

Paklitaksel jest lekiem przeciwnowotworowym, stosowanym w leczeniu nowotworu jajnika, nowotworu sutka, niedrobnokomórkowym nowotworze płuc i w mięsaku Kaposiego. Pozwala osiągać bardzo dobre efekty leczenia oraz można go stosować w terapii wielolekowej. Prowadzone są też badania nad zastosowaniem paklitakselu w innych nowotworach, m.in. głowy i szyi, prowadzone są w tych przypadkach już badania nad stosowaniem leku w fazie II i III leczenia oraz w połączeniu z radioterapią. Paklitaksel, w odróżnieniu od innych leków, które działają na DNA i powodują jego uszkodzenie, oddziałuje na mikrotubule, blokując komórkę w fazie G2/M podziału, przez powstawanie hiperstabilnego wrzeciona podziałowego i przez to wywołuje śmierć komórki. Sugeruje się jednak, iż paklitaksel działa w komórce również na inne sposoby. Interesujące jest zagadnienie, czy paklitaksel działa na DNA i prowadzi do uszkodzeń struktury. W celu badania potencjalnej genotoksyczności paklitakselu przeprowadzono doświadczenie z zastosowaniem techniki kometkowej (comet assay) na limfocytach krwi obwodowej oraz test apoptozy, celem stwierdzenia czy paklitaksel jest aktywny w komórkach i daje efekt cytotoksyczny. Badania prowadzono na krwi 35 zdrowych ochotników w wypadku comet assay i 5 w wypadku testu apoptozy. Stosowano terapeutyczne stężenia leku.

Otrzymane wyniki sugerują, iż paklitaksel nie uszkadza DNA jądrowego komórki, ale wywołuje apoptozę. Pozwala to wnioskować, iż lek nie działa na komórki niebędące w trakcie podziału i jest bezpieczny w stosowaniu.

Słowa kluczowe: paklitaksel, comet assay, apoptoza.

Brak aktywności genotoksycznej preparatu paklitaksel w limfocytach eksponowanych *in vitro* na terapeutyczne dawki leku

The lack of genotoxic activity of antitumor drug paclitaxel in lymphocytes exposed in vitro to therapeutic drug concentrations

Karolina Maria Górecka¹, Wojciech Gawęcki^{1,2},
Krzysztof Szyfter^{1,2}

¹Institut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

²Katedra i Klinika Otolaryngologii AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

WSTĘP

W latach 70. przeprowadzono zakrojone na szeroką skalę badania różnych związków pochodzenia roślinnego, z nadzieją znalezienia substancji, które można będzie stosować w leczeniu nowotworów. Jedną z nich był paklitaksel (Taxol), wykryty w korze cisu krótkoigłowego (*Taxus brevifolia*). Do tej pory odkryto jeszcze kilka związków o podobnej do paklitakselu budowie, występujące one pod nazwą taksanów.

Obecnie paklitaksel jest stosowany rutynowo w leczeniu niektórych nowotworów, takich jak rak sutka, jajnika, niedrobnokomórkowy rak płuc oraz mięsak Kaposiego występujący u chorych na AIDS. Taksany mogą być z powodzeniem łączone z innymi lekami, co znacznie zwiększa ich zastosowanie w chemioterapii, np. w leczeniu raka jajnika z cisplatyną, a w raku piersi z doksorubicyną. Taksany obok antracyklin należą do najbardziej skutecznych leków chemioterapii raka

sutka, dając 30–60 proc. remisji w monoterapii oraz do 90 proc. w terapii wielolekowej.

Działaniem niepożądanym, stanowiącym czynnik ograniczający stosowanie paklitakselu jest neutropenia. Do innych skutków ubocznych należą: uszkodzenia szpiku kostnego (np. leukopenia), utrata włosów, uszkodzenia nerwów obwodowych, zatrzymanie płynów w organizmie, reakcje uczuleniowe, bóle kostno-stawowe [1]. Sporadycznie występują też reakcje nadwrażliwości: reakcje skórne, uderzenia gorąca, ucisk w klatce piersiowej, gorączka, dreszcze oraz wymagające leczenia spadki lub wzrost ciśnienia tętniczego krwi. Może też wystąpić spastyczny skurcz oskrzeli z dusznością i silnym uczuciem niepokoju. Notowane są nieliczne przypadki zejść śmiertelnych, wywołanych silną nadwrażliwością na paklitaksel [2, 3]. Jednakże nie stwierdzono jednoznacznie czy reakcje nadwrażliwości nie są wywoływane przez inny

Paclitaxel is an anticancer drug used in the treatment of ovarian cancer, breast cancer, non small lung cancer and Kaposi's sarcoma (connected with HIV) with very good results. It can be also used in combination with other drugs. There are reported studies of paclitaxel in the treatment of other cancers, including, for example, head and neck cancer, where paclitaxel was used as a sensitiser in radiotherapy.

