

Wstęp: Odpowiedź kliniczna na chemioterapię zależy od farmakokinetyki leków, odpowiedzi komórkowej na leki oraz potencjału regeneracyjnego komórek rezydualnych.

Cel pracy: Ocena wrażliwości limfoblastów *in vitro* na cytostatyki u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ang. *acute lymphoblastic leukemia* – ALL) *de novo* i we wznowie w odniesieniu do wyników badań cyklu komórkowego i rearanżacji genów.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono u 116 pacjentów, w tym u 106 z ALL *de novo* i 23 podczas wznowy ALL, u 13 z nich badania przeprowadzono zarówno w momencie rozpoznania, jak i we wznowie. Określono profil oporności *in vitro* na 21 cytostatyków oraz skojarzony profil oporności na prednizolon, winkrystynę i L-asparaginazę (PVA). Indeks DNA i fazy cyklu komórkowego wyznaczono metodą cytometrii przepływową. Badania rearanżacji genów wykonano metodami hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (FISH) i polimerazowej reakcji łańcuchowej (ang. *polymerase chain reaction* – PCR).

Wyniki: Profil oporności wyrażony skalą PVA wykazywał większą oporność limfoblastów we wznowie oraz w ostrej białaczce limfoblastycznej T-komórkowej (ang. *T-cell acute lymphoblastic leukaemia* – T-ALL). Limfoblasty we wznowie wykazywały większą oporność *in vitro* na prednizolon, deksametazon i tioguaninę. W zależności od immunofenotypu w ALL *de novo*, limfoblasty T-ALL wykazywały większą oporność niż *common*-ALL na winkrystynę, cytarabinę, fludarabinę i kladrybinę. Limfoblasty *common*-ALL we wznowie wykazywały większą oporność *in vitro* niż limfoblasty *common*-ALL *de novo* w stosunku do fludarabiny i tioguaniny. Limfoblasty pacjentów z TEL-AML1 miały większą wrażliwość *in vitro* na L-asparaginazę. Limfoblasty z rearanżacją MLL były bardziej wrażliwe na cytarabinę i idarubicynę. Nie wykazano różnic w oporności *in vitro* limfoblastów z rearanżacją BCR-ABL. Nie stwierdzono jednoznacznych zależności pomiędzy parametrami cyklu komórkowego i opornością *in vitro* na cytostatyki.

Wniosek: Oporność *in vitro* na cytostatyki w ALL u dzieci jest związana z parametrami biologicznymi limfoblastów.

Słowa kluczowe: oporność na cytostatyki, ostra białaczka limfoblastyczna, rearanżacje genowe, cytogenetyka.

Skojarzony profil oporności *in vitro* na cytostatyki w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci *de novo* i we wznowie – związek z cyklem komórkowym i rearanżacjami genów

Combined in vitro drug resistance profile in childhood acute lymphoblastic leukemia on diagnosis and at relapse – relation to cell cycle and gene rearrangements

Jan Styczyński¹, Beata Kołodziej¹, Beata Rafińska¹, Małgorzata Kubicka¹, Krzysztof Czyżewski¹, Robert Dębski¹, Andrzej Kołtan¹, Sylwia Kołtan¹, Monika Pogorzała¹, Anna Krenska¹, Izabela Pałgan¹, Katarzyna Dylewska¹, Agnieszka Gaca¹, Elżbieta Grześk¹, Barbara Tejza¹, Katarzyna Jankowska¹, Karolina Dulęba¹, Anna Hagner¹, Natalia Bartoszewicz¹, Ewa Demidowicz¹, Aldona Rudzka-Gockiewicz¹, Joanna Szczepanek¹, Andrzej Kurylak¹, Krystyna Soszyńska², Barbara Mucha², Olga Haus^{2,3}, Mariusz Wysocki¹

¹Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, *Collegium Medicum* w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

²Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej, *Collegium Medicum* w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

³Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Wstęp

W komórkach nowotworowych zachodzą procesy umożliwiające im przeżycie w obecności cytostatyku, czyli wytwarza się oporność na chemioterapię. Może ona być pierwotna lub nabyta. Z opornością pierwotną mamy do czynienia wtedy, gdy mechanizmy oporności działały zanim podano lek. Oporność nabyta rozwija się w trakcie chemioterapii [1]. Odpowiedź kliniczna na chemioterapię jest określona 3 czynnikami, tj. farmakokinetyką leku, odpowiedzią komórkową na lek oraz możliwościami odrostu pozostających komórek białaczkowych. Większość niepowodzeń terapeutycznych może być wyjaśniona opornością farmakokinetyczną, opornością komórkową i minimalną chorobą resztkową [2]. Oporność na cytostatyki jest zjawiskiem wieloczynnikowym nawet dla pojedynczego leku.

