

Wstęp: L-asparaginaza jest hydrolazą, enzymem katalizującym rozszczepienie L-asparaginy, endogennego aminokwasu niezbędnego do funkcji niektórych komórek nowotworowych. Eliminacja L-asparaginy z otoczenia komórek nowotworowych prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1, zahamowania syntezy DNA i białek, apoptozy komórek i w efekcie do śmierci komórki.

Cel pracy: Ocena cytotoksyczności trzech preparatów L-asparaginazy oraz ich wpływu na wybrane mechanizmy wpływające na indukcję apoptozy i na cykl komórkowy w liniach komórkowych ludzkich ostrych białaczek mieloblastycznych i limfoblastycznych.

Materiał i metodyka: Badania cytotoksyczności trzech preparatów L-asparaginazy wykonano przy zastosowaniu testu MTT. Analizę parametrów związanych z indukcją apoptozy: wiązania aneksyny V, syntezy tlenu azotu, ekspresji kaspazy-3 oraz ocenę późnej apoptozy i zmian faz cyklu komórkowym przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej.

Wyniki: Komórki linii ostrej białaczki promielocytowej HL-60 wykazywały profil cytotoksyczności i indukcji mechanizmów apoptozy w stopniu porównywalnym z wrażliwością komórek linii ostrych białaczek limfoblastycznych, niezależnie od stosowanego preparatu L-asparaginazy. Wielkość syntezy tlenu azotu silnie korelowała z nasileniem wczesnej apoptozy, wyrażoną wiązaniem aneksyny V. Komórki linii K-562 o morfologii M6 wg klasyfikacji FAB, były odporne w teście MTT oraz nie wykazywały cech indukcji apoptozy pod wpływem wszystkich badanych preparatów L-asparaginazy.

Wnioski: Przeprowadzone badania wykazują, że w obrębie ostrych białaczek mieloblastycznych istnieją 2 rodzaje odpowiedzi na cytotoksyczne i proapoptotyczne działanie L-asparaginazy. W komórkach linii HL-60 wykazano profil indukcji apoptozy i wrażliwości na L-asparaginazę, porównywalny z profilem odpowiedzi w liniach ostrych białaczek limfoblastycznych T-komórkowych. Natomiast komórki linii K-562 wykazują znaczną oporność na L-asparaginazę, związaną z brakiem indukcji apoptozy.

Słowa kluczowe: L-asparaginaza, ostra białaczka limfoblastyczna, ostra białaczka mieloblastyczna, cytotoksyczność, apoptoza, oporność na cytostatyki.

Porównanie aktywności trzech preparatów L-asparaginazy w ostrej białaczce limfoblastycznej i mieloblastycznej: badania cytotoksyczności i indukcji apoptozy w liniach komórkowych

Comparison of activity of three preparations of L-asparaginase in acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia: the study of cytotoxicity and induction of apoptosis in cell lines

Beata Kołodziej*, Beata Kuryło-Rafińska*,
Małgorzata Kubicka, Robert Dębski, Jan Styczyński

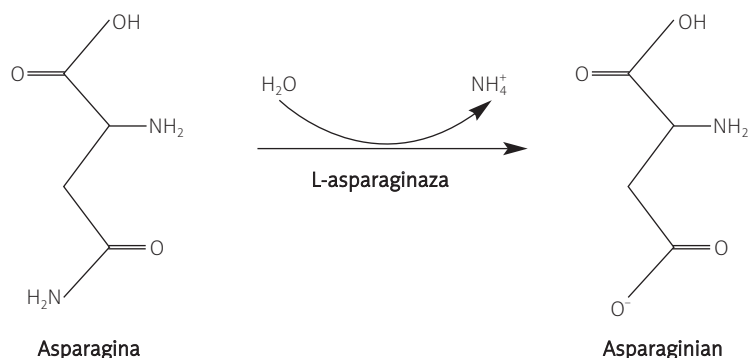
Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Pracownia Onkologii Klinicznej i Eksperymentalnej *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika

* obie autorki mają identyczny wkład w pracę

Wstęp

L-asparagina (amid kwasu 2-aminobursztynowego) jest aminokwasem endogennym, została wyodrębniona z soku asparagusa przez Vauquelina i Robigueta w 1806 r. jako pierwszy odkryty aminokwas występujący w przyrodzie [1]. Ponieważ obecność tego aminokwasu jest niezbędna do funkcjonowania niektórym komórkom nowotworowym, w szczególności limfoblastom, eliminacja L-asparaginy z otoczenia komórek nowotworowych prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1, zahamowania syntezy DNA i białek, przzerwania nici DNA i apoptozy, a w efekcie do śmierci komórki [2].

