

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

ЯГУБОВ СЕРГЕЙ АРКАДЬЕВИЧ

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

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Киселевский Михаил Валентинович

доктор медицинских наук, профессор

Барсуков Юрий Андреевич

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Общие сведения о препарате	10
1.2. Особенности метаболизма МТ в организме человека и животных	11
1.3. Влияние МТ на фармакологическую активность других препаратов <i>in vivo</i> . ..	19
1.4 Влияние МТ на фармакологическую активность препаратов <i>in vitro</i>	28
1.5 Использование МТ для увеличения эффективности радиотерапии	30
1.6 Влияние метронидазола на иммунную систему	34
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1. Лабораторные животные	42
2.2. Перевиваемые опухоли.....	42
2.3 Оценка противоопухолевого эффекта.....	43
2.4 Противоопухолевые препараты.....	43
2.5. Световая микроскопия.....	43
2.6 Цитотоксический тест.....	44
2.7 Проточная цитометрия (FASC-анализ).....	44
2.8 Одномерный электрофорез	45
2.9 Идентификация белков методом протеомного анализа.....	46
2.10 Метод дифференциальной спектрофотометрии	47
2.11 Методика пробоподготовки образцов для спектрометрии.....	49
2.12 Методы статистической обработки результатов	49
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	50
3.1 Влияние МТ на биологическое действие 5-фторурацила (5-ФУ) и доксорубина (ДКС)	50
3.2 Влияние МТ на противоопухолевый эффект 5-ФУ и ДКС на модели карциномы яичников СаО-1 и меланомы В16	50
3.3 Влияние МТ на токсическое действие 5-ФУ и ДКС	57

3.4 Влияние МТ на цитотоксичность ДКС и 5-ФУ по отношению к клеткам карциномы яичников СаО-1 и меланомы В16 <i>in vitro</i>	68
3.5 Оценка фармакокинетики МТ при ректальном введении	78
3.6 Отработка метода идентификации МТ в биологических средах	81
3.7 Определение концентрации МТ в образцах опухоли больных раком толстой кишки.....	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
ВЫВОДЫ	100
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102

ВВЕДЕНИЕ

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 [34]. 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 [4]. В таких случаях часто отмечают резкое увеличение токсического воздействия цитостатических препаратов, которое приводит к необходимости прерывать начатое лечение [20]. 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 рассматриваемый 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 [5, 7, 8]. 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 противомикробного 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 противоинфекционных 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. и соавторов [11, 20]. В зарубежной литературе клиническая эффективность и побочных эффектов МТ исследовалась в работе Furukawa S. с соавторами [44].

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 и 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.

Впервые показано, что увеличение 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.

Положения, выносимые на защиту:

1. Токсическое действие МТ в сочетании с цитостатиками зависит от интервала между введением этих препаратов. Введение МТ за 20 мин -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.

Степень достоверности и апробацию результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений. Анализ данных проведен на большой выборке лабораторных животных и больных, достаточной для выбранных методов математического анализа. Сформулированные в тексте диссертации научные положения, выводы основаны на фактических данных, продемонстрированных в приведенных таблицах и рисунках. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации.

Основные результаты исследования доложены и обсуждены на Научно-практической конференциях с международным участием «Новые отечественные противоопухолевые препараты» в 2016 г. и 2017 г. и межлабораторной конференции НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о препарате

Метронидазол (МТ) известен как антипаразитарный и антибактериальный препарат, эффективно используемый при лечении грамм-отрицательных анаэробных инфекций, а также являющийся предпочтительным препаратом при лечении инфекций, вызванных бактериями *fragilis* и простейшими [28, 52]. Представляет собой 1-(в-гидроксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол. Препарат имеет следующую структурную формулу (Рисунок 1).

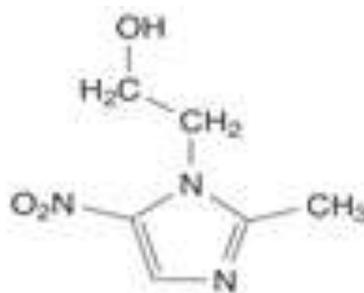


Рисунок 1 – Структурная формула метронидазола

Препарат стабилен при комнатной температуре, имеет белый цвет со слабым желтоватым оттенком и легким запахом [31]. Препарат растворим в воде (до 10 г/л), этаноле, эфире, хлороформе. Данные свойства МТ важны для разработки метода выделения его из исследуемых тканей с последующим его количественным измерением.

МТ выпускается в разнообразных лекарственных формах: таблетки, раствор для инъекций и для местного использования в виде аппликаций [28, 30]. Для лечения бактериальных инфекций рекомендован режим перорального приема по 525 мг каждые 6 часов в течение 7 дней. Для лечения трихомонадной инфекции МТ принимается перорально в дозе 250 мг три раза в день также в течение 7 дней или по 1 – 2 г дважды в день. При внутривенном введении при лечении бактериальной инфекции обычно используется режим 15 мг/кг веса тела в первый день. В последующие дни в дозе 7,5 мг/кг каждые 6 часов в течение 7 дней. От 60

до 80% введенной дозы препарата выводится с мочой, как в виде исходного препарата, так и в виде метаболитов в основном с окисленными боковыми алифатическими группами (гидроксиметил и ацетильной группой). Регистрируются также метаболиты МТ в виде конъюгатов с глюкуроновой кислотой. С нашей точки зрения, тот факт, что препарат подвергается окислению ферментными системами печени, очень важен и будет подробно проанализирован нами ниже. Примерно 20% препарата циркулирует в сыворотке крови в связанном с белками виде [34]. Препарат проникает через гематоэнцефалический барьер, и определяется в слюне, грудном молоке и даже в гнойном содержимом абсцессов печени.

При пероральном приеме препарата пик его концентрации в сыворотке крови наблюдается через 1 – 2 часа. Максимальная концентрация препарата в сыворотке крови может достигать 40 мкг/л. Важно, отметить, что при одной и той же дозе препарата его концентрация в сыворотке крови женщин будет достоверно выше, чем концентрация МТ в сыворотке крови мужчин [2].

1.2. Особенности метаболизма МТ в организме человека и животных

МТ, как и любой другой препарат, может обладать летальной активностью для людей с некоторыми генетическими особенностями метаболизма. С нашей точки зрения, эту группу пациентов необходимо обязательно упомянуть для того, чтобы у врачей, использующих в своей практике МТ, была бы настороженность в его использовании [91]. Синдром Cockayne является редким генетическим отклонением, характеризуемым маленьким ростом, отставанием в интеллектуальном развитии и ускоренным патологическим старением. Авторами было идентифицировано 8 случаев острой печеночной недостаточности на фоне приема МТ (8% от всех пациентов больницы), 3 из которых были фатальными. Интервал между начальным приемом и смертью составлял 6-11 дней. У двух из этих пациентов были отмечены неврологические симптомы. Врачи рекомендуют, чтобы синдром Cockayne считали абсолютным противопоказанием к использованию МТ [91].

Ранее упоминалось, что при метаболизме МТ происходит окисление боковых алифатических групп препарата. Известно, что такое окисление происходит в печени. Поэтому при заболеваниях печени метаболизм препарата замедляется, что приводит к его накоплению в плазме крови и биологических жидкостях. Конечно, больные с заболеваниями печени, как правило, осведомлены о необходимости коррекции доз многих препаратов. Поэтому их передозировки не происходит, и эту ситуацию можно рассматривать как частный случай. Другая ситуация, которая имеет тотальный характер, - это одновременный метаболизм нескольких фармакологических препаратов в ферментных системах печени. В этом случае препараты могут или ускорять, или замедлять метаболизм друг друга [67].

Введение препаратов, которые стимулируют микросомальные ферменты печени, приводит к тому, что препараты разрушаются организмом быстрее, и их лечебное действие снижается. Особенно это актуально в случае противоопухолевых препаратов. В частности, в работе Т.А. Богуш и соавт. показано, что лечебное действие противоопухолевых препаратов (доксорубицин, рубомицин, карминомицин, винкристин, винбластин, циклофосфан, митомицин С, блеомицин, блеоцин, проспидин и др.) у мышей, предварительно получивших фенобарбитал, было достоверно ниже, чем противоопухолевое действие этих же препаратов у мышей с опухолью, не получавших индуктора микросомальных ферментов печени [9].

Подобные эффекты увеличения активности ферментных систем печени с потерей фармакологического действия МТ были неоднократно описаны в клинике. Например, 57-летний пациент с рецидивирующим заболеванием кишечника, вызванным *Clostridium* и выражающемся тяжелым энтероколитом, нуждался в системном лечении антибактериальным препаратом. Лечение пациента МТ со временем стало неэффективным. Потеря эффективности МТ наблюдалась на фоне резкого увеличения активности ферментов печени. Авторы приводят данные, что активность аланин-аминотрансферазы возросла до 371 U/L, а аспартат-аминотрансферазы - до 203 U/L. Ранее отмечалось, что при введении

фармакологических препаратов происходит увеличение активности не одного фермента, а многих ферментных систем печени. И результатом увеличения активности данных ферментов будет снижение эффективности не только этих, но и других препаратов. Авторы нашли решение проблемы снижения эффективности лечения в назначении ванкомицина пятикратно (с дозами от 125 до 500 мг/день) [39]. Такой прерывистый курс приема препаратов, как правило, не активизирует ферментные системы печени.

Следует отметить, что возможна и противоположная ситуация, когда одновременное воздействие двух веществ на ферментные системы печени приводит к взаимной блокировке их метаболизма. Следствием такой блокировки будет существенное уменьшение их разрушения с последующим возрастанием токсичности. В литературе описан случай с летальным исходом при применении МТ у пациента употреблявшего этанол [41]. МТ был рекомендован как антибактериальное вещество, одно из выраженных побочных действий которого может возникнуть, если пациенты употребляют спиртосодержащие напитки. Результатом взаимодействия МТ и этанола может быть накопление ацетальдегида в крови. Ацетальдегид является гепатотоксичным, кардиотоксичным и аритмогенным веществом. В описанном случае летального исхода 31-летней женщины, принимавшей МТ совместно с этанолом, анализ выявил повышение концентрации этанола сыворотки (162 mg/d), ацетальдегид (4.6 mg/d), и МТ (0.42 mg/L). Причиной смерти, как сообщили авторы исследования, была сердечная аритмия из-за токсичности ацетальдегида, окисление которого до уксусной кислоты было заблокировано МТ, алифатические группы которого также окислялись в этой ферментной системе [41].

Факторы, которые могут влиять на метаболизм препаратов и их токсическое и лечебное действие, весьма разнообразны. Тем не менее, их необходимо знать и максимально учитывать для того, чтобы избежать увеличения токсичности препаратов. Одним из таких уникальных факторов, которые могут влиять на фармакодинамику препаратов, является кишечная флора. Препарат Sorivudine, 1-бетта-D-арабинофуранозил-5-(E) под действием флоры кишечника превращается

в (2-бромвинил)-урацил (BVU), который является мощным средством против вируса опоясывающего лишая, ветряной оспы и вируса простого герпеса 1 типа. Однако Sorivudine не должен использоваться в комбинации с цитостатиками, такими как 5-фторурацил, потому что BVU блокирует деградацию 5-фторурацила, приводя к его накоплению в крови и отмеченному повышению токсичности последнего. Sorivudine трансформируется в BVU под действием фосфоролитических ферментов бактерий, распределение активности которых у крыс было исследовано авторами [58]. Высокая их активность была найдена в толстом кишечнике и в кишечном содержимом, в то время как очень низкая активность или полное ее отсутствие было зафиксировано в печени, почках, желудке, слепой кишке. Эти результаты предполагают, что кишечная микрофлора играет важную роль в производстве BVU. Поэтому авторы измерили активность фосфорилазы в гомогенатах, полученных из 23 аэробов, 16 анаэробов и грибов. У бактериоидных разновидностей *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. uniformis* и *B. eggerthii*, доминирующих среди кишечной микрофлоры, была высокая активность этого фермента, чтобы преобразовать Sorivudine в BVU. Чтобы объяснить вклад кишечной микрофлоры в трансформацию BVU в естественных условиях, авторы дали Sorivudine крысам на фоне нескольких антибиотиков и измерили концентрацию BVU в сыворотке крыс. Когда Sorivudine был дан крысам совместно с ампициллином или смесью бацитрацина, неомицина и стрептомицина, который сокращал число жизнеспособных аэробов и анаэробов, BVU определялся в сыворотке в низкой концентрации. МТ также снижал концентрацию BVU в сыворотке крыс из-за сокращения числа кишечных анаэробов. Напротив, концентрация BVU в сыворотке крыс увеличивалась на фоне приема канамицина, который использовался для сокращения числа аэробов, и была выше, чем в контрольной группе крыс. Эти результаты позволили авторам утверждать, что BVU трансформируется из Sorivudine под действием кишечных анаэробных бактерий, присутствующих в кишечнике в естественных условиях, особенно разновидности *Bacteroides* [58].

Без преувеличения можно сказать, что генотоксическая активность МТ является одним из самых опасных побочных действий препарата. Чтобы оценить значение этой активности МТ проводятся разнообразные исследования не только на мышах, но и на других видах животных. Так, влияние однократной дозы МТ на генотоксичность препарата была изучена на кошках. Кошки получали МТ внутривенно в дозе 5мг/кг или перорально в дозе 20мг/кг в виде метронидазол бензоата (12,4 мг/кг в пересчете на чистое вещество) однократно. Внутривенная концентрация МТ в сыворотке крови кошек достигала 8,84 мкг/мл через 3,6 мин при внутривенном введении и 5,4 мкг/мл с пиком через 2,9 часа при пероральном введении. Токсичность препарата оценивали в разные сроки на ядрах лейкоцитов периферической крови. Было выявлено разрушение ДНК в ядрах лейкоцитов. Генотоксичность МТ была выявлена при всех путях введения и наблюдалась еще по крайней мере 6 дней после введения препарата. *In vitro* генотоксичность МТ оценивали на клетках кошачьей линии Т-клеточной-лимфомы, которые инкубировали с МТ в течение 7 дней. Также было выявлено разрушение ДНК. Концентрации МТ *in vivo* и *in vitro* оценивали методом ВЭЖХ [72].

Тем не менее, не исключено, что генная токсичность МТ на клетки человека может быть ниже, чем у бактерий. Авторы исследования исходили из того факта, что мутагенность МТ ранее показали в различных прокариотических, но не в эукариотических системах. Цель их исследования состояла в том, чтобы определить мутагенные и цитостатические эффекты МТ при концентрациях препарата, которые встречаются в плазме крови людей. В этом исследовании они оценили мутагенность и цитотоксичность МТ в культуре человеческих лимфоцитов периферической крови. Дозы были отобраны согласно концентрации препарата в плазме крови людей. Анализ провели по митотическому индексу (МИ), индексу ответа (RI) и обмену в сестринских хроматидах. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью теста дисперсионного анализа. Достоверное уменьшение ($p < 0.001$) МИ и RI, так же, как и увеличении частоты обмена в сестринских хроматидах ($p < 0.001$) наблюдалось по сравнению с клетками культуры контроля. Полученные результаты указывают, что

генотоксический и цитостатический эффект МТ в культурах человеческих лимфоцитов периферической крови наблюдается при концентрациях немного выше, чем терапевтические концентрации МТ [40].

Показано также, что генная токсичность МТ может быть связана с его метаболической активацией. Цель этой работы состояла в том, чтобы исследовать цитогенетический эффект трех аналогов МТ на человеческие культуры лимфоцитов периферической крови с и без метаболической активации *in vitro*, используя тест обмена в сестринских хроматидах. Генную токсичность аналогов сравнивали с активностью МТ. Эффект оценивали по МИ, RI и по цитостатическому эффекту. Частота обмена в сестринских хроматидах с и без метаболической активации в опыте и в лимфоцитах контроля не показали достоверных статистических различий. Однако отмечено существенное увеличение пролиферации и митотической активности при метаболической активации [46].

Использование МТ постоянно подвергается сомнению ввиду его мутагенности у бактерий и канцерогенности у мышей. Было выполнено генотоксичное исследование, в котором в качестве критериев токсичности использовали увеличение клеточного деления и частоты обменов в сестринских хроматидах в человеческих лимфоцитах периферической крови, полученных от 12 доноров. Использовались только терапевтические дозы МТ. Не было отмечено достоверного изменения МИ, за исключением трех доноров, которые ранее получали лечение (подробности не сообщаются). Увеличения обмена в сестринских хроматидах также обнаружено не было. Авторы не исключают иммуностимулирующего действия МТ. С нашей точки зрения, данная работа важна, так как показывает существование индивидуальных реакций на препарат примерно у 25% людей (у 3 из 12 доноров [41]).

В литературе обсуждаются подходы к снижению мутагенности препаратов вообще и МТ в частности. Мутагенность и канцерогенность МТ связывают с формированием опасных промежуточных соединений, которые образуют радикальные формы, полученные в процессе восстановления нитросоединений. С

тех пор как было обнаружено, что диметилсульфоксид (ДМСО), "универсальный" растворитель, может подавить свободные радикалы в пробирке, было предложено использовать ДМСО в качестве антимуtagenного препарата, чтобы он мог бы защитить организм, подавляя свободные радикалы в естественных условиях. В данном исследовании оценили способность ДМСО, который вводился совместно с МТ в кровь животного, для профилактики органоспецифической мутагенности МТ в естественных условиях. ДМСО, используемый в качестве растворителя, показал уменьшение на 20-30% частоты возникновения мутаций от МТ. Профилактическое использование ДМСО также вызывало подавление органоспецифической мутагенности МТ. Однако было зафиксировано увеличения частоты мутации в результате повышения мутагенности МТ в почке. Защитный эффект ДМСО был связан с уменьшением активности цитохрома NADPH (P450) редуктазы в печени, почке, и в меньшей степени в микросомах легкого по сравнению с контрольными животными. Снижение мутагенной активности может быть связано с подавлением образования радикальных метаболитов МТ. Однако изменения в активности редуктазы под действием ДМСО могут затронуть общий метаболизм МТ с последующим изменением структуры его метаболитов и образованием метаболитов с мутагенной активностью [50].

В настоящем исследовании изучалась генотоксическая активность МТ на эмбриональные ткани. В частности, чтобы оценить возможные генотоксичные эффекты МТ использовали эмбрион хомяка. Беременные золотые сирийские хомяки получали с едой МТ в дозах в пределах от 200 мг/кг до 900 мг/кг в дни 11 и 12 их беременности. Была проведена морфология эмбриональных клеток, полученных из опытных и контрольных животных в системе *in vitro*. Были выявлены признаки малигнизации клеток. Чтобы далее оценить значение обнаруженных в системе *in vitro* признаков малигнизации, клетки от массовой культуры были проверены на их способность к росту на мягком агаре. Контрольные клетки обрабатывали препаратом диэтил нитрозамин (канцероген). Клетки перевивались хомячкам и мышам *nude*. Обнаружили, что эмбриональные клетки, которые были выделены из животных, получивших МТ в дозе 200 мг/кг,

давали фибросаркому у мышей, но не давали опухоли у хомяков. Эмбриональные клетки, которые были получены от животных, получивших 900 мг/кг, давали рост опухоли и у хомяков, и у мышей. Исследователи приходят к заключению, что МТ способен к вертикальной передаче генотоксичного потенциала к зародышу [45].

В следующем исследовании авторы поставили своей целью рассмотреть имеющиеся доказательства связи между приемом МТ во время беременности и риском преждевременных родов и развития врожденных дефектов плода. В исследовании использовались данные от MEDLINE и базы данных EMBASE. Были выбраны исследования, изданные на английском или французском языке между 1964 и 2012 гг. В работу включены 17 исследований, расследующих связь между приемом перорального МТ и риском преждевременных родов, из которых 12 были рандомизированные клинические исследования. На фоне антибактериальной терапии была отмечена вероятность преждевременных родов. Кроме того, было проанализировано 13 исследований, посвященных исследованию связи между приемом МТ беременными женщинами и развитием врожденных дефектов. Никакого тератогенного действия МТ зафиксировано не было. Авторы считают, что исследования в этом направлении необходимо продолжить, так как, по их мнению, существенное значение на срок преждевременных родов могут иметь сроки, на которых беременные получали МТ [.

Способность МТ предотвращать развитие рака желудка описано группой авторов. Инфекция *H. pylori* вызывает гастрит, язвенные болезни и рак желудка. Уничтожение *H. pylori* предотвращает развитие гастрита и язвы желудка, но до какой степени подавление этой инфекции предотвращает рак, остается неизвестным, особенно если уже развилась метаплазия кишечника. Мыши не болеют раком, но мыши, которые были инфицированы *H. pylori* могут столкнуться с развитием гастрита и язвы желудка. Авторы заразили *H. pylori* штамм p27 мышей в 6-8 недельном возрасте. Часть мышей поучила антибактериальную (омепразол, МТ и кларитромицин) "рано" (через 15 недель после инфицирования), или "поздно" (через 45 недель после инфицирования).

Через 70 недель мыши были подвергнуты эвтаназии для определения *H. pylori*, гистопатологии и цитокин/хемокин исследования. Инфицированные мыши, не получавшие антибиотики, имели повреждения слизистой желудка, тогда как те, которые получали антибиотики, таких повреждений не имели [94].

1.3. Влияние МТ на фармакологическую активность других препаратов *in vivo*

В настоящем разделе исследовано влияние МТ на противоопухолевую активность других противоопухолевых цитостатиков. Данные о совместном применении МТ в комбинированной терапии онкологических заболеваний многочисленны [12-14].

24-летний пациент получал обычную иммуносупрессивную терапию, связанную с пересадкой почки. Доза препарата (такролим) составляла 4 мг два раза в день. При данном режиме приёма препарата в течение 2 месяцев его концентрация в сыворотке крови составляла 7–10 нг/мл сыворотки крови. В связи с клинической необходимостью (у пациента в кале обнаружили *Clostridium*) ему была назначена терапия МТ по 500 мг 4 раза ежедневно. Через 4 дня после начала приема МТ максимальная концентрация иммунодепрессанта возросла до 26,3 нг/мл сыворотки крови. Параллельно было отмечено увеличение уровня креатинина в сыворотке крови (1,6-1,8 мг/дл сыворотки крови). В результате подбора доза препарата была снижена в 4 раза (1 мг два раза в день). Спустя два дня после прекращения приема МТ отмечено снижение концентрации такролима до 9,4 нг/мл сыворотки крови и креатинина до 2,3 мг/дл сыворотки крови. В последующие дни, чтобы сохранить эффективную концентрацию иммунодепрессанта в сыворотке крови, его суточную дозу увеличили до 3 мг два раза в день. В обсуждении авторы связывают такую реакцию пациента с влиянием МТ на микросомальный фермент CYP3A4 и, возможно, на Р-гликопротеин. Авторы делают вывод, что совместное применение такролима с МТ может привести к увеличению концентрации такролима в сыворотке крови и к увеличению его токсичности. Практики должны знать об этом потенциальном

взаимодействии и контролировать концентрации иммунодепрессанта и почечную функцию [61]. К сожалению, в данной работе не исследовано воздействие такролима на МТ, что является также важным для клиницистов.

Аналогичный эффект МТ обнаружила другая группа исследователей, которая работала с препаратом бусульфан (БС). Данный препарат входит в комплексную терапию, назначаемую при трансплантации стволовых клеток. В данном исследовании авторы сравнили концентрации препарата у трех групп пациентов. Группа А (n=5) получала МТ для профилактики возникновения иммунологической реакции отторжения "трансплантант против хозяина" на фоне приема иммунодепрессанта. Группа В (n=9) получила МТ только в течение 2 дней совместно с БС. Группа С (n=10) была контрольной группой, которая получила БС без МТ. Продолжительность приема БС пациентами из всех групп определялась по их иммунологическому статусу. Обнаружили, что концентрации БС в сыворотке крови пациентов были значительно выше, если они получали МТ ($P < 0.001$) и составляли в среднем (948 +/- 280 нг/мл сыворотки крови), по сравнению с контрольной группой С (507 +/- 75 нг/мл сыворотки крови). В группе В использование МТ привело к достоверному ($P < 0.001$) увеличению уровней БС (807 +/- 90 нг/мл сыворотки крови) в течение 2 дней приема препаратов по сравнению с 452 +/- 68 нг/мл сыворотки крови в течение первых 2 дней без МТ. В группе А один пациент умер из-за полиорганной недостаточности, и еще у четырех пациентов наблюдались серьезные осложнения. Увеличение активности трансаминазы печени и билирубина были обнаружены во всех группах пациентов. Авторы исследования пришли к заключению, что МТ нельзя использовать одновременно с БС, чтобы избежать его высоких уровней в плазме крови, что может привести к серьезной токсичности и даже вызвать гибель больного [59].

