

УДК 615.07

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТРОНИДАЗОЛА В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ПРЯМОЙ КИШКИ ПРИ АППЛИКАЦИОННОМ СПОСОБЕ ВВЕДЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

С.А. Ягубов¹, Г.М. Янковский^{1*}, С.Э. Кондаков²

(¹ФГБУ НИИ канцерогенеза РАМН; ²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; *e-mail: gyankovskii@mail.ru)

Исследовано распределение метронидазола в тканях опухолей прямой кишки при его аппликационном способе введения. Проведена сравнительная оценка фармакокинетических показателей накопления метронидазола в тканях в зависимости от концентрации препарата в аппликационной смеси. Приведены обобщенные фактические данные распределения метронидазола в образцах ткани (341 образец), полученных при проведении 31 операции.

Ключевые слова: метронидазол, ткани опухоли, биодоступность, *in vivo* эксперимент.

В современной онкологии разработка методов преодоления радиорезистентности опухолей является одной из актуальных задач. В настоящее время в качестве радиомодификаторов в ходе комбинированного лечения ряда распространенных опухолей по расщепленному курсу лучевой терапии эффективно применяются электронно-акцепторные соединения (ЭАС). Одним из фармацевтических препаратов, получившим широкое распространение в качестве радиомодификатора при лечении опухолей прямой кишки является метронидазол (МЗ), структурная формула которого приведена на рис. 1.

Метронидазол впервые был выпущен на фармацевтический рынок компанией «Rhone-Poulenc» в 1962 г. В настоящее время метронидазол выпускает фирма «Sanofi» (Франция) в виде препарата под торговым названием Флагил (Flagyl)[®], содержащего в качестве активного вещества 1-(b-Оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол.

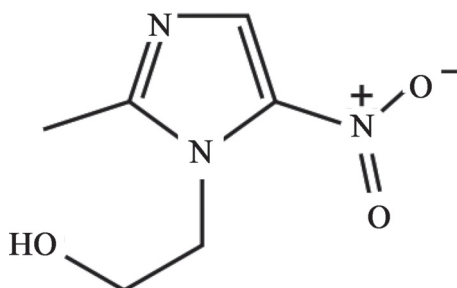


Рис. 1. Структурная формула действующего начала препарата метронидазол (Metronidazolium), химическое название: 1-(b-Оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол или 2-(2-метил-5-нитро-1*H*-имидазол-1-ил)этанол

Низкая токсичность, хорошая переносимость и широкий спектр применения препарата при лечении различных инфекционных заболеваний, вызванных анаэробными микроорганизмами, привели к тому, что до сих пор на основе 1-(b-Оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазола выпускается много препаратов-дженериков, наиболее известными из которых в России являются Трихопол, Вагимид, Метровагин и Флюнидазол. Считается установленным, что механизм антибактериального, противомикробного и противопаразитарного эффекта препарата заключается в биохимическом восстановлении 5-нитрогруппы метронидазола внутриклеточными транспортными белками анаэробных микроорганизмов и простейших. Восстановленная 5-нитрогруппа метронидазола взаимодействует с ДНК микроорганизмов, ингибируя синтез нуклеиновых кислот, что ведет к их гибели [1].

МЗ применяется в лечении опухолевых заболеваний прямой кишки как в виде терапевтического препарата [2], так и в качестве радиосенсибилизирующего препарата при лучевой терапии ряда опухолевых процессов [3]. Однако для реализации основных механизмов действия ЭАС (радиосенсибилизация, хемосенсибилизация и цитотоксичность) необходимо установить их минимальную эффективную концентрацию в опухолевой ткани. Основным недостатком применения МЗ в данном качестве считается нейротоксичность, связанная с необходимостью постоянного приема большой дозы препарата [4]. В этой связи для уменьшения токсических эффектов разрабатываются различные аппликационные схемы ло-

кального подведения МЗ к опухолевой ткани в рамках комбинированной схемы лечения рака прямой кишки [5, 6]. Однако для успешного проведения неoadьювантной (предоперационной) лучевой терапии необходимо знать время и продолжительность периода, когда концентрация радиосенсибилизатора превышает в тканях опухоли минимальную действующую концентрацию (180 мкг/мл) [7].