L-asparaginaza jest hydrolazą, enzymem katalizującym rozszczepienie L-asparaginy na kwas asparaginowy i amoniak (ryc. 1), występuje w wielu organizmach bakteryjnych, roślinnych i zwierzęcych, nie stwierdza się natomiast obecności tego enzymu u człowieka. Jako lek stanowi istotną część polichemioterapii stosowanej w przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci



Ryc. 1. Schemat reakcji rozkładu asparaginy na kwas asparaginowy i amoniak
Fig. 1. Scheme of asparagine decay to asparagic acid and ammonium

Background: L-asparaginase is a hydrolase, an enzyme catalyzing the decay of L-asparagine, an endogenous amino acid necessary for the survival of some types of neoplastic cells, such as lymphoblasts. The elimination of L-asparagine from the environment of cancer cells leads to the cell cycle arrest in G1 phase, inhibition of DNA and protein synthesis, induction of apoptosis and eventually, cell necrosis.

Aim of the study: to analyze cytotoxicity of 3 preparations of L-asparaginase and their effect on induction of selected mechanisms of apoptosis and cell cycle in cell lines of human acute myeloblastic and lymphoblastic leukemias.

Material and methods: Cytotoxicity was assessed using the MTT assay of cytotoxicity and viability end-point type. Mechanisms of apoptosis induction, as measured by annexin V binding, synthesis of nitric oxide, changes in expression of caspase-3 and changes in the cell cycle after *in vitro* treatment with L-asparaginase, were determined by flow cytometry.

Results: Cells of acute promyelocytic leukemia HL-60 showed a profile of sensitivity and induction of apoptosis, comparable to respective sensitivity and response in acute lymphoblastic leukemic cell lines, regardless of preparations of L-asparaginase used. The intensity of nitric oxide synthesis correlated with the early phase of apoptosis expressed by annexin V binding. Erythroblastoid cell line K-562 with FAB morphology M6 presented high resistance to all tested L-asparaginases and showed no induction of apoptosis.

Conclusions: This study shows that there are different patterns of response to L-asparaginase among acute myeloblastic leukemias with respect to cytotoxicity and induction of apoptosis. The sensitivity of promyelocytic cell line HL-60 to L-asparaginase is similar to the sensitivity of T-lineage acute lymphoblastic leukemia cell lines, whereas K-562 cell line is resistant to all tested preparations of L-asparaginase.

Key words: L-asparaginase, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, cytotoxicity, apoptosis, drug resistance

i dorosłych oraz nieziarniczych chłoniaków złośliwych i mięsaka limfatycznego [2]. Ze względu na oporność komórkową, nie jest to lek stosowany w leczeniu białaczek mieloblastycznych. W terapii wykorzystuje się 2 naturalne formy enzymu, produkowane przez bakterie *Escherichia coli* i *Erwinia chrysanthemi*, a także pochodną L-asparaginazy *E. coli* związaną z glikolem polietylenowym (Peg-asparaginazę). Dostępnych jest kilka preparatów L-asparaginazy, które różnią się okresem półtrwania, enzymatyczną aktywnością i wynikającym z tego stopniem deplecji asparaginy.

Celem pracy była ocena cytotoksyczności trzech preparatów L-asparaginazy oraz ich wpływu na cykl komórkowy i wybrane mechanizmy, wpływające na indukcję apoptozy w liniach komórkowych ludzkich ostrych białaczek mieloblastycznych i limfoblastycznych.

Material i metody

Badany materiał stanowiły linie komórkowe: ostrej białaczki promielocytowej HL-60 (AML, typ M3 wg klasyfikacji FAB), kryzy erytroblastycznej przewlekłej białaczki mieloblastycznej K-562 (AML, typ M6) i ostrych białaczek limfoblastycznych T-komórkowych CCRF-CEM i Jurkat. Oceniano wpływ trzech preparatów L-asparaginazy: Asparaginase medac (*E. coli-asparaginase*, Medac, Hamburg), Erwinase (Erwinia L-asparaginase, Berkshire, England) i Kidrolase (*E. coli-asparaginase*, Bellon, Montrouge) na badane komórki. Cytotoksyczność oceniono testem MTT, natomiast badania cyklu komórkowego, zmiany w ekspresji kaspazy-3, indukcję wczesnej apoptozy oraz syntezę tlenu azotu wykonano metodą cytometrii przepływowej.

