

Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2013
УДК616-006-036.8

Вопросы онкологии, 2013. Том 59, № 1

И.В. Аникин¹, И.Г. Попович¹, М.Л. Тындык¹, М.А. Забежнинский¹,
М.Н. Юрова¹, В.П. Скулачев², В.Н. Анисимов¹

ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНОГО ПЛАСТОХИНОНА SkQ1 НА КАНЦЕРОГЕНЕЗ В МЯГКИХ ТКАНЯХ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ БЕНЗ(А)ПИРЕНОМ

¹ ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

² Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ, Москва.

90 мышам-самкам SHR весом 25-30 г введено однократно подкожно в область правого бедра по 2 мг бенз(а)пирена в 0,2 мл растительного масла. Контрольные мыши (1-я группа) дополнительным воздействиям не подвергались. Подопытные мыши 2-й и 3-й групп, начиная со следующего дня после введения канцерогена, получали постоянно с питьевой водой митохондриальный антиоксидант SkQ1 в двух дозах: 5 и 50 нмоль/кг веса в сутки в течение всей жизни. Опыт был завершен на 358-й день опыта.

До 20-й недели опыта динамика нарастания количества мышей с опухолями была схожа во всех группах. Однако затем процесс нарастания количества мышей с впервые обнаруженными опухолями в группах, получавших SkQ1, происходил медленнее, чем в контрольной группе. Изучение динамики роста опухолей на месте введения БП показало, что наибольший прирост объема опухолей наблюдался у мышей контрольной группы, что сопровождалось более быстрой их гибелью. К 30 неделе жизни мышей 1-й группы (контроль) в живых осталось 20% животных, во 2-й группе (5 нмоль SkQ1)—30%, в 3-й—40%. Средний объем опухолей к 40 неделе составлял в контроле около 40 см³, 13 см³ во 2-й группе и 21 см³ в 3-й. У подопытных мышей реже, чем в контроле, обнаруживали пневмонию. Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что введение с питьевой водой SkQ1 в дозах 5 и 50 нмоль/кг оказывает тормозящее действие на канцерогенез в мягких тканях, вызванный подкожным введением бенз(а)пирена мышам SHR.

Ключевые слова: SkQ1, бенз(а)пирен, опухоли мягких тканей, мыши

Среди средств химиопрофилактики рака значительное место занимают антиоксиданты, угнетающие канцерогенез, индуцируемый

представителями различных классов химических канцерогенов, ионизирующей радиацией и ультрафиолетовым облучением [8, 13]. Однако их эффективность в отношении экспериментальных опухолей не всегда подтверждается результатами применения антиоксидантов в клинической практике [3, 14, 16]. Учитывая, что свободные радикалы, в частности, активные формы кислорода (АФК), образуются преимущественно в митохондриях, перспективным направлением является использование антиоксидантов, способных целенаправленно проникать внутрь митохондрий, аккумулироваться там и снижать уровень свободно-радикальных процессов [17].

Было показано, что применение липофильных катионов для транспортировки биоактивных молекул внутрь митохондрий значительно увеличивает их эффективность [15]. Для снижения риска прооксидативной активности было предложено использовать пластохинон вместо убихинона. Синтезированная молекула 10E(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний получила название SkQ1. Предполагается, что SkQ1 как нейтрализатор активных форм кислорода (АФК) внутри митохондрии может замедлять развитие программы старения, обусловленной АФК—стимулированным апоптозом в различных органах и тормозить развитие связанной с возрастом патологии [9].

В растительных и животных клетках *in vitro* очень низкие (наномолярные) концентрации SkQ1 уменьшали апоптоз и некроз, вызванный АФК. У крыс Вистар SkQ1 в дозах 0,02—250 нмоль/кг снижал сердечную аритмию, вызванную перфузией изолированного сердца раствором H₂O₂; уменьшал размер инфарктной зоны, вызванной реперфузией сердца *in vivo* [7]. У крыс линии OXYS с генетической предрасположенностью к повышенному образованию свободных радикалов введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг предотвращало развитие катаракты, ретинопатий, остеопороза, увеличивало минерали-

зацию костей [6]. В ряде исследований показан геропротекторный эффект SkQ1 у мышей разных линий [4, 10, 11, 18].

