

Стаховская Л.В.¹, Громова О.А.^{2,3}, Торшин И.Ю.³, Филимонова М.В.⁴

¹НИИ цереброваскулярной патологии и инсульта ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия; ²ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», Иваново, Россия; ³ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН, Москва, Россия; ⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия
¹117997, Москва, ул. Островитянова, 1; ²153000, Иваново, Шереметевский пр., 8; ³119333, Москва, ул. Вавилова, 40; ⁴249036, Калужская область, Обнинск, ул. Королева, 4

Противоопухолевые эффекты сочетанного применения витаминов В₁, В₆ и В₁₂

Витамины группы В широко используются в неврологии в лечебных и профилактических целях, нередко их назначают на длительный срок (недели и месяцы). В связи с этим важно всесторонне оценить целесообразность и безопасность их применения, особенно в повышенных (лечебных) дозах. В статье обсуждается потенциальная антиканцерогенность витаминов группы В.

Цель исследования — оценка влияния тиамин дисульфида, пиридоксина гидрохлорида и цианокобаламина (нейробион 110 мг/кг/сут) на рост и метастазирование злокачественных новообразований у мышей.

Материал и методы. Исследования проведены на 25 самцах мышей-гибридов F1 (возраст — 2,5–3 мес, масса тела — 23–26 г). В качестве опухолевой модели использована перевиваемая эпидермоидная карцинома легких Льюис (КЛЛ).

Результаты. Подопытные животные легко переносили препарат, симптомов интоксикации не отмечено. Воздействие препарата до 21-х суток развития КЛЛ сопровождалось нарастающей тенденцией к торможению роста опухоли на 10–20% ($p=0,059$).

Заключение. При субхроническом внутривентральном введении препарата В₁₂ животным-опухоленосителям в ежедневной дозе 110 мг/кг наблюдается устойчивая тенденция к торможению роста КЛЛ. Антиметастатического действия при этом не выявлено.

Ключевые слова: карцинома легких; тиамин дисульфид; пиридоксин гидрохлорид; цианокобаламин.

Контакты: Людмила Витальевна Стаховская; rsmu@rsmu.ru

Для ссылки: Стаховская ЛВ, Громова ОА, Торшин ИЮ, Филимонова МВ. Противоопухолевые эффекты сочетанного применения витаминов В₁, В₆ и В₁₂. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2017;9(4):101–105.

Antitumor effects of the combined use of vitamins B₁, B₆, and B₁₂ *Stakhovskaya L.V.¹, Gromova O.A.^{2,3}, Torshin I.Yu.³, Filimonova M.V.⁴*

¹Research Institute of Cerebrovascular Disease and Stroke, N.I. Pirogov Russian National Medical Research University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia; ²Ivanovo State Medical Academy, Ministry of Health of Russia, Ivanovo, Russia; ³Federal Research Center «Informatics and Control», Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ⁴National Medical Radiology Research Center, Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia

¹1, Ostrovityanov St., Moscow 117997; ²8, Sheremetevsky Pr., Ivanovo 153000; ³40, Vavilov St., Moscow 119333; ⁴4, Korolev St., Obninsk, Kaluga Region 249036

Vitamin B complex is widely used therapeutically and prophylactically in neurology; they are often prescribed for long-term treatment (for weeks and months). In this connection, it is important to comprehensively estimate the feasibility and safety of its use, especially at high (therapeutic) doses. The paper discusses the potential anticancer effects of vitamin B complex.

Objective: to evaluate the effect of thiamine disulfide, pyridoxine hydrochloride, and cyanocobalamin (neurobion 110 mg/kg/day) on the growth and metastatic spread of malignant tumors in mice.

Material and methods. Experiments were carried out in 25 F1 hybrid male mice (aged 2.5–3 months; body weight, 23–26 g). Transplantable Lewis lung epidermoid carcinoma (LLC) was used as a tumor model

Results and discussion. The experimental animals tolerated the drug well; there were no symptoms of intoxication. The drug's effects lasting up to 21 days of LLC development were accompanied by a growing trend towards tumor growth inhibition by 10–20% ($p=0.059$).

