

Оценка онкологической безопасности препарата Магнерот на модели карциномы легких

Л.В.Адамян^{1,2}, О.А.Громова^{3,4}, О.Н.Грачева⁴, А.Г.Калачева³, И.Ю.Торшин⁵, М.В.Филимонова⁶

¹ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова Минздрава России. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4;

²ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова Минздрава России. 127473, Россия, Москва, ул. Дедегатская, д. 20, стр. 1;

³ГБОУ ВПО Ивановская государственная медицинская академия Минздрава России. 153000, Россия, Иваново, Шереметевский пр., д. 8;

⁴ФГБОУ ВПО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России. 443099, Россия, Самара, ул. Чапаевская, д. 89;

⁵ГБАОУ ВПО Московский физико-технический институт (государственный университет) Минобороны России. 141700, Россия, Долгопрудный, Институтский пер., д. 9;

⁶ФГБУ Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России. 249036, Россия, Обнинск, ул. Королева, д. 4

Длительная коррекция недостаточности магния проводится органическими солями магния. В работе представлены результаты экспериментальной оценки онкологической безопасности оротата магния в составе препарата Магнерот в дозах 5 и 10 мг/кг в расчете на элементный магний. Показана высокая онкологическая безопасность изученных доз препарата на стандартной модели – карциномы легких Льюис.

Ключевые слова: карцинома легких Льюис, Магнерот, оценка безопасности, противоопухолевый эффект.

✉ unesco.gromova@gmail.com

Для цитирования: Адамян Л.В., Громова О.А., Грачева О.Н. и др. Оценка онкологической безопасности препарата Магнерот на модели карциномы легких. Consilium Medicum. 2016; 18 (6): 98–102.

Evaluation of oncological safety of Magnerot on a model of lung carcinoma

L.V.Adamyan^{1,2}, O.A.Gromova^{3,4}, O.N.Gracheva⁴, A.G.Kalacheva³, I.Yu.Torshin⁵, M.V.Filimonova⁶

¹V.I.Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the Ministry of Health of the Russian Federation. 117997, Russian Federation, Moscow, ul. Akademika Oparina, d. 4;

²A.I.Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Health of the Russian Federation. 127473, Russian Federation, Moscow, ul. Delegatskaia, d. 20, str. 1;

³Ivanovo State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation. 153462, Russian Federation, Ivanovo, pr. Sheremetevskii, d. 8;

⁴Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. 443099, Russian Federation, Samara, ul. Chapaevskaia, d. 89;

⁵Moscow Institute of Physics and Technology. 141700, Russian Federation, Dolgoprudnyi, Institutskii per., d. 9;

⁶National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation. 249036, Russian Federation, Obninsk, ul. Koroleva, d. 4

Compensation of prolonged magnesium deficiency is carried out with organic magnesium salts. Here, the results of experimental evaluation of the oncological safety of magnesium orotate in doses of 5 and 10 mg/kg (elemental magnesium) are presented. The high oncological safety of the Magnerot was tested on a standard model – Lewis lung carcinoma.

Key words: Lewis lung carcinoma, Magnerot, safety assessment, anti-tumor effect.

✉ unesco.gromova@gmail.com

For citation: Adamyan L.V., Gromova O.A., Gracheva O.N. et al. Evaluation of oncological safety of Magnerot on a model of lung carcinoma Consilium Medicum. 2016; 18 (6): 98–102.

Введение

Недостаточность магния встречается, по разным данным, у 30–60% населения. При своевременном выявлении дефицита магния и проведении долговременной коррекции можно предотвратить возникновение и развитие широкого круга коморбидных дефициту магния патологий [1], в том числе опухолевых заболеваний [2]. Подчеркнем, что эффективная коррекция дефицита магния подразумевает достаточно длительные курсы терапии (месяцы, годы). Поэтому оценка онкологической безопасности различных солей магния весьма актуальна.

Для длительной коррекции дефицита магния, как правило, пользуются препаратами на основе органических солей магния (аспарагинат, цитрат, лактат, глицинат, оротат и др.) вследствие их высокой биодоступности и безопасности. Онкологическая безопасность этих солей недостаточно исследована, что вызывает многочисленные необоснованные спекуляции относительно эффектов тех или иных солей магния.

