

## КЛІТИННІ ЕФЕКТИ РАНІБІЗУМАБУ НА КУЛЬТУРУ ФІБРОБЛАСТОПОДІБНИХ КЛІТИН IN VITRO

Л.М.Литвинчук, А.М.Сергієнко, Г.Й.Лавренчук

Київська міська клінічна офтальмологічна лікарня

"Центр Мікрохірургії Ока"

ДУ "Науковий центр радіаційної медицини АМН України"  
(Київ)

### Вступ

Розвиток хоріоїдальної неоваскулярної мембрани (ХНМ) в макулярній ділянці є одним з найбільш грізних ускладнень патологічної міопії (ПМ), яке призводить до стійкого зниження центрального зору та інвалідизації працездатного населення. Застосування інтравитреальних ін'єкцій блокаторів фактора росту ендотелію судин (анти-ФРЕС) є одним з найефективніших методів лікування ХНМ при ПМ. Ранібізумаб є препаратом вибору [7]. Механізми інволюції ХНМ після застосування ранібізумабу, що можна простежити за даними флюоресцентної ангіографії, до кінця не з'ясовані. Фібробласти та міофібробласти, які володіють високою проліферативною активністю, є основною складовою целюлярного матриксу ХНМ. Дія ранібізумабу саме на ці клітини може викликати зменшення ХНМ у розмірах.

**Мета:** дослідити вплив ранібізумабу на культуру фібробластоподібних клітин лінії L929, як модель активно проліферуючих клітин ХНМ in vitro.

### Матеріали та методи дослідження

В дослідженні була використана культура перещеплюваних клітин (лінія L<sub>929</sub>). За своєю морфологією клітини культури L929 є фібробластоподібними. Клітини лінії L<sub>929</sub> були обрані через свою здатність до перманентного росту. Культивування клітин здійснювали за загальноприйнятими методами роботи з культуральними штамами [1] у поживному середовищі, що містить середовище RPMI-1640 (90%), ембріональну телячу сироватку (10%) та гентаміцин із розрахунку 10 мкг/мл.

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

Ранібізумаб - фрагмент моноклонального антитіла з високим афінитетом до ФРЕС-А, отриманий з материнського антитіла миші. Препарат розроблений для лікування вологої форми вікової макулярної дегенерації, при якій відзначається підвищення продукції ФРЕС. Ранібізумаб зв'язується та інгібує підтипи ФРЕС-А, викликаючи інволюцію неоваскулярних клітин та зменшення проникності судинної стінки. Інкубацію клітин L<sub>929</sub> з ранібізумабом проводили шляхом додавання його до культури через 24 год після посадки клітин в концентраціях 12.5, 50, 125 та 250 мкг/мл відповідно. З 1-ої по 5-ту добу культивування оцінювали клітинні ефекти за показниками життєздатності: проліферативна активність - виживання; мітотична активність - мітотичний індекс; гетерогенність популяції клітин - індекс полікаріоцитів. Одночасно в інтактних та дослідних культурах клітин визначали апоптоз на протоковому цитофлюориметрі FACStar Plus фірми "Becton Dickinson" (США). Статистична обробка результатів проводилася з використанням t-критерію Стьюдента та за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Excel та Biostat.

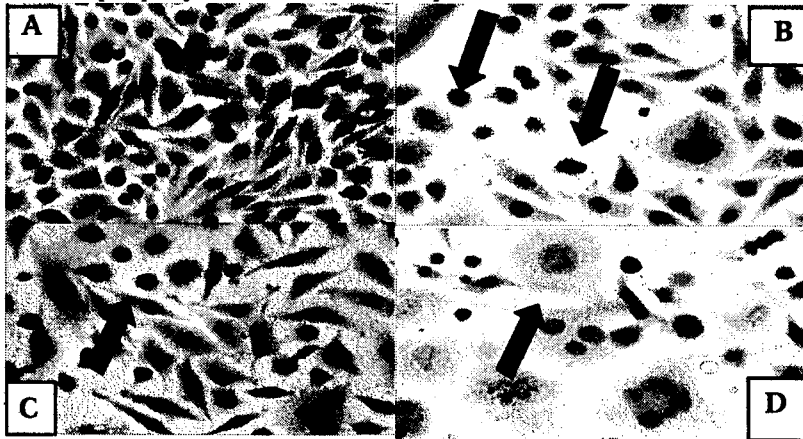
### Отримані результати та їх обговорення