Цель данной работы – изучение реального распределения и изменения содержания МЗ, применяемого аппликационно в виде геля с разной концентрацией действующего начала, в зависимости от времени, прошедшего от его подведения к опухолевой ткани и окружающим ее нормальным тканям *in vivo*, для определения оптимального времени проведения операции.

Материалы и методы

В качестве вводимой ректально аппликационной формы лекарственного средства (ЛС), имеющего в своем составе МЗ, использовали фармацевтические композиции, содержащие 6, 8 и 10 г метронидазола в 200 мл геля (варианты I, II и III соответственно), описанной ранее [8], что считается приблизительным эквивалентом дозировок 6, 8 и 10 г/м², используемых в радиобиологии.

После хирургического удаления участка прямой кишки осуществляли отбор биоматериала для извлечения МЗ из фрагментов опухоли и нормаль-

ной ткани. Кровоснабжение опухоли и окружающих ее тканей неоднородно, что является причиной различной степени насыщения отдельных участков тканей метронидазолом [9], поэтому для получения объективных данных мы проводили отбор материала из 11 точек: 6 участков опухоли (4 глубоких участка опухоли и 2 на ее поверхности) и 5 участков здоровой ткани. Области забора биоматериала представлены на рис. 2. Образцы ткани получены при проведении 31 операции, исследован 341 образец ткани.

Концентрацию МЗ в полученном биоматериале измеряли методом УФ-спектрометрии. Известно, что ошибка определения МЗ в опухолевых тканях спектрофотометрическим методом при использовании пробоподготовки лежит в диапазоне 10–40 мкг/мл и зависит от того, насколько тщательно проведена гомогенизация, а также от условий центрифугирования гомогената образца ткани. В предварительных экспериментах установлено, что центрифугирование требуется проводить при 8000 об/мин, для того чтобы все поглощающие в УФ-области спектра взвешенные частицы оседали. Образцы операционного материала брали в виде навески 100±4 мг и измельчали с помощью ручного гомогенизатора при добавлении 0,4 мл физиологического раствора. Для экстракции МЗ из биоматериала в полученный гомогенат добавляли этанол из расчета 4,1 мл на 100 мг биопробы. Каждую пробу после гомогениза-

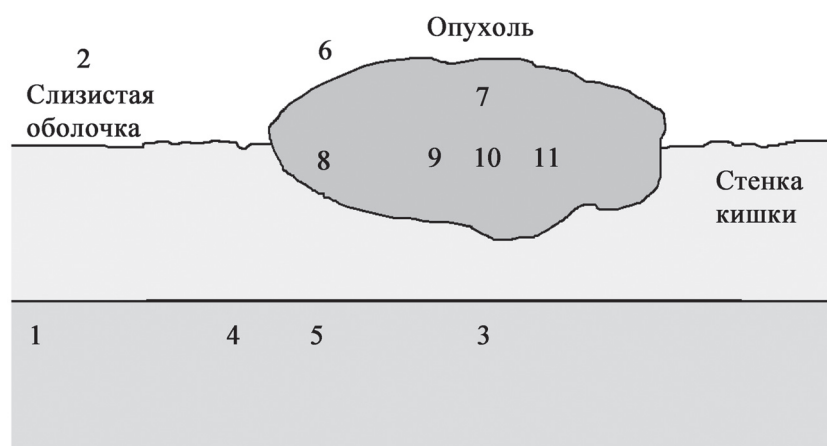


Рис. 2. Схема забора образцов тканей для эксперимента. Непораженные ткани кишки в 5 см проксимальной верхнего края опухоли: 1 – параректальная клетчатка; 2 – слизистая оболочка кишки. Непораженная кишка снаружи от видимой границы опухоли: 3 – параректальная клетчатка под опухолью (от слизистой оболочки 1,5–2 см); 4 – параректальная клетчатка под опухолью, периферия проксимальная; 5 – лимфатические узлы параректальной клетчатки. Ткани опухоли: 6 – со стороны слизистой оболочки периферия; 7 – со стороны слизистой оболочки центр; 8 – со стороны жировой клетчатки периферия проксимальная; 9, 10, 11 – образцы со стороны жировой клетчатки центр

ции центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин до получения прозрачных спиртовых экстрактов. Надосадочную жидкость отбирали и исследовали спектрофотометрически.

Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре «Хьюлетт-Паккард 852А». Количественное определение МЗ проводили методом абсолютной калибровки по измененной методике [10] при длине волны 318 нм в максимуме поглощения МЗ (раствор в этаноле).

Из литературных данных известно, что точность определения экстрагируемого компонента можно существенно увеличить путем использования дифференциальной спектрофотометрии, применяя для сравнения экстракт беспрепаратного гомогената соответствующей ткани [11]. Для получения сигналов сравнения создана база данных спектров поглощения беспрепаратных экстрактов разных тканей, полученных по описанной ранее методике. Было выявлено, что

спектры поглощения гомогенатов разноименных тканей имеют разные спектры поглощения в диапазоне 200–400 нм, однако в области 300–340 нм поглощение наблюдается только у образцов тканей с МЗ.

Экспериментальные результаты

На рис. 3 представлены результаты определения содержания МЗ в опухолевых и здоровых тканях через 3 ч после введения препарата при концентрации в нем метронидазола 6, 8 и 10 г/м² (I, II и III варианты соответственно). Из рис. 3, *a–в* видно, что в случае варианта I наибольшее содержание МЗ в опухоли наблюдается в областях 6 и 7 (периферия и центр опухоли со стороны слизистой). Со стороны жировой клетчатки в центре опухоли и периферии содержание МЗ сильно варьирует как от пациента к пациенту, так и от положения в опухоли. В случае вариантов II и III его содержание превышает 180 мкг/мл в цен-

