

М.А. Осипов¹, Т.Ю. Семглазова^{1,2}, И.Г. Попович¹, А.В. Панченко¹, М.Л. Тындык¹,
М.А. Забежинский¹, В.В. Клименко¹, А.Н. Стуков¹, В.Н. Анисимов¹

Влияние метформина, мелатонина и их комбинаций с паклитакселом на рост перевиваемой HER2-положительной опухоли молочной железы у самок мышей FBV/N

¹ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
²ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России,
Санкт-Петербург

В работе использованы 69 мышей-самок FVB/N. Всем животным была подкожно трансплантирована перевиваемая опухоль молочной железы, происшедшая от трансгенных мышей FVB/N, несущих онкоген HER2. Мыши были рандомизированы на 7 групп. Животные получали метформин в дозе 100 мг/кг ежедневно, мелатонин в дозе 10 мг/кг ежедневно, паклитаксел в дозе 6 мг/кг 1 раз в неделю, а также комбинации этих препаратов. Эффективность терапии оценивали по торможению роста опухоли, а также по индексу роста опухоли. Мелатонин усиливал противоопухолевый эффект паклитаксела, а монотерапия метформином приводила к статистически значимому угнетению роста опухоли.

Ключевые слова: метформин, мелатонин, паклитаксел, перевиваемая HER2-положительная опухоль молочной железы, мыши FBV/N, индекс роста опухоли

В последнее десятилетие особенно много внимания посвящено изучению эффектов гормона эпифиза мелатонина и синтетического бигуанида метформина. Оба вещества обладают выраженными геропротекторными свойствами в экспериментальных исследованиях на животных [5, 9]. Изучение ингибиторов m-TOR, к которым относится метформин, признано в 2013 г. одним из ведущих направлений (8-е место из 100) исследований в биологии. В 2014 году анализ свойств мелатонина, как одного из активных регуляторов оксидативного стресса в организме, в рейтинге приоритетных биологических исследований занял 9-е место из 100. Как мелатонин, так и метформин обладают противоопухолевой активностью *in vitro* в отношении различных опухолевых штаммов, в частности клеточных линий рака молочной железы [1, 8, 19], *in vivo* способны тормозить спонтанный [6] и химически индуцированный канцерогенез РМЖ [14, 20], а также сдерживать опухолевый рост на моделях перевиваемых опухолей и ксе-

нографтах опухолей молочной железы [10, 13]. В крупных мета-анализах показано потенцирующее действие мелатонина на противоопухолевую активность цитостатиков и иммунотерапию у пациентов с солидными опухолями [18]. Метформин, как показано преимущественно в нерандомизированных клинических исследованиях, может значительно снижать риск развития рака и улучшать выживаемость онкологических больных с диабетом 2-го типа [7, 11, 16]. Таким образом, представляется весьма перспективным изучение возможного противоопухолевого и/или потенцирующего эффекта метформина и мелатонина при сочетанном применении с химиотерапевтическими препаратами.

Целью данного исследования стало изучение противоопухолевого потенциала метформина и мелатонина как в монорежиме, так и в комбинации с паклитакселом на модели перевиваемой HER2-положительной опухоли молочной железы у мышей FBV/N.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с методическими указаниями по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ [3], было получено одобрение этического комитета. В работе использованы 69 мышей-самок FVB/N 3-х месячного возраста весом 22-26 г. Животные содержались в пластиковых клетках со стальными решетками типа ТЗ и получали питьевую воду и полноценный брикетированный корм ПК-120. Всем животным была перевита трансплантируемая опухоль молочной железы, происшедшая от трансгенных мышей FVB/N, несущих онкоген HER2. Опухоль в количестве 0,2 мл 10% суспензии клеток перевивали под кожу правого бедра. Началом эксперимента (день 0) считали день перевивки опухоли. После перевивки все животные были рандомизированы по компьютерной программе (SAS/StatUser'sGuide, version 9.2.Cary, NC: SAS Institute Inc; 2009. SAS institute Inc./graphpad.com, quickcalls) на 7 групп. Схема эксперимента представлена в табл. 1.