Рассмотрим этот вопрос более подробно на примере оротата магния и лактата магния, так как обе эти соли широко используются для изготовления препаратов для коррекции дефицита магния. Например, в эксперименте при однократном введении проканцерогенного диэтилнитрозамина в дозе 200 мг/кг диета с очень высоким содержанием аргинина (3,5–15 г/кг в сутки) [3] или оротовой кислоты (10–25 г/кг в сутки) [4] может способствовать усилению роста опухолей. Заметим, что взаимосвязь между оротовой кислотой, диэтилнитрозамином и другими канцерогенами и развитием опухолей наблюдалась только в экспери-

менте. Данные о способности оротовой кислоты стимулировать развитие опухолей у человека отсутствуют.

Однако результаты нескольких исследований, проведенных, во-первых, только на экспериментальном уровне, во-вторых, в присутствии специальных канцерогенов и, в-третьих, с чрезвычайно высокими дозами оротовой кислоты (мегадозы) ни в коем случае не позволяют делать абсурдный вывод, что оротовая кислота и ее соли якобы канцерогенны. Гораздо больше имеется научных обоснований для обсуждения проканцерогенных эффектов высоких доз молочной кислоты и ее солей, лактатов.

Например, в экспериментальных и клинических исследованиях было показано, что уровни лактата в тканях коррелируют с развитием опухолей, так что опухоли с более высоким содержанием лактата характеризуются более высокой малигнизацией [5]. Онкотрансформация клеток человека ассоциирована с повышением уровней основного фермента метаболизма лактата, лактат дегидрогеназы [6]. Общеизвестно, что онкотрансформация клеток приводит к повышенному потреблению глюкозы раковой клеткой и более активной конверсии пирувата именно в лактат (так называемый эффект Варбурга). Эффект Варбурга усиливает выживание и деление раковых клеток [7], всасывание фолиевой кислоты и миграцию раковых клеток [8].

Более того, в клинических исследованиях было показано, что гиперлактатемия является независимым предиктором высокой смертности пациентов от рака. Например, исследование пациентов с раком легких IV степени (n=85, 45–96 лет) показало, что уровни лактата в плазме крови

Таблица 1. Динамика массы тела животных в разных экспериментальных группах

Срок наблюдения, сут	Средняя масса тела, % (M±SE)*		
	Контроль	Магнерот, 5 мг/кг	Магнерот, 10 мг/кг
3-е	99,2±0,7	99,2±0,6	100,5±0,8
7-е	103,6±0,8	102,2±1,0	103,9±0,9
10-е	103,3±1,0	101,3±0,8	102,2±1,0
13-е	104,9±1,0	103,3±0,8	105,3±0,9
15-е	105,5±1,0	105,5±0,9	106,9±1,0
17-е	110,2±1,1	107,4±1,1	110,4±1,3
21-е	113,8±1,6	112,6±1,3	114,0±1,3

*Показатели нормированы на исходную массу тела.

более 1,4 ммоль/л ассоциированы с достоверно более низким выживанием пациентов [9].

Таким образом, вопрос об онкологической безопасности той или иной соли магния требует проведения специальных исследований. Целью настоящей работы являлась оценка влияния препарата Магнерот на рост и метастазирование злокачественных новообразований на модели карциномы легких Льюис (КЛЛ).

