

В. В. Кончак, К. М. Солонец
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОТОКСИЧЕСКОГО
ЭФФЕКТА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА ГЕМЦИТАБИН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУР КЛЕТОК
Научный руководитель канд. мед. наук К. И. Павлов
Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,
Лаборатория экспериментальной медицины, фармакологии токсикологии НИЧ
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

U. V. Kanchak, K. M. Salanets
COMPARATIVE EVALUATION OF IMMUNOTOXIC EFFECT OF
ANTI-TUMOR DRUG GEMCITABIN USING CELL CULTURES
Tutor: K. I. Pavlov, PhD
Department of Microbiology, Virology, Immunology,
Laboratory of Experimental Medicine, Pharmacology and Toxicology
Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Оценка токсического эффекта лекарственного средства «Гемцитабин» для культур клеток фибробластов человека позволила оценить токсический эффект различных концентраций при краткосрочном воздействии.

Ключевые слова: иммунотоксикология, гемцитабин, фибробласты.

Resume. Evaluation of the toxic effect of the drug “Gemcitabine” for human fibroblast cell cultures made it possible to evaluate the toxic effect of various concentrations upon short-term exposure.

Keywords: immunotoxicology, gemcitabine, fibroblasts.

Актуальность. Иммунотоксикология представляет собой раздел иммунологии, использующий методы токсикологии. Гемцитабин – сравнительно новое цитидиноподобное лекарственное средство из группы антиметаболитов, применяющееся для лечения рака поджелудочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы.

Он является антиметаболитом группы аналогов пиримидина, подавляет синтез ДНК, ингибируя цитидиндезаминазу. Проявляет циклоспецифичность, действуя на клетки в фазах S и G1/S клеточного цикла. Метаболизируется в клетке под действием нуклеозидкиназ до активных дифосфатных и трифосфатных нуклеотидов. Гемцитабин является также сильным радиосенсибилизирующим средством даже в концентрациях более низких, чем цитотоксические. Максимальная концентрация гемцитабина в плазме крови (от 3,2 мкг/мл до 45,5 мкг/мл) достигается в течение 5 минут после окончания инфузии.

Терапевтический интервал гемцитабина крайне узкий (от 25 мг/кг до 27 мг/кг), что связано с высокой токсичностью. В силу данного свойства гемцитабин может являться эффективным референсным химическим веществом для оценки токсического эффекта на культурах клеток.

Фибробласты – это клетки волокнистых соединительных тканей круглой или удлинённой веретенообразной формы с отростками и плоским овальным ядром, и присутствуют в строме всех без исключения органов.

Главная функция фибробластов – участие в метаболизме межклеточного вещества, кроме того они способны продуцировать простагландины, эритропоэтин и

цитокины, а также различные факторы роста (EGF, FGF, KGF и др.).

Фибробласты не прихотливы к условиям культивирования, поэтому они являются объектом исследования иммунотоксических эффектов.

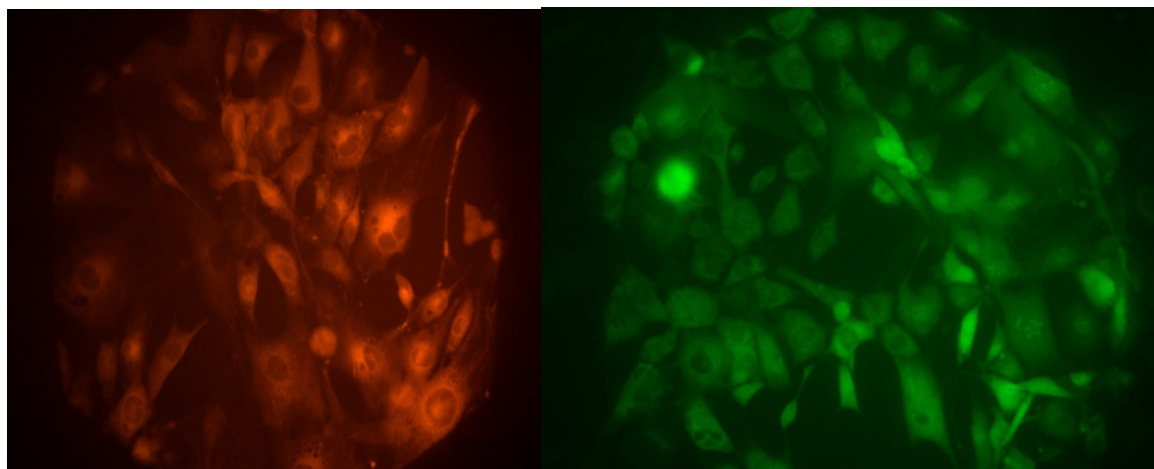


Рис. 1 – Микрофотография культуры фибробластов. Флуоресценция после окрашивания акридиновым жёлтым и родамином Ж.

Цель: оценка иммунотоксического эффекта гемцитабина для культур фибробластов человека.

Задачи:

1. Инкубация культур клеток фибробластов человека в растворах гемцитабина различной концентрации и последующая световая и флуоресцентная микроскопия клеток;
2. Оценка токсичности различных концентраций гемцитабина путем совмещения полученных микрофотографий;
3. Определение летальных концентраций гемцитабина для различных клеток.