Na płytce 96-dołkowej przygotowano panel z roztworami poszczególnych cytostatyków o identycznych stężeniach i przechowywano je w temperaturze -20°C . W trakcie badania do płytek z lekami dodawano badane komórki, po czym inkubowano je w środowisku 5-proc. CO_2 w temp. 37°C przez 3 doby. Stężenia leków dla poszczególnych badań wynosiły: 0,0032–10 IU/ml w teście MTT; 0,4 IU/ml w analizie faz cyklu komórkowego; 10 IU/ml przy oznaczaniu aktywności kaspazy-3 oraz 2 IU/ml przy badaniu syntezy tlenu azotu. Początkowe stężenie badanych komórek w poszczególnych liniach komórkowych wynosiło $0,49\text{--}0,65 \times 10^6/\text{ml}$.

Cytotoksyczność. Oporność *in vitro* badanych komórek na wybrane leki oceniano przy pomocy testu cytotoksyczności MTT wg metodyki wcześniej opisanej [3]. W skrócie, zasada testu opiera się na redukcji żółtego rozpuszczalnego bromku 3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT, Serva, Heidelberg) do błękitnego formazanu. Reakcja ta przebiega jedynie w żywych komórkach. Test przeprowadzano na 96-dołkowych płytkach mikrotitracyjnych, na które dodawano po 80 ml zawiesiny komórkowej do każdego dołka, do którego wcześniej podano 20 ml roztworu badanych preparatów L-asparaginazy. Dla każdego stężenia wykonywano po 2 badania (tj. przygotowano po 2 dołki). Niezależnie od badanych cytostatyków, na każdej płytce oznaczano kontrolę pozytywną (komórki w medium, bez leków) oraz absorbancję stosowanych płynów (medium bez komórek i bez leków). Przygotowane panele inkubowano 72 godz., a następnie do każdego dołka dodawano po 10 ml roztworu MTT. Żywe komórki powodowały powstanie błękitnego formazanu, który następnie rozpuszczano izopropanolem i mierzo no gęstość optyczną (OD – *optical density*) przy użyciu czytnika mikroplatek ELISA (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria). Gęstość optyczna odpowiada ilości komórek, które przeżyły inkubację, czyli komórek kontrolnych oraz opornych. We wszystkich badaniach w teście MTT, skorygowana wartość OD wynosiła $>0,050$. Za miarę oporności przyjęto stężenie leku, w którym ginie 50 proc. badanych komórek (LC50 – *lethal concentration to 50% cells*).

Analiza faz cyklu komórkowego. Komórki barwiono jodkiem propidyny (Sigma-Aldrich, P4170, o stężeniu 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rozpuszczonym w buforze cytrynianowym i 2-proc. Tritonie X-100), a następnie analizowano w cytometrze

przeptywowym przy wykorzystaniu programu Multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). W programie Multicycle, w cyklu komórkowym w pierwszej kolejności wyznaczany jest odsetek komórek znajdujących się w fazie apoptotycznej sub-G1, a następnie pozostałych faz, stąd odsetek komórek w fazach G1 + S + G2 = 100 proc. dla pojedynczego badania. Faza sub-G1 jest miernikiem późnej apoptozy komórek, faza G1 stanem spoczynkowym komórek, a fazy S i G2 wyrażają odsetek komórek znajdujących się w fazie proliferacji. Zwiększenie odsetka komórek w dowolnej fazie cyklu komórkowego pod wpływem stosowanego leku oznacza zahamowanie progresji cyklu w tej fazie. Następstwem zaburzenia prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego jest apoptoza komórek.

Kaspaza-3. Końcową fazą apoptozy jest aktywacja kaskady proteaz zwanych kaspazami. Kaspaza-3 jest markerem komórek ulegających apoptozie. Badanie ekspresji tego białka przeprowadzono metodą cytometrii przepływową przy użyciu zestawu Active Caspase-3 PE Mab Apoptosis Kit (Becton Dickinson Biosciences, Nr 550914). Aktywność kaspazy-3 jest proporcjonalna do fluorescencji ekspresji tego białka [4]. Zmiany aktywności kaspazy-3 korelują ze sobą w czasie, w związku z czym wystarczające są pomiary w jednym punkcie czasowym [4]. Kaspaza-3 jest markerem zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzpo pochodnego szlaku apoptotycznego, tj. drogi mitochondrialnej i receptorowej (cyt. wg Jia et al. [5]).

