

На правах рукописи

ЯГУБОВ СЕРГЕЙ АРКАДЬЕВИЧ

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО
ДЕЙСТВИЯ МЕТРОНИДАЗОЛА НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ
АКТИВНОСТЬ И ТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦИТОСТАТИКОВ**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Киселевский Михаил Валентинович

доктор медицинских наук, профессор

Барсуков Юрий Андреевич

Официальные оппоненты:

Маслюкова Елизавета Александровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры медицинской физики Димитровградского инженерно-технологического института – филиала федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

Безбородова Ольга Алексеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «4» февраля 2021 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2020 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования являются одной из основных причин смерти в России и в мире. В связи с этим повышение эффективности лечения онкологических больных остается актуальной проблемой. В настоящее время можно выделить два основных подхода для решения проблемы лечения этой группы заболеваний. Первый – это поиск новых противоопухолевых препаратов. Второй – разработка новых схем комбинированного использования уже существующих фармакологических препаратов. Первый подход подразумевает проведение первичного скрининга сотен и тысяч соединений, чтобы среди них обнаружить вещества с уникальной противоопухолевой активностью. Второй подход требует детального знания механизмов действия известных лекарственных препаратов, их фармакокинетики, чтобы, используя как свойства самих препаратов, так и их взаимное действие на злокачественно трансформированную клетку, нанести опухоли максимальное повреждение. Одним из препаратов, который уже нашел применение в онкологической практике, является метронидазол. Исходно метронидазол (МТ) использовался как противопаразитарный и противомикробный препарат. Эти же его свойства используются и при лечении сопутствующих инфекционных заболеваний у онкологических больных совместно с антибиотиками (Bergogne-Bérézin E., 2002). Противоинфекционное действие МТ использовали для эрадикации *Helicobacter pylori*. МТ в ряде случаев используют на фоне введения цитостатиков, т.к. современная химиотерапия обладает выраженным иммуносупрессивным действием, что приводит к повышению риска инфекционных осложнений у онкологических больных (Аль-Муса А., 1982). В таких случаях часто отмечают резкое увеличение токсического воздействия цитостатических препаратов, которое приводит к необходимости прерывать начатое лечение. Вероятно, что в данном случае речь идет о взаимном влиянии препаратов на метаболизм друг друга. Наличие такой клинической проблемы требует экспериментального обоснования оптимизации использования комбинации МТ с цитостатиками. В научной литературе данные, которые позволили бы выработать рекомендации по эффективному использованию комбинации рассматриваемых лекарственных средств для лечения онкологических больных, отсутствуют. Поскольку использование всех этих препаратов в лечебном цикле является необходимым, то важно понять, каковы должны быть временные интервалы между ними для минимизации влияния на метаболизм друг друга. Изучение метаболизма МТ позволило установить, что он обладает свойствами миметика кислорода. Данное свойство МТ нашло применение в клинической онкологии, в частности в его сочетании с лучевыми методами лечения злокачественных заболеваний (Аль-Муса А., 1982; Байсоголов Г.Д., 1983; Баран Л.А., 1984). Известно, что эффективность лучевого поражения клеток возрастает, если в этих клетках

высокое парциальное давление кислорода. Справедливо также обратное утверждение, что на фоне гипоксии цитопатогенное действие радиации уменьшается. МТ обладает нейрпатогенным действием. Причем это нейрпатогенное действие напрямую зависит от дозы препарата. Поэтому большие дозы препарата, которые необходимы для его радиосенсибилизирующего действия, могут давать нежелательные побочные осложнения. Таким образом, независимо от цели использования МТ в онкологии - как противoinфекционного препарата или как радиосенсибилизатора - возникает один и тот же вопрос: как этот препарат будет влиять на эффективность химиотерапевтических препаратов и лучевой терапии при лечении злокачественных опухолей у больных. Основными вопросами при изучении фармакологического действия совместного действия препаратов, являются влияние комбинации на токсичность и противоопухолевый эффект, а также на преодоление устойчивости опухоли к цитостатику. Например, если токсичность комбинации препаратов сопровождается увеличением эффективности их воздействия на опухоль, то есть смысл в использовании такой комбинации в лечебном процессе. Если же увеличение токсичности комбинации не сопровождается возрастанием ее терапевтической эффективности, то эту комбинацию не рекомендуется использовать в клинической практике. Если комбинация препаратов позволяет преодолевать исходную (индуцированную) резистентность опухоли к цитостатику, то она также должна использоваться в онкологии. Для ответа на эти вопросы необходимо провести соответствующие исследования в эксперименте на перевиваемых опухолях на животных и в системе *in vitro*. При работе на экспериментальных животных целесообразно изучить токсическое и лечебное действие комбинации МТ и цитостатика, сделать вывод об эффективности такой комбинации, а также дать рекомендации по их совместному использованию в клинике. При работе в системе *in vitro* важно оценить эффективную цитотоксическую концентрацию как одного цитостатика, так и его комбинации с МТ. Данное исследование позволит ответить на вопрос о возможности преодоления резистентности опухолевых клеток к противоопухолевому препарату и об увеличении его терапевтической эффективности. Такое исследование целесообразно провести с использованием сигнальных опухолевых моделей, которые отличаются высокой агрессивностью и имеют общие биохимические черты с соответствующими опухолями человека.

Степень разработанности темы

Несмотря на достаточно большое количество работ по изучению противoinфекционных эффектов МТ а и его применения в клинической практике онкологии, остается не решенным вопрос о влиянии препарата противоопухолевую активность и токсические свойства цитостатиков. Отсутствуют также оптимальные подходы для количественной оценки

оптимальных радиосенсибилизирующих концентраций в опухоли для последующей радиотерапии. Методы применения МТ для лечения онкологических больных рассматривались в работах Голдобенко Г.В., Кныша В.И., Кондратьева А.Л., Барсукова Ю.А. и соавторов. Разработка лекарственной формы метронидазола для локального применения проводилась Н.Т. Олтаржевской и И.В. Гусевым. В зарубежной литературе клиническая эффективность и побочных эффектов МТ исследовалась в работах Furukawa S, Yamamoto T, Sugiyama A, Ohira K, Aotsuka Y, Koide K, Kojima K, и Kuwabara S.

Цель исследования

Исследование влияния метронидазола на биологическую активность противоопухолевых цитостатиков.

Задачи исследования

1. Изучить влияние метронидазола на противоопухолевую активность 5-фторурацила и доксорубина у экспериментальных животных
2. Исследовать влияние метронидазола на способность 5-фторурацила и доксорубина преодолевать устойчивость опухолевых клеток в системе *in vitro*.
3. Оценить влияние метронидазола на токсичность 5-фторурацила и доксорубина.
4. Разработать метод количественного определения метронидазола в нормальных и опухолевых тканях онкологических больных.
5. Определить содержание метронидазола в опухолевых тканях онкологических больных при аппликационном воздействии.

Методы и методология исследования

При проведении работы были использованы методы экспериментальной онкологии и токсикологии. Для оценки влияния препаратов на жизнеспособность опухолевых клеток применяли методы световой микроскопии и цитотоксический тест. Для отработки метода определения МТ в крови пациентов использованы методы колоночной хроматографии, спектрофотометрии, электрофорез и протеомный анализ.