Paclitaxel, in contrast to other drugs interacting with DNA and causing DNA lesions, binds to microtubules. Then a cell becomes blocked during the G2/M phases of the cell cycle, forming a hyperstable mitotic spindle and cannot divide. However, it has been suggested that paclitaxel could act in cells also in other ways. Hence, a question of genotoxic activity of paclitaxel emerges.

In this study the comet assay was used to estimate genotoxicity, and the apoptosis test to check whether the drug is active in the cells. The experiments were conducted on blood of healthy volunteers: 35 for the comet assay, and 5 for the apoptosis. Paclitaxel was used in therapeutic concentrations.

The obtained results suggest that paclitaxel does not induce damage to DNA, although it is active in cells, and causes apoptosis. Thus, the results suggest that paclitaxel does not interact with not resting cells and is safe for patients.

Key words: paclitaxel, comet assay, apoptosis.

Tab. 1. Porównanie procesów apoptozy i nekrozy

Apoptoza	Nekroza
<ul style="list-style-type: none"> ▶ proces fizjologiczny, istotny podczas rozwoju i prawidłowego funkcjonowania organizmu, ▶ dotyczy pojedynczych komórek, ▶ objawia się utratą fosfolipidowej asymetryczności błony cytoplazmatycznej, obkurczaniem cytoplazmy, kondensacją jądra komórkowego, powstawaniem mniejszych otoczonych błoną cytoplazmatyczną tworów – ciałek apoptotycznych. 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ proces patologiczny, występujący na skutek działania silnego czynnika chemicznego lub fizycznego, ▶ może dotyczyć całej tkanki, ▶ następuje utrata integralności błony cytoplazmatycznej, fragmentacja komórki.

składnik leku: polioksylogowany olej rydocynowy (Cremophor EL). Opracowano skuteczny sposób łagodzenia reakcji nadwrażliwości i zespołu retencji płynów, są to objawy, które w początkowym okresie ograniczały stosowanie paklitakselu. Premedykacja polega na podawaniu glikokortykosteroidów i leków blokujących receptory histaminowe H1 i H2 [4].

Niestety, w przypadku nowotworów głowy i szyi nie ustalono ostatecznie czy stosowanie paklitakselu przynosi znaczną poprawę. Stosowanie paklitakselu i docetaxelu jako pojedynczych leków, bądź w kombinacji z innymi cytostatykami lub/i radioterapią daje wysoki współczynnik odpowiedzi w niektórych przypadkach, lecz wywołuje również silne skutki uboczne, szczególnie w przypadku leczenia kilkulekowego [5]. Prowadzone są badania nad zastosowaniem leku jako środka zwiększającego podatność na radioterapię. Testy prowadzone *in vitro* na liniach komórkowych wykazały, iż dla wielu linii nowotworowych paklitaxel w kombinacji z naświetlaniem daje efekt addytywny i osiąga poziom odpowiedzi nawet do 100 proc. [6, 7]. Jakkolwiek wyniki badań przedklinicznych i klinicznych fazy II i III wydają się być zachęcające; autorzy wskazują na konieczność dalszych badań przed wprowadzeniem paklitakselu do rutynowego leczenia w przypadku nowotworów głowy i szyi [8].

W odróżnieniu od innych leków przeciwnowotworowych, które dzia-

łają genotoksycznie na DNA komórek neoplastycznych, paklitaxel wywołuje śmierć komórki (apoptozę) poprzez oddziaływanie na mikrotubule i powstawanie hiperstabilnego wrzeciona kariokinetycznego. Istnieją również inne hipotezy na temat oddziaływań paklitakselu z materiałem biologicznym, jednak żaden autor nie neguje istotności wspomnianego wyżej mechanizmu (tab. 1.).

