

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ 5-ФТОРУРАЦИЛА МЕЖДУ ЛИМФОЦИТАМИ И ПЛАЗМОЙ КРОВИ

М. А. СТАШКЕВИЧ, Е. В. ХОМУТОВ, О. П. ШАТОВА,
Ю. В. ДУМАНСКИЙ, И. И. ЗИНКОВИЧ

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Украина;
e-mail: matviyenko.maryna@gmail.com

Оценивали распределение 5-фторурацила (5-ФУ) при его инкубации с лимфоцитами, ресуспендированными в плазме крови. Содержание 5-ФУ определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в образцах, полученных из крови 8 здоровых добровольцев. Доказано быстрое накопление 5-ФУ в лимфоцитах (концентрация в клетках уже через 3 мин инкубации превышает таковую в плазме более чем в 2,5 раза) и отсутствие изменения концентрации препарата как в лимфоцитах, так и в плазме крови в течение 30 мин эксперимента.

Ключевые слова: 5-фторурацил, лимфоциты, плазма, эндолимфатическое введение.

Цитостатик 5-фторурацил (5-ФУ) был введен в практику около 50 лет назад и до сих пор широко применяется в терапии рака желудочно-кишечного тракта, молочной железы, кожи и др. [1]. Проявления токсичности 5-ФУ зависят от режима и способов его введения. Так, миелотоксичность обычно проявляется у пациентов, получавших болюсные инъекции, нейро- и кардиотоксичность, в основном, – при длительных инфузиях препарата [2]. Это свидетельствует о необходимости поиска способов введения 5-ФУ, которые могли бы обеспечить его максимальное воздействие на опухоль и свести к минимуму системные и местные побочные эффекты.

В 80-х годах прошлого столетия были предложены и сейчас продолжают испытываться методы эндолимфатической терапии, предполагающие инфузию химиопрепаратов в систему лимфоциркуляции. Эффективность такого пути введения показана в ряде исследований [3, 4], подтверждающих увеличение пятилетней выживаемости до 40% у радикально оперированных больных. При этом частота развития токсических осложнений была существенно ниже, чем при традиционной внутривенной химиотерапии теми же препаратами [5]. Аналогом эндолимфатической терапии является метод аутолимфохимиотерапии [6], суть которого состоит в заборе лимфы из грудного лимфатического протока, ее экстракорпоральной инкубации с химиопрепаратами и последующим внутривенным введением в организм пациента.

Описанная авторами высокая клиническая эффективность эндолимфатического пути введения может быть объяснена особенностями фармакокинетики и фармакодинамики препарата. Целью настоящего исследования было установление характера распределения 5-ФУ между плазмой и лимфоцитами крови.

Материалы и методы

Содержание 5-ФУ определяли отдельно в лимфоцитах и в плазме крови после их совместной инкубации с препаратом *in vitro* в течение 3, 15 и 30 минут.

Материалом для исследования служила цельная кровь, взятая из локтевой вены у восьми здоровых доноров-добровольцев (четырех женщин и четырех мужчин) в возрасте от 18 до 37 лет.

Для выделения лимфоцитов к 9 мл цельной крови добавляли 1 мл гепарина и центрифугировали 5 мин при 855 g, отделяли плазму и добавляли к форменным элементам физиологический раствор в соотношении 1 : 1. Полученную клеточную суспензию наслаивали на фиколл-урографиную смесь (плотность 1,077 г/см³) и центрифугировали 40 мин при 214 g. Отбирали лимфоциты, трижды отмывали клетки физиологическим раствором (разводили в соотношении 1 : 1) и разделяли центрифугированием в течение 5 мин при 855 g. Полученную лимфоцитарную массу ресуспендировали в 2 мл ранее отобранной плазмы крови этого же донора. Объем добавляемой плазмы обеспечивал близкое к естественным условиям содержание клеток в суспензии.

Определение распределения 5-ФУ между лимфоцитами и плазмой. К 1 мл полученной суспензии лимфоцитов добавляли 0,4 мл 1,75 мМ раствора 5-ФУ (Sigma, Германия) и инкубировали в термостате при 37 °С. Расчет рабочей концентрации 5-ФУ в инкубационной среде проводили, исходя из его фармакологической дозы (340 мг) и среднего объема крови пациента (4,5 л). Аналогичные концентрации препарата были использованы и в других работах, в которых изучалась стабильность 5-ФУ в цельной крови и при перфузии печени раствором препарата [7].

