

ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი
ბიოლოგიის დეპარტამენტი

მარიამ ოსეფაშვილი

მიკრობირთვების ანალიზი გენოტოქსიკურობის
შესაფასებლად

გამოყენებითი ბიომეცნიერებებისა და ბიოტექნოლოგიის ბაკალავრის
ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი
საბაკალავრო ნაშრომი

ხელმძღვანელები:
დოქტ. რუთ მორსე
დასავლეთ ინგლისის უნივერსიტეტი (UWE), ბრისტოლი
ასოც. პროფ. პავლე ჭელიძე
ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2013

შინაარსი

შინაარსი

1. ანოტაცია	3 გვ.
2. შესავალი	4 გვ.
2.1 საკითხის აქტუალობა	4 გვ.
2.2 კვლევის მიზანი	5 გვ.
2.3 ამოცანები	5 გვ.
3. ლიტერატურის მიმოხილვა	6 გვ.
3.1 მიკრობირთვების ანალიზი	6 გვ.
3.2 მელფალანი და მისი მოქმედების მექანიზმი	7 გვ.
3.3 კარმუსტინი და მისი მოქმედების მექანიზმი	9 გვ.
3.4 ცისპლატინი და მისი მოქმედების მექანიზმი	11 გვ.
3.5 ეტოპოზიდი და მისი მოქმედების მექანიზმი	14 გვ.
4. გამოყენებული მასალები და მეთოდები	17 გვ.
4.1 კვლევის ობიექტი	17 გვ.
4.2 ექსპერიმენტის მსვლელობა	17 გვ.
5. მიღებული შედეგები და მათი ანალიზი	19 გვ.
5.1 მელფალანის ზემოქმედებით გამოწვეული ეფექტები	19 გვ.
5.2 კარმუსტინის ზემოქმედებით გამოწვეული ეფექტები	22 გვ.
5.3 ცისპლატინის ზემოქმედებით გამოწვეული ეფექტები	25 გვ.
5.4 ეტოპოზიდის ზემოქმედებით გამოწვეული ეფექტები	28 გვ.
5.5 პრეპარატების მოქმედების შედარებითი ანალიზი	31 გვ.
5.6 დასკვნა	32 გვ.
6. დანართი	33 გვ.
7. გამოყენებული ლიტერატურა	37 გვ.

1. ანოტაცია

In vitro მიკრობირთვების ანალიზი არის გენოტოქსიკურობის ტესტი, რომელიც უკანასკნელ წლებში ფართოდ გამოიყენება სხვადასხვა ქემოთერაპიული პრეპარატის უსაფრთხოების შესაფასებლად და ტოქსიკოლოგიურ კვლევებში.

ნაშრომი მიზნად ისახავს, დადგინდეს, თუ რამდენად ეფექტური იქნება მიკრობირთვების ანალიზის აღნიშნული ტესტ-სისტემის გამოყენება, ადამიანის TK6 ლიმფობლასტურ უჯრედებზე ანტინეოპლაზიური პრეპარატების გენოტოქსიკური ეფექტების შესაფასებლად. ამისათვის შესწავლილ იქნა 4 ანტისიმსივნური პრეპარატის - მელფალანის, კარმუსტინის, ცისპლატინისა და ეტოპოზიდის მოქმედება TK6 უჯრედებზე. მიუხედავად იმისა, რომ აღნიშნულ პრეპარატებს მოქმედების განსხვავებული მექანიზმები ახასიათებთ, ნაჩვენებია, რომ თითოეული მათგანი ზრდის ლეიკემიის განვითარების რისკს. უჯრედის სხვა სტრუქტურულ ცვლილებებთან ერთად ისინი იწვევენ მიკრობირთვების ფორმირებას და კვლევის შედეგებმა დაადასტურა, რომ მიკრობირთვების წარმოქმნა ნამდვილად შეიძლება ჩაითვალოს მათი გენოტოქსიკურობის საიმედო მარკერად.

Abstract

The *in vitro* micronucleus assay is a genotoxicity test, which has recently become acknowledged and widely used as reliable tool in drug safety assessment and toxicological research. The aim of research is to establish efficiency of micronucleus test for to assay the genotoxicity effect of antitumor drugs in regard to human lymphoid tumors. Therefore we studied the action of 4 member of anticancer drugs – Melphalan, Carmustine, Cisplatin and Etoposide using the TK6 human cell line. Though these drugs are characterized with different mechanism of action, it was shown that each of them increased risk of leukemia. Furthermore they induced reorganization of nuclear structure that was revealed in enhanced activity of micronuclei formation. Our results indicate that micronuclei formation can be accepted as reliable marker for genotoxicity assay.

ნაშრომი შესრულებულია Tempus-ის პროგრამის (#159340 Tempus -- 1-2009-1-ES-Tempus-JPCR-"MAPB") დაფინანსებით დასავლეთ ინგლისის უნივერსიტეტში (UWE), ბრისტოლში.

2. შესავალი

2.1 საკითხის აქტუალობა

დღეისათვის კიბო სიკვდილის ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული მიზეზია მთელს მსოფლიოში. დაავადებულთა დაახლოებით ერთი მესამედი მკურნალობს ოპერაციული ან სხივური თერაპიის ჩარევით. ეს საკმაოდ ეფექტური მეთოდია, თუმცა მხოლოდ მაშინ, როდესაც სიმსივნე არაა მეტასტაზირებული. მეტასტაზირების შემთხვევაში საჭირო ხდება მკურნალობაში ქიმიოთერაპიული პრეპარატების ჩარევა. [1]

სიმსივნის ქიმიოთერაპია დაიწყო მეოცე საუკუნის 40-50-იან წლებში, როდესაც აღმოაჩინეს, რომ მეორე მსოფლიო ომში გამოყენებული მომწამვლელი აირი მუსტინ ჰიდროქლორიდი (mustard gas) ხასიათდებოდა ანტისიმსივნური თვისებებით. ამ აღმოჩენის შედეგად მკვლევართა ჯგუფები ენთუზიაზმით შეუდგნენ აღნიშნულ აირში შემავალი ნაერთების კვლევას და ნირტოგენ მუსტარდის მრავალი წარმოებული შეიქმნა. ყველა ამ აგენტს ახასიათებდა დნმ-ის ალკილირების გზით სიმსივნური უჯრედების გაყოფის ინჰიბირების უნარი. თუმცა 1950 წელს ნათელი გახდა, რომ აღნიშნული პრეპარატები შერჩევითად მოქმედებდნენ მხოლოდ გარკვეული ტიპის სიმსივნეების წინააღმდეგ და ამასთან ხასიათდებოდნენ ძლიერ ტოქსიკური მოქმედებით ძვლის ტვინის უჯრედებზე. [2]

დღეისათვის უკვე ანტისიმსივნური პრეპარატების ფართო სპექტრია შექმნილი. ისინი გაერთიანებულია ათამდე ჯგუფში. მათ შორისაა მრავალფუნქციური მაალკილირებელი აგენტები, სხვა მაალკილირებელი პრეპარატები, ანტიმეტაბოლიტები, მცენარეული ალკალოიდები, მონოკლონური ანტისხეულები, ჰორმონალური აგენტები და სხვა. [1; 3; 4] თუმცა ის პრობლემა, რომ აღნიშნულ პრეპარატებს არ ახასიათებთ სრული სპეციფიკურობა და სიმსივნურთან ერთად ჯანმრთელი უჯრედებისთვისაც ტოქსიკურობა არიან, დღესაც მოუგვარებელი რჩება. განსაკუთრებით მძიმედ ვლინდება მათი უარყოფითი ეფექტები სისხლწარმომქმნელ უჯრედებზე მოქმედებისას. მაგალითად, ნაჩვენებია, რომ მაალკილირებელი პრეპარატების მოხმარება პაციენტებში საგრძნობლად ზრდის მწვავე მიელოიდური ლეიკემიის განვითარების რისკს. [5; 6]

ვინაიდან ანტისიმსივნური პრეპარატების ყველაზე მძიმედ გამოხატული გვერდითი მოვლენა ჰემატოტოქსიკურობაა, კვლევის ობიექტად შერჩეულ იქნა ადამიანის TK6 (თიმიდინ კინაზა ჰეტეროზიგოტული) ლიმფობლასტური უჯრედები.

უკანასკნელი ათწლეულების განმავლობაში მიკრობირთვების ანალიზის ტესტ-სისტემა ფართოდ გამოიყენება კლასტოგენური და ანეოგენური აგენტების დასადგენად, [7] თუმცა ნაკლებადაა ცნობილი, აღნიშნული ტესტ სისტემით რამდენად ობიექტურად შეიძლება შეფასდეს ანტინეოპლაზიური აგენტების გენოტოქსიკური მოქმედება ჰემოპოეზურ, მათ შორის ლიმფოიდურ უჯრედებზე.

2.2 კვლევის მიზანი

კვლევის მიზანია *in vitro* მიკრობირთვების ანალიზის ტესტ-სისტემის ეფექტურობის დადგენა ადამიანის TK6 ლიმფობლასტურ უჯრედებზე სხვადასხვა ტიპის ანტინეოპლაზიური პრეპარატის გენოტოქსიკური ეფექტების შესასწავლად.

2.3 ამოცანები

ამოცანა:

- ალკალოიდების (მელფალანი და კარმუსტინი), ალკალოიდ მსგავსი (ცისპლატინი) და ტოპოიზომერაზა II-ის ინჰიბიტორი (ეტოპოზიდი) პრეპარატების დოზადამოკიდებული ციტო- და გენოტოქსიკური ეფექტების შესწავლა და შედარება TK6 ლიმფობლასტურ უჯრედებში;

ქვეამოცანები:

- აღნიშნული პრეპარატების ზემოქმედების შედეგად კულტურის ზრდის ტემპის ცვლილების დადგენა;
- წარმოქმნილი მიკრობირთვ(ებ)ის რაოდენობის (პრეპარატის დოზადამოკიდებული) ცვლილების ანალიზი როგორც ერთ, ასევე ორბირთვიან უჯრედებში;
- აპოპტოზური უჯრედების რაოდენობის ცვლილების შესწავლა;

- გენოტოქსიურობის სხვა პარამეტრების - მრავალბირთვიანობა, „გატეხილი კვერცხის სინდრომის“ შესწავლა.
- თითოეული წამლის კლინიკაში გამოყენებადი დოზითა და მასზე დაბალი დოზებით გამოწვეული გენოტოქსიურობის ხარისხის შედარება.

3. ლიტერატურის მიმოხილვა

3.1 მიკრობირთვების ანალიზი

მიკრობირთვები ციტოპლაზმაში განლაგებული ბირთვის კომპონენტებია. მათი ჩამოყალიბება ხდება აბერირებული ქრომოსომების უჯრედის მიტოზური ციკლისას ჩამორჩენის შედეგად. როგორც წესი, მათი ინდუქციის მაპროვოცირებელია ისეთი ნივთიერებები, რომლებსაც კლასტოგენური ეფექტი ახასიათებთ ან აზიანებენ გაყოფის თითისტარას ცილებს. [8] უფრო კონკრეტულად რომ ვთქვათ, მიკრობირთვი შესაძლოა წარმოიქმნას აცენტრული ქრომოსომის (ქრომოსომა რომელსაც აკლია ცენტრომერა) ფრაგმენტისაგან ანდა მთლიანი ქრომოსომისაგან, რომელმაც გაყოფის პროცესში, კერძოდ ანაფაზაში ვერ მოახერხა მიგრაცია უჯრედის საწინააღმდეგო პოლუსებისაკენ. [9; 10; 8]

ინ ვირტო მიკრობირთვების ანალიზი არის გენოტოქსიურობის ტესტი, რომელიც საშუალებას გვაძლევს მოვახდინოთ მიკრობირთვების დეტექცია ინტერფაზული უჯრედების ციტოპლაზმაში.

მიკრობირთვ(ებ)ის არსებობა წარმოადგენს დაზიანებას, რომელიც შვილეულ უჯრედებს გადაეცემა, განსხვავებით სხვა ქრომოსომული აბერაციებისაგან, თუმცა ორივე შემთხვევაში შესაძლოა გენეტიკური ცვლილება იყოს სიცოცხლესთან არათავსებადი და უჯრედის დაღუპვა გამოიწვიოს.

იმისათვის, რომ დავრწმუნდეთ მიკრობირთვების ანალიზით მიღებული შედეგების ობიექტურობაში, საჭიროა, დამზიანებელ აგენტთან ურთიერთქმედების შემდეგ გასული იყოს უჯრედების გაყოფისათვის საკმარისი დრო, ვინაიდან მიკრობირთვის წარმოქმნა ხდება გაყოფის პროცესში, კერძოდ მიტოზის/მეიოზის ტელოფაზაში. [9; 10; 7; 8; 11; 12; 13]

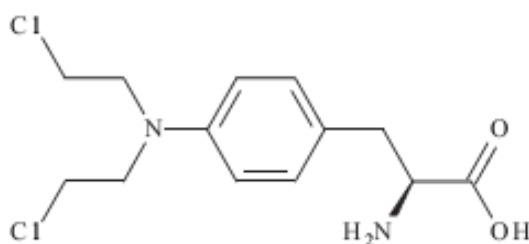
3.2 მელფალანი და მისი მოქმედების მექანიზმი

წმინდა და გამოყენებითი ქიმიის საერთაშორისო კავშირის (IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry) ნომენკლატურით პრეპარატის სისტემური დასახელებაა: 2-ამინო-3-[[4-ბის(2-ქლოროეთილ)ამინო]ფენილ] პროპანოლის მჟავა.

სინონიმები: ალანინ ნიტროგენ მუსტარდი, ალკერანი, L-ფენილალანინ მუსტარდი, L-ფენილალანინ მუსტარდ ჰიდროქლორიდი და სხვა.

მოლეკულური ფორმულა: $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O$

სტრუქტურული ფორმულა:



მოლეკულური მასა: 305.2

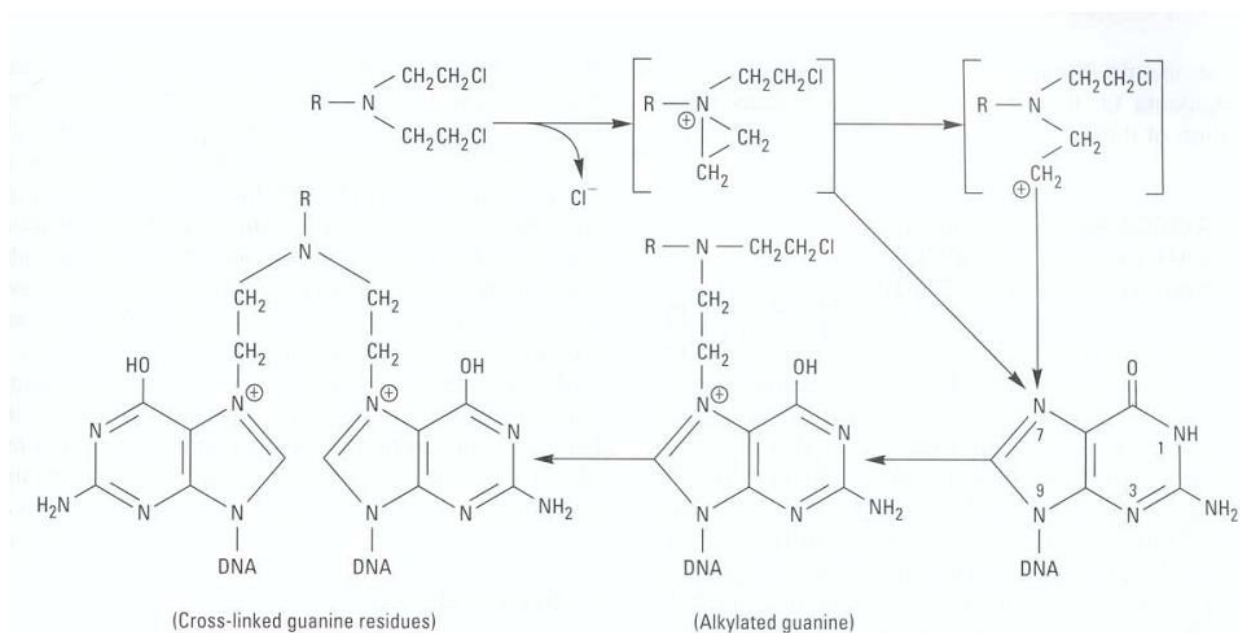
მელფალანი არის ანტისიმსივნური პრეპარატი, რომელიც მიეკუთვნება მაალკილირებელ საშუალებებს ნიტროგენ მუსტარდის ჯგუფიდან. პრეპარატი გამოიყენება მრავლობითი მიელომის, საკვერცხის ადენოკარცინომის, ძუძუს კიბოს, ნეირობლასტომისა და ერითერმიის დროს. [14] იგი თავდაპირველი გამოკვლევების საფუძველზე მიჩნეული იყო როგორც მელანომის საწინააღმდეგო პრეპარატი, მაგრამ შემდგომში დამტკიცდა, რომ ამ მხრივ არაეფექტურია, თუმცადა ეფექტურად მკურნალობს მიელომას. [15]

აბსორბციისა და დისტრიბუციის დროს არ ხდება მელფალანის მეტაბოლური გარდაქმნა. იგი ინაქტივირებულ მდგომარეობაში იმყოფება პლაზმაში და მხოლოდ არაფერმენტული ჰიდროლიზის გზით იშლება მონოჰიდროქსიმელფალანად და დიჰიდროქსიმელფალანად. ჰიდროლიზის ამ პროდუქტების გარდა მელფალანის სხვა მეტაბოლიტები ადამიანის ორგანიზმში არ არის აღმოჩენილი.