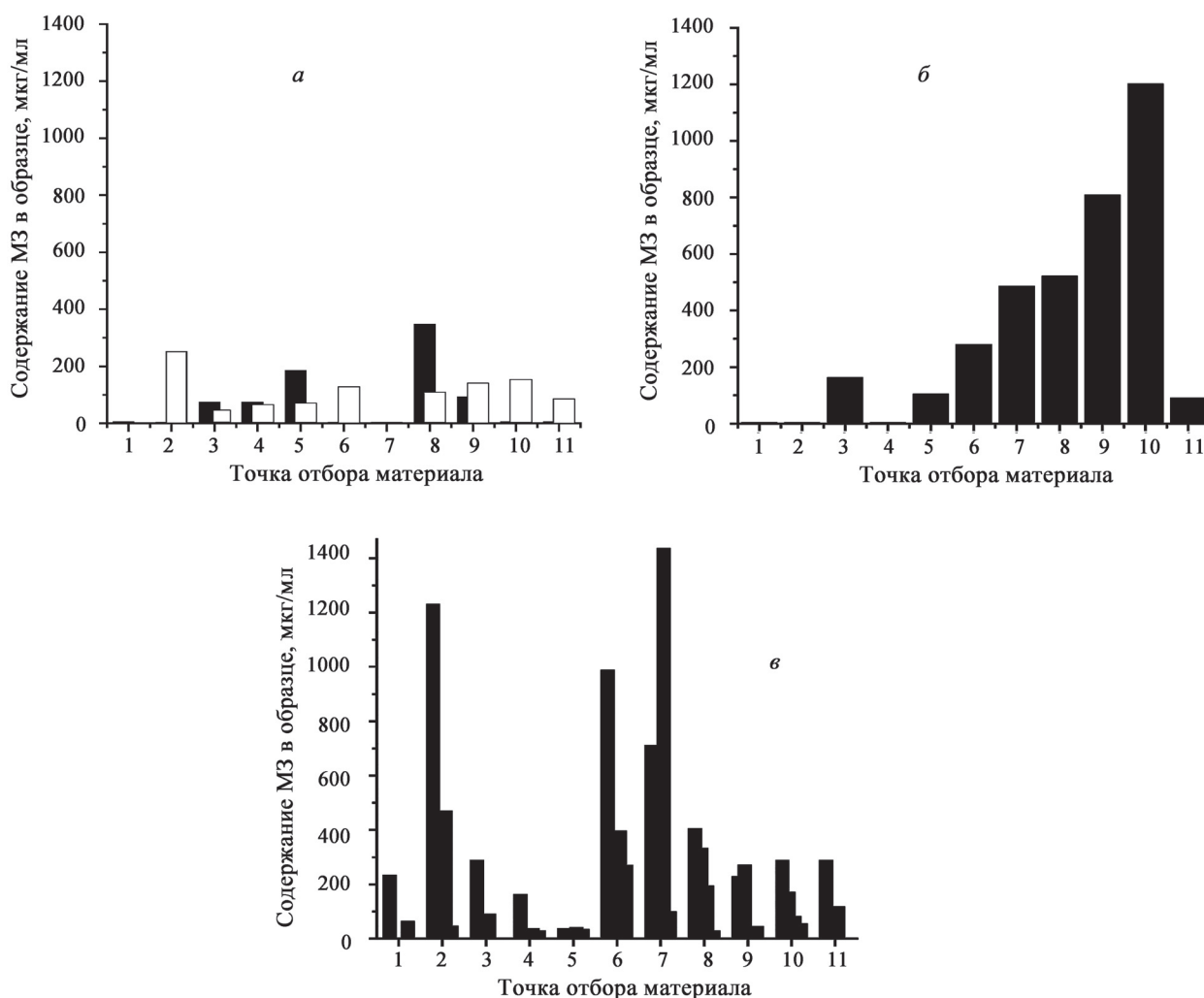


Рис. 3. Содержание МЗ через 3 ч после подведения: *a* – вариант I, *б* – вариант II, *в* – вариант III

тре и периферии опухоли со стороны слизистой и наблюдается одновременно в 3 из 5 исследованных опухолей. Две опухоли либо на периферии, либо в центре со стороны слизистой (но не одновременно) содержат менее 180 мкг/мл МЗ. Самое большое содержание МЗ в здоровой ткани наблюдается на слизистой и в параректальной клетчатке под опухолью.

Рассмотрим рис. 4, из которого видно, что через 4 ч после введения препарата в вариантах II и III на периферии и в центре опухоли со стороны слизистой (14 образцов опухолевой ткани из 7 опухолей) содержание МЗ превышает 180 мкг/мл. В центрах опухолей со стороны жировой клетчатки брали по три разных образца, концентрация МЗ в них сильно варьирует. В случае вариантов II и III только в 2 опухолях из 6 исследованных содержание МЗ превышало 180 мкг/мл во всех трех точках центра опухоли. При этом во всех образцах, взятых на периферии опухолей и из центров со стороны слизистой, содержание МЗ значительно превышало 180 мкг/мл.

Из рис. 5 видно, что через 5 ч после введения препарата в варианте I содержание МЗ становится

меньше 180 мкг/мл на всех участках опухоли, откуда проводили забор биоматериала. В случае варианта II содержание МЗ в тканях опухоли становится в основном ниже 180 мкг/мл, кроме отдельных точек на периферии и в центре опухоли со стороны слизистой. В случае варианта III метронидазол в тканях опухоли распределяется неоднородно и превышает концентрацию 180 мкг/мл лишь в 17 образцах из 30.

Рассмотрим рис. 6. Через 6 ч после введения содержание МЗ в тканях опухоли в случае варианта II становится меньше 180 мкг/мл на всех участках опухоли, откуда проводился забор биоматериала. В случае варианта III содержание МЗ в опухоли превышает 180 мкг/мл в 11 из 18 образцов и распределяется более равномерно. В центре опухоли и на периферии со стороны жировой клетчатки содержание МЗ варьирует от 117 до 1435 мкг/мл.

Обсуждение результатов

Изучение накопления МЗ в опухолевой ткани показало, что через 3 ч после внутривидеального подведения полимерной композиции достигается радиосенсибилизирующий уровень МЗ в 180 мкг/мл на поверхности опухоли или в центре со стороны слизистой в 60% образцов, при концентрации МЗ в полимерной смеси 8 и 10 г/м² (варианты II и III).

Через 4 ч с момента введения полимерной композиции в прямую кишку радиосенсибилизирующий уровень МЗ (более 180 мкг/мл) был обнаружен в 50% образцов при концентрации МЗ в геле 8 г/м² (вариант II) и в 63% образцов при концентрации МЗ в геле 10 г/м² (вариант III)

Через 5 ч с момента введения полимерной композиции в прямую кишку лишь концентрация 10 г/м² МЗ в геле позволяет достичь радиосенсибилизирующего уровня в 55% образцов всех тканей и в 60% образцов опухолевой ткани. При этом в центре и на периферии опухоли со стороны жировой клетчатки распределение МЗ в опухоли очень неоднородно. Концентрация МЗ на поверхности и в центре опухоли со стороны слизистой начинает уменьшаться, а в центре опухоли со стороны жировой клетчатки начинает выравниваться в разных точках.