Материалы и методы

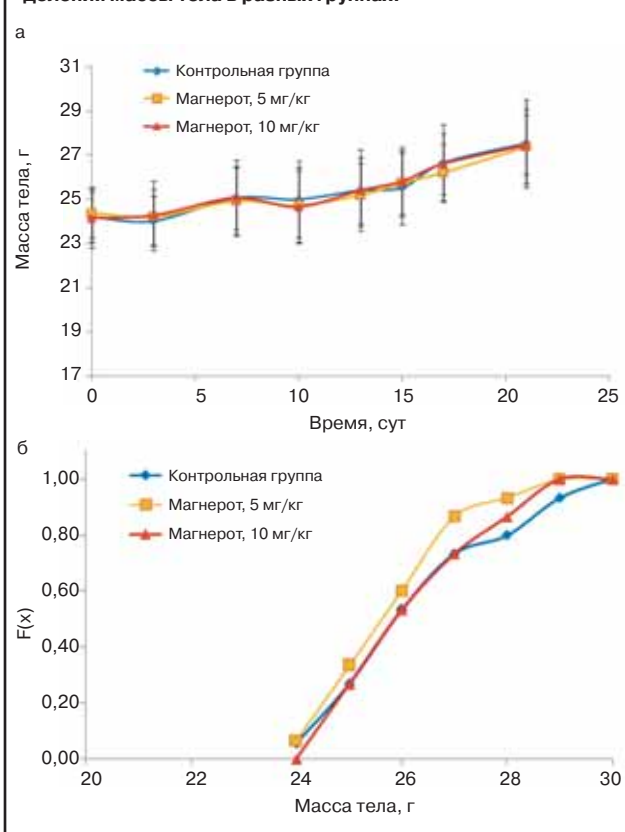
Описание препарата. Согласно фармакопее Российской Федерации, Магнерот представляет собой таблетированный препарат, содержащий в качестве действующего вещества 500 мг магния оротата дигидрат на 1 таблетку. В исследованиях Магнерот использован в фармакопейной таблетированной форме для перорального введения («Верваг Фарма ГмБХ и Ко. КГ», Германия). При проведении работ препарат хранился в защищенном от света месте при температуре ниже 25°C.

Лабораторные животные. Исследования проведены на 45 самцах мышей-гибридов F₁ (СВА×С₅₇BL_{6j}) в возрасте 2,5–3 мес с массой тела 22–26 г. Животные были получены из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, имели ветеринарный сертификат и прошли 20-суточный карантин в виварии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф.Цыба. Содержались животные в соответствии с требованиями Приказа МЗ РФ №708н: в клетках Т-3 с соблюдением норм группового размещения, в условиях естественного освещения и принудительной 16-кратной вентиляции, при температуре 18–20°C и относительной влажности воздуха 40–70%, на подстилке из простерилизованных древесных стружек, со свободным доступом к питьевой воде и корму. Животные получали стандартный (ГОСТ Р50258-92) брикетированный корм ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», РФ).

Все экспериментальные работы с лабораторными животными выполнены в соответствии с общепринятыми этическими нормами, на основе стандартных операционных процедур, принятых в МРНЦ им. А.Ф.Цыба, которые соответствуют правилам Европейской конвенции по защите животных, используемых для научных целей (ETS 123).

Опухолевая модель. Исследования проведены на перевиваемой КЛЛ. Штамм КЛЛ получен из банка опухолевых материалов ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» Минздрава России и поддерживался на самцах мышей С₅₇BL_{6j}. Трансплантацию КЛЛ самцам мышей F₁ (СВА×С₅₇BL_{6j}) проводили подкожным введением 1,6×10⁶ опухолевых клеток в 0,1 мл суспензии в область латеральной поверхности правого бедра, на которой предварительно депилировали шерстный покров.

Экспериментальные группы, способы введения и дозы препарата. После перевивки КЛЛ животных методом рандомизации распределили в 3 группы, по 15 особей

Рис. 1. Динамика роста массы тела в экспериментальных группах: а – масса тела; б – эмпирические функции распределения массы тела в разных группах.

в каждой, – контрольную и 2 подопытные. Животные контрольной группы в дальнейшем не получали никаких воздействий. Животным подопытных групп со 2 по 20-е сутки после трансплантации опухоли ежедневно интрагастрально вводили Магнерот в дозах 5 и 10 мг/кг (в расчете на элементный магний) в виде суспензии в крахмальном геле. Изученные дозы соответствуют максимальным суточным дозам магния, рекомендованным для человека при длительном применении данного препарата [10].

Оценка эффектов. Переносимость Магнерота оценивали путем ежедневного наблюдения за животными, в котором изучали неврологический статус по характеру спонтанной двигательной активности, общей возбудимости и реакции на тактильные и звуковые раздражители, а также по пищевой активности животных и динамике прироста их массы тела.

