

mgr Julia Stańczyk

Praca magisterska wykonana w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej

Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Olga Ciepiela

Opiekun naukowy pracy: mgr Milena Matecka-Giełdowska

WSTĘP

Leki stosowane w terapii nowotworów hematologicznych poza efektem terapeutycznym powodują liczne działania niepożądane. Poszukiwanie substancji o działaniu synergistycznym do leku może przyczynić się do zwiększenia skuteczności niższych dawek oraz zmniejszenie ryzyka objawów ubocznych u pacjentów.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena cytotoksyczności doksorubicyny, jej połączenia z cholekalcyferolem oraz samej witaminy na linii komórkowej HL-60.

Badania miały na celu wskazanie wpływu kombinacji cholekalcyferolu z badanym lekiem na procesy apoptotyczne w komórkach ostrej białaczki szpikowej oraz opisanie jej potencjalnej roli w skuteczności terapii przeciwnowotworowej.

MATERIAŁY I METODY

Hodowla komórek z linii HL-60

Przygotowanie roztworów doksorubicyny i cholekalcyferolu

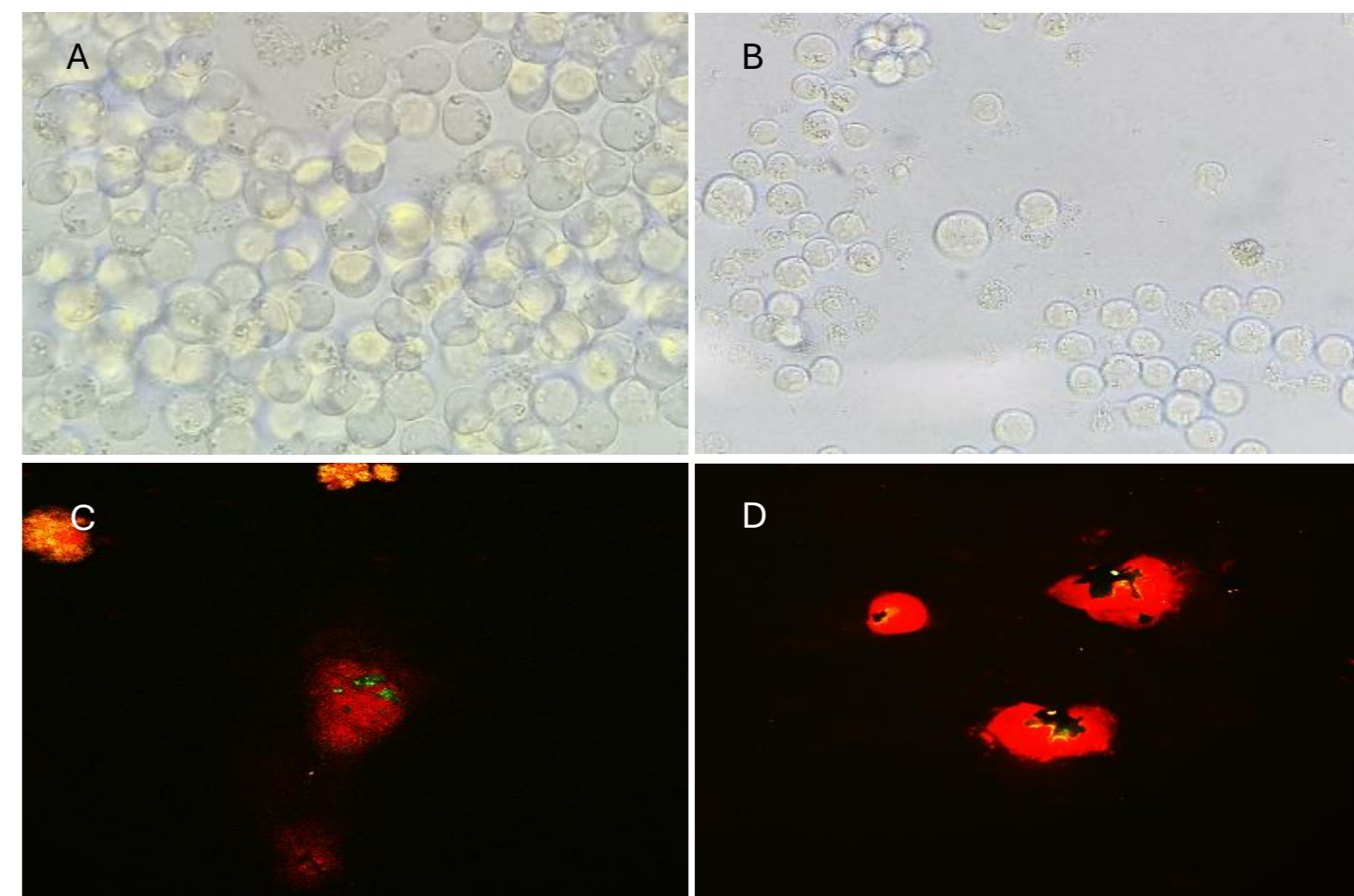
Inkubacja komórek z roztworami leków

Wykonanie testu cytotoksyczności z odczynnikami MTT

Barwienie z wykorzystaniem FITC-aneksyny V i jodku propidyny

Analiza interakcji farmakologicznych metodą Chou-Talalay'a

Analiza statystyczna wyników

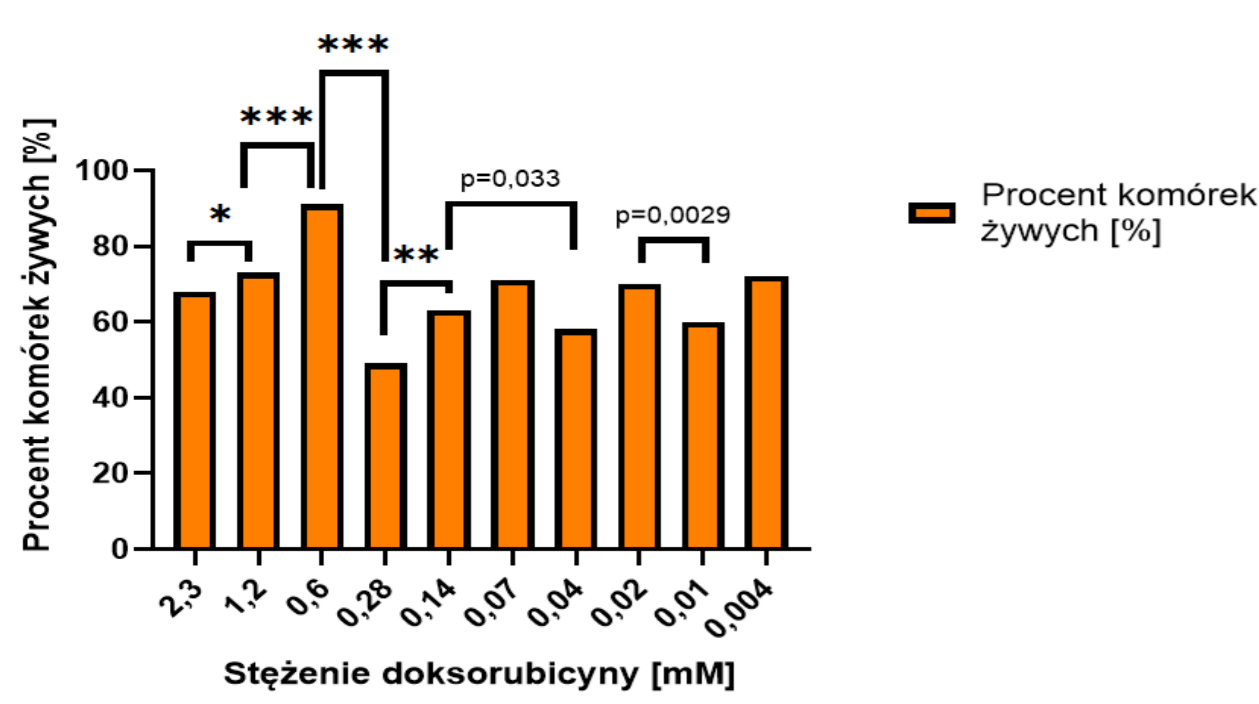


Rycina 1. Komórki linii HL-60.