Conclusion. After subchronic intragastric administration of B₁₂ at a daily dose of 110 mg/kg to tumor-bearing animals, there is a steady tendency to LLC growth inhibition. No antimetastatic activity was found.

Keywords: lung carcinoma; thiamine disulfide; thiamine hydrochloride; cyanocobalamin.

Contact: Lyudmila Vitalyevna Stakhovskaya; rsmu@rsmu.ru

For reference: Stakhovskaya LV, Gromova OA, Torshin IYu, Filimonova MV. Antitumor effects of the combined use of vitamins B₁, B₆ and B₁₂. Neurologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics. 2017;9(4):101–105.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2017-4-101-105>

Витамины группы В традиционно используются при неврологических заболеваниях в лечебных и профилактических целях, иногда длительно (недели и месяцы). Поэтому важно всесторонне оценить целесообразность и безопасность применения этих препаратов, особенно в повышенных (лечебных) дозах. Интерес к теме «витамины и канцерогенез» возник после появления данных об их потенциальной антиканцерогенности.

Витамины играют важную роль в обмене ксенобиотиков, снижении выраженности воспаления, формировании антиоксидантной защиты организма. В конце 80-х годов были получены данные об антиканцерогенном действии всех известных витаминов в физиологических дозах [1–4]. Противоопухолевый эффект физиологических доз витаминов отмечается уже во внутриутробном периоде: употребление беременными витаминных комплексов снижает риск развития опухолей мозга у детей [5]. Важными витаминами, которые следует использовать для лечения опухолевых заболеваний, являются витамины С, Е, D и витамины группы В [6].

Показано, что тиамин улучшает соматическое состояние пациентов с онкологическими заболеваниями [7]. Дефицит витаминов В₁₂, В₆ и фолатов способствует не только возникновению гипергомоцистеинемии (доказанному фактору риска опухолевых заболеваний) [8], но и снижению Т-клеточной защиты. Многолетнее применение комплексов витаминов группы В (В₁₂, В₆ и фолатов) абсолютно безопасно [9]. Регулярное потребление фолатов, витаминов В₆ и В₁₂ снижает риск развития рака молочной железы [10].

Опухолевые заболевания (в частности, опухоли желудка и кишечника) сопровождаются дефицитом витамина В₁₂. При этом, с одной стороны, показано, что некоторые виды опухолей являются своего рода «ловушками» витамина В₁₂, захватывают его из организма пациента и вызывают недостаточность этого витамина). При распаде клеток таких опухолей у пациентов отмечаются кратковременные периоды повышения концентрации витамина В₁₂ в плазме крови. С другой стороны, результаты многочисленных экспериментальных исследований указывают на то, что витамин В₁₂ может ингибировать рост опухолевых клеток. Данных о стимулирующем действии витамина В₁₂ на рост опухолей не получено [11].

Противоопухолевое действие витаминов В₆ и В₁₂ обусловлено тем, что они принципиально необходимы для фолатного метаболизма, обезвреживания гомоцистеина, метилирования ДНК, биосинтеза нуклеотидов, профилактики анемических состояний. Нарушение этих процессов, которое наблюдается на фоне дефицита витаминов В₆, В₁₂ и других витаминов группы В, способствует канцерогенезу. Как показывают результаты клинических исследований, связь между дефицитом витамина В₁₂ и риском опухолевых заболеваний усиливается при наличии таких факторов, как потребление красного мяса, алкоголя и недостаток витаминов группы В [11].

Цель исследования – изучение влияния препарата нейробион (в виде таблеток) на рост и метастазирование злокачественных новообразований у мышей.