Через 6 ч после подведения препарата содержание МЗ в опухолевых тканях начинает снижаться и становится ниже уровня сенсибилизации.

Через 10 ч после подведения препарата содержание МЗ в центре опухоли со стороны жировой клетчатки начинает существенно уменьшаться, вероятно, в связи с истощением кон-

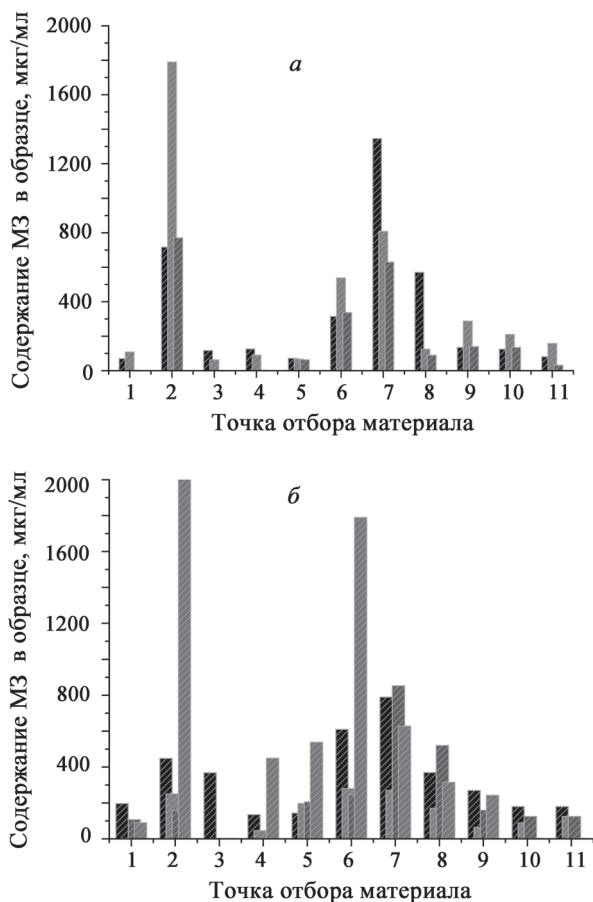


Рис. 4. Содержание МЗ через 4 ч после подведения: а – вариант II (3 опухоли), б – вариант III (4 опухоли)