Вместе с тем необходимо понимать, что МТ является эффективным антипаразитарным и антибактериальным препаратом. Поэтому, если учитывать и корректировать дозы иммунодепрессантов на фоне терапии МТ, то можно получить и хороший клинический эффект. В частности, подобную работу опубликовала группа исследователей при лечении лейкозов у детей. Лечение

было выполнено между 1992 и 2000 гг. у 49 пациентов в возрасте от 11 месяцев до 16 лет. Пациентам была выполнена трансплантация костного мозга от не родственного донора. Цель иммуносупрессивной терапии при такой трансплантации костного мозга состояла в подавлении иммунологической реакции "трансплантант против хозяина" с одной стороны. С другой стороны также необходимо было подавить иммунологическую реакцию отторжения хозяином пересаженных клеток костного мозга донора, которые необходимы для защиты хозяина от инфекций и для предотвращения развития рецидивов лейкоза у хозяина. Больные получали терапию циклоспорином, метатрексатом, МТ и серотерапию. Авторы делают вывод, что использование МТ совместно с циклоспорином и метатрексатом повысило эффективность противоопухолевой и иммуносупрессивной терапии (6).

Интересные результаты получила другая группа исследователей, которая изучала влияние МТ на фармакокинетику противоопухолевого препарата иматиниб, который является ингибитором СYP3A4 киназы основания Р-гликопротеина. Были взяты несколько экспериментальных групп мышей. Животные в первой группе получили 50 мг/кг веса тела животных ИМ (контрольная группа). Во второй группе мыши получили 50 мг/кг веса тела животных ИМ и через 15 минут, после противоопухолевого препарата, им был введен МТ в дозе 40 мг/кг веса тела животных (экспериментальная группа). Противоопухолевый препарат затем определяли в мозге, почках и печени методом ВЭЖХ. Обнаружили, что МТ существенно изменял распределение противоопухолевого препарата в организме мышей. Так, был зафиксирован его двойной пик в сыворотке крови экспериментальной группы животных. Максимальная концентрация (C_{max}) уменьшилась на 38 %, область под кривой ($AUC(0-\infty)$) уменьшилась на 14 % и время к C_{max} (T_{max}) снизилось на 50 % в плазме крови экспериментальной группы животных. Очевидный объем распределения (V_{SS}/F) и устное разрешение (Cl/F) увеличилось на 21% и 17%, соответственно. Проникновение в ткани ИМ было выше после МТ в 1,7 и 2,1-раза для печени и почек, соответственно. В мозге C_{max} был 3,9-раза выше, чем

контроле и AUC были 2,3 раза больше в экспериментальной группе, чем в плазме контрольной группы. Авторы делают неоднозначный вывод о совместном применении этих двух препаратов. С одной стороны, увеличение накопления этого препарата в тканях печени и почек может привести к увеличению токсического поражения этих органов при химиотерапии. Но, с другой, такое резкое увеличение накопления препарата в ткани мозга делает возможным его применение для лечения глиомы и глиобластомы [85].

Попытка преодолеть побочные эффекты МТ была предпринята исследователями в следующем исследовании. Препарат куркумин (КН) показывает антиокислительные свойства. Цель работы состояла в том, чтобы оценить отрицательные эффекты МТ на клетки Лейдига и семенные каналцы в яичках без и с применением КН. Мыши линий Balb/c и MTZ были разделены на шесть групп. Различия между группами были связаны в основном с различными дозами препаратов. Так, доза МТ колебалась от 165 до 500 мг/кг/сутки. Доза препарата КН составляла 100 мг/кг/сутки. Авторы показали значительное сокращение объема каналцев, их длины и диаметра и зародышевой высоты эпителия, и увеличение числа клеток Лейдига в группах животных, получавших один МТ. Введение МТ совместно с КН с высокими или терапевтическими дозами МТ повысило число клеток Лейдига. Защитный эффект КН от побочных действий МТ был отмечен на всем изученном интервале доз МТ у мышей, получавших МТ совместно с КН в дозе 100 мг/кг/сутки. Клетки Лейдига, их объем ядра и промежуточный объем ткани не показали значительной разницы в MTZ мышцах. Авторы пришли к заключению, что МТ вызывает изменения в структурных параметрах семенных каналцев и в числе клеток Лейдига, тогда как КН снижает побочное действие МТ [60].

Тот факт, что МТ может влиять на метаболизм многих препаратов, изменяя их накопление в клетках и тканях, делает его перспективным модулятором. В частности, пытаются использовать МТ для преодоления резистентности опухоли к химиотерапии. Устойчивость к химиотерапии, вероятно, определяется многими факторами. Поэтому исследователями была выполнена работа, в которой

карбоплатин (КБ) использовался с различными модуляторами у 53 пациентов с резистентными формами онкологических образований. Были сформированы группы: группа 1 – пациенты получали КБ в дозе 400 мг/м² площади тела и два модулятора пентоксифиллин и дипиридамола; группа 2 – пациенты получали КБ в той же дозировке и МТ в качестве модификатора; группа 3 – пациенты получали КБ в дозе 200 мг/м² площади тела и МТ в качестве модификатора. Маннитол и солевая нагрузка были использованы во всех группах для оптимизации доставки цитостатика в опухоль, уменьшая вязкость крови. Авторы выявили высокую тромбоцитопению у пациентов второй группы, однако у пациентов третьей группы тромбоцитопения была минимальной. Отмеченные иные формы токсичности у пациентов 2 и 3 групп были умеренно выраженными и не угрожали жизни [83]. Таким образом, для исследователей оказался неожиданным тот факт, что МТ настолько сильно способен увеличивать токсичность КБ. Поэтому они были вынуждены скорректировать план исследования, уменьшив дозу КБ до 200 мг/м² площади тела во всех изучаемых группах. Снижение дозы КБ не позволило им обнаружить преодоление резистентности опухоли к цитостатику. Поэтому авторы делают вывод, что, планируя работу, необходимо учитывать взаимное влияния препаратов на метаболизм друг друга. Результатом такой ошибки явилась необходимость в корректировке доз препаратов и изменение плана проводимого исследования.

Аналогичное исследование было проведено другой группой ученых. Это исследование отличалось от предыдущих только тем, что в качестве цитостатика был взят эпирубицин (ЭРБ). Была изучена токсичность и эффективность добавления к ЭРБ пяти модуляторов для преодоления резистентности опухолей к химиотерапии. Дополнительные препараты были добавлены последовательно в группы пациентов. Так, в группе 1 пациент совместно с ЭРБ получил два препарата, в то время как в группе 4 пациенты получили совместно с ЭРБ пять модуляторов. Пациенты совместно с ЭРБ в группе 1 получили МТ и тамоксифен, в группе 2 – дополнительно дипиридамола, в группе 3 - дополнительно кетоконазол, в группе 4 – дополнительно циклоспорин. Лечение получили 22

пациента. Тошнота и рвота были обычно умеренными. Был неожиданно зафиксирован высокий уровень сердечной токсичности, что сопровождалось увеличением числа обращений больных. Гранулоцитопения была выражена во всех четырех группах, но было неясно, связано ли это с использованием модуляторов. В группах 1 и 2 было зарегистрировано два случая лихорадки, которые успешно купировались антибиотиками. Также было зафиксировано три смертельных случая (один в каждой из групп 1, 2 и 4). Такое резкое усиление токсичности цитостатика на фоне модуляторов явилось причиной для прекращения исследования [84]. Таким образом, в данном исследовании отмечается та же закономерность – усиление токсичности цитостатика на фоне модуляторов. Исследователи опять не учли взаимного влияния метаболизма препаратов друг на друга и увеличения их токсичности вследствие этого взаимодействия.

Следующее исследование может стать положительным примером использования МТ как модификатора противоопухолевой активности цитостатика. Двадцать пять пациентов лечились по протоколу II фазы клинического исследования доксорубицина (ДКС) в дозировке 60-75 мг/м² площади тела внутривенно каждые 3 недели, МТ давали в дозе 1500 мг/м² площади тела перорально за 12 часов и немедленно перед введением ДКС и через 6 и 24 часа после введения ДКС. Из 23 пациентов у 2 (9 %) достигнута полная ремиссия, 2 (9 %) достигли частичной ремиссии и 4 (18 %) пациента были устойчивы к проведенному лечению. У одного пациента с неоперабельным, верифицированным биопсией диагнозом после 4-х курсов лечения отмечено уменьшение размера опухоли на 3 см, после чего проведена лучевая терапия и оперативное лечение, в результате которых получена полная ремиссия, сохраняющаяся в течение 8 лет. Второй пациент, который достиг полной ремиссии впоследствии, подвергся хирургической резекции вовлеченной области. Никакая остаточная опухоль не была найдена, и в течение 8,5 лет рецидива не отмечается. Увеличение токсичность ДКС на фоне МТ не зафиксировано. Авторы

считают эту комбинацию перспективной и предлагают, чтобы эта комбинация была изучена далее в других типах опухоли [81].

О влиянии МТ на токсичность митомицина С (МТС) сообщила другая группа химиотерапевтов. Пятнадцать пациентов с прогрессирующей карциномой почки лечили комбинацией МТС 14-20 мг/м² площади тела внутривенно каждые 7 недель и МТ 1 500 мг/м² площади тела за 12 и 1 час до внутривенного введения и через 6 и 24 часа после введения МТС. Фармакологический эффект был оценен только у 12 пациентов. У 3 пациентов (25%) отмечено частичное уменьшение опухолевого очага. Миелосупрессия не была более выражена по сравнению с больными, которые получали один МТС. Легочная токсичность наблюдалась у трех пациентов и была фатальной для двух. Уровень легочной токсичности был увеличен по сравнению с пациентами, которые получали МТС без МТ. Авторы также отметили почечную токсичность. На основании данного исследования авторы делают заключение о том, что при данной схеме химиотерапии и дозе МТ и цитостатика комбинация этих двух препаратов не показала большей эффективности, чем один цитостатик [79].

Сходную работу по комбинации МТС и МТ опубликовала другая группа авторов. У 27 пациентов с метастатической аденокарциномой груди, невосприимчивой к другой химиотерапии, было проведено лечение МТС и МТ. МТС был взят в дозах 15-20 мг/м² площади тела внутривенно каждые 6-9 недель. МТ 1 500 мг/м² площади тела дали перорально за 12 часов и за 1 час до МТС и через 6 и 24 часа после цитостатика. Фармакологический эффект был оценен у 24 пациентов. Частичные эффекты были отмечены у 4 пациентов (17 %), которые прошли лечение. Гематологическая токсичность была на уровне ожидаемой от одного цитостатика. Желудочно-кишечная токсичность была увеличена по сравнению с токсичностью одного цитостатика. Исследователи зафиксировали 3 вероятных и 2 возможных случая легочной токсичности. Авторы делают вывод, что МТ увеличивает легочной и желудочно-кишечной токсичности МТС (38).

Другая группа авторов исследовала комбинацию МТ и 5-фторурацила (5-ФУ) в лечении метастатического рака ободочной и прямой кишки. 5-ФУ вводили

в дозе 600 мг/м^2 площади тела внутривенно, ежедневно в течение 5 дней. МТ вводили в дозе 750 мг/м^2 площади тела внутривенно за 1 час до 5-ФУ. Курс повторялся каждые 4 недели, пока развитие болезни или токсичность делали его возможным. Из 27 пациентов, которые были взяты в исследование, 4 (15 %) имели объективный полный или частичный ответ, длящийся в среднем 7 месяцев. Токсичность 5-ФУ была достоверно увеличена на фоне МТ. 74 % пациентов имели гранулоцитопению (меньше чем 1500 кл/мкл). Авторы исследовали возможные механизмы, лежащие в основе увеличения этой токсичности 5-ФУ. В системе *in vitro* исследователям не удалось выявить эффект синергизма между МТ и 5-ФУ. Фармакокинетическая оценка показала, что клиренс 5-ФУ был значительно снижен на фоне МТ (26,9%, P меньше чем 0.001). Авторы делают вывод о том, что МТ уменьшает терапевтический индекс 5-ФУ за счет уменьшения клиренса препарата, увеличивая его токсичность без увеличения лечебного эффекта [32].

Однако необходимо учитывать, что прием МТ при хирургическом лечении онкологических заболеваний связан не только с его модифицирующим действием на метаболизм других препаратов. Прием МТ в большинстве случаев связан с клинической необходимостью подавлять развитие инфекции в хирургической ране. В этом случае, если МТ назначается исключительно как противoinфекционный препарат, может быть проигнорировано его действие как модификатора, которое является жизненно важным и обязательно должно быть учтено при проведении химиотерапии. Хирургическая инфекция места операции является значимым фактором заболеваемости и смертности у пациентов, которым хирургическим путем лечат карциному гортани. В другом исследовании определяли уровень риска развития инфекции у таких пациентов, которым хирургическим путем был удален опухолевый узел. В исследовании участвовало 277 пациентов. Все пациенты, которые предварительно принимали химиотерапию и/или радиотерапию, были исключены. Все пациенты имели постоперационную трахеостому и получали антибиотики: цефалоспорин, аминогликозид и МТ. Число пациентов с инфекциями в этой группе составляло 18 человек (6,5%): 4

пациента (22%) с поверхностными инфекциями, 11 пациентов (61,11 %) с глубокими инфекциями и 3 пациента (16,66%) с инфекциями внутренних органов, включая 1 случай пневмонии и 2 случая колита, вызванного *Clostridium*. Среднее пребывание в больнице у пациентов, с развившейся инфекцией раны было более длительным по сравнению с теми больными, у которых развитие инфекции не наблюдалось (33,5 дня против 16 дней, $p < 0.001$). Среди факторов, которые влияли на развитие инфекции в ране, были определены: продолжительность хирургической операции более 120 минут, возраст, пол, индекс массы тела, история курения, наличие диабета. Продолжительность пребывания пациентов в учреждении до операции не влияла на возникновение постоперационной инфекции. Наиболее часто изолированным микроорганизмом была *Klebsiella spp* [77].

К противоположному выводу пришел автор, который изучал изменения противоопухолевого действия BCNU или циклофосфида при их введении совместно с МТ или мизонидазолом, которые относятся к нитроимидазолам. Совместное или с интервалом 4 часа введение нитроимидазола и противоопухолевого препарата приводило к торможению роста опухолей. Мыши, получающие химиопрепарат и модификатор имели большую потерю веса и миелосупрессию по сравнению с мышами, которые принимали один противоопухолевый препарат. Автор тем не менее считает данную комбинацию эффективной для усиления цитостатиков (50). Аналогичные результаты были получены этим же автором при изучении модифицирующего действия нитроимидазолов на терапевтическую эффективность метотрексата, 5-ФУ и ДКС. Нитроимидазолы не влияли на рост изучаемых экспериментальных опухолевых штаммов 16/С грудной карциномы и фибросаркомы КНТ. Метотрексат был эффективен только против опухоли КНТ, добавление МТ к метотрексату не изменяло торможение роста опухоли. ДКС был активным только против опухоли 16/С, и торможение роста увеличивалось на фоне модификатора (51).

1.4 Влияние МТ на фармакологическую активность препаратов *in vitro*

Не менее интересными с нашей точки зрения являются работы по изучению влияния МТ на опухолевые линии клеток. Эти работы важны, поскольку позволяют изучить как прямое действие МТ на рост клеточных линий, так и модифицирующее действие МТ на цитотоксическое действие различных препаратов. В этом случае изучается не организменный уровень воздействия фармакологических средств, а местное действие веществ на клетки. То, что такое воздействие МТ присутствует, видно из многочисленных научных публикаций.

Так, было изучено воздействие МТ на синтез ДНК в двух линиях клеток рака молочной железы человека с различной экспрессией рецептора эстрогена MCF-7 (положительный рецептор эстрогена) и MDA-MB-231 (отрицательный рецептор эстрогена). Токсичность МТ определяли тестом МТТ. Клетки MCF-7 и MDA-MB-231 инкубировали с МТ 24, 48 и 72 часа в концентрациях от 0,1 до 250 мкг/мл. Эффект МТ на синтез ДНК оценивали по включению H^3 -тимидина.

Было показано, что МТ в концентрации 250 мкг/мл значительно увеличивал рост клеточной линии MCF-7 через 24 часа инкубации, но в то же время через 72 часа после отмены препарата наблюдался обратный эффект. Этот обратный эффект наблюдался также и при концентрациях МТ 1 и 10 мкг/мл. Такое же ускорение роста было получено для клеток MDA-MB-231 при концентрации МТ 250 мкг/мл. Подавление пролиферации клеток было получено в клеточной линии MDA-MB-231 после применения следующих концентраций МТ 0,1 мкг/мл (после 24 часов инкубации) и 0,1, 10, 50, 250 мкг/мл (при инкубации в течение 72 часов). Авторы делают вывод о влиянии МТ на человеческие клеточные линии рака молочной железы, которое зависит от дозы и времени воздействия и не зависит от присутствия или отсутствия рецепторов эстрогена в исследуемых линиях клеток. Они предполагают, что эти различия могут быть связаны с передачей сигналов эстрогена [69].

Другая группа исследователей сообщает о способности МТ влиять на поглощение опухолевыми клетками полиаминов. Многие клетки опухолевые

клетки, включая клетки опухоли асцита Эрлиха, обладают системой поглощения полиамина, которая выборочно накапливает эндогенные полиамины и структурно связанные с ними соединения. Авторы предположили, что эта система может быть использована для доставки определенных цитостатических агентов к этим опухолевым клеткам. В начале ими была синтезирована серия 2- и 5-нитроимидазолов, связанных с полиаминами. Затем они изучили их способность проникать в клетки, используя систему транспорта полиаминов. В пределах ограниченной серии синтезируемых аналогов обнаружили, что 2-нитроимидазол-полиамины, были более мощными ингибиторами транспорта спермидина в клетки карциномы Эрлиха, чем 5-нитроимидазол-полиамины. Изученные аналоги отличались более чем в 700 раз по их способности тормозить транспорт спермидина в опухолевые клетки. Самые мощные ингибиторы сохранили определенные структурные особенности, подобные таковым у спермидина. Такие аналоги, связанные с полиаминами, были намного более мощными ингибиторами транспорта полиамина, чем исходный МТ. Токсичность исходных аналогов и их полиаминов была принята за контрольный уровень, и истощение пула полиаминов в опухолевых клетках карциномы Эрлиха был оценен с помощью измерения блокировки синтеза тимидина. Истощение полиаминов при предварительном воздействии дифлуорометилорнитинном приводит к компенсационному увеличению транспорта полиаминов и аналогов в клетки, которые могут привести к увеличению токсического воздействия на эти клетки. Полученные авторами результаты поддерживают гипотезу, что присоединение полиаминов к нитроимидазолам облегчает проникновение последних в опухолевые клетки. Поэтому данный подход может стать основанием для разработки новых противоопухолевых препаратов [49].

Считается, что опухолевые клетки в условиях гипоксии не чувствительны к действию многих цитостатиков. Если при этом учесть, что вследствие скудности кровоснабжения опухолевого узла практически все опухолевые клетки находятся в состоянии гипоксии, то эффективность многих цитостатиков находится под вопросом. Поэтому есть возрастающий интерес к модификаторам, которые

оказывают токсичность на гипоксические части опухолей. Цисплатин вообще не оказывает токсичности в гипоксических клетках, в отличие от нитроимидазолов. Высказано предположение, что добавление нитроимидазолов может снизить гипоксию клеток и, следовательно, повысить эффективность препаратов платины. Платиновые комплексы, содержащие один нитроимидазол, связываются с ДНК и показывают более высокую токсичность на клетках сирийского хомячка, находящихся в гипоксии, чем на аналогичных клетках, находящихся в аэробных условиях. Было произведено сравнительное изучение изомеров по их способности связываться с ДНК и их токсичности. По этому показателю сравнивались комплексы платины с мизонидазолом (2-нитроимидазолы) и МТ (5-нитроимидазол). Соединения показали сходную эффективность. Считают, что эффект комплекса платины и нитроимидазола не может быть полностью объяснен их связыванием с ДНК. Показали, что аналоги не активны на клетках L1210 с индуцированной резистентностью к платине. Авторы считают перспективным дальнейшее развитие этого направления [76].

1.5 Использование МТ для увеличения эффективности радиотерапии

Было проведено исследование по изучению эффективности применения МТ совместно с гипертермией, химиотерапией и радиотерапией. С июля 2006 до февраля 2011 гг. в данное исследование были взяты 64 ранее не вылеченных пациента с диагнозом распространенный ректальный рак Т4. В настоящее время эти больные имеют неблагоприятный прогноз, и для них нет единой стандартной стратегии лечения. Цель этого исследования состояла в том, чтобы исследовать безопасность и эффективность неоадьювантной химиотерапии (капецитабин, оксалиплатин и МТ) с мелкодозовой радиотерапией и местной гипертермией. Радиотерапия была дана в суммарной дозе 40 Gy в 10 фракциях. Капецитабин в дозе 650 мг/м² площади тела в два введения в день был дан в 1-22 дни и оксалиплатин в дозе 50 мг/м² площади тела были введен внутривенно в 3, 10 и 17 дни. Местная гипертермия, 41-45°C в течение 60 минут, была выполнена на 8, 10, 15 и 17 сутки. МТ 10 000 мг/м² площади тела применяли местно в прямую кишку в

8 и 15 дни. Хирургия была выполнена в сроки 6-8 недель после неоадьювантной химиотерапии с уровнем резекции R0. Эффект оценивали по 2-летнему выживанию без признаков болезни, по 2-летнему полному выживанию, по частоте местных рецидивов и по переносимости лечения. Резекция R0 была выполнена у 59 пациентов (92,2%). У 5 больных (7,8%) опухоль осталась неоперабельной. У 7 пациентов (10,9%) были местные рецидивы. Средняя продолжительность жизни составляла 24,9 месяца. Двухлетнее полное выживание составляло 91%, и 2-летнее выживание без болезни составляло 83%. Гипертермия, объединенная с химиотерапией с целью радиосенсибилизирования опухоли в местном масштабе прогрессирующего неподвижного первичного ректального рака, сопровождается высоким уровнем резекции R0 с токсичностью, сопоставимой со стандартными режимами [21, 33]. В серии подобных исследований на группах пациентов больных раком прямой кишки были получены аналогичные результаты [22-27].

Хирургический метод остается главным в лечении рака желудка и рака прямой кишки [1-5, 18]. Неблагоприятный прогноз по долгосрочному выживанию вынуждает искать новые методы лечения. Одним из таких новых подходов остается изучение различных комбинаций радиотерапии и ее радиосенсибилизатора - МТ. Данная работа была выполнена между 1982 и 1988 гг. Клинический протокол предусматривал проведение дооперационной радиотерапии (20 дней Gy/5) в комбинации с пероральным введением МТ, 3 раза, по 5 000 мг/м² площади тела. Из 91 пациента, получивших дооперационную радиотерапию, 67 пациентам затем была выполнена резекция опухоли. Было зарегистрировано 4 смертельных случая. 5-летнее выживание составило 46%, 10-летнее выживание – 36% и среднее выживание составляло 46 месяцев. По мнению авторов, данная работа подтверждает перспективность комбинированного лечения рака желудка и прямой кишки [75].