Животные 1-й группы служили контролем (n=9) и подвергались еженедельному внутрибрюшинному (в/б) введению 0,2 мл 0,9% раствора NaCl на протяжении 3-х недель. Мыши 2-й группы получали в/б 0,2 мл 0,9% раствора NaCl 1 раз в неделю на протяжении 3-х недель и мелатонин с питьевой водой в концентрации 200 мг/л

ежедневно в вечернее и ночное время на протяжении всего эксперимента. Мыши 3-й группы (n=10) получали в/б 0,2 мл 0,9% раствора NaCl 1 раз в неделю на протяжении 3-х недель и метформин с питьевой водой в дозе 2 г/л ежедневно на протяжении всего эксперимента. Животным 4-й группы (n=10) вводили в/б паклитаксел в дозе 6 мг/кг 1 раз в неделю на протяжении 3-х недель. Мышам 5-й группы (n=10) вводили паклитаксел в режиме, как в 4-й группе, и мелатонин, как во 2-й группе. В 6-й группе мышам (n=10) вводили паклитаксел, аналогично животным 4-й группы и метформин — как в 3-й группе. Мыши 7-й группы (n=10) получали паклитаксел как в 4-й группе и мелатонин вводили, как животным во 2-й группе, а метформин — как в 3-й группе. Ежедневно осматривали всех животных и отмечали время появления опухолей. Регулярно у всех животных измеряли размеры опухоли. Эффективность терапии оценивали по торможению роста опухоли, а также по площади под кинетической кривой роста опухоли и индексу роста опухоли. Величину торможения роста рассчитывали по формуле: $(V_k - V_o) / V_k * 100\%$, где V_k - средний объем опухоли в контрольной группе, а V_o - средний объем опухоли в опытной группе. Индекс роста опухоли (ИРО) определяли в процентах по формуле: $ИРО = Sэ / S_k * 100\%$, где $Sэ$ - площадь под кинетической кривой роста опухоли в группе мышей, получавших терапию, а S_k - площадь под кинетической кривой роста опухоли мышей контрольной группы. То есть чем значительнее терапевтическое действие, тем меньше ИРО. ИРО является интегральным критерием противоопухолевого эффекта, отражающим как его выраженность, так и продолжительность [4]. Для определения площади кинетической кривой роста опухоли использовали метод трапеций, базирующийся на формуле: $\sum = (V_1 + V_{i+1}) / 2 * t_{i+1} - (V_1 + V_2) / 2 * t_1 + (V_2 + V_3) / 2 * t_2 + \dots + (V_{n-1} + V_n) / 2 * t_n - 1$, где V_i - объем опухоли в соответствующем измерении под номером i , n - число измерений, t_1 - время в днях между 1-м и 2-м измерениями, t_2 - время в днях между 2-м и 3-м измерениями, t_{n-1} - время в днях между предпоследним и последним измерениями. Эксперимент был завершен на 39 день, когда более 50% животных пали и замеры опухолей были неэффективны. Результаты опыта были подвергнуты статистической обработке по методу Стьюдента с помощью компьютерной программы STATGRAPH. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Перевивка опухоли у всех животных прошла успешно. Измерение размеров опухоли начинали с 10-го дня после перевивки опухоли, когда с надежностью можно было убедиться в развитии опухолевых узелков на месте перевивки. К этому сроку опухоли развились у всех животных. Данные о влиянии препаратов на рост опухоли представлены в табл. 2. Введение мелатонина с питьевой водой (2-я гр.) не приводило к торможению роста опухоли. Индекс роста опухоли составил 104%. При введении метформина (3-я гр.) с питьевой водой наблюдалась тенденция к торможению роста опухоли на 10-й ($p=0,03$) и 38-й ($p=0,03$) дни (на 91% и 40%, соответственно) по сравнению с контрольной группой. В остальные дни также имело место торможение опухолевого роста, од-