Материал и методы. Лабораторные животные. Исследования проведены на 25 самцах мышей-гибридов F₁ (СВАхС₅₇ВL₆) в возрасте 2,5–3 мес с массой тела 23–26 г. Животные были получены из питомника Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, имели ветеринарный серти-

фикат и прошли 20-суточный карантин в виварии. Животных содержали в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России № 708н [12] (клетки Т-3, естественное освещение, принудительная 16-кратная вентиляция, температура 18–20 °С, относительная влажность воздуха 40–70%, подстилка из простерилизованных древесных стружек, свободный доступ к питьевой воде и корму). Животные получали стандартный брикетированный корм ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», Россия). Все работы с лабораторными животными выполнены в соответствии с общепринятыми этическими нормами, на основе стандартных операционных процедур, принятых в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба, которые соответствуют правилам Европейской конвенции по защите животных, используемых для научных целей (ETS 123) [13].

Опухолевая модель. Исследования проведены на переносимой карциноме легких Льюис (КЛЛ). Штамм КЛЛ получен из банка опухолевых материалов Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина и поддерживался на самцах мышей С₅₇ВL₆. Трансплантацию КЛЛ самцам мышей F₁ (СВАхС₅₇ВL₆) проводили с помощью подкожного введения 1,9×10⁶ опухолевых клеток в 0,1 мл суспензии в область латеральной поверхности правого бедра [14–16].

Экспериментальные группы, способ введения и доза препарата. Животных включали в опыт на 7-е сутки после переноски КЛЛ, когда опухолевый узел уже сформировался и мог быть измерен у всех мышей. Животных рандомизировали на две группы – контрольную (n=10) и подопытную (n=15). Животные контрольной группы получали плацебо. Животным подопытной группы с 7-х по 20-е сутки после трансплантации КЛЛ ежедневно внутривентрикулярно вводили нейробион.

Нейробион рекомендуется принимать по 1–3 таблетки в сутки в течение 4–6 нед. Каждая таблетка имеет массу 700 мг и содержит 100 мг тиамина дисульфида, 200 мг пиридоксина гидрохлорида и 200 мкг цианокобаламина. В соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [17] коэффициент пересчета для мышей составляет 11,8. Поэтому препарат у подопытных животных применяли в дозе 110 мг/кг (в пересчете на витамины: тиамина дисульфида – 15,6 мг/кг, пиридоксина гидрохлорида – 31,2 мг/кг, цианокобаламина – 31,2 мкг/кг). Таблетку измельчали и давали животным в 1% крахмальном геле, который изготавливали *ex tempore*. В качестве плацебо использовали соответствующее количество 1% крахмального геля без добавления нейробиона.

Оценка эффектов. Переносимость нейробиона определяли при ежедневном наблюдении за животными: изучали неврологический статус по характеру спонтанной двигательной активности, общей возбудимости и реакции на тактильные и звуковые раздражители, а также пищевую активность и динамику прироста массы тела.

Влияние нейробиона на опухолевый процесс оценивали по динамике роста и активности метастазирования КЛЛ. Для этого каждые 3–4 сут у всех животных измеряли калипером два диаметра опухолевых узлов: максимальный (L) и ортогональный к L (W). Объем узлов рассчитывали в приближении, которое надежно коррелирует с данными магнитно-резонансной томографии [14]. Влияние препара-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 1. Динамика массы тела у животных контрольной и подопытной групп ($M \pm SD$)

Группа животных	7-е сутки	10-е сутки	Масса тела, г 13-е сутки	17-е сутки	21-е сутки
Контрольная (n=10)	25,9±1,4	25,9±1,6	27,1±1,4	28,0±1,3	28,9±1,5
Подопытная (n=15)	25,7±1,9	26,0±1,7	26,5±1,7	27,6±1,9	29,1±2,2

Таблица 2. Динамика роста КЛЛ у животных контрольной и подопытной групп ($M \pm SD$)

Группа животных	7-е сутки	10-е сутки	Средний объем опухоли, мм ³ 13-е сутки	17-е сутки	21-е сутки
Контрольная (n=10)	30±14	243±99	547±128	1091±298	2612±804
Подопытная (n=15)	38±24	193±61	455±147	986±239	1999±409

Таблица 3. Число легочных метастазов у животных контрольной и подопытной групп на 21-е сутки роста КЛЛ ($M \pm SD$)