W literaturze nie ma wielu informacji na temat genotoksyczności paklitakselu. W ulotce dostarczanej wraz z lekiem przez producenta wspomina się o potencjalnej genotoksyczności, jednak nie są podane konkretne dane. Wobec szerokiego stosowania Taxolu w leczeniu nowotworów, bardzo istotne staje się pytanie o bezpieczeństwo pacjentów i w tym zakresie podjęto badania nad genotoksycznością preparatu paklitaxel.

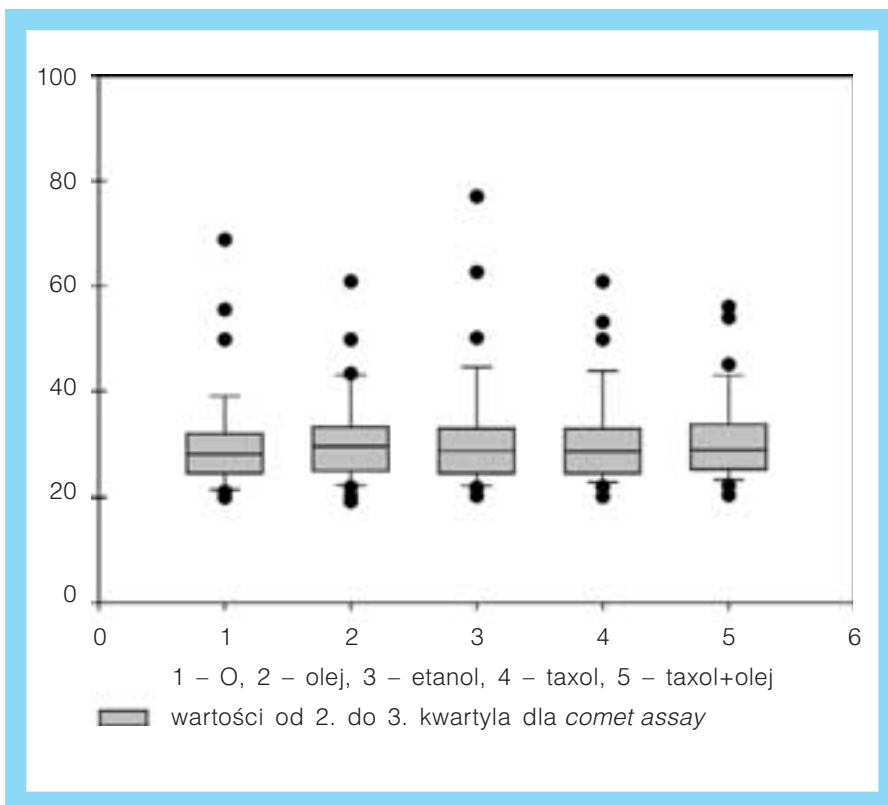
MATERIAŁY I METODY

Do badania genotoksyczności zastosowano test *comet assay*.

Comet assay (elektroforeza pojedynczych komórek)

Przebadano działanie leku na próbach krwi od 35 zdrowych dawców. Dla każdego przeprowadzono eksperyment, w skład którego wchodziły następujące próby:

- a) zerowa (nieekspozycja na działanie leku),
- b) etanolowa (zawierająca 1 proc. etanolu),



Ryc. 1. Porównanie wartości uszkodzeń mierzonych za pomocą techniki kometowej. Oś rzędnych przedstawia długość ogonów komet

- c) olejowa (zawierająca 1 proc. oleju rycynowego),
 d) taxolowa (zawierająca 10 μ M paklitakselu [Bristol-Mayers Squibb]),
 e) taxolowo-olejowa (zawierająca 10 μ M paklitakselu oraz 1 proc. oleju rycynowego).

Izolowane z krwi limfocyty poddawano 3-godzinnej ekspozycji na ww. czynniki, ekspozycję prowadzono w 37°C. Następnie komórki zatapiano w żelu agarozowym i nakraplano na szkiełka mikroskopowe, poddawano lizie w silnie alkalicz-

nym środowisku przez godz. Następnie przeprowadzano etapy rozwijania (40 min) oraz elektroforezy (30 min, 25 V, 300 mA, 0,5–1 V/cm) w 4°C. Następnie preparaty zanurzano na 15 min w płynie neutralizującym. Kolejnym krokiem było suszenie preparatów przez zanurzenie na 10 min w etanolu. Preparaty barwiono DAPI i analizowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego z filtrem dla DAPI, sprzężonego z kamerą i systemem komputerowym do analizy obrazu. W każdym żelu mierzono długość 50 komet. Do oceny wyników zastosowano

test U Manna Whitney'a, przy poziomie istotności $p=0,05$.

