

## АНТИОКСИДАНТЫ НА ОСНОВЕ 3-ОКСИПИРИДИНОВ ПОВЫШАЮТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Скопин П. И.<sup>1</sup>, Скопина Ю. А.<sup>1</sup>, Евстифеев С. В.<sup>1</sup>, Сухова Л. А.<sup>2</sup>, Кулаев М. Т.<sup>1</sup>,  
Куслина А. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУВПО «Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва», Саранск, e-mail: skopinpi@mail.ru;

<sup>2</sup>ГБУЗ Республики Мордовия «Республиканский онкологический диспансер», Саранск

Изучено влияние комбинированного применения мексидола и эмоксипина и противоопухолевых препаратов: циклофосфана, 5-фторурацила и рубомицина на рост опухоли, продолжительность жизни животных и метастатический процесс на модели спонтанного метастазирования – перевиваемой меланоме мышей В<sub>16</sub> в присутствии первичного опухолевого узла. У животных оценивали объем первичного опухолевого узла, частоту метастазирования опухоли, количество метастазов на поверхности легких, подсчитывали индекс ингибирования метастазирования (ИИМ). Установлена способность мексидола, при ежедневно внутримышечном введении с 1 суток после перевивки опухоли в дозах 10 и 50 мг/кг, и эмоксипина в дозах 6,8 и 34 мг/кг повышать антиметастатическую активность исследуемых противоопухолевых препаратов. Комбинированное применение мексидола и эмоксипина с этопозидом, метотрексатом и доксорубицином усиливало противоопухолевую эффективность цитостатиков, способствуя увеличению индекса торможения роста опухоли и более выраженному уменьшению опухолевой массы.

Ключевые слова: метастазирование, меланома мышей В<sub>16</sub>, противоопухолевая химиотерапия, антиоксиданты.

## 3-HYDROXYPYRIDINEBASED ANTIOXIDANTSINCREASEEFFICIENCY OF ANTICANCER DRUGS

Skopin P. I.<sup>1</sup>, Skopina Y. A.<sup>1</sup>, Evstifeev S. V.<sup>1</sup>, Sukhova L. A.<sup>2</sup>, Kulaev M. T.<sup>1</sup>,  
Kuslina A. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: skopinpi@mail.ru;

<sup>2</sup>Mordovia Oncology Center, Saransk

The present study aimed to investigate the influence of combination of the synthetic antioxidant mexidolum(3-oxy-6-metyl-2-etyl-piridin succinate) and antitumor drugs – cyclophosphamide, 5-fluorouracil and rubomycine on cancer progression, lifespan and metastatic process. Studies were performed on C<sub>57</sub>Bl and BDF<sub>1</sub>micewhich B<sub>16</sub> melanoma had been implanted subcutaneous. The volume of primary tumor, quantity of lung surface metastases, ability to inhibit metastases were determined. Mexidolum at a dose of 10 or 50 mg/kg and Emoxipine at dose 6,8 or 34 mg/kg body weight was injected i.m. daily followed by tumor transplant for 25 days. Results showed that assessedantioxidants (Mexidolumand Emoxipine) significantly increased anticancer and antimetastatitic efficacy studied antitumor drugs (Cyclophosphane, 5-Fluorouracil, Methotraxate, Doxorubicine, Rubomycine and Etoposide), helped toincrease the indexof inhibitionof tumor growthanddecrease tumor mass.

Keywords: metastasis, B<sub>16</sub> melanoma, antioxidant drugs, cancer chemotherapy.

Смещение прооксидантно-оксидантного равновесия, нарастающее параллельно опухолевой прогрессии, является одним из важнейших компонентов синдрома эндогенной интоксикации. В связи со значительным количеством пациентов, выявляемых в поздних стадиях заболевания, вопросы паллиативного лечения остро стоят как перед медицинской общественностью, так и обществом в целом, и особую актуальность приобретает внедрение в клиническую практику методов эффективной коррекции синдрома эндогенной интоксикации.