პრეპარატი უჯრედში შედის აქტიური ტრანსპორტის მეშვეობით. განსაკუთრებით მაღალი აფინიტეტი ახასიათებს L-ამინომჟავას სატრანსპორტო სისტემის მიმართ რომელიც გლუტამინისა და ლეიცინის ტრანსპორტირებისათვისაა განკუთვნილი. [14]

მოქმედების მექანიზმი

უჯრედში მოხვედრილი მელფალანი გადასცემს ალკილის ჯგუფს (მაგ. $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ან ჩაანაცვლებს მათ (მაგ. $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl}$) უჯრედულ მოლეკულებზე, როგორიცაა დნმ, რნმ და ცილები. ამ გზით მას შეუძლია გამოიწვიოს უჯრედის სიკვდილი, განსაკუთრებით თუ იგი დაუკავშირდა დნმ-ს. ამ უკანასკნელთან მელფალანის ზმა ხორციელდება გუანინის N^7 ჯგუფზე, O^6 -ალკილგუანინის ანდა ადენინის N^3 პოზიციაზე. [5; 6] სურათი №3.1 [1]



სურათი №3.1. მაალკილირებელი პრეპარატის მოქმედება დნმ-ზე.

მელფალანის გენოტოქსიურობაზე ტესტირებებით დადგენილია, რომ დნმ-თან დაკავშირებით მას შეუძლია გამოიწვიოს ლეტალური მუტაციები, ქრომოსომული აბერაციები, მიკრობირთვების წარმოქმნა და დნმ-ის გაწყვეტა. აღნიშნული ცვლილებების გამო კვლევებმა აჩვენა, რომ პაციენტებში, რომლებიც მელფალანს ღებულობენ, აღინიშნება მწვავე მიელოიდური ლეიკემიის გაზრდილი რისკი. ლეიკემიის განვითარების ალბათობა იცვლება პაციენტის ასაკის, პრეპარატის დოზისა და ორგანიზმში მისი აკუმულაციის გათვალისწინებით. უმეტეს შემთხვევებში ლეიკემიის განვითარება იწყება მკურნალობის დაწყებიდან მეორე წელს და რისკი მაქსიმუმს აღწევს მე-5-10 წლებში. ამასთან ხშირ შემთხვევაში თავდაპირველად აღინიშნება მიელოდისპლასტიური სინდრომი (MDS) რომელიც შემდგომ გადაიზრდება მწვავე ლეიკემიაში. [5; 14; 16; 17]

ნაჩვენებია, რომ მაალკილირებელი საშუალებებით (ხშირად სხვა ჯგუფის პრეპარატებთან კომბინაციაში გამოყენების დროს) გამოწვეული მწვავე მიელოიდური

ლეიკემიისას ხშირად ხდება მე-5 და მე-7 ქრომოსომის როგორც მთლიანად დაკარგვა, ასევე ამ ქრომოსომების გრძელი მხრის დელეცია. [14] არ არის გამორიცხული, რომ სწორედ ეს ქრომოსომები ან ქრომოსომის ეს უბნები შედის წარმოქმნილი მიკრობირთვების შემადგენლობაში.

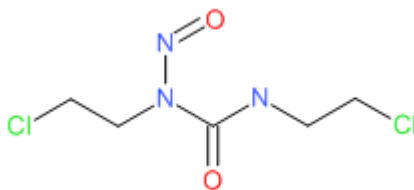
მიუხედავად არსებული მტკიცებულებებისა, რომ მელფალანი სპეციფიკურად იწვევს მე-5 ან მე-7 ქრომოსომის დაზიანებას/დაკარგვას, არსებობს ექსპერიმენტული მოდელები, რომელშიც იგი არასპეციფიკურ ქრომოსომულ ცვლილებებს იწვევს. მაგალითად, მელფალანით მკურნალობის შედეგად გამოწვეული მწვავე მიელოიდური ლეიკემიის დროს ხშირად აღინიშნება p15 პრომოუტერის მეთილაცია. [14]

3.3 კარმუსტინი და მისი მოქმედების მექანიზმი

კარმუსტინი (1,3-ბის-(2-ქლორეთილ)-1-ნიტროზოურეა) წარმოადგენს ნიტროზო-ურეას ჯგუფის ბიფუნქციონალურ მაალკილირებელ პრეპარატს.

ქიმიური ფორმულა: $C_5H_9Cl_2N_3O_2$

სტრუქტურული ფორმულა:



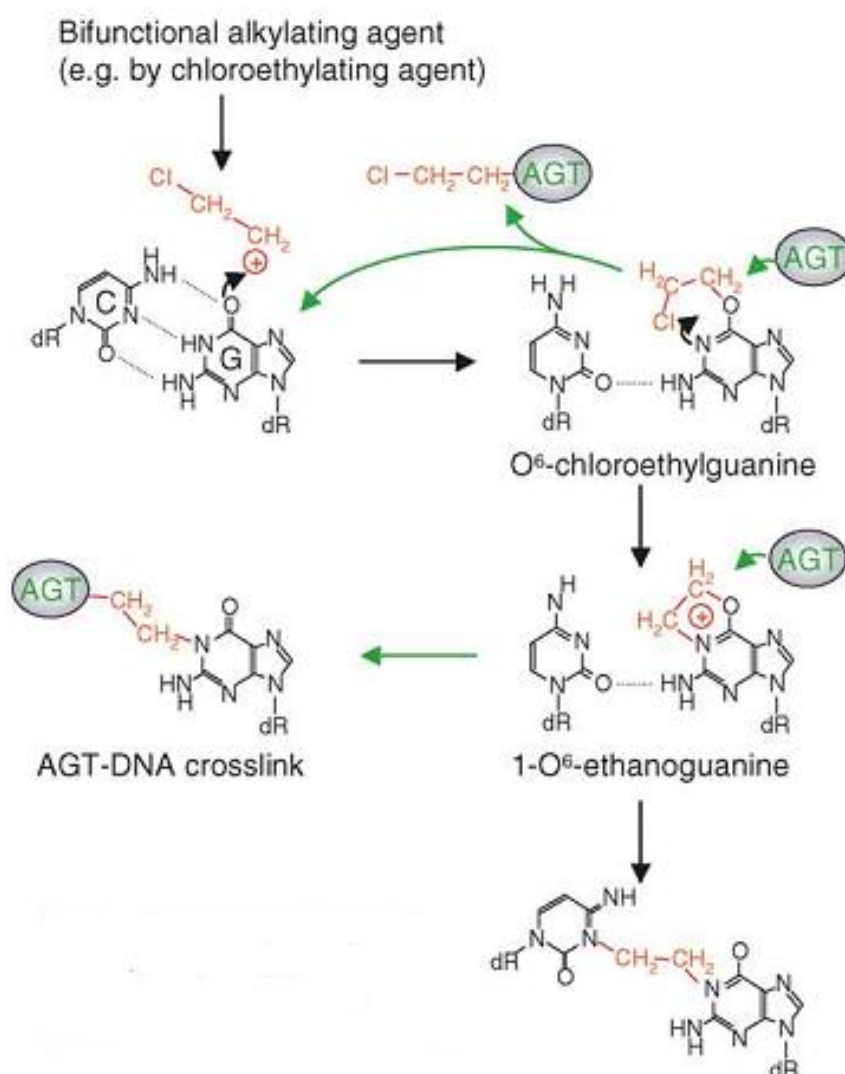
მოლური მასა: 214.05 გ/მოლი

1977 წელს პირველად აშშ-ში დამტკიცდა მისი კლინიკურ თერაპიაში გამოყენების ნებადართულობა. დღეისათვის იგი ფართოდ გამოიყენება მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყანაში, როგორც მკერდის, კუჭის, ღვიძლის, პანკრეასის, ფილტვის, თავის ტვინის, საკვერცხეების, სათესლეების სიმსივნის ასევე ავთვისებიანი მელანომის, ჰოჯკინისა და არაჰოჯკინის ლიმფომების, მიელომის საწინააღმდეგო საშუალება. იგი კლავს სიმსივნურ უჯრედებს მათში აპოპტოზის ინდუცირების გზით. მისი LD₅₀-ია 20 მგ/კგ. [18; 19; 20]

პრეპარატის გვერდითი ეფექტებიდან აღსანიშნავია მისი ტოქსიკურობა ფილტვის, ღვიძლის, თირკმელების, კუჭ-ნაწლავის, სისხმწარმომქმნელ ჯანმრთელ უჯრედებზე. აღსანიშნავია, რომ იგი ასევე იწვევს მიელოსუპრესიას და ზრდის ლეიკემიის განვითარების რისკს. [21]

მოქმედების მექანიზმი:

კარმუსტინისა და მელფალანის მოქმედების მექანიზმი ერთმანეთის მსგავსია. კარმუსტინიც გადასცემს ალკილის ჯგუფს (მაგ. $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ან ჩანაცვლებს მათ (მაგ. $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl}$) უჯრედულ მოლეკულებზე, როგორცაა დნმ, რნმ და ცილები. ვინაიდან იგი ბიფუნქციონალურ მაალკილირებელ აგენტს წარმოადგენს, მისი მოქმედების პირველადმა პროდუქტმა (მაგ.: O^6 -chloroethylguanine-მა) შესაძლოა მეორადად დნმ-ის ალკილირება გამოიწვიოს, რაც რეპარაციული სისტემის არაეფექტური მოქმედებისას გენომის დაზიანებითა და საბოლოოდ მუტაციის წარმოქმნით ანდა უჯრედის სიკვდილით შეიძლება დასრულდეს. [19; 22; 23; 24] სურათი №3.2 [19]



სურათი №3.2 O^6 -ქლორეთილგუანინის მოქმედება დნმ-ზე.

AGT - O^6 -ალკილგუანინ-დნმ ალკილტრანსფერაზა მონაწილეობს რეპარაციაში.

3.4 ცისპლატინი და მისი მოქმედების მექანიზმი

საუკუნეზე მეტია, რაც ცნობილია ნაერთი - $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$. პირველად მისი სინთეზი 1845 წელს მოხდა. არსებობს აღნიშნული ნაერთის ორი იზომერი: ტრანს- $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$ და ცის- $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$. ეს უკანასკნელი, სრული დასახელებით ცის-დიამინოდოქლოროპლატინა(II) (იგივე ცის-DDP, CDDP, CP და სხვა) ცნობილია, როგორც ცისპლატინი. (სტრუქტურას სახელი 1893 წელს უწოდა ალფრედ ვერნერმა). [25] მისი, როგორც ანტისიმბიოზური აგენტის გამოცდა დაიწყო ადრეულ 60-იან წლებში, როდესაც როზენბერგი და მისი ჯგუფი აკვირდებოდა *Escherichia Coli*-ს ზრდას ელექტრულ ველში, რომელიც წარმოიქმნებოდა პლატინის ელექტროდებსა და NH_4Cl -ის წყალხსნარს შორის. მეცნიერებისათვის მოულოდნელად ამან *Coli*-ში გამოიწვია ფილამენტების ზრდა, თუმცა შემდგომი გამოკვლევებით დადგინდა, რომ ეს განპირობებული იყო არა ელექტრული ველით, არამედ რეაქციისას წარმოქმნილი პლატინის შემცველი ნაერთებით. განსაკუთრებით ეფექტური აღმოჩნდა ცის- $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$.

შემდგომი გამოკვლევები ჩატარდა ვირთავებზე სადაც ნაჩვენები იყო სრული რემისია სხვადასხვა ტიპის სარკომების დროს. 1972 წლიდან ცისპლატინმა წარმატებით გაიარა კლინიკური გამოცდა და დღესდღეობით ერთ-ერთი ფართოდ გამოიყენებადი ქიმიოპრეპარატია ნეოპლაზიის წინააღმდეგ. იგი მიეკუთვნება სხვა მაალკილირებელი (იგივე მაალკილირებელის მსგავსი) პრეპარატების ჯგუფს. [25; 26; 27]

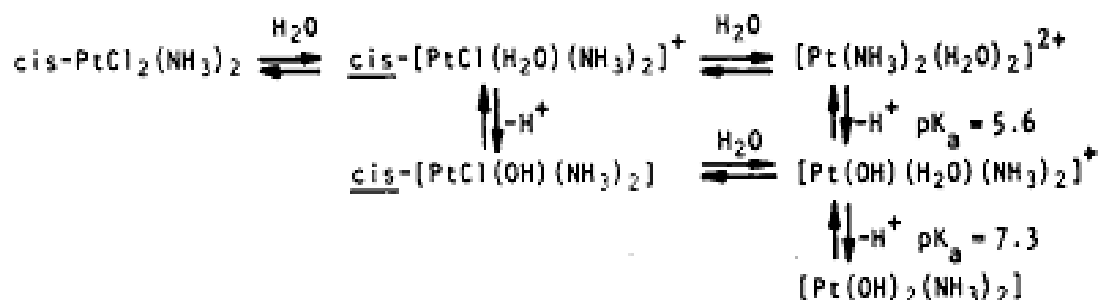
მოქმედების მექანიზმი

პრეპარატის აქტივაციისათვის, იმისათვის რომ სწრაფად მოხდეს მისი ურთიერთქმედება დნმ-თან, რნმ-თან და/ან ცილებთან, საჭიროა მისი ჰიდროლიზური დაშლა. ადამიანის სისხლში არსებული Cl^- იონების მაღალი კონცენტრაცია ხელს უშლის აღნიშნულ პროცესს და შესაბამისად ცისპლატინის უმნიშვნელო რაოდენობა ჰიდროლიზირდება, [26] თუმცა, აღმოჩნდა, რომ პრეპარატს იერთებს სისხლის პლაზმაში არსებული თიოლის ჯგუფის შემცველი ნაერთები, მაგ. როგორცაა ალბუმინი და ამინომჟავა ცისტეინი. აღნიშნულის გამო პრეპარატის მიღებიდან ერთი დღის შემდეგ შესაძლოა მისი 65-98% ინაქტივირებული იქნეს და ამასთან გამოიწვიოს სხვა არასასურველი გვერდითი მოვლენები.