SkQ1, добавленный в питьевую воду (5 нмоль/кг в сутки), подавлял развитие лимфом у мышей с выключенным геном *p53* и тормозил рост ксенографтов рака ободочной кишки человека HCT116/*p53*^{-/-} на бестимусных мышках; не вызывал значительных изменений в росте опухолевых ксенографтов *SiHa* (HPV-16-ассоциированного рака шейки матки человека), однако заметно увеличивал продолжительность жизни мышей с опухолями [1]. В наших опытах SkQ1 не оказывал существенного влияния на развитие спонтанных опухолей у неинбредных мышей SHR, инбредных мышей линии 129/Sv и трансгенных HER-2/neu мышей [10].

Стандартным подходом к изучению антиканцерогенной активности новых препаратов является их тестирование на моделях опухолей, индуцированных у животных канцерогенными агентами [5]. В НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова с этой целью отработаны и применяются различные модели, в том числе, опухоли мягких тканей мышей, вызванные однократным подкожным введением 2 мг бенз(а)пирена. По нашим данным, частота опухолей (подкожных сарком), развивающихся на месте введения бенз(а)пирена, у различных линий мышей колеблется от 70 до 90%. Опухоли достигают максимальной частоты через 21-23 недели опыта [2].

Целью данной работы было изучение действия препарата SkQ1 на развитие опухолей мягких тканей, индуцируемых бенз(а)пиреном (БП) у мышей.

Материал и методика

В работе использованы 90 мышей-самок SHR весом 25-30 г разведения питомника «Рапполово» РАМН. Животных содержали по 5 в клетках при стандартном режиме освещения (12 ч. свет: 12 ч. темнота), они получали полнорационный гранулированный корм ПК-120 производства «Лаб-борторм» (Москва) и питьевую воду без ограничений.

Всем мышам было введено однократно подкожно в область правого бедра по 2 мг БП (Fluka, Busch AG, Швейцария) в 0,2 мл растительного масла. Этот день считался первым днем опыта. После введения БП животные путем рандомизации были подразделены на 3 группы (по 30 экз.). Контрольные мыши (1-я группа) дополнительным воздействиям не подвергались. Мыши 2-й и 3-й групп, начиная со следующего дня после введения канцерогена, получали с питьевой водой SkQ1 в двух дозах: 5 и 50 нмоль/кг веса в сутки, в течение всей жизни. Ранее нами было показано, что в этом интервале доз (от 5 до 250 нмоль/кг) исследуемый препарат при постоянном введении мышам с питьевой водой может тормозить процесс старения и увеличивать продолжительность их жизни [10].

Место инъекции канцерогена ежедневно пальпировали для выявления опухолей. Раз в неделю опухоли измеряли и определяли их объем по формуле: $V = (a \cdot b^2) / 2$, где *a* — наибольший, а *b* — наименьший линейный размер опу-

холевого узла. Для сравнения динамики роста разных по объему опухолей оценивали прирост их объема индивидуально, по отношению объема во время измерения опухоли к исходному объему, принимаемому за 1: $\Delta V = V_t / V_0$.

Павших животных подвергли полной аутопсии. Обнаруженные новообразования вырезали, фиксировали в 10% нейтральном формалине и заключали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином имикроскопировали. Новообразования классифицировали согласно рекомендациям МАИР [19].

Оценку возможного антиканцерогенного эффекта SkQ1 производили путем сравнения с контролем следующих показателей в подопытных группах:

- срок обнаружения первой опухоли на месте введения канцерогена;
- средний латентный период обнаружения опухолей;
- частота новообразований на месте введения канцерогена;
- размеры новообразований в различные сроки после их обнаружения;
- степень распространения опухолей и наличие метастазов;
- продолжительность жизни животных.