МТ применяется как радиосенсибилизатор для лечения опухолей центральной нервной системы, в частности, глиобластом и анапластических астроцитом. Пациенты получили цисплатин в комбинации с МТС одновременно с радиотерапией и после нее в общей дозе 60 Gy. Радиосенсибилизаторы были

добавлены совместно с химиотерапией в каждой группе из 6 пациентов следующим образом: МТ + пентоксифиллин (группа 1); МТ + пентоксифиллин + дипиридамола (группа 2), МТ + пентоксифиллин + дипиридамола + бета каротин (группа 3). Токсическое воздействие на центральную нервную систему отмечалось часто и выражалось в диапазоне от сонливости до конвульсий и потери сознания. Токсическое воздействие на желудочно-кишечный тракт было выраженным, но не являлось лимитирующим. Средняя продолжительность выживания для всех пациентов составляла 26 недель от постановки диагноза. Исследование было закончено преждевременно из-за существенной токсичности. С нашей точки зрения, токсичность данных комбинаций связана с взаимным влиянием препаратов на метаболизм друг друга [82].

МТ используется в комбинации не только с другими препаратами, но и с физическими воздействиями (например, гипертермия) и радиотерапией. В этих комбинациях делается попытка использовать способность МТ выступать радиосенсибилизатором [16]. В следующем исследовании был использован режим гипертермии $43,5^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут и облучения в дозе 20 Gy. В качестве модификаторов был выбран МТ и его производное мизонидазол. В качестве опухолевой модели использовалась FSa-II фибросаркома крысы. Модификатор вводили в дозе 5 ммоль/кг веса тела за 30 минут до гипертермии и последующего облучения. Авторы не обнаружили различий по радиационным кривым доза-эффект для обоих модификаторов с нагреванием при $43,5^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут. По реакции ноги крысы оценивали местную токсичность после объединенного воздействия. Аналог МТ увеличивал величину реакции ноги и продлевал время восстановления по сравнению с реакцией ноги на гипертермию и облучение без мизонидазола. Не было отмечено различий реакции ноги между животными, получившими гипертермию и облучение без и с добавлением МТ. Авторы изучили фармакокинетику аналога МТ в условиях гипертермии в опухолях FSa-II для исследования возможного механизма теплового повышения чувствительности. Местная гипертермия не изменяла фармакокинетику мизонидазола. Концентрация в опухоли аналога МТ и отношение содержания

препарата в опухоли к содержанию препарата в плазме было снижено во время нагревания. То есть во время нагревания конечности животного содержание модификатора в конечности снижалось. Тем самым основной замысел исследователей – увеличить эффективность гипертермии с помощью модификатора - не мог быть выполнен, так как модификатор не поступал в конечность, хотя тепловая сенсibilизация ткани на фоне даже невысокого содержания модификатора была выражена. Авторы делают вывод, что очень низкая местная и системная токсичность вместе с высокой эффективностью МТ при повышенных температурах может позволить использование МТ в качестве радиосенсibilизатора [92].

Существуют публикации, в которых утверждается, что МТ не является радиосенсibilизатором. Авторы изучали токсическое поражение ткани и радиосенсibilизирующий эффект пяти различных терапевтических препаратов: блеоцина, хлорпромазина, мизонидазола, МТ и диамминдихлорплатина. В качестве мишени были взяты образцы тощей кишки швейцарских белых мышей. Все препараты (кроме МТ) показали выраженную и сопоставимую между собой токсичность на ткань кишки. Когда изучали комбинированное воздействие препарата и облучения, то блеоцин вызвал самое высокое радиационное поражение ($DMF=1,5$), в то время как МТ не имел никакого эффекта; другие препараты располагались по радиосенсibilизирующему эффекту между блеоцином и МТ (29). Данные, которые изложены в цитируемой работе, явно не согласуются с данными других исследователей. Возможно, это противоречие связано со спецификой выбранного объекта и тем, что данная экспериментальная модель ближе к системе *invitro* [15].

Авторы следующего исследования обнаружили радиосенсibilизирующий эффект МТ в системе *in vitro*. Исследование было проведено на клетках карциномы асцитной карциномы Эрлиха и на мышах линии C57Bl/6 с гемобластозом La. Предварительно клетки в анаэробных условиях подвергали облучению и воздействию МТ и его изомера. Было показано, что цитостатический эффект облучения при использовании изомера был менее явным, чем

цитостатический эффект, полученный на фоне МТ [65]. В то же время другие аналоги МТ оказались не эффективными как радиосенсибилизаторы [68].

В литературных обзорах приведены промежуточные результаты поисков радиосенсибилизаторов. Поиск радиосенсибилизаторов, которые могли бы восстановить чувствительность к облучению гипоксических клеток, началась в 1973 с МТ (52). Результаты зарегистрированных клинических испытаний с МТ до сих пор неутешительны. Только в 5 из 32 проанализированных исследований отмечено существенное реальное преимущество добавления МТ в схему комбинированного лечения онкологических больных (59, 60). Гипоксические клетки существуют во всех опухолях человека (56, 57, 58). Наиболее важным фактором, лежащим в основе невозможности достигнуть клинического эффекта, являются недостаточные концентрации модификатора в опухолевом узле и, как следствие, радиосенсибилизирующая концентрация препарата не достигается. Лимитирующей токсичностью и фактором, ограничивающим дозу МТ, является его нейротоксичность. Новые препараты, аналоги МТ, которые разрабатываются в настоящее время, имеют различные лимитирующие токсичности, что также указывает на сложность задачи [36, 38, 42]. Энцефалопатия, связанная с приемом МТ, является частым, но потенциально обратимым состоянием и зависит от общей дозы МТ. Большинство симптомов уходит после прекращения приема препарата, хотя бывает и неблагоприятное течение. В литературе описаны такие случаи [56, 73]. Также описаны состояния острой энцефалопатии на фоне приема МТ [44, 90].

1.6 Влияние метронидазола на иммунную систему

Не секрет, что любой живой организм представляет собой сложную целостную систему. В этой целостной системе функционирование любого органа или системы органов оказывает влияние на другие органы или системы органов, делая их работу стабильной или, наоборот, вызывая нарушения в их функционировании. Иммунная система является наиболее сложной и разветвленной системой организма. Помимо ее центральных звеньев - клеточного

и гуморального иммунитета в крови и лимфоидных органах, существует местный иммунитет. При местном иммунитете, как правило, развитие иммунных реакций не выходит за пределы органа или его части, но последствия этих местных реакций имеют более глобальное значение для организма. Поэтому необходимо признать, что данный подраздел назван слишком широко и неконкретно. Поэтому конкретизируем то направление, которое, с нашей точки зрения, представляет наибольший интерес в рамках проводимого исследования. МТ чаще всего используется как противомикробный и противопаразитарный препарат. Частой мишенью для инфекционных агентов является желудочно-кишечная система. С другой стороны, данное исследование имеет своей целью разработку новых методов лечения рака прямой кишки. То есть желудочно-кишечный тракт в рамках данной работы попадает под химиотерапевтическое, хирургическое и лучевое воздействие. Выше при анализе литературных данных упоминалось, что больные при лечении онкологических заболеваний с участием МТ погибали от полиорганной недостаточности. Одной из причин полиорганной недостаточности может быть «цитокиновый взрыв», в том числе и из-за генерализации инфекционного заболевания.

Пероральный или парентеральный прием МТ оказывает воздействие на желудочно-кишечную микрофлору макроорганизма. Группа авторов из Университета штата Луизианы изучила влияние нарушения микрофлоры кишечника на общую устойчивость макроорганизма к инфекционному заболеванию. Дисбактериоз в кишечнике исследователи создавали как с помощью антибиотиков (ампициллин, гентамицин, неомицин, ванкомицин и МТ), так и хроническим потреблением алкоголя. В качестве объекта исследования были выбраны мыши самцы линии C57BL/6. Животные получали антибиотики в течение двух недель, а жидкую пищу, содержащую алкоголь – 10 дней. Затем животных заражали *Klebsiella pneumoniae*. Исследователи выявили уменьшение устойчивости животных к пневмонии. Развитие пневмонии авторы связывают с нарушением местного иммунитета у животных с дисбактериозом. По мнению исследователей, нарушение местного иммунитета проявлялось в увеличении в

легком провоспалительных цитокинов и уменьшении CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Авторы делают вывод, что изменения в кишечной иммунной реакции как следствие дисбактериоза способствовали увеличенной восприимчивости животных к пневмонии, вызванной *Klebsiella pneumoniae* [37, 70, 71].

Следующая группа исследователей считает, что любое нарушение кишечной микрофлоры (даже в молодом возрасте) может вызывать состояние устойчивого дисбактериоза, который в более зрелом возрасте может привести к развитию колитов. Для демонстрации этого положения авторы сформировали несколько экспериментальных групп. Одна группа животных хронически получала низкие дозы пенициллина, вторая группа мышей получала МТ, тогда как третья – энрофлоксацин. Затем у животных вызывали колит с помощью сульфата декстрана натрия. Отметили, что предварительный прием мышами пенициллина снижала частоту развития колита у таких мышей. МТ увеличивал частоту развития колита, вызванного сульфатом декстрана натрия. Протективное действие пенициллина авторы связывают с его действием на сегментированные жгутиковые бактерии. Предварительная вакцинация животных против этих бактерий также оказывала протективное действие. Развитие колита, возможно, связано с подавлением пенициллином в низкой дозе провоспалительного цитокина IL-17 в различных тканях кишечника и уменьшением количества клеток Th17 в слизистой тонкой кишки. Таким образом, и в этой работе исследователи связывают развитие воспалительной реакции в кишечнике с уровнем цитокина IL-17 [51].

По данным тайландских исследователей, МТ эффективен против *Helicobacter Pylori* у 55% больных. Соответственно, в 55% случаев лечения гастрита МТ будет эффективен [63].

Группа египетских ученых показала эффективность МТ в лечении паразитарной инфекции *Cryptosporidium Parvum*. Элиминация паразита происходила на фоне выраженной иммунологической реакции с участием CD4⁺ Т-клеток и интерферона IFN-gamma. Таким образом, и при лечении

паразитарного зооноза уровень цитокинов и эффекторов иммунитета является информативным [29].

Более детальное исследование о роли цитокинов в развитии паразитарной инфекции провела другая группа исследователей. Мышей линии C57BL/6 заражали *Trichuris muris*. *Trichuris muris* - часто изучаемая модель гельминтоза. Цель работы состояла в том, чтобы охарактеризовать зависимое от дозы *Trichuris muris* поражение желудочно-кишечного тракта и брюшной полости мышей и чтобы выявить наиболее эффективный способ защиты желудочно-кишечного тракта и брюшной полости с помощью IL-10 или МТ. Доза заражения мышей IL-10(+/+), IL-10(+/-) и IL-10(-/-) колебалась от 75 до 25 яиц на мыш. Авторы отмечали высокую эффективность МТ для защиты желудочно-кишечного тракта и брюшной полости при всех дозах заражения, и только некоторое снижение тяжести заболевания гельминтозом у мышей IL-10(+/-) при низких дозах заражения [54].

О значении цитокинов в нормальном функционировании кишечника говорится в работе японских исследователей. В работе была описана делеция в экзоне гена IL10RA. Результатом этой делеции стала мутация в молекулах интерлейкина IL-10 и его рецепторе. Мутация была обнаружена у новорожденного мальчика и проявлялась воспалением кишечника, тромбоцитопенической пурпурой и клиническим синдромом, сходным с миелоцитарным лейкозом. Пациент не отвечал на стандартное лечение, включающее диету, сульфазосульфапиридин, МТ, кортикостероиды, инфликсимаб и адалимумаб. В возрасте 21 месяца ему был пересажен костный мозг донора [93].

В следующем исследовании была установлена роль интерлейкина 6 в патогенезе развития пародонтоза у больных диабетом 2 типа. Авторы изучили локальный уровень 14 цитокинов в ротовой полости 21 пациента на фоне их лечения амоксициллином и МТ. Обнаружили достоверное увеличение уровней гранулоцит-макрофаг колоний стимулирующего фактора и интерлейкина 6.

Исследователи делают вывод, что снижение уровней этих факторов является необходимым условием излечения пародонтоза [35].

В другом исследовании было показано, что местное применение МТ может локально повышать уровень IL-1 β и хемокина CCL28 в отделяемом из десен при гингвите в экспериментальном моделировании этого заболевания у человека. Совместное применение МТ и хлоргексидина имело ярко выраженный противовоспалительный эффект [66].

Таким образом, МТ является эффективным фармакологическим препаратом. Однако в клинической практике могут возникать ситуации, связанные в частности с дисбактериозом, когда он может запускать выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов. При анализе литературы бросается в глаза тот факт, что не изученным остается вопрос о влиянии МТ на синтез цитокинов в лимфоузлах брыжейки. А ведь именно эти лимфоузлы являются первым барьером, который препятствует распространению инфекции из просвета кишечника.

Таким образом, метронидазол является препаратом, обладающим разнообразной биологической эффективностью. Основной областью его применения является антимикробная и антипаразитарная химиотерапия. Дозы и продолжительность лечения метронидазолом зависят от возбудителя, против которого проводится терапия. Часто, особенно при хронических желудочно-кишечных заболеваниях, эти дозы близки к максимально переносимым, и режимы применения препарата носит хронический характер. В этом случае больные сталкиваются с побочными его эффектами. Главным из этих побочных эффектов (лимитирующая токсичность) является нейротоксичность.

Следующей обширной областью применения метотронидазола является онкология. В частности, радиотерапия опухолей. При детальном изучении метаболизма препарата было установлено, что он обладает свойствами миметика кислорода [19]. В экспериментах на животных показано, что его использование увеличивает эффективность радиотерапии опухолей (69).

Основным «недостатком» метронидазола являются пути его метаболизма. Препарат окисляется микросомными ферментами печени. В этой же ферментной системе метаболизируются практически все фармакологические препараты. Поэтому при перекрытии метаболизма веществ на одном и том же ферменте возникает конкуренция этих веществ за фермент. Итогом такой конкуренции является изменение фармакокинетики препаратов в организме, что в свою очередь ведет к изменению их биологической и терапевтической эффективности. Ранее приводился пример, когда у больного после пересадки почки наблюдалось увеличение активности иммунодепрессантов. В клинике проводился мониторинг концентрации иммунодепрессанта в сыворотке крови, на фоне приема метронидазола доза препарата была снижена в 4 раза! Авторы этой статьи не измеряли концентрации самого метронидазола у этого пациента. Но не вызывает сомнения тот факт, что его фармакокинетика тоже должна была измениться. Именно изменение фармакокинетики метронидазола на фоне других препаратов может объяснить случаи увеличения его нейротоксичности на фоне обычных терапевтических доз препарата.

Следует отметить, что в онкологической практике, особенно после хирургических вмешательств, метронидазол чаще всего используется по своему прямому назначению (антимикробное и антипаразитарное). Хирургические раны после удаления опухолей, к сожалению, заживают плохо, так как зачастую больные получают курсы радиотерапии и химиотерапии. Поэтому курсы антимикробной терапии всегда продолжительны. Обнаруженные свойства метронидазола указывают на способность этого препарата влиять на эффективность химиотерапевтических препаратов при лечении злокачественных опухолей. Противоопухолевые препараты, как известно, обладают токсическими свойствами, а комбинация МТ с цитостатиками может усилить побочные эффекты химиопрепаратов, вплоть до фатальных исходов, как отмечалось ранее. Все вышесказанное указывает на сложность проблемы, с которой сталкиваются практические врачи, при применении МТ у онкологических пациентов на фоне химиолучевой терапии.

В то же время, в литературе остается практически не изученным вопрос о влиянии временных интервалов между приемом метронидазола и проведением химиотерапии [17]. Также не изучен вопрос о возможности использования метронидазола в виде аппликаций совместно с химиотерапией и радиотерапией. Также не изучен вопрос увеличения противоопухолевого действия метронидазола при его совместном использовании с цитостатиками. МТ является широко используемым противомикробным и противопаразитарным препаратом [6, 23, 48, 89, 95]. При этом в клинической практике область его применения зачастую связана не только с его действием на микроорганизмы, но и с его ЭАС [53]. Последнее его свойство наиболее широко используется в онкологии для увеличения эффективности радиотерапии злокачественных новообразований [91]. Известно, что в лечении любого заболевания в медицинской практике, и онкологических заболеваний в частности, используется много различных препаратов. На практике это означает, что больной должен принимать одновременно несколько лекарственных средств. Например, для повышения эффективности лучевой терапии опухолей прямой кишки больным на фоне облучения дают 5-ФУ и МТ [33]. Больным после хирургического удаления первичного узла и на фоне неoadъювантной и адъювантной химиотерапии онкологическим больным назначают МТ с целью подавления инфицирования раны [77]. Отметим, что подобная ситуация встречается не только в онкологии, но, например, и в трансплантологии. В качестве примера приведен клинический случай, когда больному после трансплантации почки назначили МТ для борьбы с сопутствующей инфекцией. В данном случае лечащие врачи имели возможность напрямую контролировать концентрацию иммунодепрессанта в сыворотке крови больного, что позволило уменьшить его курсовую дозу в 4 раза для исключения передозировки [61]. Хотя увеличения токсичности препаратов при их совместном применении с МТ не вызывает сомнений, тем не менее в ряде случаев возникает необходимость использовать МТ у онкологических больных. Возможным выходом из сложившейся ситуации может быть использование различных режимов приема этих препаратов [41, 59].

На настоящее время не изучен вопрос о том, с чем связано повышение токсичности цитостатика на фоне приема метронидазола. Возможно, оно является последствием не только изменения концентрации цитостатика в сыворотке крови, но и результатом его перераспределения в тканях и клетках организма. Последнее обстоятельство крайне важно, так как может быть использовано для преодоления резистентности опухоли к цитостатикам. Недостаточная изученность этих вопросов определяет направление дальнейшего исследования.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Лабораторные животные

Опыты проводили на мышах линии СВА/Лас массой 18-20 г, самцах (n=450), полученных из питомника «Столбовая» Московской области, мышах линии С57В1/6 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».

2.2. Перевиваемые опухоли

Карцинома яичников СаО-1 и меланома 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 мышечки-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 С57В1/6. Опухоль перевивали подкожно в правую подмышечную область. Для перевивки опухолевый узел извлекали из мышечки-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.

2.3 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 (мм^3) и определяли по формуле

$$V=a^2b,$$

где a – меньшее из линейных размеров опухоли, выраженное в миллиметрах, 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.

2.4 Противоопухолевые препараты

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

2.5. 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 CO_2 – 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).

2.6 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 бромида (МТТ-тест), который является одним из основных нерадиометрических методов оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток [75]. Суть метода заключается в метаболическом превращении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида 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 MCC-340 (Labsystem, Финляндия), рассчитывался процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности) [62].

2.7 Проточная цитометрия (FASC-анализ)

Определение экспрессии поверхностных клеток карциномы яичников СаО-1 проводили при помощи поликлональных антител против муцина СА 125 человека («Хема», Россия). Антитела были мечены FITC (флюоресцеинизотиоционатом). Клетки карциномы СаО-1 инкубировали в течение 10 мин с 10% сывороткой человека, чтобы заблокировать места неспецифического связывания, в фосфатном буфере при рН 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 рН 7,4 при 800g в течение 20

мин дважды. Результаты учитывали на проточном цитометре FACS Calibur («Becton Dickinson», США) с 15 мВт 488 аргон-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 2, все клетки мышинной карциномы яичников CaO-1 экспрессируют антигены, идентичные муциновым антигенам антигена СА 125 человека. Эти данные указывают на сходство использованных в настоящей работе опухолевых мышинных моделей с опухолями человека.

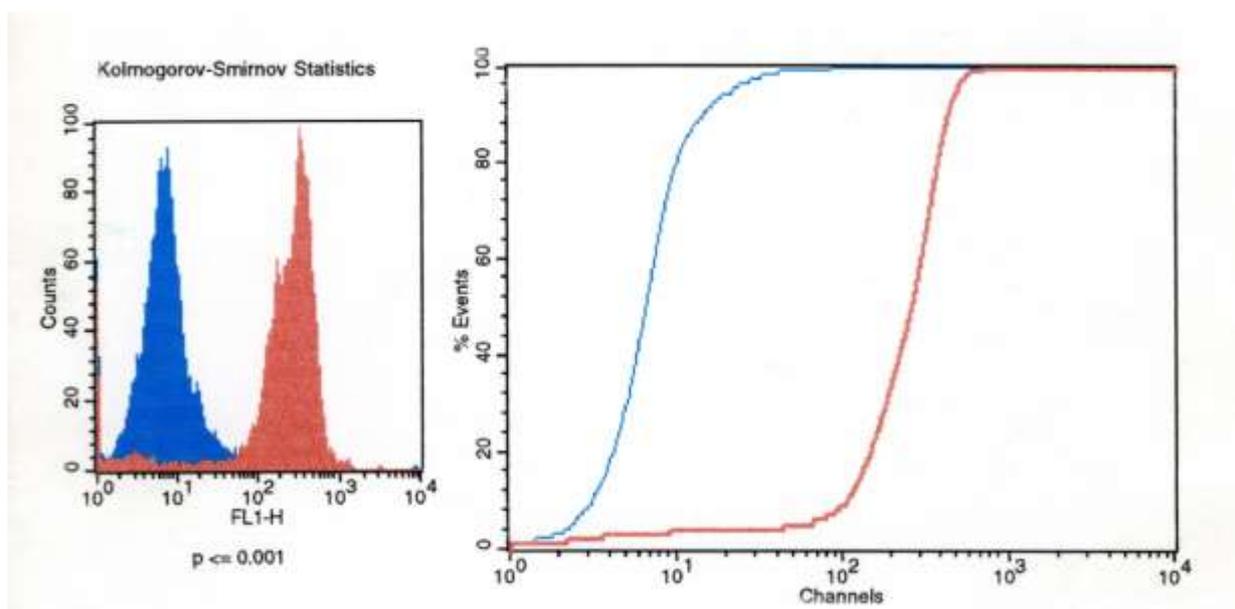


Рисунок 2 – Цитологическая характеристика клеток карциномы CaO-1. Взаимодействие клеток карциномы яичников CaO-1 с поликлональными антителами человека против муцина СА 125. Статистическая обработка по Колмогорову-Смирнову ($p <= 0.001$).

2.8 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 [55].

2.9 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).

2.10 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:

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

где C – 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, A – 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 3 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.

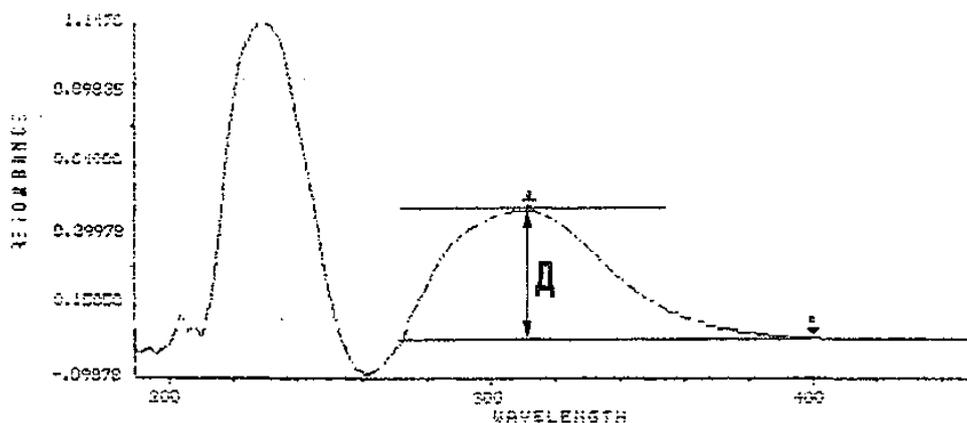


Рисунок 3 – Спектр поглощения МТ в спиртовом экстракте биоптата опухоли, полученный в результате вычитания из спектра поглощения биоптата опухоли, содержащей МТ, спектр поглощения биоптата опухоли без МТ

2.11 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.

2.12 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 $p < 0,05$.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние МТ на биологическое действие 5-фторурацила (5-ФУ) и доксорубицина (ДКС)

В настоящей главе представлены результаты изучения влияния различных временных промежутков между введением препарата МТ и антиметаболита 5-ФУ и цитостатика ДКС на биологическое действие последних. Выбор препаратов обусловлен широтой их применения в онкологической практике при различных формах онкологических заболеваний.