Через 3 мин после добавления 5-ФУ к суспензии лимфоцитов, а также через 15 и 30 минут после начала инкубации в пробирку отбирали по 0,3 мл суспензии и центрифугировали 3 мин при 855 g. В отдельную пробирку отбирали 0,25 мл надосадочной жидкости — экспериментальная фракция «плазма», оставшийся в пробирке осадок клеток — фракция «лимфоциты». В обеих полученных фракциях путем добавления 0,25 мл ацетонитрила (Sigma, Германия) и центрифугирования 15 мин при 6760 g осаждали протеины. Ацетонитрил удаляли с помощью экстрагирования хлороформом (Sigma, Германия). В полученных образцах методом ВЭЖХ на хроматографе Konikrom (Konik-Tech, Испания) с колонкой YMC Triart (YMC Europe GmbH, Германия) длиной 25 см определяли концентрацию 5-ФУ [8].

Статистическую обработку проводили с использованием программного пакета

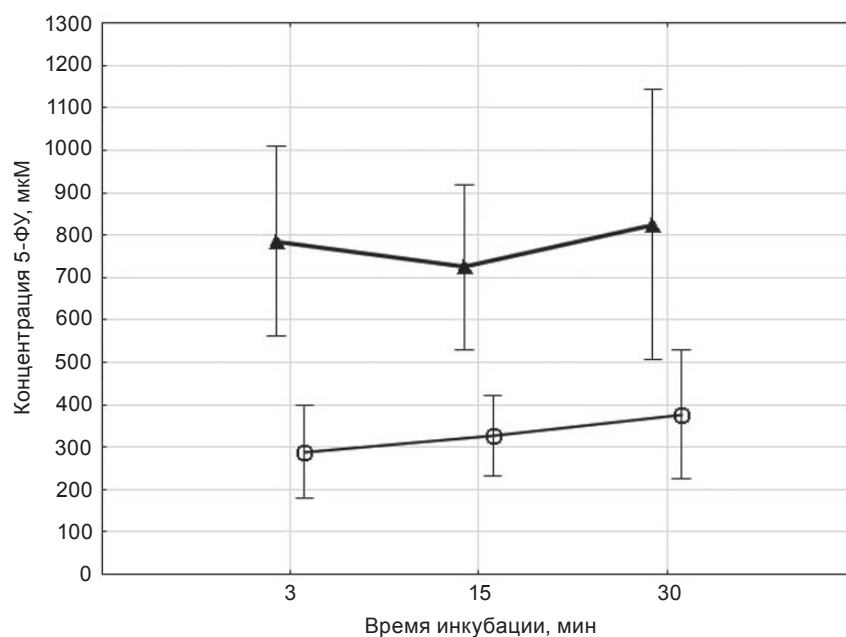
Statistica 6.0 (Statsoft Inc.). Данные представлены в виде средних значений и их среднеквадратических отклонений. Достоверность различий определяли по критерию Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

Согласно с полученными данными при инкубации лимфоцитов в плазме крови без 5-ФУ, а также в его присутствии *in vitro* препарат между плазмой и клетками распределяется неравномерно.

Уже через 3 мин инкубации средняя концентрация 5-ФУ во фракции «лимфоциты» в 2,5 раза превышает таковую во фракции «плазма»: 814 ± 276 и 320 ± 145 мкМ соответственно (различия достоверны при $P = 0,04$). Следует подчеркнуть, что описанные выше технические особенности получения экспериментальной фракции «лимфоциты» приводят к несколько искаженной оценке, поскольку содержание 5-ФУ измеряли в осадке лимфоцитов, разбавленном некоторым объемом оставшейся в пробирке плазмы крови. Поэтому истинная концентрация 5-ФУ в лимфоцитах выше фактически полученной, а указанное соотношение концентраций (1 : 2, 1 : 3) — нижняя граница оценки.

Неожиданным оказалось отсутствие изменений концентрации 5-ФУ в последующие моменты исследования (рис.). В обеих экспериментальных фракциях: и в плазме, и в лимфоцитах продолжительность инкубации не влияет на содержание 5-ФУ. Концентрация



Концентрация 5-ФУ в плазме (○) и лимфоцитах (▲)

препарата в плазме на 3-, 15- и 30-й минутах инкубации составляет 319 ± 145 , 327 ± 117 , 377 ± 177 мкМ, а во фракции «лимфоциты» — 814 ± 276 , 724 ± 259 , 838 ± 139 мкМ соответственно.

Полученные результаты достоверно указывают на: 1) быстрое, с позиции практической медицины — мгновенное, накопление 5-ФУ лимфоцитами из плазмы крови и 2) отсутствие деградации 5-ФУ *in vitro* в течение 30 минут эксперимента.