Специфическое влияние Магнерота на опухолевый процесс изучали по динамике роста и активности метастазирования КЛЛ. Для этого с 7-х суток опыта, по достижению опухолями измеряемого размера, каждые 2–3 сут у всех животных проводили измерение калипером двух диаметров опухолевых узлов: L – максимальный диаметр узла; W – диаметр, ортогональный к L. Расчет объемов узлов проводили в приближении: $V=(L \times W^2) \times (\pi/6)$, которое надежно коррелирует с данными магнитно-резонансной томографии [11]. Влияние препарата на рост КЛЛ оценивали путем статистического сравнения объема опухолевых узлов в контрольных и подопытных группах на разных сроках наблюдения, по длительности задержки роста опухоли и индексу торможения роста опухоли (ТРО): $TPO=(V_k-V_o)/V_k \times 100\%$, где V_k и V_o – средние объемы узлов в контрольной и опытной группе [12]. На 21-е сутки роста карциномы животных выводили из опыта путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом, выделяли легкие, фиксировали их 24 ч в жидкости Буэна и далее проводили подсчет числа крупных и мелких легочных метастазов. Влияние Магнерота на процессы метастазирования и рост метастазов оценивали

Рис. 2. Кривые скорости роста опухолей для индивидуальных животных.

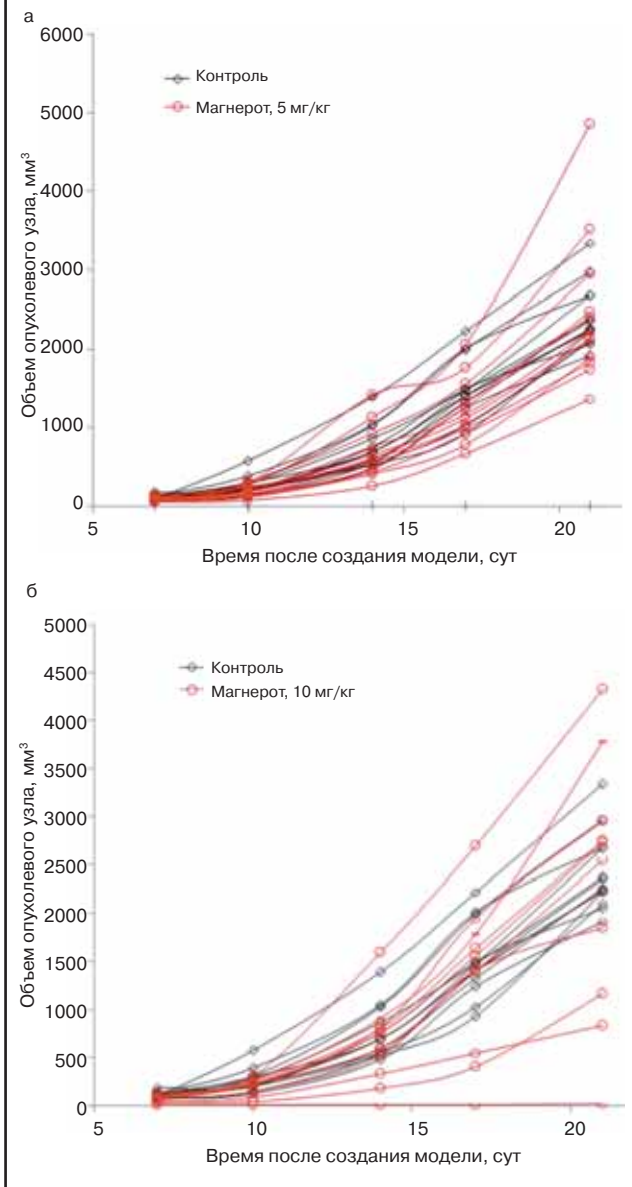


Рис. 3. Усредненные по группам кривые роста опухолей.