Опыт был завершён на 358-й день опыта. К этому времени все мыши с опухолями пали, образования новых опухолей у животных уже не наблюдалось, поэтому все оставшиеся в живых мыши без опухолей были умерщвлены путем шейной дислокации. Результаты опытов были подвергнуты статистической обработке [12].

Результаты и обсуждение

Сводные данные о сроках и динамике обнаружения опухолей, их частоте представлены в табл. 1 и рис. 1. Первые опухоли у животных отдельных групп были обнаружены одновременно — на 83-й день опыта. До этого срока дожили все животные. Как видно на рис. 1, на ранних сроках опыта динамика нарастания количества мышей с опухолями была примерно одинаковой во всех группах. Однако после 20-й недели этот процесс в группах 2 и 3, получавших SkQ1, происходил медленнее, чем в контрольной группе, что отразилось на величине среднего латентного периода, который во 2-й и 3-й группах был несколько больше, чем в контроле, хотя выявленные различия не достигали уровня статистической достоверности. Частота опухолей на месте введения канцерогена была сходной и составила: в контроле — 25 из 30; во 2-й группе (SkQ1, 5 нмоль/кг) — 24 из 30; в 3-й группе (SkQ1, 50 нмоль/кг) — 23 из 30.

Данные о динамике роста опухолей на месте введения БП представлены в табл. 2. Наибольший прирост объема опухолей наблюдался в контрольной группе. К 4-й неделе от времени обнаружения средний прирост объема опухолей в 1-й группе составлял 39,1, во 2-й группе — 12,9, а в 3-й — 21,0. Таким образом, опухоли у подопытных мышей росли медленнее, чем в контроле, хотя эти различия носили характер тенденций (рис. 2). Отмеченные различия в сро-

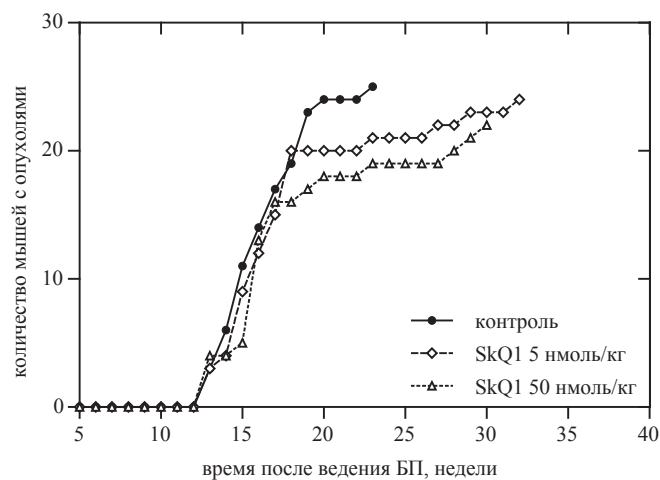


Рис. 1. Динамика возникновения индуцированных бенз(а)пиреном (БП) сарком у мышей, получавших и не получавших препарат SkQ1

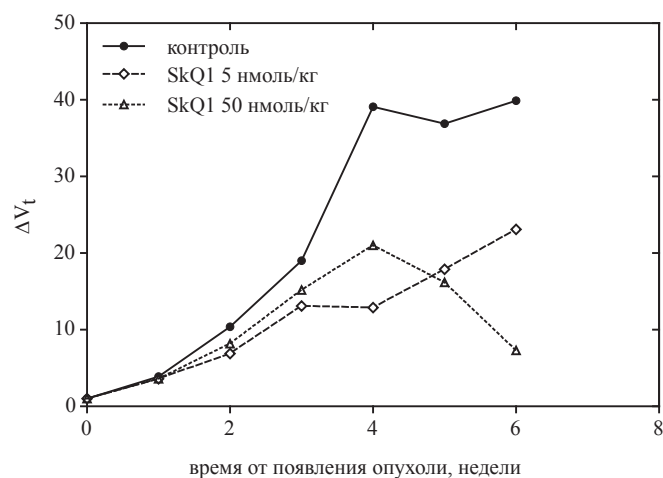


Рис. 2. Динамика роста опухолей, индуцированных бенз(а)пиреном (БП) у мышей, получавших и не получавших SkQ1. ΔV_t – Объем опухолей, см³