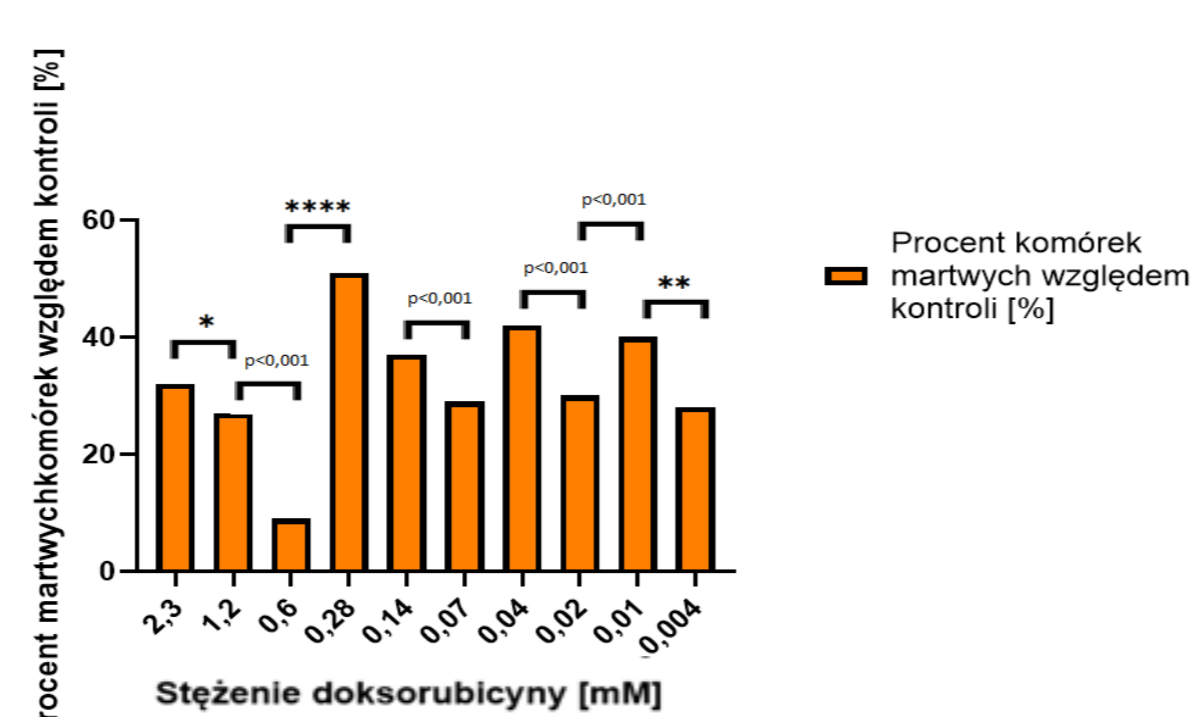
A,B- obraz natywny z mikroskopu odwróconego
C,D- obraz z mikroskopu fluorescencyjnego po barwieniu z wykorzystaniem FITC-aneksyny V i jodku propidyny.