нако, оно не было статистически достоверным. Индекс роста опухоли был на 32,6% меньше по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Внутривнутрибрюшинное введение мышам паклитаксела (4-я гр.) приводило к торможению роста опухоли на 35-й ($p=0,04$) день на 32% по сравнению с контрольной группой. В остальное время также наблюдалось торможение роста опухоли, хотя и без статистической значимости. Индекс роста опухоли был на 34,9% меньше по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При введении паклитаксела и мелатонина (5-я гр.) наблюдалось торможение роста опухоли на всем протяжении опыта по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что статистически достоверным этот эффект был на 14-й ($p=0,04$), 20-й ($p=0,04$), 28-й ($p=0,02$) и 35-й ($p=0,002$) дни после перевивки опухоли (53-72%). По сравнению с результатами во 2-й гр. было выявлено торможение роста опухоли у животных 5-й группы с 17-го ($p=0,02$) по 35-й ($p=0,01$) дни после перевивки опухоли, средний объем опухоли уменьшился на 57-72%. Комбинация паклитаксела и мелатонина усиливала торможение роста опухоли на 28-й день на 63% по сравнению с 4-й гр. ($p=0,05$). Индекс роста опухоли был на 55,3% меньше по сравнению с контролем, что является статистически достоверным ($p < 0,001$). Комбинация введения паклитаксела и метформина (6-я гр.) приводила к торможению роста опухоли на 38-й день на 47% по сравнению с контрольной группой ($p=0,03$). Индекс роста опухоли был на 39% меньше по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Однако, при сравнении с группами животных, получавших паклитаксел (4-я гр.) и метформин (3-я гр.) не было отмечено статистически достоверного торможения роста опухоли. Комбинация паклитаксела, мелатонина и метформина не имела преимуществ перед комбинацией паклитаксела и мелатонина. Индекс роста опухоли был на 44,3% меньше по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Статистически значимое увеличение продолжительности жизни мышей — опухоленосителей после траснсплантации опухоли (день 0) по сравнению с контролем наблюдалось только в группе комбинированного воздействия паклитаксела с мелатонином -35, 5% ($p < 0,05$) - табл. 2.

В доступной литературе нам не удалось найти ни одного исследования, в котором бы мелатонин применялся совместно с паклитакселом у мышей, однако мелатонин использовался совместно с различными режимами химиотерапии, в частности с паклитакселом у пациентов с солидными опухолями и в ряде случаев потенцировал их эффект препарата [11]. Было показано отсутствие усиления противоопухолевого эффекта при использовании комбинации

Таблица 1. Схема эксперимента

№№ групп	Воздействие			Число мышей
	Паклитаксел 6 мг/кг в/б х1раз/нед. в течение 3 недель	Мелатонин 10 мг/кг с питьевой водой по ночам в течение 3 нед.	Метформин 100 мг/кг с питьевой водой в течение 3 нед.	
1	-	-	-	9
2	-	+	-	10
3	-	-	+	10
4	+	-	-	10
5	+	+	-	10
6	+	-	+	10
7	+	+	+	10

Таблица 2. Влияние паклитаксела, метформина и мелатонина на площадь под кинетической кривой роста опухоли и индекс роста опухоли (ИРО) и продолжительность жизни у мышей FBV/N с перевитой подкожно HER2-положительным раком молочной железы

Группа	Площадь под кинетической кривой роста опухоли	ИРО, %	Средняя продолжительность жизни, дни	Увеличение продолжительности жизни, %
Контроль	221±33	100	42,4±4,7	-
МЛТ	230±28	104	44,7±3,7	5,3
МТФ	149±32	67,4*	48,9±4,8	15,2
Паклитаксел	144±33	65,1*	55,6±5,5	31
Паклитаксел + МЛТ	99±17	44,7**	57,5±5,1	35,5*
Паклитаксел + МТФ	135±18	61*	48,3±4,7	13,8
Паклитаксел + МЛТ+МТФ	125±27	56,7**	43,4±2,3	22,3

*p<0,05, **p<0,001 – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой животных

мелатонина с доцетакселом, препаратом схожим с паклитакселом по механизму действия, эффект которого также изучали на модели перевиваемой опухоли молочной железы с инкорпорированным геном HER у самок мышей FBV [2]. При введении паклитаксела совместно с метформинном у бестимусных мышей с перевитым ксенографтом опухоли легкого, напротив, усиливался цитостатический эффект паклитаксела. Как оказалось, это связано с использованием более высоких доз как паклитаксела в дозе 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении, так и метформина — 500 мг/кг, который вводили ежедневно внутривенно [17]. В работе американских авторов было изучено действие метформина на опухолевый рост при совместном введении с различными цитостатиками, включая паклитаксел. Мышам перевивали различные опухолевые штаммы, в том числе HER2- позитивного и трижды негативного рака молочной железы, далее выполнялось 4 внутриопухолевые инъекции паклитаксела 10 мг/кг. Инъекции назначались на 10, 15, 20 и 25 дни после перевивки опухоли. Противоопухолевые препараты вводили либо самостоятельно, либо в комбинации с метформинном, который мыши получали с питьевой водой в дозе 15 мг/кг. Паклитаксел в монорегиме статистически значимо тормозил опухолевый рост по сравнению с контролем. Сочетанное введение метформина и паклитаксела приводило к статистически значимому угнетению опухолевого роста по сравнению с контролем, также увеличивалось время до возникновения рецидива как по сравнению с контролем, так и с группой мышей,