აღსანიშნავია, რომ უჯრედების შემადგენლობაშიც შედის თიოლის შემცველი ნაერთები, როგორცაა გლუტათიონი და მეტალოთიონინი, რამაც ასევე შეიძლება გამოიწვიოს პრეპარატის ინაქტივაცია. [27]

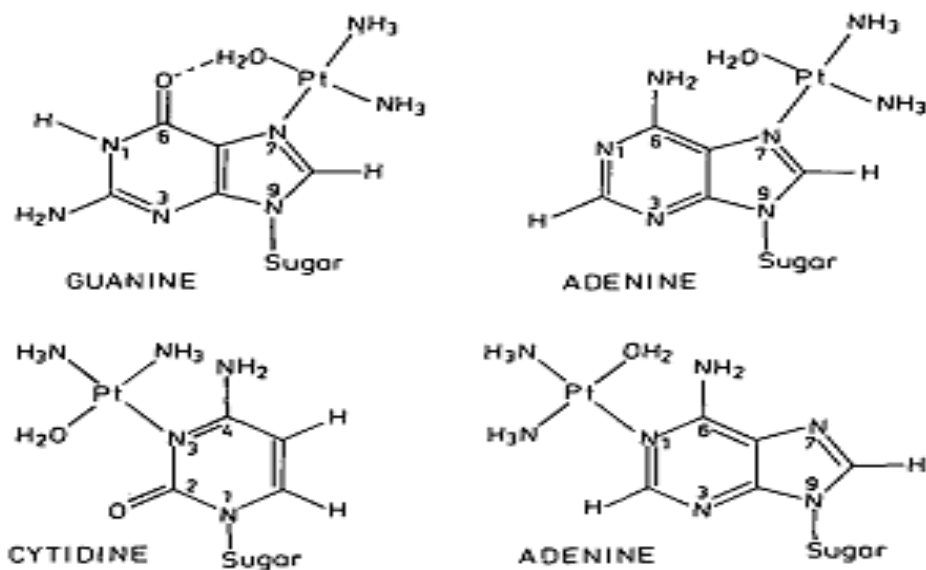
ცისპლატინს აქვს უნარი, დიფუზიის გზით შეაღწიოს ნებისმიერი ტიპის უჯრედში. თუმცა უკანასკნელი მონაცემებით ცნობილი გახდა, ამის გარდა, დასაშვებია იგი აქტიური ტრანსპორტით მოხვდეს უჯრედში Cu-ტრანსპორტერი ცილების მეშვეობით. [26; 27]

იმის გამო, რომ უჯრედი მცირე რაოდენობით შეიცავს Cl^- იონებს, მასში მოხვედრილი ცისპლატინი ჰიდროლიზის გზით იშლება. სურათი №3.3



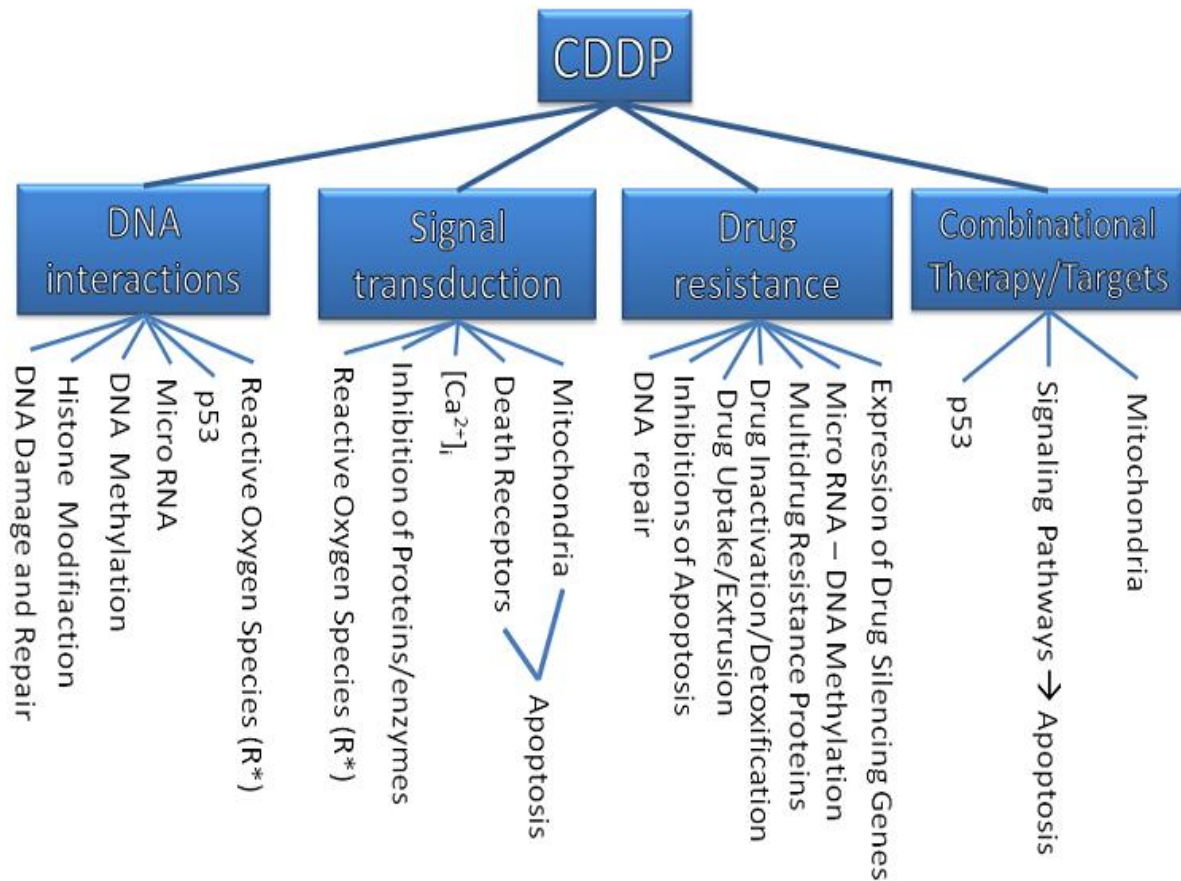
სურათი №3.3 ცისპლატინის ჰიდროლიზური დაშლა

წარმოქმნილი ჰიდროლიზური პროდუქტების ერთ-ერთი მთავარი სამიზნე უჯრედში დნმ-ია. მიუხედავად იმისა, რომ დნმ-ს მრავალი საიტი აქვს სადაც შეიძლება მოხდეს მეტალის ბმა, ცდებმა დაადასტურა, რომ ცისპლატინი უკავშირდება ნუკლეოტიდებში შემავალ აზოტის ატომებს ისე, როგორც სურათი №3.4-ზეა გამოსახული. [26]



სურათი №3.4 ცისპლატინის ჰიდროლიზური პროდუქტების ბმა ნუკლეოტიდების შემადგენლობაში შემავალ აზოტის ატომებთან.

დნმ-ის ეს მნიშვნელოვანი დაზიანება იწვევს მიკრობირთვების ფორმირებას, ჰომოლოგიურ ქრომოსომებს შორის გენეტიკური მასალის მიმოცვლასა და ქრომოსომულ აბერაციებს. რასაც შესაძლოა მოჰყვეს რეპარაციის სისტემის გააქტივება ანდა აპოპტოზის სიგნალის ინიცირება, რაც საბოლოოდ უჯრედის სიკვდილით მთავრდება. ამასთან ერთად პრეპარატს ახასიათებს მოქმედების ფართო სპექტრი. სურათი №3.5 [5; 25]



სურათი №3.5 ცისპლატინის უჯრედული სამიზნეები.

პლატინის კომპლექსის უნარის გამო, გამოიწვიოს უჯრედის სიკვდილი, ცისპლატინი გამოიყენება როგორც ფართო სპექტრის ანტისიმსივნური პრეპარატი. მას ხმარობენ ისეთი სიმსივნეების წინააღმდეგ, როგორიცაა სათესლე ჯირკვლების, საკვერცხეების, შარდის ბუშტის, თავისა და კისრის, საელაპავი მილის, ფილტვის, კუჭის, მკერდის, საშვილოსნოს ყელის, პროსტატის სიმსივნეები. ასევე ჰოჯკინისა და არა-ჰოჯკინის ლიმფომების, ნეირობლასტომის, სარკომის, მრავალჯერადი მიელომის, მელანომისა და მეზოთელიომის დროს.

რამდენადაც პრეპარატის მაღალტოქსიკურობა სასარგებლოა კიბოს წინააღმდეგ ბრძოლისათვის, იმდენად საშიშია მისი გვერდითი ეფექტები. განსაკუთრებით გასათვალისწინებელია, რომ ცისპლატინის მოქმედების შედეგად სისხლის უჯრედების რაოდენობა მცირდება, ვინაიდან იგი იწვევს მიელოსუპრესიას, ძვლის ტვინის სისხლწარმომქმნელი უჯრედების დაზიანებას შედეგად იმუნოსუპრესიაც მოსდევს. ცისპლატინის მიერ გამოწვეული ლეიკემია ძნელად ექვემდებარება მკურნალობას და ხშირია ლეტალური გამოსავალი, თუმცა ცნობილია, რომ თავად ლეიკემიის განვითარების რისკი ნაკლებია ვიდრე მაალკილირებელი პრეპარატების გამოყენების შემთხვევაში.

ზემოთ არნიშნულის გარდა, პრეპარატს ახასიათებს ნეფრო-, ნეირო-, კარდიო- და ჰეპატოტოქსიკურობა, სმენის დაკარგვა, ღებინება და სხვა თანმდევი გვერდითი ეფექტები. [2; 5; 25; 26; 27; 28]

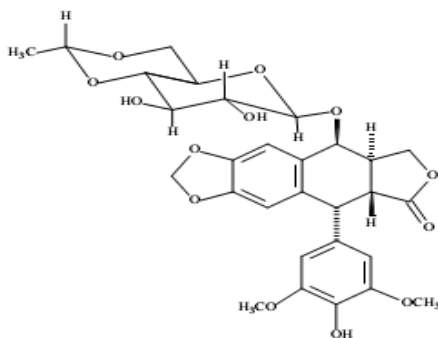
3.5 ეტოპოზიდი და მისი მოქმედების მექანიზმი

წმინდა და გამოყენებითი ქიმიის საერთაშორისო კავშირის (IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry) ნომენკლატურით პრეპარატის სისტემური დასახელებაა: 4'-დემეთილეპიპოდოფილოტოქსინ 9-(4,6-O-(R)-ეთილიდენ-β-D-გლუკოპირანოზიდი).

სინონიმები: ტრანს-ეტოპოზიდი, VP 16, VP 16-123 და სხვა.

მოლეკულური ფორმულა: $C_{29}H_{32}O_{13}$

სტრუქტურული ფორმულა:



მოლეკულური მასა: 588.57

ეტოპოზიდი არის პოდოფილოტოქსინის ნახევრად სინთეზური წარმოებული, რომლის სინთეზიც პირველად 1963 წელს მოხდა. პოდოფილოტოქსინი მიიღება Podophyllin-ის გვარის მცენარეებისგან, როგორიცაა მაისის ვაშლი ან ამერიკული მანდრაგორა (Podophyllin peltatum L.). 1971 წელს მოხდა პრეპარატის პირველი კლინიკური გამოცდა, ხოლო 1983 წლიდან იგი აქტიურად გამოიყენება მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში. პრეპარატი განსაკუთრებით ეფექტურია არა-ჰოქსინის ლიმფომის დროს, ასევე ისეთი სიმსივნეების სამკურნალოდ, როგორიცაა ფილტვის, ღვიძლის, სათესლეების, ძუძუს კიბო, ლეიკემია, ლიმფომა, ადენოკარცინომა და სხვა. [29; 30; 31; 32]

პრეპარატი გამოიყენება როგორც მონოთერაპიის დროს, ასევე სხვა წამლებთან კომბინაციებში. განსაკუთრებით ეფექტურია მისი ცისპლატინთან ან ბლეომიცინთან ერთად გამოყენება. [31; 32]

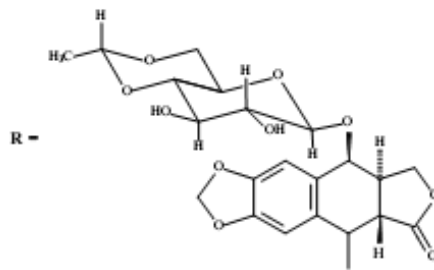
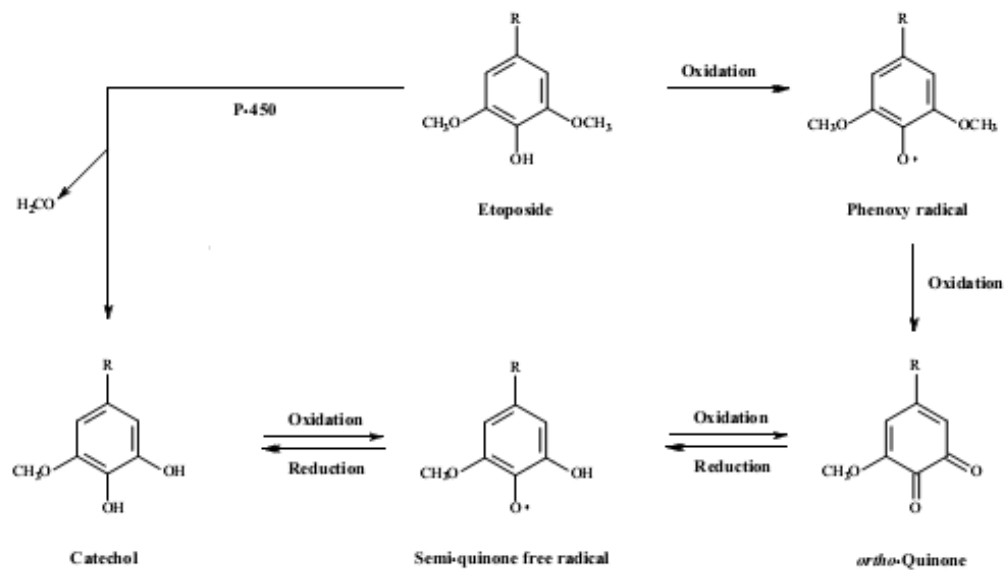
გვერდითი ეფექტები

ეტოპოზიდის ორგანიზმში შეყვანის შედეგად (არა აქვს მნიშვნელობა ორალური გზით იქნება თუ ინტრავენული) აღინიშნება ისეთი გვერდითი ეფექტები როგორიცაა: ჰემატოლოგიური ტოქსიკურობა, რაც მიეღოსუპრესიაში გამოიხატება; მწვავე მიელოიდური ლეიკემია (თუმცა აღნიშნული ეფექტი ზემოთ აღწერილ მაალკილირებელ პრეპარატებთან შედარებით ნაკლებია); კუჭ-ნაწლავის სისტემის მიმართ ტოქსიკურობა, რის გამოც გამოწვეულმა გულისრევებმაც შეიძლება ისეთი მასშტაბური ხასიათი მიიღოს, რომ მკურნალობის შეწყვეტა გახდეს საჭირო; ჰიპოტენზია; ანაფილაქსიის მსგავსი რეაქცია და სხვა. [31]

მოქმედების მექანიზმი

ეტოპოზიდს აქვს მოქმედების 2 ძირითადი მექანიზმი, რომლითაც მან შეიძლება გამოიწვიოს მუტაცია. ესენია:

1. იწვევს ტოპოიზომერაზა II-ის ინჰიბირებას. იგი სპეციფიკურად მოქმედებს მხოლოდ ეუკარიოტული უჯრედების ტოპოიზომერაზა II-ზე და ხელს არ უშლის ამ უკანასკნელის აქტივობას ბაქტერიულ უჯრედში.
2. ახასიათებს დამჟანგველი აქტივობა. უმეტესად ჟანგავს 4'-ფენოლის ჰიდროქსი ჯგუფებს და შედეგად წარმოიქმნება თავისუფალი რადიკალები. სურათი №3.6 [32]



From Mans *et al.* (1990)
P-450, cytochrome P450 mixed-function oxidases

სურათი №3.6 ეტოპოზიდის დამჟანგველი მოქმედება.

აღნიშნული მექანიზმებით პრეპარატმა შესაძლოა გამოიწვიოს სხვადასხვა ტიპის მუტაციური ცვლილებები, დნმ-ის ორმაგი სპირალის გაწყვეტა, ქრომოსომული აბერაციები, მიკრობირთვების ფორმირება, ჰომოლოგიურ ქრომოსომებს შორის უბნების გაცვლები, ქრომოსომების დელეცია, ტრანსლოკაცია, ცენტრომერული დნმ-ის ფრაგმენტაცია და სხვა. ამასთან ნაჩვენებია, რომ ეტოპოზიდით გამოწვეული ქრომოსომული ცვლილებები ძირითადად ვლინდება 1-ელ, მე-11 და მე-17 ქრომოსომებზე. უმეტესად სწორედ გენომის ამგვარი დაზიანება ხდება პრეპარატის ციტოტოქსიკურობის საფუძველი. [32]

4. გამოყენებული მასალები და მეთოდები

4.1 კვლევის ობიექტი

საკვლევ ობიექტს წარმოადგენს TK6 (თიმიდინ კინაზა ჰეტეროზიგოტული) ლიმფობლასტური უჯრედები.

მახასიათებლები:

აღნიშნული კულტურა არის CD19 დადებითი. პოპულაციის 50% ასევე აქსპრესირებს CD20, ხოლო მცირე სუბპოპულაცია CD22 მარკერებს. შეიცავს X,Y სასქესო ქრომოსომებს. [33]

კულტივაციის მეთოდოლოგია:

უჯრედული კულტურა ინახებოდა თხევად აზოტში -179°C -ზე. გამოღობის შემდეგ მათი კულტივაცია მოხდა ინკუბატორში 37°C -ზე 5 %-იანი CO_2 -ის თანაობისას ნესტიან ატმოსფეროში. უჯრედული კულტურის ახალ საკვებ არეზე გადათესვა ხდებოდა კვირაში 3-ჯერ. ზრდისათვის გამოყენებული იყო დასრულებული RPMI 1640 მედიუმი (87% RPMI 1640 + 2% L გლუტამინი + 10% ჩანასახოვანი ხბოს შრატი (FBS) + 1 % პენიცილინ/სტრეპტომიცინი).

გადათესვისას ხდებოდა მედიუმში არსებული უჯრედული მასის ცენტრიფუგირება (1300 ბრუნზე 10 წუთის განმავლობაში). სუპერნატანტის გადაღვისა და 1 მლ. ახალ მედიუმში რესუსპენზირების შემდეგ ნიმუშიდან ხდებოდა 20 მკლ. სითხის აღება, ტრიპანის ლურჯის 4%-იანი ხსნარით შეღებვა და ჰემოციტომეტრის დახმარებით ცოცხალი უჯრედების შესაბამისი წესით დათვლა. ახალ საკვებ არეზე გადათესვისას უჯრედების კონცენტრაცია იყო 3×10^5 უჯრედი/მლ.

