

Ингибирование мутагенной активации орто-аминоазотолуола повышает его канцерогенность для печени мышей

В.И. Каледин¹, Л.П. Овчинникова¹, С.И. Ильницкая¹, Т.С. Морозкова², Н.А. Попова^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт молекулярной патологии и патоморфологии», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

В злокачественных опухолях человека и животных часто обнаруживаются мутантные варианты генов, контролирующих размножение и рост клеток. В то же время многие канцерогены проявляют положительную активность в различных тестах на мутагенность. Это свидетельствует в пользу представлений о генотоксическом механизме канцерогенеза. Считается, что если химически активные канцерогены вызывают мутации при непосредственном взаимодействии с ДНК, то химически неактивные активируются до мутагенных продуктов в процессе метаболических превращений в организме. Было установлено, что аминоазокрасители активируются путем N-гидроксилирования и последующей конъюгации с остатком серной кислоты, катализируемой печеночной сульфотрансферазой, ферментом второй фазы метаболизма ксенобиотиков. Ранее мы показали, что именно активированные метаболиты орто-аминоазотолуола ответственны за ингибирование глюкокортикоидной индукции тирозинаминотрансферазы у чувствительных к его гепатоканцерогенному действию мышей. Подавление с помощью ингибитора сульфотрансферазы пентахлорфенола сульфатирования 4-аминоазобензола, другого канцерогенного для мышей азокрасителя, приводило, по литературным данным, к снижению его как мутагенной, так и канцерогенной активности. Мы подтвердили это наблюдение. Однако при использовании с орто-аминоазотолуолом пентахлорфенол так же, как в случае с 4-аминоазобензолом, подавлял его мутагенное действие, но значительно усиливал канцерогенное. Следовательно, канцерогенное действие на печень оказывает неметаболизированный орто-аминоазотолуол или его нессульфатированные немутагенные метаболиты. О негенотоксическом механизме действия канцерогенов говорят и наши результаты параллельных опытов с орто-аминоазотолуолом и 3,4-бензпиреном, которые, одинаково активируясь ферментами печени мышей в мутагенном отношении, вызывают опухоли в разных тканях: первый – гепатоцеллюлярные в печени, а второй – лимфоидные в селезенке. Таким образом, принятые представления о генотоксическом механизме действия канцерогенов требуют пересмотра.

Ключевые слова: орто-аминоазотолуол; сульфоконъюгация; мутагенная активация; канцерогенность.

Inhibition of mutagenic activation of ortho-aminoazotoluene increases its carcinogenicity for mouse liver

V.I. Kaledin¹, L.P. Ovchinnikova¹, S.I. Il'nitskaya¹, T.S. Morozkova², N.A. Popova^{1,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Various mutationally impaired genes are often found in malignant tumors of animals and humans. At the same time, a large number of carcinogens demonstrate positive activity in different *in vitro* tests for mutagenicity. These findings are indicative of a genotoxic mechanism of carcinogen action. It is considered that chemically active carcinogens induce mutations (and tumors) directly interacting with DNA, while inactive substances are mutagenically activated in the processes of cellular metabolism in target tissues. The aminoazo dyes were found to be activated by N-hydroxylation and subsequent conjugation with sulfuric acid catalyzed by the enzyme sulfotransferase. Previously we found that it is activated metabolites of ortho-aminoazotoluene that are responsible for its inhibitory effect on hormonal induction of tyrosinaminotransferase activity in the liver of sensitive mice. Inhibition of sulfoconjugation of 4-aminoazobenzene, another hepatocarcinogen for mice, by pentachlorophenol was reported to reduce its both mutagenic and carcinogenic activity. In this paper, we confirmed this observation. But we found that, when used ortho-aminoazotoluene, pentachlorophenol inhibited its mutagenic activity, but significantly stimulated the hepatocarcinogenic potency. It seems that carcinogenic action is provoked by unmetabolized ortho-aminoazotoluene per se or some of its non-sulfated derivatives. The results of our comparative study with ortho-aminoazotoluene and 3,4-benzopyrene are in contradiction with the genotoxic theory

of carcinogenesis: both are similarly activated by mouse liver enzymes, but induce tumors in different tissues: the former, hepatocellular carcinomas and the latter, splenic lymphoma. The conclusion was made that the accepted notion about the mechanism of carcinogenesis has to be revised.