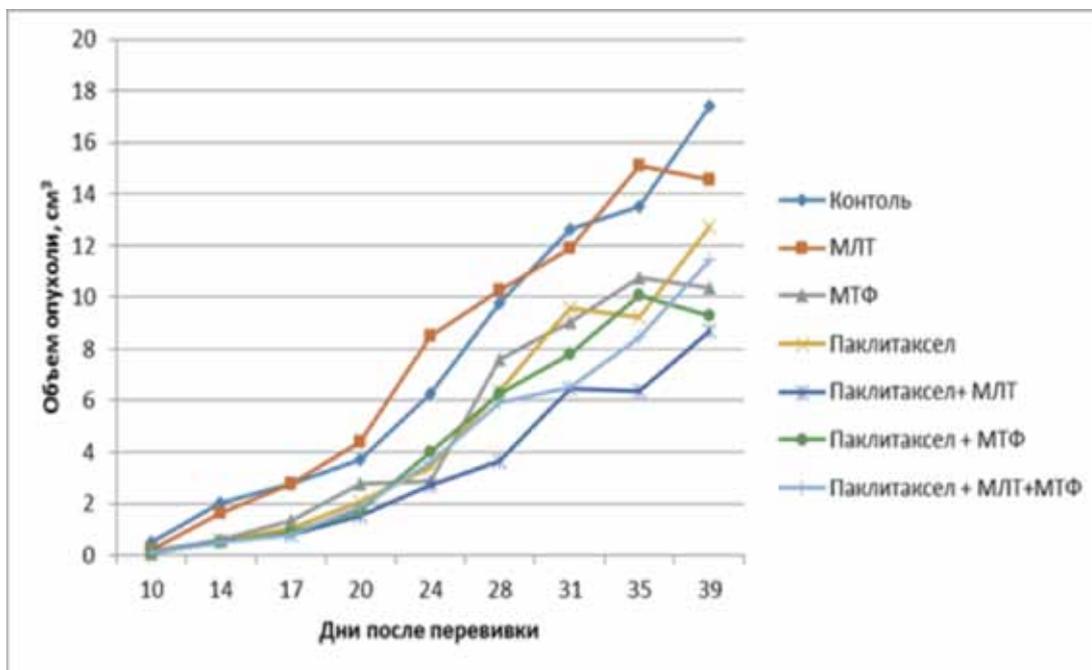


Рис.1 Динамика изменения объема опухоли в см³ у мышей с перевитой опухолью HER -2 при воздействии паклитаксела, МЛТ и МТФ

получавших только паклитаксел. Обращает на себя внимание способ введения паклитаксела – внутриопухолевые инъекции, высокая доза противоопухолевого препарата и кратность введения [12]. Также было исследовано сочетанное введение паклитаксела и метформина у трансгенных мышей линии *LSL-K-ras^{G12D/+}Pten^{loxP/loxP}*, у которых спонтанно развиваются опухоли яичников. Метформин назначался в дозе 250 мг/кг, паклитаксел — 3 мг/кг/1 раз в неделю. В данной работе метформин и паклитаксел в монорежиме ингибировали рост опухоли, однако различия не были статистически достоверны по сравнению с контролем, в то время как сочетанное их введение приводило к статистически значимому торможению роста опухоли по сравнению с контролем [15].

В нашем опыте метформин не оказывал потенцирующего эффекта на действие паклитаксела, однако его противоопухолевое действие в монотерапии было сопоставимо с эффектом цитостатика, а индекс роста опухоли в группе с введением метформина был статистически значимо меньше, чем в группе контроля. Мелатонин, напротив, не оказывал цитостатического эффекта, но в комбинации усиливал противоопухолевое действие паклитаксела и продолжительность жизни мышей.