4.2 ექსპერიმენტის მსვლელობა

კულტურის გადათესვიდან/გამოკვებიდან 46-48 საათზე, როდესაც უჯრედები იმყოფებიან ზრდის ლოგარითმულ (log) ანუ ექსპონენციალურ ფაზაში, თითოეული ნიმუშისათვის 5×10^5 უჯრედის გადატანა ხდებოდა პლანშეტზე 1 მლ ახალ მედიუმში. კონტროლის გარდა პლანშეტის თითოეულ ფოსოში დამატებული იყო პრეპარატის სხვადასხვა კონცენტრაცია. შესწავლილ იქნა თითოეული წამლის 3 სხვადასხვა დოზა,

რომელთაგან მაქსიმუმი წარმოადგენდა კლინიკაში გამოყენებად დოზას (კგდ), ანუ კონცენტრაციას, რომლის ნახვაც მოსალოდნელია პაციენტის სისხლში აღნიშნული წამლით მკურნალობის შედეგად. ეს დოზებია:

მელფალანი - 0.3, 3 და 33 მკ. მოლი

კარმუსტინი - 0.1, 1 და 10 მკგ/მლ

ცისპლატინი - 0.03, 0.3 და 3 მკგ/მლ

ეტოპოზიდი - 0.1, 1 და 10 მკ. მოლი

პრეპარატის დამატების შემდეგ უჯრედული კულტურა თავსდება ინკუბატორში 37° C-ზე 5 %-იანი CO₂-ის თანაობისას ნესტიან ატმოსფეროში. ინკუბირების 24-ე საათზე ხდება თითოეულ ნიმუშში ცოცხალი უჯრედების რაოდენობის დათვლა ტრიპანის ლურჯის 4%-იანი ხსნარისა და ჰემოციტომეტრის გამოყენებით Nikon-ის ფირმის სინათლის მიკროსკოპში.

შემდეგ PBS (ფოსფატური ბუფერის) ხსნარისა და ციტოსპინის დახმარებით ცენტრიფუგირების (1300 ბრ.წთ.-ზე 10 წუთის განმავლობაში) შედეგად ხდება უჯრედული მასის სასაგნე მინაზე დატანა. ფიქსაციისათვის გამოყენებული იქნა 90%-იანი მეთანოლი (10წთ.). ფიქსაციის შემდეგ ხდება უჯრედების 12%-იანი აკრიდინ ორანჯით (AO) შეღებვა. შეღებვს შემდეგ ხდება სასაგნე მინაზე დაფიქსირებული უჯრედების გაშრობა და სინათლისაგან დაცულ თერმოსტატში შენახვა ფლუორესცენტულ მიკროსკოპში ვიზუალიზაციამდე.

უჯრედების მიკროსკოპული ანალიზი

სასაგნე მინაზე დატანილი უჯრედების ანალიზი მიმდინარეობდა Nikon Eclipse 80i ტიპის ფრუორესცენტული მიკროსკოპის გამოყენებით 40 გადიდებაზე წითელი და მწვანე ფილტრის ქვეშ.

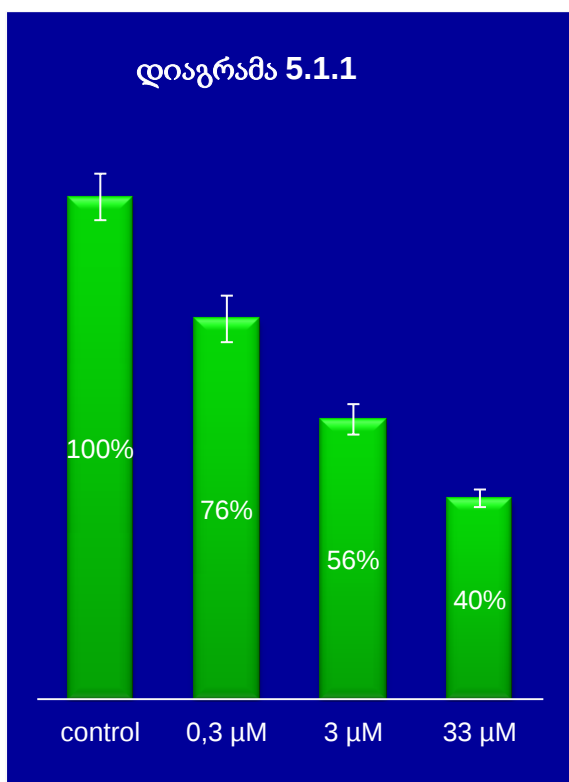
თითოეულ სასაგნე მინაზე, ანუ წამლის თითოეული კონცენტრაციისათვის დათვლილი და გაანალიზებული იყო 1000 უჯრედი და ის თუ ამ 1000-დან რამდენი უჯრედი იყო ნორმალური (ერთბირთვიანი), რამდენი ერთბირთვიანი უჯრედი შეიცავდა 1, 2 ან 3 მიკრობირთვს (მიკრობირთვების სხვადასხვა რაოდენობის შემცველი უჯრედები აღიწერებოდა ცალ-ცალკე), რამდენი იყო ორბირთვიანი და რამდენი ორბირთვიანი უჯრედი შეიცავდა მიკრობირთვ(ებ)ს. ასევე დათვლილი იქნა აპოპტოზის პროცესში მყოფი, „გატეხილი კვერცხის სინდრომის“ (blebbed) მქონე და მრავალბირთვიანი უჯრედები. (იხ. დანართი)

5. მიღებული შედეგები და მათი ანალიზი

როგორც ზემოთაა აღნიშნული, შესწავლილ იქნა ოთხი ანტისიმსივნური პრეპარატი. თითოეული პრეპარატისათვის 3 სხვადასხვა დოზა, რომელთაგან მაქსიმალური წარმოადგენს კლინიკაში გამოყენებად დოზას (კგდ). ექსპერიმენტის სანდოობისათვის თითოეულ პრეპარატზე ცდა გამეორდა სამჯერ.

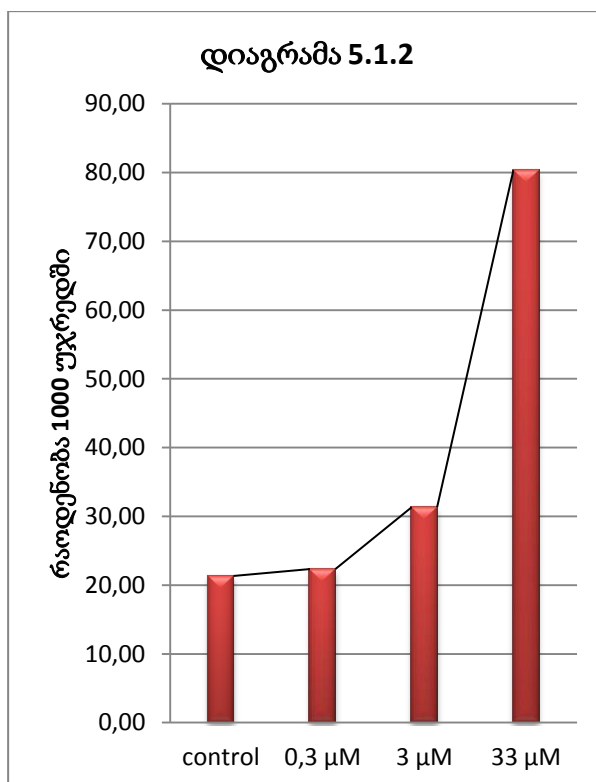
მიღებული შედეგები - თითოეული პრეპარატის სხვადასხვა პარამეტრების პრეპარატის დოზადამოკიდებული ცვლილება მოცემულია დიაგრამების სახით (იხ. ქვემოთ).

5.1 მეღვალანის ზემოქმედებით გამოწვეული ეფექტები



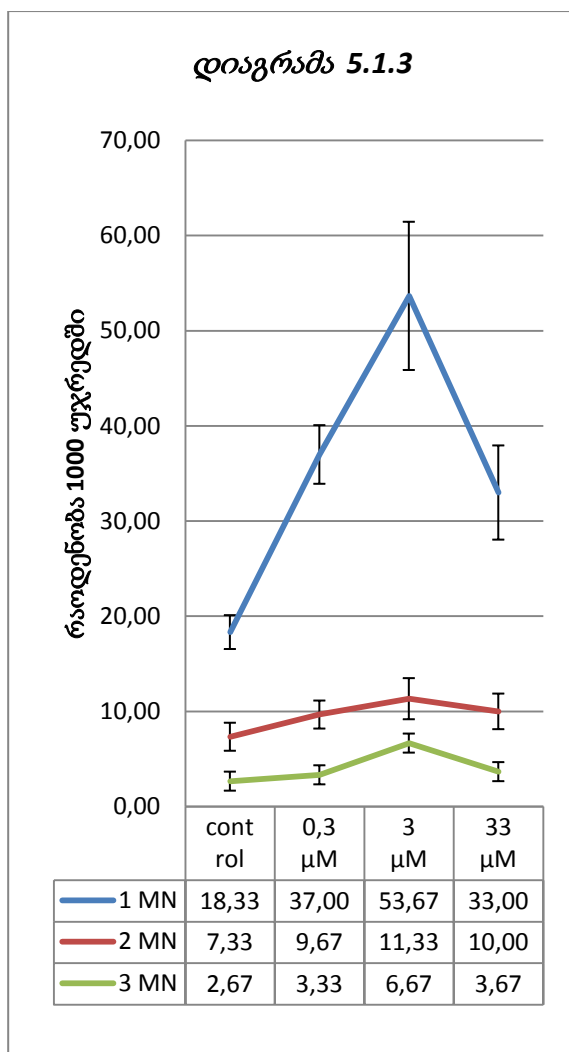
დიაგრამა 5.1.1 ცოცხალი უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება.

მეღვალანი / 24 სთ.

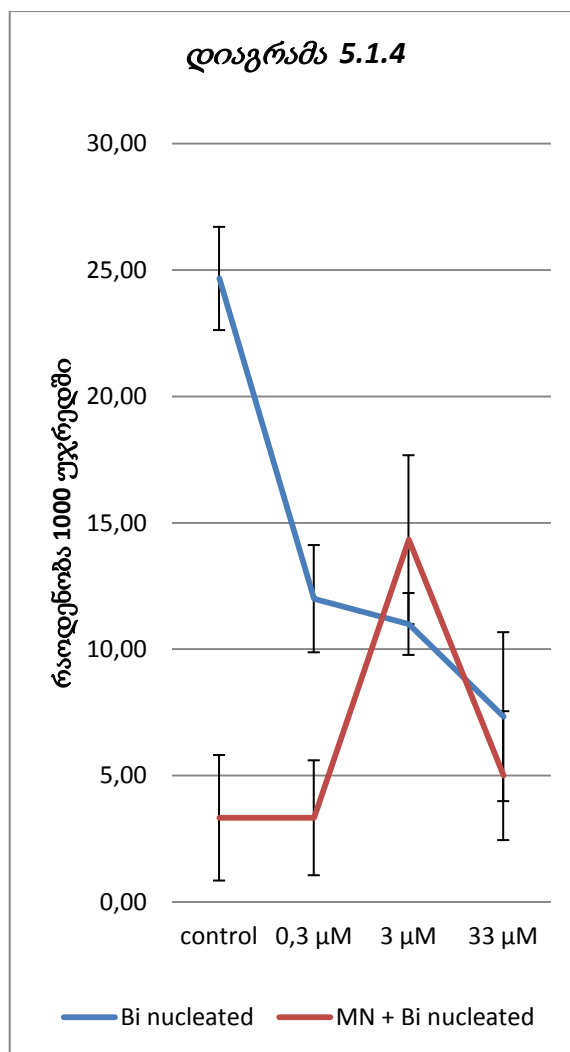


დიაგრამა 5.1.2 აპოპტოზური უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება.

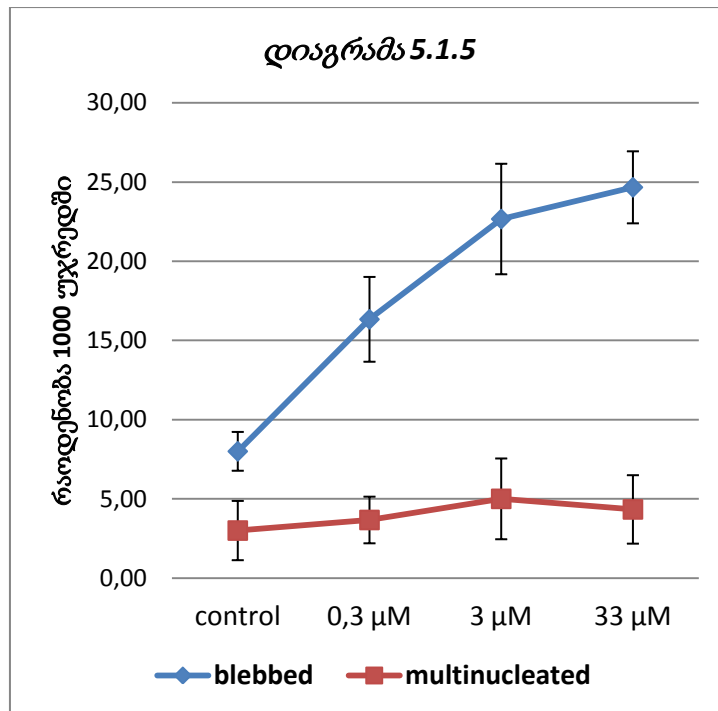
მეღვალანი / 24 სთ.



დიაგრამა 5.1.3 ერთ (1MN), ორ (2MN) და სამ (3MN) მიკრობირთვის შემცველი ერთ-ბირთვიანი უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. მელფალანი / 24 სთ.



დიაგრამა 5.1.4 ორბირთვიანი (Bi nucleated) უჯრედებისა და მიკრობირთვების შემცველი ორბირთვიანი (MN + Bi nucleated) უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. მელფალანი / 24 სთ.



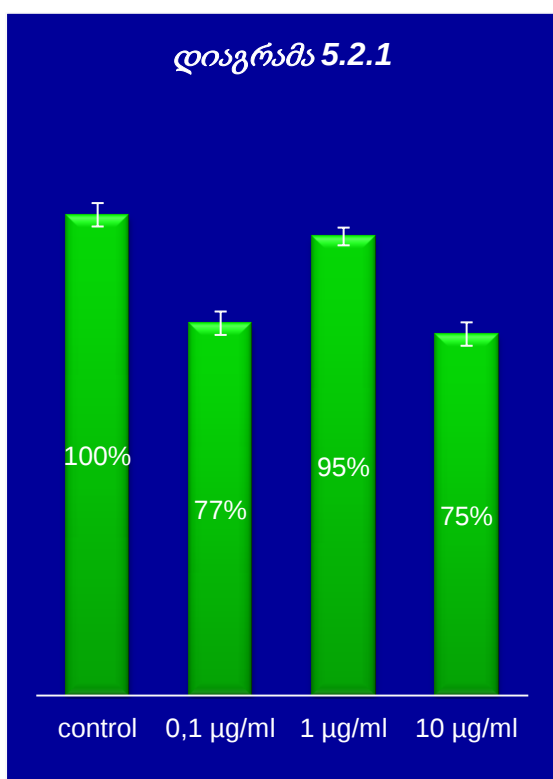
დიაგრამა 5.1.5 „გატეხილი კვერცხის სინდრომისა“ (blebbed) და მრავალბირთვიანი (multinucleated) უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. მელფალანი / 24 სთ.

მიღებული დიაგრამების ანალიზის შედეგად შეგვიძლია ვიმსჯელოთ, რომ:

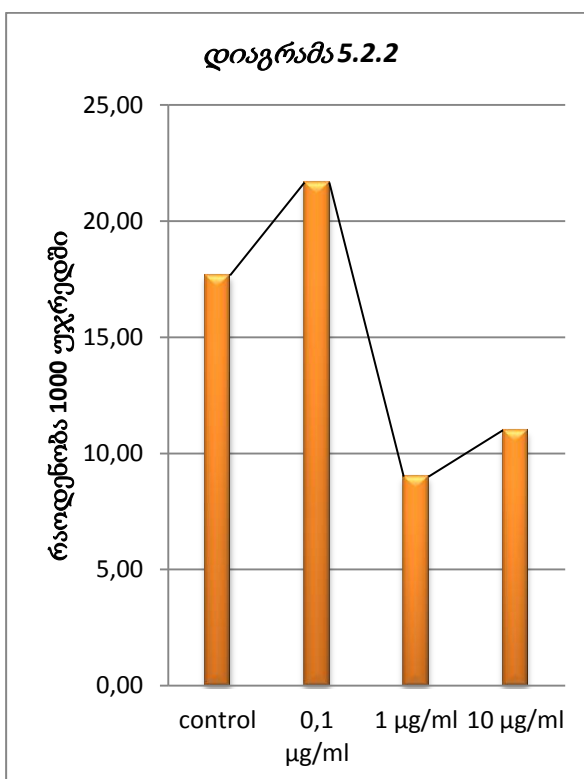
1. მელფალანი დამთრგუნველად მოქმედებს უჯრედების რაოდენობის ზრდაზე. წამლის კონცენტრაციის მატების პროპორციულად კლებულობს კულტურაში ცოცხალი უჯრედების რაოდენობა.
2. მელფალანის კლინიკაში გამოყენებადი დოზა (კგდ) მნიშვნელოვნად ასტიმულირებს უჯრედების აპოპტოზს.
3. შესწავლილი დოზებიდან 3 მკ. მოლი ყველაზე მეტად იწვევს მიკრობირთვების ინდუქციას, ხოლო კგდ ამ მხრივ ყველაზე ნაკლებად გენოტოქსიკურია.
4. პრეპარატი ძირითადად იწვევს 1 მიკრობირთვის ფორმირებას და ფაქტიურად არ მოქმედებს 2 და 3 მიკრობირთვიანი უჯრედების წარმოქმნაზე.
5. მელფალანი იწვევს ორბირთვიანი უჯრედების რაოდენობის შემცირებას.
6. ფაქტიურად არ მოქმედებს მრავალბირთვიანი უჯრედების ფორმირებაზე.