3.2 Влияние МТ на противоопухолевый эффект 5-ФУ и ДКС на модели карциномы яичников СаО-1 и меланомы В16

На рисунке 4 показана динамика роста опухоли карциномы яичников СаО-1 в контрольной серии и на фоне воздействия препаратами 5-ФУ и МТ. Как следует из рисунка 5, в контрольной группе отмечался быстрый рост первичного узла. Введение МТ внутривнутрибрюшинно в дозе 1000 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли не оказывало 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 в течение $10 \pm 1,2$ сут. наблюдения. Совместное внутривнутрибрюшинное введение МТ и через 20 минут после подкожного введения 5-ФУ в указанных выше дозах достоверно увеличивало противоопухолевый эффект антиметаболита. Задержка выхода опухолей отмечалась в течение $14 \pm 1,5$ сут. , ТРО = 100% ($p < 0,05$).

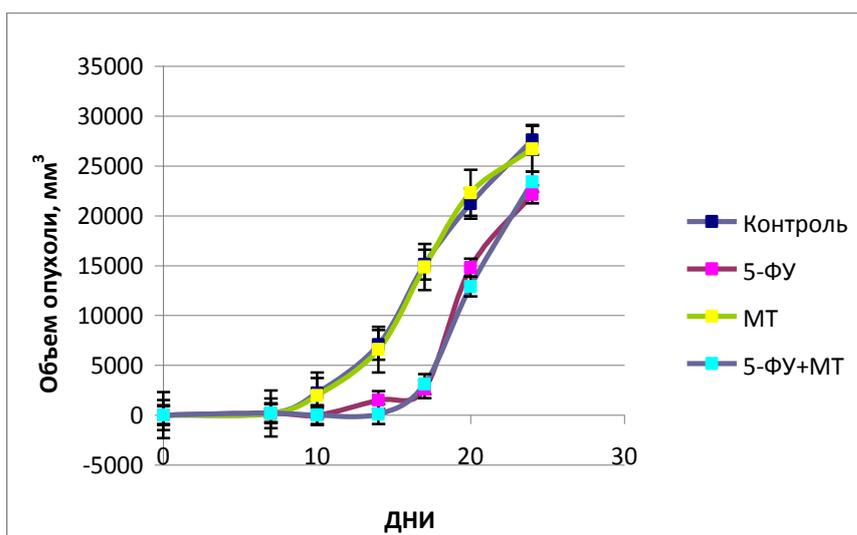


Рисунок 4 – Влияние МТ на противоопухолевое действие 5-ФУ на примере динамики роста карциномы СаО-1*

* 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 внутривентриально. В каждой группе было по 10 животных. По оси абсцисс дни после перевивки опухоли. По оси ординат объем опухоли в мм³.

На рисунке 5 показана динамика роста карциномы яичников СаО-1 в контрольной серии и при воздействии цитостатиков в комбинации с МТ при различных интервалах между введением антимиетаболита и МТ от 20 мин до 12 часов. Как видно из приведенного рисунка 6, в контрольной группе отмечался быстрый рост опухолевого узла. Введение МТ внутривентриально в дозе 1000 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли не оказывало 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 на 10±1,4 сут. наблюдения. Совместное внутривентриальное введение МТ и подкожное введение 5-ФУ через 12 часов в указанных выше дозах не увеличивало противоопухолевый эффект антимиетаболита. Задержка выхода опухолей также отмечалась только на 10±2,1 сут. после перевивки опухоли (P>0,05).

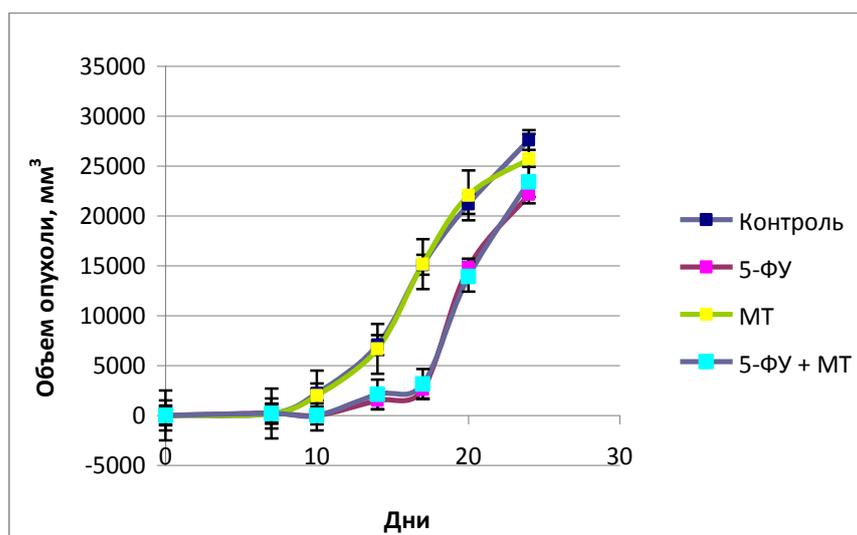


Рисунок 5 – Влияние МТ на противоопухолевое действие 5-Фу на динамику роста карциномы СаО-1 при увеличении интервала между введением препаратов*

* 5-ФУ вводили в дозе 100 мг/кг веса тела животных подкожно. МТ вводили в дозе 1000 мг/кг веса тела животных за 12 часов 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.

На рисунке 6 представлена динамика роста меланомы В16 в контрольной серии и при воздействии 5-ФУ в монорежиме и в комбинации с МТ. Как следует из рисунка 7 в контрольной группе наблюдался экспоненциальный рост первичного узла. Введение МТ внутривнутрибрюшинно в дозе 1000 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли не оказывало достоверного влияния на рост опухоли. Подкожная инъекция 5-ФУ в дозе 100 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли также не вызывала торможения роста опухоли. Совместное внутривнутрибрюшинное введение МТ и через подкожное введение 20 минут в указанных выше дозах также не приводило к противоопухолевому эффекту антимиетаболита. Таким образом, МТ не оказывал модифицирующего действия на опухолевые клетки, которое могло бы позволить преодолеть исходную резистентность опухоли к этому противоопухолевому

препарату. ТРО не превышал 50%, что позволяет сделать вывод об отсутствии усиления противоопухолевой активности 5-ФУ по отношению к меланоме В16.

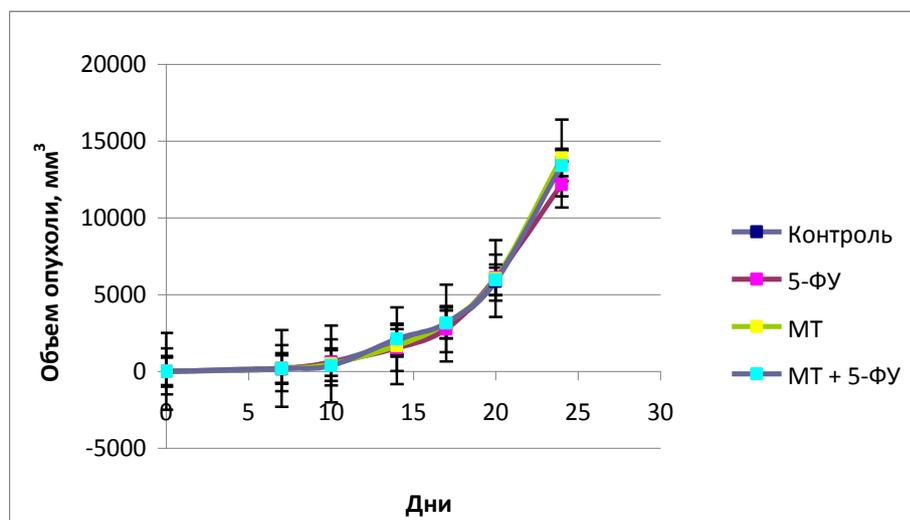


Рисунок 6 – Влияние МТ на противоопухолевое действие 5-ФУ на примере динамики роста меланомы В16*

* 5-ФУ вводили в дозе 100 мг/кг веса тела животных подкожно. МТ 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.

На рисунке 7 представлена динамика роста карциномы яичников СаО-1 в контроле и на фоне воздействия препаратами ДКС и МТ. В контрольной серии отмечался быстрый рост опухолевого узла. Введение МТ внутривентриально в дозе 1000 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли не оказывало достоверного влияния на рост опухоли. Введение подкожно ДКС в дозе 8 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли вызывало задержку выхода опухолевых узлов на 14±2,0 сут. наблюдения. Эти данные указывают на то, что противоопухолевое действие ДКС на карциному яичников менее выраженное по сравнению с 5-ФУ, поскольку не отмечалось регрессии опухолевого узла, однако эффект ДКС был более продолжительным. Совместное внутривентриальное введение МТ и подкожное введение ДКС через 20 минут в указанных выше дозах незначительно увеличивало противоопухолевый эффект

цитостатика – задержка выхода опухолей - $16 \pm 2,6$ сут. ($p > 0,05$). Хотя введение комбинации не привело к полной регрессии опухолевого узла, период торможения роста опухоли на фоне комбинации увеличился на 3 сут. по сравнению с аналогичным периодом, при введении ДКС в монорежиме.

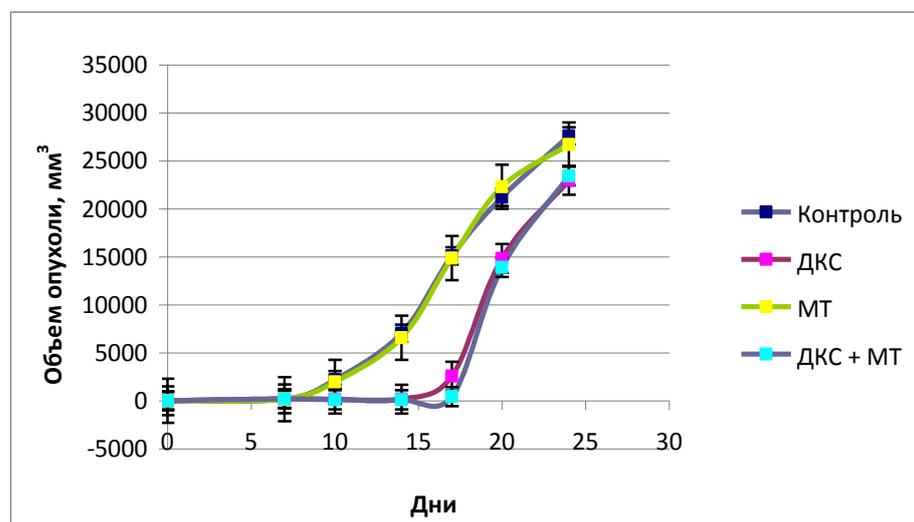


Рисунок 7 – Влияние МТ на противоопухолевое действие ДКС на примере динамики роста карциномы СаО-1*

* ДКС вводили в дозе 8 мг/кг веса тела животных подкожно. МТ вводили в дозе 1000 мг/кг веса тела животных за 2 часа до введения ДКС внутривентриально. В каждой группе было по 10 животных. По оси абсцисс дни после перевивки опухоли. По оси ординат объем опухоли в мм³.

На рисунке 8 показана динамика роста опухоли карциномы яичников СаО-1 в контрольной серии и на фоне воздействия препаратов при увеличении интервала между введением противоопухолевого антибиотика и МТ до 12 часов. Как показано на рисунке 9, в контрольной группе отмечался быстрый рост первичного узла. Введение МТ внутривентриально в дозе 1000 мг/кг веса тела животных на 7 сут. после перевивки опухоли не оказывало достоверного влияния на рост опухоли. Введение подкожно ДКС в дозе 8 мг/кг веса тела животных в те же сроки вызывало задержку выхода опухолевых узлов на $16 \pm 1,5$ сут. Совместное внутривентриальное введение МТ и подкожная инъекция ДКС через 12 часов в указанных выше дозах не увеличивало противоопухолевый эффект цитостатика

(задержка $16 \pm 1,0$ сут.) В данных условиях не отмечали увеличения торможения роста опухоли, как это было отмечено на фоне комбинации препаратов, когда интервал между их введением был всего 20 минут.

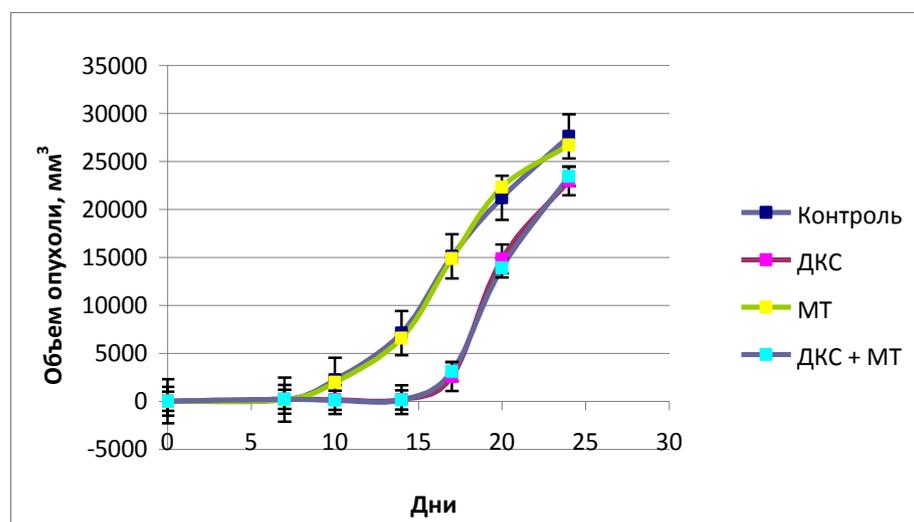


Рисунок 8 – Влияние МТ на противоопухолевое действие ДКС на примере динамики роста карциномы СаО-1 при увеличении интервала между введением препаратов*

* 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 внутривентриально. В каждой группе было по 10 животных. По оси абсцисс дни после перевивки опухоли. По оси ординат объем опухоли в мм³.

Аналогичное действие ДКС и его комбинации с МТ отмечалось у мышей с привитой меланомой В16. как следует из данных рисунка 10, в контрольной группе отмечался экспоненциальный рост первичного узла. Введение МТ внутривентриально в дозе 1000 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли не оказывало достоверного влияния на рост опухоли. Подкожная инъекция ДКС дозе 8 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли вызывала торможение роста опухоли, которое проявлялось в задержке ее выхода на $14 \pm 2,1$ сут. Совместное внутривентриальное введение МТ и подкожное введение ДКС через 20 минут в указанных выше дозах приводило к усилению

противоопухолевого эффекта цитостатика, которое проявлялось торможению роста опухоли до 80% в течение $17 \pm 2,3$ сут (Рисунок 9).

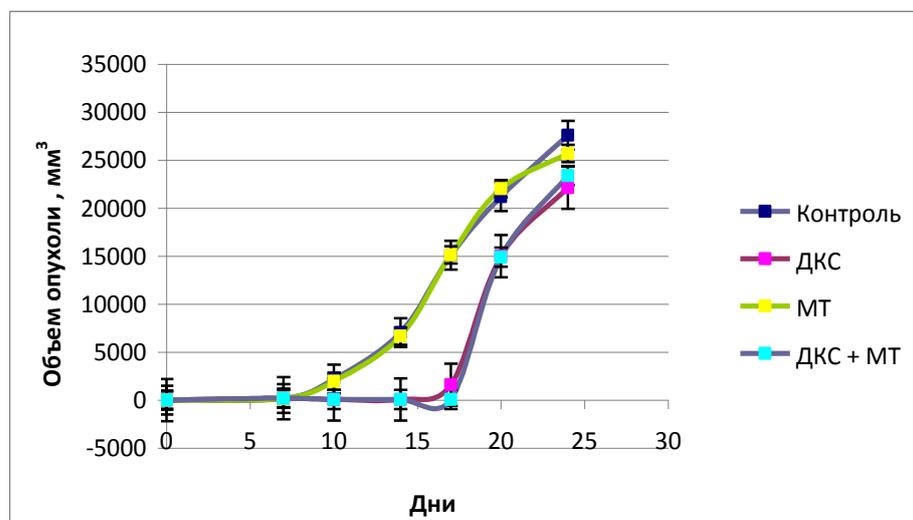


Рисунок 9 – Влияние MT на противоопухолевое действие ДКС на примере динамики роста меланомы B16*

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

Согласно данным, представленным на рисунке 10, в контрольной серии отмечен быстрый рост меланомы B16. Введение MT внутрибрюшинно в дозе 1000 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли не оказывало значимого влияния на рост опухоли. Подкожная инъекция ДКС в дозе 8 мг/кг веса тела животных на 7 день после перевивки опухоли вызывало задержку выхода опухолевых узлов к 14 сут. Совместное внутрибрюшинное введение MT и подкожное введение ДКС через 12 часов в указанных выше дозах, не увеличивало противоопухолевый эффект цитостатика, в отличие от введения этой же комбинации препаратов, когда интервал между их введением был всего 20 минут.

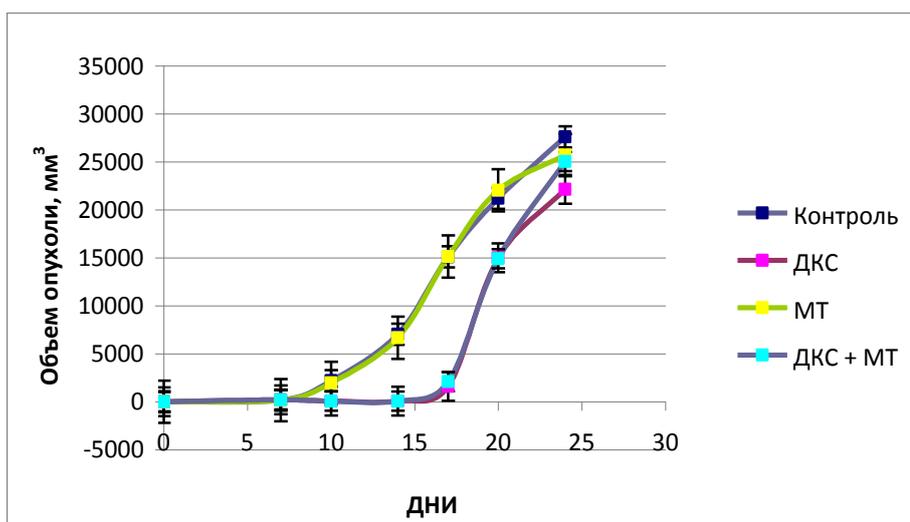


Рисунок 10 – Влияние МТ на противоопухолевое действие ДКС на примере динамики роста меланомы В16*

* 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.

3.3 Влияние МТ на токсическое действие 5-ФУ и ДКС

В настоящем разделе работы было оценить влияние МТ на острую токсичность 5-ФУ и ДКС.

В таблице 1 представлены результаты экспериментов по изучению влияния интервала между введением 5-ФУ и МТ на летальность интактных животных. Для определения увеличения токсического действия противоопухолевых препаратов при комбинации с МТ исследовали сублетальные дозы.

Как следует из данных, приведённых в таблице 2, 5-ФУ не вызывал гибели мышей в дозе 200 мг/кг веса тела животных (0,5 LD₅₀). Введение МТ (0,5 LD₅₀) за 20 минут до инъекции противоопухолевого препарата вызывало гибель 70% животных. Степень увеличения токсичности можно оценить, если сравнить дозу 5-ФУ, которая вызывает сравнимый (70%) процент гибели животных. Доза 5-ФУ, вызывающая гибель 70% особей составляет 300 мг/кг веса тела животных. Когда интервал между введением модификатора и 5-ФУ был увеличен до 1 часа,

процент гибели животных уменьшался до 20%. Снижение токсичности комбинации препаратов можно объяснить быстрым метаболизмом МТ в организме мыши. Очевидно, что снижение концентрация МТ в сыворотке крови вызывало уменьшение его влияния на фармакокинетику и токсичность 5-ФУ.

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

№ п\п	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 ± 1,6	70	>0.05
		1 час	14,8 ± 0,5	20	
		4 часа	35,2±3,1	0	
2	5-ФУ- 250		Не отмечено	0	
		20 минут	10,6± 0,5	100	>0.05
		1 час	12,3± 0,6	90	>0.05
		4 часа	14,0± 0,5	10	
3	5-ФУ- 300		14,0 ±0.0	70	-
		20 минут	9,9 ± 0,3	100	>0.05
		1 час	10,6± 0,3	100	>0.05
		4 часа	14,0± 0,1	80	>0.05
4	5-ФУ- 400		10,6 ±0,8	100	
		20 минут	7,8 ±0,7	100	<0.05
		1 час	8,1 ± 0,7	100	
		4 часа	8,1 ± 0,8	100	<0.05

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

¹ Модификатор МТ вводили внутривенно 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.

Предположение об усилении токсичности совместного введения МТ и 5-ФУ подтверждается данными из таблицы 2 при дозе 5-ФУ 200 мг/кг веса тела животных, так как дальнейшее увеличение интервала между введением препаратов до 4 часов приводит к еще большему уменьшению токсичности 5-ФУ. Из таблицы 1 видно, что гибель животных в этом режиме не наблюдалась.

Как следует из данных, приведённых в таблице 2, 5-ФУ в дозе 250 мг/кг веса тела животных также не вызывал летальных эффектов. Однако введение модификатора МТ за 20 минут до введения противоопухолевого препарата вызывало гибель 100% животных, что указывает на увеличение токсичности 5-ФУ. Доза 5-ФУ равная 400 мг/кг веса тела животных вызывала 100% летальность животных (LD_{100}). Если интервал между введением модификатора и 5-ФУ увеличивали до 1 часа, то процент гибели животных уменьшался до 90%. Увеличение интервала между введением препаратов до 4 часов еще больше снижало летальность до 10%.

5-ФУ в дозе 300 мг/кг веса тела животных вызывал гибель 70% животных. Введение МТ за 20 минут до введения противоопухолевого препарата приводило к 100% летальности животных. При этом отмечалось достоверное уменьшение средней продолжительности жизни погибших животных с 14 до 9,9 сут., что также указывает на увеличение токсичности цитостатика при комбинации с МТ. Увеличение интервала между введением модификатора и 5-ФУ увеличивали до 1 часа, также вызывало 100% гибель мышей, однако отмечалось тенденция к

увеличению средней продолжительности жизни животных с 9,9 сут. до 10,6 сут., что можно расценить как уменьшение токсичности препарата. Увеличение интервала времени между введением препаратов до 4 часов сопровождалось дальнейшим снижением токсичности комбинации. Процент погибших животных уменьшился до 80%, а средняя продолжительность их жизни увеличилась до 14 сут.

При введении 5-ФУ в дозе 400 мг/кг наблюдалась гибель 100% животных. Важно отметить, что эта гибель отмечалась в короткие сроки – на 7-8 сут. наблюдения. Учитывая выраженную токсичность цитостатика в этой дозе, сделать обоснованные выводы об усилении гибели животных после воздействия комбинации препаратов в этой дозе не представлялось возможным. Сам модификатор в указанных условиях не вызывал гибели животных.

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

№ п/п	Препарат, Доза (мг/кг)	Модификатор ¹ , интервал введения	Продолжите льность жизни павших животных (Дни)	Количес тво павших в % к исходно му	Достоверн ость 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		$10,2 \pm 0,0$	70	
10		20 минут	$5,9 \pm 0,3$	100	<0.05
11		1 час до	$7,6 \pm 0,3$	100	<0.05
12		МТ 4 часа	$11,0 \pm 0,6$	80	
13	ДКС 20		$4,6 \pm 0,1$	100	
14		20 минут	$3,8 \pm 0,1$	100	<0.05
15		1 час	$4,1 \pm 0,1$	100	<0.05
16		4 часа	$4,1 \pm 0,1$	100	
17		МТ	более 30	0	

¹ Модификатор МТ вводили внутривенно 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.

В таблице 2 представлены результаты экспериментов по изучению влияния интервала между введением ДКС и МТ на гибель животных.