Ocena wczesnej apoptozy i syntezy tlenu azotu (NO). Wczesną apoptozę wyrażoną wiązaniem aneksyny V przez fosfatydyloserynę oraz produkcję tlenu azotu oznaczano metodą cytometrii przepływową przy użyciu zestawu ApoAlert Nitric Oxide/Annexin V Dual Sensor Kit (Becton Dickinson Biosciences, Nr K2013-2). Tlenek azotu ma znaczenie w indukcji apoptozy i zahamowania wzrostu komórek nowotworowych, w wyniku produkcji endogennych reaktywnych związków azotu. Tlenek azotu powoduje apoptozę w komórkach Jurkat, mediowaną uwalnianiem cytochromu C z mitochondriów oraz aktywacją kaspazy-3 i kaspazy-9 [6].

Ekspresję kaspazy-3 oraz ocenę wiązania aneksyny-V i syntezy tlenu azotu wyznaczano używając parametru średniej intensywności fluorescencji (MFI – *mean intensity of fluorescence*), zgodnie z zaleceniami brytyjskiego *Imperial Cancer Research Fund FACS Laboratory* (<http://lif.icnet.uk/axp/facs/davies/stats.html>). Ocenę syntezy tlenu azotu i analizę faz cyklu komórkowego wykonywano przed rozpoczęciem inkubacji oraz po 2 dobach, natomiast test MTT i ekspresję kaspazy-3 analizowano po 3 dobach inkubacji badanych komórek z lekami.

Statystyka. Każde badanie wykonywano co najmniej 3-krotnie. Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe. Różnice wartości średnich porównano testem t-Studenta. Zmianę wartości badanych parametrów indukcji apoptozy po zastosowaniu leku, oceniono testem par Wilcozona. Korelację oceniono testem Pearsona. Znamienność statystyczną przyjęto dla wartości $p < 0,05$.

Wyniki

Cytotoksyczność. Linie ostrej białaczki wykazywały relatywnie dobrą wrażliwość na wszystkie badane preparaty

Tab. 1. Porównanie cytotoksyczności trzech preparatów L-asparaginazy

Table 1. Comparison of cytotoxicity of three L-asparaginases

Cytotoksyczność	CCRF-CEM	Jurkat	K-562	HL-60
LC50 (Medac)	1,29±0,46	0,87±0,71	>10	1,10±0,19
LC50 (Erwinase)	0,12±0,08	0,28±0,29	>10	0,28±0,18
LC50 (Kidrolase)	1,22±0,58	1,13±0,79	>10	1,59±0,57

Wartość LC50 podano w IU/ml. Każdy wynik jest średnią co najmniej 3 niezależnych eksperymentów

L-asparaginazy. Linia K-562 była oporna na wszystkie testowane preparaty L-asparaginazy, aczkolwiek w najwyższych stężeniach L-asparaginaza powodowała cytotoksyczność ok. 34 proc. komórek tej linii. Natomiast linia HL-60 wykazywała wrażliwość na preparaty L-asparaginazy porównywalną z wrażliwością linii limfoblastycznych (tab. 1.).

Analiza faz cyklu komórkowego i zawartości DNA. Wszystkie 3 preparaty L-asparaginazy powodowały wzrost fazy apoptotycznej sub-G1 po 2 dobach inkubacji w liniach limfoblastycznych oraz w linii HL-60, natomiast nie wpływały na wielkość tej fazy w linii K-562. Preparaty L-asparaginazy nie wpływały istotnie na zahamowanie cyklu komórkowego we wszystkich badanych liniach. Zwraca jednak uwagę duża aktywność pro-apoptotyczna preparatu Erwinase w linii HL-60 (tab. 2.).

Ekspresja kaspazy-3. W komórkach obydwu linii limfoblastycznych oraz linii HL-60 ekspresja kaspazy-3 zwiększała się po inkubacji z każdym z badanych preparatów L-asparaginaz we wszystkich przeprowadzonych eksperymentach ($p < 0,001$ w teście par Wilcozona), natomiast nie stwierdzono takiego wzrostu w linii K-562 (tab. 3.).

Analiza syntezy tlenu azotu. We wszystkich badanych liniach po inkubacji z preparatami L-asparaginaz obserwowano wzrost syntezy tlenu azotu, przy czym w liniach wrażliwych na asparaginazę wzrost syntezy był większy (tab. 4.). Średnia wartość MFI odnosząca się do syntezy tlenu azotu, korelowała z wielkością wczesnej apoptozy, wyrażoną jako średnia wartość MFI dla wiązania aneksyny V, wartość testu Pearsona 0,889, $p < 0,01$ (ryc. 2.).