WYNIKI

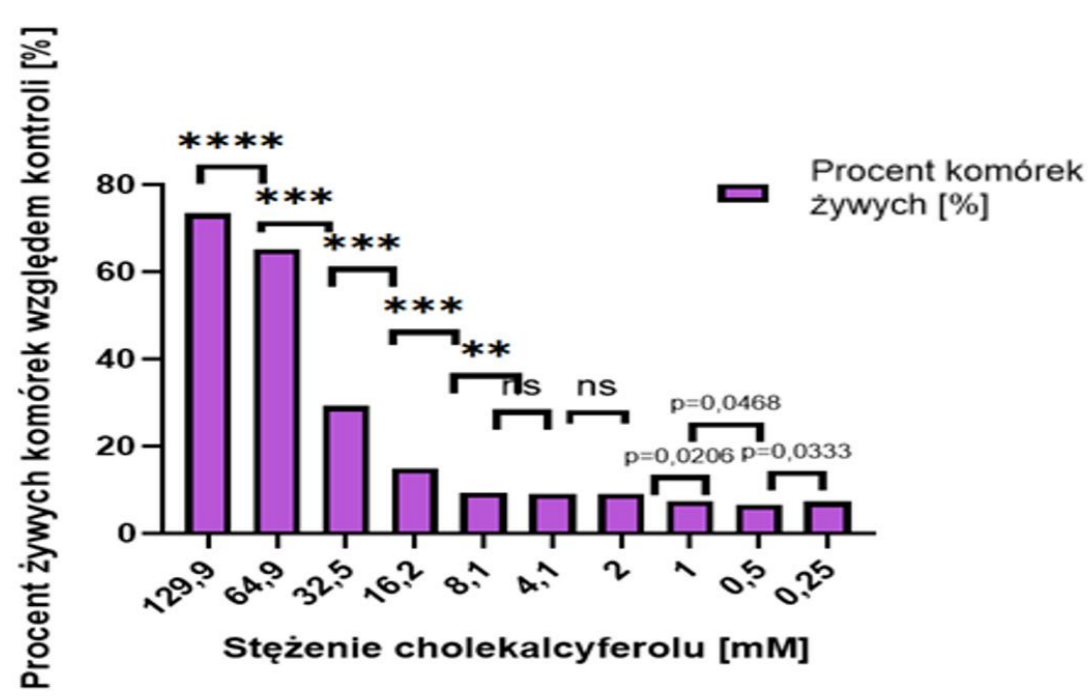
Analizie poddano wyniki absorbancji po przeprowadzeniu testu MTT na 16 płytkach 96-dołkowych oraz jednej płytce 24-dołkowej. Wyniki zależności liczby komórek żywych i komórek martwych od podanych stężeń przedstawiono na wykresach kolumnowych. Jako poziom istotności przyjęto wartość $p < 0.05$. Różnice istotnie statystycznie zaobserwowano dla par stężeń oznaczonych gwiazdkami (* $p = 0,0332$; ** $p = 0,0021$; *** $p = 0,0002$; **** $p < 0,0001$).



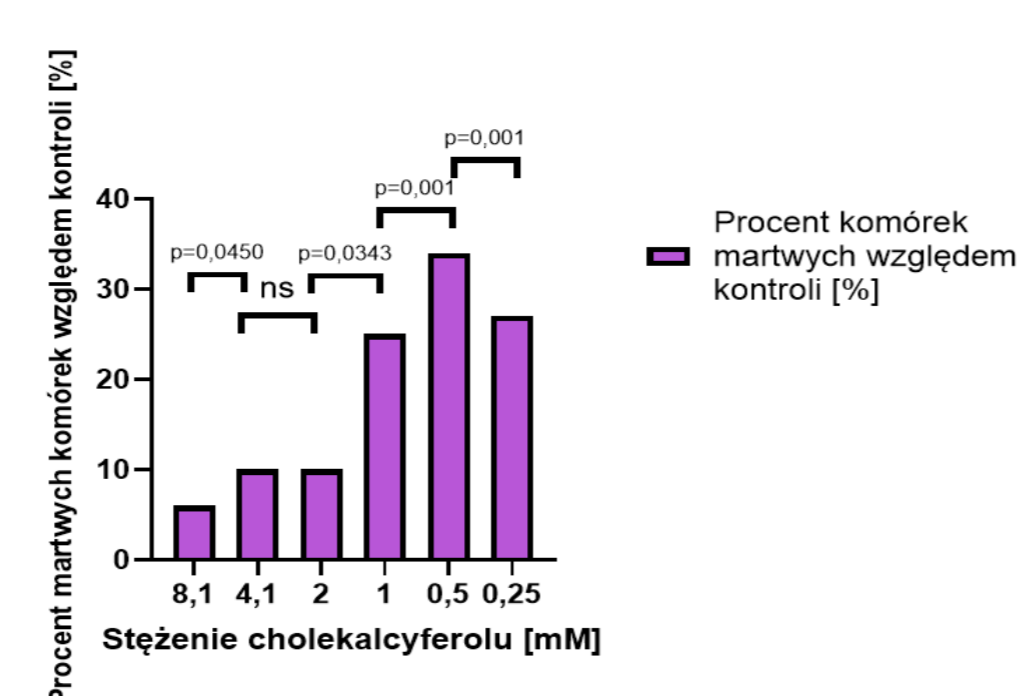
Wykres 1. Wykres zależności liczby komórek żywych od podanych stężeń doksorubicyny (n=48).