Группа животных	Число легочных метастазов		
	крупные	малые	всего
Контрольная (n=10)	10,9±6,9	53,9±35,6	64,5±39,6
Подопытная (n=15)	12,2±11,0	45,6±21,7	58,4±24,2

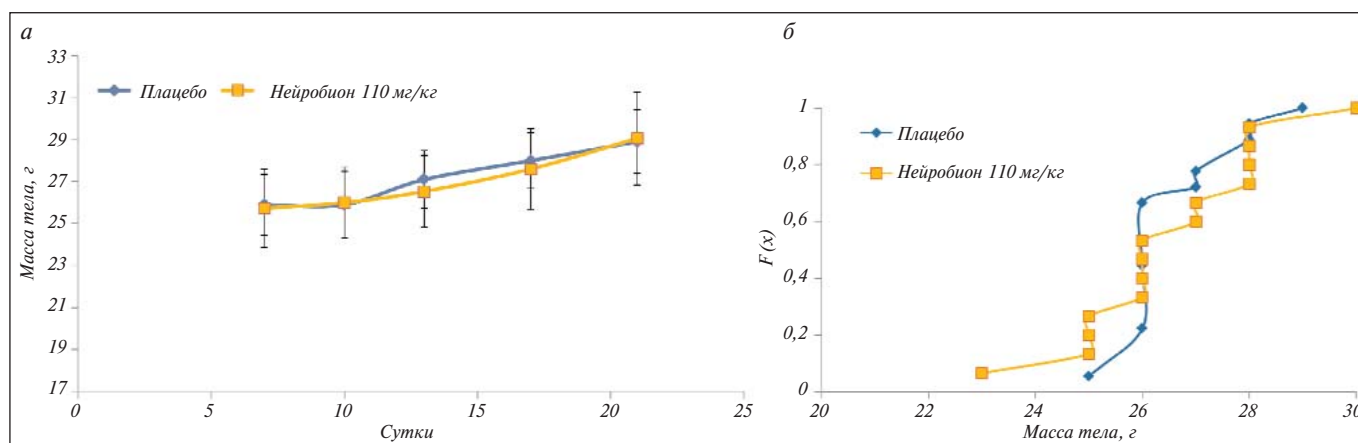


Рис. 1. Динамика массы тела у животных контрольной и подопытной групп (а) и отсутствие различий по тесту Колмогорова–Смирнова на 13-е сутки эксперимента (б). $F(x)$ – эмпирическая функция распределения

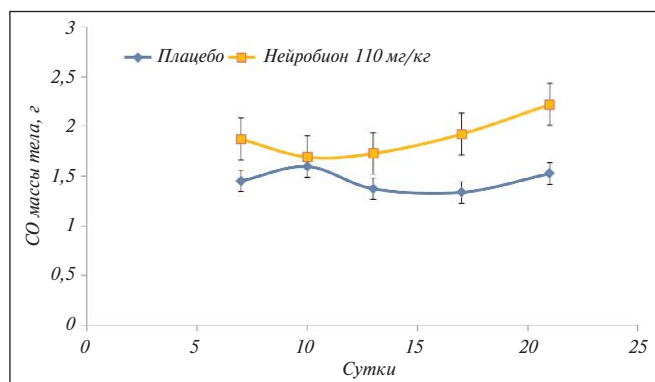


Рис. 2. Динамика СО массы тела у животных контрольной и подопытной групп

та на рост КЛЛ изучали путем статистического сравнения объема опухолевых узлов в контрольной и подопытной группах в разные сроки наблюдения, а также по индексу торможения роста опухоли [15].

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, после чего подсчитывали число крупных и мелких легочных метастазов. Влияние нейробиона на процессы метастазирования и рост метастазов оценивали путем статистического сравнения числа метастазов в контрольной и подопытной группах.