Клітини лінії L<sub>929</sub> в інтактному контролі утворюють щільний моношар з типових фібробластоподібних клітин. Форма клітин веретеноподібна та полігональна з двома чи кількома відростками. В цитоплазмі клітин зустрічаються світлі вакуолі та дрібні гранули. Ядра клітин відносно великі. Зустрічаються поодинокі двоядерні, а також гіперхромні клітини. У полі зору визначаються 2 - 5 клітин на стадії поділу (рис.1, А).

Дослідження кінетики росту. Для інтактних клітин характерне збільшення проліферативної активності в період з 1-ї по 5-ту добу культивування (фаза логарифмічного росту) з поступовим виходом на плато на 5 - 6-ту добу (фаза стаціонарного росту). Щільність моношару клітин у ці терміни досить висока. На 3-тю добу культивування спостерігався максимум мітотичної активності. У подальшому спостерігалось зменшення мітотичного індексу за рахунок контактного інгібування мітозу та конфлуентного стану культури клітин. В інтактному контролі індекс гігантських полікаріоцитів становив 8 - 17 %.

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

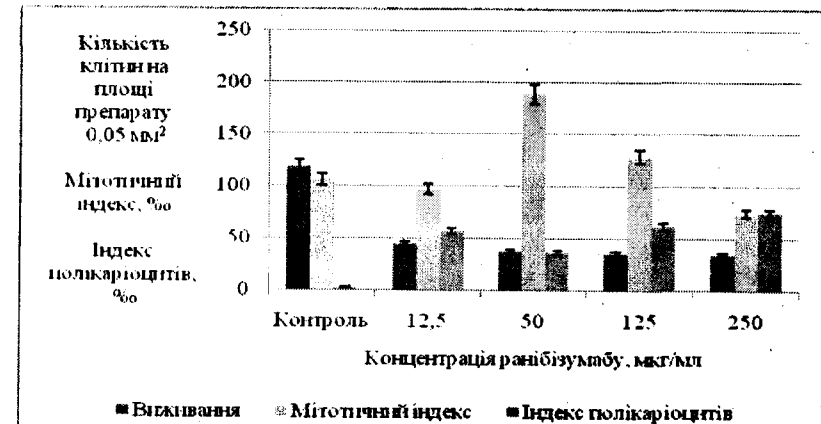
При інкубації клітин з ранібізумабом в концентрації 12,5 мкг/мл відзначалося зниження щільності моношару культури (рис 1, В). В полі зору почали з'являтися клітини з явищами апоптозу: зморщена цитоплазма із зміненим ядром (рис 1, В, стрілка). Форма клітин, в основному, залишалася веретеноподібною. В полі зору зберігалася значна кількість мітозів. Зміна кінетики показників життєдіяльності проявлялася у зниженні виживання клітин та у значному збільшенні кількості полікаріоцитів, які, для даної культури клітин лінії L<sub>929</sub>, є ознакою репродуктивної загибелі (рис. 2).



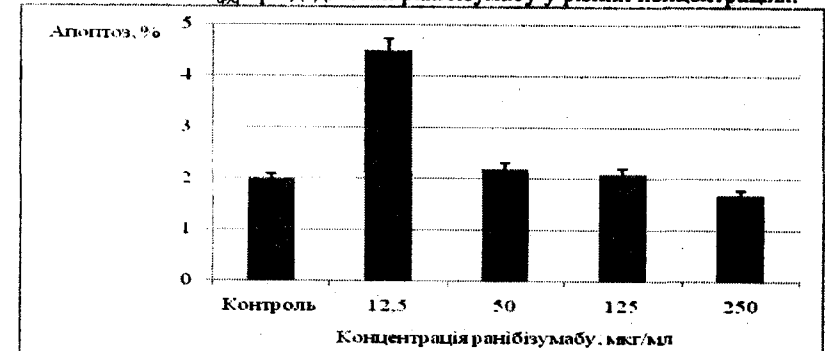
**Рисунок 1.** Культура клітин лінії L929 на 5-ту добу культивування: А - в інтактному контролі; В - з ранібізумабом в дозі 12,5 мкг/мл; С - з ранібізумабом в дозі 125 мкг/мл; D - з ранібізумабом в дозі 250 мкг/мл. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення x 1000.