Основным компонентом паллиативного противоопухолевого лечения являются химиотерапия, реализация эффектов которой сопровождается дополнительной активацией

процессов перекисного окисления, что вносит существенный вклад в прогрессирование эндотоксикоза. Однако разработка способов коррекции многочисленных нарушений в тканях организма, возникающих в результате противоопухолевой химиотерапии, без снижения ее противоопухолевых эффектов до настоящего времени остается актуальной задачей. Эту задачу могут решить антиоксидантные препараты [1–5], но их внедрению в клиническую практику и схемы противоопухолевого лечения препятствует вероятность развития антагонистических взаимодействий и снижения эффективности противоопухолевого влияния.

Целью нашего исследования явилась оценка влияния 3-окси-6-метил-2-этил-пиридина сукцината (мексидол®), относящегося к классу  $\beta$ -оксипроизводных азотистых гетероароматических антиоксидантов, на антиметастатическую активность некоторых противоопухолевых химиопрепаратов.

**Материалы и методы исследования:** использована модель спонтанного метастазирования – перевиваемая опухоль мышей – меланома В<sub>16</sub> (штамм опухолевого банка НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН). Эксперимент проведен на мышах самках линии С<sub>57</sub>BL/6 массой 20–22 г, мышах самках линии ВDF<sub>1</sub>. Перевивку опухоли осуществляли путем инъекции под кожу спины взвеси опухолевых клеток ( $7 \times 10^6$  клеток в 0,2 мл среды 199). Оценка результатов проводилась на 25 день после перевивки опухоли. Все мыши забивались путем декапитации под эфирным наркозом. У животных оценивали объем первичного опухолевого узла, частоту метастазирования опухоли (процент животных из группы, имеющих макрометастазы), количество метастазов на поверхности легких, подсчитывали индекс ингибирования метастазирования (ИИМ). Влияние производных 3-оксипиридина – эмоксипина и мексидола – исследовали в условиях применения противоопухолевых препаратов, широко используемых в практической онкологии – циклофосфана, 5-фторурацила, рубомицина, этопозиды, метотрексата и доксорубицина, которые вводили с первых суток после перевивки опухоли в режиме, вызывающем умеренное торможение опухолевого процесса (30–40 % торможения роста первичной опухоли при незначительном уменьшении интенсивности развития метастазов) (табл. 1,2).

Результаты исследований обрабатывали методами вариационной статистики на персональном компьютере с использованием программ Microsoft Office Excel, Primer of Biostatistics for Windows. Вычисляли среднюю арифметическую выборочную ( $M$ ), ошибку средней арифметической ( $m$ ) и стандартное отклонение. Значимость отличий средних величин выборок при нормальном распределении оценивали с помощью параметрического  $t$ -критерия Стьюдента, а при распределении признака, отличного от нормального, и при малых выборках – непараметрический критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test).

Значимость различий показателей до и после лечения – с использованием парного критерия Вилкоксона. При сравнении долей, выраженных в процентах, применялся критерий согласия  $\chi^2$  Пирсона. Различия средних величин, а также корреляционные связи признавались значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ . Полученные данные представлены в виде  $M \pm m, p$ .

Таблица 1

**Структура эксперимента. Исследование влияния производных 3-оксипиридина на продолжительности жизни мышей линии BDF<sub>1</sub> в условиях роста экспериментальных опухолей**