W chemioterapii skojarzonej ostrej białaczki limfoblastycznej stosuje się wiele leków. Efektem tego jest nakładanie się różnych mechanizmów. Badanie wrażliwości i oporności komórek nowotworowych na cytostatyki można przeprowadzić, badając mechanizmy oporności będące przyczyną oporności lub wykonując testy przeżycia komórek białaczkowych przez określenie ich wrażliwości na cytotoksyczne działanie leków przeciwbiałaczkowych.

Analogicznie, do określania antybiogramów oceniających wrażliwość bakterii na antybiotyki Pieters i wsp. wprowadzili w 1988 r. zmodyfikowany test MTT, opracowany przez Mosmanna w 1983 r. [3]. Niedługo potem wykazano, że profil oporności *in vitro* na cytostatyki ma bardzo silne znaczenie rokownicze w ALL [4], zwłaszcza na cytarabinę u niemowląt [5] oraz na prednizolon, winkrystynę i L-asparaginazę u dzieci starszych [6, 7]. W ostatnich latach wykazano, że skojarzony profil oporności na cytostatyki koreluje z profilem

Background: The clinical effect of chemotherapy is dependent on drug pharmacokinetics, cellular response and regenerative potential of residual cells.

Objective: Analysis of *in vitro* drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) on diagnosis and at relapse, with respect to cell cycle study and gene rearrangements.

Material and methods: A total of 116 patients entered the study, including 106 *de novo* and 23 relapsed children; in 13 patients paired analysis was performed. *In vitro* drug resistance profile for 21 compounds was done by the MTT assay, including combined drug resistance profile for prednisolone, vincristine and L-asparaginase (PVA score). DNA index and cell cycle phases were analyzed by flow cytometry. Gene rearrangement study was done by FISH and PCR.

Results: PVA score showed higher *in vitro* drug resistance of lymphoblasts at relapse and in T-ALL. Relapsed lymphoblasts were more *in vitro* resistant to prednisolone, dexamethasone and thioguanine. Paired analysis showed good sensitivity at relapse for cytarabine and cladribine. T-ALL lymphoblasts were more *in vitro* resistant than common-ALL to vincristine, cytarabine, fludarabine and cladribine. Relapsed common-ALL were more *in vitro* resistant than common-ALL at first diagnosis to fludarabine and thioguanine. Lymphoblasts with TEL-AML1 rearrangement were more drug sensitive to L-asparaginase; lymphoblasts with MLL rearrangements were more sensitive to cytarabine and idarubicin. No differences in drug resistance were found for BCR-ABL lymphoblasts. No unambiguous relations were found between cell cycle parameters and cellular drug resistance.

Conclusion: *In vitro* drug resistance in childhood ALL is related to biological features of lymphoblasts.

Key words: drug resistance, acute lymphoblastic leukaemia, gene rearrangements, cytogenetics.

ekspresji genów [8, 9], jak również ma związek z polimorfizmem genowym w dziecięcej ALL [10, 11].

Celem pracy była ocena wrażliwości limfoblastów *in vitro* na cytostatyki u dzieci z ALL *de novo* i we wznowie w odniesieniu do wyników badań cyklu komórkowego i rearanżacji genów.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 116 pacjentów w wieku 0,1–17,9 roku (mediana 5,4 roku) diagnozowanych i leczonych w jednym ośrodku, w tym u 106 pacjentów (60 chłopców, 46 dziewcząt) z ALL *de novo* i u 23 podczas wznowy ALL (11 chłopców, 12 dziewcząt); przy czym u 13 pacjentów badania przeprowadzono zarówno w momencie rozpoznania, jak i we wznowie.

Określono profil oporności *in vitro* na cytostatyki w teście MTT na 3–21 leków dla każdego pacjenta (tab. 1) oraz skojarzony profil oporności na prednizolon, winkrystynę i L-asparaginazę (PVA).