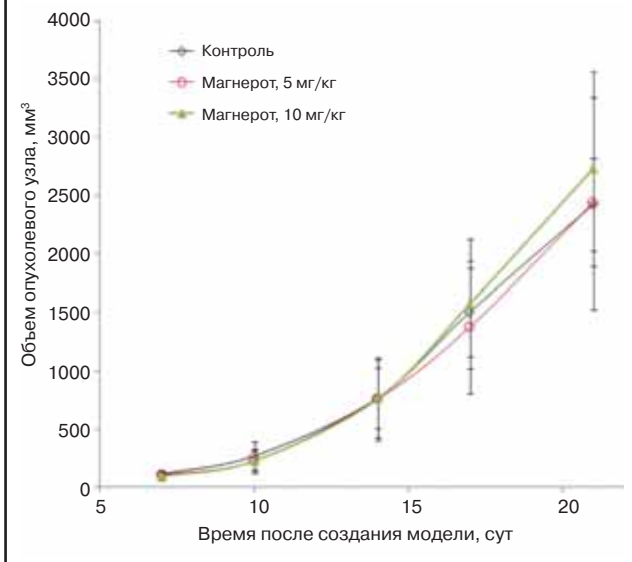
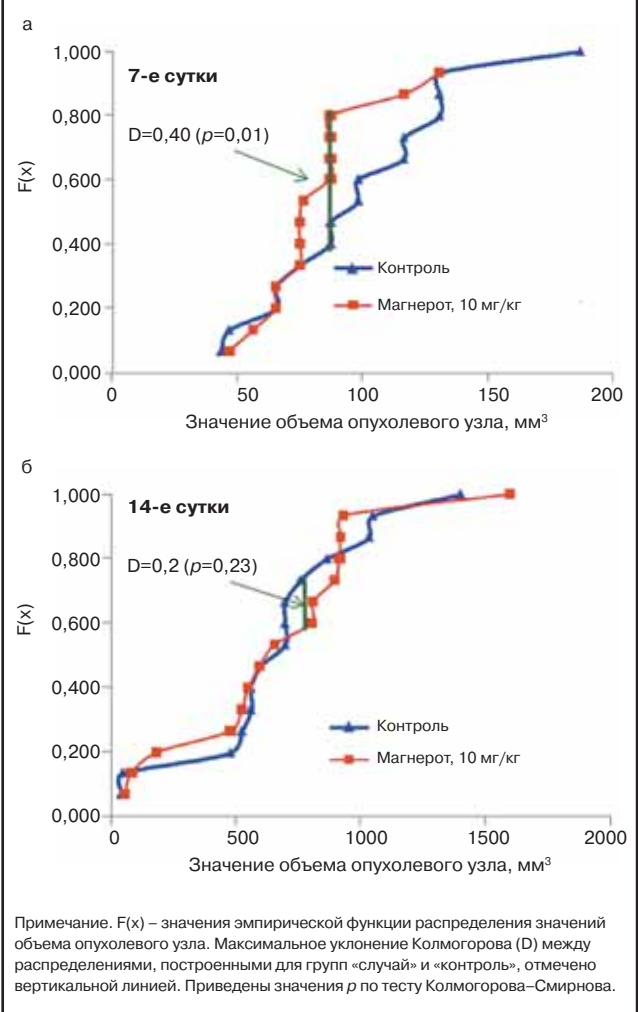
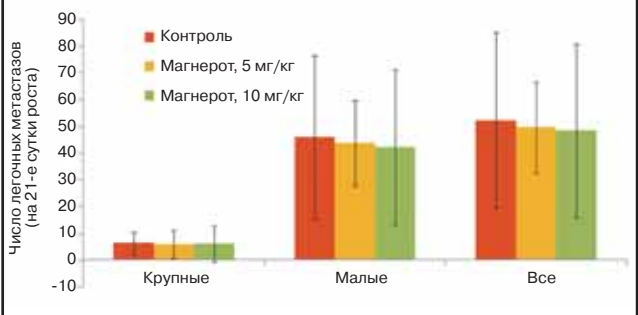


Рис. 4. Анализ различий в скорости роста опухолей по максимальному уклонению в тесте Колмогорова.



Примечание. F(x) – значения эмпирической функции распределения значений объема опухолевого узла. Максимальное уклонение Колмогорова (D) между распределениями, построенными для групп «случай» и «контроль», отмечено вертикальной линией. Приведены значения p по тесту Колмогорова–Смирнова.

Рис. 5. Отсутствие достоверных различий между группами в количестве опухолей разного размера (крупные, малые, все).



путем статистического сравнения числа метастазов в контрольных и опытных группах.