№	Условия проведения исследования		n		
1-2	Рост карциномы Льюис	Рост меланомы В16	0,9% р-р NaCl - 0,5 мл в/м в течение 14 суток (контроль)	24	
3-4			Этопозид 6,5		24
5-6			мг/кг в/м через 1	+эмоксипин 17 мг/кг в/м ежедневно 14 суток	24
7-8			день, 5 раз	+ мексидол 33 мг/кг в/м ежедневно 14 суток.	24
9-10			Метотрексат в/м		24
11-12			13 мг/кг 2 раза в	+эмоксипин 17 мг/кг в/м ежедневно 14 суток	24
13-14			неделю, 4 раза	+ мексидол 33 мг/кг в/м ежедневно 14 суток	24
15-16			Доксорубин		25
17-18			1,3 мг/кг 1 раз в	+ эмоксипин 17 мг/кг в/м ежедневно 14 суток	25
19-20			неделю в/б, 3	+ мексидол 33 мг/кг в/м ежедневно 14 суток.	25
			ВСЕГО	243	

Таблица 2

**Структура эксперимента по оценке антиметастатической эффективности на модели меланомы В16**

№	Условия проведения опыта		n	
21	Физиологический раствор 0,2 мл в/м		5	
22-23	Мексидол 10 мг/кг, 50 мг/кг в/м с 1 по 24 сутки ежедневно		10	
24	Рубомицин 4 мг/кг с 21 суток в/б 4 раза через день		5	
25-26		+мексидол 10 и 50 мг/кг в/м с 1 по 24 сутки ежедневно	10	
27-28		+эмоксипин 6,8 и 34 мг/кг в/м с 1 по 24 сутки ежеднев.	10	
29	5-фторурацил 10 мг/кг с 21 дня в/м 5 раз через день		5	
30-31		+мексидол 25 и 50 мг/кг в/м с 1 по 24 сутки ежеднев.	10	
			ВСЕГО	55

**Результаты исследования.** Применение на фоне роста меланомы В16 этопозида в изученной дозе достоверного влияния на продолжительность жизни опухоленосителей не оказывало – она составила  $20,5 \pm 1,8$  суток (в контроле  $18,1 \pm 1,6$  суток). Включение в состав терапии эмоксипина увеличило продолжительность жизни экспериментальных животных  $24,1 \pm 2,2$ , что достоверно выше, чем в контрольной группе (табл. 3). Комбинированное применение этопозида с мексидолом приводило к увеличению до  $34,1 \pm 3,3$  суток

продолжительности жизни животных с меланомой В<sub>16</sub>, что превысило на 88 % (p<0,01) данный показатель у животных в контрольной группе и на 65 % (p<0,05) у животных, получавших монотерапию этопозидом.

При оценке массы опухоли меланомы В<sub>16</sub> при использовании этопозида – достоверного изменения по сравнению с контролем не выявлено. Комбинированное использование этопозида и эмоксипина ограничивало на 33 % по сравнению с контрольной группой массу опухоли, ИТРО составил при этом 37 % (рис. 1).

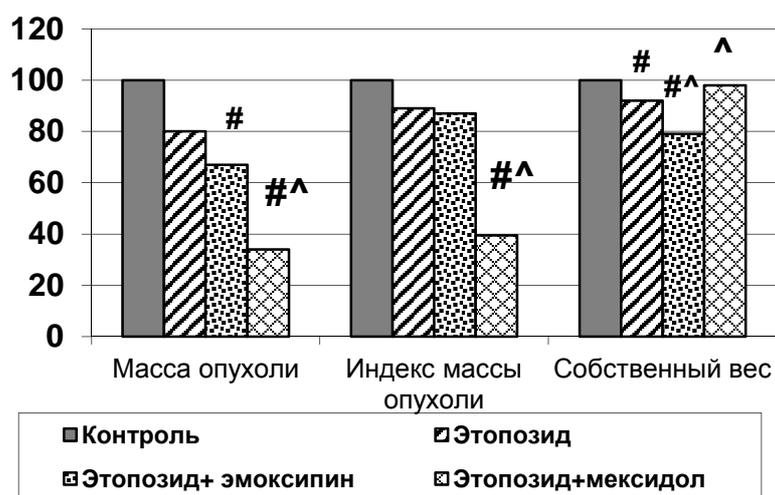


Рис. 1. Некоторые показатели роста меланомы В<sub>16</sub> в условиях комбинированного применения этопозида, эмоксипина и мексидола (# – данные достоверно отличаются от контрольных, ^ – достоверное отличие от показателей монотерапии этопозидом)

