

*М.А. Осипов, В.Н. Анисимов, И.Г. Попович, Т.Ю. Семиглазова*

## Мелатонин усиливает противоопухолевый эффект доксорубицина на модели перевиваемой опухоли Эрлиха у самок мышей SHR

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

На модели перевиваемой опухоли Эрлиха у самок-мышей SHR был изучен сочетанный эффект противоопухолевого действия однократного введения доксорубицина и индольного гормона эпифиза мелатонина. Мелатонин в подопытных группах животные получали либо в дозе 10 мг/кг подкожно (по 0,2 мл раствора) в ночные часы (с 20:00 до 8:00) 5 раз в неделю на протяжении 3 недель, либо в концентрации 10 мг/л с питьевой водой в вечернее время также на протяжении 3 недель. Результаты исследования показали, что сочетанное введение доксорубицина и мелатонина как при подкожном его введении, так и с питьевой водой приводит к статистически значимому торможению роста опухоли по сравнению с контролем и доксорубицином.

**Ключевые слова:** доксорубицин, мелатонин, перевиваемая опухоль Эрлиха, мыши SHR

В 21-м веке заболеваемость злокачественными опухолями демонстрирует тенденцию к повышению. Современные противоопухолевые препараты, используемые в онкологии, позволяют добиться контроля над заболеванием, но ни один из них не обладает стопроцентной эффективностью. Поиск новых подходов к лекарственному лечению опухолей представляет собой актуальную задачу. Мелатонин (МЛТ), индольный гормон эпифиза, основной ритмоводитель организма, и вырабатываемый в ночное время суток [2]. Установлено, что функция мелатонина не ограничивается регулированием цикла сон – бодрствование [20]; МЛТ обладает антиоксидантными свойствами [19] и геропротекторными свойствами [7]. Рецепторы к нему обнаружены в сетчатке, головном мозге, супрахиазматических ядрах, яичниках, мозговых и периферических артериях, почках, поджелудочной железе, иммунных клетках и адипоцитах [13]. Мелатонин способен не только препятствовать развитию спонтанных новообразований у мышей [8], но и тормозить у них индуцированный канцерогенез [9,11,14,15,17,22]. Однако, на некоторых моделях МЛТ может, напротив, провоцировать развитие опухолей и способствовать опухолевому росту [10]. Влияние МЛТ на продолжительность жизни

и развитие опухолей зависит от дозы, причем малые дозы МЛТ тормозят канцерогенез, тогда как большие дозы могут способствовать развитию опухолей [8]. Было изучено действие МЛТ на рост перевиваемых опухолей у животных [1,12,16,18], но лишь немногочисленные работы посвящены изучению его совместного действия с цитостатиками на рост перевиваемых опухолей у животных [3-5]. В настоящей работе впервые представлены данные о потенцирующем эффекте МЛТ в отношении противоопухолевого действия доксорубицина (ДР) на модели перевиваемой опухоли Эрлиха у самок мышей SHR.

### Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с методическими указаниями по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ [6]. В работе использованы 61 самка мышей SHR 3 мес. возраста весом 22-26 г. Животные содержались в пластиковых клетках со стальными решетками типа ТЗ и получали питьевую воду и полнорационный брикетированный корм ПК-120. Опухоль Эрлиха была перевита всем мышам подкожно в правый бок в объеме 0,2 мл 10% суспензии клеток. Через 48 часов после перевивки опухоли (ППО) животные были рандомизированно распределены на 6 групп по компьютерной программе (SAS/StatUsersGuide, version 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc; 2009. SAS institute Inc./gphpad.com, quckcalls). Все животные получали изучаемые препараты согласно схеме (табл.1).