Статистическая обработка. При данной постановке эксперимента присутствует несколько подопытных групп, поэтому оценку межгрупповых различий приводили методами множественного сравнения – путем рангового дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса с применением критерия Данна. Различия полагали достоверными на 0,05 уровне значимости. Расчеты выполнены с помощью программного пакета Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты

Субхроническое интрагастральное введение Магнерота в дозах 5 и 10 мг/кг переносилось подопытными животными легко и не вызывало у них каких-либо изменений в нев-

Срок наблюдения, сут	Средний объем опухолевых узлов, мм ³ (M±SE)		
	Контроль	Магнерот, 5 мг/кг	Магнерот, 10 мг/кг
7-е	98,7±9,8	99,0±10,7	85,8±7,4
10-е	236,4±34,7	206,3±26,7	202,8±24,7
14-е	667,7±90,5	721,3±101,6	515,1±85,7
17-е	1302,9±159,6	1370,0±146,4	1370,3±189,7
21-е	2101,9±235,7	2433,7±252,0	2374,1±313,9

Показатель	Среднее число легочных метастазов на 21-е сутки роста КЛЛ (M±SE)		
	Контроль	Магнерот, 5 мг/кг	Магнерот, 10 мг/кг
Крупные	6,3±1,1	5,9±1,0	6,1±1,7
Малые	45,9±7,8	43,6±4,1	42,3±7,5
Всего	52,3±8,5	49,6±4,4	48,4±8,4

рологическом статусе и пищевой активности. Не наблюдалось также и статистически значимых различий в динамике прироста массы тела животных в разных экспериментальных группах (табл. 1). Анализ эмпирических функций распределения значения массы тела в экспериментальных группах посредством тестов Колмогорова и Смирнова также подтвердил отсутствие достоверных различий между группами (рис. 1).

В данном опыте рост КЛЛ носил типичный характер – к 7-м суткам после трансплантации опухолевый узел определялся и достигал измеряемого размера у 100% животных, а единичная гибель подопытных животных отмечалась на поздних сроках роста неоплазии – на 20–21-е сутки после перевивки. Анализ пучков индивидуальных кривых скорости роста опухолей подтвердил отсутствие достоверных различий между группами в течение всего периода исследования (рис. 2).

Анализ динамики роста КЛЛ в разных группах показал, что Магнерот в обеих использованных дозах в данном опыте не оказывал статистически значимого проопухолевого действия. Как показано в табл. 2, на всех сроках наблюдения объем опухолевых узлов КЛЛ в подопытных группах статистически не различался с показателями контрольной группы. Более того, в группе, получавшей Магнерот в дозе 10 мг/кг, была отмечена умеренная задержка роста карциномы (на 20–22%) к 14-м суткам. Однако этот эффект не достигал уровня статистической значимости по тесту Дана ($p=0,05$) и не наблюдался в последующие дни (рис. 3).

В то же время на 7-е сутки было установлено достоверное различие между контрольной группой и группой получавших Магнерот (Mg^{2+} – 10 мг/кг) с использованием другого статистического теста – непараметрического теста Колмогорова. Значение максимального отклонения (D) между распределениями, построенными для групп «случай» и «контроль», на 7-е сутки составило $D=0,40$ (что соответствовало достоверным различиям, $p=0,010$; рис. 4). Таким образом, приему препарата Магнерот соответствовали более низкие значения объема опухолей. Тем не менее данный эффект со временем затухал и к 14-м суткам достоверные различия между группами отсутствовали (см. рис. 4).

Не было отмечено влияния препарата Магнерот на процессы метастазирования и рост метастазов карциномы: число легочных метастазов на 21-е сутки роста КЛЛ в экспериментальных группах статистически не различалось (табл. 3; рис. 5).

Выводы

Магнерот в дозах 5 и 10 мг/кг при субхроническом энтеральном введении животным-опухоленосителям не оказывает никакого проопухолевого или прометастатического действия на К/ЛЛ. Более того, для дозы в 10 мг/кг (в расчете на элементный магний) отмечены достоверно более низкие объемы опухолей на 7-е сутки эксперимента. Результаты доказывают высокую онкологическую безопасность препарата и указывают на возможность компенсации Магнеротом дефицита магния у пациентов с опухолевыми заболеваниями.