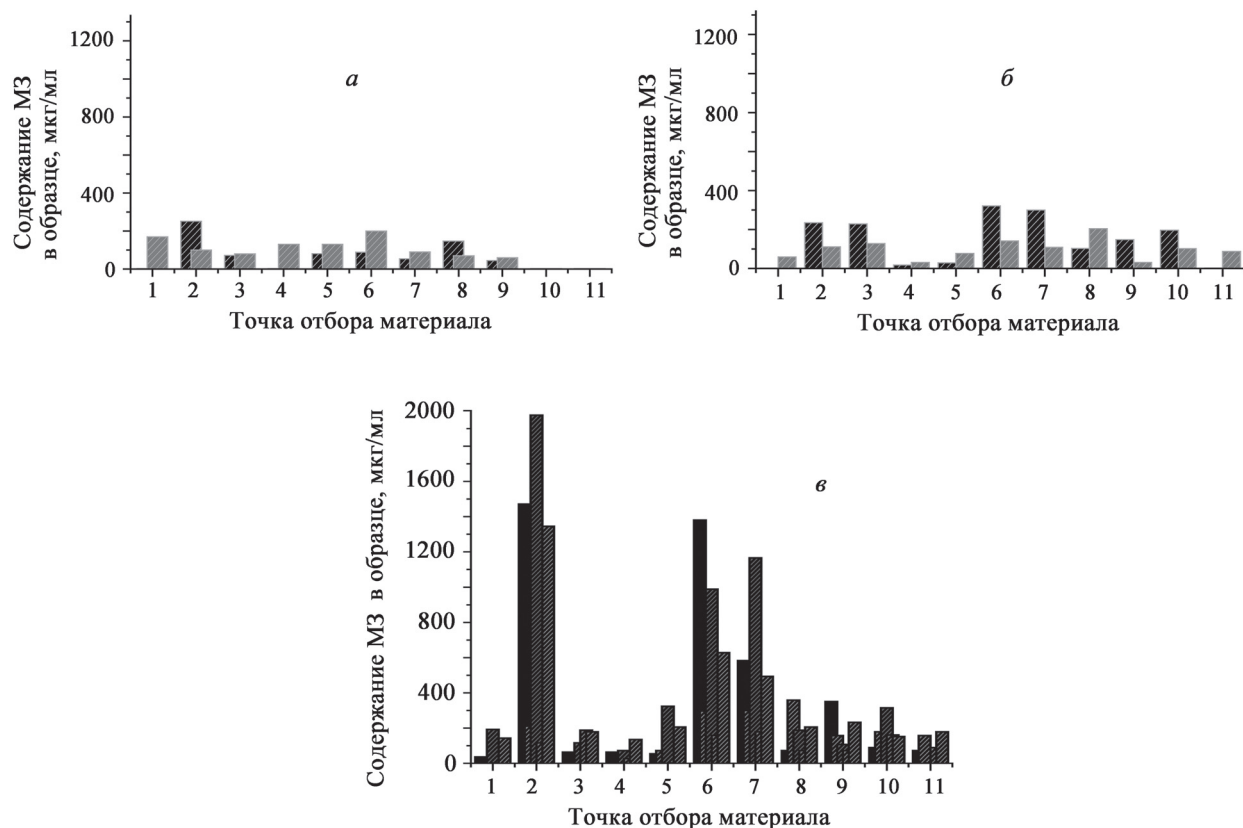


Рис. 5. Содержание МЗ через 5 ч после подведения: *а* – вариант I (2 опухоли), *б* – вариант II (2 опухоли), *в* – вариант III (4 опухоли)

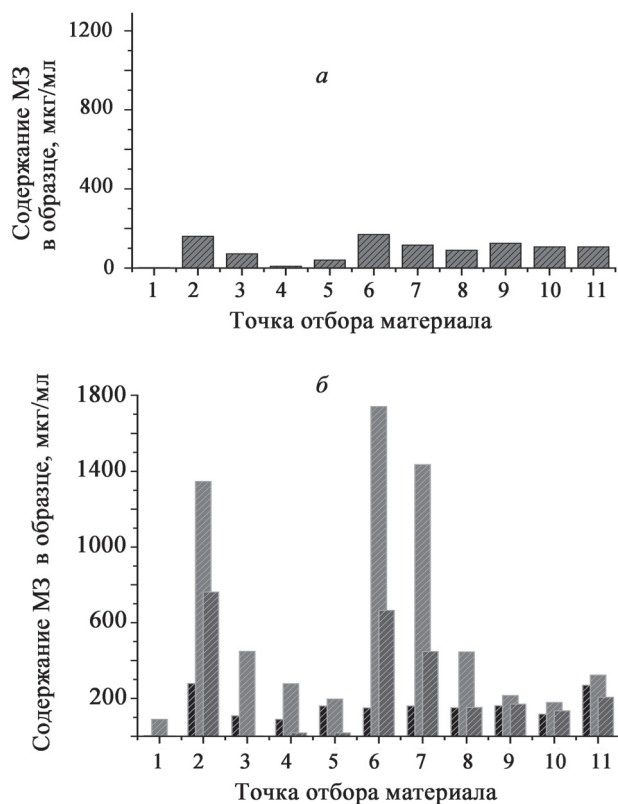


Рис. 6. Содержание МЗ через 6 ч после подведения: *а* – вариант II (1 опухоль), *б* – вариант III (3 опухоли)

центрации препарата в аппликационной смеси и через 21–24 ч (рис. 7) становится порядка ошибки метода.

Выводы

Проведенное исследование показывает, что наиболее оптимальной является концентрация метронидазола 10 г на 200 мл (вариант III). При этой концентрации в течение 3–6 ч после ректального введения смеси в 60% случаев сохраняется содержание МЗ в тканях опухоли более 180 мкг/мл, что позволяет проводить операцию с использованием лучевой терапии. В этот промежуток времени могут реализоваться основные (как быстрые, так и медленные) механизмы радиосенсибилизации – биохимический, хемосенсибилизация, цитотоксичность и блокирование репарации сублетальных и потенциально летальных лучевых повреждений опухолевых клеток [12].