**Таблица 1.**  
**Схема опыта**

№	Воздействие	Мелатонин	Число мышей
1	0,9% р-р NaCl в/бр, 0,2 мл/мышь x1 и п/к 5 раз/нед. в течение 3 нед.	-	11
2	-	10 мг/кг п/к в вечернее время 5 раз/нед. в течение 3 нед.	11
3	-	10 мг/л с питьевой водой по ночам в течение 3 нед.	10
4	Доксорубицин, 5 мг/кг в/бр x1		10
5	Доксорубицин, 5 мг/кг в/бр x1	10 мг/кг п/к в вечернее время 5 раз/нед. в течение 3 нед.	10
6	Доксорубицин, 5 мг/кг в/бр x1	10 мг/л с питьевой водой по ночам в течение 3 нед.	10

Животные 1 –й группы (n=11) служили контролем и подвергались однократному внутрибрюшинному (в/бр) введению 0,2 мл 0,9% физиологического раствора (NaCl) с 0,02 мл этанола. Подкожное введение 0,9% NaCl с 0,008

мл этилового спирта осуществлялось 5 раз в неделю на протяжении 3 недель в вечернее время (после 17 часов). В дневное время животные пили обычную водопроводную воду, в вечернее время – питьевую водопроводную воду с 0,008 мл этилового спирта. Мыши 2-й группы (n=10) получали мелатонин подкожно (п/к) в дозе 10 мг/кг (по 0,2 мл раствора) в вечернее время 5 раз в неделю на протяжении 3 недель. Животные 3-й группы (n=10) получали мелатонин в концентрации 10 мг/л с питьевой водой в ночные часы (с 20:00 до 8:00) 5 последовательных дней в неделю на протяжении 3 недель. Мыши 4-й группы (n=10) получали доксорубин (ДР) в дозе 5 мг/кг в/б однократно в дневное время. Для получения раствора доксорубина во флакон с 50 мг препарата добавляли 100 мл 0,9 % NaCl и получали раствор с концентрацией 0,5 мг/мл. Дозы ДР и объем раствора препарата рассчитывали в зависимости от веса животных. 5-я группа мышей (n=10) получала мелатонин, как во 2-й группе, и ДР, как в 4-й группе мышей. Животные 6-й группы (n=10) получали мелатонин, как в 3-й группе, и ДР, как в 4-й. Ежедневно осматривали всех животных и отмечали время появления опухолей. Регулярно (два раза в неделю) у всех животных измеряли длину и ширину опухолевых узлов. 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 опухоли рассчитан по формуле:  $(VK-VO)/VK*100\%$ , где VK – средний объем опухоли в контрольной группе, а VO – средний объем опухоли в опытной группе. Ускорение роста опухоли, рассчитывали по аналогичной формуле и отмечали на бланках со знаком минус (-), соответственно. Эксперимент был завершен через 39 дней ППО, когда в большинстве групп осталось менее половины животных. Результаты, полученные при проведении экспериментов, были подвергнуты статистической обработке по методу Стьюдента с помощью компьютерной программы STATGRAPH. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Основные результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Подкожное введение МЛТ (2-я гр.) приводило к торможению роста опухоли (от 4% до 45%) только с 28-го дня ППО и до конца эксперимента (39-й день ППО), однако, эти результаты не достигали статистической достоверности при сравнении с контрольной группой мышей. На других сроках наблюдения отмечали некоторую стимуляцию роста опухоли, которая также не

имела статистически достоверного различия с контролем. Аналогичные результаты были получены при изучении ведения МЛТ с питьевой водой (3-я гр.) в концентрации 10 мг/л в ночные часы на протяжении 3 недель. Тенденцию к торможению роста опухоли наблюдали на 25-й и 28-й день ППО (3% и 8%, соответственно) и 35-й и 39-й день ППО (33%). В остальные дни эксперимента у животных этой группы отмечали тенденцию к увеличению роста опухоли, что не было статистически достоверно по сравнению с контрольными мышами.

Однократное введение ДР в дозе 5 мг/кг (4-я гр.) приводило к торможению роста опухоли только в конце периода наблюдения – 35-й и 39-й день ППО, причем, по сравнению с контрольной группой различия были статистически достоверными ( $p = 0,01$ ) только на 39-й день ППО (60%). До 35-го дня ППО в этой группе наблюдали стимуляцию роста опухоли, которая не достигала статистически значимого уровня по сравнению с контролем.