Статистическая обработка. Статистическую оценку значимости межгрупповых различий приводили с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия полагали достоверными при уровне значимости 0,05. Расчеты вы-

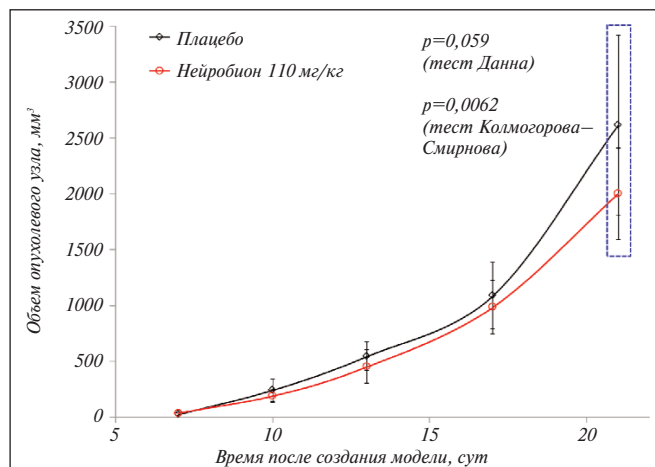


Рис. 3. Сравнение усредненных по группам кривых скорости роста опухолей: достоверные различия между нейробионом и плацебо

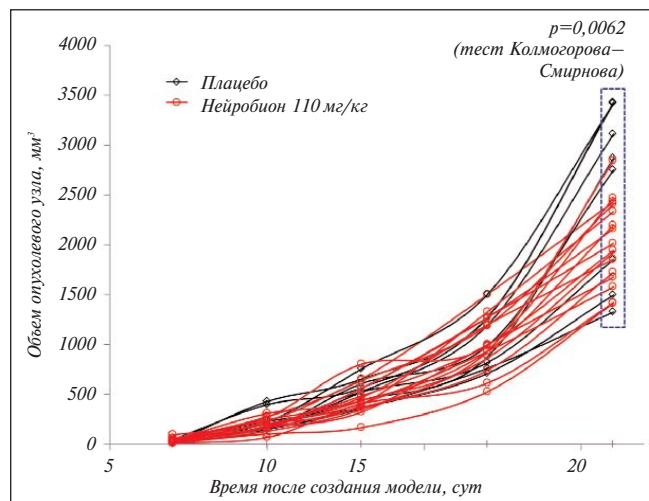


Рис. 4. Индивидуальные кривые скорости роста опухолей у животных

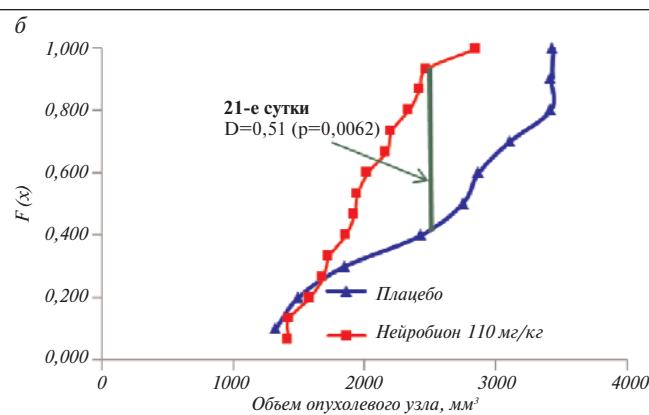
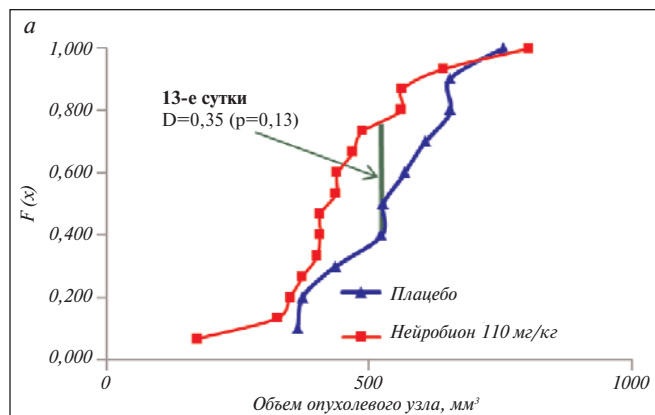


Рис. 5. Анализ различий в скорости роста опухолей по максимальному уклону в тесте Колмогорова–Смирнова на 13-е (а) и 21-е (б) сутки. $F(x)$ – эмпирическая функция распределения значений объема опухолевого узла. Максимальное уклонение в тесте Колмогорова–Смирнова (D) между распределениями, построенными для групп нейробиона и плацебо, отмечено вертикальной линией

полнены с помощью программного пакета Statistica 7.0, MS Excel.

