

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИОПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИКОПИНА НА МОДЕЛИ РАКА ПИЩЕВОДА, ИНДУЦИРОВАННОГО У КРЫС N-МЕТИЛ-N-БЕНЗИЛНИТРОЗАМИНОМ

И.И. Басиева¹, Л.З. Болиева¹, А.В. Сергеев²

¹ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Россия, 362019, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40;

²ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Россия, 115478, г. Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Басиева Инна Исламовна bolievalz@mail.ru

Введение. Рак пищевода занимает 6-е место в мире в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями и характеризуется значительной территориальной вариабельностью заболеваемости.

Цель исследования — сравнительное изучение химиопрофилактической активности ликопина в отношении новообразований пищевода, индуцированных у крыс N-метил-N-бензилнитрозамином.

Материалы и методы. Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 160–180 г. Новообразования пищевода индуцировали введением с питьевой водой N-метил-N-бензилнитрозамина в разовой дозе 0,5 мг/кг массы тела в 10 % растворе этилового спирта ежедневно в течение 8 нед.

Результаты. Применение ликопина в дозе 50 мг/кг массы тела приводило к статистически достоверному снижению частоты возникновения новообразований в группе животных, получавших канцероген, со 100 до 44 % ($p < 0,05$). Количество опухолей на одну особь в группе животных, получавших ликопин, достоверно уменьшилось в 2,4 раза ($p < 0,05$). Средний балл микроскопических изменений снизился под воздействием ликопина в 2,4 раза ($p < 0,001$) по сравнению с группой животных, получавших канцероген, что свидетельствует о торможении процессов малигнизации неопластических изменений в органе-мишени. Дополнительное введение ликопина экспериментальным животным, получавшим N-метил-N-бензилнитрозамин, препятствовало формированию дисбаланса в системе перекисного окисления липидов — антиоксидантной защиты: снижению активности антиоксидантных ферментов и накоплению основного продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида.

Выводы. Согласно полученным на данном этапе исследований результатам, каротиноид ликопин обладает антиоксидантной и химиопрофилактической активностью.

Ключевые слова: канцерогенез, рак пищевода, химиопрофилактика, ликопин

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-32-35

COMPARATIVE STUDY OF CHEMOPREVENTIVE ACTIVITY OF LYCOPENE ON EXPERIMENTAL MODEL OF ESOPHAGUS CANCER INDUCED BY N-METHYL-N-BENZYLNITROSOUREA IN RATS

I.I. Basieva¹, L.Z. Bolieva¹, A.V. Sergeev²

¹North-Ossetian State Medical Academy; 40 Pushkinskaya St, Vladikavkas, 362019, Russia;

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Cancer of the esophagus is the sixth most common malignancy worldwide and there is a remarkable variation in the incidence of esophageal cancer in different parts of the world.

Objective: The present study was designed to evaluate chemopreventive activity of lycopene on esophagus carcinogenesis induced by N-methyl-N-benzylnitrosourea in rats.

Methods. The study was conducted on male Wistar rats with body weight at the beginning 160–180 g. Tumors of esophagus were induced by N-methyl-N-benzylnitrosourea in dose of 0.5 mg/kg body weight in 10 % ethanol given daily with drinking water during 8 weeks.

Results. Lycopene given in dose of 50 mg/kg reduced incidence of tumors of esophagus from 100 % in N-methyl-N-benzylnitrosourea group to 44 % ($p < 0.05$). Lycopene also inhibited tumor multiplicity, the standard end point in this tumor model 2.4 times in comparison with N-methyl-N-benzylnitrosourea group ($p < 0.005$). The average score of neoplastic changes decreased 2.4 times in lycopene group ($p < 0.001$) and indicates inhibition of malignization of neoplastic changes in target organ. Additional feeding of N-methyl-N-benzylni-

trosoarea-treated rats with lycopene prevented formation of the imbalance in lipid peroxidation – antioxidant defense system by prevention of inhibition of antioxidant enzymes and accumulation of malonic dialdehyde.