Test apoptozy – barwienie aneiny – zastosowano dla potwierdzenia aktywności leku w komórkach.

Test apoptozy – barwienie aneiny-V-fluos

Przebadano próby krwi od 5 zdrowych dawców. Izolowano limfocyty, a następnie inkubowano je przez 24 godz. z medium hodowlanym. Po tym czasie dodawano badanych substancji wg schematu podanego dla *comet assay*, ekspozycję prowadzono przez 24 godz. w 37°C. Następnie próby wirowano, a do osadu limfocytów dodawano mieszaninę barwiącą, zawierającą jodek propidyny (Sigma Aldrich) i aneiny-V-fluos (Roche Applied Sciences), inkubowano w ciemności przez 15 min, po czym nakładano na zwilżone szkiełka mikroskopowe i poddawano analizie mikroskopowej. Stosowano system jak dla *comet assay*, ale z filtrami do FITC i PI. Z każdego preparatu zliczano po 1 000 komórek, dzieląc je na frakcje apoptotyczną, nekrotyczną oraz natywną. Do analizy statystycznej użyto testu X-kwadrat.

WYNIKI

W teście *comet assay* nie stwierdzono, aby paklitaksel powodował uszkodzenia DNA jądrowego komórek (ryc. 1.). Niewielkie różnice wysokości median dla poszczególnych prób w porównaniu z próbą zerową nie osiągnęły progu istotności statystycznej:

- ▶ próba olejowa: próba zerowa; poziom $p=0,42$,
- ▶ próba etanolowa: próba zerowa; poziom $p=0,53$,
- ▶ próba taxolowa: próba zerowa; poziom $p=0,5$,
- ▶ próba taxolowo-olejowa: próba zerowa; poziom $p=0,3$.

Również porównanie próby taxolowej z próbą taxolowo-etanolową

Tab. 2. Procentowy udział frakcji komórek apoptotycznych w poszczególnych próbach

Nr próby	O proc. kom. apop.	Olej proc. kom. apop.	Etanol proc. kom. apop.	Taxol proc. kom. apop.	Taxol+Olej proc. kom. apop.
1.	28	24	29	43	38
2.	22	20	21	45	41
3.	21	22	21	42	45
4.	23	21	21	42	43
5.	22	21	21	44	43

nie wykazało różnicy istotnej statystycznie ($p=0,7$).

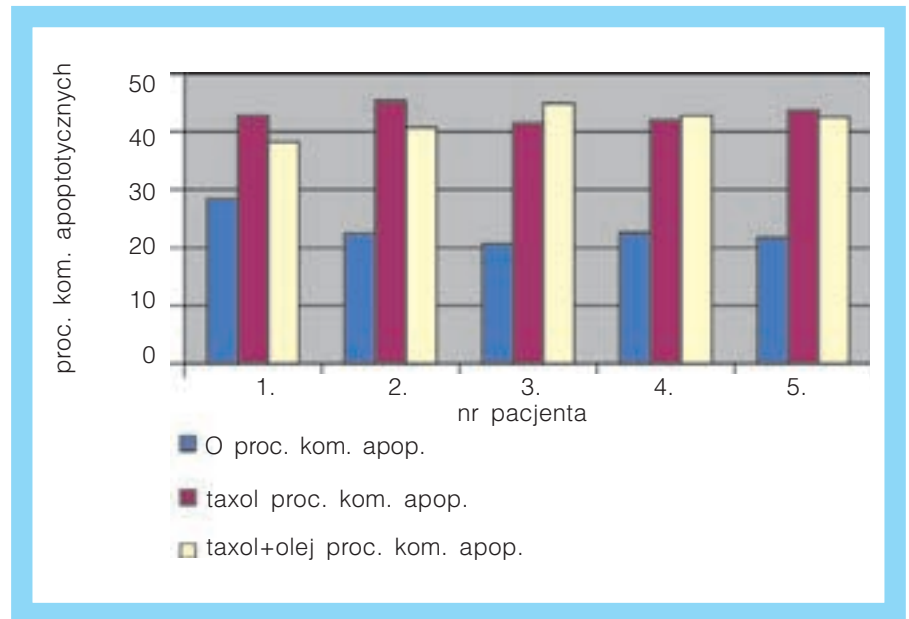
W przypadku trzech dawców uzyskano wyższe wyniki dla kontroli niż dla prób eksponowanych.