Согласно данным, приведённым в таблице 3, ДКС не вызывал гибели мышей в дозе 5 мг/кг веса тела животных ($0,5 LD_{50}$). Однако введение модификатора МТ за 20 минут до введения противоопухолевого препарата вызывало гибель 10% животных, что указывает на увеличение токсичности при комбинации с МТ. Из приведенных данных следует, что это доза ДКС при применении в монорежиме, вызывающая аналогичный токсический эффект, составляла 10 мг/кг веса тела животных. Если интервал между введением модификатора и ДКС увеличивали до 1 часа, то гибели мышей не наблюдалось. Не отмечали летальные эффекты и при увеличении интервала между введением МТ и ДКС до 4 часов.

При воздействии в монорежиме ДКС в дозе 10 мг/кг веса тела животных вызывал гибель 10% мышей при продолжительности жизни павших животных 14 сут. Однако введение модификатора МТ за 20 минут до противоопухолевого препарата увеличивало гибель животных до 40%, что указывает на повышение токсичности комбинации. Увеличение интервала между введением МТ и ДКС до 1 часа или до 4 часов снижало процент гибели животных до уровня сравнимого с действием ДКС в монорежиме.

ДКС в дозе 15 мг/кг веса тела животных вызывал гибель 70% мышей при продолжительности жизни павших животных 10,2 сут. Введение модификатора МТ за 20 минут до противоопухолевого препарата увеличивало гибель животных до 100% и уменьшало среднюю продолжительность жизни павших животных до 5,9 сут., что указывает на увеличение токсичности комбинации. При увеличении интервала между введением МТ и ДКС до 1 часа 100% гибель животных сохранялась, но наблюдалось увеличение средней продолжительности жизни павших животных до 7,6 сут., что указывает на незначительное уменьшение токсичности комбинации препаратов. При дальнейшем увеличении интервала между введением препаратов до 4 часов процент гибели животных снижался до 80%, а средняя продолжительность жизни павших животных увеличивалась до 11 сут.

При введении ДКС в дозе 20 мг/кг веса тела животных наблюдалась 100% гибель животных. При этом гибель наблюдалась в короткие сроки – на 3-4 сут. наблюдения. В данных условиях МТ не влиял на токсичность ДКС. Показано, что изолированное использование модификатора в таком режиме не вызывало гибели животных.

В таблице 3 представлены результаты экспериментов по изучению влияния противоопухолевых препаратов, МТ, а также их комбинации на количество лейкоцитов в периферической крови мышей.

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

Сутки ¹	1	2	3	4	5	6
Группы ²						
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 внутрибрюшинно 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 ($M \pm m$) $\times 10^3/\text{мкл}$.

В контрольной группе животных количество лейкоцитов в периферической крови было стабильным на протяжении всего периода наблюдения со средними показателями от 9,6 до $11,2 \times 10^3$ клеток на микролитр периферической крови мышей. Введение модификатора в дозе 1000 мг/кг веса тела животных вызывало снижение количества лейкоцитов периферической крови до $7,6 \times 10^3$ на 4 сут. 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 сут. после введения противоопухолевого препарата. В последующие сутки наблюдалось восстановление количества клеток в периферической крови практически до исходных уровней. В группе животных, которые получили модификатор за 2 часа до введения противоопухолевого препарата, также отмечалось снижение количества лейкоцитов периферической крови до $6,1 \times 10^3$ на 4 сут. после введения противоопухолевого препарата. В последующие дни наблюдалось восстановление количества клеток в периферической крови. Однако полного восстановления до исходного количества клеток в периферической крови мышей в изученный период времени не произошло. Это 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 снижение количества лейкоцитов в периферической крови достоверно не отличалось от данного параметра в группе мышей, получивших 5-ФУ в монорежиме.

ДКС в отличие от 5-ФУ вызывал более длительное снижение количества лейкоцитов в периферической крови мышей с 3 по 5 сут. наблюдения. В группе животных, которые получили модификатор за 2 часа до введения ДКС, также отмечалось снижение количества лейкоцитов периферической крови на 4 сут. после введения противоопухолевого препарата. Однако в этом случае лейкопения была более интенсивной и продолжительной по сравнению количеством лейкоцитов периферической крови в группе животных, получивших один ДКС. Достоверное снижение количества лейкоцитов периферической крови и увеличение времени восстановления рассматриваемого параметра, указывают на то, что предварительное введение МТ (за 2 часа) приводит к увеличению токсичности ДКС. Однако если интервал введения между МТ и ДКС увеличивали до 4 часов, достоверные различия в количестве лейкоцитов периферической крови мышей, получивших один ДКС и ДКС в комбинации с МТ, нивелируются.

В таблице 4 представлены результаты экспериментов по изучению влияния противоопухолевых препаратов, МТ, а также их комбинации на среднюю массу тела мышей.

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

Сутки ¹	0	5	6	7	8	9
Группы ²						
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
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*
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
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
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*
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
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
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/Lac/.

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.

Как следует из данных таблицы 5, в контрольной группе животных средняя масса тела была стабильна на протяжении всего периода наблюдения со средним значением 21,4 г. Введение модификатора МТ в дозе 1000 мг/кг незначительно снижало массу тела мышей в среднем на 5% (20,5 г). В последующие сутки эксперимента наблюдали восстановление массы тела животных, получивших модификатор. В группе животных, получивших 5-ФУ в дозе 100 мг/кг веса тела животных, также отмечалось снижение массы тела животных примерно на 5%. Это снижение было устойчивым и наблюдалось в течение всего эксперимента. В группе животных, получивших модификатор за 2 часа до введения противоопухолевого препарата, отмечалось достоверное снижение массы тела животных, достигающее 16,1 г к 7 сут от исходных 21,6 г. То есть снижения массы тела животных при воздействии 5-ФУ на фоне модификатора достигало 25%, что свидетельствует об усилении токсичности комбинации препаратов по сравнению с отдельным применением препаратов. Увеличение интервала между введением модификатора и противоопухолевого препарата до 4 часов приводило к тому, что потеря массы тела животных, при воздействии комбинации МТ и 5-ФУ не отличалась от таковой у мышей при отдельном применении этих препаратов.

ДКС в отличие от 5-ФУ вызывал более длительное уменьшение массы тела животных с 5 по 9 сут. наблюдения. В группе животных, которые получили модификатор за 2 часа до введения ДКС, также отмечается увеличение токсичности комбинации модификатора и ДКС по сравнению с отдельным их применением. Так, на 9 сут.наблюдения средняя масса тела животных достигала 16,6 г, что на 2,5 грамм ниже по сравнению со средней массой тела животных, которые получили один ДКС. Такое снижение было достоверно ниже и продолжительнее по сравнению со средней массой тела животных в других группах. Достоверное снижение средней массы животных и увеличение длительности этого эффекта указывают на то, что предварительное введение МТ приводило к увеличению токсичности ДКС. Однако если интервал введения между МТ и ДКС увеличить до 4 часов, то достоверные различия в средней массе

тела животных, получивших один ДКС, получивших ДКС спустя 4 часа после МТ нивелируются.

В настоящем исследовании приведены данные по влиянию МТ на биологическое действие противоопухолевых препаратов. Под биологическим действием в данном случае понимают как противоопухолевое, так и токсическое действие. Противоопухолевое действие препаратов и их комбинаций оценивали по их влиянию на динамику роста экспериментальных опухолевых моделей – меланомы В16 и карцинома яичников СаО-1. Из приведенных выше данных видно, что 5-ФУ способен влиять только на рост карциномы яичников СаО-1. Использование модификатора МТ оказывало неоднозначное действие на противоопухолевую эффективность 5-ФУ. Если модификатор был введен за 2 часа до введения противоопухолевого препарата, то он увеличивал противоопухолевое действие 5-ФУ на рост карциномы СаО-1. Увеличение интервала до 12 часов не изменяло противоопухолевое действие 5-ФУ на рост карциномы СаО-1. Влияние модификатора на противоопухолевое действие 5-ФУ может быть связано с его действием на фармакокинетику 5-ФУ или с его действием на опухолевые клетки. Последний вариант модифицирующего действия является более интересным, так как позволяет ожидать, что данная комбинация будет способна преодолевать устойчивость опухоли к антиметаболиту. Однако комбинация 5-ФУ и МТ не преодолевала устойчивость меланомы В16 к 5-ФУ.

В специальной серии экспериментов изучено влияние МТ на противоопухолевое действие ДКС. МТ увеличивал противоопухолевое действие ДКС на карциному яичников СаО-1 и меланому В16 только в том случае, если он был введен за 20 мин – 1 час до цитостатика. Введение МТ за 12 часов до введения ДКС не изменяло противоопухолевое действие последнего на рост перевиваемых штаммов опухолей.

Было изучено влияние модификатора на токсичность цитостатиков. Важно отметить, что в этой серии экспериментов был изменен временной интервал между введением МТ и противоопухолевыми препаратами с 12 до 4 часов. Это

изменение было связано с необходимостью выявить минимальный временной интервал, при котором МТ влиял на фармакокинетику противоопухолевых препаратов. Из данных, полученных в этой серии экспериментов, следует, что такой временной интервал одинаков для ДКС и 5-ФУ и составляет не менее 4 часов. В противном случае токсичность препаратов возрастает не менее чем 1,5-2 раза. В результате такого усиления токсичности наблюдается даже увеличение гибели животных. Таким образом, полученные данные подтверждают и позволяют практически обосновать клинические результаты гибели больных на фоне данной комбинации.

В клинической практике временной интервал между приемом МТ и введением цитостатиков должен составлять не менее 30 часов, так как период полуэлиминации МТ у человека составляет в среднем 10 часов. Данная цифра получена из сопоставления периодов полуэлиминации препаратов в организме животных и человека. У грызунов он значительно короче, менее 1 часа, тогда как в организме людей период полуэлиминации составляет около 10 часов (102, 103). Поэтому должно пройти не менее 3 периодов полуэлиминации, чтобы концентрация препаратов в сыворотке крови снизилась до безопасного уровня. Вторая возможность избежать усиления токсичности противоопухолевых препаратов – это местное использование МТ при системном их использовании.

3.4 Влияние МТ на цитотоксичность ДКС и 5-ФУ по отношению к клеткам карциномы яичников СаО-1 и меланомы В16 *in vitro*

Ранее нами было показано, что МТ увеличивает противоопухолевую активность 5-ФУ *in vivo*. Это увеличение выражалось в усилении торможения роста опухоли у мышей с карциномой яичников СаО-1. В то же МТ время не преодолевал исходной резистентности перевиваемой меланомы В16 к 5-ФУ. Обнаруженное увеличение противоопухолевой активности препарата можно объяснить как изменением фармакокинетики препарата в организме животных, так и непосредственным воздействием МТ на опухолевые клетки. Поэтому целью

настоящего раздела было изучения цитотоксического действия 5-ФУ на клетки меланомы В16 в системе *in vitro* в монорежиме и на фоне модификатора.

5-ФУ добавляли в среду инкубации в концентрациях, в различных концентрациях МТ препарат вносили в среду инкубации в концентрации 150 мкг/мл. Исходя из данных литературы, это максимальная концентрация препарата, которая наблюдается в биологических жидкостях организма при стандартных методах лечения. Клетки меланомы В16 были получены из опухолевого узла перевиваемого штамма. Дальнейшая инкубация клеток осуществлялась в среде RPMI 1640 с 10 % (v/v) эмбриональная телячьей сывороткой, 10 Ед/мл пенициллина, и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°С, и 5%-ый CO₂. Чтобы убедиться в том, что опухолевые клетки не потеряли свои злокачественные свойства, клетки вводили мышам и убеждались в том, что у животного развивалась опухоль на месте введения суспензии. Клетки инкубировали в CO₂ – инкубаторе в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки.

На рисунке 11 показана цитологическая картина нативной культура клеток СаО-1. Как видно из рисунка, карцинома формирует адгезивную культуру клеток. Добавление в среду инкубации клеток МТ в концентрации 150 мкг/мл не влияло на плотность клеточной популяции и адгезию клеток к пластику (Рисунок 12). Внесение в среду инкубации 5-ФУ в концентрации 10 мкг/мл при визуальной оценке уменьшало плотность клеточной популяции (Рисунок 13). При добавлении в среду инкубации 5-ФУ в концентрации 10 мкг/мл совместно с МТ плотность клеточной популяции также уменьшалась (Рисунок 14).

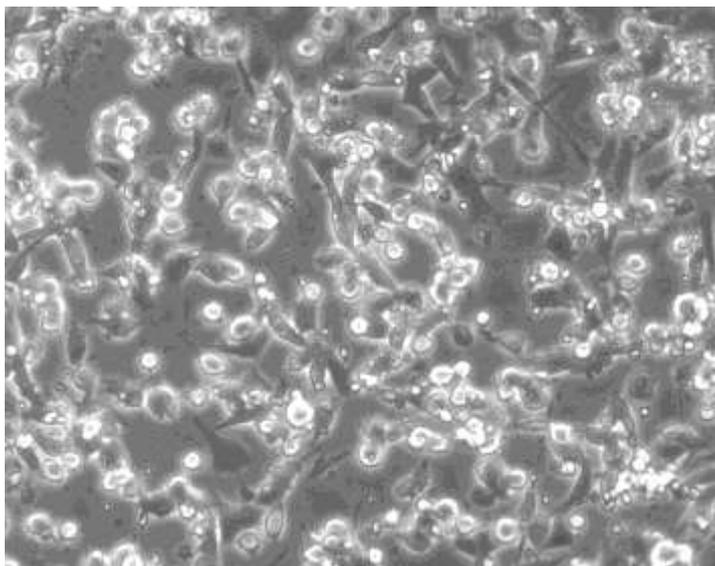


Рисунок 11 – Клетки карциномы СаО-1 при росте в системе *in vitro*. Контроль. 900-кратное увеличение.

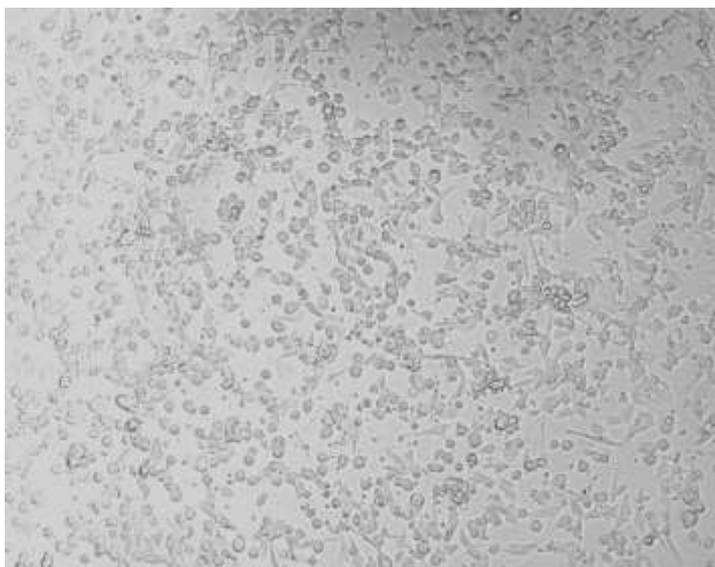


Рисунок 12 – Клетки карциномы СаО-1 при росте в системе *in vitro* в присутствии 150 мкг/мл МТ. 200-кратное увеличение.

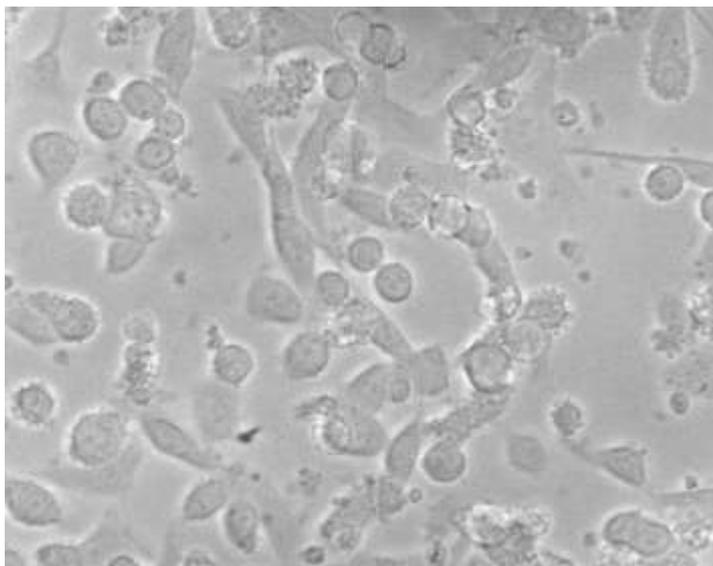


Рисунок 13 – Клетки карциномы СаО-1 при росте в системе *in vitro* в присутствии 10 мкг/мл 5-ФУ. 900-кратное увеличение.

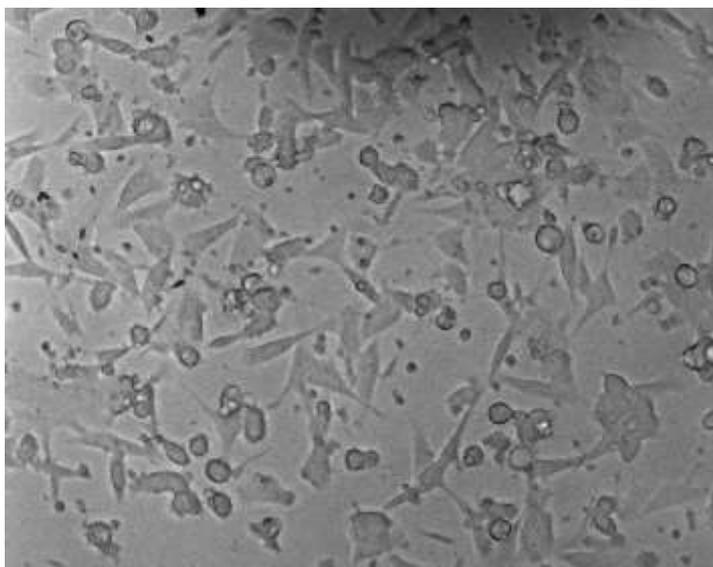


Рисунок 14 – Клетки карциномы СаО-1 при росте в системе *in vitro* в присутствии 10 мкг/мл 5-ФУ и 150 мкг/мл МТ. 400-кратное увеличение.

Для количественной оценки числа выживших клеток был использован МТТ-тест. На рисунке 16 представлены результаты по влиянию МТ на цитотоксическое действие 5-ФУ на клетки карциномы яичников СаО-1. Как видно из рисунка, 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 антиметаболитом 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 антиметаболитом 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 ($p > 0,05$).

При концентрации 5-ФУ 10 мкг/мл процент выживших клеток СаО-1 после 24 часов инкубации с антиметаболитом составил 40 ± 18 , а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в концентрации 150 мкг/мл процент выживших клеток СаО-1 был равен 55 ± 19 ($p > 0,05$).

При концентрации 5-ФУ 15 мкг/мл процент выживших клеток СаО-1 после 24 часов инкубации с антиметаболитом составил 21 ± 11 , а при добавлении в среду инкубации еще и МТ в концентрации 150 мкг/мл процент выживших клеток СаО-1 был равен 11 ± 9 ($p > 0,05$).

Концентрация IC_{50} для 5-ФУ на клетках карциномы яичников СаО-1 составила 9 ± 1 мкг/мл в случае их инкубации с одним антиметаболитом в течение 24 часов и $8,4 \pm 1,0$ мкг/мл в случае, если к среде инкубации добавили еще и 150 мкг/мл МТ.

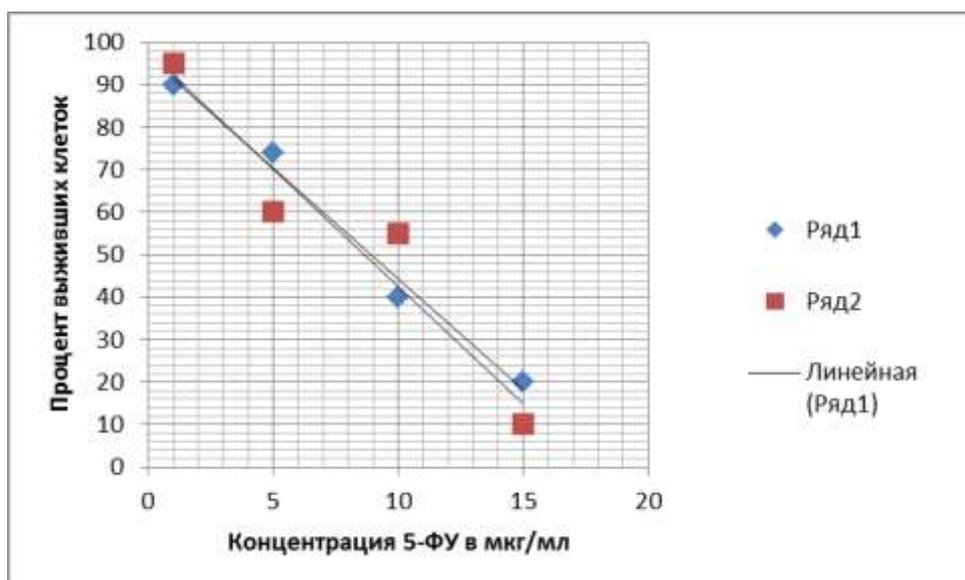


Рисунок 15 – Влияние МТ на токсическое действие 5-ФУ на клетки СаО-1 в системе *in vitro*. МТ содержится в среде инкубации в концентрации 150 мкг/мл. Клетки инкубировали с препаратами 24 часа. Каждая точка на графике – это среднее от 4 измерений. Цитотоксичность препаратов измеряли МТТ-тестом. Ряд 1-Клетки 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.

На рисунке 16 показана культура клеток меланомы В16. Как видно из рисунка, в отличие от карциномы, которая формирует культуру клеток, хорошо прилипшую к пластику, клетки меланомы формировали объемные конгломераты по типу виноградных гроздей. Добавление в среду инкубации клеток МТ в концентрации 150 мкг/мл не влияло на плотность клеточной популяции и на формирование объемных образований (Рисунок 17). Добавление в среду инкубации 5-ФУ в концентрации 10 мкг/мл не уменьшало плотность клеточной популяции (Рисунок 18). При добавлении в среду инкубации 5-ФУ в концентрации 10 мкг/мл совместно с МТ отмечалось незначительное уменьшение плотности клеточной популяции (Рисунок 19).

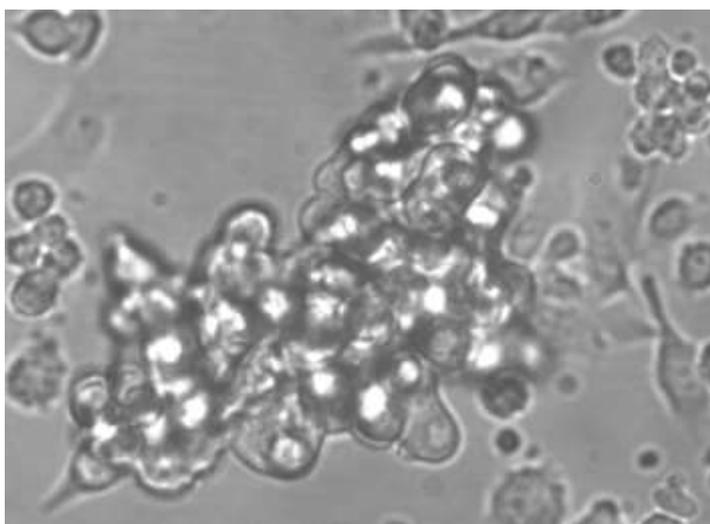


Рисунок 16 – Клетки меланомы В16 при росте в системе *in vitro*. Контроль. 900-кратное увеличение.