Научная новизна

Впервые проведено исследование концентрации МТ в опухолях человека при местном применении. Показана возможность достижения необходимых радиосенсибилизирующих концентраций препарата при применении биополимерной композиции, содержащей МТ.

Впервые изучено изменение токсического и противоопухолевого действия доксорубина и 5-фторурацила на фоне введения МТ у экспериментальных животных.

Получены новые данные, свидетельствующие об увеличении токсического действия цитостатиков у мышей на фоне введения МТ нивелируется, если интервал между введениями препаратов составляет более 4 часов или более 3 периодов полуэлиминации МТ.

Получены новые данные о цитотоксической активности комбинации МТ и цитостатиков по отношению к опухолевым клеткам *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость

Представленные данные расширяют представления о влиянии МТ на метаболизм цитостатиков и могут быть использованы для повышения эффективности и снижения токсичности методов противоопухолевой терапии. Отработан метод количественной оценки содержания МТ в биоматериалах. Обоснованы оптимальные режимы местного применения МТ-содержащей композиции для достижения радиосенсибилизирующей концентрации препарата в опухоли толстой кишки. Полученные результаты использованы в разработке метода комплексного лечения больных раком толстой кишки.

Личный вклад

Автор разработал дизайн диссертационной работы, освоил и эффективно применил экспериментальные методы исследования для решения поставленных задач; выполнил статистическую обработку и описал полученные результаты; сформулировал выводы и положения, выносимые на защиту. В получении и публикации части данных, помимо научных руководителей проф. Ю.А. Барсукова и проф. М.В. Киселевского, вместе с автором участвовал проф. Ф.В. Доненко (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). При этом вклад автора в подготовку диссертации, автореферата и научных публикаций по теме диссертационного исследования является определяющим.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («Медицинские науки») и области исследований п.2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» и п.6 «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Положения, выносимые на защиту

1. Токсическое действие МТ в сочетании с цитостатиками зависит от интервала между введением этих препаратов. Введение МТ за 20 мин –т 1 ч характеризовалось повышением летальности; при увеличении интервала введения препаратов до 2 ч. не отмечалось достоверного увеличения летальности животных, однако зарегистрирована

лейкопения и снижение массы тела. Эффект усиления токсичности композиции нивелировался только при введении МТ за 4 ч до цитостатика.

2. Комбинация МТ и цитостатиков существенно не влияет на противоопухолевую активность химиопрепаратов, и приводит к усилению токсического эффекта, поэтому при совместном применении МТ и химиопрепаратов интервал между их введениями должен составлять не менее 4 ч.

3. Разработанная методика определения концентрации МТ в биологических материалах позволила определить оптимальные режимы аппликации препарата, позволяющие достичь эффективной радиосенсибилизирующей концентрации препарат в опухоли пациентов.

Внедрение результатов исследования

Основные результаты исследования доложены и обсуждены на научно-практических конференциях с международным участием «Новые отечественные противоопухолевые препараты» в 2016 г. и 2017 г. Результаты работы внедрены в практику ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 4 октября 2019 года на научной конференции с участием лабораторий и отделений ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

Материалы диссертационных исследований изложены в 5 научных работах, из них 3 статьи опубликованы в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Получен 1 патент на изобретение.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 112 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего источника, в том числе отечественных и зарубежных. Работа иллюстрирована таблицами и рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Лабораторные животные

Опыты проводили на мышах линии СВА/Лас массой 18-20 г, самцах (n=450), полученных из питомника «Столбовая» Московской области, мышах линии С57Bl/6 весом 20-

22 г, самцах (n=450) из питомника «Столбовая» Московской области. Мышей выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Перевиваемые опухоли

Карцинома яичников СаО-1 и меланому В16 были получены из коллекции опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Карциному яичников поддерживали перевивкой на мышах линии СВА/Лас. Опухоль перевивали подкожно в правую подмышечную область. Опухолевый узел извлекали из мышики-донора в стерильных условиях. Участки некроза опухолевого узла удаляли. Остальную часть узла измельчали ножницами в среде RPMI-1640 и затем аккуратно выделяли одиночные опухолевые клетки в стеклянном гомогенизаторе. Полученную суспензию затем фильтровали через капроновый фильтр. Конечное разведение суспензии составляло 1 г ткани на 12 мл среды RPMI-1640. Инъекцию суспензии делали из расчета 0,2 мл суспензии на мышь. Меланому В16 поддерживали перевивкой на мышах линии С57Bl/6. Опухоль перевивали подкожно в правую подмышечную область. Для перевивки опухолевый узел извлекали из мышики-донора в стерильных условиях. Участки некроза опухолевого узла удаляли. Остальную часть узла измельчали ножницами в среде RPMI-1640 и затем аккуратно (без вращения) выдавливали одиночные опухолевые клетки в стеклянном гомогенизаторе. Полученную суспензию затем фильтровали через капроновый фильтр. Конечное разведение суспензии составляло 1 г ткани на 10 мл среды RPMI-1640. Инъекцию суспензии делали из расчета 0,2 мл суспензии на мышь.

Осадок клеток ресуспензировали и подсчитывали их количество в камере Горяева.

Оценка противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект оценивали по объему опухоли и торможению роста опухоли (ТРО). Объем опухоли измеряли по двум взаимно перпендикулярным диаметрам. Объем выражали в условных единицах (мм³) и определяли по формуле

$$V=a^2b,$$

где а – меньшее из линейных размеров опухоли, выраженное в миллиметрах, а b – больший линейный размер опухоли, выраженный также в миллиметрах.

Торможение роста опухоли рассчитывали по формуле:

$$\text{ТРО} = V_{\text{ср. опыт}} - V_{\text{ср. контроль}} / V_{\text{ср. Контроль}}.$$

Где $V_{\text{ср. опыт}}$ – средний размер опухоли в у.е. в опытной группе,

$V_{\text{ср. контроль}}$ – средний размер опухоли в у.е. в контрольной группе.

Противоопухолевые препараты

Доксорубин фирмы Teva Pharmaceutical Industries, Израиль (Doxorubicin-Teva) и 5-фторурацил фирмы EBEWE Pharma, Австрия (5-Fluorouracil-Ebewe).

Световая микроскопия

Световая микроскопия была выполнена для цитологического исследования клеток карциномы яичников CaO-1 и меланомы B16 *in vitro*.

Цитологический контроль клеток перевиваемых штаммов проводили методами фазово-контрастной микроскопии и фотографирования клеток с помощью системы AxioVision 4 («Carl Zeiss», Германия). Клетки инкубировали в CO₂ – инкубаторе (Binder, Германия) в среде RPMI-1640 (Панэко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят (Панэко, Россия). Визуальный контроль за результатами роста клеток проводили с помощью фото-видеосистемы AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Германия), с использованием микроскопа Axiovert (Carl Zeiss, Германия) и программы визуализации изображений Axiovision 4 (Carl Zeiss, Германия).

Цитотоксический тест

Опухолевые клетки в концентрации 1×10^4 в 1 мл инкубировались в культуральной среде RPMI-1640 в плоскодонных 96-луночных микропланшетах (Costar). Время инкубации составляло 24 часа. Для выявления цитотоксической активности клеток использовали тест восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ-тест). Суть метода заключается в метаболическом превращении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид в диформазаз НАДФН-зависимыми оксидазами клеток, активность которых увеличивается в процессе митогенеза. Образующийся диформазаз элюировался с клеточных мембран диметилсульфоксидом, результат оценивался спектрофотометрически при длине волны 540 нм. После 24 часов инкубации в лунки микропланшета добавлялся витальный краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (Sigma) и по оптической плотности, измеряемой на мультискане МСС-340 (Labsystem, Финляндия), рассчитывался процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности).