Из полученных данных следует, что даже при местном введении диффузия МЗ со стороны слизистой в глубь опухоли происходит неоднородно.

Для достижения относительно равномерного распределения препарата как в глубине опухоли, так и на границе подведения требуется время не

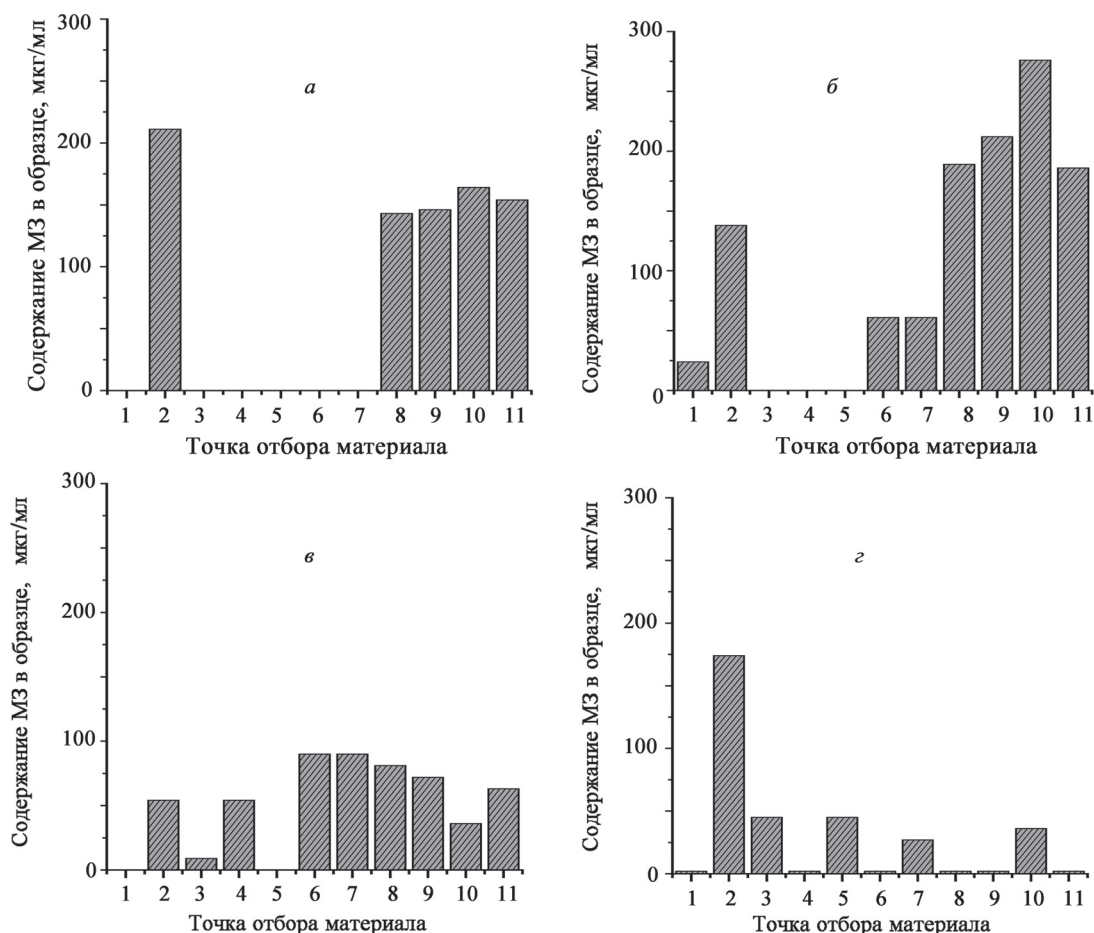


Рис. 7. Графики изменения содержания МЗ при концентрации 10 г/м² в зависимости от времени, прошедшего после подведения, ч: а – 8, б – 10, в – 21, г – 24

менее 6, но не более 8 ч с момента введения фармацевтической композиции.