Транспорт азотистых оснований и нуклеозидов через клеточную мембрану происходит с участием протеинов-переносчиков: уравнивающих (Equilibrative Nucleoside Transporters, ENT), отвечающих за поступление веществ в клетку по механизму облегченной диффузии, и концентрирующих (Concentrative Nucleoside Transporters, CNT), обеспечивающих активный против градиента концентрации транспорт веществ [9].

Обнаруженный нами факт значительно, более чем двукратного превышения концентрации 5-ФУ во фракции «лимфоциты» по сравнению с плазмой крови явно указывает на участие в этом процессе именно концентрирующих транспортеров. Последние разделяют на два типа [9]: первый (CNT1) обеспечивает транспорт преимущественно пиримидиновых нуклеозидов, тогда как второй тип транспортеров (CNT2) отвечает за трансмембранный перенос пуринов. И, хотя известно [10], что на мембранах лейкоцитов активно экспрессируются пуриновые CNT2 и практически отсутствуют пиримидиновые CNT1, перенос галогенопроизводных урацила может осуществляться и через транспортеры пуринов CNT2 [11]. Вероятно, присутствующие на мембране лимфоцитов пуриновые переносчики и обеспечивают накопление 5-ФУ в клетках. Концентрирование 5-ФУ в лимфоцитах, помимо теоретического интереса, может иметь и важное прикладное значение. Известно, что лимфоциты склонны инфильтрировать опухолевые ткани и связываться с антигенами («сорбироваться») на поверхности злокачественных клеток [12]. Благодаря показанной нами способности лимфоцитов аккумулировать 5-ФУ они могут играть роль «природных систем прицельной доставки» данного химиопрепарата к опухолевой ткани. Именно эта способность лимфоцитов и может обеспечивать сочетание низкой токсичности и высокой эффективности химиотерапии при эндолимфатическом способе введения препарата или при применении метода аутолимфохимиотерапии.

На основании полученных результатов также можно поставить под сомнение обоснованность рекомендаций по аутолимфохимиотерапии [5], предписывающих относительно длительную, около 1 часа, инкубацию лимфы с химиопрепаратами. Согласно представленным в настоящей статье данным, для насыщения клеток 5-ФУ достаточно 1–3-минутного экстракорпорального их взаимодействия с препаратом. Такое уточнение способствует большей сохранности лимфоцитов и, следовательно, улучшит эффективность метода аутолимфохимиотерапии.

Показанное нами отсутствие изменений концентрации 5-ФУ в течение 3–30 мин эксперимента заставляет задуматься о фармакокинетики данного химиопрепарата.

В условиях организма кинетика 5-ФУ характеризуется быстрым, с периодом полувыведения около 15 мин [13], снижением его концентрации в крови. Последнее обеспечивается как поступлением препарата в ткани организма, так и его деградацией с участием дигидропиримидиндегидрогеназы (ДПДГ) (1.3.1.2) [14]. Поскольку известно, что для лимфоцитов характерна высокая активность этого энзима [15], причиной обнаруженного нами постоянства концентрации 5-ФУ в интервале 3–30 мин эксперимента возможно считать быстрое истощение внутрилимфоцитарного пула второго субстрата ДПДГ — восстановленного NADP. Именно отсутствие последнего может тормозить реакцию преобразования захваченного лимфоцитами 5-ФУ в 5-фтордигидроурацил.

Понятно, представленные в настоящей статье результаты не следует прямо экстраполировать на фармакокинетику и фармакодинамику 5-ФУ в лимфоцитах циркулирующей крови *in vivo*. Кроме того, характерные для онкологических больных изменения состояния многих энзимных систем [16, 17] могут обусловить особенности в распределении 5-ФУ и его метаболизме, отличные от таковых у здоровых доноров. Однако, если описанные в настоящей работе закономерности имеют место и в организме пациента, то пул лимфоцитов периферической крови смело можно рассматривать как естественное и эффективное образование, позволяющее накапливать и, главное, сохранять 5-ФУ от распада. Данные, приведенные выше, и любые другие теоретические рассуждения не дают веских оснований исключить наличие таких способностей у лимфоцитов. Подтверждение или опровержение этого требует постановки дополнительных экспериментов.

Таким образом, изолированные лимфоциты способны *in vitro* аккумулировать 5-ФУ в концентрациях, многократно превышающих таковые в инкубационной среде. Насыщение лимфоцитов 5-ФУ происходит быстро, с выходом на плато в первые 3 мин инкубации, с последующим сохранением концентрации в интервале до 30-й минуты эксперимента.