Проточная цитометрия (FACS-анализ)

Определение экспрессии поверхностных клеток карциномы яичников CaO-1 проводили при помощи поликлональных антител против муцина СА 125 человека («Хема», Россия). Антитела были мечены FITC (флюоресцеинизотиоционатом). Клетки карциномы CaO-1 инкубировали в течение 10 мин с 10% сывороткой человека, чтобы заблокировать места неспецифического связывания, в фосфатном буфере при pH 7,4 и температуре 4⁰С. Далее к суспензии клеток добавляли 10 мкг антител, суспензию перемешивали и инкубировали 1 час в

тех же условиях. Затем суспензию клеток отмывали центрифугированием в фосфатном буфере pH 7,4 при 800g в течение 20 мин дважды. Результаты учитывали на проточном цитометре FACS Calibur («Becton Dickinson», США) с 15 мВт 488 арго-ионным лазерным и 585/42 (FL2) дискриминационным фильтром. Данные анализировали после выделения логического гейта клеточной популяции в dot/plot распределении клеток по их линейному переднему (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию. При учете результатов анализировали минимум 20000 событий в гейте. Статистическая обработка материалов проведена при помощи программного пакета прибора.

Как видно из рисунка 1, все клетки мышинной карциномы яичников CaO-1 экспрессируют антигены, идентичные муцинозным антигенам антигена СА 125 человека. Эти данные указывают на сходство использованных в настоящей работе опухолевых мышинных моделей с опухолями человека.

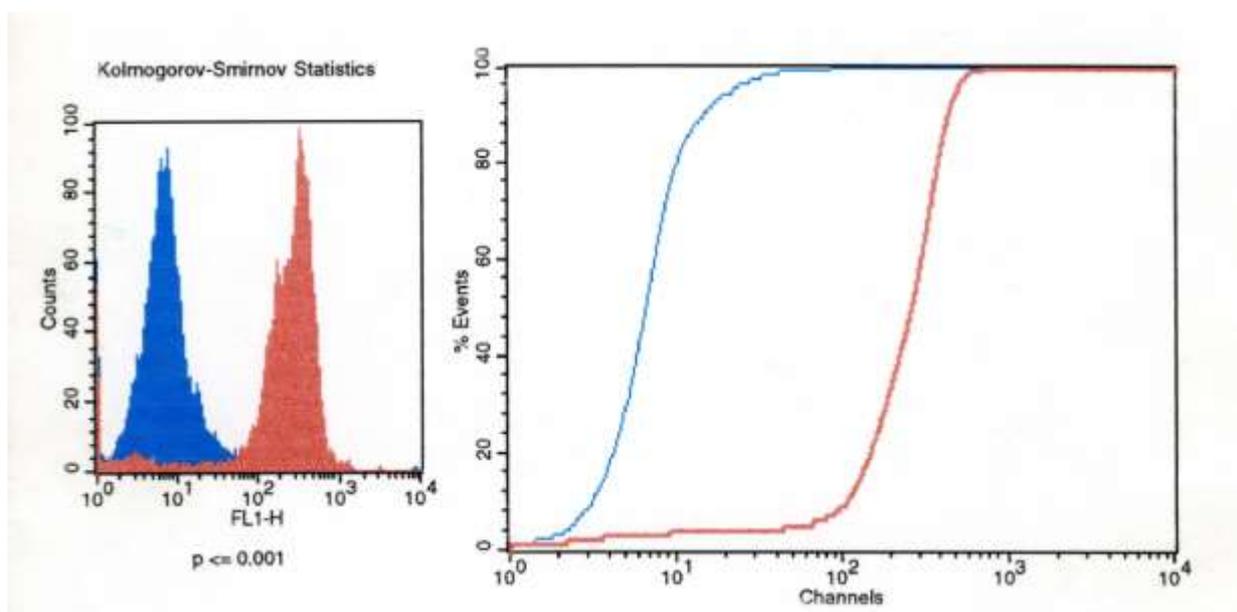


Рисунок 1 – Цитологическая характеристика клеток карциномы CaO-1. Взаимодействие клеток карциномы яичников CaO-1 с поликлональными антителами человека против муцина СА 125. Статистическая обработка по Колмогорову-Смирнову ($p <= 0.001$)

Одномерный электрофорез

Необходимость проведения одномерного белкового электрофореза возникла при разработке метода определения МТ в биопсийном материале у онкологических больных. Однако проведение одномерного электрофореза показало наличие примеси белков, которые вносили ошибку в измерение. Белок в образцах осаждали 5% трихлоруксусной кислотой. Образовавшийся осадок трижды отмывали ацетоном. Далее проводили электрофорез по Лемли. После окрашивания Coomassie Brilliant Blue G250 с последующим сканированием на приборе CanoScan N670 U, полученные данные обрабатывали с помощью программы ImageMaster™

1D Software version 4.10. В качестве стандартов в обоих случаях использовали бычий сывороточный альбумин. В результате проведенного одномерного электрофореза белки из примеси были разделены и таким образом подготовлены для дальнейшего исследования.

Идентификация белков методом протеомного анализа

Необходимость проведения идентификации белков методом протеомного анализа возникла при разработке метода определения МТ в биопсийном материале у онкологических больных. Первоначально метод определения МТ предусматривал экстракцию препарата из водно-спиртовой смеси (см. пункт 2.10 настоящего раздела). Однако более детальное исследование (в том числе и методом протеомного анализа) показало наличие примеси белков, которые вносили ошибку в измерение. Для того чтобы исключить наличие белков в измеряемом образце, необходимо было понять, белки с какими свойствами находятся в этом образце. Поэтому была выполнена идентификация белков. Идентификацию белков осуществляли MALDI-TOF масс-спектрометрией. Белковые полосы вырезали из фореозного геля, используя Proteome Works spot picking robot “Bio-Rad” (США). Масс-спектры были получены с помощью MALDI-TOF Reflex III масс-спектрометра “Bruker” (США) с УФ-лазером (336 нм) (граница масс положительных ионов от 500 до 8000 Да). Масс-спектры были высчитаны, используя известные массы внутренних стандартов. Белки идентифицировали с помощью набора протеолитических пептидных масс, используя Peptide Fingerprint option of Mascot software “Matrix Science” (США).

Метод дифференциальной спектрофотометрии

Спектрофотометрические исследования проводились на спектрофотометре Хьюлетт-Паккард HP8452A. Этот спектрофотометр представляет собой однолучевой прибор с микропроцессорным управлением. Диспергирующим элементом прибора служит вогнутая голографическая решетка, а регистрация спектра поглощения осуществляется диодной матрицей из 316 фотодиодов и схем управления в спектральном диапазоне 190-820 нм. Полный спектр регистрируется за время вспышки импульсной дейтериевой лампы (за 0,1 сек). Прибор имеет компьютерное управление, что позволяет осуществлять математическую обработку спектральных данных, а также создавать базы спектральных данных.