Zależności pomiędzy badanymi parametrami indukcji apoptozy. Wykładniki aktywacji procesów apoptozy wykazywały korelację pomiędzy sobą (ryc. 2. i 3.), jak również odwrotną korelację z cytotoksycznością L-asparaginazy (wyrażoną jako wartość LC50) w teście MTT.

Omówienie wyników

Profil leków cytostatycznych aktywnych w ostrej białaczce limfoblastycznej i mieloblastycznej różni się dość istotnie. Lekami o najwyższej cytotoksyczności wobec limfoblastów są glikokortykoidy, winkrystyna, L-asparaginaza, antracykliny, cytarabina, metotreksat, cyklofosfamid, merkaptopuryna i tioguanina [7]. Natomiast lekami najbardziej aktywnymi wobec mieloblastów są cytarabina, antracykliny, etopozyd i tioguanina [8]. Chociaż komórki ostrych białaczek mieloblastycznych zasadniczo wykazują brak wrażliwości wobec glikokor-

Tab. 2. Analiza faz cyklu komórkowego i zawartości DNA w komórkach
Table 2. Analysis of cell cycle phases and cellular DNA contents

Faza cyklu komórkowego		CCRF-CEM	Jurkat	K-562	HL-60
dzień 0.	sub-G1	2,9±1,0	7,9±8,7	2,2±1,0	3,2±2,2
	G1	48,7±0,3	40,6±6,2	45,6±6,2	41,6±6,9
	S	45,3±0,0	36,1±4,8	52,9±4,9	49,9±4,4
	G2	6,0±0,28	23,3±6,4	1,4±1,3	8,4±8,6
dzień 2.	sub-G1	4,3±1,6	9,5±9,0	2,5±2,0	6,7±4,2
	G1	56,0±4,5	46,7±4,9	45,1±7,4	44,4±7,1
	S	38,3±4,8	32,1±4,6	54,2±7,8	48,8±4,7
	G2	5,7±0,28	20,2±8,0	0,6±1,3	6,7±9,2
Medac	sub-G1	6,6±2,4	9,7±9,0	3,3±2,3	9,4±7,8
	G1	56,7±2,3	47,6±5,8	46,3±6,2	44,8±8,3
	S	37,6±3,1	30,5±1,8	50,6±7,2	49,3±4,1
	G2	5,6±0,8	21,8±5,4	3,3±5,7	5,8±9,1
Erwinase	sub-G1	15,9±11,1	11,0±11,0	2,7±1,1	35,2±13,6
	G1	58,9±0,8	49,9±7,3	46,7±5,0	61,3±5,3
	S	37,1±0,6	27,2±4,0	53,2±5,0	30,3±6,1
	G2	3,9±1,5	22,8±4,0	0,0±0,0	8,9±2,9
Kidrolase	sub-G1	7,7±3,0	9,3±7,8	2,3±1,0	10,4±4,8
	G1	56,6±2,9	46,6±5,7	43,4±4,3	45,3±7,4
	S	37,6±3,0	32,0±3,3	54,8±3,9	50,2±4,0
	G2	5,7±0,1	21,2±5,8	1,6±0,7	4,4±5,4

Wielkość poszczególnych faz cyklu komórkowego podano jako odsetek komórek znajdujących się w danej fazie. Każdy wynik jest średnią co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. W programie Multicycle odsetek komórek w pojedynczym badaniu w fazach jest wyznaczany wg reguły $G1+S+G2=100$ proc., po wcześniejszym wyznaczeniu odsetka komórek znajdujących się w fazie sub-G1

tykoidów [8] i metotreksatu [9], to wykazano, że leki te mogą wywierać również efekt cytotoksyczny wobec mieloblastów. W badaniach *in vivo* [10], stosując wysokie dawki metylprednizolonu, uzyskano efekt przeciwbiałaczkowy (nie różnicowano podtypu AML). Natomiast w badaniach *ex vivo* [11] komórki AML M5 poddane 21-godzinnej terapii z metotrek-

satem podlegały efektowi cytotoksycznemu identycznemu jak komórki ALL *de novo* i we wznowie. L-asparaginaza jest lekiem, który znalazł zastosowanie głównie w terapii ostrych rozrostów limfoblastycznych, jednakże był również stosowany w terapii AML zarówno w pierwszej linii terapii, jak i we wznowach [12, 13].