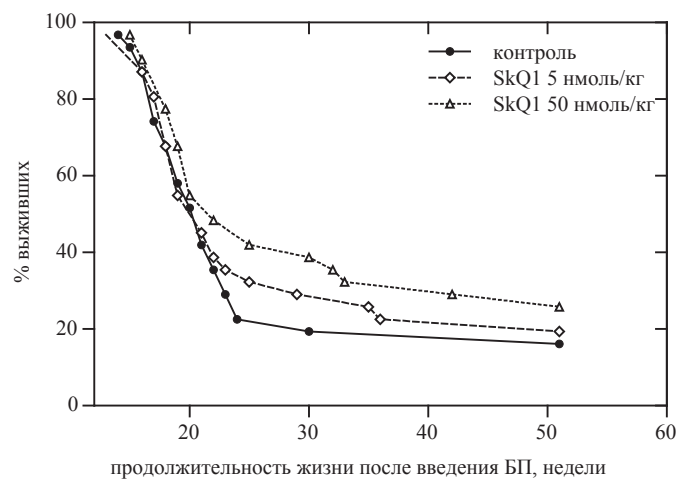


Рис. 3. Динамика гибели мышей, подвергавшихся воздействию бенз(а)пирена (БП) и SkQ1
Примечание: оставшиеся в живых мыши без опухолей на месте введения БП были умерщвлены на 358 день опыта. По оси абсцисс - время после введения БП, сутки.

Таблица 1.

Влияние SkQ1 на канцерогенез в мягких тканях, индуцируемый бенз(а)пиреном (БП) у самок мышей линии SHR

Показатели	БП	БП + SkQ1, 5 нмоль/кг	БП + SkQ1, 50 нмоль/кг
Количество мышей в группе	30	30	30
Время обнаружения 1-й опухоли, сут.	83	83	83
Число мышей с опухолями	25 (83,3%)	24 (80%)	23 (74,3%)
Средний латентный период обнаружения опухолей, сут.	114 ± 3.5	124 ± 7.1	125 ± 7.6
Средняя продолжительность жизни животных после обнаружения опухоли, сут.	28 ± 1.9	25 ± 2.0	33 ± 3.7
Число мышей, доживших до конца опыта	4 (13,3%)	6 (20%)	8 (30%)
Средний размер опухолей (см ³)	12.5 ± 1.42	9.9 ± 1.3	14.7 ± 2.0
Число мышей с метастазами	2	0	0

Таблица 2.

Динамика роста опухолей, индуцированных бенз(а)пиреном у мышей, получавших и не получавших SkQ1

Группа	Показатели	Неделя от появления опухоли						
		0	1	2	3	4	5	6
Контроль	N _t	25	25	22	17	14	3	1
	V _t , см ³	0,72±0,11	2,64±0,45	5,95±1,09	9,19±1,75	12,31±1,00	15,28±0,81	19,97
	ΔV _t	1	3,9	10,4	19,0	39,1	36,9	39,9
SkQ1, 5 нМоль/кг	N _t	24	24	21	16	5	3	3
	V _t , см ³	0,69±0,15	2,47±0,42	4,76±0,66	9,01±1,80	8,84±1,56	12,32±4,41	15,88±3,99
	ΔV _t	1	3,6	6,9	13,1	12,9	17,9	23,1
SkQ1, 50 нМоль/кг	N _t	23	23	21	18	11	6	4
	V _t , см ³	0,74±0,11	2,64±0,53	6,03±1,12	11,16±2,03	15,44±3,37	11,91±5,34	5,37±2,00
	ΔV _t	1	3,6	8,2	15,2	21,0	16,2	7,3

N_t—Количество животных с опухолями;V_t—Средний объем опухолей, см³;ΔV_t—Прирост объема по сравнению с исходным.