Key words: ortho-aminoazotoluene; sulfoconjugation; mutagenic activation; carcinogenicity.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Каледин В.И., Овчинникова Л.П., Ильницкая С.И., Морозкова Т.С., Попова Н.А. Ингибирование мутагенной активации орто-аминоазотолуола повышает его канцерогенность для печени мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):708-715. DOI 10.18699/VJ16.190

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kaledin V.I., Ovchinnikova L.P., Il'nitskaya S.I., Morozkova T.S., Popova N.A. Inhibition of mutagenic activation of ortho-aminoazotoluene increases its carcinogenicity for mouse liver. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):708-715. DOI 10.18699/VJ16.190

С помощью современных методов исследования в злокачественных опухолях человека и животных обнаруживаются мутантные варианты генов, контролирующих основные процессы жизнедеятельности клетки (размножение, рост, дифференцировку). Именно с накоплением таких мутаций обычно связывают возникновение и прогрессию опухолей. По мнению одних авторов, для развития опухоли необходимо накопление в клетке от трех до шести генетических повреждений (Абилев и др., 2012), по другим данным – до 10 (Зборовская, 2004). Поэтому считается, что «если вещество индуцирует опухоль, оно, следовательно, реагирует с ДНК, вызывая специфическую мутацию; если же оно не вызывает мутации, то не должно быть канцерогеном» (Турусов и др., 2004. С. 212). Если химически активные соединения (азотистый иприт, нитрозомочевина и др.) способны вызывать мутации при непосредственном взаимодействии с ДНК, то неактивные в химическом отношении полициклические углеводороды, аминозокрасители и т. п. приобретают такую способность после их метаболической активации в тканях-мишенях.

Для аминозокрасителей было установлено, что исходные соединения подвергаются в печени крыс С- и N-гидроксилированию, катализируемому NADPH-зависимой системой митохондриальных монооксигеназ, и последующей конъюгации в реакциях второй фазы метаболизма ксенобиотиков. При этом если конъюгаты С-гидроксилированных производных неактивны в канцерогенном отношении и выводятся из организма, то при сульфоконъюгации N-гидроксипроизводных образуются высокореакционноспособные электрофильные соединения, способные атаковать нуклеофильные центры клеточных макромолекул, в том числе ДНК, и вызывать мутации (Миллер Дж., Миллер Э., 1955; Miller, 1970; Miller J.A., Miller E.C., 1969; Miller E.C., Miller J.A., 1981). Эти данные были с энтузиазмом встречены биохимиками и молекулярными биологами, увидевшими в них экспериментальное доказательство тогда еще умозрительных, но уже чрезвычайно популярных представлений о генотоксическом механизме действия канцерогенов. Поэтому как само собой разумеющееся было воспринято сообщение о том, что ингибирование пентахлорфенолом (ПХФ) сульфоконъюгации, последнего этапа метаболической активации 4-аминоазобензола (АБ), подавляет связывание его с ДНК

и снижает частоту индукции опухолей печени (Delclos et al., 1984, 1986). В опытах с 2-ацетиламинофлуореном (2-ААФ) также было обнаружено, что непосредственно активным канцерогеном для печени крыс является мутагенный сернокислый эфир его N-гидроксипроизводного (Weisburger et al., 1972). Это же было показано для эстрагола и сафрала (Fennel et al., 1985).

С другой стороны, в литературе были многочисленные наблюдения, свидетельствующие о наличии определенного параллелизма между ингибирующим влиянием гепатоканцерогенов на глюкокортикоидную индукцию активности адаптивных ферментов печени и способностью индуцировать опухоли печени у этих животных (Каледин, Захарова, 1984; Каледин и др., 2015). Обнаружив в специальных экспериментах, что глюкокортикоидная индукция тирозинаминотрансферазы у мышей ингибируется не исходным орто-аминоазотолуолом, а продуктами его метаболизма, мы должны были признать, что и канцерогенное действие этого соединения реализуется через его активированные метаболиты (Каледин и др., 1997). Не усомнились в этом мы и тогда, анализируя литературные данные, обратили внимание на то, что Е. и Дж. Миллеры с коллегами (Delclos et al., 1984, 1986) на подсосных мышках использовали исключительно АБ и его моно- и диметильные производные, применяющиеся обычно в опытах на крысах, и не использовали 2'-3-диметил-АБ (по старой номенклатуре орто-аминоазотолуол, ОАТ), для которого к тому времени были известны высокие специфичность в отношении канцерогенного действия на печень мышей и мутагенность продуктов его активации ферментами печени в бактериальных тестах *in vitro* (Ames et al., 1973).

Расценивая это как некоторое упущение, мы изучили в тех же условиях – на подсосных мышках с использованием ПХФ – влияние ингибирования сульфоконъюгации на канцерогенное действие и ОАТ. Неожиданные результаты, полученные в этих опытах, потребовали сопоставления их с результатами американских исследователей. Мы повторили эксперименты, взяв для сравнения используемый ими АБ. В настоящей работе показано, что если данные об ингибирующем влиянии ПХФ на канцерогенность АБ (Delclos et al., 1986) хорошо воспроизводятся, то в случае с ОАТ ПХФ оказывает противоположное влияние, а именно усиливает его канцерогенное действие на печень. В бактериальном тесте Эймса на мутагенность в

присутствии клеточных ферментов (S9-фракции) печени мышей как АБ, так и ОАТ вызывали образование мутантных колоний, а при наличии в активационной среде ПХФ их образовывалось значительно меньше. Стимуляция же *in vivo* активности ферментов, метаболизирующих аминоазокрасители, приводила к снижению у мышей выхода индуцированных ОАТ опухолей печени. Полученные результаты показывают, что для индукции опухолей печени у мышей ОАТ не нуждается в метаболической активации и, следовательно, канцерогенное действие химических соединений может осуществляться не через их мутагенные метаболиты.