Izolacja komórek jednojądrzastych

W momencie rozpoznania białaczki lub jej wznowy, szpik kostny pobierano na heparynę (15–20 U/ml szpiku kostnego). Limfoblasty izolowano na gradiencie stężeń (Gradisol L, Aqua Medica, Łódź), płukano 2-krotnie w RPMI-1640 (Sigma, St Louis, USA). Nadmiar erytrocytów usuwano w roztworze chlorku amonowego, powodując ich lizę. Wyizolowane komórki zawieszano w medium hodowlanym w stężeniu ok. $2,0 \times 10^6$ komórek/ml. Żywotność komórek oceniano barwieniem z 0,4% błękitem trypanu (Sigma); wszystkie próbki miały ponad 95-procentową żywotność. Jednocześnie wykonywano cytospiny, używając wirówki Sigma (typ 3-15, Sigma). Po barwieniu metodą May-Grunwald-Giemsa, morfologię komórek oceniano w mikroskopie świetlnym Nikon Eclipse E600.

Badania oporności *in vitro* na cytostatyki

Profil wrażliwości i oporności komórek białaczkowych określano testem cytotoksyczności z solami tetrazolowymi MTT. Zasada testu MTT opiera się na redukcji żółtego rozpuszczalnego bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolu (MTT) do nierozpuszczalnego błękitnego formazanu [12]. Reakcja ta przebiega jedynie w żywych komórkach, w ich mitochondriach. Ilość wytworzonego formazanu jest wprost proporcjonalna do liczby żywych (czyli opornych) komórek [13]. Po rozpuszczeniu formazanu przy użyciu izopropanolu mierzona absorbancja odpowiada liczbie żywych komórek.

Po izolacji i 2-krotnym płukaniu limfoblastów, ich stężenie dostosowywano do ok. 2×10^6 /ml. Do mikro płytki titracyjnej 96-dołkowej (Profilab, Warszawa) dodawano po 80 μ l zawiesiny komórkowej do każdego dołka. Do dołków tych dodano uprzednio po 20 μ l roztworu badanych związków w znanych stężeniach. Wykonywano po 2 badania (tj. po 2 dołki) dla każdego stężenia. Dodatkowo, na każdej płytce przeprowadzano kontrolę pozytywną (komórki w medium, bez leków cytotoksycznych) oraz absorbancję stosowanych płynów (medium bez komórek i bez leków). Przygotowane panele inkubowano 92 godz. Odsetek komórek żywych oceniano jako reakcję kolorymetryczną po dodaniu 10 μ l soli tetrazolowej bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-yl)-2,5-difenylo tetrazolu (MTT, Sigma). Po dalszych 4 godz. inkubacji z MTT i po wytworzeniu kryształów formazanu przez żywe komórki (tj. komórki kontrolne oraz komórki odporne) rozpuszczano je w izopropanolu zakwaszonym przy użyciu 1N HCl. Ilość wytworzonego formazanu oznaczano, określając gęstość optyczną (ang. *optical density* – OD) przy zastosowaniu czytnika ELISA (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) i oprogramowania DigiWin (Asys Hitech) dla 96-dołkowych płytek mikrotitracyjnych przy długości fali 550 nm i długości fali referencyjnej 720 nm, wykorzystując właściwości kolorymetryczne rozpuszczonego formazanu. Ponieważ wartość OD jest liniowo zależna od liczby żywych komórek [13, 14], % komórek żywych

Tabela 1. Leki i zakres testowanych stężeń zastosowane w badaniach profilu oporności *in vitro* na cytostatyki
Table 1. Drugs and tested concentrations used in the study on *in vitro* drug resistance profile