7. პრეპარატი იწვევს „გატეხილი კვერცხის სინდრომის“ მქონე უჯრედების წარმოქმნას. აღნიშნული ეფექტი ძლიერდება წამლის კონცენტრაციის მატებასთან ერთად.

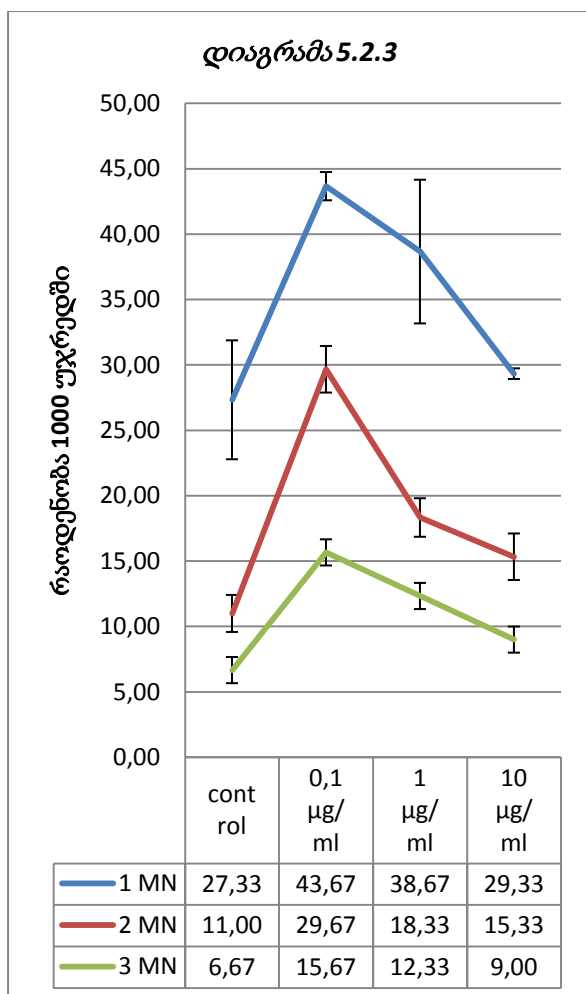
5.2 კარმუსტინის ზემოქმედებით გამოწვეული ეფექტები



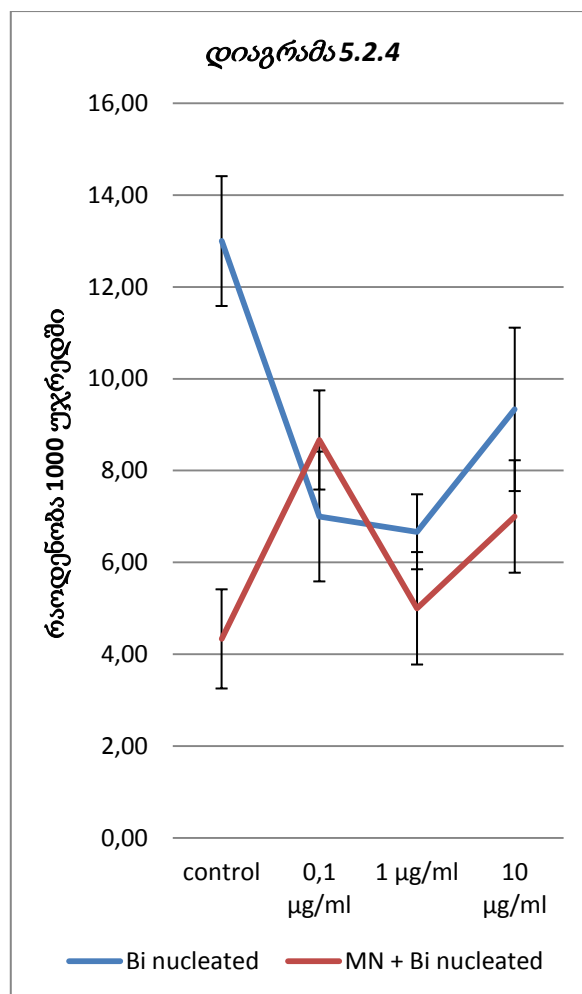
დიაგრამა 5.2.1 ცოცხალი უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება.
კარმუსტინი / 24 სთ.



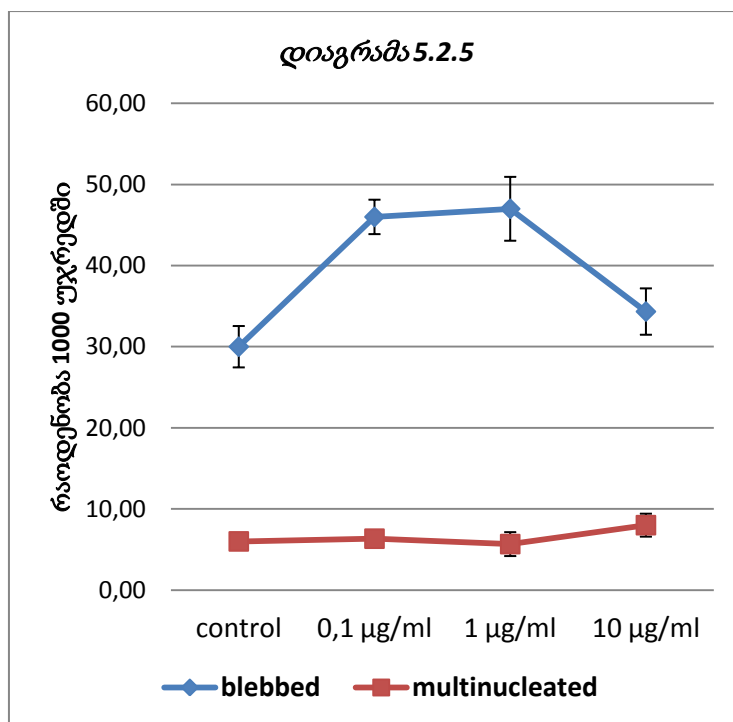
დიაგრამა 5.2.2 აპოპტოზური უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება.
კარმუსტინი / 24 სთ.



დიაგრამა 5.2.3 ერთ (1MN), ორ (2MN) და სამ (3MN) მიკრობირთვის შემცველი ერთ-ბირთვიანი უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. კარმუსტინი / 24 სთ.



დიაგრამა 5.2.4 ორბირთვიანი (Bi nucleated) უჯრედებისა და მიკრობირთვების შემცველი ორბირთვიანი (MN + Bi nucleated) უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. კარმუსტინი / 24 სთ.



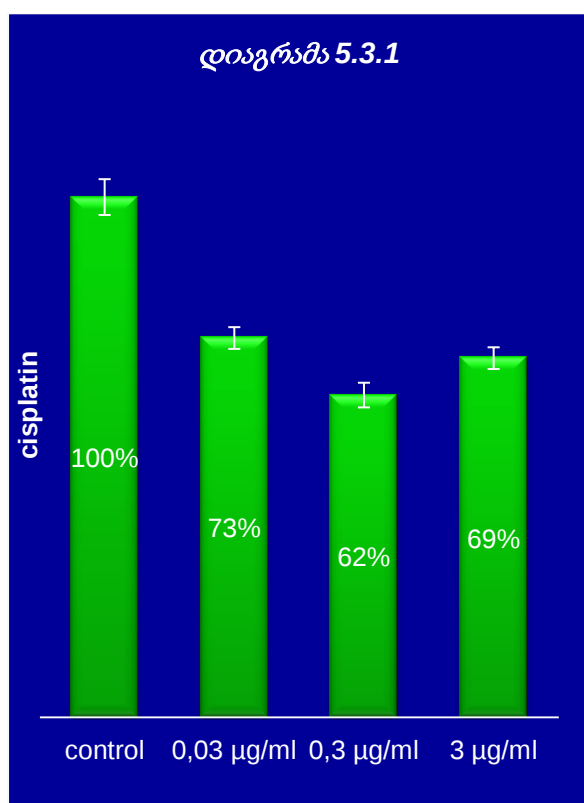
დიაგრამა 5.2.5 „გატეხილი კვერცხის სინდრომისა“ (blebbed) და მრავალბირთვიანი (multinucleated) უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. კარმუსტინი / 24 სთ.

მიღებული შედეგების ანალიზის შედეგად შეგვიძლია ვიმსჯელოთ, რომ:

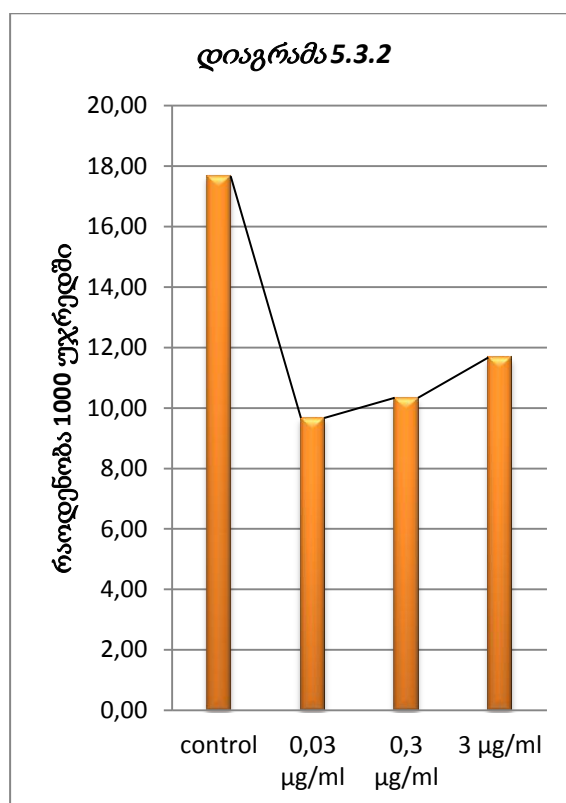
1. კარმუსტინის შესწავლილი კონცენტრაციებიდან 0,1 µg/ml იწვევს აპოპტოზის ინდუქციას, რაც სავარაუდოდ ერთ-ერთი მიზეზია იმისა, რომ ამ კონცენტრაციაზე აღინიშნება უჯრედების რაოდენობის შემცირება, ხოლო 1 µg/ml დოზა პირიქით, თრგუნავს აპოპტოზს რითაც შეიძლება აიხსნას ამ კონცენტრაციაზე კონტროლთან მაქსიმალურად მიახლოებული უჯრედების რაოდენობა.
2. კგდ-ს (10 µg/ml) თრგუნავს აპოპტოზს, თუმცაღა ამ დოზაზე აღინიშნება უჯრედების ზრდის მაქსიმალური დათრგუნვა, რაც უკვე სხვა მექანიზმებითაა გამოწვეული.
3. პრეპარატი თანაბრად ასტიმულირებს როგორც ერთ, ისე ორ და სამ მიკრობირთვიანი უჯრედების წარმოქმნას. მაქსიმალური მასტიმულირებელი ეფექტი ახასიათებს წამლის 0,1 µg/ml კონცენტრაციას, ხოლო მინიმალური - კგდ-ს.

4. კარმუსტინი დამთრგუნველად მოქმედებს ორბირთვიანი უჯრედების წარმოქმნაზე, თუმცა ხელს უწყობს მათში მიკრობირთვების ფორმირებას.
5. პრეპარატის დაბალი კონცენტრაციები ასტიმულირებს „ბაინდიანი“ უჯრედების წარმოქმნას, ხოლო კვლევებზე ნაკლებად გენოტოქსიკურია ამ მხრივ.
6. კარმუსტინი არ მოქმედებს მრავალბირთვიანი უჯრედების რაოდენობის ცვლილებაზე.

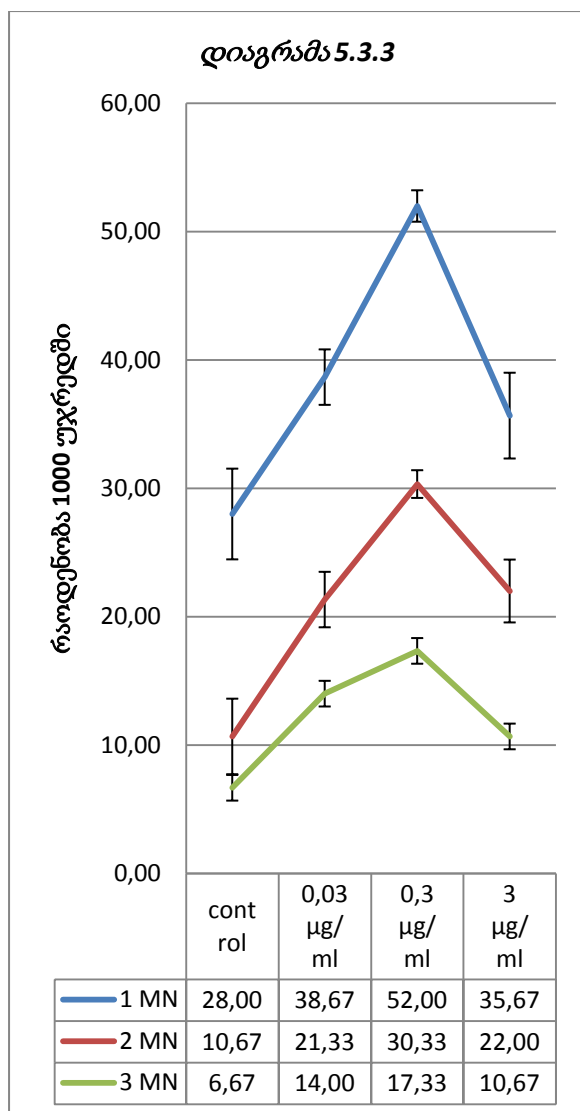
5.3 ცისპლატინის ზემოქმედებით გამოწვეული ეფექტები



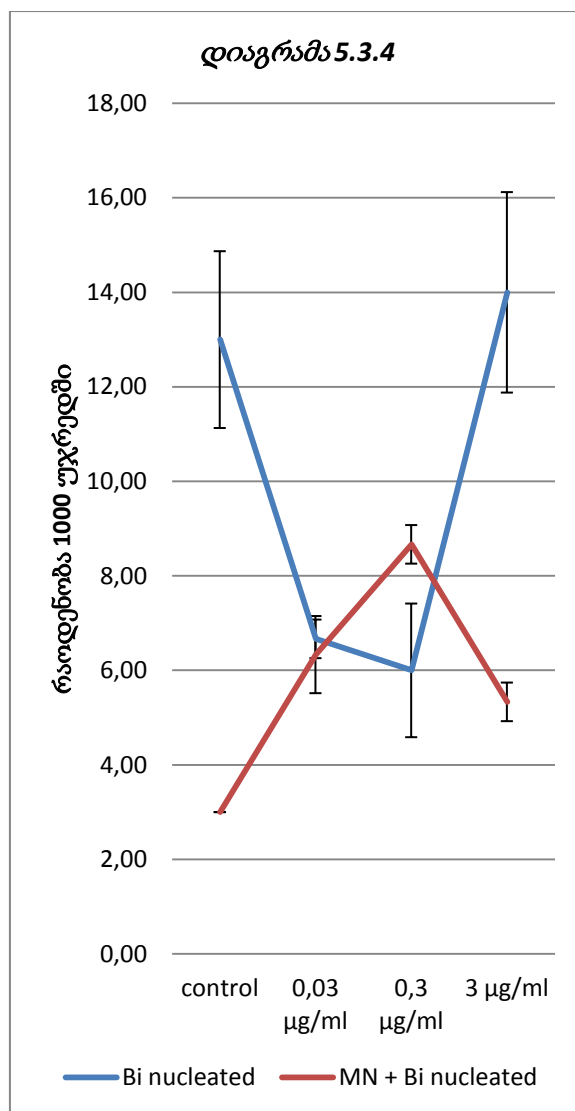
დიაგრამა 5.3.1 ცოცხალი უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება.
ცისპლატინი / 24 სთ.