При сочетанном введении ДР и МЛТ (п/к 10 мг/кг) (5-я гр.) наблюдали торможение роста опухоли по сравнению с контрольной группой мышей на всем протяжении опыта, причем, статистически достоверные различия отмечены в период от 31-го до 39-го дня ППО на 47-62%. При сравнении с мышами, получавшими только ДР (4-я гр.), в группе сочетанного введения ДР и МЛТ наблюдали более выраженное торможение роста опухоли на протяжении всего эксперимента, при этом статистически достоверные или близкие к достоверным различия были отмечены с 25-го по 35-й день ППО ( $p = 0,010 - 0,07$ ). По сравнению с группой животных, получавших только МЛТ п/к (3-я гр.), не обнаружено статистически достоверных различий.

При введении ДР и МЛТ с питьевой водой (10 мг/л) (6-я гр.) на протяжении всего эксперимента отмечали торможение роста опухоли (за исключением 14-го дня ППО) по сравнению с контрольными животными, причем статистически достоверные различия ( $p = 0,004-0,048$ ) на-

Таблица 2.  
Влияние ДР и МЛТ на рост перевиваемой опухоли Эрлиха у самок мышей SHR

Воздействие	Время после перевивки опухоли, сутки						
	11	14	21	28	31	35	39
	Средние размеры опухоли, мм <sup>2</sup>						
Контроль	0,7±0,30	1,1±0,31	2,1±0,33	4,6±0,81	5,4±0,73	8,6±1,35	9,0±1,12
МЛТ п/к	0,9±0,38	1,4±0,54	2,4±0,68	4,4±1,65	4,1±1,47	4,7±1,55	6,0±1,24
МЛТ внутрь	0,7±0,21	1,7±0,45	2,2±0,43	4,2±1,26	6,1±1,67	5,8±2,05	6,0±2,00
ДР	0,9±0,27	1,9±0,44	3,0±0,69	5,8±1,26	7,1±1,53	7,5±1,41	3,6±1,41**
ДР+ МЛТ п/к	0,6±0,16	0,9±0,29	1,6±0,42	2,7±0,95	2,2±0,61*##	3,3±1,10*	4,8±1,46*
ДР+МЛТ внутрь	0,7±0,29	1,3±0,56	1,5±0,60	2,1±0,84*#	2,5±0,93*#	2,7±1,13*#	4,4±1,74*

Примечания. Различия с соответствующими показателями для мышей 1 й группы достоверно \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Различия с соответствующими показателями для мышей 4 й группы достоверно #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ . Значение сокращений см. в тексте

**Таблица 3.**  
**Влияние комбинации МЛТ с цитостатиками на рост перевиваемых опухолей у животных**

Вид, линия	Опухолевый штамм	Цитостатик		МЛТ		Наблюдаемый эффект	Ссылка
		Доза	Доза	Доза	Способ введения		
МышиSHR	Эрлих	В/бр. ДР	5 мг/кг	10 мг/кг 10 мг/л	П/к per os	усиление усиление	Осипов М.А., 2015 (в печ.)
МышиFVB	HER 2/neu	В/бр. ЦП Г ДР ТТ	8 мг/кг 25мг/кг 5 мг/кг, 20 мг/кг	10 мг/л	per os	не влияет усиление не влияет не влияет	[5]
МышиSHR	Эрлих	В/бр. ДР ДР	5 мг/кг 2 мг/кг	10 мг/кг	В/бр.	не влияет усиление	[4]
МышиSHR	Эрлих	В/бр: ЦФ ННМ	200 мг/кг 50 мг/кг	5 мг/кг 20 мг/л	П/к per os	не влияет не влияет	[3]

**Примечания.** ЦП – цисплатин, Г – гемцитабин, ТТ – доцетаксел, ЦФ – циклофосфамид, ННМ – нитрозометилмочевина.

блюдали только в последние 10 дней опыта (с 28-го по 39-й день ППО) – (от 51% до 68% торможения роста опухоли). По сравнению с группой мышей, получавших только ДР однократно (4-я гр.), противоопухолевый эффект был более выраженным, статистически достоверные или близкие к достоверным различия в торможении роста опухоли отмечали с 25-го по 35-й день ППО ( $p = 0,02 - 0,07$ ). При сравнении с группой животных, получавших только МЛТ с питьевой водой (3-я гр.), не было отмечено статистически достоверного торможения роста опухоли, хотя тенденция к снижению объема опухоли наблюдалась на протяжении всего эксперимента.