Lek	Producent	Zakres stężeń
prednizolon	Jelfa, Jelenia Góra	0,007–250 µg/ml
deksametazon	Jelfa, Jelenia Góra	0,0002–6 µg/ml
winkrystyna	Eli-Lilly, Indianapolis	0,019–20 µg/ml
idarubicyna	Farmitalia, Mediolan	0,0019–2 µg/ml
daunorubicyna	Rhone-Poulenc-Rhorer, Paryż	0,0019–2 µg/ml
dokсорubicyna	Farmitalia, Mediolan	0,0078–8 µg/ml
mitoksantron	Jelfa, Jelenia Góra	0,001–1 µg/ml
etopozyd	Bristol-Myers Squibb, Princeton	0,048–50 µg/ml
L-asparaginaza	Medac, Hamburg	0,0032–10 IU/ml
melfalan	Alkeran, Glaxo Wellcome, Parma, Włochy	0,038–40 µg/ml
cytarabina	Cytosar, Pharmacia & Upjohn	0,0097–10 µg/ml
fludarabina	Fludara, Schering AG, Berlin	0,019–20 µg/µl
kladrybina	Biodribin, Bioton, Warszawa	0,0004–40 µg/µl
tioguanina	Sigma, nr A4882	1,56–50 µg/µl
merkaptopuryna	Sigma, nr M7000	15,6–500 µg/µl
tiotepa	Lederle, Riemser, Greifswald, Niemcy	0,096–100 µg/µl
treosulfan	Ovastat, Medac, Hamburg	0,0005–1 µg/µl
cyklofosfamid	4-HOO-Cyclophosphamide, Asta Medica	0,096–100 µg/µl
tenipozyd	Vumon; Bristol-Myers Squibb, Princeton	0,0078–8 µg/ml
windezyna	Eli-Lilly, Indianapolis	0,02–20 µg/µl
ifosfamid	4-HOO-Ifosfamide, Hamburg, Asta Medica	0,096–100 µg/µl

(ang. *leukemic cell survival* – LCS) dla danego stężenia cytostatyku wyliczono z równania:

$$\text{LCS} = [\text{OD badanego stężenia cytostatyku} - \text{OD płynów}] / [\text{średnie OD dołków kontrolnych} - \text{OD płynów}] \times 100\%$$

Wyznaczano krzywą kalibracyjną dla badanych 6 stężeń cytostatyków. W końcowym etapie obliczano LC50 (*lethal concentration for 50% of cells*), tj. stężenie leku, w którym ginie 50% komórek białaczkowych wg następującego wzoru [15]:

$$\text{LC50} = [(\% \text{LCS powyżej } 50\%) - 50] / [(\% \text{ LCS powyżej } 50\%) - (\% \text{ LCS poniżej } 50\%)] \times [\text{stężenie leku poniżej } 50\% \text{ LCS} - \text{stężenie leku powyżej } 50\% \text{ LCS}] + [\text{stężenie leku powyżej } 50\% \text{ LCS}]$$

Wielkość ta jest miarą oporności badanych komórek na testowany lek, tj. im wyższa wartość LC50, tym stosunkowo bardziej odporne są komórki na dany lek (ryc. 1).

Oporność względna

W celu porównania względnej oporności na testowany lek pomiędzy 2 badanymi grupami, zastosowano parametr względnej oporności (ang. *relative resistance* – RR), jako stosunek mediany wartości LC50 dla danego leku

w jednej grupie do mediany wartości LC50 dla tego leku w drugiej grupie.

Kryteria skutecznego przeprowadzenia testu MTT

Zawiesina do badań w momencie rozpoczęcia testu zawierała co najmniej 90% limfoblastów. Po 4 dobach inkubacji kontrolne dołki zawierały co najmniej 70% komórek nowotworowych, a gęstość optyczna (OD) wynosiła co najmniej 0,050 [16, 17].

Skala PVA

Dla wszystkich pacjentów wyznaczono wartość skojarzonego profilu oporności na prednizolon, winkrystynę i L-asparaginazę, zgodnie z wartościami granicznymi przedstawionymi w tab. 2., odniesionymi do wartości procentylowych, uprzednio wyznaczonych dla dzieci populacji polskiej z ostrą białaczką limfoblastyczną [18]. Punktacja PVA jest sumą punktów odpowiadających oporności na te leki. Punktacja PVA przyjmuje wartości 3–9. Wartości 3–4 odpowiadają profilowi wrażliwemu, 5–7 profilowi pośredniemu i 8–9 profilowi opornemu. W przypadku sa-

moistnej apoptozy komórek białaczkowych w trakcie trwania testu, jako wartość PVA przyjęto 0.

Badania cytogenetyczne i molekularne

Indeks DNA (tj. stosunek zawartości DNA w badanych komórkach nowotworowych do zawartości DNA komórek prawidłowych) i fazy cyklu komórkowego G0/G1, S i G2/M wyznaczono metodą cytometrii przepływowej. Aktywność proliferacyjną wyznaczano jako odsetek komórek znajdujących się w fazie S i G2/M. Badania cytogenetyczne wykonano metodą prążkową. Badania molekularne w kierunku obecności transkryptów BCR-ABL, MLL-AF4 i TEL-AML1 wykonano metodami FISH i PCR.