Таблица 3

**Влияние комбинированного применения этопозида, эмоксипина и мексидола на продолжительность жизни мышей линии ВDF<sub>1</sub> при росте меланомы В<sub>16</sub>(M±m)**

Условия проведения эксперимента	Продолжительность жизни (сутки)
Контр.	18,2 ± 1,66
Этопоз.	20,6 ± 1,89; p>0,05
Этопоз. + эмокс.	24,0 ± 2,0; p<0,05; p <sub>1</sub> >0,05
Этопоз. + мекс.	34,0 ± 3,39; p<0,01; p <sub>1</sub> <0,05
Доксоруб.	18,8 ± 2,6; p>0,05
Доксоруб. + эмокс.	25,2 ± 1,3; p<0,001; p <sub>1</sub> <0,05
Доксоруб. + мекс.	35,4 ± 5,01; p<0,05; p <sub>1</sub> <0,05
Метотрекс.	18,4 ± 2,7; p>0,05
Метотрекс. + эмокс.	23,2 ± 2,97; p>0,001; p <sub>1</sub> >0,05
Метотрекс. + мекс.	26,0 ± 3,61; p>0,05; p <sub>1</sub> >0,05

Примечание: достоверность различия p по сравнению с контролем, p<sub>1</sub> – с данными животных, получавших монотерапию цитостатиком.

Совместное использование этопозидом с мексидолом сопровождалось снижением на 66 % массы опухоли от контрольного уровня и по сравнению с уровнем животных, получавших монотерапию этопозидом, на 57 %. Индекс массы опухоли снижался на 61 % при комбинированном применении этопозидом и мексидолом по сравнению с контролем и на 54 % по сравнению с уровнем при монотерапии этопозидом, ИТРО при этом возрос на 223 % по сравнению с монотерапией цитостатиком (табл. 4).

При оценке антиметастатической активности выявлено, что в изученной дозе этопозид на фоне роста меланомы способствовал снижению числа митозов в опухолевой ткани на 36 %, а комбинация этопозидом с эмоксипином – дополнительно на 30 %, с мексидолом – на 50 %, относительно серии с монотерапией этопозидом.

Таким образом, комбинированное применение этопозидом с мексидолом и эмоксипином увеличивает противоопухолевую эффективность этопозидом, способствуя увеличению индекса торможения роста опухоли (эмоксипин и мексидол) и более выраженному уменьшению опухолевой массы (мексидол).

Таблица 4

**Влияние комбинаций этопозидом и метотрексата с эмоксипином и мексидолом на некоторые показатели роста опухоли меланомы В<sub>16</sub> (M±m)**

Условия проведения эксперимента	Вес мыши общий, г	Вес без учета опухоли (собственный вес), г	Масса опухоли, г	ИМО, %	ИТРО, %
Интактные	24,32±0,89	24,32±0,89	-	-	-
Контроль	29,5±0,29*	24,58±0,51	5,23±0,39	17,56±1,41	-
Этопозид	26,42±0,47#	22,25±0,49*#	4,17±0,35	15,77±1,15	20,30±6,01
Этопозид + эмоксипин	22,65±0,38*#^	19,15±0,36*#^	3,50±0,26#	15,42±1,07	36,90±4,01^
Этопозид + мексидол	25,5±0,29#^	23,7±0,50*^	1,80±0,49#^	7,02±1,93#^	65,58±9,44^
Метотрексат	24,00±0,18#	19,40±0,24*#	4,60±0,26	19,15±1,03	13,78±3,96
Метотрексат + эмоксипин	24,75± 0,34#	21,87± 0,37*#^	2,83±0,28#^	11,63±1,09#^	44,87±5,05^
Метотрексат + мексидол	24,83± 0,49#	22,85± 0,48*#^	1,82±0,24#^	7,32±0,84#^	65,27±4,17^

Примечание: \* – данные достоверно отличаются от показателей интактной группы, # – от показателей контрольной группы, ^ – от данных серии монотерапии цитостатиком.