Таким образом, использованное нами в данном эксперименте однократное внутривенное введение ДР в дозе 5 мг/кг через 48 часов ППО не оказывало выраженного противоопухолевого эффекта. Следует отметить, что сочетанное введение ДР и МЛТ как при подкожном, так и при введении его с питьевой водой в ночное время приводило к торможению роста перевиваемой опухоли Эрлиха практически на всем протяжении опыта, причем статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой животных наблюдались от 31-го до 39-го дня ППО (5-я гр.) и с 28-го по 39-й день ППО (6-я гр.).

Использованная схема введения (противоопухолевый препарат ДР однократно в/б в дозе 5 мг/кг и МЛТ п/к в дозе 10 мг/кг или с питьевой водой в концентрации 10 мг/л в ночные часы), начиная через 48 часов ППО, оказывает тормозящий эффект на рост перевиваемой опухоли Эрлиха. Торможение роста опухоли при сочетанном введении ДР и МЛТ было более выраженным, чем при введении только ДР и может быть также обусловлено спецификой введения МЛТ (в вечернее время) [11,21].

При изучении противоопухолевой активности новых фармакологических веществ необходимо

использовать модели ориентированные на оценку скорости роста опухоли, в частности, перевиваемые *in vivo* опухолевые системы с генерализованным и солидным характером роста. Параметрами оценки результатов этих опытов являются: перевиваемость опухолей, скорость роста опухоли и время жизни животных с опухолью. Одной из наиболее распространенных моделей опухолей мышей является рак Эрлиха. Результаты, полученные на перевиваемой опухоли Эрлиха, могут иметь существенное значение, поскольку свойства данной модели, как предполагается, наиболее приближены к характеристикам некоторых опухолей человека, обладающих различными биологическими параметрами и лекарственной чувствительностью [6]. Согласно результатам исследований на животных с перевитыми опухолями, где МЛТ применялся совместно с цитостатиками, он не только не ослабляет противоопухолевый эффект препаратов, но и способен потенцировать его (табл. 3).

Ранее было показано, что совместное применение МЛТ с циклофосфамидом и нитрозометилмочевинной не ослабляло их противоопухолевую эффективность (табл. 3 и [3]). Сочетанное применение доцетаксела, доксорубина и цисплатина с МЛТ существенно не влияло на вызываемое ими торможение опухолевого роста, напротив, в отличие от других цитостатиков, сочетание МЛТ с гемцитабином приводило к значительному усилению противоопухолевого эффекта, что сопровождалось увеличением продолжительности жизни мышей [5]. В предыдущем опыте были использованы различные дозы и схемы введения доксорубина. Наблюдалось снижение токсичности доксорубина у мышей, получавших его совместно с МЛТ, что проявилось в увеличении продолжительности жизни, однако статистически достоверных различий в торможении роста опухоли между группами получено не было [4].