Збільшення дози ранібізумабу до 125 мкг/мл призвела до наростання гетерогенності клітин в культурі: переважали клітини округлої та полігональної форми. Зросла кількість клітин з явищами апоптозу: прогресування зморщення цитоплазми цих клітин (рис.1, С, стрілка). Спостерігалось інгібування проліферативної активності клітин в культурі. Помітно збільшилася кількість полікаріоцитів. Мітотичний індекс у культурі зберігався на рівні з контролем (рис. 2). Інкубація клітин з ранібізумабом в дозі 250 мкг/мл призвела до вираженої деградації культури клітин. Цитоплазма клітин стала сильно вакуолізована, збільшилася кількість

клітин з ознаками апоптозу (рис.1, D). Вже на 1 - 2 добу відзначалося істотне зниження щільності клітинної популяції, мітотичної активності та значне зростання (у 8 - 10 разів у порівнянні з контролем) кількості полікаріоцитів (рис. 2).



**Рисунок 2.** Зміни показників життєдіяльності клітин (проліферативна та мітотична активність, кількість полікаріоцитів) у культурі фібробластоподібних клітин лінії L<sub>929</sub> при додаванні ранібізумабу у різних концентраціях.



**Рисунок 3.** Кількість апоптотичних клітин в культурі клітин лінії L929 при додаванні ранібізумабу в різних концентраціях.

Аналіз апоптотичної активності препарату показав, що при додаванні мінімальних доз ранібізумабу в культурі клітин лінії L<sub>929</sub> в порівнянні з контролем у два рази збільшувався апоптоз клітин (рис. 3). При збільшенні дози препарату рівень апоптозу

знижувався, проте одночасно і знижувалося виживання клітин, що свідчить про наявність інших шляхів впливу на проліферуючі клітин, зокрема, репродуктивна та інтерфазна загибель клітин.

#### Висновки

1. Експериментальні дослідження впливу ранібізумабу на тест-систему культури перещеплюваних фібробластоподібних клітин лінії L<sub>929</sub> показали, що незначні дози ранібізумабу (12.5-125 мкг/мл) проявляють виражену антипроліферативну дію на досліджувані клітини: інгібують їх проліферативну активність та збільшують гетерогенність культури клітин за рахунок появи гігантських полікаріоцитів, які є ознакою репродуктивної загибелі.

2. За даними дослідження ранібізумаб, починаючи з найменших концентрації, викликає апоптоз фібробластоподібних клітин культури L<sub>929</sub>.

3. Отримані результати свідчать про альтернативну властивість ранібізумабу, а саме, сповільнювати та пригнічувати проліферативну активність фібробластоподібних клітин шляхом активації апоптозу та ініціації репродуктивної загибелі. Це пояснює особливість механізму дії препарату, яка, ймовірно, призводить до зменшення ХНМ у розмірах після інтравітреального введення при ПМ.

4. Виявлена властивість препарату потребує подальшого дослідження його антипроліферативної дії in vitro.

#### Література

1. Дьяконова Л.П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Дьяконова Л.П. - М.: Спутник+, 2009. - 656 с.
2. L-929 (NCTC-clone 929, Clone of strain L) (Connective tissue, mouse) / <http://www.viomed.com/services/product/1929.htm>.
3. Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells / A. Carneiro, M. Falcao, A. Pirrao [e.a.]. - Elsevier Ltd, 2008. - С. 246-279.
4. Comparative role of intravitreal ranibizumab versus bevacizumab in choroidal neovascular membrane in age-related macular degeneration / P. Biswas, S. Sengupta, R. Choudhary [e.a.] // *Indian J. Ophthalmol.* - 2011. - Vol. 59 (3). - P. 191-196.