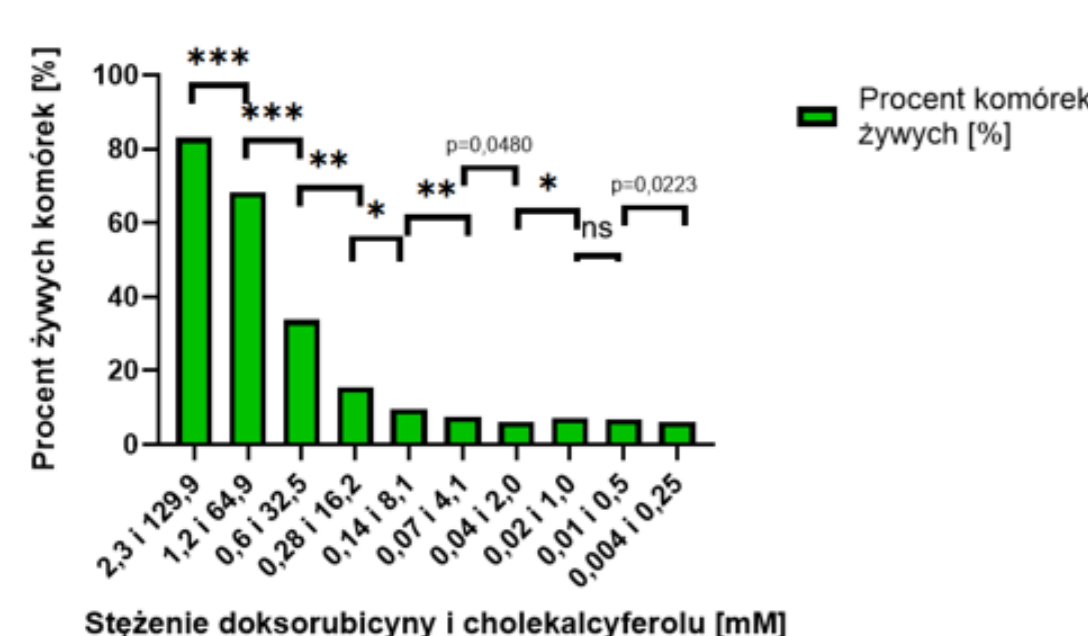
Wykres 4. Wykres zależności liczby komórek martwych od podanych stężeń doksorubicyny (n=48).