Metody statystyczne

W celu porównania parametrów pomiędzy analizowanymi grupami stosowano testy nieparametryczne – test U Manna-Whitneya dla zmiennych niepowiązanych oraz test par Wilcoxon dla zmiennych powiązanych (ang. *Wilcoxon matched-pair analysis*).

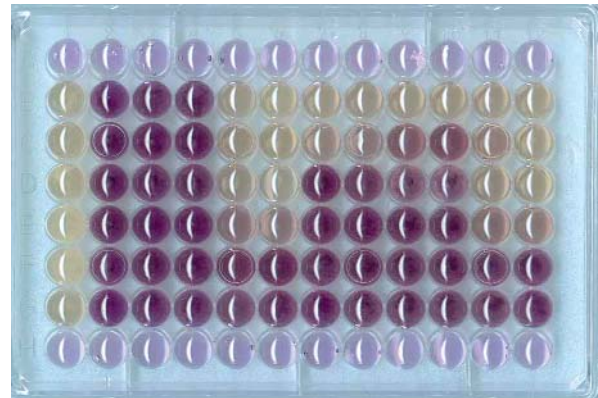
Wyniki

Limfoblasty we wznowie wykazywały większą oporność na większość testowanych leków. Znamienność statystyczną wykazano dla prednizolonu (RR=10; p=0,0222), deksametazonu (RR>28,6; p=0,0272) i tioguaniny (RR=2,6; p=0,0049), natomiast trend do większej oporności stwierdzono w przypadku L-asparaginazy (RR=1,8; p=0,0958) i melfafanu (RR=1,7; p=0,0904) (tab. 3.). Skojarzony profil oporności *in vitro* na cytostatyki wykazywał większą oporność we wznowie ALL (mediana PVA 6 vs 5; p=0,0053) (ryc. 2.).

Wykonano również analizę sparowanych wyników MTT, tzn. badania, które wykonano w pierwszym rozpoznaniu i we wznowie dla danego pacjenta i dla danego leku. We wznowie stwierdzono nieznamienne większą oporność na glikokortykoidy (prednizolon RR=3,1; deksametazon RR>2,5). Limfoblasty we wznowie wykazywały dobrą wrażliwość na cytarabinę (RR=0,5; p=0,0451) i kladrybinę (RR=0,1; p=0,0231).

W zależności od immunofenotypu w ALL *de novo*, limfoblasty T-ALL wykazywały większą oporność na wszystkie leki (prawdopodobnie z wyjątkiem tioguaniny), przy czym znamienność statystyczną stwierdzono dla winkrystyny, cytarabiny, fludarabiny i kladrybiny (tab. 4.).

Limfoblasty *common*-ALL we wznowie wykazywały większą oporność niż limfoblasty *common*-ALL *de novo* w sto-



Ryc. 1. Obraz płytki 96-dotkowej po zakończeniu testu MTT. W kolejnych kolumnach znajdują się: medium (1 kolumna); komórki kontrolne (1 kolumna); komórki + prednizolon (2 kolumny, bardzo duża oporność komórek); komórki + winkrystyna (2 kolumny, wrażliwość komórek); komórki + daunorubicyna (2 kolumny, umiarkowana oporność); komórki + asparaginaza (2 kolumny, oporność); komórki + etopozyd (2 kolumny, wrażliwość)

Fig. 1. A picture of 96-well plate at the end of the MTT assay. The description of columns: medium (1 column); control cells (1 column); cells + prednisolone (2 columns, high cellular resistance); cells + vincristine (2 columns, cellular sensitivity); cells + daunorubicin (2 columns, intermediate cellular resistance); cells + asparaginase (2 columns, cellular resistance); cells + etoposide (2 columns, cellular sensitivity)

sunku do większości badanych leków. Znamienność statystyczną wykazano w stosunku do fludarabiny i tioguaniny. Trend do większej oporności we wznowie stwierdzono wobec prednizolonu, deksametazonu, melfafanu, cytarabiny i merkaptopuryny (tab. 4.). Ze względu na liczebność grupy T-ALL we wznowie (n=3) nie wykonano analizy wyników testu MTT we wznowie ALL w zależności od immunofenotypu.

