): 337-44.
13. Choudhari Sh.K., Chaudhary M., Bagde S., Gadbaile A.R. and Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J. Oncol*. 2013; 11: 118.
14. Merkulov G.A. Course pathological techniques. Moskva: Medicina; 1969. (in Russian).
15. Turusov V.S. Pathology of tumors in laboratory animal. Tumors in the mouse. In IARC. Lyon; 1979: 655.
16. Haitov R. M., Pinegin B. V., Istamov H.I. Ecological immunology. M.: VNIRO; 1995. (In Russian).
17. Deryagina V. P., Mashkovtsev YU.V., Ilnitsky A. P. Experimental study of functional activity neutrophiles and macrophages followed effect produced by sodium nitrite. *Biomedicinskaya himiya*. 2003; 49 (1): 19-26. (In Russian).
18. Cortas N.K., Wakid N.W. Pharmacokinetic aspects of inorganic nitrate ingestion in man. *Pharmacol Toxicol*. 1991; 68 (3): 192-5.
19. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assay based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatog*. 2007; 851: 51-70.
20. Gubler E.V. Computing methods of the analysis and recognition of pathological processes. Moskva: Medicina; 1978. (in Russian)
21. Krasnova T.A., Klepikov N.N., Kharkovskaya N.A., Schevyakova L.Ya, Khrustalev S.A. Oncological and genetic characterization of first generation hybrid mice (CBAx57BL/6)F1. *Vestnik rossijskogo onkologicheskogo centra imeni N.N. Blohina*. 2005; 1-2: 3-6. (in Russian)
22. Yurchenko V.A., Linnik A.B., Ilnitsky A.P. Carcinogenic risk of low doses of nitrite due to the endogenous synthesis of nitroso compounds. *Ekspierimentalnaya onkologiya*. 1986; 1: 41-3. (in Russian)
23. Savitskiy I.V. The pathophysiological mechanisms of participation of nitric oxide in the formation ekzavisimoy pathology of the reproductive system: diss. Moscow; 2003 (in Russian).
24. Osinkovskaya N.D. Evaluation of the damaging and transforming action of sodium nitrite on lung cells in culture. *Ekspierimentalnaya onkologiya*. 1987; 9 (6): 37-9. (n Russian).
25. Sushko S.N., Malenchenko A.F. Induction of chromosomal aberrations in spermatocytes of mice. *Radiobiology*. 1992; 32 (4): 500-5. (in Russian)
26. Mitchenkov V.T. Toxicological and hygienic evaluation of nitrate-nitrite loads on the human body and methodical bases its prevention: diss. Moscow; 1992. (in Russian).
27. Deryagina V.P. Formation of free radical compounds under the influence of the sodium nitrite on animals' organism and in vitro conditions. *Toksikologicheskii vestnik*. 2003; (6): 20-5. (in Russian).
28. Stepuro I. I., Chaykovskaya N. A., Solodunov A. A., Artsukevich A. N. NO formation in the process of nitrite oxidation of hemoglobin ferroforms. *Biohimiya*. 1997; 62 (9): 1122-9. (in Russian).
29. Reutov V.P., Sorokina E. G., Okhotin V. E., Kositsin N. S. Cyclic nitrogen oxide transformations in the organism of mammals. Moskva: Nauka; 1997. (in Russian).
30. Cheng H., Wang L., Mollica M., Re A.T., Wu Sh. and Zuo L. Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Lett*. 2014; 353 (1): 1-7.
31. Bonavida B. Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics. *Redox biology*. 2015; 6: 486-94.

## References