В условиях роста меланомы В<sub>16</sub> достоверное увеличение продолжительности жизни подопытных животных по сравнению с группой, получавшей монотерапию доксорубицином, достигнуто при комбинации доксорубицином с эмоксипином на 36 (p<0,05) и на 88 % (p<0,05) при использовании доксорубицином с мексидолом.

Доксорубин в изученной дозе проявил достоверный противоопухолевый эффект на фоне роста меланомы В<sub>16</sub> – произошло снижение ИМО на 28 %. Комбинированное введение доксорубина с эмоксипином привело к усилению противоопухолевого эффекта препарата, что проявилось в дальнейшем уменьшении ИМО на 21 % по сравнению с монотерапией доксорубином, ростом ИТРО на 62 % ( $p < 0,05$ ). Комбинация доксорубина с мексидолом также способствовала снижению массы первичного опухолевого узла на 53 % по сравнению с показателем при монотерапии доксорубином ( $p < 0,01$ ), снижение ИМО составило 50 %, ИТРО увеличился в 2,4 раза по сравнению с данными группы, получавшей доксорубин в виде монотерапии.

При совместном использовании метотрексата с мексидолом продолжительность жизни животных с меланомой В<sub>16</sub> возросла на 43 % по сравнению с показателями монотерапии метотрексатом (рис. 2). Совместное применение эмоксипина с метотрексатом повлияло на весовые показатели опухоли – почти в 2 раза по сравнению с контролем и на 39 % по отношению с уровнем при монотерапии метотрексатом снижалась масса опухоли, ИТРО при этом увеличился в 3,3 раза по сравнению с монотерапией цитостатиком.

Применение метотрексата на фоне роста меланомы снижало митотическую активность опухолевых клеток на 34 %, комбинация метотрексата с эмоксипином – на 32 %, а с мексидолом – в 2 раза, по сравнению с данными группы монотерапии метотрексатом.

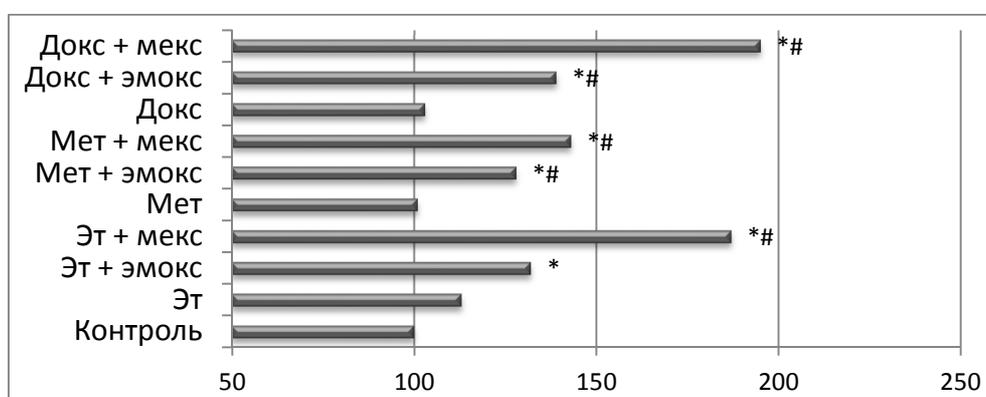


Рис. 2. Продолжительность жизни мышей с меланомой В<sub>16</sub> в условиях сочетанного применения химиопрепаратов с эмоксипином и мексидолом, % к данным контрольной группы (\* – данные достоверно отличаются от контрольного уровня, # – достоверное отличие от данных серии монотерапии цитостатиком)

Таким образом, комбинация метотрексата с эмоксипином и мексидолом на фоне роста меланомы В<sub>16</sub> потенцировала противоопухолевую эффективность цитостатика.