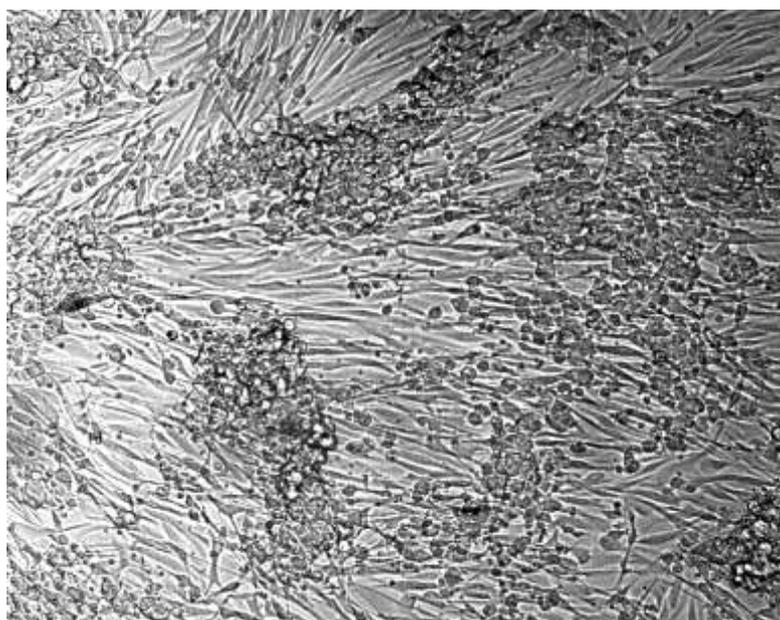


Рисунок 17 – Клетки меланомы В16 при росте в системе *in vitro* в присутствии 150 мкг/мл МТ. Контроль. 400-кратное увеличение.

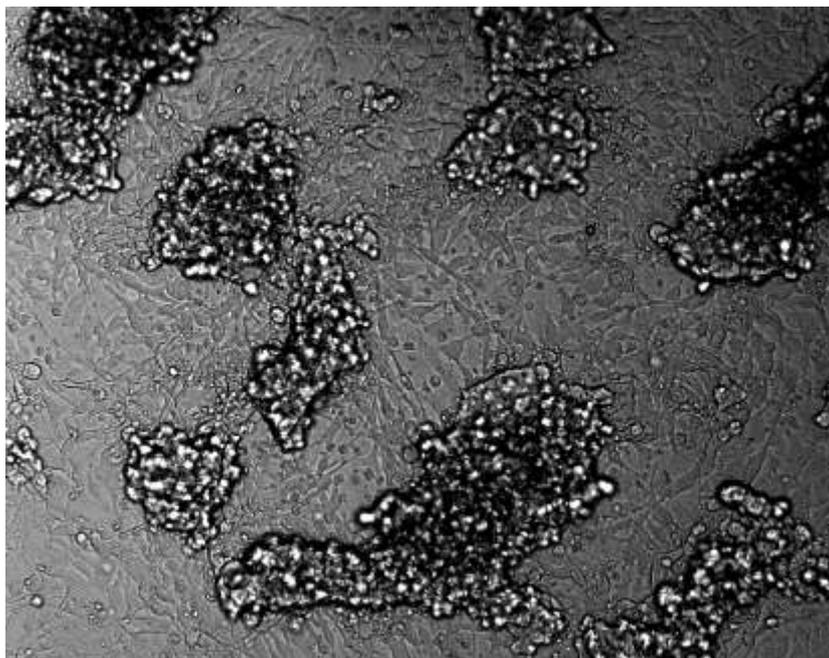


Рисунок 18 – Клетки меланомы В16 при росте в системе *in vitro* в присутствии 10 мкг/мл 5-ФУ. 400-кратное увеличение.

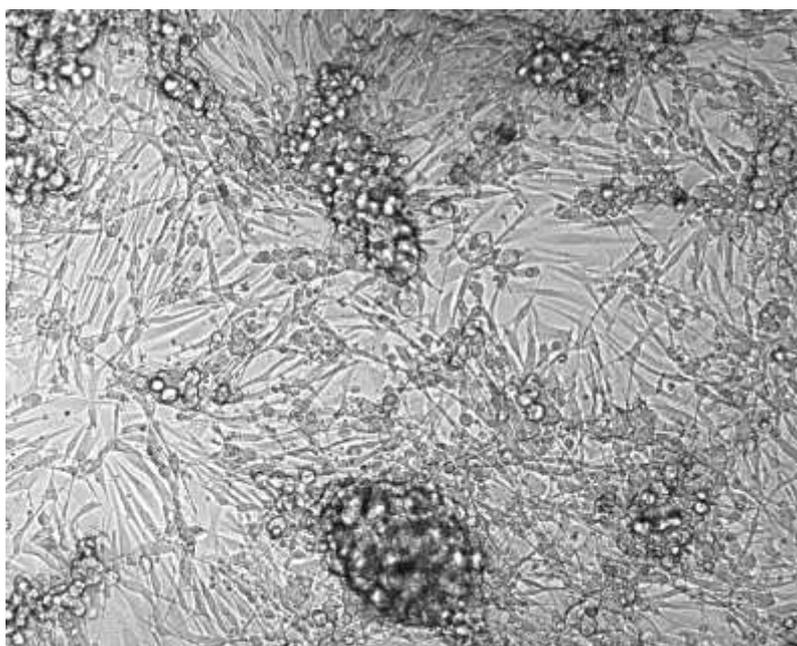


Рисунок 19 – Клетки меланомы В16 при росте в системе *in vitro* в присутствии 10 мкг/мл 5-ФУ и 150 мкг/мл МТ 24 часа инкубации. Видно образование по типу виноградной грозди. Контроль. 400-кратное увеличение.

Для количественной оценки числа выживших клеток был использован МТТ-тест. На рисунке 20 представлены результаты по влиянию МТ на

цитотоксическое действие 5-ФУ на клетки меланомы В16. Как видно из рисунка, добавление МТ в среду инкубации клеток меланомы В16 существенно не изменяет токсичность 5-ФУ по сравнению с токсическим действием одного антиметаболита.

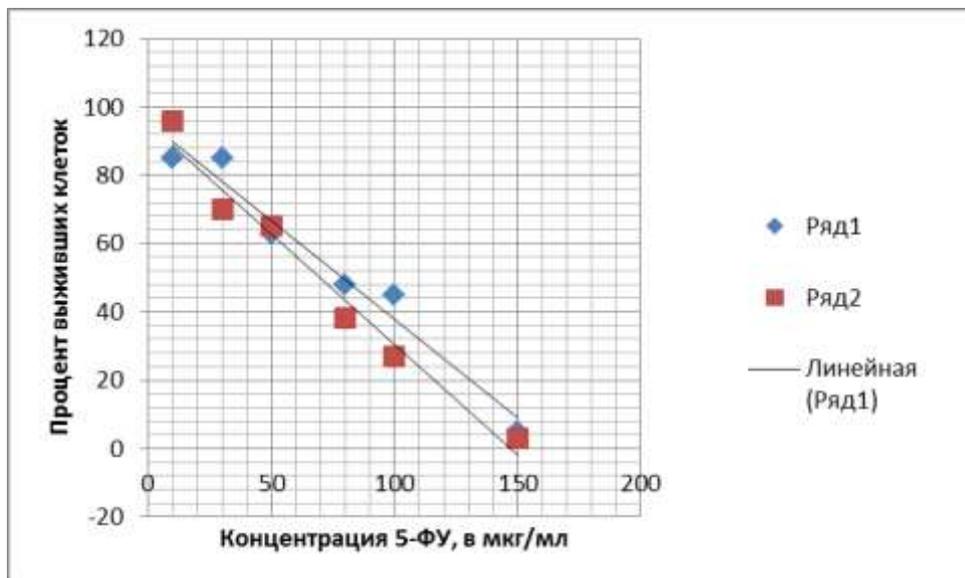


Рисунок 20 – Влияние МТ на токсическое действие 5-ФУ на клетки меланомы В16 в системе *in vitro*. МТ содержится в среде инкубации в концентрации 150 мкг/мл. Клетки инкубировали с препаратами 24 часа. Каждая точка на графике – это среднее от 4 измерений. Цитотоксичность препаратов измеряли МТТ-тестом. Ряд 1-Клетки меланомы В16 инкубировали 24 часа в присутствии соответствующих концентраций 5-ФУ. Ряд 2-Клетки меланомы В16 инкубировали 24 часа в присутствии соответствующих концентраций 5-ФУ и 10 мкг/мл МТ.

Так, при концентрации 5-ФУ 10 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 после 24 часов инкубации с антиметаболитом 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 концентрации 150 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 концентрации 150 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 концентрации 150 мкг/мл процент выживших клеток меланомы В16 был равен 3 ± 1 ($p > 0,05$).

Концентрация IC_{50} 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.

Как видно, из полученных в системе *in vitro* данных, МТ не изменял столь сильно токсичность противоопухолевого антиметаболита. В то же время в исследованиях на животных МТ увеличивал токсичность 5-ФУ почти в 2 раза. Такое расхождение в модифицирующем действии МТ в системе *in vivo* и *in vitro* можно объяснить влиянием МТ на скорость метаболизма 5-ФУ в организме мышей. Из данных литературы известно, что МТ увеличивает противоопухолевое действие препаратов у онкологических больных. Это увеличение сопровождается повышением выраженности побочных эффектов. В то же время очевидно, что существует реальная необходимость одновременного

использования нескольких лекарственных препаратов одновременно. Например, МТ используется после хирургических вмешательств в онкологии, для предотвращения развития инфекционных осложнений (108). В этой связи интересен опыт работ группы авторов, которые изучали опыт применения 5-ФУ местно, в виде крема (107). Эта работа интересна еще тем, что они использовали практически идентичную модель перевиваемых опухолей подштамм меланомы В16 F-10. Данный подштамм опухоли также был относительно устойчив к антиметаболиту. IC_{50} составило для клеток меланомы В16 F-10 около 70 мкг/мл. Местное использование 5% мази с 5-ФУ, в состав которой входят микроиглы, позволяет получать терапевтический эффект. Факт низкой эффективности воздействия 5-ФУ на меланому В16 также описан другой группой авторов [78, 105]. Полученные нами результаты согласуются с этими данными. На перевиваемых опухолях эффективность 5-ФУ хорошо коррелирует с IC_{50} препаратов системе *in vitro*.

3.5 Оценка фармакокинетики МТ при ректальном введении

В предыдущих главах было показано, что МТ увеличивал токсичность ДКС и 5-ФУ у мышей при одновременном введении препаратов или в тех случаях, когда интервал между введениями препаратов был незначительным. Крайне важен тот факт, что данное увеличение токсичности препаратов не сопровождалось существенным увеличением их лечебного действия. То есть при сочетанном применении МТ и химиопрепаратов можно говорить, главным образом, об увеличении токсичности данной комбинации. Тот факт, что комбинация МТ и химиопрепаратов не обладает большей цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам в системе *in vitro* позволяет предположить, что увеличение токсических свойств и некоторое повышение противоопухолевой активности комбинации обусловлено влиянием МТ на фармакокинетику цитостатиков. Поэтому на основании полученных результатов можно сделать только вывод о нежелательности совместного использования этих препаратов. С другой стороны также неоспоримым является факт необходимости совместного

использования этих препаратов в онкологической практике по клиническим показаниям. Преодолеть данное противоречие возможно только при изменении интервалов и методов введения этих препаратов больному. В обзоре литературы нами приведены данные фармакокинетики МТ при использовании его в качестве противопаразитарного препарата. Из приведенных данных следует, что в онкологии необходимо достигать концентраций МТ в 3-5 раз выше, чем при лечении инфекций. Поэтому для проведения настоящего исследования необходимо было разработать методику применения МТ для повышения эффективности лечения рака прямой кишки.

В 2004 году в отделении проктологии в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. БЛОХИНА» МЗ РФ под руководством доктора медицинских наук, профессора Ю.А. Барсукова и доктора технических наук, профессора Н.Д. Олтаржевской с соавт. (ООО «Колетекс») было разработано новое медицинское изделие, представляющее собой гидрогелевую биополимерную композицию с физически иммобилизованной в ней субстанцией метронидазола для внутриректального подведения его к опухоли. В данном медицинском изделии используется гидрогель на основе биополимера альгината натрия с вязкостью 2,63 Па с добавлением 2% раствора ДМСО и 9% метронидазола. В основу создания биополимерной композиции для направленного подведения метронидазола к опухолевым тканям была положена идея использования гидрогелевой структурированной биополимерной матрицы с инкорпорированным в нее лекарственным препаратом в качестве средства его доставки к очагу поражения.

Механизмы, обеспечивающие пролонгированное поступление метронидазола в опухоль:

- в биополимерной композиции более 90% полимера представлено наночастицами диаметром в пределах 20–250 нм, что наряду с высоким градиентом концентрации метронидазола на границе поверхности опухолевой ткани обеспечивает высокую степень диффузии МЗ в опухоль (заключение ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН от 15.09. 2008 г.);

- пролонгированное поступление МЗ в опухоль происходит за счет набухания и биодеструкции полимерной основы (альгината натрия), в которой как в «депо» введена субстанция лекарства и определяется как свойствами самого полимера, так и первоначальной вязкостью системы;
- клиническое применение МЗ в биополимерной композиции реализуется в соответствии с регистрационным удостоверением ФСР № 2009/05407 от 4.09. 2009.



Рисунок 21 – Полимерная композиция («Колегель®») с метронидазолом разрешена к применению МЗ РФ (Регистрационное удостоверение № 2009/05407).



Рисунок 22 – Биополимерная композиция с Метронидазолом в фольгированном пакете



Рисунок 23 – Биополимерная композиция с Метронидазолом в стерильной тубе

Упакованные стерильные гели «Колегель» хранились при температуре +3 – 5°C и нагревались до температуры 36–37°C непосредственно перед использованием путем помещения упаковки с препаратом в горячую воду.

В день исследования пациентам назначалась очистительная клизма. Затем посредством шприца Жанне и гибкого катетера, проведенного в прямую кишку проксимальнее опухоли, вводился гидрогель с метронидазолом общим объемом 200 мл за 10–12 сек (Рисунки 22 и 23).

Непременным условием успешности процедуры является хорошая континенция у пациента, обеспечивающая удержание биополимерной композиции в прямой кишке и проведение зонда проксимальнее опухоли для обеспечения полноценного контакта с опухолью (Рисунок 24).

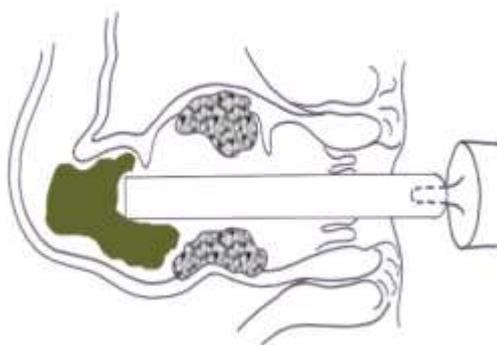


Рисунок 24 – Внутривентральное введение биополимерной композиции с Метронидазолом при помощи шприца Жанне

Экспозиция препарата в прямой кишке составляла 5 часов. Пациент все это время пребывает в горизонтальном положении, периодически переворачиваясь для равномерного контакта радиосенсибилизирующей биоконпозиция с опухолью.

3.6 Отработка метода идентификации МТ в биологических средах

В обзоре литературы были кратко описаны некоторые характеристики МТ. В частности, что препарат стабилен при комнатной температуре, имеет белый цвет со слабым желтоватым оттенком и легким запахом (1). Препарат растворим в воде (до 10 г/л), этаноле, эфире, хлороформе. На первом этапе необходимо было

выбрать способ извлечения МТ из биологических образцов. В настоящее время наиболее широко используются подходы, которые включают в себя их гомогенизацию. Поэтому был выбран общепринятый подход, который включал в себя гомогенизирование образца с последующей экстракцией МТ этанолом. Недостатком такого подхода может быть сопутствующая экстракция из гомогената многих водорастворимых веществ, в том числе белков и пептидов, спектры поглощения которых будут перекрываться со спектрами поглощения МТ. В качестве биологического образца была взята сыворотка крови (0,5 мл) мыши. В данном случае, по этическим соображениям было высказано пожелание о проведении подготовительных исследований с использованием биологического материала экспериментальных животных, получивших МТ. К образцу добавили 1 мл физиологического раствора и провели его гомогенизацию в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. К гомогенату добавили 4 мл этанола, тщательно перемешали с помощью гомогенизатора. Выпавший осадок отделили от супернатанта центрифугированием при 20 000 g в течение 20 мин. В супернатанте определили наличие экстрагированных белков методом Бредфорда. Установили, что в супернатанте содержание белков превышает 1 мг/мл. В связи с тем, что гомогенизацию образца проводили в присутствии МТ, существовала вероятность того, что данные белки перешли в раствор благодаря образованию комплекса с МТ. Поэтому был проведен электрофорез с последующей идентификацией белков методом МАЛДИ масс-спектрометрии.

На рисунке 25 приведена электрофореграмма супернатанта этанолового экстракта сыворотки мыши, в которую был добавлен МТ с финальной концентрацией 200 мкг/мл. Видно, что электрофореграмма содержит несколько белковых полос. Интенсивная белковая полоса, которая соответствует белкам с молекулярным весом более 170 кДа содержит агрегированные белки, которые в условиях эксперимента разделить нельзя. Отмечается двойная интенсивная полоса, которая соответствует белкам в диапазоне молекулярных масс от 55 до 70 кДа. Кроме этой мажорной полосы, отмечаются также менее интенсивные полосы в диапазоне от 40 до 55 кДа.

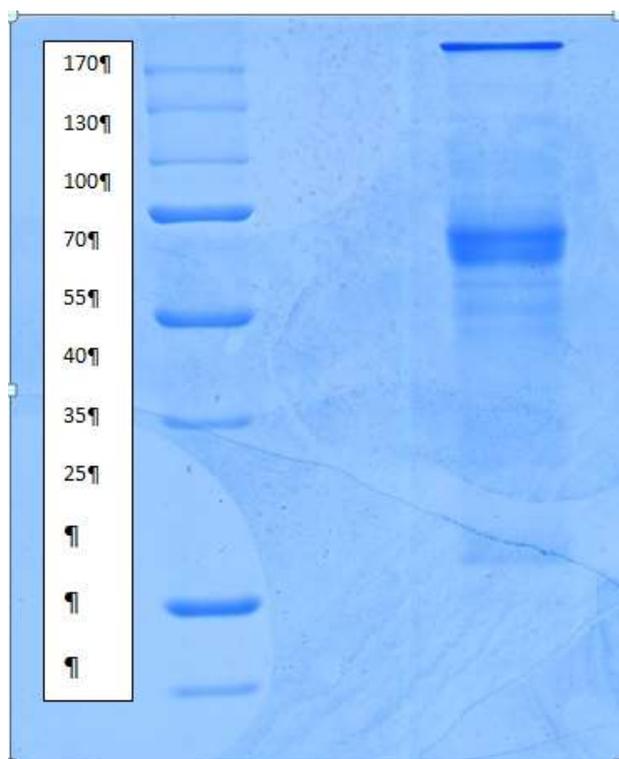


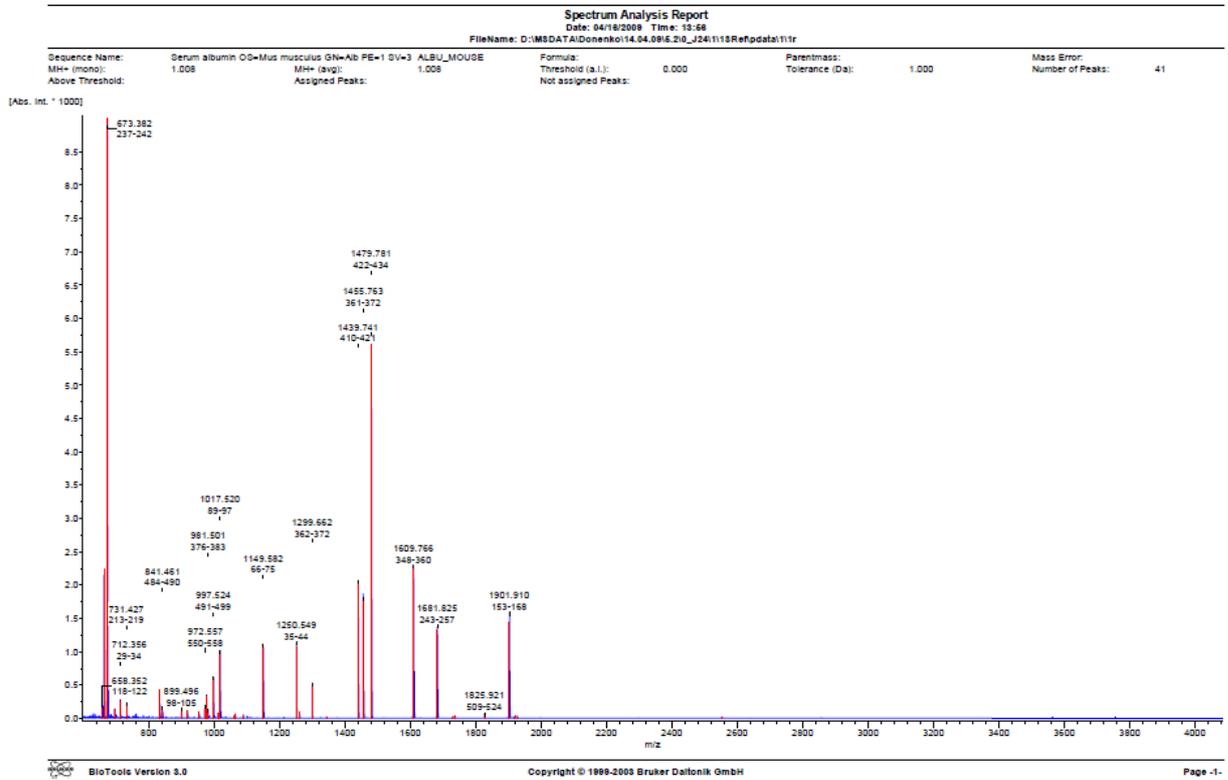
Рисунок 25 – Электрофорез супернатанта этанолового экстракта сыворотки (чего) мыши с добавлением МТ. Слева приведены маркеры масс в кДа. Справа приведены белковые полосы, которые были экстрагированы из биологического образца.

Все эти визуально определяемые полосы были вырезаны из геля для проведения анализа. В результате МАЛДИ анализа достоверно были определены всего два белка.

Первый белок – это сывороточный альбумин. Его молекулярный вес составляет MW:68647.710 Да. Доля сигнала альбумина в исследуемой полосе составила 84,2%. Процент покрытия гена Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3 ALBU_MOUSE составил 31,4% (рис.23). Такой невысокий процент сигнала альбумина в исследуемой полосе указывает на то, что в данной полосе может присутствовать примесь других белков около 16% по доле сигнала.

Второй белок – это аполипопротеин А-1. Его молекулярный вес составляет MW:30568.650 Да. Доля сигнала аполипопротеина в исследуемой полосе составила 1,9%. Процент покрытия гена ApolipoproteinA-IOS=MusmusculusGN=Apoa1 PE=1 SV=1 APOA1_MOUSE составил 38,6%

(Рисунок 24). Доля сигнала аполипопротеина А-1 в полосе всего около 2%. Следовательно, примесь других белков составляет 98%. Идентификация белков в этой примеси представляла собой серьезную проблему и выходила за рамки поставленной задачи.



Spectrum Analysis Report
Date: 04/18/2008 Time: 13:56
FileName: D:\MSDATA\Donenko\14.04.08\6.210_224\1119Ref\data\11r

Sequence data:
Serum albumin GN=Mus musculus GN=Ab PE=1 DV=3 ALBU_MOUSE
Intensity Coverage: 84.2 % (27825 cnts) Sequence Coverage MD: 31.4%
Sequence Coverage MS/MS: 0.0% pI (isoelectric point): 5.7

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
MKVVTFLLLL	FWSGSAPFSRG	VFRREAHKSR	IARFVVDLGE	QHFEGVLVIA	FSQVLQRCSY	DEBAKIQQEV	TDPAHTCVAD	ESANWCQSL	HTLFGDLCA	IPNLRENYGE	LADCCTRQEP	ERKECPLOQR	DNFSLPPFE
150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280
RPEEAANTS	FRENPTTFNG	HYLHEVARRH	PFFYAPPELLY	TAEQYNEILT	QQCEADKHES	CLTPKLDGVK	EXALVSSVQC	RMKCSNQKF	GERAFYKAWY	ARLSQTFPNA	DFASITKLAT	DLTRWNKECC	HGDLLECADD
290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420
RAELARYKCE	NQATISSELQ	TCCDRPLLRK	ABCLSEVEHD	TKPADLPAIA	ADFVEDQVVC	KVYAKAKQVF	LGTFLYEYSR	RHPDYSVLL	LPLARKYEAT	LEKCCAEANP	PACYGTVLAE	POPLVEEFPN	LVRTKCDLYE
430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560
KLGEYGFQNA	ILWRYTQKAP	QNSPTLVEA	ARNLGRVGTK	OCTLPEDQRL	PCVEDYLSAI	LDRVCLLHEK	TPVSEGVTKC	CSGSLVERRP	CFSAITVDET	VYKRFKRAET	FTFHSICTL	PKERQIEKQ	TALAEIYKRR
570	580	590	600	610									
PRATAEQKLT	VHDDFAQFLD	TCCRAADKDT	CFSTEGPNLY	TRCKDALA									

Display Parameter:
Sequence Name: Serum albumin GN=Mus musculus GN=Ab PE=1 DV=3 ALBU_MOUSE MH+ (mono): 1.008 MH+ (avg): 1.008 Threshold (a.i.): 0.000
Tolerance (Da): 1.000 Number of Peaks: 41

Рисунок 26 – Результаты идентификации белка альбумина сыворотки крови в полосе электрофореграммы

Следовательно, до проведения экстракции необходимо проводить обезвоживание изучаемого материала.