Tab. 3. Ekspresja kaspazy-3 wyznaczona w komórkach kontrolnych oraz poddanych działaniu różnych preparatów L-asparaginazy podczas 72-godzinnej inkubacji

Table 3. Expression of caspase-3 in control cells and in cells treated with different preparations of L-asparaginase during 72 hours of incubation

Ekspresja kaspazy-3	CCRF-CEM	Jurkat	K-562	HL-60
kontrola	3,8±1,7	11,2±4,1	6,7±3,3	4,9±1,3
Medac	7,1±2,1*	15,1±5,7	6,3±3,7	6,7±1,5*
Erwinase	6,1±4,9	16,2±5,2	7,6±4,9	6,6±1,8
Kidrolase	4,4±0,2	15,7±4,8	7,5±4,4	7,5±2,2*

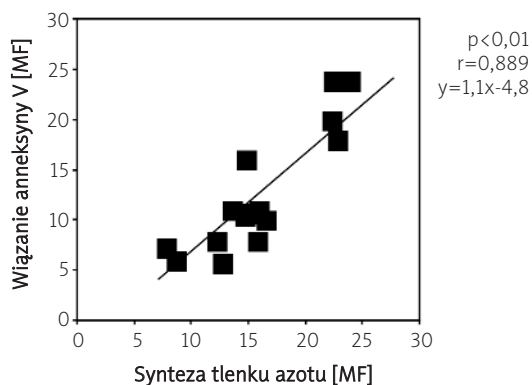
Wartość ekspresji kaspazy-3 podano w MFI. Każdy wynik jest średnią co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. (*) oznacza wartość $p<0,05$ w stosunku do badania kontrolnego dla odpowiedniej linii

Tab. 4. Synteza tlenu azotu wyznaczona w komórkach kontrolnych oraz poddanych działaniu różnych preparatów L-asparaginazy podczas 48-godzinnej inkubacji

Table 4. Nitric oxide synthesis in control cells and in cells treated with different preparations of L-asparaginase during 48 hours of incubation

Synteza tlenu azotu	CCRF-CEM	Jurkat	K-562	HL-60
kontrola	7,7±2,3	12,7±4,2	12,2±1,2	8,6±3,7
Medac	14,7±5,5*	23,9±2,8*	14,9±2,3	16,5±5,1*
Erwinase	13,5±4,5*	22,4±5,6*	14,6±2,9	22,7±10,1*
Kidrolase	15,9±5,9*	22,2±4,4*	15,0±2,5	15,7±4,8*

Wartość syntezy tlenu azotu podano w MFI. Każdy wynik jest średnią co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. (*) oznacza wartość $p<0,05$ w stosunku do badania kontrolnego dla odpowiedniej linii



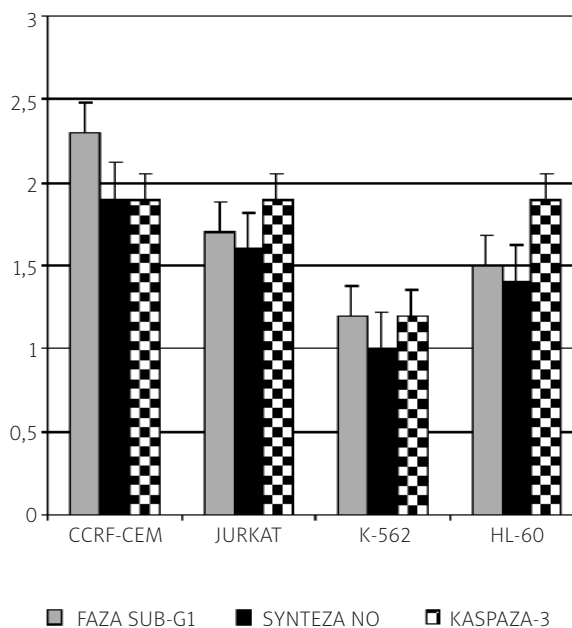
Ryc. 2. Korelacja pomiędzy syntezą tlenu azotu i wczesną apoptozą wyrażoną wiązaniem aneksyny V. Na wykresie wspólnie umieszczono wyniki wszystkich wykonanych badań (po 3–4) dla każdej z czterech badanych linii komórkowych. Każdy punkt wyraża wynik pojedynczego badania

Fig. 2. Correlation between nitric oxide synthesis and early apoptosis expressed as annexin V binding. The graph shows of all results of (3-4 separate) experiments performed for each of the tested cell line

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach wykazano, że L-asparaginaza może wykazywać aktywność również wobec mieloblastów. W analizie użyto 2 linii ostrych białaczek mieloblastycznych, zaliczanych wg klasyfikacji FAB do podtypu M3 (linia HL-60, komórki ostrej białaczki promielocytowej) oraz do podtypu M6 (linia K-562, komórki przewlekłej białaczki szpikowej w fazie kryzy erytroblastycznej). Jako linii porównawczych użyto 2 linii ostrych białaczek limfoblastycznych linii T-komórkowej. Badania eksperymentalne przeprowadzono z użyciem trzech preparatów L-asparaginazy. Stwierdzono, że badane preparaty L-asparaginazy wywierały podobne efekty we wszystkich badaniach w obrębie poszczególnych linii.