Test apoptozy pozwolił stwierdzić, iż te same stężenia paklitakselu powodują wzrost liczby komórek apoptotycznych o średnio 20 proc. w stosunku do prób kontrolnych (tab. 2. i ryc. 2.), co dowodzi aktywności biologicznej stosowanego preparatu paklitaksel.

DYSKUSJA

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, iż w przypadku stosowania leku zawierającego paklitaksel nie powinien występować paradoks Haddowa, polegający na tym, iż na skutek uszkodzeń DNA powstających w komórkach somatycznych występuje zwiększone ryzyko rozwoju wtórnego nowotworu. Wyniki otrzymane w *comet assay* tej serii doświadczeń są zbieżne z danymi literaturowymi [9], w których stwierdza się, że w stężeniach takich, jak stosowane w tym eksperymencie, nie następuje uszkodzenie DNA komórki; zaznaczyć należy, iż stosowane stężenia paklitakselu odpowiadały stężeniom terapeutycznym. Oznacza to jednocześnie, że bezpośredni kontakt z komórkami docelowymi wyklucza rozproszenie leku, co ma miejsce w organizmie, co z kolei oznacza osiągnięcie stężeń wyższych niż terapeutyczne. Jednocześnie pozytywny wynik testu apoptozy potwierdza biologiczną aktywność preparatu. Ponadto seria doświadczeń nad indukcją apoptozy sugeruje, iż paklitaksel jest aktywny w komórkach zarówno w obecności oleju, jak i bez niego, dane te również są potwierdzane przez literaturę [10].

Można zatem wyciągnąć wniosek, iż paklitaksel nie działa w komórkach spoczynkowych (niedzielących się) i jest związkiem bez-



Ryc. 2. Porównanie udziału procentowego komórek apoptotycznych

piecznym. Mimo iż otrzymane wyniki są tak jednoznaczne, wydaje się, że konieczne są poszerzone badania.

PIŚMIENNICTWO

- Pawlicki M, Rolski J. *Nowe farmakologiczne możliwości leczenia raka piersi*. Wsp Onk 2002; 6; 9: 586-96.
- Kloower JS, den Bakker MA, van Meerbeeck JP. *Fatal outcome of hypersensitivity reaction to paclitaxel; a case report*. Wsp Onk 2002; 8: 486-9.
- Specht L, Larsen SK, Hansen HS. *Phase II study of docetaxel and cisplatin in patients with recurrent or disseminated squamous-cell carcinoma of head and neck*. Ann Oncol 2000; 11 (7): 845-9.
- Litwinuk M, Łojko A, Mądry R i wsp. *Częstość występowania i profilaktyka reakcji nadwrażliwości na taksany*. Wsp Onk 2002; 9: 602-6.
- Schrijvers D, Vermorken JB. *Role of taxoids in head and neck cancer*. The Oncologist 2000; 5: 199-208.
- Colveas AD, Posner MR. *Docetaxel in head and neck cancer: a review*. Am J Clin Oncol 1998; 21 (5): 482-6.
- Pulkkinen JO, Pekkola-Heino K, Grenman R. *Paclitaxel and irradiation induce apoptosis in squamous cell carcinoma cell lines in an additive way*. Anticancer Res 1996; 16 (15A): 2923-9.
- Humerickhouse R, Brockstein B, Vokes EE. *The role of paclitaxel in the treatment of head and neck cancer*. Akt Oncol 1999; 102: 103-10.
- Digue L, Orsiere T, De Meo M, et al. *Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centomeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes*. Environ Mol Mutagen 1999; 34 (4): 269-78.
- Engblom P, Pulkkinen JO, Rantanen V, et al. *Effects of paclitaxel with or without cremophor EL on cellular clonogenic survival and apoptosis*. Eur J Cancer 1999; 35 (2): 284-8.

ADRES DO KORESPONDENCJI

Karolina Maria Górecka

Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań
tel. 0 (prefiks) 61 823 30 11
e-mail: kmgorecka@o2.pl