Материалы и методы

В работе использованы АБ и ОАТ (ICN, США), 3,4-бензпирен (FERAK, ФРГ) ароклор 1254 (SUPELCO, США), фенобарбитал (FLUKA, Швейцария). Калий железосинеродистый и железо (II) сернокислое 7-водное получены из ЗАО «Союзхимпром». Все отечественные препараты и реактивы были квалификации «хч» и «чда». Животные – мыши линий ICR и СВА/LacSto (СВА), а также гибриды первого поколения между мышами СВА и С57BL/6 – получены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН.

Мышей содержали группами по шесть–восемь особей в пластиковых ванночках площадью 20 × 36 см при контролируемой температуре и освещении, они получали гранулированный полнорационный корм «Чара» и воду *ad libitum*. Все манипуляции с ними проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European communities council directive (86/609 ЕЕС). Для получения подсосных мышат родительских животных содержали группами по три самки и одному самцу в клетке. Родившимся мышатам-самцам в 12–13-дневном возрасте вводили в брюшную полость масляные растворы АБ или ОАТ в объеме 0,01 мл на 1 г массы тела животных; при этом доза АБ составляла 50 мг/кг, а ОАТ – 225 мг/кг. В опытах с использованием пентахлорфенола его вводили в масляном растворе по 0,1 мл на 10 г массы тела мышат, что составляло примерно 14 мкг ПХФ на 1 г массы тела. В экспериментах с индукцией ферментов метаболизма ксенобиотиков мышатам в 10-дневном возрасте в брюшную полость ввели по 60 нг (10 мкг/кг) 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-пара-диоксина (ТХДД), любезно предоставленного нам доктором В.В. Литваком (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). Контрольным мышатам аналогично вводили растворитель (оливковое масло). Во всех случаях животные хорошо переносили инъекции, без каких-либо признаков токсического влияния. Через трое суток (в 13-дневном возрасте) всем животным ввели ОАТ, как описано выше. В месячном возрасте мышат отсаживали от родителей и до окончания эксперимента содержали группами по шесть–восемь особей в клетке в стандартных условиях при свободном доступе к воде и пище. В возрасте 10–12 мес им в течение четырех–пяти дней давали корм, содержащий 3 % сернокислого железа, после чего умерщвляли декапитацией, определяли абсолютную и относительную массу печени и после окрашивания по Перлсу (Williams et al., 1976; Kaledin et al., 2014b) под бинокулярной лупой определяли в ней количество и раз-

мер железodefицитных предопухолевых и опухолевых узелков. При этом учитывали как общее число узелков, так и количество условно предопухолевых и опухолевых узелков, считая предопухолевыми узелки диаметром до 1,5 мм и опухолевыми – от 2 мм и более, как это принято в подобных исследованиях (Каледин и др., 2005; Kaledin et al., 2014b). После подсчета узелков типичные образцы фиксировали в 10 % формалине, готовили гистологические срезы и исследовали под микроскопом.

Оценку мутагенной активности изучаемых соединений проводили в тесте Эймса на одном из тестерных гистидин-зависимых штаммов *Salmonella typhimurium* TA98, как описано ранее (Овчинникова и др., 2012; Frolova et al., 2015), с использованием для активации ферментов S-9 фракции печени мышей, интактных или индуцированных ароклором 1254 (250 мг/кг), фенобарбиталом (трижды по 80 мг/кг ежедневно) или ТХДД (10 мкг/кг однократно). Индукторы вводили в брюшную полость животных, через три–пять дней их умерщвляли декапитацией, печень перфузировали холодным 1,15 М КСl, 20 mM трис-НСl буфером, рН 7,4 и гомогенизировали в трех объемах этого буфера. Гомогенаты центрифугировали при 9000 g в течение 15 мин, супернатанты (S-9-фракцию) хранили в стерильных ампулах до использования при –70 °С. S-9-фракцию печени интактных мышей получали аналогично. Бактериальные клетки хранили в жидком азоте как замороженную культуру с добавлением 10 % диметилсульфоксида. Для экспериментов стоки бактерий высевали на чашки с глюкозным агаром, гистидином и ампициллином (так называемые «мастер»-чашки). Для постановки теста отдельную колонию с «мастер»-чашки инокулировали в 5 мл L-бульона с 50 мкг/мл ампициллина и инкубировали при 37 °С в течение 15–16 ч. Концентрация бактерий ночной культуры штамма TA 98 составляет примерно 1–2 × 10⁸ клеток/мл. В тест-системе Эймса применяли метод двуслойного агара. Нижний слой состоял из 1,5 % агара на минимальной среде M9, содержащей 20 % глюкозы и 50 мг/мл ампициллина. Для верхнего слоя готовили 100 мл 0,7 % топ-агара в физиологическом растворе NaCl, в который добавляли 10 мл 0,5 mM раствора гистидин-биотина. Его разливали в пробирки по 2 мл, охлаждали до 45 °С и оставляли при этой температуре в водяной бане. При проведении тест-анализа в пробирки добавляли по 100 мкл ночной культуры бактерий и анализируемый мутаген (в контроле – растворитель) в подобранной ранее концентрации (10–20 мкг на чашку). Если тест-анализ проводили с метаболической активацией, то добавляли еще 0,5 мл активационной среды, содержащей К-фосфатный буфер (рН 7,4), MgCl₂, NADP, глюкозо-6-фосфат и S9-фракцию из печени интактных или индуцированных животных. Смесь быстро перемешивали и выливали на подготовленные чашки (по шесть чашек на точку), равномерно распределяя ее по поверхности нижнего слоя агара. Через 48 ч инкубации при 37 °С в верхнем слое агара в виде мелкой сеточки были видны колонии бактерий-ауксотрофов, выросшие на фоновой концентрации гистидина, а на их фоне – проросшие в нижний слой агара отдельные His⁺-колонии ревертантов по гистидиновому локусу. В качестве контроля использовали клетки бактерий TA98: а) не подвергшиеся