Результаты. Животные легко переносили субхроническое внутрижелудочное введение нейробиона в дозе 110 мг/кг, не отмечено изменений в неврологическом статусе, двигательной и пищевой активности. Не наблюдалось также и статистически значимых различий в динамике прироста массы тела в двух группах животных (табл. 1, рис. 1).

Интересно, что при отсутствии различий в динамике увеличения массы тела (см. рис. 1) были установлены достоверные различия в динамике стандартного отклонения (СО) массы тела (рис. 2). В то время как в контрольной группе СО массы тела сохранялось в диапазоне 1,2–1,5 г в группе животных, получавших нейробион, отмечалось достоверное возрастание СО, т. е. разброса значений массы тела. Это указывает на возникающее в ходе применения нейробиона «расслоение» подопытной группы мышей на животных с более интенсивным и менее интенсивным нарастанием массы тела. Существование такого «расслоения» является косвенным признаком того, что действие нейробиона отличается от действия плацебо.

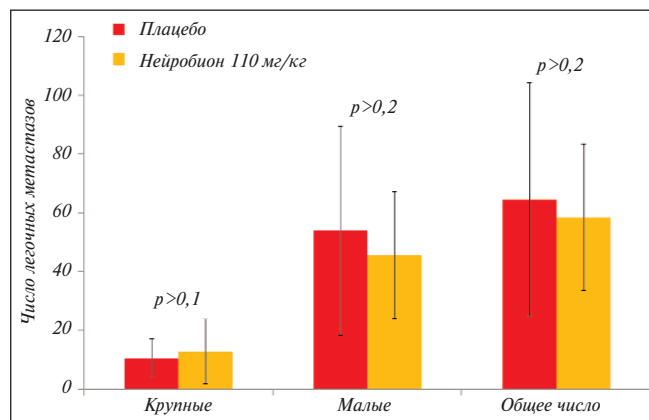


Рис. 6. Отсутствие достоверных различий между группами в количестве опухолей разного размера (крупные, малые, общее число) на 21-е сутки. Достоверность различий оценена по t -тесту

Анализ динамики роста КЛЛ в двух группах животных показал, что уже через 3 дня после начала эксперимента

нейробион вызывал у мышей-опухоленосителей умеренное торможение роста КЛЛ (на 10–20%; табл. 2, рис. 3). Причем этот эффект был не только стабильным, но и усиливался на поздних этапах эксперимента: на 21-е сутки различие объемов опухолей в группах становилось достоверным ($p=0,059$ по тесту Данна).

Анализ пучков индивидуальных кривых скорости роста опухолей подтвердил достоверные различия между подопытной и контрольной группами, наблюдавшиеся до 13-х суток (рис. 4). К 13-м суткам эксперимента наметилась тенденция к снижению скорости роста опухолей ($p=0,07$ по тесту χ^2), а к 21-м суткам – достоверное снижение интенсивности роста опухолей ($p=0,045$).

Достоверность различий была подтверждена и другим статистическим тестом – непараметрическим тестом Колмогорова–Смирнова. Значение максимального укло-

нения (D) между распределениями, построенными для групп нейробиона и плацебо, на 13-е сутки составило 0,35 ($p=0,133$), а на 21-е сутки – 0,51 (различия достоверны, $p=0,0062$; рис. 5).

Сколько-нибудь значимого влияния на процессы метастазирования КЛЛ и рост легочных метастазов нейробион не оказывал (табл. 3, рис. 6).