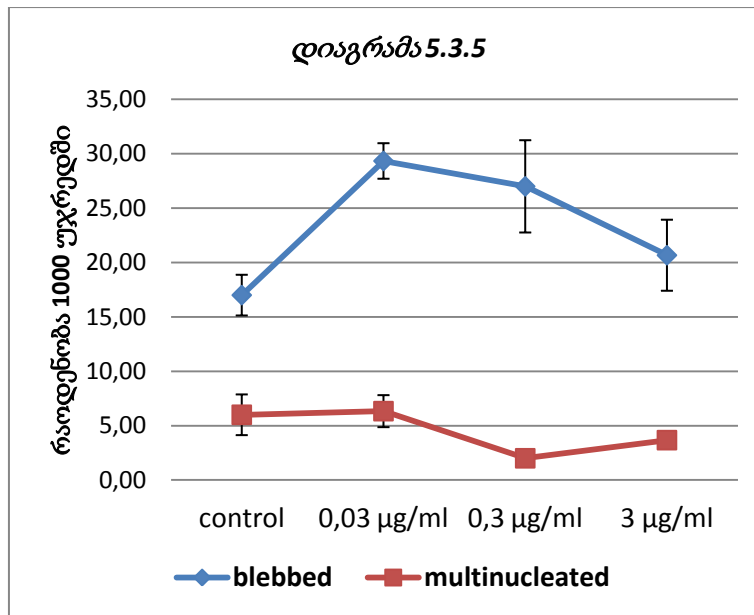
დიაგრამა 5.3.2 აპოპტოზური უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება.
ცისპლატინი / 24 სთ.



დიაგრამა 5.3.3 ერთ (1MN), ორ (2MN) და სამ (3MN) მიკრობირთვის შემცველი ერთ-ბირთვიანი უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. ცისპლატინი / 24 სთ.



დიაგრამა 5.3.4 ორბირთვიანი (Bi nucleated) უჯრედებისა და მიკრობირთვების შემცველი ორბირთვიანი (MN + Bi nucleated) უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. ცისპლატინი / 24 სთ.

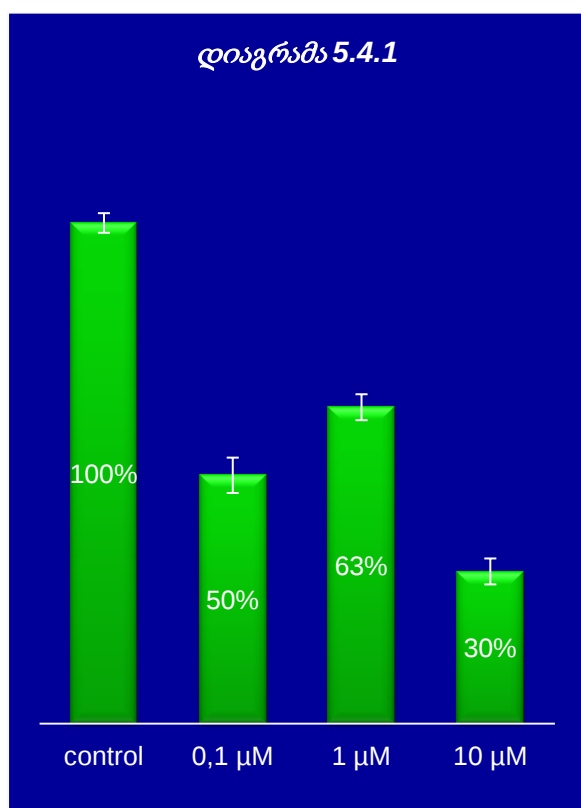


დიაგრამა 5.3.5 „გატეხილი კვერცხის სინდრომისა“ (blebbed) და მრავალბირთვიანი (multinucleated) უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. ცისპლატინი / 24 სთ.

მიღებული შედეგების ანალიზის შედეგად შეგვიძლია ვიმსჯელოთ, რომ:

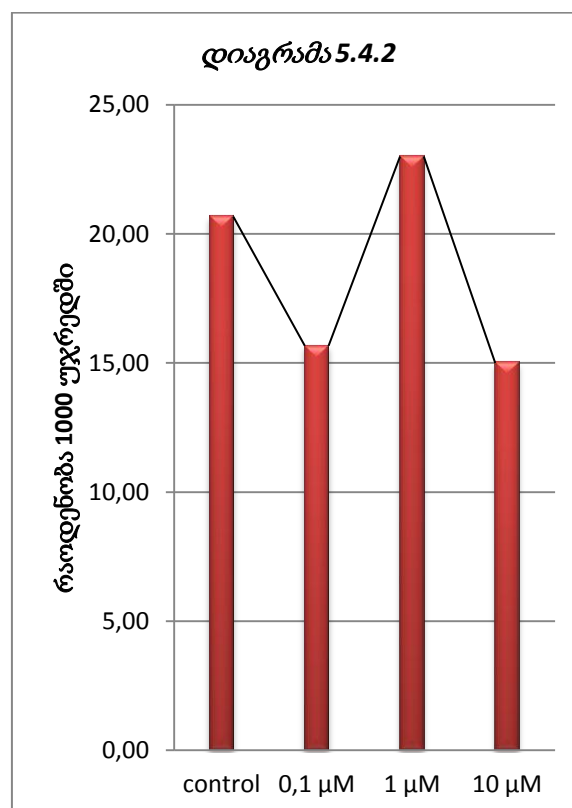
1. ცისპლატინი თრგუნავს უჯრედების რაოდენობის ზრდას, თუმცა ეს ეფექტი წამლის კონცენტრაციაზე მკვეთრად დამოკიდებული არ არის.
2. პრეპარატი თრგუნავს აპოპტოზს, თუმცა ამ შემთხვევაშიც არ აღინიშნება ეფექტის მნიშვნელოვანი დამოკიდებულება წამლის დოზაზე.
3. ცისპლატინი ხელს უწყობს როგორც 1, ისე 2 და 3 მიკრობირთვიანი უჯრედების ფორმირებას როგორც ნორმალურ, ისე ორბირთვიან უჯრედებში.
4. ნორმალური და ორბირთვიანი უჯრედები ერთნაირად მგრძნობიარენი არიან წამლის ერთი და იგივე კონცენტრაციის მიმართ.
5. ცისპლატინის დაბალი კონცენტრაციები იწვევს ორბირთვიანი უჯრედების წარმოქმნის დათრგუნვას, ხოლო კვდ არ ხასიათდება ამ ეფექტით.
6. „ბაინდიანი“ უჯრედების წარმოქმნის ინდუქციას კვდ ყველაზე ნაკლებად იწვევს.
7. პრეპარატი არ მოქმედებს მრავალბირთვიანი უჯრედების წარმოქმნაზე.

5.4 ეტოპოზიდის ზემოქმედებით გამოწვეული ეფექტები



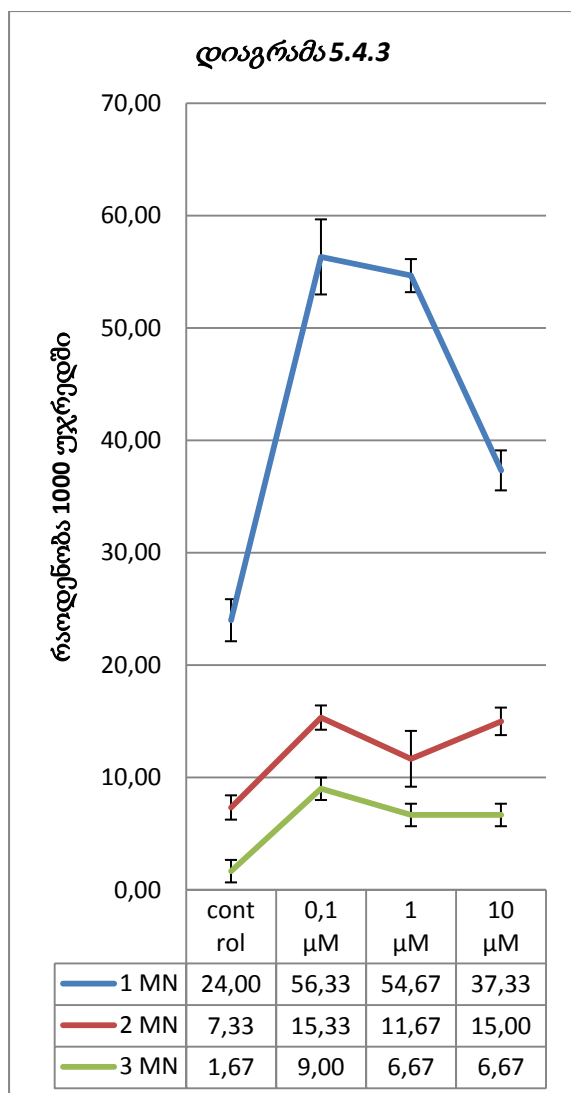
დიაგრამა 5.4.1 ცოცხალი უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება.

ეტოპოზიდი / 24 სთ.

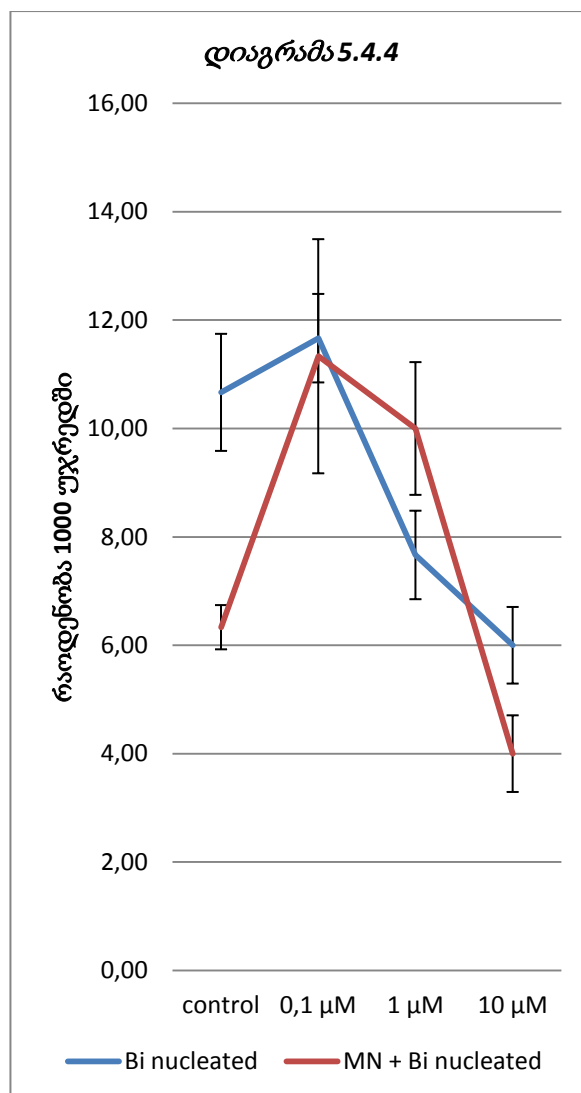


დიაგრამა 5.4.2 აპოპტოზური უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება.

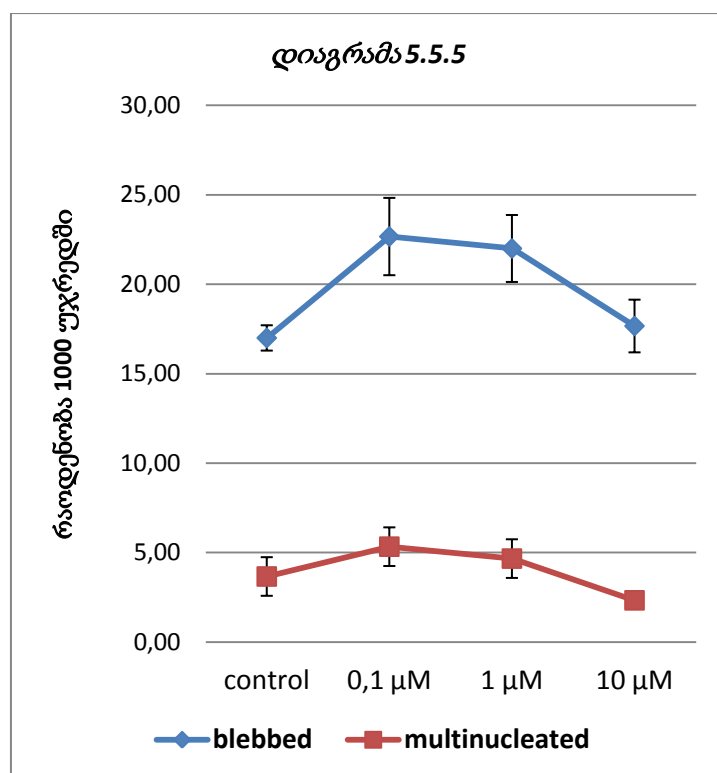
ეტოპოზიდი / 24 სთ.



დიაგრამა 5.4.3 ერთ (1MN), ორ (2MN) და სამ (3MN) მიკრობირთვის შემცველი ერთ-ბირთვიანი უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. ეტოპოზიდი / 24 სთ.



დიაგრამა 5.4.4 ორბირთვიანი (Bi nucleated) უჯრედებისა და მიკრო-ბირთვების შემცველი ორბირთვიანი (MN + Bi nucleated) უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. ეტოპოზიდი / 24 სთ.



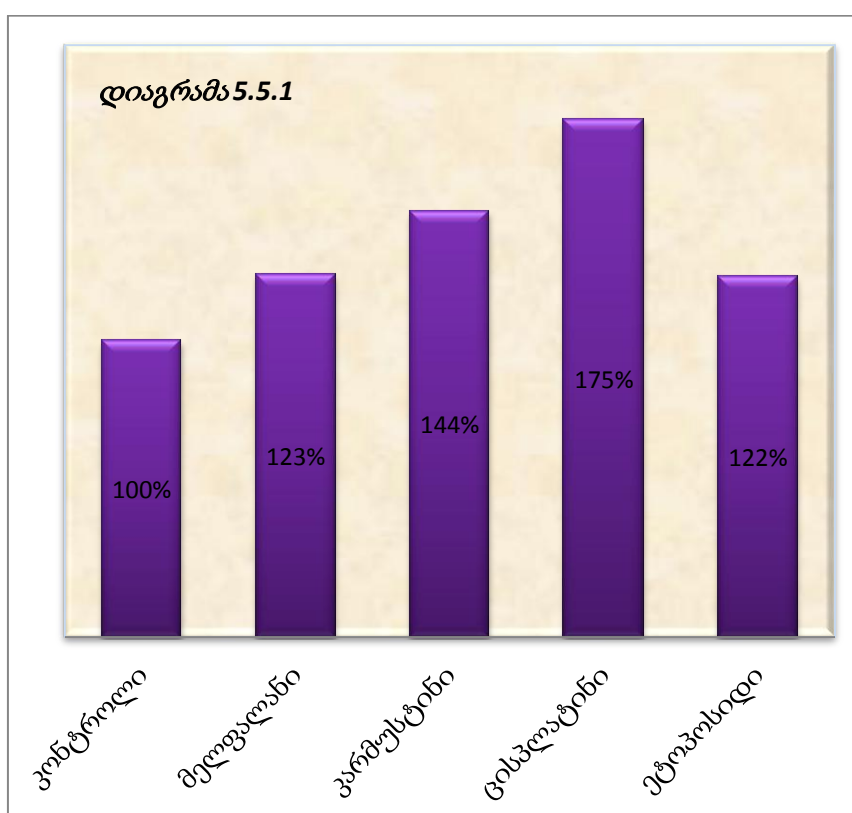
დიაგრამა 5.5.5 „გატეხილი კვერცხის სინდრომისა“ (blebbed) და მრავალბირთვიანი (multinucleated) უჯრედების რაოდენობის პრეპარატის დოზაზე დამოკიდებული ცვლილება. ეტოპოზიდი / 24 სთ.

მიღებული შედეგების ანალიზის შედეგად შეგვიძლია ვიმსჯელოთ, რომ:

1. პრეპარატი და განსაკუთრებით მისი კვლად დამთრგუნველად მოქმედებს უჯრედების რაოდენობის ზრდაზე.
2. წამლის შერჩეული კონცენტრაციებიდან 1 μM -ს ყველაზე ნაკლებად ახასიათებს უჯრედების ზრდის დამთრგუნველი მოქმედება, თუმცა იგი არც აპოპტოზზე მოქმედებს.
3. 0,1 μM და 10 μM კონცენტრაციები თანაბრად დამთრგუნველად მოქმედებენ აპოპტოზის ინდუქციაზე.
4. პრეპარატი უფრო მეტად იწვევს ერთ ვიდრე ორ და სამ მიკრობირთვიანი უჯრედების ფორმირებას. ამასთან ორ და სამ მიკრობირთვიანი უჯრედების წარმოქმნა ნაკლებადაა დამოკიდებული წამლის კონცენტრაციაზე, ხოლო ერთ მიკრობირთვიანი უჯრედების წარმოქმნას გაცილებით მეტად იწვევს დაბალი დოზები, ვიდრე კვდ.

5. წამლის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად ითრგუნება როგორც ორბირთვიანი უჯრედების წარმოქმნა, ასევე მათში მიკრობირთვების ფორმირება.
6. პრეპარატის კგდ არ იწვევს „ბაინდიანი“ და მრავალბირთვიანი უჯრედების რაოდენობის ცვლილებას.

5.5 პრეპარატების მოქმედების შედარებითი ანალიზი



დიაგრამა 5.5.1 ოთხივე პრეპარატის მიერ წარმოქმნილი მიკრობირთვების საერთო რაოდენობა გამოსახული პროცენტებში.

1. ოთხივე პრეპარატის შემთხვევაში კგდ-ები ნაკლებად გენოტოქსიკურია წინა დოზებთან შედარებით.
2. კარმუსტინი ყველაზე ნაკლებად ხასიათდება უჯრედების რაოდენობის ზრდის დათრგუნვით.