Однако прибор является однолучевым. Это обстоятельство делает необходимым усложнить процесс измерения образца. Дело в том, что для спектрофотометрического измерения количества образца в пробе такая проба не должна содержать примеси других веществ, спектры поглощения которых перекрывались бы со спектром поглощения изучаемого вещества. Обычно такая чистота пробы достигается сложной процедурой очистки пробы (пробоподготовки) и на заключительном этапе работы требует наличия современного

хроматографа. К сожалению, на момент выполнения работы этого оборудования в распоряжении исследователей не было. Поэтому для исключения ошибки в определении МТ был использован метод дифференциальной спектрофотометрии. Метод также требует тщательной пробоподготовки для максимального удаления из изучаемого образца примесей посторонних веществ. Суть метода заключается в том, что для определения вещества используется двухволновая или даже трехволновая схема измерения. Для этого в спектре поглощения вещества (в нашем случае МТ) выбирают длины волн, при которых наблюдаются максимумы и минимумы в поглощении. Затем измеряются разницы (дифференциал) в значении интенсивности поглощения вещества между максимальным значением поглощения и минимальными значениями поглощения. Затем выясняется диапазон концентрации вещества, при которых будет наблюдаться линейная зависимость между значением в разнице поглощения и концентрацией вещества в пробе. Таким образом, появляется два значения для характеристики поглощения одной пробы. Если никакое другое вещество не будет вносить свой вклад в поглощение при этих длинах волн, то разницы в поглощении между максимумом и одним минимумом и разница в поглощении между максимумом и другим минимумом будет наблюдаться при одной концентрации вещества в пробе. Более подробно этот вопрос будет проиллюстрирован в главе диссертации, посвященной разработке метода. А сейчас приведем пример вычисления концентрации МТ в пробе. Для вычисления была получена следующая формула:

$$C = 18.4 \times D_x(4.5 + A) / A$$

где С – концентрация МТ в пробе в мкг/мл биологической жидкости или мкг/г ткани, D – различия в оптической плотности МТ при 312 нм и 400 нм, А – объем пробы в мл для биологических жидкостей (стандарт – 0,1 мл) или в г для ткани (стандарт – 0,1 г).

Оптическая плотность определяется в максимуме поглощения МТ – 312 нм и 400 нм наблюдаемом дифференциальном спектре.

На рисунке 2 представлен дифференциальный спектр поглощения МТ в спиртовом экстракте из биоптата опухоли. Из рисунка видно, что МТ дает хорошо видимый пик поглощения, и примеси никаких других веществ не мешают определению.

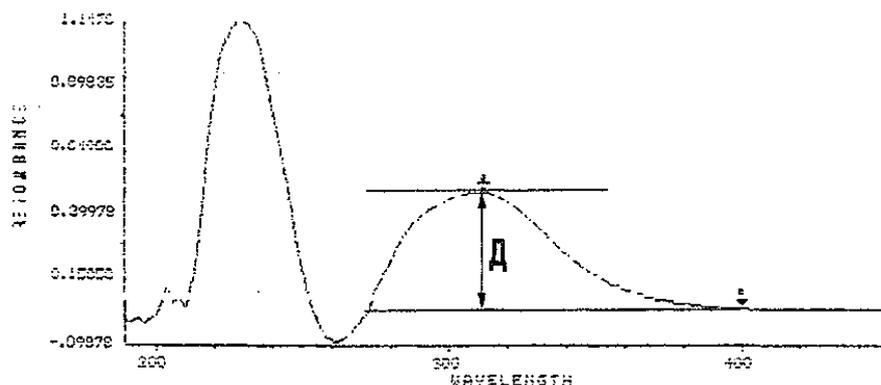


Рисунок 2 – Спектр поглощения МТ в спиртовом экстракте биоптата опухоли, полученный в результате вычитания из спектра поглощения биоптата опухоли, содержащей МТ, спектр поглощения биоптата опухоли без МТ

Методика пробоподготовки образцов для спектрометрии

Методика пробоподготовки состояла из следующих этапов:

1. Берется навеска образца операционного материала весом 100 мг.
2. Проба гомогенизируется в стеклянном гомогенизаторе с 0,4 мл физиологического раствора.
3. В полученный гомогенат добавляется 4,1 мл этанола. Этанол приводит к осаждению белка.
4. Полученный образец центрифугируется в течение 10 мин. на настольной центрифуге.
5. Надосадочная жидкость фотометрируется на спектрофотометре НР8452А в 1см кювете.

Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку результатов проводили в рамках параметрической и непараметрической базовой статистики с использованием регрессионного и многомерного факторного анализа, критерия Стьюдента, применяя стандартный пакет статистических программ Windows 2003 (StatSoft 6.0), Excel и WinMdi. Данные представлены как $M \pm m$. Различия рассматривались как значимые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В научной литературе представлены многочисленные данные о токсичности МТ и о его влиянии на токсичность других веществ и препаратов. Существуют также единичные публикации о выраженных побочных эффектах комбинации МТ и цитостатиков, вплоть до развития летальных эффектов. Эти данные об усилении токсических эффектов при комбинации цитостатиков и МТ явились основанием для работы по изучению влияния МТ на токсичность противоопухолевых препаратов. Выбор препаратов был основан на широте их применения в

онкологической практике при различных формах онкологических заболеваний. Поэтому в исследование были взяты доксорубицин и 5-ФУ.

На первом этапе была изучена динамика роста опухоли карциномы яичников СаО-1 (рисунок 1) в контроле и на фоне воздействия препаратами 5-ФУ и МТ. Введение МТ внутривнутрибрюшинно в дозе 1г/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли не оказывало никакого достоверного влияния на рост опухоли. Введение подкожно 5-ФУ в дозе 100 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли вызывало задержку выхода опухолевых узлов до 10 дня наблюдения. Совместное внутривнутрибрюшинное введение МТ и через 20 минут подкожное введение 5-ФУ в указанных выше дозах статистически достоверно увеличивало противоопухолевый эффект антиметаболита – задержка выхода опухолей опухоли отмечалась до 14 дня. Показатель ТРО достигал 100% с 10 по 14 день наблюдения (рисунок 2). Такое увеличение противоопухолевой активности 5-ФУ вызывало определенный оптимизм, так как увеличение эффективности лечения онкологических заболеваний – это одна из основных целей современной практической медицины.

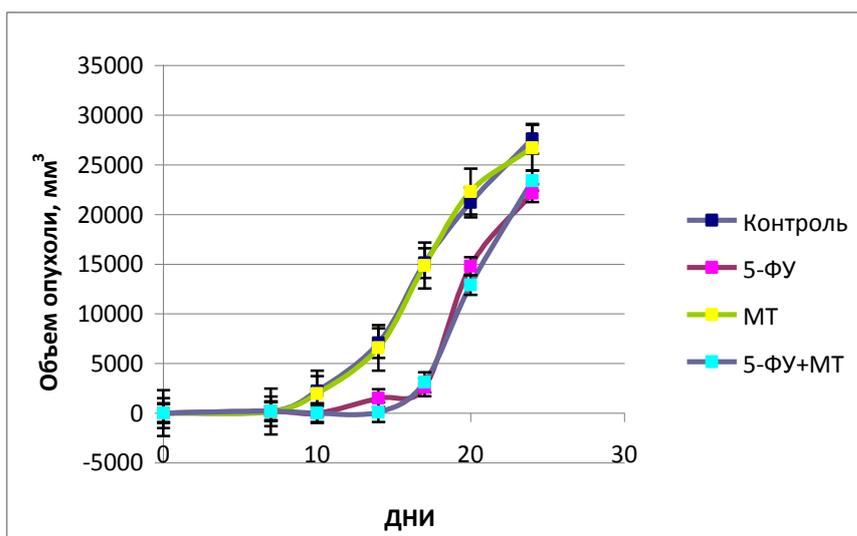


Рисунок 1 – Влияние МТ на противоопухолевое действие 5-ФУ на примере динамики роста карциномы СаО-1

5-ФУ вводили в дозе 100 мг/кг веса тела животных подкожно. МТ вводили в дозе 1000 мг/кг веса тела животных за 2 часа до введения 5-ФУ внутривнутрибрюшинно. В каждой группе было по 10 животных. По оси абсцисс дни после перевивки опухоли. По оси ординат объем опухоли в мм³.