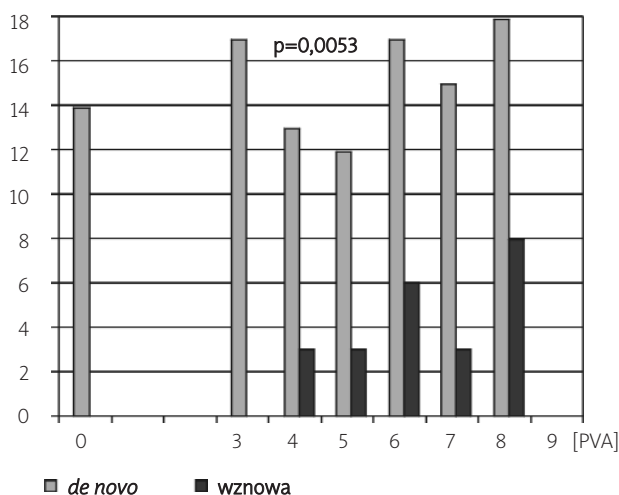
Limfoblasty pacjentów z TEL-AML1 (n=9) miały większą wrażliwość, a limfoblasty pacjentów z BCR-ABL (n=3) lub z rearanzacją MLL (n=4) miały większą oporność na większość testowanych cytostatyków, jednak różnice nie osiągnęły znamienności statystycznej w większości przypadków. Nie stwierdzono związku pomiędzy parametrami cyklu komórkowego (hiperdiploidia, odsetek komórek w fazie S >6% i aktywność proliferacyjna >12%) i opornością *in vitro* na cytostatyki (tab. 5.).

Dyskusja

Odpowiedź na chemioterapię w ALL zależy od 3 czynników – ilości leku, która dotrze do komórek białaczkowych, efektu, jaki lek wywoła w komórce białaczkowej oraz po-

Tabela 2. Graniczne wartości stężenia leku (LC50) dla punktacji PVA określające skojarzony profil oporności [18]
Table 2. Cut-off values of LC50 drug concentration for PVA score of combined drug resistance profile [18]

Punktacja oporności	1	2	3
percentyl	0.–33.	33.–67.	67.–100.
prednizolon	≤2,7 µg/ml	2,7–71,75 µg/ml	≥71,75 µg/ml
winkrystyna	≤0,915 µg/ml	0,915–2,33 µg/ml	≥2,33 µg/ml
L-asparaginaza	≤0,28 IU/ml	0,28–1,09 IU/ml	≥1,09 IU/ml



Ryc. 2. Dystrybucja wartości PVA u pacjentów z ALL *de novo* i we wznowie

Fig. 2. PVA distribution in newly diagnosed and relapsed ALL patients

tencjału wzrostowego komórek rezydualnych [4]. Dlatego niepowodzenia w terapii ALL są związane z opornością farmakologiczną, opornością komórkową i minimalną chorobą resztkową. W niniejszej pracy podjęto temat badań oporności komórkowej w ALL.

Zgodnie z przewidywaniami i wcześniejszymi wynikami [19, 20] oporność komórkowa limfoblastów *in vitro* na cytostatyki u pacjentów we wznowie ALL była większa niż u pacjentów w momencie pierwszego rozpoznania na większość testowanych leków. We wznowie ALL limfoblasty zachowywały jednak dobrą wrażliwość na cytarabinę i kładrybinę. Biorąc pod uwagę jedynie pacjentów z limfoblastami o fenotypie *common*-ALL, pacjenci we wznowie mieli limfoblasty bardziej odporne *in vitro* na większość testowanych cytostatyków niż pacjenci z ALL *de novo*. Analizując immunofenotyp limfoblastów wśród pacjentów z pierwszym rozpoznaniem, stwierdzono, że limfoblasty *common*-ALL pacjentów *de novo* były w większości przypadków bardziej wrażliwe niż limfoblasty T-ALL *de novo* (prawdopodobnie z wyjątkiem tioguaniny i ifosfamidu).