ках обнаружения и скорости роста опухоли отразились на динамике гибели и продолжительности жизни животных. Как видно на рис. 3, быстрее погибали контрольные мыши. Средняя продолжительность жизни мышей после введения канцерогена составила в 1-й группе 141,4 сут., во 2-й группе—148,8, в 3-й—158,2 ($p>0,05$) (табл. 1). Не обнаружено статистически достоверных различий в продолжительности жизни мышей различных групп после обнаружения опухолей (табл. 1).

Результаты аутопсии животных с опухолями показали, что у мышей 2-й группы, по сравнению с контролем, отмечалась тенденция к уменьшению объема опухолей, степени их распространения и метастазирования. Микроскопически развившиеся на месте введения канцерогена опухоли были классифицированы как злокачественные фиброзные гисти-

оцитомы [19]. Следует отметить, что у подопытных мышей реже, чем в контроле, обнаруживали пневмонию. Эти данные подтверждают наши наблюдения о способности SkQ1 снижать у мышей частоту развития неопухолевых заболеваний [4, 10]. При аутопсии убитых в конце опыта животных без опухолей на месте введения канцерогена, в контрольной группе выявлены две небольших опухоли молочной железы. У всех животных обнаружены олеогранулемы на месте введения БП. В остальных органах изменения не обнаружены.

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что введение с питьевой водой SkQ1 в дозах 5 и 50 нмоль/кг/сутки оказывает тормозящее влияние на канцерогенез в мягких тканях, вызванный подкожным введением БП мышам SHR. В целом, данные подтверждают гипотезу о геропротекторном дей-