Conclusion. *At this stage of our study, we can conclude that lycopene appears to be worthy of consideration as an antioxidant, and anti-tumor medicine.*

Key words: *carcinogenesis, esophagus cancer, chemoprevention, lycopene*

Введение

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями человека рак пищевода занимает шестое место в мире, однако заболеваемость и смертность варьируют в широких пределах в зависимости от географического региона. Наиболее высокие уровни заболеваемости отмечены в северных районах Китая, Казахстане, Киргизии, Монголии, Иране, Прикаспийском регионе. В России в структуре заболеваемости рак пищевода составляет 2,5 % всех злокачественных новообразований у мужчин и 0,68 % у женщин и занимает соответственно 11-е и 18-е места, а в структуре смертности – 7-е место, при этом наиболее высокая частота наблюдается в Республике Саха, Бурятии, на Алтае, в Чеченской Республике и Чукотском автономном округе [1, 2].

Наличие эндемичных регионов и, соответственно, групп высокого риска заболеваемости плоскоклеточным раком пищевода позволяет говорить о целесообразности проведения в данной популяции мероприятий по первичной профилактике злокачественных новообразований. Учитывая имеющиеся в литературе данные о наличии у каротиноида ликопина химиопрофилактической активности, а также данные о высокой безопасности ликопина, представляется актуальным изучение антиканцерогенной активности данного каротиноида на модели плоскоклеточного рака пищевода [3–6]. Ликопин, в отличие от бета-каротина, не превращается в ретиноиды (ретинол, ретиналь, ретиноевая кислота и др.) и обладает ярко выраженными антиоксидантными и антиканцерогенными свойствами [7, 8].

Целью нашего исследования было изучение химиопрофилактической активности ликопина на модели рака пищевода, индуцированного у крыс N-метил-N-бензилнитрозамином (МБН).

Материалы и методы

Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 160–180 г, полученных из вивария Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Животные содержались в стандартных условиях вивария при температуре 20–22 °С и естественном

световом режиме, получали стандартный рацион и без ограничений питьевую воду. После двухнедельного карантина животных делили на группы случайным образом. В контрольные и опытные группы входили половозрелые животные одного возраста, полученные одновременно из вивария, разброс по исходной массе тела составил не более 10 %. Эксперименты проводились в соответствии с действующими нормативными актами Российской Федерации [9, 10].

Новообразования пищевода индуцировали введением с питьевой водой МБН в разовой дозе 0,5 мг/кг массы тела в 10 % растворе этилового спирта ежедневно в течение 8 нед [11]. Животные были разделены на 4 группы по 25 крыс в каждой. Крысы I группы служили интактным контролем. Животные получали: во II группе только канцероген, в III группе – 10 % раствор этанола с питьевой водой, в IV группе – МБН и дополнительно с кормом ликопинсодержащую биологически активную добавку «Томатол» (ЗАО «Биопрогресс», Россия) ежедневно в дозе 50 мг/кг массы тела в пересчете на ликопин [6].

Продолжительность опыта составила 36 нед после начала введения канцерогена. Павших в ходе эксперимента и забитых по его окончании животных подвергали патологоанатомическому исследованию. Все новообразования в пищеводе, глотке и преджелудке подсчитывали и измеряли. Отдельно фиксировали изменения в следующих отделах: глотке, верхней трети пищевода (от глотки до уровня бифуркации трахеи), средней трети пищевода (от уровня бифуркации трахеи до уровня диафрагмы), нижней трети пищевода (от уровня диафрагмы до входа в преджелудок), собственно в преджелудке. Материал, взятый для гистологического исследования, фиксировали в 10 % растворе формалина и подвергали микроскопическому исследованию после окраски срезов гематоксилином и эозином. Эффективность модифицирующего воздействия оценивали по изменению частоты возникновения, множественности и степени малигнизации новообразований в опытных группах по сравнению с контрольной. Частоту возникновения новообразований определяли по отношению к эффективному числу животных (доживших до появления первой опухоли). Индекс множественности рассчитывали по отношению к эффективному числу крыс и числу крыс с опухолями. Микроскопические изменения в пищеводе оценивали по трехбалльной

системе: предопухолевые изменения — 1 балл, папилломы — 2 балла, рак — 3 балла [12].

Состояние системы перекисного окисления липидов — антиоксидантной защиты (ПОЛ — АОЗ) оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), активности каталазы (КТ), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП) в эритроцитах [13–16].