W badaniach wykazano, że badane 2 linie mieloidalne wykazywały odmienny profil wrażliwości na preparaty L-asparaginazy. Komórki linii HL-60 wykazywały wrażliwość na L-asparaginazę oraz indukcję procesów apoptotycznych (indukcję fazy sub-G1 w cyklu komórkowym, aktywację kaspazy-3, wiązanie aneksyny-V oraz syntezę tlenu azotu) porównywalną z chemiowrażliwością oraz indukcją apoptozy w komórkach linii ostrych białaczek limfoblastycznych. Natomiast komórki linii K-562 wykazywały całkowitą oporność na wszystkie preparaty L-asparaginazy potwierdzoną przez brak indukcji apoptozy we wszystkich badaniach.

Indukcja apoptozy w komórkach białaczkowych przez L-asparaginazę jest ważnym mechanizmem działania tego leku [14]. W badaniach przeprowadzonych w ostatnich latach stwierdzono, że L-asparaginaza powoduje aktywację kaspazy-3, hamowanie PARP, eksternalizację fosfatydyloseryny i zaburzenie potencjału przezmitochondrialnego [15] oraz zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1 [14], które w efekcie prowadzą do apoptozy. Procesowi temu sprzyja również produkcja tlenu azotu, który może wywierać działanie proapoptotyczne [16]. W przeprowadzonych badaniach na liniach komórkowych obserwowano aktywację



Ryc. 3. Względna aktywacja procesów apoptotycznych w komórkach poddanych działaniu asparaginazy (Medac) w stosunku do komórek kontrolnych

Fig. 3. Ratio of activation of apoptotic processes in cells treated with Asparaginase (Medac) in relation to untreated cells

procesów apoptozy we wszystkich liniach wrażliwych na L-asparaginazę w teście MTT, tj. w liniach ostrych białaczek limfoblastycznych oraz w linii HL-60. Poszczególne parametry indukcji apoptozy korelowały pomiędzy sobą, chociaż w różnym stopniu. Stwierdzono silną korelację pomiędzy indukcją wczesnej apoptozy, wyrażoną wiązaniem aneksyny V i syntezą tlenu azotu. Indukcja apoptozy korelowała z wrażliwością na lek w teście MTT, chociaż w przypadku linii Jurkat zjawiska te były wyrażone słabiej niż w linii CCRF-CEM. Sugeruje to współistnienie innych mechanizmów związanych z działaniem L-asparaginazy, decydujących o efekcie cytotoksycznym w tej linii komórkowej.

Wydaje się, że wrażliwość mieloblastów wobec L-asparaginazy jest zróżnicowana, a zarazem niezależna od rodzaju stosowanego preparatu L-asparaginazy. Komórki linii HL-60 o morfologii M3 są względnie wrażliwe na cytotoksyczne działanie L-asparaginazy. Natomiast komórki linii K-562 o morfologii M6, posiadające 2 kopie chromosomu Philadelphia, wykazują znaczną oporność i brak indukcji apoptozy pod wpływem działania L-asparaginazy.

L-asparaginaza jest stosowana w programach chemioterapii wielolekowej ze względu na odmienny, swoisty mechanizm działania cytotoksycznego. Lek ten wywiera również działanie ochronne (*rescue*) wobec toksycznych efektów metotreksatu i cytarabiny. Sekwencyjne zastosowanie kombinacji metotreksatu i L-asparaginazy lub cytarabiny i L-asparaginazy wykazało dobry efekt w terapii dzieci ze wznową białaczki [17], chociaż nie wykazano wpływu tego efektu na wyniki leczenia ALL w programie BFM-90 [18]. Efekt ochronny L-asparaginazy jest związany z obniżeniem

syntezy białek w normalnej tkance. Natomiast w przypadku podania tych leków w odwrotnej sekwencji (np. metotreksat podawany po L-asparaginazie), powoduje wystąpienie antagonizmu w działaniu cytotoksycznym [17].