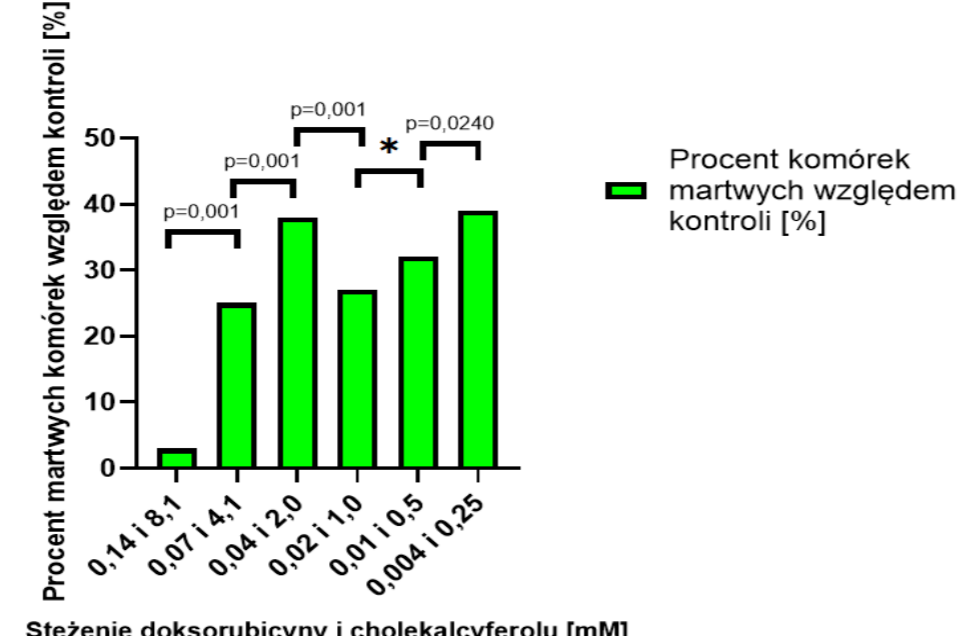
Wykres 2. Wykres zależności liczby komórek żywych od wszystkich podanych stężeń cholekalcyferolu (n=48).



Wykres 5. Wykres zależności liczby komórek martwych od podanych stężeń cholekalcyferolu (n=48).



Wykres 3. Wykres zależności liczby komórek żywych od stężeń odpowiednio doksorubicyny i cholekalcyferolu podanych w kombinacji (n=48).



Wykres 6. Wykres zależności liczby komórek martwych od stężeń odpowiednio doksorubicyny i cholekalcyferolu podanych w kombinacji (n=48).

Analiza interakcji farmakologicznych opierała się na wyliczeniu współczynnika kombinacji (CI) dla każdego z badanych stężeń podawanych w połączeniu doksorubicyny i cholekalcyferolu. Wyniki dla analizowanych kombinacji przedstawiono w Tabeli 1.

Lp.	Stężenie DOX [mM]	Stężenie cholekalcyferolu [mM]	Wartość CI	Rodzaj interakcji
1.	2,3	129,9	0.40359	SYNERGIZM
2.	1,2	64,9	1.02985	ADDYTYWIZM
3.	0,6	32,5	4.94202	ANTAGONIZM
4.	0,28	16,2	1.74803	ANTAGONIZM
5.	0,14	8,1	31.8700	ANTAGONIZM
6.	0,07	4,1	9.51394	ANTAGONIZM
7.	0,04	2,0	4.12355	ANTAGONIZM
8.	0,02	1,0	1.91517	ANTAGONIZM
9.	0,01	0,5	2.98250	ANTAGONIZM
10.	0,004	0,25	0.80316	SYNERGIZM

Tabela 1. Wyniki analizy interakcji farmakologicznych. Uzyskane wartości współczynnika kombinacji oraz odpowiadający im rodzaj interakcji farmakologicznej.

Analiza interakcji farmakologicznych z wykorzystaniem testu cytotoksyczności MTT i metody Chou-Talalay'a wykazała różnice w liczbie żywych komórek pomiędzy podaniem wyłącznie leku lub cholekalcyferolu a podaniem kombinacji obydwu z badanych substancji. Różnice obserwowano również pomiędzy wykorzystywanymi w doświadczeniach rozcieńczeniami.

WNIOSKI

1. Rodzaj interakcji farmakologicznej pomiędzy doksorubicyną a cholekalcyferolem różni się w zależności od zastosowanego stężenia.
2. Oddziaływanie synergistyczne leku i suplementu uzyskano po podaniu zastosowanych najwyższych i najniższych stężeń.
3. Przy jednoczesnym podaniu chemioterapeutyku i witaminy D₃ istnieje możliwość redukcji dawki chemioterapeutyku przy zachowaniu efektu terapeutycznego.
4. Przy suplementacji witaminy D₃ u pacjentów z ostrą białaczką szpikową wskazane jest monitorowanie oraz odpowiednie dobranie dawki cholekalcyferolu w czasie chemioterapii.