Поэтому схема экстракции МТ из биологических образцов была изменена. На первом этапе, после того, как все биологические образцы были взвешены, они переносились на подложку из алюминиевой фольги, замораживались и помещались в лиофильную сушку для обезвоживания. Лиофилизацию проводили на лиофильной сушке “Edwards” (USA) под давлением $<10^{-2}$ мбар и температуре – 40°C. Далее образцы промывали петролейным эфиром для удаления липидов. Просушивали при комнатной температуре и растирали в фарфоровой ступке с 5 мл этанола. Суспензию переносили в шприц и фильтровали (Glassfibreprefilter, SartoriusGmbh). Затем образец упаривали под вакуумом, растворяли в 5 мл 9% хлорида натрия и наносили на колонку с обратной фазой LiChroprep RP-18 (16x400), уравновешенную 5% этанолом в воде. Элюирование проводили в градиенте этилового спирта в воде от 5% до 100%. Собирали фракцию, которая соответствовала пику элюции МТ. Концентрацию МТ в пробе определяли методом дифференциальной спектрометрии.

На рисунке 28 представлены спектры поглощения МТ. Как видно из приведенных спектров, МТ имел разные значения длин волн, при которых наблюдалось максимальное поглощение в воде и в этаноле. Для воды максимальное поглощение МТ отмечено при 320 нм, тогда как в этаноле максимальное поглощение МТ - при 312 нм.

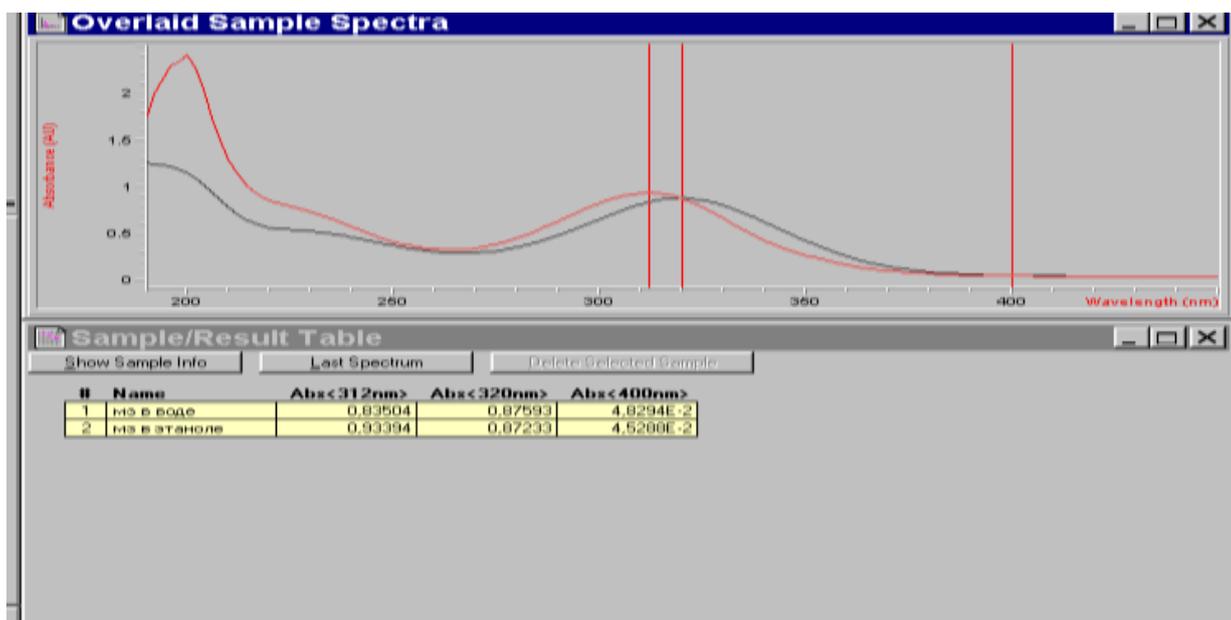


Рисунок 28 – Спектры поглощения МТ в воде и этаноле. Концентрация МТ 0,1 мМ. Коэффициент молярной экстинкции 9300 отн.ед на моль.

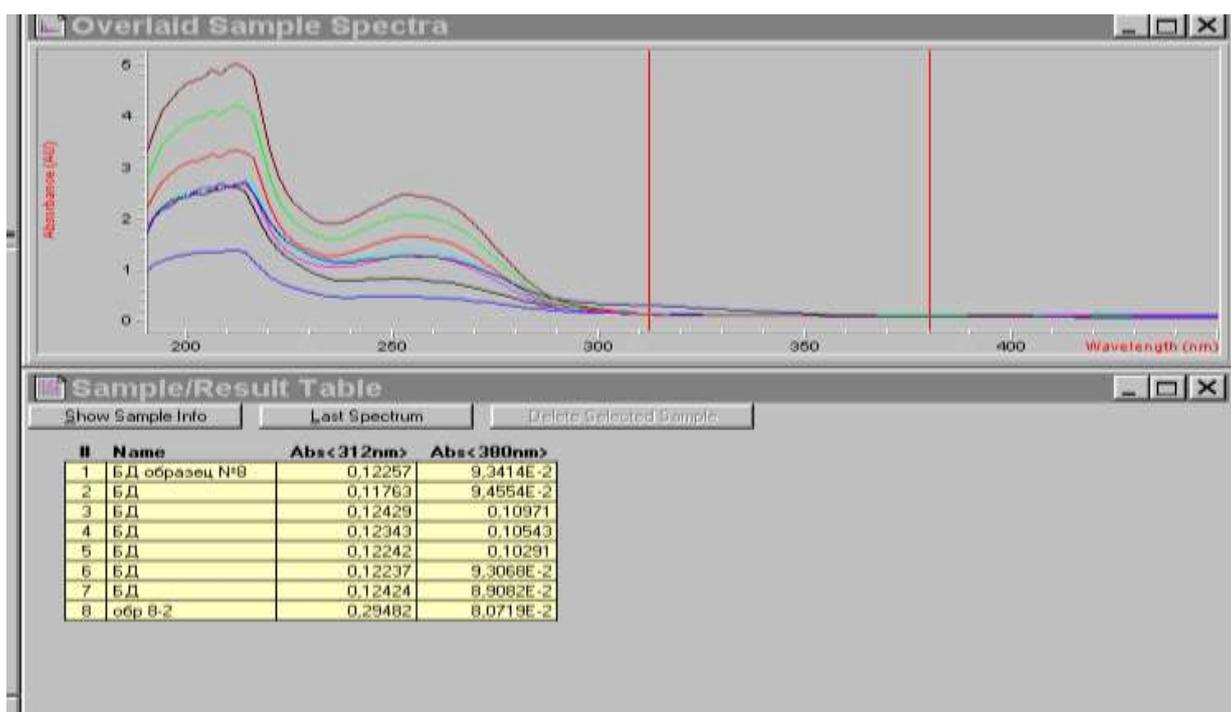


Рисунок 29 – Спектры поглощения образцов, полученных от больных, принимавших МТ.

На рисунке 29 представлены спектры поглощения этаноловых экстрактов биологических образцов, которые были получены от больных, получавших по

медицинским показаниям МТ. Как видно из приведенных спектров, удалось очистить область поглощения МТ от примесей, область поглощения которых которые перекрывается с областью поглощения МТ. Примеси поглощают в области гораздо более короткого ультрафиолета с максимумами 214 нм и 260 нм.

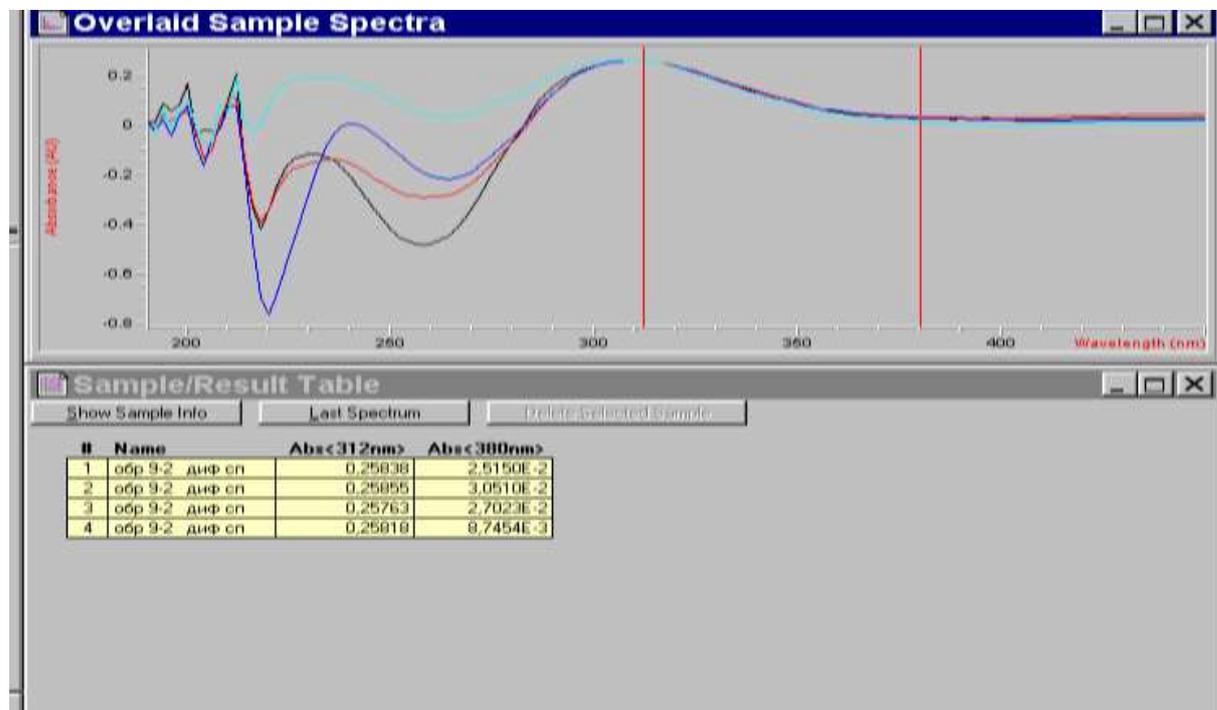


Рисунок 30 – Примеры дифференциальных спектров поглощения биологических образцов, содержащих МТ, и контрольных образцов без МТ.

Как видно из дифференциальных спектров, приведенных на рисунке 30, разнообразные не идентифицированные примеси давали сильный разброс в спектрах поглощения, который мог достигать 1 отн. ед. оптической плотности в пределах длин волн от 200 до 290 нм. При длинах волн свыше 290 нм все дифференциальные спектры совпадали. Это совпадение дифференциальных спектров при длинах волн свыше 290 нм делает возможным спектрофотометрическое определение МТ по максимуму его поглощения при 312 нм и с использованием опорной длины волны 380 нм.

Учитывая данные спектров, была выведена формула для вычисления концентрации МТ в образцах

$$C = 18.4xDx(5+A)/A$$

где C – 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, A – объем пробы в мл для биологических жидкостей (стандарт – 0,1 мл) или в г для ткани (стандарт – 0,1 г).

Для того чтобы оценить ошибку метода были приготовлены 18 образцов с известным содержанием МТ. Эти образцы можно было разделить на 6 групп по 3 образца в каждой группе. Все эти образцы были обработаны по разработанной методике. Произведены соответствующие измерения для того, чтобы определить коэффициент вариации. Известно, что мерой, характеризующей точность метода, является коэффициент вариации:

$$V_x = \frac{S_x}{X} \times 100\%, \text{ где}$$

- S_x – среднеквадратическая ошибка (среднеквадратичное отклонение), величину которой чаще всего используют для оценки величины случайной ошибки измерения;
- X – среднее значение измеряемой величины.

$$S_x = \sqrt{\frac{(X - x_1)^2 + \dots + (X - x_n)^2}{n - 1}}$$

Полученная величина коэффициента вариации составляет 29%.

На основании приведенных выше исследований была использована следующая схема пробоподготовки:

1. Образец в операционной маркировался и помещался в контейнер.
2. Образец доставали из контейнера в лаборатории и отмывали от внешних загрязнений в бакпечатках с физиологическим раствором.
3. Образец просушивали на фильтровальной бумаге, и от него отрезали кусочек для дальнейшего определения МТ.
4. Образец взвешивали на алюминиевой фольге (тара).
5. Маркировали алюминиевую фольгу в соответствии с маркировкой образца.

6. Алюминиевую фольгу с навеской переносили в лиофильную сушку.
7. Высушенный образец растирали в фарфоровой ступке с 5 мл петролейного эфира. Затем петролейный эфир аккуратно удаляли.
8. Процедуру повторяли дважды.
9. Образец в ступке просушивали и заливали 5 мл этанола.
10. Образец растирали в фарфоровой ступке с этанолом.
11. Этанольный экстракт фильтровали на фильтре (Glassfibrefilter, SartoriusGmbh).
12. Этанольный экстракт количественно переносили в круглодонную колбу.
13. Этанольный экстракт упаривали под вакуумом.
14. Круглодонную колбу трижды промывали 9% хлоридом натрия с общим объемом промывки 10 мл.
15. Раствор промывки наносили на колонку с обратной фазой LiChroprep RP-18 (16x400).
16. Элюировали с колонки фракцию, содержащую МТ.
17. Проводили спектрофотометрию образца, содержащего МТ.
18. Проводили расчет содержания МТ в образце.
19. Проводили регистрацию измерений.

3.7 Определение концентрации МТ в образцах опухоли больных раком толстой кишки

Известно, что МТ проявляет радиосенсибилизирующее действие только в том случае, если его концентрация в опухоли находится в пределах 150 - 200 мкг/г ткани. Поэтому на первом этапе необходимо было определить необходимую минимальную дозу препарата, которую должен получить больной при внутриректальном введении МТ, чтобы его концентрация в опухоли находилась в указанных выше пределах. Определение минимальной дозы препарата в данном

случае является принципиальной, так как это уменьшает риск проявления побочных эффектов МТ.

На рисунке 31 приведено схематическое изображение опухолевого поражения при раке прямой кишки, которое наглядно демонстрирует, какие участки образцов были взяты на исследование.

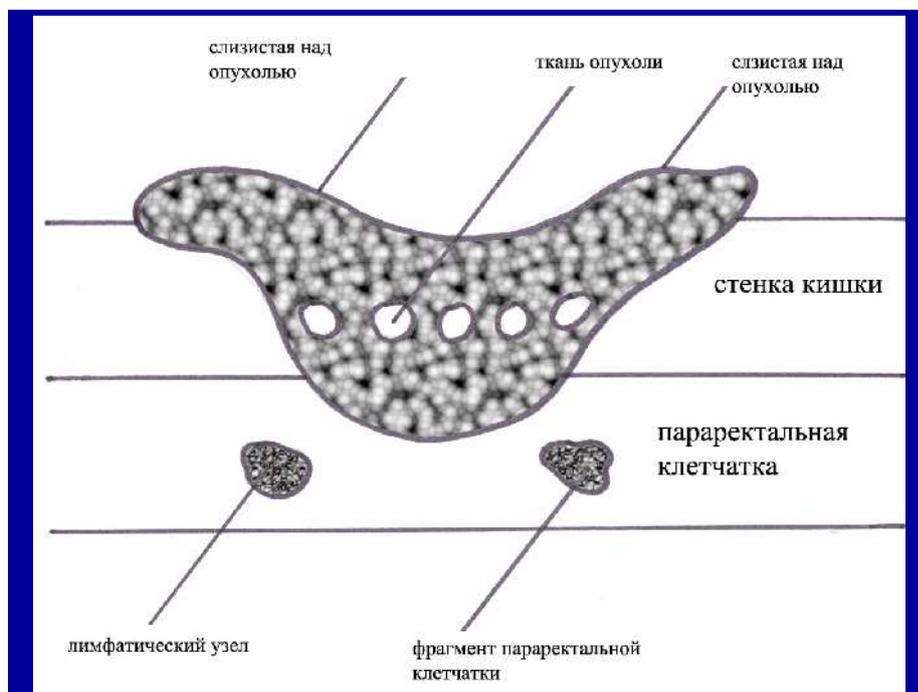


Рисунок 31 – Схематическое изображение расположение опухоли при раке прямой кишки.

Для определения минимальной дозы МТ, необходимой для достижения радиосенсибилизирующего действия, были взяты 7 пациентов, которые получили МТ в аппликационной форме в дозах 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80г/м² поверхности тела. Время экспозиции МТ при внутриванальной аппликации составило до 6 часов. В таблице 6 приведены данные по содержанию МТ в ткани опухоли при указанных дозах МТ.

Таблица 6 – Влияние дозы МТ и времени экспозиции аппликации на содержание препарата в опухоли.

Доза МТ*	Содержание МТ**					
	1 час	2 часа	3 часа	4 часа	5 часов	6 часов
80	102	250	1510	1505	1520	1500
60	101	244	1500	1510	1510	1500
40	100	240	1503	1501	1501	1501
20	103	245	502	510	506	503
10	76	98	225	219	170	190
8	70	80	210	136	127	101
6	82	78	205	90	82	80

* в г на м² площади тела.

** в мкг/г опухолевой ткани

Как следует из данных таблицы 6, отмечается общая закономерность в динамике изменения концентрации МТ в опухоли. В течение 2 часов после начала аппликации содержание МТ возрастает и достигает максимума к 3 часу экспозиции препарата. Причем значения максимума концентрации препарата для всех изученных доз превышает 200 мкг на г ткани, что является достаточным для достижения радиосенсибилизирующего эффекта. Однако, в последующие часы наблюдения при дозе препарата 8 и 6 г/м² площади тела концентрация препарата опускается ниже 150 мкг на г ткани. Следовательно, эти дозы препарата являются недостаточными для их использования в радиотерапии. Дозы МТ выше 10 г/м² площади тела после 3 часов экспозиции дают концентрации препарата, которые достаточны для достижения радиосенсибилизирующего эффекта. Следовательно, минимальная доза МТ, которую можно использовать в разрабатываемом методе лечения составляет 10 г/м² площади тела.

В последующих исследованиях распределение МТ в тканях, биологических жидкостях пациентов было изучено более подробно. Методом спектрофотометрии было исследовано 165 образцов удаленных тканей опухолей

прямой кишки при различной концентрации и времени экспозиции радиосенсибилизирующей смеси в прямой кишке.

Эффективность выбранной дозы и способа применения МТ была оценена по развитию токсичности и нейротоксичности после применения препарата. Данная схема была использована при лечении 66 пациентов. Из них 11 (16,7%) получили препарат однократно. В этой группе признаков нейротоксичности МТ не было зафиксировано вообще. 55 пациентов получили МТ двукратно. У 5 из них (9,1%) были зафиксированы минимальные признаки проявления общей токсичности – тошнота и рвота.

Изучение фармакокинетики МТ создало базу для включения биополимерной композиции в схему комплексного лечения рака прямой кишки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 в контроле и на фоне воздействия препаратами 5-ФУ и МТ. Введение МТ внутривенно 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 внутривенное 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. Такое увеличение противоопухолевой активности 5-ФУ вызывало определенный оптимизм, так как увеличение эффективности лечения онкологических заболеваний – это одна из основных целей современной практической медицины.

Актуальной задачей онкологии является преодоление исходной или индуцированной резистентности опухоли к цитостатику. Поэтому на следующем этапе было изучено влияние 5-ФУ в комбинации с МТ 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 МТ 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 внутривенное введение МТ и через 20 минут подкожное введение ДКС приводило к усилению противоопухолевого эффекта цитостатика на меланому В16. 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 МТ из сыворотки крови человека и мыши (а это более 12 часов и менее 1 часа соответственно), то можно сделать вывод, что усиление терапевтического действия препаратов исчезает, если интервал между их введением превышает три периода полуэлиминации МТ.

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 цитостатика 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 отмечалось 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.

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 антиметаболитом 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 антиметаболитом 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 антиметаболитом 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 IC_{50} 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.

Таким образом, в результате проведенного исследования можно сделать вывод о необходимости соблюдать осторожность при использовании МТ в онкологической практике. Этот препарат не следует использовать совместно 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 метронидазол усиливает противоопухолевое действия доксорубицина и 5-фторурацила при введении через 20 мин. – 1 час у мышей с привитыми опухолями рак яичников CAO-1, увеличение интервала до 4 часов нивелирует эффект синергизма комбинации.

2. Показано, что метронидазол усиливает токсическое действие цитостатиков доксорубицина и 5-фторурацила у мышей при введении 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 доксорубицина 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 СОКРАЩЕНИЙ

БС - бусульфан

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДМСО– диметилсульфоксид

ДКС - доксорубицин

ИМ – иматиниб

КН – куркумин

КБ - карбоплатин

МТС митомицин С

МИ - митотический индекс

МТ - метронидазол

МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид

ЭРБ - эпирубицин

ЭАС – электронно-акцепторные соединения

5-ФУ - 5-фторурацила

ВУU - 1-бетта-D-арабинофуранозил-5-(Е) - (2-бромвинил) урацил

IC50–концентрация, вызывающая гибель 50% клеток *in vitro*

RI - индекс ответа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров, В.Б. Рак прямой кишки / В.Б. Александров. – М.: Медицина, 1977. – 200 с.
2. Александров, Н.Н. Актуальные проблемы онкологии и медицинской радиологии: Сб. науч. работ / Н.Н. Александров, Н.Е. Савченко, Н.Д. Девятков и др.; гл. ред. Н.Н. Александров. – Вып. 10. – Минск: НИИ онкологии и мед. радиологии. – 1981. – С. 76-85.
3. Алиев, Б.А. Перспективные направления дальнейшего повышения эффективности лучевого лечения онкологических больных / Б.А. Алиев // Вестн. АМН СССР. – 1976. – № 3. – С. 41-45.
4. Аль-Муса, А. Изучение патоморфоза рака прямой кишки при комбинированном лечении с применением интенсивного предоперационного облучения с метронидазолом / Абделлатиф Аль-Муса, Л.А. Баран, В.Е. Ищенко // Радиомодификаторы в лучевой терапии опухолей: Тез. докл. всесоюз. конф., Обнинск, 8-10 дек. 1982 г. / Под общ. ред. А. Ф. Цыба, А. Г. Коноплянникова. – Обнинск, 1982. – С. 23-24.
5. Аль-Муса, А. Комбинированное и лучевое лечение больных раком прямой кишки с применением интенсивного облучения и радиосенсибилизатора метронидазола: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.19. / Аль-Муса Абделлатиф Мохаммед Саид. – Киев, 1982. – 24 с.
6. Аманджолов, Б.С. Взаимодействие естественных аутоантител против опухоль-ассоциированного антигена рака яичников человека с клетками рака яичников мышей СаО 1 БЭБМ / Б.С. Аманджолов, Ф.В. Доненко, Ю.С. Лебедин и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т. 127, № 2. – С. 227-229.
7. Байсоголов, Г.Д. Непосредственные результаты лучевого и комбинированного лечения больных со злокачественными опухолями с использованием метронидазола / Г.Д. Байсоголов, Б.А. Бердов, А.Г. Конопляников и др. // Мед. радиология. – 1983. – № 2. – С. 7-12.