Заключение. При длительном субхроническом внутриведении животным-опухоленосителям тиамин-дисульфида, пиридоксина гидрохлорида и цианокобаламина (нейробион 110 мг/кг/сут) наблюдается устойчивая тенденция к торможению роста КЛЛ (в среднем на 10–20%). Нейробион не влиял на метастазирование опухолей. Результаты исследования указывают на то, что препарат проявляет слабо выраженный, но достоверный противоопухолевый эффект ($p=0,0062$ по тесту Колмогорова–Смирнова).

ЛИТЕРАТУРА

1. Geissler C., Powers H. Human Nutrition. Edinburgh; 2006.
2. Chang SC, Lin PC, Lin JK, et al. Role of MTHFR polymorphisms and folate levels in different phenotypes of sporadic colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis.* 2006;22(5):483-9. doi: 10.1007/s00384-006-0190-x.
3. Bosetti C, Scotti L, Maso LD, et al. Micronutrients and the risk of renal cell cancer: A case-control study from Italy. *Int J Cancer.* 2007;120(4):892-6. doi:10.2139/ssrn.1988201.
4. Stadler R, Kremer A. Therapeutic advances in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): from retinoids to retinoids. *Semin Oncol.* 2006;33 (1 Suppl 3):7-10. doi:10.1053/j.seminoncol.2005.12.016.
5. Preston-Martin S, Pogoda JM, Mueller BA, et al. Prenatal vitamin supplementation and risk of childhood brain tumors. *Int J Cancer. Suppl.* 1998;11:17-22. doi:10.1002/(sici)1097-0215 (1998)78:11<17::aid-ijc6>3.3.co;2-h.
6. Swami S, Krishnan AV, Moreno J., Feldman D. Calcitriol and genistein actions to inhibit the prostaglandin pathway: potential combination therapy to treat prostate cancer. *J Nutr.* 2007;137(1):205S-210S.
7. Perumal SS, Shanthi P, Sachdanandam P. Energy-modulating vitamins – a new combinatorial therapy prevents cancer cachexia in rat mammary carcinoma. *Br J Nutr.* 2005;93(6):901-9. doi:10.1079/bjn20051439.
8. Araki A. Homocysteine and diabetic microangiopathy. *Nippon Rinsho.* 2006;64(11):2153-8.
9. Bley J, Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, et al. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(4):680-1.
10. Lapointe A, Couillard C, Lemieux S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *J Nutr Biochem.* 2006;17(10):645-58. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.01.001.
11. Volkov I. The master key effect of vitamin B12 in treatment of malignancy – a potential therapy? *Med Hypotheses.* 2008;70(2):324-8. doi:10.1016/j.mehy.2007.05.029.
12. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». Приказ Минздрава РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». [The Order of the health Ministry of the Russian Federation dated 23 August 2010 №. 708n «On approval of rules for laboratory practice». The Order of the Ministry of health from 1 April 2016 № 199n «On approval of rules of good laboratory practice».]
13. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986. http://www.iwns.org/fileadmin/content/legislation/european_conventions/E.C_Protecton_of_Vertebrate_Animals_used_for_experimental_and_other_Scientific_Purposes.pdf
14. 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. doi:10.3892/etm.2012.564.
15. Хабриев РУ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва: Медицина; 2005. [Khabriev RU. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv* [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. Moscow: Meditsina; 2005.]
16. Миронов АН, Бунатян НД, Васильев АН и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Москва: Гриф и К; 2012. [Mironov AN, Bunatyan ND, Vasil'ev AN, et al. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [The guidelines for preclinical studies of drugs]. Moscow: Grif i K; 2012.]
17. Гуськова ТА. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований. Токсикологический вестник. 2010;(5):2-5. [Gus'kova TA. Preclinical toxicology study of drugs as a guarantee of security of their clinical trials. *Toksikologicheskii vestnik.* 2010;(5):2-5. (In Russ.)].

Поступила 20.08.2017

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Исследование проведено при поддержке ООО «Др. Редди'с Лабораторис». Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.