ствии SkQ1, выявленном нами у аутбредных мышей, и отсутствии у него общей токсической и канцерогенной активности при длительном применении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агапова Л.С., Черняк Б.В., Домнина Л.В. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения: SkQ1 подавляет развитие опухолей из p53-дефицитных клеток // Биохимия. — 2008. — Т. 73. — С. 1622-1640.
2. Аникин И.В., Козлов А.П., Попов А.В. и др. Чувствительность мышей линии FVB/N (дикого типа и нокаутных по p53) к индукции подкожных сарком бензо(а)пиреном // Вопр. онкол. — 2002. — Т. 48. — С. 700-702.
3. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб.: Наука. — 2008. — Т. 1. — 481 с.; — Т. 2. — 434 с.
4. Анисимов В.Н. Бакеева Л.Е., Егорин П.А. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения: SkQ1 увеличивает продолжительность жизни и предотвращает развитие признаков старения // Биохимия. — 2008. — Т. 73. — С. 1641-1654.
5. Анисимов В.Н., Забежинский М.А., Попович И.Г. и др. Современные подходы к изучению канцерогенной безопасности, противоопухолевой, антиканцерогенной и герпротекторной активности фармакологических препаратов // Вопр. онкол. — 2012. — Т. 58. — С. 7-18.
6. Архипова Л.Т. Архипова М.М., Бакеева Л.Е. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения: Связанные с возрастом заболевания глаз: SkQ возвращает зрение слепым животным // Биохимия. — 2008. — Т. 73. — С. 1641-1645.
7. Бакеева Л.Е. Барсков И.В., Егоров М.В. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения: Терапия некоторых старческих патологий, опосредованных АФК (сердечной аритмии, инфарктов сердца и почки и инсульта головного мозга) // Биохимия. — 2008. — Т. 73. — С. 1607-1621.
8. Беспалов В.Г. Химиопрофилактика рака // Прак. мед. — 2007. — № 2. — С. 73-74.
9. Скулачев В.П. Как отменить программу старения орта-низма? // Рос. хим. ж. — 2009. — Т. 53. — С. 125-140.
10. Юрова М.Н., Забежинский М.А., Пискунова Т.С. и др. Влияние митохондриального антиоксиданта SkQ1 на старение, продолжительность жизни и спонтанный канцерогенез у мышей трех линий // Успехи геронтол. — 2010. — Т. 23. — С. 430-441.
11. Anisimov V.N., Egorov M.V., Krasilshchikova M.S. et al. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents // Aging. — 2011. — Vol. 3. — P. 1110-1119.
12. Gart J.J., Krewski D., Lee P.N. Statistical Methods in Cancer Research // IARC Sci. Publ. No 79. Lyon: IARC. 1986.
13. Gullett N.P., Ruhul Amin A.R., Bayraktar S. et al. Cancer prevention with natural compounds // Semin. Oncol. — 2010. — Vol. 37. — P. 258-281.
14. Meyskens F.L., Curt G.A., Brenner D.E. et al. Chemoprevention clinical trials and biomarkers subcommittee regulatory approval of cancer risk-reducing (chemopreventive) drugs: moving what we have learned into the clinic // Cancer Prev. Res. — 2011. — Vol. 4. — P. 311-323.
15. Murphy M.P. Development of lipophilic cations as therapies for disorders due to mitochondrial dysfunction // Expert Opin. Biol. Ther. — 2001. — Vol. 1. — P. 753-64.
16. Naithani R., Huma L.C., Moriarty R.M., McCormick D.L., Mehta R.G. Comprehensive review of cancer chemopreventive agents evaluated in experimental carcinogenesis models and clinical trials // Curr. Med. Chem. — 2008. — Vol. 15. — P. 1044-1071.
17. Skulachev M.V., Antonenko Y.N., Anisimov V.N. et al. Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies // Curr. Drug Targets. — 2011. — Vol. 12. — P. 800-826.
18. Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N., et al. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach // Biochim. Biophys. Acta. — 2009. — Vol. 1787. — P. 437-461.
19. Turusov V. Mohr U. (Eds) Pathology of Tumours in Laboratory Animals: Vol. 2: Tumours of the Mouse: Sec. Ed. // IARC Sci. Publ. No. 111. Lyon: IARC. 1994.

*I.V. Anikin¹, I.G. Popovich¹, M.L. Tyndyk¹,
M.A. Zabezhinsky¹, M.N. Yurova¹,
V.P. Skulachev², V.N. Anisimov¹*

EFFECT OF PLASTOQUINONE DERIVATIVE SKQ1 ON BENZO(A)PYRENE-INDUCED SOFT TISSUE CARCINOGENESIS

¹ N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg

² A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Ninety female SHR mice were subcutaneously injected with a single dose of 2 mg benzo(a)pyrene (BaP) dissolved in 0.2 ml of vegetable oil. Since the next day after BaP injection mice were started to treat with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 at the doses of 5 and 50 nmol/kg/day in drinking water. Control animals received tap water. Study was finished by 358th day. Number of tumor-bearing mice increased in all groups exposed to BaP but retarded since 20th week in SkQ1-treated groups in comparison with control. Maximal tumor volume gain was observed in control mice resulting in precocious death. By the 30th week of study only 20% of control animals survived, whereas SkQ1 treatment increased percent of survival up to 30% at the dose of 5 nmol and 40% at the dose of 50 nmol. By the 40th week mean tumor volume in 5 and 50 nmol SkQ1-treated mice was 13 and 21 cm³ respectively, whereas in control—40 cm³. In SkQ1-treated mice pneumonia was observed rarely as compared with controls. It could be supposed, SkQ1 at the doses of 5 and 50 nmol/kg/day retarded BaP-induced soft tissue carcinogenesis in SHR mice.

Поступила в редакцию 26.10.2012 г.