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с помощью программного обеспечения «Statistica 10.0». Для анализа данных использовали среднюю величину выборки (M) и ошибку средней (m). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Эксперимент был завершен, когда в II группе, получавшей только канцероген, пали все животные. В то же время в I группе оставались 22 крысы, или 88 % ($p < 0,05$), в III группе — 20 крыс, или 80 % ($p < 0,05$), в IV группе — 12 крыс, или 48 % ($p < 0,05$). К концу эксперимента средняя масса животных в группах составила $286,2 \pm 6,4$ г, $218,2 \pm 5,2$ г, $268,7 \pm 5,6$ г, $276,4 \pm 4,6$ г ($p < 0,05$) соответственно. До обнаружения первой опухоли в II группе дожили 23 крысы, в остальных группах — по 25 крыс.

Множественные новообразования пищевода, глотки и преджелудка развились у 100 % животных II группы; в IV группе новообразования развились у 11 крыс, или у 44 % ($p < 0,05$), в I и III группах новообразований не обнаружено (табл. 1). Опухоли располагались на слизистой оболочке и имели вид округлых образований диаметром 0,1–0,4 см (в единичных случаях — 0,5 см и более). Наибольшее число опухолей развивалось в пищеводе. Не было выявлено новообразований других локализаций и метастази-

рования развившихся опухолей. В группе животных, получавших ликопин, количество опухолей на одно животное достоверно снизилось в 2,4 раза ($p < 0,05$). При морфологическом анализе установлено, что опухоли развивались на фоне гиперплазии и (или) дисплазии эпителия. Гистологически большинство новообразований классифицировались как папилломы. Плоскоклеточные карциномы были обнаружены у 14 (58,3 %) крыс II группы. Карциномы встречались в виде одиночных узлов до 15 мм в диаметре и имели экзофитный или инфильтративный рост. При балльной оценке микроскопических изменений получены следующие результаты (табл. 1): средний балл составил $2,6 \pm 0,12$ во II группе и $1,08 \pm 0,04$ ($p < 0,001$) в группе животных, получавших ликопин.

Оценка состояния системы ПОЛ–АОЗ дала следующие результаты. В группе животных, получавших канцероген, выявлено статистически достоверное повышение содержания МДА и понижение активности СОД, КТ и ГП по сравнению с группой крыс интактного контроля. Дополнительное введение экспериментальным животным, получавшим МБН, ликопина препятствовало формированию дисбаланса в системе ПОЛ–АОЗ: снижению активности антиоксидантных ферментов и накоплению основного продукта ПОЛ–МДА (табл. 2).

Анализ полученных данных свидетельствует о наличии у ликопина антиканцерогенной активности в отношении новообразований пищевода, индуцированных МБН, которая в условиях проведенного эксперимента проявилась в статистически достоверном снижении частоты возникновения опухолей и индекса множественности в группе животных, получавших ликопин, а также в значимом уменьшении степени малигнизации развившихся новообразований во всех опытных группах животных, что согласуется с имею-

Таблица 1. Влияние ликопина на возникновение опухолей пищевода, индуцированных у крыс *N*-метил-*N*-бензилнитрозамином

Группа, воздействие	Эффективное число крыс в группе	Все локализации (глотка, пищевод, преджелудок)			Пищевод		
		Число крыс с опухолями	ИМ	Микроскопическая оценка, баллы	Число крыс с опухолями	ИМ	Микроскопическая оценка, баллы
I — Интактный контроль	25	—	—	—	—	—	—
II — МБН	24	24 (100 %)	$7,7 \pm 1,1$	$2,6 \pm 0,12$	24 (100 %)	$6,9 \pm 1,2$	$2,6 \pm 0,12$
III — 10 % раствор этанола	25	—	—	—	—	—	—
IV — МБН + ликопин	25	11 (44 %)**	$3,2 \pm 0,6^{**}$	$1,08 \pm 0,04^{***}$	11 (44 %)**	$2,9 \pm 0,5^{*}$	$1,08 \pm 0,04^{***}$

Примечания: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ — различия с контрольной группой достоверны.

Сокращения: ИМ — индекс множественности (количество опухолей на одно животное), МБН — *N*-метил-*N*-бензилнитрозамин.