При использовании на фоне меланомы В<sub>16</sub> 5-фторурацила и рубомицина в режимах монотерапии, наблюдалось достоверное уменьшение объема первичной опухоли, однако не было влияния на метастазирование у подопытных животных (частота составила 100 %). При

введении 5-фторурацила индекс ингибирования метастазирования составил 47,9 %, рубомицина – 39,7 %. Но исследуемые цитостатические препараты в изученных дозах не вызывали достоверного уменьшения метастатического процесса, т.к. среднее количество метастазов у животного составило в группе с использованием 5-фторурацила –  $7,6 \pm 2,0$  ( $p > 0,05$ ), рубомицина –  $8,8 \pm 1,86$  ( $p > 0,05$ ).

Дополнительное применение эмоксипина приводило к достоверному сокращению числа метастатических узлов в ткани легких – индекс ингибирования метастазирования комбинаций 5-фторурацил и эмоксипин 25 мг/кг составил 100 %, при использовании рубомицина и эмоксипина 6,8 мг/кг ИИМ составил 96,68 %, а рубомицина с эмоксипином в дозе 25 мг/кг – 98,52 %.

Достоверное снижение частоты метастазирования отмечалось при использовании следующих комбинаций: 5-фторурацил и эмоксипин 25 мг/кг – до 20 %, рубомицин с эмоксипином в дозах 6,8 мг/кг и 25 мг/кг – также до 20 %. Во всех опытных группах наблюдалось достоверное снижение среднего количества метастазов на 1 животное.

Таблица 5

**Оценка антиметастатической активности комбинаций противоопухолевых препаратов с мексидолом на модели меланомы В16(М±m)**

Группы	Частота метаст., %	Средн. объем первичн. опухоли, см <sup>3</sup>	Средн. число метаст. у всех животн. в группе	Индекс ингибиров. метастазиров., %
Контр.	100	$4,48 \pm 0,56$	$14,59 \pm 2,93$	—
Мекс. 10 мг/кг	60	$4,2 \pm 0,8$	$2,79 \pm 1,92\#$	80,82
Мекс. 50 мг/кг	40*	$2,83 \pm 0,61$	$0,40 \pm 0,27\#$	97,26
<b>Циклофосфан</b> 20 мг/кг	100	$2,27 \pm 0,45\#$	$8,00 \pm 2,42$	45,21
Мекс. 10 мг/кг + циклоф.	40*	$1,88 \pm 0,37\#$	$0,80 \pm 0,65\#^{\wedge}$	94,52
Мекс. 50 мг/кг + циклоф.	60	$2,89 \pm 0,72\#$	$1,60 \pm 0,84\#^{\wedge}$	87
<b>5-ФУ</b> 10 мг/кг	100	$2,68 \pm 0,42\#$	$7,57 \pm 2,02$	47,95
Мекс. 10 мг/кг + 5-ФУ	60	$3,32 \pm 1,11$	$2,37 \pm 1,89\#$	83,56
Мекс. 50 мг/кг + 5-ФУ	40*	$3,12 \pm 1,18$	$1,77 \pm 1,75\#^{\wedge}$	87,67
<b>Рубомицин</b> 4 мг/кг	100	$2,69 \pm 0,29\#$	$8,79 \pm 0,86\#$	39,73
Мекс. 10 мг/кг+ рубомиц.	60	$2,75 \pm 0,42\#$	$2,17 \pm 0,92\#^{\wedge}$	90,96
Мекс. 50 мг/кг+ рубомиц.	40*	$3,92 \pm 0,78$	$0,79 \pm 0,58\#^{\wedge}$	97,81

П р и м е ч а н и е: # – данные достоверно отличаются от аналогичного показателя контрольной группы, <sup>^</sup> – данные достоверно отличаются от аналогичного показателя группы сравнения с введением соответствующего цитостатика, рассчитанные с помощью t-критерия Стьюдента; \* – данные достоверно отличаются от показателя контрольной группы, рассчитано с помощью  $\chi^2$ .