мутагенному воздействию (частота колоний составляла 30–50 на чашку) и б) подвергшиеся действию прямого мутагена 4-нитрохинолин-N-оксида, который в концентрации 0,25 мкг/мл давал 150–176 ревертантных колоний.

Полученные результаты обрабатывали статистически и достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента и *arcsin*-преобразования Фишера.

Результаты и обсуждение

Ингибирующее влияние ПХФ на гепатоканцерогенное действие АБ показано сотрудниками лаборатории Е. и Дж. Миллеров в нескольких сериях экспериментов на мышах линии CD-1 и гибридах первого поколения между мышами C3H/He и C57BL/6 (C3BF1) (Delclos et al., 1984, 1986). Мы подтвердили это наблюдение на мышах линии СВА (Каледин, Ильницкая, 2011). Влияние ПХФ на канцерогенное действие ОАТ было изучено только нами и также на мышах линии СВА (Каледин, Ильницкая, 2011). Поэтому для того чтобы выяснить, не обусловлен ли обнаруженный эффект собственной канцерогенностью ПХФ для мышей этой линии, т. е. не является ли он линейно-специфическим, мы провели серию специальных экспериментов на мышах разных генотипов, результаты которых суммированы в табл. 1. Из приведенных данных видно, что, не увеличивая частоту и множественность опухолей печени по сравнению со значениями этих показателей у интактных мышей данной линии (СВА), ПХФ на 1/4 снижал число опухолей, индуцированных у них АБ, и в 4–5 раз увеличивал число опухолей, индуцированных ОАТ; в 2,6–4,3 раза ПХФ увеличивал число индуцированных ОАТ опухолевых узелков в печени мышей других линий (табл. 2).

О том, что подавление ПХФ канцерогенного действия АБ реализуется через влияние на метаболизм этих соединений, свидетельствует отсутствие его влияния на канцерогенность диэтилнитрозамина, в метаболизме которого ПХФ не принимает участия (Miller et al., 1983). Чтобы удостовериться в том, что и усиление им канцерогенности ОАТ связано с ингибированием метаболической активации последнего, в следующих экспериментах мы использовали противоположное воздействие, а именно стимулировали активацию канцерогена. Применяющиеся обычно при работе на взрослых животных индукторы микросомальных монооксигеназ (Ароклор 1254, 20-метилхолантрен, 3,4-бензпирен) мало подходили для использования на подсосных мышах, поэтому мы воспользовались более активным ТХДД, который вводили мышатам в микродозе (10 мкг/кг) однократно за трое суток до воздействия ОАТ. Как показано в табл. 3, по окончании эксперимента через год оказалось, что ТХДД не вызвал образования опухолей печени ни у одной мыши, а в сочетании с ОАТ ослабил канцерогенный эффект последнего в 3,9 раза.