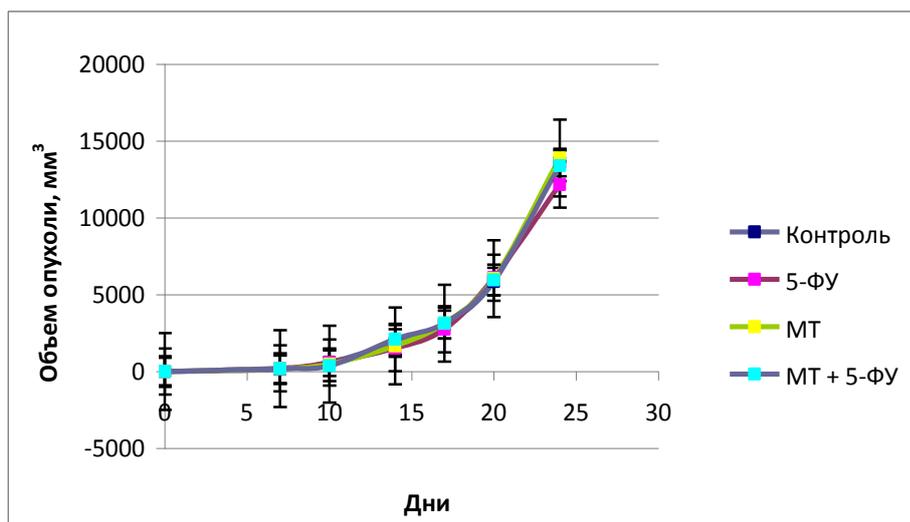


Рисунок 2 – Влияние MT на противоопухолевое действие 5-Фу на примере динамики роста меланомы В16

5-ФУ вводили в дозе 100 мг/кг веса тела животных подкожно. MT вводили в дозе 1 г/кг веса тела животных за 2 часа до введения 5-ФУ внутривентриально. В каждой группе было по 10 животных. По оси абсцисс дни после перевивки опухоли. По оси ординат объем опухоли в мм³.

Актуальной задачей онкологии является преодоление исходной или индуцированной резистентности опухоли к цитостатику. Поэтому на следующем этапе было изучено влияние 5-ФУ в комбинации с MT на рост меланомы В16. Эта опухоль практически не чувствительна к 5-ФУ и поэтому является хорошей экспериментальной моделью для изучения исходной резистентности опухоли к цитостатику. Была изучена динамика роста опухоли меланомы В16 в контроле и на фоне воздействия препаратов. В контрольной серии наблюдался экспоненциальный рост первичного узла. Введение MT в комбинации с 5-ФУ в различных режимах не оказывало модифицирующего действия, которое могло бы преодолеть исходную резистентность опухоли к этому противоопухолевому препарату.

Данные по изменению динамики роста перевиваемых опухолей были получены и для другого изученного противоопухолевого препарата – антрациклинового антибиотика ДКС. Совместное внутривентриальное введение MT и через 20 минут подкожное введение ДКС приводило к усилению противоопухолевого эффекта цитостатика на меланому В16 (рисунок 3). Это усиление проявлялось в увеличении периода, когда опухоль имела минимальные размеры, с 14 до 17 дней. Такое усиление лечебного действия цитостатика наблюдалось, если интервал между введением препаратов составлял 20 минут, но полностью исчезал, если интервал между введением составлял более 4 часов. Если сопоставить интервалы полуэлиминации MT из сыворотки крови человека и мыши (а это более 12 часов и менее 1 часа соответственно), то

можно сделать вывод, что увеличение терапевтического действия препаратов исчезает, если интервал между их введением превышает три периода полуэлиминации МТ (рисунок 4).

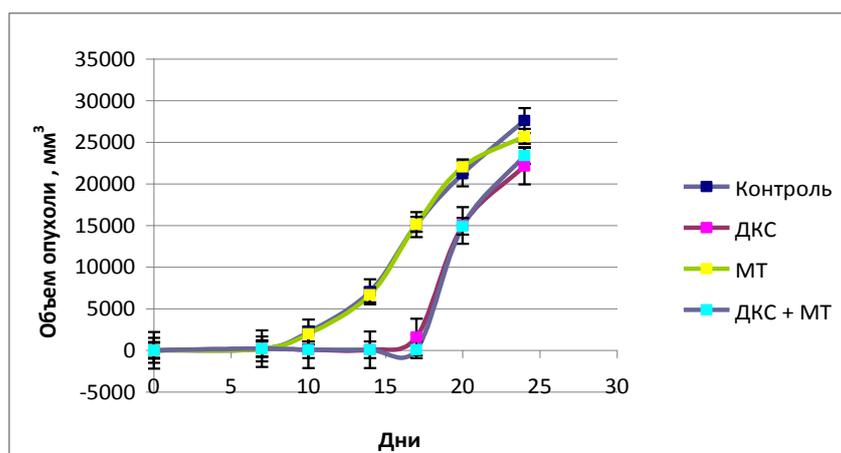


Рисунок 3 – Влияние МТ на противоопухолевое действие ДКС на примере динамики роста меланомы В16*

ДКС вводили в дозе 8 мг/кг веса тела животных подкожно. МТ вводили в дозе 1000 мг/кг веса тела животных за 20 минут до введения ДКС внутривенно. В каждой группе было по 10 животных. По оси абсцисс дни после перевивки опухоли. По оси ординат объем опухоли в мм³.

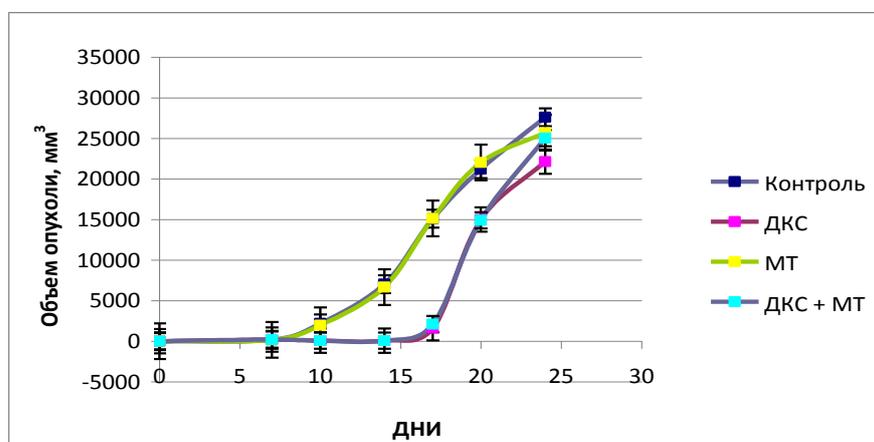


Рисунок 4 – Влияние МТ на противоопухолевое действие ДКС на примере динамики роста меланомы В16*

ДКС вводили в дозе 8 мг/кг веса тела животных подкожно. МТ вводили в дозе 1000 мг/кг веса тела животных за 12 часов до введения ДКС внутривенно. В каждой группе было по 10 животных. По оси абсцисс дни после перевивки опухоли. По оси ординат объем опухоли в мм³.