Таким образом, полученные нами результаты показали, что метформин и мелатонин обладают определенными противоопухолевыми свойствами, как при самостоятельном введении животным с перевиваемой опухолью молочной железы, так и при комбинированном использовании с паклитакселом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н., Попович И.Г., Егормин П.А. и др. Перспективы применения антидиабетических бигуанидов для профилактики и лечения рака: результаты доклинических исследований // *Вопр. онкологии.* – 2016. – Т. 62. – №2. – С. 234-245.
2. 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/ неи у самок мышей FBV // *Материалы VII съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии.* – Казань, 2014. – С. 116.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // под ред. Миронова А.Н., и др. – М: Гриф и К, 2012. – 944 с.
4. Стуков А.Н., Иванова М.А., Никитин А.К. и др. Индекс роста опухоли как интегральный критерий эффективности противоопухолевой терапии в эксперименте // *Вопр. онкологии.* – 2001. – Т.47. – № 5. – С. 616-618.
5. Anisimov V., Popovich I., Zabezhinski A. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen // *Biochim-BiophysActa.* – 2006. – Vol. 1757 (5-6). – P. 573-589.
6. 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. 56A. – P. 311-323.
7. Berstein LM. Metformin in obesity, cancer and aging: addressing controversies // *Aging (Albany NY).* – 2012. – Vol. 4(5). – P. 320-329.
8. Berstein L.M., Yue W., Wang J.P., Santen R.J. Isolated and combined action of tamoxifen and metformin in wild-type, tamoxifen-resistant, and estrogen-deprived MCF-7 cells // *Breast Cancer Res Treat.* – 2011. – Vol. 128 (1). – P. 109-117.
9. Bolin L., Zeying F., Susan M. et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells // *Cell Cycle.* – 2009. – Vol. 8 (13). – P. 2031-2040.
10. Bulterijs S. Metformin as a geroprotector // *S Rejuvenation Res.* – 2011. –Vol. 14 (5). – P. 469-482.
11. Franciosi M., Lucisano G., Laprice E. et al. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – e71583.
12. Iliopoulos D., Heather A., Hirsch K. et al. Metformin decreases the doses of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71 (9). – P. 3196-3201.
13. Jardim-Perassi B., Ali S. Arbab, Ferreira L. et al. Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9 (1). – e85311.
14. Kothari L. Influence of chronic melatonin on 9,10-dimethyl-1,2- benzanthrazene-induced mammary tumors in female Holtzman rats exposed to continuous light // *Oncology.* – 1987. – Vol. 44. – P. 64–66.
15. Lengyel E., Litchfield L., Mitra A. et al. Metformin inhibits ovarian cancer growth and increases sensitivity to paclitaxel in mouse models // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2015. – Vol. 212 (4). – P.479.e1-479.e10.
16. Noto H., Goto A., Tsujimoto T. et al. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – e33411.
17. Rocha G., Dias M., Ropelle E. et al. Metformin Amplifies Chemotherapy-Induced AMPK Activation and Antitumoral Growth // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17 (12). – P. 3993-4005.
18. Seely D., Ping Wu., Heidy F. et al. Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: a systematic review an meta-analysis of randomized trials // *Integr. Cancer Ther.* – 2012. – Vol. 11 (4). – P. 293-303.
19. Wang J., Xiao X., Zhang Y. et al. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells // *J. Pineal Res.* – 2012. – Vol. 53 (1). – P. 77-90.
20. Zaafar D., Zaitone S., Moustafa Y. et al. Role of metformin in suppressing 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in diabetic and non-diabetic mice: effect on tumor angiogenesis and cell proliferation // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9 (6). – e100562.

Поступила в редакцию 23.01.2017 г.

*M.A. Osipov¹, T.Yu. Semiglazova^{1,2}, I.G. Popovich¹,
A.V. Panchenko¹, M.L. Tyndyk¹, M.A. Zabezhinsky¹,
V.V. Klimenko¹, A.N. Stukov¹, V.N. Anisimov¹*

Effect of metformin, melatonin and their combinations with paclitaxel on the growth of transplantable HER2-positive breast tumor in female FVB/N mice

¹N.N. Petrov Research Institute of Oncology
²I.I. Mechnikov North-West State Medical University
St. Petersburg

69 female FVB/N mice were used. After subcutaneous inoculation of tumor cells of transplantable HER2-positive mammary adenocarcinoma all animals were randomly divided into 7 groups and received metformin 100 mg /kg daily, melatonin 10 mg/kg daily, paclitaxel 6 mg/kg once a week as a monotherapy or in combination. Treatment efficacy was assessed by tumor growth inhibition and the tumor growth index. It was shown that melatonin increased the cytotoxic effect of paclitaxel whereas monotherapy with metformin led to statistically significant tumor growth inhibition

Key words: metformin, melatonin, paclitaxel, injected HER2-positive breast tumor, FVB/N mice, tumor growth index