Результаты данного исследования показали, что сочетанное введение ДР и МЛТ как при подкожном его введении, так и с питьевой водой приводит к статистически значимому торможению роста опухоли по сравнению с контролем и введением ДР. Эти наблюдения в совокупности с данными других исследований свидетельствуют о целесообразности использования МЛТ в клинической онкологии у пациентов, получающих цитостатики, в частности ДР.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Дильман В.М. Сопоставление противоопухолевой активности экстрактов эпифиза, гипоталамуса, мелатонина и сигетина у мышей с перевитым раком молочной железы // *Вопр. онкол.* – 1973. – № 10. – С. 99-101.
2. Анисимов В.Н. Эпифиз, биоритмы и старение организма // *Успехи физиол. наук.* — 2008. — Т. 39. — № 4. — С. 40-65.
3. Мусатов С.А., Розенфельд С.В., Того У.Ф. и др. Влияние мелатонина на мутагенность и противоопухолевый эффект цитостатиков у мышей // *Вопр. онкол.* – 1997. – Т. 44. – № 6. – С. 623-626.
4. Осипов М.А., Попович И.Г., Анисимов В.Н. и др. Оценка влияния разных доз и схем введения доксорубина в сочетании с МЛТ на модели перевиваемой опухоли Эрлиха у самок мышей SHR // *Злокачественные опухоли.* – 2014. – № 3. – С. 285.
5. Попович И.Г., Панченко А.В., Тындык М.Л. и др. Влияние противоопухолевых препаратов и их комбинаций с мелатонином на рост перевиваемой опухоли молочной железы с инкорпорированным геном HER 2/ neu у самок мышей FBV // *Материалы VII съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии.* – Казань, 2014. – С. 116.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н., и др., М: Гриф и К, 2012. — 944 с.
7. Anisimov V.N. The solar clock of aging // *Acta Geront.* – 1994. – Vol. 45. – P. 10-18.
8. Anisimov V.N., Alimova I.N., Yashin A.I. Dose dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice // *Exp. Gerontol.* – 2003. – Vol. 38 (4). – P. 449-461.
9. Anisimov V.N., Zabezhinski M.A., Popovich I.G. et al. Inhibitory effect of melatonin on 7,12 – dymethylbenz(a) anthracene – induced carcinogenesis of the uterine cervix and vagina in mice and mutagenesis in vitro // *Cancer Lett.* – 2000. – Vol. 156. – P. 199-205.
10. Anisimov V.N., Zavarzina N.Y., Zabezhinski M.A. et al. Melatonin increases both life span and tumor incidence in female CMBA mice // *J. Gerontol. Biol. Sci.* – 2001. – Vol. 56 A. – P. 311-323.
11. Bartsch C., Bartsch H., Karasek M. Melatonin in clinical oncology // *Neuroendocrinol. Lett.* – 2002. – Vol. 23 – P. 30-38.
12. Jardim – Perassi B.V., Ali S. Arbab. Effects of Melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – №1. – e85311.
13. Dubocovich M., Delagrange P., Krause et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors // *Pharmacol Rev.* – 2010. – Vol. 62. – P. 343-380.
14. Kanishi Y., Kabayashi Y., Noda S. et al. Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines // *J. Pineal Res.* – 2000. – Vol. 28. – P. 227-233.
15. Kumar A.C., Das U.N., Effect of melatonin on two stage carcinogenesis in Swiss mice // *Med. Sci. Monit.* – 2000. – Vol. 6. – P. 471-475.
16. Leon Blanco M.M., Guerrero J.M., Reiter R.J. et al. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro // *J. Pineal Res.* – 2003. – Vol. 35. – P. 204-11.
17. Martin V., Herrera F., Carrera – Gonzalez P. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 1081-1087.
18. Paroni R., Terraneo L., Bonomini F. Antitumor activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signaling // *J. Pineal Res.* – 2014. – 57. – Vol. 57. – P. 43-52.
19. Reiter R.J. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen – centered free radicals: a brief review // *Braz J Med Res.* – 1993. – Vol. 25. – P. 1141-1145.
20. Saper C.B., Scammell T.E., Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms // *Nature.* – 2005. – Vol. 437. – P. 1257-1263.
21. Sauer L.A., Dauchy R.T., Blask D.E. Melatonin inhibits fatty acid transport in inguinal fat pads of hepatoma 7288 CTC bearing and normal Buffalo rats via receptor-mediated signal transduction // *Life Sci.* – 2001. – Vol. 68. – P. 2835-2844.
22. Weisburger J.H., Rivenson A., Choi C.I. et al. Inhibition of lung, mammary gland and colon tumors by melatonin // *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 44. – P. 1133-1134.

Поступила в редакцию 03.09. 2015 г.

*M.A.Osipov, V.N.Anisimov, I.G.Popovich,  
T.Yu.Semiglazova*

#### **Melatonin enhances of antitumor effect of doxorubicin on the model of transplantable Ehrlich tumor in female SHR mice**

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

A combined antitumor effect of a single injection of doxorubicin and the indole hormone melatonin was investigated in the model of transplantable Ehrlich carcinoma in female SHR mice. Animals received melatonin either subcutaneous 10 mg/kg in the evening or with water 10 mg/l at night (from 20 pm to 8 am) for 3 weeks. The results of an experiment showed that combined use of doxorubicin and melatonin both subcutaneous and with water leads to statistically significant inhibition of tumor growth compared with control and doxorubicin alone.

Keywords: doxorubicin, melatonin, transplantable Ehrlich carcinoma, SHR mice