В качестве дальнейших шагов по созданию более удобных аппликационных форм МЗ для использования в лечении опухолей прямой кишки можно рекомендовать увеличение концентрации препарата в подводимой смеси или создание новых транспортных форм, в которых проникающая способность МЗ увеличена. Для этого необходимо провести более подробное исследование

зависимости всасывания от вспомогательных веществ и наполнителей в готовой лекарственной форме. Например, известно, что свечи на основе полиэтиленгликолей обеспечивают значительно лучшие показатели фармакокинетики всасывания МЗ, чем свечи на жировой основе [13]. Данное исследование показывает, что модельные и предварительные эксперименты не всегда отражают реальную картину распределения МЗ в конкретных случаях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. LaRusso N.F., Tomasz M., Muller M. et al. // Mol. Pharmacol. 1977. Vol. 13. N 5. P. 872.
2. Sadowska A., Car H., Rodziewicz L., Cepowicz D., Kędra B. // Prog. Health. Sci. 2013. Vol. 3. N 2. P. 74.
3. Байсоголов Г.Д., Бердов Б.А., Конопляников А.Г. и др. // Мед. радиолог. 1983. № 2. С. 7.
4. Ярмоненко С.П. / Радиомодификаторы в лучевой терапии опухолей. Обнинск, 1982. С. 126.
5. Ким Д.Ф., Николаев А.В., Барсуков Ю.А., Ткачев С.И., Гордеев С.С. // Онкологическая колопроктология. 2012. № 4. С. 9.
6. Acharya D.K. Role of metronidazole in the radiation therapy (a review of 717 cancer cases) // Indian. J. Med. Sci. 1994. Vol. 48. P. 111.
7. Overgaard J. // Oncol. Res. 1994. Vol. 6. N 10–11. P. 509.
8. Барсуков Ю.А., Ткачев С.И., Олтаржевская Н.Д. и др. // Онкологическая колопроктология. 2012. № 3. С. 11.
9. Turgut EH, Özyazici M. Bioavailability File: Metronidazole // FABAD J Pharm. Sci. 2004. Vol. 6. P. 39.
10. Теплых А.Н., Илларионова Е.А. // Сибирский медицинский журнал. 2009. Т. 88. № 5. С. 48.

11. *Platt U., Stutz J.* // Differential optical absorption spectroscopy: principles and applications. Springer, 2008. 597 p.
12. *Ярмоненко С.П., Вайсон А.А.* Клиническая радиобиология. М., 2004.
13. *Vromans H., Moolenaar F., Visser J. et al.* // Pharm. Weekb. Sci. 1984. Vol. 6. P. 18.

Поступила в редакцию 10.09.14

**STUDY OF DISTRIBUTION OF METRONIDAZOLE IN RECTUM
CANCER TISSUE IN AN IN VIVO EXPERIMENT IN CASE
OF ADMINISTRATION OF THE DRUG VIA RECTAL APPLICATION**

S.A. Yagubov¹, G.M. Yankovskii^{1*}, S.E. Kondakov²

*(¹Blokhin Cancer Center, Russian Academy of Medical Sciences; ²Lomonosov Moscow State University; *e-mail: gyankovskii@mail.ru)*

Distribution of metronidazole in rectum cancer tissue and proximal healthy tissue was studied in the case of administration of the drug via rectal application. Concentration of metronidazole in extracts from tumor tissue and the proximal healthy tissue was studied by the means of UV-spectrophotometry. The comparative analysis of pharmacokinetics of metronidazole in the malignant and healthy proximal tissue depending on the initial concentration of metronidazole in the composition applied rectally based on 31 cases in 341 tissue samples was carried out.

Key words: metronidazole, UV-spectrophotometry, cancer tissue, bioavailability, in vivo experiment.

Сведения об авторах: *Янковский Георгий Маркович* – ст. науч. сотр. лаборатории молекулярно-биологических методов исследования ФГБУ НИИ канцерогенеза РАМН, канд. физ.-матем. наук (gyankovskii@mail.ru); *Язубов Сергей Аркадьевич* – науч. сотр. лаборатории молекулярно-биологических методов исследования ФГБУ НИИ канцерогенеза РАМН (mbmisay@mail.ru); *Кондаков Сергей Эмильевич* – вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. фарм. наук (kse@excite.chem.msu.su).