Комбинированное применение циклофосфана и мексидола в дозе 10 мг/кг угнетало метастатический процесс у экспериментальных животных – частота метастазирования у них составила 40 %, среднее число метастазов снизилось до  $0,80 \pm 0,65$  ( $p < 0,01$ ), ИИМ составил 94,52 %. При дальнейшем увеличении дозы мексидола не наблюдалось нарастания антиметастатического эффекта комбинации. При комбинировании циклофосфана и 50 мг/кг

мексидола частота метастазирования снизилась до 60 % ( $p < 0,05$ ), индекс ингибирования метастазирования составил 87 % (табл. 5).

Комбинированное применение мексидола в дозе 10 мг/кг и рубомицина не привело к достоверному изменению частоты метастазирования от группы, получавшей монотерапию рубомицином. Количество метастазов составило  $2,20 \pm 0,92$  ( $p < 0,005$ ), что на 75 % меньше, чем у животных, которым вводился химиопрепарат в виде монотерапии. Индекс ингибирования метастазирования в этой группе составил 90,96 %. При увеличении дозы мексидола до 50 мг/кг не наблюдалось изменения частоты метастазирования от предыдущей группы. В отличие от серии, где применялся только рубомицин, среднее число метастазов уменьшилось на 91 % – до  $0,79 \pm 0,58$  ( $p < 0,001$ ), ИИМ составил 97,81 %.

Комбинация 5-фторурацила с мексидолом приводила к значительному снижению числа метастатических узлов в ткани легкого по сравнению с группой, получавшей только цитостатик – индекс ингибирования метастазирования в сочетании с мексидолом 50 мг/кг составил 87,67 %. В этой группе достоверно снижалась частота метастазирования – до 40 %. Во всех группах среднее количество метастазов на одно животное достоверно снижалось.

**Выводы.** Таким образом, проведенные исследования выявили отчетливую способность мексидола и эмоксипина усиливать эффективность противоопухолевых химиопрепаратов – этопозиды, метотрексата, рубомицина и 5-фторурацила по замедлению реализации отдаленных метастазов и увеличению продолжительности жизни в условиях быстрорастущей модели неоплазии (меланома В<sub>16</sub>) в присутствии первичного опухолевого узла, в отличие от монотерапии цитостатиками.

### Список литературы

1. Семенова Е. В. Гепатопротекторная активность некоторых производных 3-гидроксипиридина при токсических повреждениях печени: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Мордовский государственный ун-т им. Н. П. Огарева. – Саранск, 2009.
2. Скопин П. И., Зорькина А. В., Скопина Ю. А. Этилметилгидроксипиридинасукцинат ограничивает эндотоксикоз на поздних сроках роста опухоли и снижает токсичность паллиативной химиотерапии в эксперименте // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – №2. – С. 167-171.
3. Скопин П. И., Зорькина А. В., Скопина Ю. А., Минаева О. В. Производные 3-оксипиридина оптимизируют применение этопозиды на модели карциномы легких Льюис // *Современные проблемы науки и образования*. – 2012. – № 6; URL: <http://www.science-education.ru/106-8026>.

4. Чаиркина Н. В., Инчина В. И., Семенова Е. В., Семенов А. В., Исаак И. Н. Возможности коррекции гибридными антиоксидантами морфофункциональных изменений при токсическом повреждении печени // Морфологические ведомости. – 2007. – Т. 1. – № 1-2. – С.232-236.
5. Siprov A. V., Masyagin V. A., Vashurkina I. M. Comparative evaluation of antioxidant drug influence on a radio therapy efficiency and oxidative status in mice // Russian Open Medical Journal. – 2013. – Т. 2, № 3. – С. 0304.