Последующие эксперименты были направлены на изучение влияния комбинации МТ с цитостатиками на их токсичность. Так, 5-ФУ не вызывал гибели мышей в дозе 250 мг/кг веса

тела животных. Однако введение модификатора МТ за 20 минут до введения противоопухолевого препарата вызывало гибель всех животных. Такую же 100% гибель животных вызывает 5-ФУ в дозе 400 мг/кг веса тела животных. Если интервал между введением модификатора и 5-ФУ увеличить до 1 часа, то процент гибели животных уменьшается до 90%. Гибель животных от ДКС также увеличивается на фоне введения МТ. ДКС в дозе 5 мг/кг веса тела животных не вызывает гибели мышей. Однако введение модификатора МТ за 20 минут до введения противоопухолевого препарата вызывает гибель 10% животных, что указывает на увеличение токсичности препарата. Степень увеличения токсичности можно оценить, если сравнить дозу одного ДКС, который вызывает такой же процент гибели 10% животных. Из полученных нами данных следует, что такая доза ДКС составляет 10 мг/кг веса тела животных. Увеличение токсичности комбинации цито-статика и МТ было также зафиксировано по изменению среднего количества лейкоцитов периферической крови. В контрольной группе животных количество лейкоцитов в периферической крови было стабильно на протяжении всего периода наблюдения со средними показателями от $9,6 \times 10^3$ до $11,2 \times 10^3$ клеток на микролитр периферической крови мышей. Введение МТ в дозе 1г/кг веса тела животных вызывало снижение количества лейкоцитов периферической крови до $7,6 \times 10^3$ на 4 день после введения модификатора. В последующие дни наблюдалось восстановление количества клеток в периферической крови практически до исходных уровней. В группе животных, получивших 5-ФУ в дозе 100 мг/кг веса тела животных, также отмечалось снижение количества лейкоцитов периферической крови до $7,0 \times 10^3$ на 4 день после введения противоопухолевого препарата. В последующие дни наблюдалось восстановление количества клеток в периферической крови практически до исходных уровней. В группе животных, которые получили МТ за 2 часа до введения 5-ФУ, также отмечалось снижение количества лейкоцитов периферической крови до $6,1 \times 10^3$ на 4 день после введения противоопухолевого препарата. В последующие дни наблюдалось восстановление количества клеток в периферической крови. Однако восстановления до исходного количества клеток в периферической крови мышей в изученный период времени не происходило. Последнее обстоятельство можно объяснить увеличением токсичности данной комбинации препаратов по сравнению с их отдельным применением. Увеличение интервала между введением модификатора и противоопухолевого препарата до 4 часов привело к тому, что клиническая картина изменения количества лейкоцитов в периферической крови сходна с клинической картиной изменения количества лейкоцитов в периферической крови в группе мышей, получивших один 5-ФУ. ДКС в отличие от 5-ФУ вызывал более длительное уменьшение количества лейкоцитов в периферической крови мышей с 3 по 5 день наблюдения. В группе животных, которые получили МТ за 2 часа до введения ДКС, также отмечался снижение

количества лейкоцитов периферической крови до $3,5 \times 10^3$ на 4 день после введения противоопухолевого препарата. Но в отличие от предыдущих групп такое снижение было достоверно ниже и более продолжительным по сравнению со средним количеством лейкоцитов периферической крови в группе животных, получивших один ДКС. Как само достоверное снижение количества лейкоцитов периферической крови, так и увеличения временного отрезка, на протяжении которого это снижение отмечается, указывают на то, что предварительное введение МТ приводит к увеличению токсичности ДКС. Однако если интервал введения между МТ и ДКС увеличить до 4 часов, то достоверные различия в количестве лейкоцитов периферической крови мышей, получивших один ДКС, со средним количеством лейкоцитов, получивших ДКС спустя 4 часа после МТ, исчезают. Поскольку в онкологической клинике количество лейкоцитов периферической крови является основным критерием, по которому оценивают возможность продолжения химиотерапевтического лечения, то не удивительно, что обсуждение больных, получающих МТ, на конференциях и консилиумах происходит часто (Таблицы 1, 2, 3, 4).

Таблица 1 – Влияние различных режимов введения модификатора МТ на токсичность 5-ФУ

№	Препарат, Доза (мг/кг)	Модификатор ¹ , Интервал введения	Время гибели животных (сут.)	Количество павших в % к исходному	Достоверность различий ²
1	5-ФУ-200	-	Не отмечено	0	-
		20 минут	$11,7 \pm 1,6$	70	>0.05
		1 час	$14,8 \pm 0,5$	20	
		4 часа	$35,2 \pm 3,1$	0	
2	5-ФУ-250		Не отмечено	0	
		20 минут	$10,6 \pm 0,5$	100	>0.05
		1 час	$12,3 \pm 0,6$	90	>0.05
		4 часа	$14,0 \pm 0,5$	10	
3	5-ФУ-300		$14,0 \pm 0,0$	70	-
		20 минут	$9,9 \pm 0,3$	100	>0.05
		1 час	$10,6 \pm 0,3$	100	>0.05
		4 часа	$14,0 \pm 0,1$	80	>0.05
4	5-ФУ-400		$10,6 \pm 0,8$	100	
		20 минут	$7,8 \pm 0,7$	100	<0.05
		1 час	$8,1 \pm 0,7$	100	
		4 часа	$8,1 \pm 0,8$	100	<0.05

5		МТ	Не отмечено	0	-
---	--	----	-------------	---	---

¹ Модификатор МТ вводили внутрибрюшинно в дозе 1000 мг/кг веса тела животных за 20 минут, 1 час и 4 часа до подкожного введения 5-ФУ. В каждой группе было по 10 животных мышей линии СВА/Лас. Гибель животных оценивали в течение 30 дней после введения препаратов.

² Достоверность различий между продолжительностью жизни животных, получивших 5-ФУ в монорежиме и 5-ФУ+ МТ.