5. Flaxel C. Prospective randomized controlled trial of combination ranibizumab (lucentis) and bromfenac (xibrom) for neovascular age-related macular degeneration : A Pilot Study / C. Flaxel, M.B. Schain, S.C. Hamon, P.J. Francis // *Retina.* - 2011. - С. 267-296.

6. Gharbiya M. Choroidal neovascularization in pathologic myopia: intravitreal ranibizumab versus bevacizumab-a randomized controlled trial / M. Gharbiya, R. Giustolisi, F. Allievi [e.a.] // *Am. J. Ophthalmol.* - 2010. - Vol. 149(3). - P. 458-464.

7. Goldschmidt E. Ocular morbidity in myopia / E. Goldschmidt // *Acta Ophthalmol.* - 1988. - Suppl. 185. - P. 86-87.

8. Lai T.Y. Intravitreal ranibizumab for the primary treatment of choroidal neovascularization secondary to pathologic myopia / T.Y. Lai, W.M. Chan, D.T. Liu, D.S. Lam // *Retina.* - 2009. - Vol. 29(6). - P. 750-756.

9. Lorenzo D. Intravitreal ranibizumab for choroidal neovascularization secondary to pathological myopia: 12-month follow-up / D. Lorenzo, L. Arias, R. Alcubierre [e.a.] // *Ophthalmologica.* - 2011. - Vol. 226. - P. 103-109.

10. Martin S. Spitzer. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells / Martin S. Spitzer, Efdal Yoeruek, Ana Sierra [e.a.] // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* - 2007. - Vol. 245. - P. 1837-1842.

11. Neruban Kumaran. Long-term remission of myopic choroidal neovascular membrane after treatment with ranibizumab: a case report / Neruban Kumaran, Dawn A. Sim, Adnan Tufail // *Journal of Medical Case Reports.* - 2009. - P. 1186.

12. Spitzer S. M. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells / M. S. Spitzer, B. Wallenfels-Thilo, A. Sierra [e.a.] // *Br. J. Ophthalmol.* - 2006. - Vol. 90. - P. 1316-1321.

#### Резюме

Литвинчук Л.М., Сергієнко А.М., Лавренчук Г.Й. Клітинні ефекти ранібізумабу на культуру фібробластоподібних клітин in vitro.

Хоріоїдальна неоваскулярна мембрана (ХНМ) при патологічній міопії призводить до зниження центрального зору та інвалідизації пацієнтів працездатного віку. Інтравітреальні ін'єкції блокаторів фактору росту ендотелію судин є найефективнішим методом лікування такого ускладнення. Було проведено дослідження клітинних ефектів ранібізумабу на культуру фібробластоподібних клітин лінії L<sub>929</sub> in vitro, з метою з'ясування впливу препарату

на активно проліферуючі клітини - фібробласти, які входять до целолярного матриксу ХНМ. За даними дослідження було встановлено, що ранібізумаб пригнічує проліферативну активність клітин лінії L<sub>929</sub> та збільшує їх гетерогенність. Препарат також ініціює посилення апоптозу фібробластоподібних клітин досліджуваної культури. Отримані дані *in vitro* можуть пояснювати особливості дії ранібізумабу на проліферативні клітини целолярного матриксу ХНМ, наслідком чого може бути зменшення мембрани у розмірах після інтравітреальних ін'єкцій у пацієнтів з патологічною міопією.

**Ключові слова:** патологічна міопія, хоріоїдальна неоваскулярна мембрана, фібробласти, культура клітин лінії L<sub>929</sub>, проліферативна активність, мітотична активність, полікаріоцити, апоптоз.

#### Резюме

**Литвинчук Л.М., Сергиенко А.Н., Лавренчук Г.И.** Клеточные эффекты ранибизумаба на культуру фибробластоподобных клеток *in vitro*.