Материал и методы. Материалом для исследования послужили культуры клеток фибробластов человека, полученные научной группой «Иммунология» НИЧ БГМУ. Клетки инкубировали в термостате при температуре 37°C в растворах лекарственного средства атипичного нуклеозида гемцитабина «Эмтаз» (Хетеро Лабс, Индия) различной концентрации. Осуществлялся положительный и отрицательный (с использованием больших концентраций параформальдегида) контроль. Проводилась световая и флуоресцентная микроскопия при помощи микроскопа ZEISS Axio Vert. A1. с использованием красителей трипанового синего, пропидия йодида, родамина Ж, акридинового жёлтого, бромистого этидия, пиронина.

В основу оценки иммунотоксичности было положено свойство красителя пропидия йодида связываться с ДНК, что возможно только в мертвой клетке вследствие нарушения барьерной функции плазмалеммы и кариолеммы. Таким образом, клетки, активно инкорпорирующие пропидий йодид, ярко окрашенные при флуоресцентной микроскопии, считались мертвыми.

Для оценки токсичности различных концентраций гемцитабина микрофотографии, полученные при флуоресцентной микроскопии, были совмещены с микрофотографиями, полученными при световой микроскопии, в графическом редакторе Adobe Photoshop CS.

Результаты и их обсуждение. Несмотря на краткосрочный характер инкуба-

ции, наблюдалась высокая инкорпорация красителей клетками культуры фибробластов человека (табл. 1, рис. 2).

Табл. 1 – Летальность фибробластов в растворах гемцитабина различной концентрации.

Концентрация гемцитабина, мг/1 млн клеток*мл	Летальность фибробластов, %
0	10,0
5	11,5
10	12,1
25	13,7
50	14,9
100	19,1
200	42,8
300	74,6

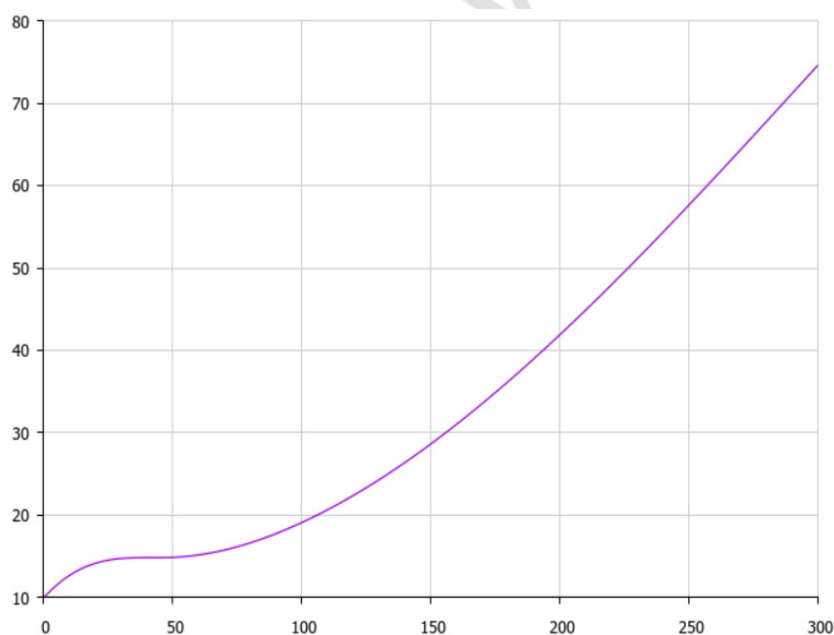


Рис. 2 – График зависимости летальности фибробластов от концентрации гемцитабина в растворе.

Выводы. Оценка токсического эффекта лекарственного средства «Гемцитабин» для культур клеток фибробластов человека позволила оценить токсический эффект различных концентраций при краткосрочной инкубации (1 час).

Для культуры фибробластов, напротив, в сходном диапазоне концентраций (50-100 мг на 1 млн.клеток/мл) наблюдался линейный рост гибели клеток. Инкубация фибробластов с лекарственным средством «Гемцитабин» в концентрациях 5-50 мг на 10 млн.клеток/мл выявила отсутствие значительного токсического эффекта (11,5-14,9% мёртвых клеток) в сравнении с интактным контролем (10% мёртвых клеток).

Таким образом, лекарственное средство «Гемцитабин» оказало дифференциро-

ванное токсическое воздействие на использованную культуру клеток.

Кратковременная инкубация и выраженный летальный эффект характеризуют «Гемцитабин» как потенциальное референсное лекарственное средство для оценки токсического воздействия.

Литература

1. Гильдеева Г. Н. Сравнительное изучение цитостатического эффекта препаратов гемцитабина [Текст]* / Гильдеева Г. Н., Семейкин А. В. // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – №2. – С. 11-14.

2. Arlt A. Role of NF- κ B and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death [Текст]* / Arlt A., Gehrz A., Muerkoster S., Vorndamm J. // Oncogene. – 2003. – №22. – С. 3243-3251.

3. Dell'Erbaa C. Inhibition of cell proliferation, cytotoxicity and induction of apoptosis of 1,4-bis(1-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene in gastrointestinal tumour cell lines and preliminary evaluation of its toxicity in vivo [Текст]* / Dell'Erbaa C., Chiavarinab B., Fenoglioc C. // Pharmacological Research. – 2005. – №52. – С. 271-282.