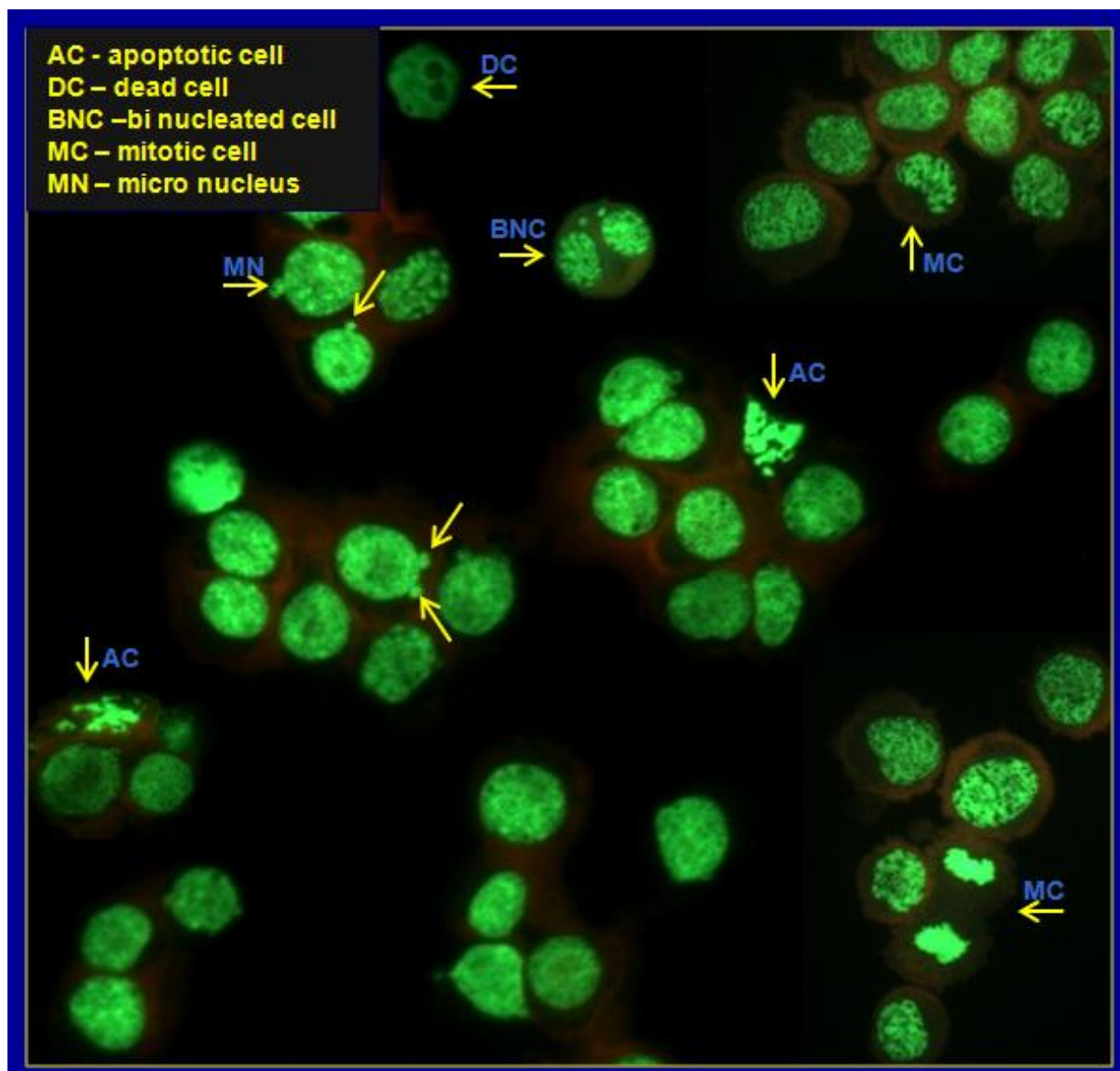
3. შესწავლილი პრეპარატებიდან ცისპლატინის კგდ ყველაზე მეტად იწვევს მიკრობირთვ(ებ)ის შემცველი უჯრედების წარმოქმნას.
4. ეტოპოზიდისა და მელფალანის კგდ ყველაზე ნაკლებად იწვევს მიკრობირთვების ფორმირებას, თუმცა ამავედროულად აღნიშნულ დოზებზე ყველაზე მეტად კლებულობს უჯრედების რაოდენობაც. მელფალანის შემთხვევაში ეს შეიძლება აიხსნას მკვეთრად გაზრდილი აპოპტოზით.
5. შესწავლილი წამლებიდან მელფალანის კგდ-ს (33 μ M) ახასიათებს აპოპტოზისა და „გატეხილი კვერცხის სინდრომის“ მქონე უჯრედების წარმოქმნის ყველაზე მკვეთრად გამოხატული ინდუქცია.
6. ყველა პრეპარატი იწვევს ორბირთვიანი უჯრედების რაოდენობის კლებას, გარდა ცისპლატინის 3 μ g/ml კონცენტრაცია.
7. მრავალბირთვიანი უჯრედების წარმოქმნაზე არცერთი პრეპარატი არ მოქმედებს.

5.6 დასკვნა

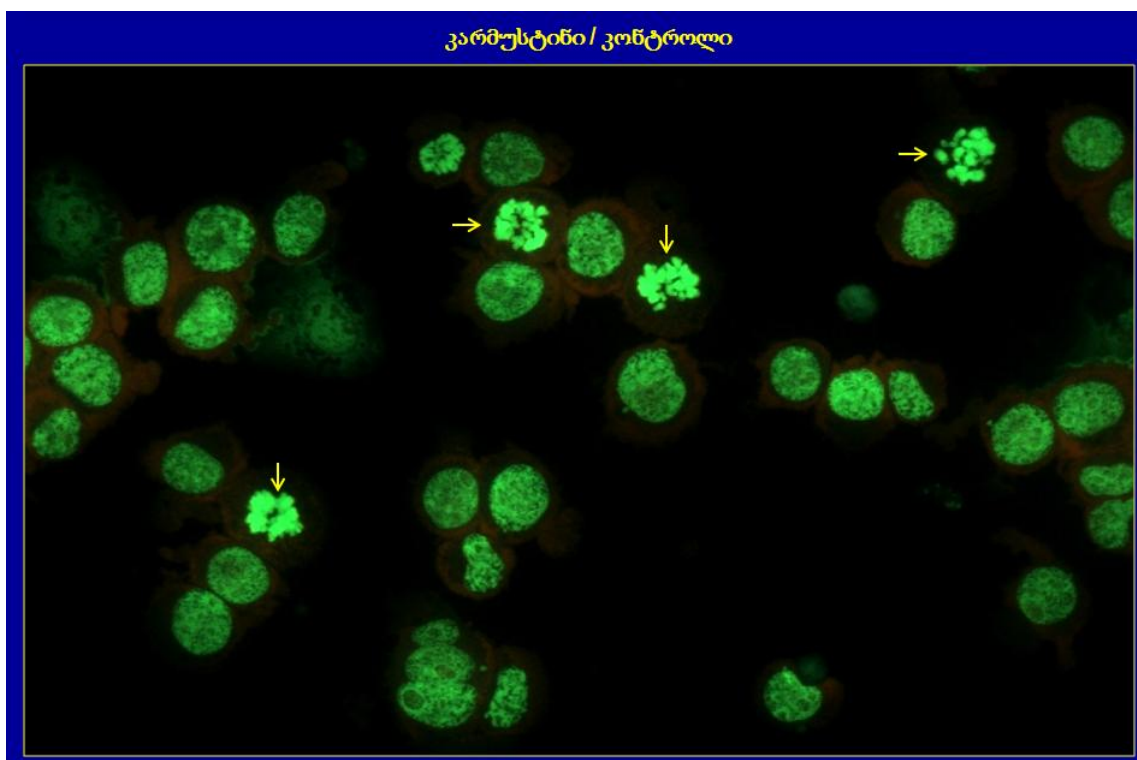
1. მიკრობირთვების ტესტ-სისტემა ეფექტურია და მისი გამოყენება მიზანშეწონილია ანტისიმსივნური პრეპარატების ფართო სპექტრის შესწავლისათვის;
2. აღნიშნული ტესტ-სისტემით დადგინდა, რომ TK6 ლიმფობლასტურ უჯრედებში გამოკვლეული ოთხივე პრეპარატი იწვევს მიკრობირთვების ინდუქციას როგორც ერთ, ასევე ორბირთვიან უჯრედებში;
3. დოზური დამოკიდებულების შედარებისას დადასტურებულ იქნა, რომ თითოეული პრეპარატის შემთხვევაში ყველაზე ნაკლებგენოტოქსიკურია კლინიკაში გამოყენებადი დოზა;
4. გამოკვლეული პრეპარატებიდან მელფალანი და ეტოპოზიდი ყველაზე მეტად ხასიათდებიან ციტოტოქსიური ეფექტით და ამავე დროს ყველაზე ნაკლებად გენოტოქსიკურები არიან.

6. დანართი

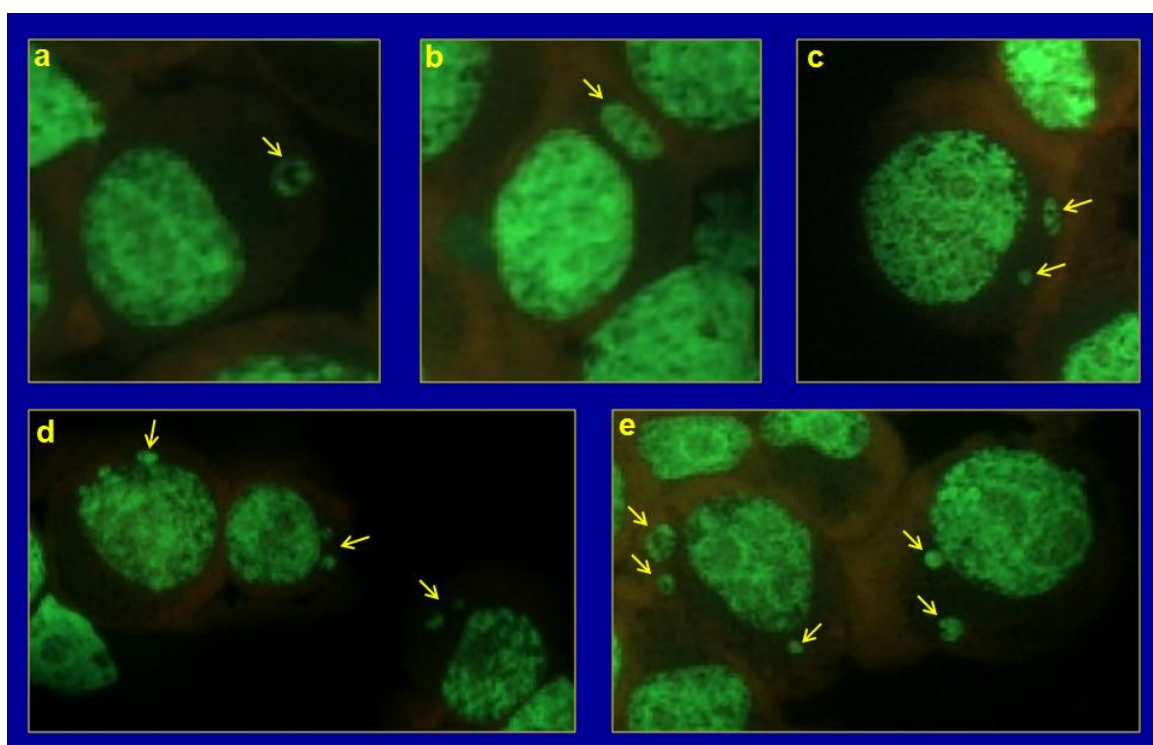
დანართი №1 აკრიდინ ორანჯით შეღებილი TK6 უჯრედები. Nikon Eclipse 80i ტიპის ფრუორესცენტული მიკროსკოპი. 40 გადიდება. ნაჩვენებია ნორმალური, აპოტოზური (AC), მკვდარი (DC), ორბირთვიანი BNC), მიტოზური (MC) და მიკრობირთვების (MN) შემცველი უჯრედები.



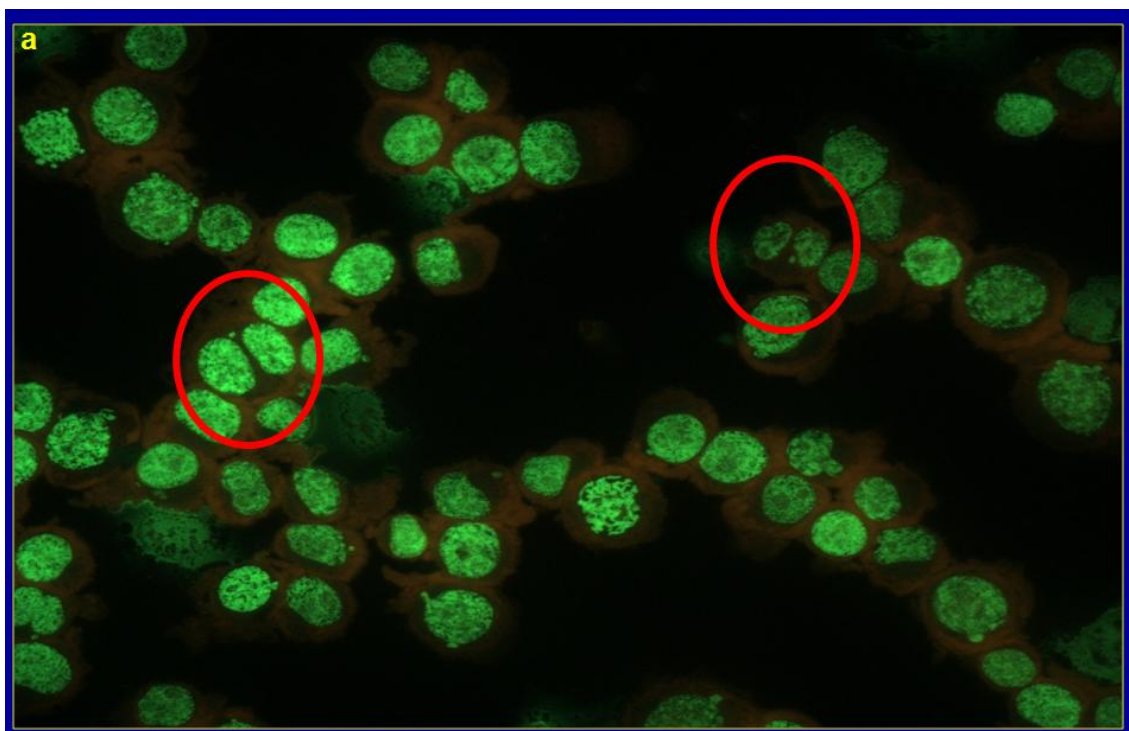
დანართი №2 ისრებით ნაჩვენებია აპოპტოზური TK6 უჯრედები



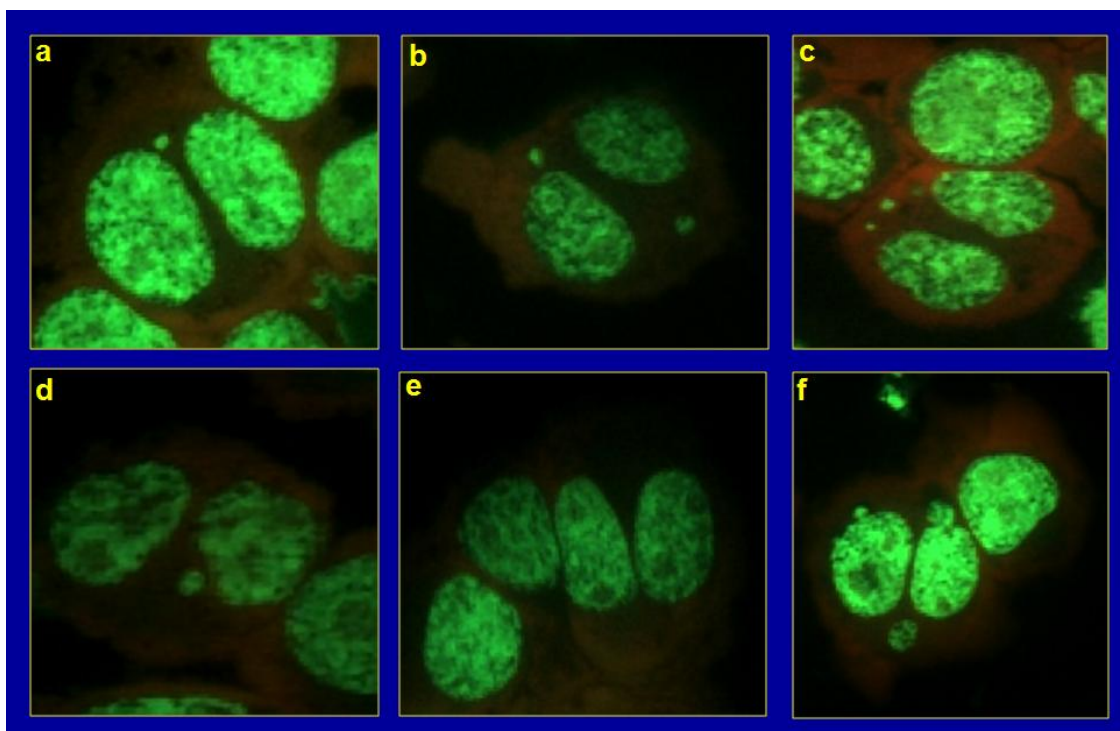
დანართი №3 ერთ, ორ და სამ მიკრობირთვის შემცველი ერთბირთვიანი უჯრედები. a - მელფალანი/0,3 მკ. მოლი; b - მელფალანი/0,3 მკ. მოლი; c - ეტოპოზიდი/1მკ. მოლი; d - კარმუსტინი/1 მკგ/მლ; e - ეტოპოზიდი/1 მკ. მოლი. 24 სთ.