8. Баран, Л.А. Комбинированное и лучевое лечение больных раком прямой кишки с применением метронидазола / Л.А. Баран, Абделлатиф Аль-Муса, В.Е. Ищенко // Мед. радиология. – 1984. – № 9. – С. 43-46.
9. Богуш, Т.А. Влияние хлорамфеникола и декстриамицина на токсическое действие канцерогенных углеводов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.00 / Богуш Татьяна Анатольевна. – М, 1972. – 19 с.
10. Винская, Н.П. Цитотоксическое действие метронидазола при его сочетании с кратковременной гипергликемией и облучением / Н.П. Винская, Е.А. Волошина // Тез. докл. XI Всесоюзн. съезда рентгенологов и радиологов. – М., Обнинск, 1984. – С. 24.
11. Голдобенко, Г.В. Лучевое лечение местнораспространенного рака прямой кишки с использованием радиосенсибилизатора – метронидазола / Г.В. Голдобенко, В.И. Кныш, А.П. Кондратьева и др. // Радиомодификаторы в лучевой терапии опухолей. – Обнинск, 1982. – С. 27-28.
12. Григорьев, А.Н. Распределение и радиосенсибилизирующая эффективность метронидазола в тканях животных и человека: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.01 / Григорьев Александр Николаевич. – Обнинск, 1986. – 16 с.
13. Дарьялова, С.Л. Метронидазол при лучевом лечении злокачественных новообразований / С.Л. Дарьялова, П.Ю. Поляков, Е.С. Киселева и др. // Мед. радиология. – 1986. – № 7. – С. 6-13.
14. Дарьялова, С.Л. Использование метронидазола в качестве радиосенсибилизатора при лучевом лечении больных со злокачественными новообразованиями и определение его концентрации в сыворотке крови и тканях: Метод. рекомендации / С.Л. Дарьялова. – М., 1989. – 13 с.
15. Есельбаева, Г.О. Радиосенсибилизация опухолей при помощи некоторых электрон акцепторных соединений / Г.О. Есельбаева, Р.П. Колосова // Тез. докл. X Всесоюзного съезда рентгенологов и радиологов. – М., 1977. – С. 61.
16. Зайчук, А.И. Лечение местно-распространенного рака прямой кишки / А.И. Зайчук // Клин. хирургия. – 1979. – № 5. – С. 47-50.

17. Зельвин, Б.М. Фармакокинетика и действие на организм метронидазола при использовании его в качестве радиосенсибилизатора / Б.М. Зельвин, П.Ю. Поляков, Е.С. Зимина и др. // Мед. радиология. – 1984. – № 6. – С. 38-44.
18. Зыбина, М.А. Клиническая оценка эффективности комбинированного лечения рака прямой кишки / М.А. Зыбина // Сб. трудов: Диагностика и лечение заболеваний прямой и ободочной кишок. – Куйбышев, 1974. – С. 29-30.
19. Киселева, Е.С. Электроакцепторные соединения как радиосенсибилизаторы гипоксических клеток опухолей человека / Е.С. Киселева, С.Л. Дарьялова // Мед. радиология, 1984. – № 9. – С. 74-82.
20. Кныш, В.И. Клиническое течение, диагностика и современное состояние лечения рака прямой кишки: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.14 / Кныш Василий Иванович. – М., 1979. – 32 с.
21. Пелевина, И.И. Метронидазол, основные экспериментальные результаты, перспективы для клиники / И.И. Пелевина, С.С. Воронина, Р.К. Каракулов и др. // Мед. радиология. – 1984. – № 2. – С. 10-20.
22. Саркисян, Ю.Х. Опыт использования трихопола в комплексной лучевой терапии рака прямой кишки / Ю.Х. Саркисян, А.М. Антонова, С.С. Воронина и др. // Мед. радиология. – 1981. – № 8. – С. 7-11.
23. Ситдикова, С.М. Оценка эффективности иммунотерапии карциномы яичников мышей СаО-1 вакцинами на основе дендритных клеток / С.М. Ситдикова, М.В. Киселевский, В.Ю. Сельчук и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 2. – С.187-190.
24. Федоров, В.Д. Рак прямой кишки / В.Д. Федоров, Г.А. Покровский, Ю.М. Милитарев и др.; под ред. В.Д. Федорова. – М.: Медицина, 1979. – 320 с.
25. Федоров, В.Д. Рак прямой кишки / В.Д. Федоров, Т.С. Одарюк, В.Л. Ривкин и др.; под ред. В.Д. Федорова. – М.: Медицина, 1987. – 320с.
26. Херхелуидзе, З.Ш. Возможности лучевого и лекарственного лечения местнораспространенного неоперабельного рака прямой кишки с применением

радиомодификатйров: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.14 / Херхелуиде З.Ш. – М., 1983. – с.

27. Ярмоненко, С.П., Радиобиология человека и животных: Учебное пособие / С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон; под ред. С. П. Ярмоненко. – М.: Высш. шк., 2004. – 549 с.

28. Abdali, K. Comparison of the Effect of Vaginal Zataria multiflora Cream and Oral Metronidazole Pill on Results of Treatments for Vaginal Infections including Trichomoniasis and Bacterial Vaginosis in Women of Reproductive Age / K. Abdali, L. Jahed, S. Amooee et al. // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – N 11. – P. 683640. doi: 10.1155/2015/683640.

29. Abouel-Nour, M.F. The efficacy of three medicinal plants: garlic, ginger and mirazid and a chemical drug metronidazole against cryptosporidium parvum. i-immunological response / M.F. Abouel-Nour, D.M. EL-Shewehy, S.F Hamada, TA. Morsy // *J. Egypt. Soc. Parasitol.* – 2015. – Vol. 45, N 3. – P. 559-570.

30. Abramovich, R.A. Preclinical investigation and standardization of metronidazole soft dosage forms / R.A. Abramovich, Iu.A. Koshelev, O.A. Vaganova, I.A. Elagina // *Antibiot. Khimioter.* – 2005. – Vol. 50, N 8-9. – P. 27-31.

31. Akron. 2009. The Chemical Database. The Department of Chemistry at the University of Akron. <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd> and search on CAS number.

32. Bardakji, Z. 5-Fluorouracil-metronidazole combination therapy in metastatic colorectal cancer. Clinical, pharmacokinetic and in vitro cytotoxicity studies / Z. Bardakji, J. Jolivet, Y. Langelier et al. // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 1986. – Vol. 8, N 2. – P. 140-144.

33. Barsukov, Y.A. Phase II study of concomitant chemoradiotherapy with local hyperthermia and metronidazole for locally advanced fixed rectal cancer / Y.A. Barsukov, S.S. Gordeyev, S.I. Tkachev et al. // *Colorectal Dis.* – 2013. – Vol. 15, N 9. – P. 1107-1114. doi: 10.1111/codi.12281.

34. Bergogne-Bérézin, E. Clinical role of protein binding of quinolones / E. Bergogne-Bérézin // *Clin. Pharmacokinet.* – 2002. – Vol. 41, N 10. – P. 741-750.

35. Bezerra, J.P. Local levels of biomarkers after surgical and nonsurgical debridement of residual pockets and nonresidual sites in diabetic patients: a 12-month follow-up / J.P. Bezerra, L.M. Shaddox, A.C. de Mendonca et al. // *Gen. Dent.* – 2015. – Vol. 63, N 5. – P. 58-64.
36. Bonda, C. Metronidazole CNS toxicity / C. Bonda, M.S. Evans // *Acta. Neurol. Belg.* – 2015. – Vol. 115, N 4. – P. 709-710. doi: 10.1007/s13760-015-0485-1.
37. Byerley, L.O. Changes in the gut microbial communities following addition of walnuts to the diet / L.O. Byerley, D. Samuelson, E. Blanchard 4th et al. // *J. Nutr. Biochem.* – 2017. – Vol. 48. – P. 94-102. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.07.001.
38. Cação, G. Metronidazole-induced central and peripheral nervous system toxicity / Cação, S. Fontes, M. Salgado et al. // *Neurol. Sci.* – 2015. – Vol. 36, N 9. – P. 1737-1739. doi: 10.1007/s10072-015-2260-8.
39. Cadle, R.M. Vancomycin-induced elevation of liver enzyme levels / R.M. Cadle, M.D. Mansouri, R.O. Darouiche // *Ann. Pharmacother.* – 2006. – Vol. 40, N 6. – P. 1186-1189.
40. Celik, A. The frequency of sister chromatid exchanges in cultured human peripheral blood lymphocyte treated with metronidazole in vitro / A. Celik, N. Aras Ateş // *Drug. Chem. Toxicol.* – 2006. – Vol. 29, N 1. – P. 85-94.
41. Cina, S.J. Sudden death due to metronidazole/ethanol interaction / S.J. Cina, R.A. Russell, S.E. Conradi // *Am. J. Forensic. Med. Pathol.* – 1996. – Vol. 17, N 4. – P. 343-346.
42. Dische, S. Chemical sensitizers for hypoxic cells: a decade of experience in clinical radiotherapy / S. Dische // *Radiother Oncol.* – 1985. – Vol. 3, N 2. – P. 97-115.
43. Elizondo, G. Lymphocyte proliferation kinetics and sister-chromatid exchanges in individuals treated with metronidazole / G. Elizondo, R. Montero, J.E. Herrera et al. // *Mutat Res.* – 1994. – Vol. 305, N 2. – P. 133-137.
44. Furukawa, S. Metronidazole-induced encephalopathy with contrast enhancing lesions on MRI / S. Furukawa, T. Yamamoto, A. Sugiyama et al. // *J. Neurol. Sci.* – 2015. – Vol. 352, N 1-2. – P. 129-131. doi: 10.1016/j.jns.2015.03.039.

45. Garry, V.F. Host-mediated transformation: metronidazole / V.F. Garry, R.L. Nelson // *Mutat. Res.* – 1987. – Vol. 190, N 4. – P. 289-295.
46. Gómez-Arroyo, S. Cytogenetic study of metronidazole and three metronidazole analogues in cultured human lymphocytes with and without metabolic activation / S. Gómez-Arroyo S. Melchor-Castro R. Villalobos-Pietrini et al. // *Toxicol. Vitro.* – 2004. – Vol. 18, N 3. – P. 319-322.
47. Graf Finckenstein, F. Unrelated donor stem cell transplantation in children: low toxicity using a GvHD-prophylaxis regimen with CSA, MTX, metronidazole, iv-immunoglobulin and ATG / F. Graf Finckenstein, T. Zabelina, M. Dürken et al. // *Klin. Padiatr.* – 2002. – Vol. 214, N 4. – P. 206-211.
48. Guo, Z.H. Design, synthesis and molecular docking of salicylic acid derivatives containing metronidazole as a new class of antimicrobial agents / Z.H. Guo, Y. Yin, C. Wang et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 23, N 18. – P. 6148-6156. doi: 10.1016/j.bmc.2015.07.075.
49. Holley, J. Uptake and cytotoxicity of novel nitroimidazole-polyamine conjugates in Ehrlich ascites tumour cells / J. Holley, A. Mather, P. Cullis et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 43, N 4. – P. 763-769.
50. Hrelia, P. Dimethylsulfoxide as modifier of the organospecific mutagenicity of metronidazole in mice / P. Hrelia, M. Scotti, M. Morotti et al. // *Teratog. Carcinog. Mutagen.* – 1990. – Vol. 10, N 3. – P. 263-271.
51. Jin, S. Low-dose penicillin exposure in early life decreases Th17 and the susceptibility to DSS colitis in mice through gut microbiota modification / S. Jin, D. Zhao, C. Cai et al. // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 43662. doi: 10.1038/srep43662.
52. Kasten, M.J. Clindamycin, metronidazole, and chloramphenicol / M.J. Kasten // *Mayo Clin. Proc.* – 1999. – Vol. 74, N 8. – P. 825-833.
53. Keller, P.M. Rational Therapy of *Clostridium difficile* Infections / P.M. Keller, M.H. Weber // *Viszeralmedizin.* – 2014. – Vol. 30, N 5. – P. 304-309. doi: 10.1159/000366302.
54. Kopper, J.J. Metronidazole-but not IL-10 or prednisolone-rescues *Trichuris muris* infected C57BL/6 IL-10 deficient mice from severe disease / J.J. Kopper, J.S.

Patterson, L.S. Mansfield // *Vet. Parasitol.* – 2015. – Vol. 212, N 3-4. – P. 239-252. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.07.038.

55. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.

56. Lakshmi, G.S. Metronidazole encephalopathy / G.S. Lakshmi // *J. Assoc. Physicians. India.* – 2014. – Vol. 62, N 10. – P. 84.

57. Naguib, Y.W. The effect of microneedles on the skin permeability and antitumor activity of topical 5-fluorouracil / Y.W. Naguib, A. Kumar, Z. Cui // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2014. – Vol. 4, N 1. – P. 94-99. doi:10.1016/j.apsb.2013.12.013.

58. Nakayama, H. Intestinal anaerobic bacteria hydrolyse sorivudine, producing the high blood concentration of 5-(E)-(2-bromovinyl)uracil that increases the level and toxicity of 5-fluorouracil / H. Nakayama, T Kinouchi, K Kataoka et al. // *Pharmacogenetics.* – 1997. – Vol. 7, N 1. – P. 35-43.

59. Nilsson, C. The effect of metronidazole on busulfan pharmacokinetics in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation / C. Nilsson, J. Aschan, P. Hentschke et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2003. – Vol. 31, N 6. – P. 429-435.

60. Noorafshan, A. Ameliorative effects of curcumin on the structural parameters of seminiferous tubules and Leydig cells in metronidazole-treated mice: a stereological approach / A. Noorafshan, S. Karbalay-Doust, A. Valizadeh, E. Aliabadi // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 2011. – Vol. 63, N 7-8. – P. 627-633. doi: 10.1016/j.etp.2010.05.004.

61. Page, R.L. Potential elevation of tacrolimus trough concentrations with concomitant metronidazole therapy / R.L. Page, P.M. Klem, C. Rogers // *Ann. Pharmacother.* – 2005. – Vol. 39, N 6. – P. 1109-1113.

62. Peterszegi, G. The effect of different samples on cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes (PBL) of 5 healthy donors was evaluated by MTT test Biomed / G. Peterszegi, N. Isnard // *Pharmacother.* – 2003. – Vol. 57. – P. 187-194.

63. Phiphatpathamaamphan, K. Effect of IL-1 Polymorphisms, CYP2C19 Genotype and Antibiotic Resistance on Helicobacter pylori Eradication Comparing Between 10-day Sequential Therapy and 14-day Standard Triple Therapy with Four-

Times-Daily-Dosing of Amoxicillin in Thailand: a Prospective Randomized Study / K. Phiphatpatthamaamphan, R.K. Vilaichone, S. Siramolpiwat et al. // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* – 2016. – Vol. 17, N 4. – P. 1903-1907.

64. Physicians' desk reference. – 58-th ed. Medical economic data, 2014. – 2700 p. ISBN 1-56363-061-3.

65. Proskuriakov, S.Ia. Radiosensitizing and toxic action of metronidazole and isometronidazole (1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-4-nitroimidazole) on the cells of Ehrlich ascites cancer and hemoblastosis *La in vitro* / S.Ia Proskuriakov, O.A. Smoryzanova, A.N. Dedenkov, N.I. Riabchenko // *Radiobiologiya.* – 1986. – Vol. 26, N 6. – P. 766-770.

66. Pulikkotil, S.J. Effects of curcumin on crevicular levels of IL-1 β and CCL28 in experimental gingivitis / S.J. Pulikkotil, S. // *Aust. Dent. J.* – 2015. – Vol. 60, N 3. – P. 317-327. doi: 10.1111/adj.12340.

67. Radandt, J.M. Interactions of fluoroquinolones with other drugs: mechanisms, variability, clinical significance, and management / J.M. Radandt, C.R. Marchbanks, M.N. Dudley // *Clin. Infect. Dis.* – 1992. – Vol. 14, N 1. – P. 272-284.

68. Rockwell, S. Effect of 1-methyl-5-sulfonamide-4-nitroimidazole and 1-methyl-5-bromide-4-nitroimidazole on the radiosensitivity of EMT6 tumor cells / S. Rockwell, C.G. Irvin, M. Nierenburg // *Cancer Treat. Rep.* – 1986. – Vol. 70, N 3. – P. 411-413.

69. Sadowska, A. Metronidazole affects breast cancer cell lines / A. Sadowska, S. Prokopiuk, W. Milyk et al. // *Adv. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 58, N 1. – P. 90-95. doi: 10.2478/v10039-012-0070-2.

70. Samuelson, D.R. The respiratory tract microbial biogeography in alcohol use disorder / D.R. Samuelson, E.L. Burnham, V.J. Maffei et al. // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2017. – Vol. 134, N 1. – P. 107-117. doi: 10.1152/ajplung.00277.2017.

71. Samuelson, D.R. Alcohol-associated intestinal dysbiosis impairs pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae* / D.R. Samuelson, J.E. Shellito, V.J. Maffei et al. // *PLoS Pathog.* – 2017. – Vol. 13, N 6. – P. 1006426.

72. Sekis, I. Single-dose pharmacokinetics and genotoxicity of metronidazole in cats / I. Sekis, K. Ramstead, M. Rishniw et al. // *J. Feline. Med. Surg.* – 2009. – Vol. 11, N 2. – P. 60-68. doi: 10.1016/j.jfms.2008.06.011.
73. Senthilkumaran, S. Metronidazole encephalopathy: Uncommon reaction to a common drug / S. Senthilkumaran, S. Shah, N. Balamurugan, P. Thirumalaikolundusubramanian // *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci.* – 2015. – Vol. 5, N 2. – P. 123-124. doi: 10.4103/2229-5151.158422.
74. Sheehy, O. The use of metronidazole during pregnancy: a review of evidence / O. Sheehy, F. Santos, E. Ferreira, A. Berard // *Curr. Drug. Saf.* – 2015. – Vol. 10, N 2. – P. 170-179.
75. Skoropad, V.Y. Preoperative radiotherapy in combination with metronidazole for resectable gastric cancer: long-term results of a phase 2 study / V.Y. Skoropad, B.A. Berdov, V.M. Zagrebina // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2003. – Vol. 29, N 2. – P. 166-170.
76. Skov, K.A. Toxicity of [PtCl₂(NH₃)₂L] in hypoxia; L = misonidazole or metronidazole / K.A. Skov, H. Adomat, D.J. Chaplin, N.P. Farrell // *Anticancer Drug. Des.* – 1990. – Vol. 5, N 1. – P. 121-128.
77. Sotirović, J. Risk factors for surgical site infection in laryngeal cancer surgery / J. Sotirović, V. Šuljagić, N. Baletić et al. // *Acta Clin. Croat.* – 2015. – Vol. 54, N 1. – P. 57-64.
78. Stephens, T.C. Cell survival in B16 melanoma after treatment with combinations of cytotoxic agents: lack of potentiation / T.C. Stephens, J.H. Peacock, G.G. Steel // *Br. J. Cancer.* – 1977. – Vol. 36. – P. 84-93.
79. Stewart, D.J. Mitomycin-C plus metronidazole in advanced carcinoma of the breast / D.J. Stewart, J.A. Maroun, B. Lefebvre et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 1985. – Vol. 5, N 2. – P. 189-194.
80. Stewart, D.J. Mitomycin-C and metronidazole in the treatment of advanced renal-cell carcinoma / D.J. Stewart, N. Futter, A. Irvine et al. // *Am. J. Clin. Oncol.* – 1987. – Vol. 10, N 6. – P. 520-522.

81. Stewart, D.J. Doxorubicin plus metronidazole in the treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck / D.J. Stewart, M.C. Cripps, A. Lamothe et al. // *Am. J. Clin. Oncol.* – 1993. – Vol. 16, N 2. – P. 113-116.
82. Stewart, D.J. Cranial radiation and concomitant cisplatin and mitomycin-C plus resistance modulators for malignant gliomas / D.J. Stewart, S. Dahrouge, O. Agboola, A. Girard // *J. Neurooncol.* – 1997. – Vol. 32, N 2. – P. 161-168.
83. Stewart, D.J. Multiple resistance modulators combined with carboplatin for resistant malignancies: a pilot study. *Invest New Drugs* / D.J. Stewart, R. Goel, M.C. Cripps et al. // [Invest. New Drugs](#). – 1997. – Vol. 15, N 4. – P. 267-277.
84. Stewart, D.J. Pilot study of multiple chemotherapy resistance modulators plus epirubicin in the treatment of resistant malignancies / D.J. Stewart, M.C. Cripps, R. Goel et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 41, N 1. – P. 1-8.
85. Tan, S.Y. Metronidazole leads to enhanced uptake of imatinib in brain, liver and kidney without affecting its plasma pharmacokinetics in mice / S.Y. Tan, E. Kan, W.Y. Lim et al. // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 63, N 7. – P. 918-925. doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01296.x.
86. Tannock, I.F. In vivo interaction of anti-cancer drugs with misonidazole or metronidazole; cyclophosphamide and BCNU / I.F. Tannock // *Br. J. Cancer.* – 1980. – Vol. 42. – P. 871-880.
87. Tannock, I.F. In vivo interaction of anti-cancer drugs with misonidazole or metronidazole: methotrexate, 5-fluorouracil and adriamycin / I.F. Tannock // *Br. J. Cancer.* – 1980. – Vol. 42, N 6. – P. 861-870.
88. Veena, K. Comparison of the toxic and radiosensitizing effects of five therapeutic drugs on the mouse jejunum / K. Veena, P. Uma Devi // *Strahlenther Onkol.* – 1990. – Vol. 166, N 8. – P. 554-556.
89. Vilaichone, R.K. Seven-Day Bismuth-based Quadruple Therapy as an Initial Treatment for *Helicobacter pylori* Infection in a High Metronidazole Resistant Area / R.K. Vilaichone, H. Prapitpaiboon, P. Gamnarai et al. // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* – 2015. – Vol. 16, N 14. – P. 6089-6092.

90. Ward, F. Acute cerebellar syndrome associated with metronidazole / F. Ward, P. Crowley, P.E. Cotter // *Pract. Neurol.* – 2015. – Vol. 15, N 4. – P. 298-299. doi: 10.1136/practneurol-2014-000974.
91. Wilson, B.T. Metronidazole Toxicity in Cockayne Syndrome: A Case Series / B.T. Wilson, A. Strong, S. O'Kelly et al. // *Pediatrics.* – 2015. – Vol. 136, N 3. – P. 706-708. doi: 10.1542/peds.2015-0531.
92. Wong, K.H. Comparative study of thermoradiosensitization by misonidazole and metronidazole in vivo: antitumour effect and pharmacokinetics / K.H. Wong, H. Maezawa, M. Urano // *Int. J. Hyperthermia.* – 1992. – Vol. 8, N 5. – P. 645-658.
93. Yanagi, T. Novel exonic mutation inducing aberrant splicing in the IL10RA gene and resulting in infantile-onset inflammatory bowel disease: a case report / T. Yanagi, T. Mizuochi, Y. Takaki et al. // *BMC Gastroenterol.* – 2016. – Vol. 16. – P. 10. doi: 10.1186/s12876-016-0424-5.
94. Zhang, S. Early or late antibiotic intervention prevents *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in a mouse model / S. Zhang, D.S. Lee, R. Morrissey et al. // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 359, N 2. – P. 345-351.
95. Zhang, W. Bismuth, lansoprazole, amoxicillin and metronidazole or clarithromycin as first-line *Helicobacter pylori* therapy / W. Zhang, Q. Chen, X. Liang et al. // *Gut.* – 2015. – Vol. 64, N 11. – P. 1715-1720. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309900.
96. Youssef, W. Naguib, Amit Kumar¹, and Zhengrong Cui The effect of microneedles on the skin permeability and antitumor activity of topical 5-fluorouracil* *Acta Pharm Sin B.* 2014; 4(1): 94–99. doi:10.1016/j.apsb.2013.12.013.