Таблица 2. Влияние ликопина на систему ПОЛ–АОЗ в крови экспериментальных животных

Группа	СОД, ед/мг	КТ, ед/мг	ГП, ед/мг	МДА, нмоль/мг
I	172,2 ± 14,3	28,4 ± 2,1	33,6 ± 3,4	8,4 ± 0,5
II	96,3 ± 7,3*	14,8 ± 1,7*	18,4 ± 2,2*	12,6 ± 0,8*
III	168,4 ± 12,2	26,4 ± 2,3	31,4 ± 3,1	8,1 ± 0,8
IV	128,2 ± 11,3**	22,6 ± 2,1**	26,4 ± 2,8**	9,4 ± 0,7**

Примечания: * $p < 0,05$ – различия с I группой достоверны; ** $p < 0,05$ – различия со II группой достоверны.

Сокращения: СОД – супероксиддисмутаза, КТ – каталаза, ГП – глутатионпероксидаза, МДА – малоновый диальдегид.

щимися в литературе данными о его химиопрофилактических свойствах. Одним из основных механизмов антиканцерогенного действия ликопина является, по-видимому, его способность препятствовать нарушению баланса в системе ПОЛ – АОЗ [3–6, 8, 17].

Заключение

Таким образом, проведенный эксперимент демонстрирует, что ликопин обладает антиканцерогенной

активностью в отношении канцерогенеза пищевода, индуцированного у крыс МБН. Учитывая благоприятное соотношение эффективности и безопасности, представляется целесообразным дальнейшее экспериментальное и клиническое изучение химиопрофилактической активности ликопина для определения перспектив его применения в качестве средства первичной профилактики плоскоклеточного рака пищевода у человека.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдов М.И., Ганцев Ш.Х. Онкология: учебник. 2010.
2. Полоцкий Б.Е., Тер-Ованесов М.Д., Давыдов М.И., Стилиди И.С. Рак пищевода: современные подходы к диагностике и лечению. Русский медицинский журнал 2006;14: 1006–1010.
3. Gloria N.F., Soares N., Brand C. et al. Lycopene and beta-carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines Anticancer Res 2014;34(3): 377–1386. PMID: 24596385.
4. Kim M.J., Kim H. Anticancer effect of lycopene in fastric carcinogenesis. J Cancer Prev 2015;20(2):92–6. doi: 10.15430/JCP.2015.20.2.92. PMID: 26151041
5. Konijeti R., Henning S., Moro A. et al. Chemoprevention of prostate cancer with lycopene in the TRAMP model. Prostate 2010;70:1547–1554. doi: 10.1002/pros.21190. PMID: 20687227
6. Luo C., Wu X.-G. Lycopene enhances antioxidant enzyme activities and immunity function in N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric cancer rats. Int J Mol Sci 2011;12:3340–3351. doi: 10.3390/ijms12053340. Epub 2011 May 23. PMID: 21686188
7. Trumbo P.R. Are there adverse effects of lycopene exposure? J Nutr 2005;135(8):2060–2061. PMID: 16046742
8. Wang Y., Ausman L.M., Greenberg A.S. et al. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats Int J Cancer 2010;126(8):1788–1796.
9. Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Доступно на: <http://www.rg.ru/2010/10/22/laboratornaya-praktika-dok.html>.
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005.
11. Болиева Л.З., Джигоев Ф.К., Коростелев С.А. Ингибирующее влияние отечественного синтетического бета-каротина на возникновение у крыс опухолей пищевода, глотки и преджелудка, индуцированных N-метил-N-бензилнитрозамином. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 1995;6(3):21–24.
12. Гуркало В.К., Забежинский М.А. Модифицирующий эффект гемитона, кофеина и этилового спирта на канцерогенез, вызванный N-нитрозодизэтиламином. Экспериментальная онкология 1982;4(3):25–28.
13. Справочник по лабораторным методам исследования. Под ред. Л.А. Даниловой. СПб.: Питер, 2003.
14. Aebi H.E. Catalase. In: Bergmeyer H.U. (Ed.). Methods of enzymatic analysis. Weinheim: Verlag Chemie, 1983: 273–286.
15. Flohe L.; Gunzler W.A. Assays of glutathione peroxidase Meth. Enzymol 1984;105:114–121.
16. Marklund S., Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase Eur J Biochem 1974;47:469–474.
17. Койбаева М.Т., Болиева Л.З., Решетникова В.В., Сергеев А.В. Влияние ликопина на возникновение опухолей печени, индуцированных у крыс N-нитрозодизэтиламином. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(2):26.