

*И.В. Аникин¹, Н.В. Гончаров², М.Л. Тындык¹, Н.Г. Войтенко², Г.Б. Плисс¹,
М.А. Забежинский¹, И.Г. Попович¹, В.Н. Анисимов¹*

ВЛИЯНИЕ ФТОРАЦЕТАТА НАТРИЯ НА РОСТ СОЛИДНОГО РАКА ЭРЛИХА И АУТОХТОННЫХ САРКОМ МЫШЕЙ

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

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

В связи с биохимическими особенностями токсического действия фторацетата на энергетику и метаболизм клеток, в том числе опухолевых, представлялось интересным провести тестирование фторацетата натрия (ФАН) на противоопухолевую активность *in vivo*. Установлено, что ФАН статистически значимо тормозит рост рака Эрлиха. В экспериментах с аутохтонными индуцированными бенз(а)пиреном подкожными опухолями ФАН не активен в режиме монотерапии, но усиливает противоопухолевый эффект циклофосфамида, статистически значимо повышая долю опухолей с не изменившимся или уменьшившимся объемом и продолжительность этого эффекта. Полученные данные дают основания для дополнительного изучения механизма противоопухолевого эффекта фторацетата натрия.

Ключевые слова: фторацетат натрия, противоопухолевая активность, рак Эрлиха, индуцированные саркомы.

Несмотря на значительное количество применяемых в клинике противоопухолевых средств, поиск новых лекарственных препаратов является одним из приоритетных направлений экспериментальной онкологии. Как правило, высокая активность противоопухолевого препарата тесно связана с его высокой токсичностью. Такие препараты не могут быть эффективно использованы для терминальных пациентов, получивших 2 и более курсов традиционной химиотерапии. Кроме того, наличие токсичности за счет воздействия на общие с опухолью мишени в организме больного ограничивает использование цитостатиков в адекватных дозах, что ускоряет развитие резистентности [1]. На протяжении последних 40 лет, со времени опубликования пионерских работ J. Folkman [4, 7], внимание исследователей привлекает другое направление воздействия на опухолевый рост — влияние на опухолевый ангиогенез. Однако эффект препаратов антиангиогенного спектра действия обратим, более того, эти препараты могут увеличивать агрессивность опухоли и скорость её диссеминации

[6, 11]. Многие противоопухолевые препараты воздействуют на клетки не избирательно, поражая и эндотелий сосудов. Этот факт лежит в основе метростатической химиотерапии, которая предполагает использование сравнительно малых доз на протяжении длительного времени с меньшими побочными эффектами [12].

Подавляющее большинство противоопухолевых препаратов ингибирует синтез ДНК опухолевых и нормальных клеток. В то же время имеется ряд других молекулярных мишеней для антинеопластических, связанных, в частности, с энергетикой и метаболизмом клеток. Исследование механизма токсического действия фторацетата — метаболита токсического яда, избирательно ингибирующего аконитазу, тормозящего дыхание и анаболические процессы — послужило основанием для проведения исследований его противоопухолевой активности. Фторацетат натрия (ФАН) вызывает дисбаланс ионов в клетках, осмотический дисбаланс и дефицит АТФ вследствие блокады митохондриальной аконитазы; накапливающийся цитрат хелатирует кальций, блокирует фосфофруктокиназу и, как следствие, гликолиз [8, 9]. Ранее в экспериментах *in vitro* нами было показано влияние ФАН на уровень пиридиновых нуклеотидов в митохондриях, мембранный потенциал и гомеостаз кальция в клетках эндотелия и асцитной карциномы Эрлиха [2, 14].

Цель настоящей работы состояла в исследовании действия ФАН на рост перевиваемых и канцероген-индуцированных новообразований *in vivo*.

Материалы и методика

Исследование выполнено на 87 мышцах-самках SHR возрастом 3–3,5 мес., разведение которых поддерживается в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. Животных содержали в стандартных пластмассовых клетках типа Т2 при температуре 21–23°C и световом режиме 12 ч свет—12 ч темнота (12С:12Т). Мыши получали стандартный гранулированный корм («Лабораторкорм», Москва) и воду без ограничения.