Литература/References

1. Громова О.А., Калачева А.Г., Торшин И.Ю. и др. Недостаточность магния – достоверный фактор риска коморбидных состояний: результаты крупномасштабного скрининга магниевого статуса в регионах России. Фарматека. 2013; 6 (259): 115–29. / Gromova O.A., Kalacheva A.G., Torshin I.Yu. i dr. Nedostatocnost' magniia – dostoverniy faktor riska komorbidnykh sostoianii: rezul'taty krupnomasshtabnogo skringinga magnieвого statusa v regionakh Rossii. Farmateka. 2013; 6 (259): 115–29. [in Russian]
2. Torshin IY, Gromova OA. Magnesium and pyridoxine: fundamental studies and clinical practice. Nova Science Publ 2011.
3. Vasudevan S, Laconi E, Rao PM et al. Perturbations of endogenous levels of orotic acid and carcinogenesis: effect of an arginine-deficient diet and carbamyl aspartate on hepatocarcinogenesis in the rat and the mouse. Carcinogenesis. 1994; 15 (11): 2497–500.
4. Laconi E, Denda A, Rao PM et al. Studies on liver tumor promotion in the rat by orotic acid: dose and minimum exposure time required for dietary orotic acid to promote hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis 1993; 14 (9): 1771–5.
5. Walenta S, Voelxen NF, Mueller-Klieser W. Lactate-An Integrative Mirror of Cancer Metabolism. Recent Results Cancer Res. 2016; 207: 23–37. doi: 10.1007/978-3-319-42118-6_2.
6. Chang CC, Zhang C, Zhang Q et al. Upregulation of lactate dehydrogenase a by 14-3-3? leads to increased glycolysis critical for breast cancer initiation and progression. Oncotarget 2016; May 2. doi: 10.18632/oncotarget.9136.
7. Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sanchez-Garcia FJ. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. Front Immunol 2016; 7: 52. doi: 10.3389/fimmu.2016.00052.
8. Guedes M, Araujo JR, Correia-Branco A et al. Modulation of the uptake of critical nutrients by breast cancer cells by lactate: Impact on cell survival, proliferation and migration. Exp Cell Res 2016; 341 (2): 111–22. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.01.008.
9. Vlachostergios PJ, Oikonomou KG, Gibilaro E, Apergis G. Elevated lactic acid is a negative prognostic factor in metastatic lung cancer. Cancer Biomark 2015; 15 (6): 725–34. doi: 10.3233/CBM-150514.
10. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей. Справочник. 15-е изд. М.: Новая Волна, 2005. / Mashkovskii M.D. Lekarstvennye sredstva. Posobie dlia vrachei. Spravochnik. 15-e izd. M.: Novaia Volna, 2005. [in Russian]
11. Kawano K, Hattori Y, Iwakura H et al. Adrenal tumor volume in genetically engineered mouse model of neuroblastoma determined by magnetic resonance imaging. Exp Ther Med 2012; 4 (1): 61–4.
12. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. / Khabriev R.U. Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniiu novykh farmakologicheskikh veshchestv. Izd. 2-e, pererab. i dop. M.: Meditsina, 2005. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Адамян Лейла Вагоевна – акад., РАН, д-р мед. наук, проф., зам. дир. по научной работе ФГБУ НЦАГиП им. В.И.Кулакова, зав. каф. репродуктивной медицины и хирургии фак-та последипломного образования ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И.Евдокимова

Громова Ольга Алексеевна – д-р мед. наук, проф. каф. фармакологии и клин. фармакологии ГБОУ ВПО ИвГМА. E-mail: unesco.gromova@gmail.com

Грачева Ольга Николаевна – канд. мед. наук, доц. каф. акушерства и гинекологии ИПО ФГБОУ ВО СамГМУ

Калачева Алла Геннадьевна – канд. мед. наук, доц. каф. фармакологии и клин. фармакологии ГБОУ ВПО ИвГМА

Торшин Иван Юрьевич – канд. физ.-мат. наук, доц. каф. «Интеллектуальные системы» ФГАУ ВПО МФТИ

Филимонова Марина Владимировна – канд. мед. наук, ФГБУ НМИРЦ