В следующих экспериментах с использованием теста Эймса мы сопоставили влияние ингибирования с помощью ПХФ сульфоконъюгации ОАТ и АБ на их мутагенную активацию печеночными ферментами мышей. Результаты представлены в табл. 4. Как и в ранних опытах Эймса, использовавшего индуцированные фенобарбиталом ферменты печени крыс (Ames et al., 1973), индуциро-

ванные ТХДД ферменты печени мышат активировали ОАТ вдвое более эффективно по сравнению с АБ, в то же время ПХФ в обоих случаях снижал число мутантных колоний примерно в одинаковой степени: на 33 % для АБ и на 43 % для ОАТ. В то же время *in vivo*, как было показано в табл. 1, на канцерогенный эффект АБ и ОАТ ПХФ влиял противоположным образом: уменьшал его в первом случае и увеличивал во втором. Таким образом, стимуляция метаболизма ОАТ у мышей *in vivo* уменьшает, а ингибирование (хотя бы на уровне сульфатирования) увеличивает выход индуцированных им опухолей, из чего следует, что непосредственно активным канцерогеном для печени является сам ОАТ (который в этих случаях, по-видимому, более или, соответственно, менее быстро выводится), а не его активированные метаболиты. Можно допустить, что при стимуляции активности монооксигеназ С-гидроксилирование ОАТ, и так резко преобладающее над N-гидроксилированием (Miller, 1970), еще более возрастает, в результате чего относительно большее его количество выводится в составе неактивных конъюгатов с глутатионом и глюкуроновой кислотой при общем уменьшении выхода активированных продуктов сульфоконъюгации. В таком случае подавление активности сульфотрансферазы должно было бы не увеличивать, а уменьшать выход опухолей. Следовательно, опухоли печени индуцируют не мутагенные серные эфиры ОАТ, а либо неметаболизированный ОАТ, либо несulfатированные метаболиты. (Не исключено, что у ОАТ существует особый, отличный от других аминоазокрасителей, путь канцерогенной активации, которая, однако, не сводится к активации мутагенной.)

В табл. 5 представлены результаты сравнительного изучения мутагенных потенциалов ОАТ и известного непеченочного канцерогена 3,4-бензпирена в условиях активации их *in vitro* нативными и преиндуцированными ферментами печени мышей. Результаты были получены в тесте Эймса на бактериях *S. typhimurium* (см. раздел «Материалы и методы»). В отсутствие активирующих ферментов ОАТ так же, как и БП, не увеличивает число мутаций в контролируемом нами локусе бактерий, т. е. в исходном виде не вызывает мутаций типа «сдвиг рамки». В присутствии же S9-фракции из печени мышей, предобработанных индукторами микросомальных монооксигеназ (фенобарбиталом, ароклором 1254, ТХДД), оба эти соединения оказываются в равной степени мутагенными, увеличивающими число ревертантных колоний в 4,4–5,1 раза по сравнению с контролем. Что касается активации БП и ОАТ ферментами печени непредобработанных индукторами животных (подсосных и взрослых мышей), то она также имеет место, хотя и на значительно более низком уровне. В этом отношении никаких существенных различий между активацией ОАТ ферментами печени мышей, различающихся по чувствительности к его канцерогенному действию в зависимости от генотипа (СВА, ICR, C57BL) и возраста (подсосные, взрослые), нами не обнаружено.

В то же время при хроническом введении в организм взрослых мышей всех этих линий ОАТ вызывает развитие множественных опухолей печени у 100 % животных и вообще не вызывает лимфом (Каледин и др., 1990,

Table 1. Effect of pentachlorophenol (PCP) on the hepatocarcinogenic action of 4-aminoazobenzene (AB) and ortho-aminoazotoluene (OAT) in suckling CBA mice

Groups and treatment	Number of mice		Number of nodules	
	Total	With tumor nodules in the liver, %	Total	> 2 mm in diameter
1. AB	28	26 (92.9)	15.5 ± 2.3	6.2 ± 1.2
2. PCP + AB	20	17 (85.0)	11.4 ± 2.1	5.5 ± 1.2
Effect of PCP		-8.5 %	-26.5 %	-11.3 %
3. OAT	12	12 (100)	9.4 ± 1.9	2.9 ± 0.7
4. PCP + OAT	16	16 (100)	53 ± 9.1***	19 ± 5.0**
Effect of PCP		0	+463.8 %	+555.2 %
5. PCP	21	3 (14.3)	0.2 ± 0.2	-

Note: The life span of mice having received PCP alone was 403 ± 4.4 days. Asterisks designate significant differences (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) from group 3.

Table 2. Effect of pentachlorophenol (PCP) on the hepatocarcinogenic action of ortho-aminoazotoluene (OAT) in suckling ICR and (C57BL × CBA)_F₁ mice

Index	OAT (Group 1)	PCP + OAT (Group 2)
	ICR mice	
Number of mice	29	15
Of them with liver tumor nodules	28 (96.6 %)	15 (100 %)
Life span, days	254 ± 4.3	271 ± 4.6
Mean number of nodules in the liver	3.6 ± 0.59	9.5 ± 1.90**
	(C57BL × CBA) _F ₁ mice	
Number of mice	11	9
Of them with liver tumor nodules	9 (81.8 %)	9 (100 %)
Life span, days	300 ± 7.1	286 ± 0.8
Mean number of nodules in the liver	2.7 ± 0.8	11.8 ± 2.2***

Asterisks designate significant differences (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) from group 1.