В работе на перевиваемых опухолях был использован рак Эрлиха — штамм перевиваемых опухолей мышечной ткани, широко применяющийся в онкологических исследованиях. Рак Эрлиха перевивали рандомизированным на 2 группы 27 мышам SHR под кожу правого бока в количестве

107 клеток в 0,2 мл физиологического раствора (ФР) хлористого натрия. Спустя 72 ч. после перевивки опухоли контрольным животным начинали вводить ФР 14 раз внутрибрюшинно ежедневно, а подопытным — ФАН (Chem Service Inc., США), разведенный в ФР в дозе 1,25 мг/кг внутрибрюшинно 14 раз ежедневно.

Измерения размеров опухолей проводили два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V=(a*b^2)/2$, где a — больший, b — меньший линейный размер узла. Эффективность терапии оценивали по торможению роста опухоли. Процент торможения роста рассчитывали по формуле: $(VK-VO)/VK*100\%$, где VK — средний объем опухоли в контрольной группе, а VO — средний объем опухоли в опытной группе.

Учитывая, что опухоли человека, за исключением хорионэпителиомы, являются аутохтонными, были поставлены также эксперименты по оценке влияния ФАН на рост индуцированных бенз(а)пиреном сарком у мышей как в режиме монотерапии, так и в комбинации с известным противоопухолевым препаратом циклофосфамидом (Endoxan). Индукцию сарком проводили согласно общепринятой методике введением 2 мг бенз(а)пирен (Fluka, Швейцария) мышам в 0,2 мл растительного масла под кожу правого бока. По мере появления опухолей и достижения ими размера около 10 мм в диаметре (в среднем через 2,5–4,5 мес. после введения канцерогена) животных распределяли на контрольную и подопытные группы. Контрольным мышам вводили ФР, а подопытным — раствор ФАН в ФР. Измерение объема опухолей проводили один раз в неделю. Реакцию каждой опухоли на препарат оценивали индивидуально по объему опухолей. При этом отмечали частоту новообразований, объем которых оставался равен исходному или становился меньше.

Циклофосфамид (Endoxan, Baxter, Германия) в дозе 200 мг/кг однократно и фторацетат натрия в дозах 0,5 и 1 мг/кг вводили внутрибрюшинно, режим введения указан в табл. 1.

При статистическом анализе полученных данных для сравнения объемов опухоли у животных двух групп использовали критерии t Стьюдента, для сравнения числа животных с замедлением роста опухоли — точный метод Фишера. Для обработки результатов использовали программы MS Excel и Statistica.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения влияния ФАН на рост рака Эрлиха представлены в табл. 1.

Как можно судить по данным, представленным в табл. 1, ФАН умеренно, но статистиче-

ски значимо тормозил рост рака Эрлиха. Максимальный эффект наблюдался через 13 дней после перевивки (56%), но даже через 26 дней торможение роста опухоли составило 42%.

Несмотря на очевидные удобства работы с перевиваемыми опухолями они имеют также ряд недостатков, а именно: а) высокий процент ложноположительных данных и, соответственно, невысокую степень предсказательности результатов, полученных на перевиваемых опухолях, для клиники; б) каждый штамм перевиваемой опухоли есть в сущности одна индивидуальная опухоль, растущая на разных животных, а в случае использования животных инбредных линий — фактически на одном и том же животном, что приводит к тестированию практически всех исследуемых субстанций только на ограниченном числе индивидуальных опухолей; в) на рост перевиваемой опухоли может оказывать огромное влияние изменение трансплантационного иммунитета хозяина, что приводит к получению ложноположительных результатов; г) критерии, используемые в экспериментальной онкологии для оценки активности в опытах на перевиваемых опухолях (процент торможения роста опухоли и процент увеличения продолжительности жизни животных), существенно отличаются от критериев, используемых в клинике (процент ремиссий и их длительность).