Хоріоїдальна неоваскулярна мембрана (ХНМ) при патологічній міопії приводить до зниження центрального зору та інвалідизації пацієнтів працездатного віку. Інтравітреальні ін'єкції блокувальних факторів росту ендотелію судин є найефективнішим методом лікування такого ускладнення. Було проведено дослідження клітинних ефектів ранібізумабу на культуру фібробластоподібних клітин лінії L<sub>929</sub> *in vitro*, з метою вивчення впливу препарату на активно проліферуючі клітини - фібробласти, які входять до складу целолярного матриксу ХНМ. По даним дослідження було встановлено, що ранібізумаб гнітить проліферативну активність клітин лінії L<sub>929</sub> та збільшує їх гетерогенність. Препарат також ініціює посилення апоптозу фібробластоподібних клітин досліджуваної культури. Отримані дані *in vitro* можуть пояснювати особливості дії ранібізумабу на проліферативні клітини целолярного матриксу ХНМ, наслідком чого може бути зменшення мембрани в розмірах після інтравітреальних ін'єкцій у пацієнтів з патологічною міопією.

**Ключові слова:** патологічна міопія, хоріоїдальна неоваскулярна мембрана, фібробласти, культура клітин лінії L<sub>929</sub>, проліферативна активність, мітотична активність, полікаріоцити, апоптоз.

#### Summary

**Lytvynchuk L., Sergienko A., Lavrenchuk G.** Cellular effects of ranibizumab on fibroblast-like cellular strain *in vitro*.

Choroidal neovascularisation (CNV) causes central visual loss and disability of workable patients. Intravitreal injections of anti-VEGF is the most effective method to treat such complications. Investigation of ranibizumab cellular effects on fibroblast-like cell strain L<sub>929</sub> *in vitro* was held to reveal influence of the drug on actively proliferated cells - fibroblasts, that compose CNV cellular matrix. Following the results it was established inhibits proliferative activity of cell strain L<sub>929</sub> and increases its heterogeneity. Drug also initiates apoptosis activity of fibroblast-like cells. Experimental data *in vitro* can explain specifics of ranibizumab action on proliferative cells of CNV cellular matrix. Such an action can cause membrane diminishing after intravitreal injection in patients with pathological myopia.

**Key words:** pathologic myopia, choroidal neovascularisation, fibroblasts, cell strain L<sub>929</sub>, proliferative activity, mitotic activity, polycariocytes, apoptosis.

**Рецензент:** д.біол.н., проф. С.М. Смірнов.

## КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИ ОТРУЄННІ ГРИБОМ БІЛОЮ ПОГАНКОЮ (AMANITA PHALLOIDES) В ЛУГАНСЬКІЙ ОБЛАСТІ

**Б.П.Романюк, Г.А.Дубова, О.М.Фастова, Ю.М.Дубова,  
А.І.Рубан, В.А.Макарук**

*ДЗ "Луганський державний медичний університет"  
Луганська обласна клінічна лікарня*

### Вступ

Випадки гострих отруєнь грибами, зареєстровані в багатьох країнах світу, характеризуються високою летальністю, що у 100-200 раз перевищує смертність при захворюваннях бактеріальної етіології. Кожного року з настанням грибного сезону в Україні, як правило, створюється епідеміологічна ситуація щодо отруєнь грибами. Особливо потерпають мешканці областей (Дніпропетровської, Донецької, Луганської, Одеської), де населення не має відповідних традиційних навичок у збиранні грибів та певної мікологічної культури. Кількість любителів "тихого" полювання невпинно збільшується за рахунок пенсіонерів, людей без постійного місця роботи тощо. Отруєння грибами наносить державі значну економічну шкоду. Так, курс лікування одного пацієнта, котрий постраждав від гриба - білої поганки, коштує біля 10 тисяч доларів США.

Переважає більшість населення не сприймає застереження про недоцільність вживання грибів взагалі, говорячи, що збір грибів - стародавня пристрасть слов'янських племен. З прийняттям Київською Руссю християнства, гриби під час "постів" заміняли скоромну їжу. І не дивно, гриби - продукти харчування, за поживними якостями близькі до овочів.

W.Linzel (1991) [1] в результаті порівняльного дослідження поживних цінностей білків у представників різних видів їстівних грибів виявив, що в білих грибах, печерицях і інших найбільший вміст білка (табл.1) і найвища засвоюваність його людським організмом.