W związku z niezadowalającymi wynikami w terapii AML, ciągle trwają poszukiwania leków skutecznych wobec tej choroby. W ostatnich latach pojawiły się próby zastosowania nowych leków w leczeniu AML. Największe zainteresowanie budzą leki zaliczane do tzw. terapii celowanej, a w szczególności inhibitory receptora kinazy tyrozynowej FLT-3/ITD, czyli CD135 (SU5416, SU11657) [19], inhibitory białka MDR1 [20], gemtuzumab ozogamicin (przeciwciała monoklonalne anty-CD33) [21, 22] i inhibitory transferazy farnazylowej (Zarnestra), które hamują drogę sygnałową białka RAS [23].

Podziękowania

Autorzy dziękują anonimowemu recenzentowi za uwagi i sugestie, które przyczyniły się do podniesienia jakości tej pracy.

Piśmiennictwo

1. Gałamon T. Chemia ogólna dla studentów medycyny i stomatologii. PZWL, Warszawa 1988; 126-7.
2. Orzechowska-Juzwenko K. Farmakologia kliniczna leków przeciwnowotworowych. W: Orzechowska-Juzwenko K (red.). Chemioterapia nowotworów. PZWL, Warszawa 1990; 22-64.
3. Styczyński J, Pieters R, Huismans DR, et al. In vitro drug resistance profiles in adult versus childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 110: 813-8.
4. Liu T, Raetz E, Moos PJ, et al. Diversity of the apoptotic response to chemotherapy in childhood leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 223-32.
5. Jia W, Yu C, Rahmani M, et al. Synergistic antileukemic interactions between 17-AAG and UCN-01 involve interruption of RAF/MEK- and AKT-related pathways. *Blood* 2003; 102: 1824-32.
6. Umansky V, Schirmacher V. Nitric oxide-induced apoptosis in tumor cells. *Adv Cancer Res* 2001; 82: 107-31.
7. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339: 605-15.
8. Zwaan CM, Kaspers GJ, Pieters R, et al. Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 2879-86.
9. Rots MG, Pieters R, Peters GJ, et al. Role of folylpolyglutamate synthetase and folylpolyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylolation in childhood leukemia. *Blood* 1999; 93: 1677-83.
10. Ozbek N, Erdemli E, Hicsonmez G, et al. Effects of methylprednisolone on human myeloid leukemic cells in vitro. *Am J Hematol* 1999; 60: 255-9.
11. Rots MG, Pieters R, Jansen G, et al. A possible role for methotrexate in the treatment of childhood acute myeloid leukaemia, in particular for acute monocytic leukaemia. *Eur J Cancer* 2001; 37: 492-8.
12. Perel Y, Auvrignon A, Leblanc T, et al. Impact of addition of maintenance therapy to intensive induction and consolidation chemotherapy for childhood acute myeloblastic leukemia: results of a prospective randomized trial, LAME 89/91. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2774-82.
13. Hiddemann W, Buchner T. Treatment strategies in acute myeloid leukaemia (AML). B. Second line treatment. *Blut* 1990; 60: 163-71.
14. Ueno T, Ohtawa K, Mitsui K, et al. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia* 1997; 11: 1858-61.
15. Holleman A, den Boer ML, Kazemier KM, et al. Resistance to different classes of drugs is associated with impaired apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2003; 102: 4541-6.
16. Shami PJ, Saavedra JE, Wang LY, et al. JS-K, a glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide donor of the diazeniumdiolate class with potent antineoplastic activity. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 409-17.
17. Balis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General principles of chemotherapy. In: Principles and practice of pediatric oncology. Third Edition. Pizzo PA, Poplack DG (red.). Lippincott-Raven, Philadelphia 1997; 215-72.
18. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000; 95: 3310-22.
19. Zwaan CM, Kaspers GJL. Possibilities for tailored and targeted therapy in paediatric acute myeloid leukaemia. *Brit J Haematol* 2004; 127: 264-79.
20. Mahadevan D, List AF. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. *Blood* 2004; 104: 1940-51.
21. Reinhardt D, Diekamp S, Fleischhack G, et al. Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in children with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Onkologie* 2004; 27: 269-72.
22. Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, et al. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003; 102: 2387-94.
23. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukaemia. Hematology. ASH Educational Book 2004; 98-117.

Adres do korespondencji

dr n. med. **Jan Styczyński**
Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika
ul. Curie-Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz
tel. +48 52 585 48 60
faks +48 52 585 40 87
e-mail: jstyczynski@cm.umk.pl