Таблица 2 – Влияние различных режимов введения модификатора МТ на токсичность ДКС

№ п/п	Препарат, Доза (мг/кг)	Модификатор ¹ , интервал введения	Продолжительность жизни павших животных (Дни)	Количество павших в % к исходному	Достоверность различий ²
1	ДКС 5		более 30	0	
2		20 минут	14,0	10	
3		1 час	более 30	0	
4		4 часа	более 30	0	
5	ДКС 10		14,0	10	
6		20 минут	13,6 ± 0,5	40	<0.05
7		1 час	14,00	10	
8		4 часа	14,0	10	
9	ДКС 15		10,2 ± 0.0	70	
10		20 минут	5,9 ± 0,3	100	<0.05
11		1 час до	7,6 ± 0,3	100	<0.05
12		МТ 4 часа	11,0 ± 0,6	80	
13	ДКС 20		4,6 ± 0,1	100	
14		20 минут	3,8 ± 0,1	100	<0.05
15		1 час	4,1 ± 0,1	100	<0.05
16		4 часа	4,1 ± 0,1	100	
17		МТ	более 30	0	

¹ Модификатор МТ вводили внутрибрюшинно в дозе 1000 мг/кг веса тела животных за 20 минут, 1 час и 4 часа до подкожного введения ДКС. В каждой группе было по 10 животных мышей линии СВА/Лас. Гибель животных оценивали в течение 30 дней после введения.

Таблица 3 – Влияние 5-ФУ, ДКС и их комбинации с МТ на содержание лейкоцитов в периферической крови мышей ($10^3/\text{мкл}$)[#]

	Группы ²	Сутки ¹					
		1	2	3	4	5	6
	5-ФУ	11,5±1,2	9,3±1,1	8,1±1,1	7,0±1,0	8,2±1,2	9,7±1,3
	5-ФУ + МТ за 2 часа	11,2±1,2	9,5±1,0	7,4±0,9	6,1±1,0	7,9±1,4	8,7±1,5
	5-ФУ + МТ за 4 часа	9,5±1,1	9,3±0,9	8,6±0,9	8,7±0,9	8,8±1,1	9,1±1,1
	ДКС	10,7±1,2	9,6±1,2	7,5±1,2	6,9±1,1	6,8±1,1	9,1±1,1
	ДКС + МТ за 2 часа	10,3±1,3	9,1±1,2	6,3±1,1	3,5±0,9*	4,1±0,8*	5,6±0,7*
	ДКС + МТ за 4 часа	11,4±1,2	9,1±0,9	7,1±0,8	6,4±0,7	7,0±0,9	8,9±1,3
	Контроль ³	10,8±0,9	11,2±1,0	9,6±1,1	10,1±0,9	11,1±1,1	10,4±1,1
	МТ	11,3±1,3	9,4±1,1	8,5±1,1	7,6±1,2	9,7±1,2	11,5±1,2

¹ – Дни после введения препаратов.

² – 5-ФУ вводили подкожно в дозе 100 мг/кг веса тела животных. МТ вводили внутривенно в дозе 1000 мг/кг веса тела животных за 2 или за 4 часа до противоопухолевого препарата. ДКС вводили в дозе 10 мг/кг веса тела животных, подкожно. В каждой группе было 10 животных линии СВА/Лас.

³ – интактные мыши.

* - $p < 0.05$ между группами ДКС и ДКС+МТ за 2 часа.

- среднее число лейкоцитов в периферической крови ($M \pm m$)x $10^3/\text{мкл}$.

Таблица 4 - Влияние 5-ФУ, ДКС и их комбинации с МТ на среднюю массу тела мышей[#]

N	Группы ²	Сутки ¹					
		0	5	6	7	8	9
1	5-ФУ	21,5±0,4	20,3±0,4	20,1±0,3	20,0±0,4	20,2±0,4	20,7±0,3
2	МТ за 2 часа до 5- ФУ	21,6±0,4	19,5±0,8	17,4±0,9	16,1±0,9*	17,9±0,9*	18,7±1,5*
3	МТ за 4 часа до 5- ФУ +	22,1±0,4	21,3±0,6	20,6±0,9	20,7±0,9	20,8±0,7	21,1±0,6

Продолжение таблицы 3

4	ДКС	22,7±0,4	20,6±0,3	20,5±0,4	19,9±0,5	18,8±0,5	19,1±0,6
5	МТ за 2 часа до ДКС	22,3±0,6	20,1±1,2	19,3±0,5	18,5±0,9*	17,1±0,8*	16,6±0,7*
6	МТ за 4 часа до ДКС	22,4±0,6	21,1±0,9	20,1±0,8	20,4±0,7	19,0±0,9	19,9±0,3
7	Контроль 3	21,5±0,3	21,2±0,4	21,6±0,4	22,1±0,5	22,1±0,4	21,4±0,4
8	МТ	21,3±0,3	20,4±0,4	20,5±0,4	20,6±0,4	20,7±0,4	20,5±0,4

¹ - Дни после введения препаратов.

² - 5-ФУ вводили подкожно в дозе 100 мг/кг веса тела животных. МТ вводили внутривенно в дозе 1000 мг/кг веса тела животных за 2 или за 4 часа до противоопухолевого препарата. ДКС вводили в дозе 10 мг/кг веса тела животных, подкожно. В каждой группе было 10 животных линии СВА/Лас/.

³ - интактные мыши.

- Средняя масса тела животных приведена в граммах (M + m).

* - $p < 0.05$ между группами ДКС и МТ за 2 часа до ДКС.

Было изучено влияние МТ на цитотоксическое действие 5-ФУ на клетки карциномы яичников СаО-1. Установлено, что добавление МТ в среду инкубации клеток СаО-1 существенно не изменяет токсичность 5-ФУ по сравнению с токсическим действием одного антиметаболита. Так, при концентрации 5-ФУ 1 мкг/мл процент выживших клеток СаО-1 после 24 часов инкубации с анти-метаболизмом составил 90 + 9, а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в концентрации 150 мкг/мл процент выживших клеток СаО-1 был равен 94 + 6 ($p > 0,05$). При концентрации 5-ФУ 5 мкг/мл процент выживших клеток СаО-1 после 24 часов инкубации с антиметаболизмом составил 74 + 17, а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в концентрации 150 мкг/мл процент выживших клеток СаО-1 был равен 60 + 19 ($p > 0,05$).

Было также изучено влияние МТ на цитотоксическое действие 5-ФУ на клетки меланомы В16. Ранее было показано, что клетки меланомы исходно резистентны к антиметаболиту. Поэтому представлялось целесообразным изучить возможность преодоления этой резистентности в системе *in vitro* с помощью МТ. Было показано, что добавление МТ в среду инкубации клеток меланомы В16 существенно не изменяет токсичность 5-ФУ по сравнению с токсическим действием одного антиметаболита. Так, при концентрации 5-ФУ 10 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 после 24 часов инкубации с антиметаболизмом составил 85 + 13, а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в концентрации 150 мкг/мл

процент выживших клеток меланомы В16 был равен 96 ± 4 ($p > 0.05$). При концентрации 5-ФУ 30 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 после 24 часов инкубации с антиметаболитом составил также 85 ± 13 , а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в дозе 10 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 был равен 70 ± 14 ($p > 0.05$). При концентрации 5-ФУ 50 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 после 24 часов инкубации с антиметаболитом составил 63 ± 26 , а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в концентрации 150 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 был равен 65 ± 24 ($p > 0.05$). При концентрации 5-ФУ 80 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 после 24 часов инкубации с антиметаболитом составил 48 ± 17 , а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в дозе 10 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 был равен 36 ± 15 ($p > 0.05$). При концентрации 5-ФУ 100 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 после 24 часов инкубации с антиметаболитом составил 45 ± 13 , а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в концентрации 150 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 был равен 27 ± 12 ($p > 0.05$). При концентрации 5-ФУ 150 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 после 24 часов инкубации с антиметаболитом составил 5 ± 3 , а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в дозе 10 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 был равен 3 ± 1 ($p > 0.05$). Концентрация IC50 для 5-ФУ на клетках меланомы В16 составила 95 ± 11 мкг/мл в случае их инкубации с одним антиметаболитом в течение 24 часов и 84 ± 10 в случае, если к среде инкубации добавили еще и 150 мкг/мл МТ (рисунок 5).