Указанных недостатков лишены аутохтонные опухоли животных, как спонтанные, так и индуцированные канцерогенами. Каждая аутохтонная опухоль индивидуальна и обладает, в определенных пределах, своей скоростью роста. Аутохтонные опухоли значительно более дифференцированы и значительно медленнее растут, чем перевивные. Наконец, они идентичны по гистогенезу опухолям человека аналогичной локализации. Еще в 60-х годах прошлого века высказывалось предположение, что результаты терапевтических экспериментов, проведенных на аутохтонных опухолях животных, почти идеально должны соответствовать клиническим на-

Таблица 1

Влияние фторацетата натрия (ФАН) на рост солидного рака Эрлиха

Параметры	День после перевивки				
	0	13	17	22	26
Контроль — физиологический раствор NaCl					
Число животных	14	14	11	11	11
Объем опухоли, мм ³ ($M \pm m$)	0	1271±149	2330±149	4887±539	6440±600
ФАН, 1,25 мг/кг внутрибрюшинно, 14 раз					
Число животных	13	13	12	9	8
Объем опухоли, мм ³ ($M \pm m$)	0	563±92*	1534±240*	2939±676*	3760±1069
Торможение роста опухоли		56%	34%	40%	42%

* — $p < 0,05$ по сравнению с контролем

блюдениям, что нашло затем полное подтверждение во многих лабораториях [3, 5, 10, 13].

Результаты эксперимента с индуцированными опухолями представлены в табл. 2.

В отличие от эксперимента с перевиваемым раком Эрлиха, в опыте с индуцированными саркомами ФАН в режиме монотерапии не был активен, что подтверждает важность проведения исследований новых препаратов на аутохтонных моделях. В то же время в комбинации с циклофосфамидом ФАН статистически значимо увеличивал относительное число опухолей с уменьшившимся объемом и продолжительность этого эффекта. Так, при введении ФАН в дозе 0,5 мг/кг в сочетании с циклофосфамидом в 1,4 раза возрос процент опухолей с неизменившимся или уменьшившимся объемом, тогда как продолжительность эффекта возросла в 2,4 раза. При использовании ФАН в дозе 1 мг/кг в сочетании с циклофосфамидом процент опухолей с неизменившимся или уменьшившимся объемом возрос в 1,8 раз, а продолжительность эффекта — в 1,9 раз.