2002a, б), тогда как БП при аналогичном введении мышам вызывает в основном лимфоидные опухоли и опухоли легких, но не печени (de Vries et al., 1997). Таким образом, наличие мутагенных производных БП в печени, где они образуются, не приводит к развитию опухолей печени, так же, как поступление из печени мутагенных метаболитов ОАТ в селезенку не приводит к образованию в ней лимфом.

Обнаружение мутагенной активности у канцерогена традиционно считается доказательством того, что он вызывает развитие опухолей посредством мутаций. Между тем в действительности его канцерогенная и мутагенная активность могут просто совпадать, так же, как в других случаях они проявляются по отдельности (Zeiger, 2001). Классическим примером генотоксического канцерогена считается диэтилнитрозамин (Турусов и др., 2004). Однако, контролируя условия его метаболизма в печени мышей, мы показали обратную зависимость между его канцерогенной и мутагенной активностью, т. е. их несо-

впадение (Kaledin et al., 2015). В качестве другого примера можно привести неканцерогенность для печени мышей однократного облучения их в подсосном периоде заведомо мутагенной дозой (4 Гр) гамма-излучения (Каледин и др., 2002a).

Канцерогенов же, не проявляющих мутагенной активности ни в одном из известных тестов, в настоящее время так много, что их пришлось выделить в особую группу «эпигенетических канцерогенов» (Турусов и др., 2004). Но признание наличия таких канцерогенов, по существу, означает признание неуниверсальности генотоксического механизма канцерогенеза. Более того, в этом случае нельзя исключить, что канцерогенез вообще развивается на эпигенетической основе и генотоксичность канцерогенов является лишь их побочным свойством. Этому, казалось бы, противоречат тысячи публикаций с сообщениями о полиморфизме в опухолях сотен генов, в том числе онкогенов и генов-супрессоров опухолей, мутации в которых могут вносить существенный вклад в их развитие. Но по-

Table 3. Inhibitory effect of the microsomal enzyme inducer 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD) on the carcinogenicity of ortho-aminoazotoluene (OAT) in the liver of CBA suckling male mice

Index / group	Oil + OAT	TCDD + OAT	TCDD
Number of mice	16	13	9
Of them with liver tumors, %	16 (100)	8 (61.5)	0
Life span, days	365 ± 2.8	364 ± 1.8	359 ± 6.9
Liver index, %	4.81 ± 0.24	4.47 ± 0.10	4.26 ± 0.14
Total number of nodules in the liver	6.7 ± 1.1	1.7 ± 0.5***	0
Mean diameter of tumor nodules in the liver, mm	3.8 ± 0.22	0.5 ± 0.3**	0

Note: TCDD at the dose of 10 µg/g body weight was administered to 10-days suckling mice (3 days before administration of OAT). The number and size of tumor nodules were estimated as described in *Materials and methods*.

Asterisks designate significant differences (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) from group 1.

Table 4. Effect of pentachlorophenol (PCP) on the mutagenic activation of 4-aminoazobenzene (AB) and ortho-aminoazotoluene (OAT) by the S9-fraction of liver microsomal enzymes from suckling (C57BL × CBA)_{F1} mice pretreated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD)

The activating mixture was supplemented with:	Number of His ⁺ revertant colonies per dish	Induction factor	Effect of PCP
DMSO (diluent)	41 ± 0.7	1.00	
PCP	39 ± 1.8	0.95	
AB	84 ± 2.7	2.05	
AB + PCP	56 ± 2.0*	1.37	-33.4 %
OAT	158 ± 3.9	3.85	
OAT + PCP	90 ± 2.0*	2.20	-43.0 %

Note: Mutagenicity of carcinogens was assessed in the Ames test as described in *Materials and methods*.

The doses of AB and OAT were 20 µg and PCP, 10 µg per dish.

Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) from the corresponding data in the foregoing row.

Table 5. Mutagenicity of benzo[a]pyrene (BP) and ortho-aminoazotoluene (OAT) in the Ames test on *S. typhimurium* under metabolic activation by the intact or preinduced S9-fraction of mouse liver microsomal enzymes

Donors of S9-fraction	Number of His ⁺ revertant colonies			
	BP		OAT	
	Number per dish	Induction factor	Number per dish	Induction factor
Control (without S9-fraction)	34 ± 2.1	1.0	35 ± 1.9	1.1
Liver of suckling CBA mice without enzyme induction	88 ± 4.8	2.7	62 ± 4.9	1.9
Liver of suckling ICR mice without enzyme induction	73 ± 1.0	2.2	52 ± 2.1	1.6
Liver of adult C57BL males without enzyme induction	78 ± 7.4	2.4	63 ± 1.4	1.9
Liver of adult C57BL mice induced with phenobarbital	144 ± 1.7	4.4	167 ± 3.2	5.1
Liver of adult C57BL mice induced with Aroclor 1254	160 ± 0.9	4.8	169 ± 0.6	5.1
Liver of suckling F ₁ (BL × CBA) mice induced with TCDD	–	–	163 ± 3.7	4.9

Note: The mean number of revertant colonies without carcinogens was 33 ± 3.6 per dish. The induction factor is the ratio between the number of colonies in the experimental groups and the number of colonies in the control.