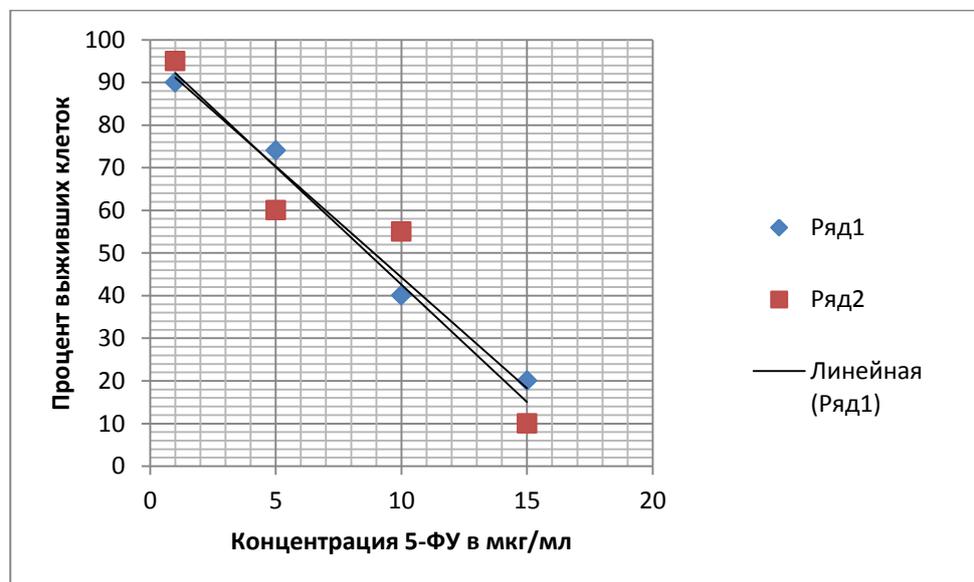


Рисунок 5 – Влияние МТ на токсическое действие 5-ФУ на клетки СаО-1 в системе *in vitro*. МТ содержится в среде инкубации в концентрации 150 мкг/мл. Клетки инкубировали с препаратами 24 часа. Каждая точка на графике – это среднее от 4 измерений. Цитотоксичность препаратов измеряли МТТ-тестом. Ряд 1-Клетки СаО-1 инкубировали 24 часа в присутствии

соответствующих концентраций 5-ФУ. Ряд 2-Клетки СаО-1 инкубировали 24 часа в присутствии соответствующих концентраций 5-ФУ и 150 мкг/мл МТ.

Были разработаны методические подходы определения концентрации МТ в опухоли при аппликационном применении препарата методом спектрофотометрии. Было исследовано 165 образцов тканей опухолей прямой кишки при различной концентрации МТ и времени экспозиции радиосенсибилизирующей смеси. Установлены оптимальныевоздействующие концентрации МТ, которые были использованы при создании биополимерной композиции на основе МТ, включенной схему комплексного лечения рака прямой кишки.

Таким образом, в результате проведенного исследования можно сделать вывод о необходимости соблюдать осторожность при использовании МТ в онкологической практике. Этот препарат не следует использовать одновременно с химиопрепаратами, так как он повышает их токсичность. Однако в клинической практике онкологии используются схемы, которые предусматривают применение МТ, в частности, при лучевой терапии. С нашей точки зрения, в этом случае препараты следует применять с интервалом так, чтобы не накладывались профили их фармакокинетики. Другим возможным вариантом является местное применение МТ, минимизируя его проникновение в кровоток. Разработанный методический подход позволил определить оптимальную режимы аппликации МТ-содержащей композиции, обеспечивающие радиосенсибилизирующую концентрацию препарата в опухолевом узле. Полученные в настоящей работе данные были использованы для разработки метода комплексного лечения больных раком толстой кишки.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что метронидазола усиливает противоопухолевое действия доксорубина и 5-фторурацила при введении через 20 мин. – 1 час у мышей с привитыми опухолями рак яичников СаО-1, увеличение интервала до 4 часов нивелирует эффект синергизма комбинации.

2. Показано, что метронидазол усиливает токсическое действие цитостатиков доксорубина и 5-фторурацила у мышей при введе-нии через 20 минут-1 час после цитостатиков; при увеличении интервала между введениями препаратов до 4 часов токсичность не отмечена.

3. В системе *in vitro* метронидазол не увеличивает цитотоксическое действие доксорубина и 5-фторурацила на линии опухолевые клеток, что свидетельствует об опосредованном влиянии метронидазола на биологическую активность цитостатиков за счет изменений их фармакокинетики в организме животных.

4. Разработан метод количественного определения метронидазола в нормальных и опухолевых тканях онкологических больных.

5. Обоснованы оптимальные режимы аппликации метронидазол-содержащей полимерной композиции для достижения радиосенсибилизирующих концентраций препарата; оптимальная доза МТ, которую можно использовать в разрабатываемом методе лечения составляет 10 г/м² площади тела.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ягубов, С.А. Влияние метронидазола на биологическое действие доксорубина / С.А. Ягубов, Б.С. Аманджолов, Ф.В. Доненко, Ю.И. Должикова, Н.В. Малахова // Исследования и практика в медицине. – 2017. - Т. 4. – № 3. – С.16 – 22.

2. Ягубов, С.А. Влияние метронидазола на противоопухолевую активность и токсичность 5-фторурацила / С.А. Ягубов, Б.С. Аманджолов, Ф.В. Доненко, Ю.И. Должикова // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2017. – Т. 6. – №3. – С.29-34.

3. Ягубов, С.А. Изучение распределения метронидазола в опухолевой ткани прямой кишки при аппликационном способе введения в эксперименте *in vivo* /С.А. Ягубов, Г.М. Янковский, С.Э. Кондаков. // Вестн. моск. ун-та. сер. 2. химия. – 2016. – Т. 57. – № 5. – С. 336-342.

4. Ягубов, С.А. Иммуномодулирующая активность метронидазола / С.А. Ягубов, М.В. Киселевский, Ф.В. Доненко // Российский биотерапевтический журнал. – 2017– Т. 16(s1) – С. 86.

5. Ягубов, С.А. Распределение метронидазола в опухолевой ткани при аппликационном способе введению / С.А. Ягубов, Г.М. Янковский, Т.В. Павлова // Научные ведомости серия Медицина. Фармация. – 2013. – Т. 147. – № 4. Выпуск 21/1. – С. 95-97.

6. Патент Ягубов С.А. Способ лечения рака прямой кишки. RU 2424011 С1 А61N5/10 рентгенотерапия; гамма-лучевая терапия; терапия облучением элементарными частицами А61N2/04 с использованием переменных полей, например низкой частоты или пульсирующих А61K31/51. С.А. Ягубов, Ю.А. Барсуков, Н.Д. Олтаржевская, С.И. Ткачев, А.В. Николаев, М.А. Коровина, В.А. Алиев, Д.В. Кузьмичев, В.В.Глебовская, А.Т. Градюшко, А.М. Павлова.