Полученные данные дают основания для более серьезного изучения фторацетата натрия в онкологии. Сочетанное использование токсических препаратов, имеющих различные молекулярные мишени, может существенно повысить противоопухолевый эффект, притом что токсический эффект такого комплекса не будет превышать суммы токсических эффектов его компонентов. Дальнейшие исследования должны быть направлены на изучение молекулярного механизма противоопухолевого эффекта ФАН и экспериментальную разработку более адекватного режима введения ФАН в сочетании с традиционными противоопухолевыми препаратами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуков Н.В. Современное состояние антиангиогенной терапии. Целевая терапия без мишени? // *Практ. онкол.* — 2007. — Т. 8. — № 3. — С. 164–172.
2. Зинченко В.П., Гончаров Н.В., Теплова В.В. и др. Изучение взаимосвязи внутриклеточных сигнальных и метаболических путей при ингибировании митохондриальной аконитазы фторацетатом // *Цитология* — 2007. — Т. 49. — С. 1041–1050.
3. Amberger H. Different autochthonous models of colorectal cancer in the rat // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* — 1986. — Vol. 111. — P. 157–159.
4. Cavallo T., Sade R., Folkman J., Cotran R.S. Tumor angiogenesis. Rapid induction of endothelial mitoses demonstrated by autoradiography // *J. Cell Biol.* — 1972. — Vol. 54. — N. 2. — P. 408–420.
5. Cheng L., Ramesh A.V., Flesken-Nikitin A. et al. Mouse models for cancer stem cell research // *Toxicol. Pathol.* — 2010. — Vol. 38. — P. 62–71.
6. Ebos J.M., Lee C.R., Cruz-Munoz W. et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis // *Cancer Cell.* — 2009. — Vol. 15. — P. 232–239.
7. Folkman J., Merler E., Abernathy C., Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis // *J. Exp. Med.* — 1971. — Vol. 133. — P. 275–288.
8. Goncharov N.V., Jenkins R.O., Radilov A.S. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research // *J. Appl. Toxicol.* — 2006. — Vol. 26. — P. 148–161;.
9. Goncharov N., L. Glashkina, E. Savelieva et al. Fluoroacetate // R.C. Gupta (Ed.) *Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents.* Elsevier Inc., Oxford, 2009. — P. 177–198.
10. Iyengar S., Houvras Y., Ceol C.J. Screening for melanoma modifiers using a zebrafish autochthonous tumor model // *J. Vis. Exp.* — 2012. — Vol. 69: e50086.
11. Pàez-Ribes M., Allen E., Hudock J. et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis // *Cancer Cell.* — 2009. — Vol. 15. — P. 220–231.
12. Pasquier E., Kieran M.W., Sterba J. et al. Moving forward with metronomic chemotherapy: meeting report of the 2nd International Workshop on Metronomic and Anti-Angiogenic Chemotherapy in Paediatric Oncology // *Transl. Oncol.* — 2011. — Vol. 4. — P. 203–211.
13. Zeller W.J., Berger M.R. Chemically induced autochthonous tumor models in experimental chemotherapy // *Behring Inst. Mitt.* — 1984. — Vol. 74. — P. 201–208.
14. Zinchenko V.P., Goncharov N.V., Teplova V.V. et al. Polarographic and spectroscopic studies of the effects of fluoroacetate/fluorocitrate on cells and mitochondria // *Spectroscopy Int. J.* — 2007. — Vol. 21. — P. 121–134.

Таблица 2

Влияние фторацетата натрия (ФАН), циклофосфамида и их комбинации на рост индуцированных сарком у мышей

Группа	Число животных	Количество и % опухолей с неизменившимся или уменьшившимся объемом	Средняя продолжительность эффекта, недели
Контроль, физраствор	10	0	—
ФАН 0,5 мг/кг, 5 раз в неделю, 15 раз	5	0	—
ФАН 1 мг/кг, 5 раз в неделю, 15 раз	5	0	—
Циклофосфамид 200 мг/кг, 1 раз	20	10 (50%)	1,1±0,10
Циклофосфамид 200 мг/кг, 1 раз + ФАН 0,5 мг/кг, 5 раз в неделю, 15 раз	10	7 (70%)	2,6±0,37*
Циклофосфамид 200 мг/кг, 1 раз + ФАН 1 мг/кг, 5 раз в неделю, 15 раз	10	9 (90%)*	2,1±0,41*

* — отличие от группы, получавшей только циклофосфамид (p<0,05)

*I.V. Anikin¹, N.V. Goncharov², M.L. Tyndyk¹,
N.G. Voitenko², G.B. Pliss¹, M.A. Zabezhinski¹,
I.G. Popovich¹, V.N. Anisimov¹*

**EFFECT OF SODIUM FLUOROACETATE
ON EHRlich SOLID TUMOR
AND AUTOCHTHONOUS SARCOMA GROWTH
IN MICE**

1N.N. Petrov Research Institute of Oncology
2I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and
Biochemistry, St. Petersburg, Russia

Due to biochemical characteristics of toxic action of fluoroacetate on energetics and metabolism of cells, including tumor cells, it was interesting to testify sodium fluoroacetate (SFA) for its antitumor activity in vivo. We have estimated that SFA significantly inhibits growth of Ehrlich tumor carcinoma. In experiments with autochthonous induced by benzo[a]pyrene subcutaneous tumors, SFA was not active in monotherapy regime, though potentiated antitumor effect of cyclophosphamide, significantly increasing the relative number of mice with stabilized or decreased tumor volume as well as the duration of this effect. The data obtained render basis for additional studies of mechanism of antitumor effect of SFA.

Поступила в редакцию 05.07.2013