лиморфизм, обнаруживаемый обычно в зрелых опухолях, нарастает по мере их прогрессии, которая идет спонтанно или под влиянием немутагенных промоторов, как правило, уже в отсутствие канцерогена, и ничего не может сказать о механизме иницирующего действия последнего.

Определяя рак как генетическую болезнь, Г.П. Георгиев (1999. С. 17) констатирует, что он может быть связан «с потерей, или повреждением, или активацией, или, наконец, привнесением извне определенных генов». Собственно генотоксическими при этом являются потеря и повреждение и только частично активация в той части, в которой она – результат повреждения или реаранжировки этих генов. Другой путь увеличения активности онкогена, связанный с усилением синтеза матричных РНК и в итоге белкового продукта онкогена и его накопления в клетке, может реализоваться через регуляцию этого синтеза, т. е. эпигенетически, как это происходит в нормальном онтогенезе и при репаративных процессах. В настоящее время имеются соображения относительно того, как могут действовать канцерогены на уровне не структуры, а функции генома (Nguen-Ba, Vasseur, 1999; Jones, Baylin, 2007; Kaledin et al., 2014a, b, 2015). Обсудить их мы надеемся в следующем сообщении.

Acknowledgments

Работа выполнялась в рамках государственного задания (проект № 0324-2015-0003).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Abilev S.K., Glazer V.M., Aslanyan M.M. Osnovy mutagenеза i genotoksikologii [Fundamentals of Mutagenesis and Genotoxicology]. Moscow; Saint-Petersburg, 2012. (in Russian)

Ames D.N., Durston W.E., Yamasaki E., Lee F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1973;70: 2281-2285.

Delclos K.B., Miller E.C., Miller J.A., Liem A. Sulfuric acid esters as major ultimate electrophilic metabolites of 4-aminoazobenzene and its N-methyl derivatives in infant male C57BL/6J × C3H/HeJ F₁ (B6C3F₁) mice. Carcinogenesis. 1986;7:277-287.

Delclos K.B., Tarpley W.G., Miller E.C., Miller J.A. 4-aminoazobenzene and N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene as equipotent hepatic carcinogens in male C57BL/6 × C3H/He F₁ mice and characterization of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoazobenzene as the major persistent hepatic DNA-binding dye in these mice. Cancer Res. 1984;44:2540-2550.

De Vries A., Dolle M.E.T., Broekhof J.L.M., Muller J.J.A., Kroese E.D., van Kreijl C.F., Capel P.J.A., Vijg J., van Steeg H. Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of XPA-deficient/lacZ transgenic mice after oral treatment with benzo[*a*]pyrene: correlation with tumor development. Carcinogenesis. 1997;18:2327-2332.

Fennel T.R., Wiseman R.W., Miller J.A., Miller E.C. Major role of hepatic sulfotransferase activity in the metabolic activation, DNA adduct formation, and carcinogenicity of 1'-hydroxy-2',3'-dehydroestradiol in infant male C57BL/6J × C3H/HeJ F₁ mice. Cancer Res. 1985;45:5310-5320.

Frolova T.S., Sinityna O.I., Kaledin V.I. The mutagenic activities of four aminoazo compounds with different carcinogenicities for rat liver in the Ames test. Biophysics. 2015;60:818-822.

Georgiev G.P. How a normal cell is transformed into a cancer one. Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal = Soros Educational Journal. 1999;4:17-22. (in Russian)

Jones P.A., Baylin S.B. The epigenomics of cancer. Cell. 2007;128: 683-692.

Kaledin V.I., Gulyamova M.R., Serova I.A., Ilnitskaya S.I., Nikitenko E.V., Schkurupii V.A. On sensitivity of adult males of C57BL/6 and C3H strains of mice to hepatic tumor induction by ortho-aminoazotoluene. Byulleten SO RAMN = Bulletin of SB RAMS. 2002b;4(106):100-103. (in Russian)

Kaledin V.I., Gulyaeva L.F., Ilnitskaya S.I., Popova N.A., Bulycheva T.E. Glucocorticoid induction of tyrosine aminotransferase in the liver is impaired by activated metabolites of carcinogens. Doklady Akademii nauk SSSR = Reports of the Academy of Sciences of USSR. 1997;357:126-129. (in Russian)

Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I. Metabolism inhibition enhances the carcinogenic action of o-aminoazotoluene in the mouse liver, whereas activation inhibits it. Voprosy onkologii = Problems in Oncology. 2011;57:216-220. (in Russian)

Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Baginskaya N.V., Kholodar A.V., Obut T.A. Effect of phenobarbital and tyroxine on carcinogenesis induced in mice by nitrosoethylurea and diethylnitrosamine. Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal. 2005;91:1481-1491. (in Russian)

Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Ovchinnikova L.P., Popova N.A., Bogdanova L.A., Morozkova T.S. Mutagenic activation and carcinogenicity of aminoazo dyes ortho-aminoazotoluene and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene in experiments on suckling mice. Biophysics. 2014a;59:431-435.

Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Popova N.A., Baginskaya N.V., Bogdanova L.A., Perepechaeva M.L., Grishanova A.Yu. Inhibitory effect of ortho-aminoazotoluene on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in suckling mice. Phenomenon and possible mechanism. Biophysics. 2014b;59:635-641.

Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Popova N.A., Koval O.A., Pyshnaya B.A., Gulyaeva L.F. Induction of tyrosine aminotransferase in mice is inhibited by the activated metabolites of ortho-aminoazotoluene. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):136-143. (in Russian)

Kaledin V.I., Ilnitskaya S.I., Vasyunina E.A., Popova N.A., Bogdanova L.A., Perepechaeva M.L., Grishanova A.Yu. The effect of changes in Cyp2e1 activity in the liver on toxicity and carcinogenicity of diethylnitrosamine in mice. Biophysics. 2015;60:970-976.

Kaledin V.I., Serova I.A., Semenova L.A. Different predisposition to development of spontaneous and induced tumors of the liver in mice of different strains and their hybrids. Eksperimentalnaya onkologiya = Experimental Oncology. 1990;12:28-30. (in Russian)

Kaledin V.I., Vasyunina E.A., Ovchinnikova L.P., Ronichevskaya G.M., Zvereva L.N., Ilnitskaya S.I. Search for correlation between the oncogenic and mutagenic effects of chemical carcinogens and gamma-irradiation in mice. Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders. 2002a;21-22:11-19. (in Russian)

Kaledin V.I., Zakharova N.P. Vliyanie gepatokantserogennykh soedineniy na gormonalnuyu induktsiyu tirozinaminotransferazy v pecheni chuvstvitelnykh i rezistentnykh zhivotnykh [The influence of hepatocarcinogenic compounds on hormonal induction of tyrosine aminotransferase in the liver of sensitive and resistant animals]. Issledovaniya po induktsii i metastazirovaniyu zlokachestvennykh opukholey u eksperimentalnykh zhivotnykh [Studies on Tumor Induction and Metastasis in Experimental Animals]. Novosibirsk: ICG CO AN SSSR Publ., 1984;146-185. (in Russian)

Miller J.A. Carcinogenesis by chemicals: an overview. Cancer Res. 1970;30:658-664.

Miller J.A., Miller E.C. Kantserogennyye aminoazosodineniya [The carcinogenic aminoazodyes]. Uspekhi v izuchenii raka [Advances in Cancer Research]. Moscow, Inostrannaya literatura Publ., 1955;1: 7-71. (in Russian)

- Miller E.C., Miller J.A. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*. 1981;47:2327-2345.
- Miller E.C., Swanson A.B., Phillips D.H., Fletcher T.L., Liem A., Miller J.A. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Res*. 1983;43:1124-1134.
- Miller J.A., Miller E.C. The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides. *Progr. Exptl. Tumor Res*. 1969;11:273-301.
- Nguen-Ba G., Vasseur P. Epigenetic events during the process of cell transformation induced by carcinogens (review). *Oncol. Rep*. 1999;6(4):925-932.
- Ovchinnikova L.P., Bogdanova L.A., Kaledin V.I. Mutagenic activation diminishes the carcinogenicity of ortho-aminoazotoluene in the mouse liver. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012;154:623-628. (in Russian)
- Turusov V.C., Belitskii G.A., Pylev L.N., Koblyakov V.A. Mekhanizmy deystviya i klassifikatsiya khimicheskikh kantserogenov [The action pathways and classification of chemical carcinogens]. *Kantserogenez. Red. D.G. Zaridze [Carcinogenesis. Ed. by D.G. Zaridze]*. Moscow, Meditsina Publ., 2004;204-225. (in Russian)
- Weisburger J.H., Yamamoto R.S., Williams G.M., Grantham P.H., Matsushima T, Weisburger E.K. On the sulfate ester of N-hydroxy-2-fluorenylacetamide as a key ultimate hepatocarcinogen in the rat. *Cancer Res*. 1972;32:491-500.
- Williams G.M., Klaiber M., Parker S.E., Farder E. Nature of early appearing, carcinogen-induced liver lesions resistant to iron accumulation. *J. Nat. Cancer Inst*. 1976;57:157-165.
- Zborovskaya I.B. Molekulyarno-biologicheskie issledovaniya onkogenov i genov-supressorov opukholevogo rosta v klinicheskoy praktike [Molecular study of oncogenes and genes suppressing tumor growth in clinical practice]. *Kantserogenez. Red. D.G. Zaridze [Carcinogenesis. Ed. by D.G. Zaridze]*. Moscow, Meditsina Publ., 2004. (in Russian)
- Zeiger E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? *Mutat. Res*. 2001;492:29-38.