РОЗПОДІЛ 5-ФТОРУРАЦИЛУ МІЖ ЛІМФОЦИТАМИ ТА ПЛАЗМОЮ КРОВІ

М. А. Сташкевич, Є. В. Хомутов,
О. П. Шатова, Ю. В. Думанський,
І. І. Зінкович

Донецький національний медичний
університет ім. М. Горького, Україна;
e-mail: matviyenko.maryna@gmail.com

Оцінювали розподіл 5-фторурацилу (5-ФУ) під час його інкубації з лімфоцитами, ресуспендованими в плазмі крові. Вміст 5-ФУ визначали методом високоефективної рідинної хроматографії у зразках, одержаних із крові 8 здорових добровольців. Доведено швидке накопичення 5-ФУ в лімфоцитах (концентрація в клітинах вже через 3 хв інкубації перевищує таку в плазмі більш ніж в 2,5 рази) і відсутність зміни концентрації препарату як у лімфоцитах, так і в плазмі крові протягом 30 хв експерименту.

Ключові слова: 5-фторурацил, лімфоцити, плазма, ендолімфатичне введення.

DISTRIBUTION OF 5-FLUOROURACIL BETWEEN LYMPHOCYTES AND BLOOD PLASMA

М. А. Stashkevych, E. V. Khomutov,
O. P. Shatova, Yu. V. Dumanskiy,
I. I. Zinkovych

M. Gorky Donetsk National Medical
University, Ukraine;
e-mail: matviyenko.maryna@gmail.com

In blood plasma of 8 healthy volunteers with resuspended lymphocytes incubated with 5-fluorouracil (5-FU) the drug distribution between cells and liquid was assessed by means of HPLC. Rapid accumulation of 5-FU in lymphocytes was proved (the drug concentration on the 3-rd minute is 2.5-fold higher than in plasma) as

well as the absence of temporal changes of 5-FU content both in lymphocytes and blood plasma during 30 minutes of experiment.

Key words: 5-fluorouracil, lymphocytes, plasma, endolymphatic administration.

1. Ceilley R. I. // J. Dermatolog. Treat. – 2012. – 23, N 2. – P. 83–89.
2. Patel K., Anthoney D. A., Crellin A. M. et al. // Ann. Oncol. – 2004. – 15, N 4. – P. 568–573.
3. Бондарь Г. В., Кондратюк Б. П., Комендант В. В., Гончар А. Г. // Клін. хірургія. – 1999. – № 1. – С. 18–20.
4. Яковець Ю. И., Кондратюк Б. П., Попович А. Ю. // Хірургія України. – 2005. – 13, № 1. – С. 106–109.
5. Бондарь Г. В., Попович А. Ю., Лисовская Н. Ю., Попович Ю. А. // Междунар. мед. журн. – 2006. – № 2. – С. 82–86.
6. Пат. RU 2195268, МПК А61К31/00, А61Р35/00 Способ лечения рака тела матки / Сидоренко Ю. С.; Пустовалова А. В.; Неродо Г. А. – Оpubл.: 27.12.2002. № 2000110761/14.
7. Colville H., Dzadony R., Kemp R. et al. // J. Extra Corpog. Technol. – 2010. – 42, N 1. – P. 75–79.
8. Lal-Sim Au J., Muh-Hwan Su, Gulllaume Wlentjes M. // Clin. chem. – 1989. – 35, N 1. – P. 48–51.
9. Mackey J. R., Galmarini C. M., Graham K. A. et al. // Blood. – 2005. – 105, N 2. – P. 767–774.
10. Molina-Arcas M., Bellosillo B., Casado F. J. et al. // Blood. – 2003. – 101, N 6. – P. 2328–2334.
11. Lang T. T., Selner M., Young J. D., Cass C. E. // Mol. Pharmacol. – 2001. – 60, N 5. – P. 1143–1152.
12. Deschoolmeester V., Baay M., Van M. E. et al. // BMC Immunol. – 2010. – N 11. – P. 19.
13. Leichman C. G. // Oncology (Williston Park). – 1999. – 13, N 7, suppl. 3. – P. 26–32.
14. Milano G. // Fluoropurimidines in cancer therapy. – Totowa, New Jersey: Humana press, 2003. – P. 29–36.
15. Jiang Hao, Jing Lu, Jiang Ji et al. // Br. J. Pharmacol. – 2004. – 141, N 4 – P. 616–623.
16. Raida M., Kliche K. O., Schwabe W. et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2002. – 128, N 2 – P. 96–102.
17. Katayanagi S., Aoki T., Takagi Y. et al. // Oncol. Rep. – 2003. – 10, N 1 – P. 115–119.

Получено 29.12.2012