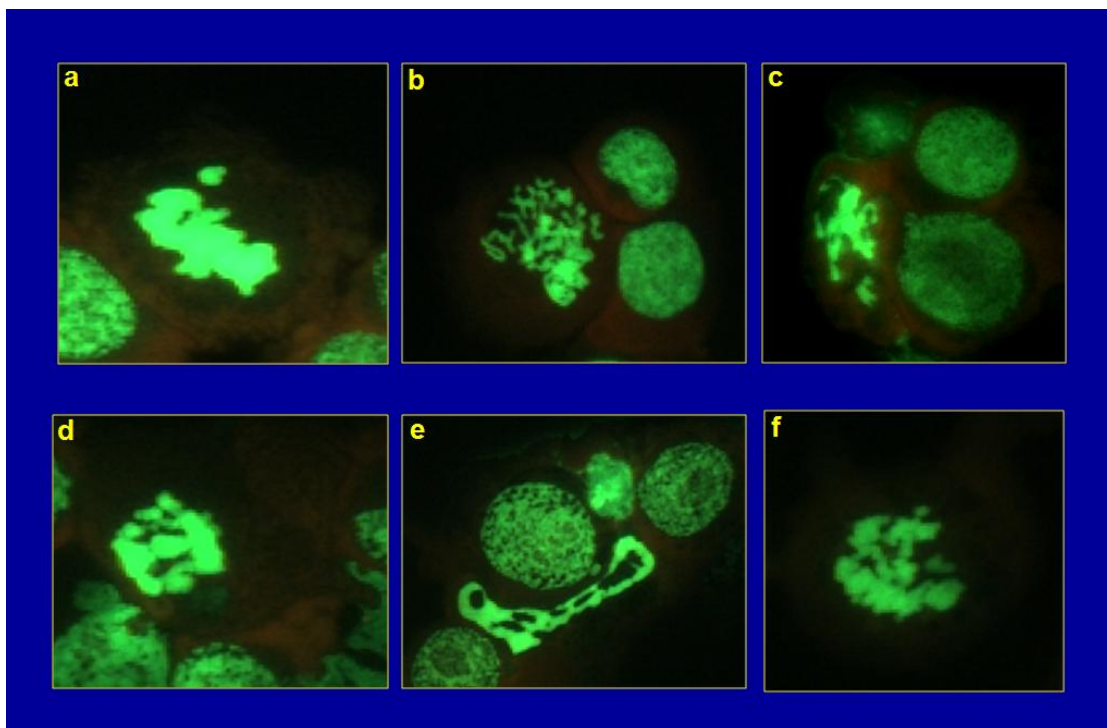
დანართი №4 ორბირთვიანი უჯრედები მიკრობირთვით. კარმუსტინი / 10მკგ/მლ / 24 სთ.



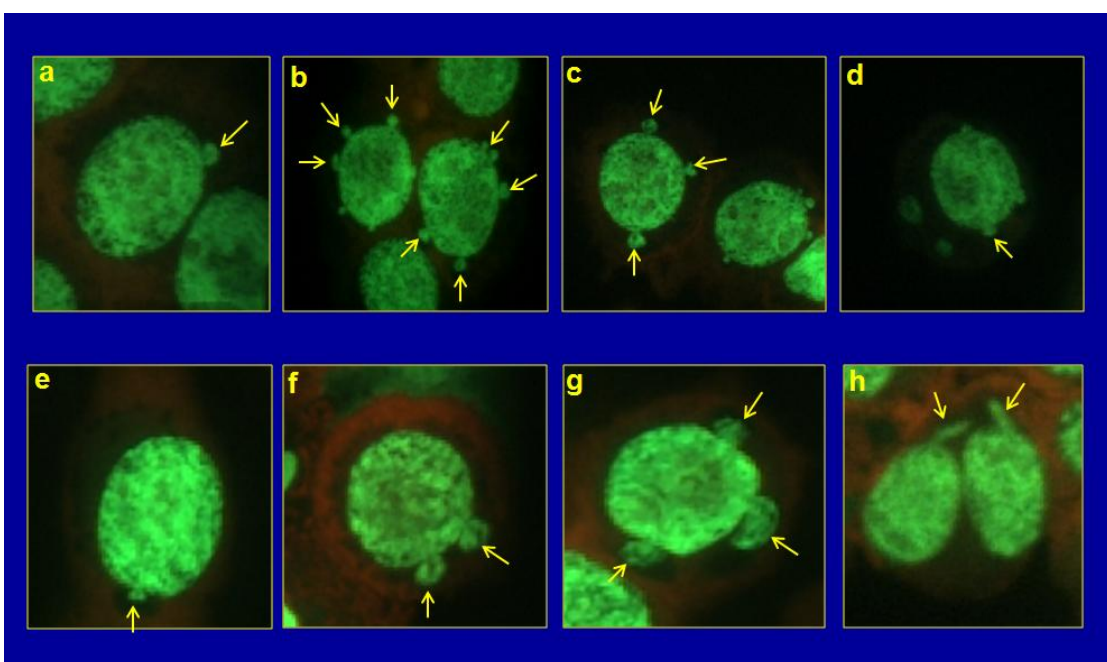
დანართი №5 ორბირთვიანი უჯრედები მიკრობირთვის გარეშე (სურათი e), ერთი (სურათები a და d), ორი (სურათი b) და სამი (სურათები c და f) მიკრობირთვით. a – კარმუსტინი / 10მკგ/მლ; b - ეტოპოზიდი / 0,1 მკ. მოლი; c - მელფალანი / 3 მკ. მოლი; d - კონტროლი; e - ცისპლატინი / 3მკგ/მლ; f - ცისპლატინი / 0,3 მკგ/მლ. 24 სთ.



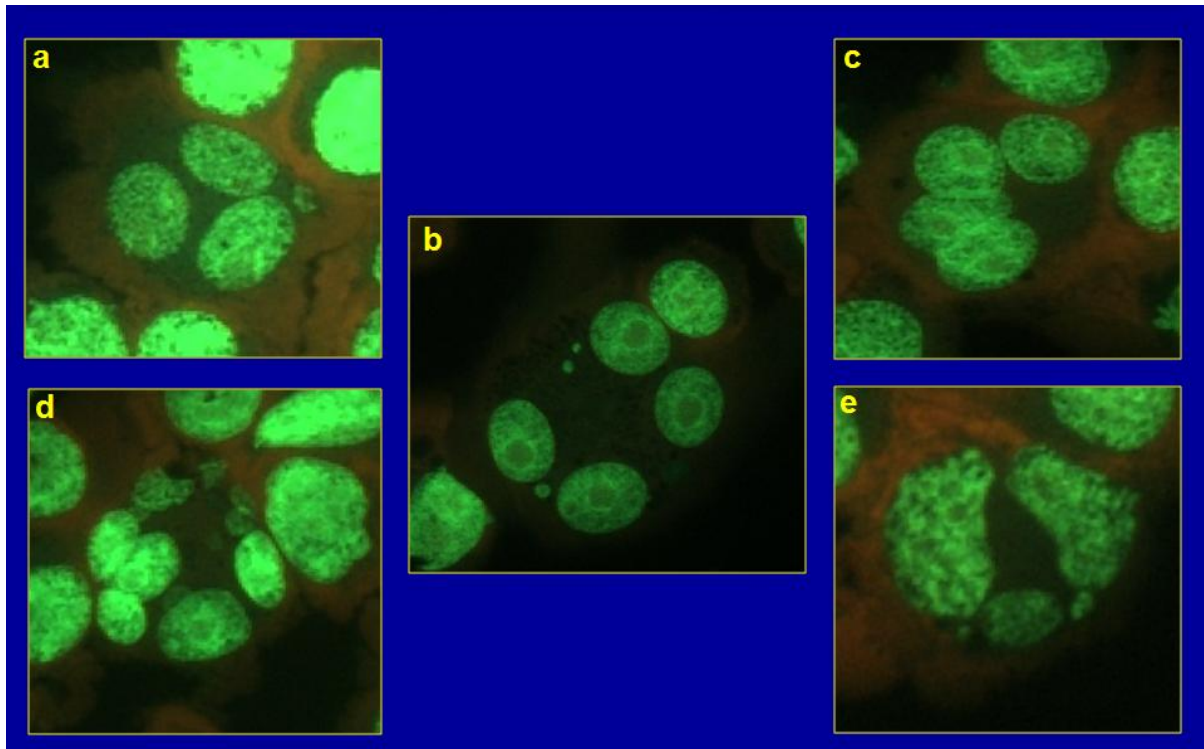
დანართი №6 აპოპტოზური უჯრედები. a - ეტოპოზიდი / 0,1 მკ. მოლი; b - კონტროლი; c - ეტოპოზიდი 10 მკ. მოლი; d - კარმუსტინი / 1 მკგ/მლ; e - მელფალანი / 33 მკ. მოლი; f - ცისპლატინი 3 მკგ/მლ. 24 სთ.



დანართი №7 გატეხილი კვერცხის სინდრომის მქონე (blebbed) უჯრედები. a, b - კარმუსტინი / 1 მკგ/მლ; c - კარმუსტინი / 0,1 მკგ/მლ; d, e - ეტოპოზიდი 10 მკ. მოლი; f - ცისპლატინი / 0,03 მკგ/მლ; g, h - მელფალანი 3 მკ. მოლი. 24 სთ.



დანართი №8 მრავალბირთვიანი უჯრედები. a - ცისპლატინი / 3 მკგ/მლ; b - კარმუსტინი 0,1 მკგ/მლ; c - ეტოპოზიდი / 1 მკ. მოლი; d - მელფალანი 0,3 მკ. მოლი; e - მელფალანი 3 მკ. მოლი. 24 სთ.



7. გამოყენებული ლიტერატურა

1. Katzung PHARMACOLOGY, 9e> Section VIII. Chemotherapeutic Drugs > Chapter 55. Cancer Chemotherapy > <http://jpck.zju.edu.cn/jcyxjp/files/dao/05/MT/05C.pdf>;
2. Eve Wiltshaw. Cisplatin in the Treatment of Cancer THE FIRST METAL ANTI-TUMOUR DRUG, Platinum Metals Rev., 1979, 23, (3), 90-98;
3. Classification of Anticancer Drugs, 28-Sep-2011. <http://pharmatips.doyouknow.in/Articles/Pharmacology/Classification-Of-Anticancer-Drugs.aspx>;

4. Cancer Chemotherapy: Drug Classification and Mechanism of Action, <http://www.pharmacology2000.com/Anticancer/classes1.htm>;
5. Stella M. Davies, Therapy-Related Leukemia Associated With Alkylating Agents, *Medical and Pediatric Oncology* 36:536-540 (2001);
6. A Buschini, E Anceschi, C Carlo-Stella, E Regazzi, V Rizzoli, P Poli and C Rossi, Amifostine (WR-2721) selective protection against melphalan genotoxicity, *Leukemia* (2000) 14, 1642–1651; www.nature.com/leu;
7. Zhanna Sobol, Michael L. Homiski, Donna A. Dickinson, Richard A. Spellman, Dingzhou Li, Andrew Scott, Jennifer R. Cheung, Stephanie L. Coffing, Jennifer B. Munzner, Kelley E. Sanok, William C. Gunther, Krista L. Dobo, Maik Schuler, Development and validation of an in vitro micronucleus assay platform in TK6 cells, *Mutation Research* 746 (2012) 29– 34; www.elsevier.com/locate/gentox;
8. მარინე ანთელავა, ადამიანის ორგანიზმზე მუტაგენების ზემოქმედების გამოვლენა ციტოგენეტიკური მეთოდების გამოყენებით, 2006;
9. Svetlana L. Avlasevich, StevenM. Bryce, Sia“n E.Cairns, and StephenD. Dertinger, InVitroMicronucleus Scoring by FlowCytometry: Differential Staining of Micronuclei Versus Apoptotic andNecrotic Chromatin Enhances Assay Reliability, *Environmental andMolecularMutagenesis* 47:56^66 (2006);
10. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS,Proposal for updating Test Guideline 487, In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/50108793.pdf>;
11. Robson Seriani, Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ângela Teresa Silva-Souza and Silvia Roseli Napoleão, Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil, *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 33, n. 1, p. 107-112, 2011;
12. G. Iarmarcovai, A. Botta, T. Orsi` ere, Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy, *Toxicology Letters* 166 (2006) 1–10;
13. Dolores Diaz, Andrew Scott, Paul Carmichael, Wei Shi, Chester Costales, Evaluation of an automatedin vitromicronucleus assay in CHO-K1 cells, *Mutation Research* 630 (2007) 1–13;
14. IARC MONOGRAPHS – 100A, MELPHALAN, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100A/mono100A-11.pdf>;
15. Melphalan, From Wikipedia, the free encyclopedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Melphalan>;
16. American Cancer Society, Second Cancers Caused by Cancer Treatment. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002043-pdf.pdf>
17. Leukemia--Acute Myeloid (Myelogenous), American Cancer Society. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003110-pdf.pdf>;

18. CARMUSTINE, DRUG RECORD, <http://livertox.nih.gov/Carmustine.htm>;
19. Finn Drabløs, Emadoldin Feyzi, Per Arne Aas, Cathrine B. Vaagbø, Bodil Kavli, Marit S. Bratlie, Javier Peña-Díaz, Marit Otterlei, Geir Slupphaug, Hans E. Krokan, Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance, F. Drabløs et al. / DNA Repair 3 (2004) 1389–1407;
20. Carmustine, From Wikipedia, the free encyclopedia, <https://en.wikipedia.org/wiki/Carmustine>;
21. BiCNU, carmustine for injection, May 2011. http://packageinserts.bms.com/pi/pi_bicnu.pdf;
22. Vladimir Beljanski, Luigi G. Marzilli, and Paul W. Doetsch, DNA Damage-Processing Pathways Involved in the Eukaryotic Cellular Response to Anticancer DNA Cross-Linking Drugs, American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Mol Pharmacol 65:1496–1506, 2004;
23. Takahiro Yamauchi, Masami Ogawa, and Takanori Ueda, Carmustine-Resistant Cancer Cells Are Sensitized to Temozolomide As A Result of Enhanced Mismatch Repair during the Development of Carmustine Resistance, The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, Mol Pharmacol 74: 82–91, 2008;
24. Kashif Jilani and Florian Lang. Carmustine-Induced Phosphatidylserine Translocation in the Erythrocyte Membrane. Toxins 2013, 5, 703-716;
25. Ana-Maria Florea and Dietrich Büsselberg, Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects, Cancers 2011, 3, 1351-1371;
26. J. REEDIJK* AND P.H.M. LOHMAN. Cisplatin: synthesis, antitumour activity and mechanism of action. Vol. 7 - 1985 Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, 173-180;
27. Rebecca A. Alderden, Matthew D. Hall, and Trevor W. Hambley, The Discovery and Development of Cisplatin, Journal of Chemical Education • Vol. 83 No. 5 May 2006, 728-734;
28. . Victoria Cepeda, Miguel A. Fuertes, Josefina Castilla, Carlos Alonso, Celia Quevedo and Jose M. Pérez, Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2007, 7, 3-18;
29. Anna Litwiniec, Lidia Gackowska, Anna Helmin-Basa, Agnieszka Żuryń and Alina Grzanka, Low-dose etoposide-treatment induces endoreplication and cell death accompanied by cytoskeletal alterations in A549 cells: Does the response involve senescence? The possible role of vimentin, Litwiniec et al. Cancer Cell International 2013, 13:9;
30. Francesco Marchetti, Francesca S. Pearson, Jack B. Bishop and Andrew J. Wyrobek, Etoposide induces chromosomal abnormalities in mouse spermatocytes and stem cell spermatogonia, Human Reproduction Vol. 21, No. 4 pp. 888–895, 2006;

31. Etoposide Injection, Gensia Sicor Pharmaceuticals, Inc, July 1998,
<http://patient.cancerconsultants.com/druginserts/Etoposide.pdf>;
32. IARC MONOGRAPHS VOLUME 76, ETOPOSIDE, 177-257;
33. TK6 cell line. http://www.cell-lines-service.de/content/e3969/e4304/e4344/index_eng.html