Tabela 3. Profil oporności *in vitro* na cytostatyki u pacjentów z ALL *de novo* i ALL z wznową

Table 3. *In vitro* drug resistance profile in patients with ALL on diagnosis and at relapse

Leki	n	De novo ALL			n	Wznowy ALL			RR	p
		mediana	min.	maks.		mediana	min.	maks.		
PVA	106	5	0	8	23	6	4	8		0,0053
prednizolon	92	6,15	0,003	>250	23	64,01	0,18	>250	10,4	0,0222
deksametazon	61	0,21	0,0001	>6	14	>6	0,02	>6	>28,6	0,0272
winkrystyna	93	0,84	0,01	>20	23	1,57	0,019	>20	1,9	0,1769
idarubicyna	77	0,11	0,001	>2	18	0,22	0,02	1,46	1,9	0,1084
daunorubicyna	92	0,24	0,001	>2	23	0,3	0,02	1,21	1,3	0,3651
doksorubicyna	75	1,16	0,09	>8	21	1,3	0,2295	>8	1,2	0,5304
mitoksantron	59	0,057	0,01	>1	15	0,09	0,02	>1	1,6	0,1570
etopozyd	85	1,4	0,048	>50	22	1,905	0,08	>50	1,4	0,3391
L-asparaginaza	90	0,37	0,0032	>10	22	0,675	0,05	>10	1,8	0,0958
melfalan	50	2,59	1,47	>40	15	4,44	1,57	23,59	1,7	0,0904
cytarabina	74	0,42	0,0097	>10	17	0,68	0,04	>10	1,6	0,6688
fludarabina	61	0,29	0,019	>20	16	0,465	0,16	>10	1,6	0,1151
kladrybina	63	0,05	0,001	>40	14	0,09	0,003	>40	1,9	0,8427
tioguanina	77	4,77	0,83	>50	20	12,44	1,56	59,46	2,6	0,0049
merkaptopuryna	55	57,69	8,45	>500	14	91,61	16,88	>500	1,6	0,1277
tiotepa	54	0,76	0,05	>100	17	1,37	0,1141	9,26	1,8	0,0834
treosulfan	58	0,57	0,00001	>1	14	0,14	0,00002	>1	0,3	0,3771
cyklofosamid	53	0,42	0,097	>100	17	0,67	0,097	2,98	1,6	0,2978
tenipozyd	14	0,52	0,0078	6,28	3	0,35	0,16	1,69	0,7	0,6143
windezyna	10	2,88	0,24	>20	3	1,25	0,068	1,52	0,4	0,2341
ifosamid	26	2,72	0,097	31,6	10	8,6	0,8	20,1	3,2	0,1427

n – liczba pacjentów, u których wykonano badanie oporności *in vitro* na dany lek, RR – oporność względna, wyznaczona jako stosunek wartości median (wznowa/*de novo* ALL), p – wartość wg testu Manna-Whitneya wyznaczona dla całych grup pacjentów z ALL *de novo* i z wznową

Tabela 4. Oporność względna *in vitro* na cytostatyki u pacjentów w zależności od immunofenotypu w ALL *de novo* oraz w *common-ALL de novo* i w wznowie

Table 4. Relative resistance to drugs with respect to lymphoblasts immunophenotype in newly diagnosed ALL and in relapsed and *de novo common-ALL*

Leki	ALL <i>de novo</i>		Common-ALL	
	T-ALL/ <i>common-ALL</i>	p	wznowa/ <i>de novo</i>	p
PVA	6 vs 5	0,0316	6 vs 5	0,0077
prednizolon	12,0	0,1988	16,0	0,0764
deksametazon	30,9	0,1051	20,5	0,0897
winkrystyna	2,3	0,0382	2,4	0,187
idarubicyna	1,6	0,2847	2,1	0,1526
daunorubicyna	1,4	0,2773	0,9	0,9948
doksorubicyna	6,0	0,2535	1,7	0,1565
mitoksantron	2,3	0,3428	2,4	0,1369
etopozyd	2,5	0,1784	1,7	0,4406
L-asparaginaza	2,1	0,1377	1,8	0,1823
melfalan	5,1	0,0688	2,0	0,0623
cytarabina	4,5	0,0266	2,2	0,0875
fludarabina	7,1	0,0008	1,8	0,0158
kladrybina	20,6	0,0432	8,7	0,4571
tioguanina	0,7	0,704	3,2	0,0166
merkaptopuryna	4,6	0,0748	1,6	0,062
tiotepa	2,9	0,3133	1,7	0,1403
treosulfan	>1,1	0,7112	0,2	0,2476
cyklofosfamid	1,4	0,6512	1,4	0,5001
tenipozyd	3,1	0,2012	ND	
windezyna	>11,2	0,2373	ND	
ifosfamid	1	0,6547	3,1	0,3861

wartość <1 oznacza lepszą wrażliwość *in vitro* na badany lek w analizowanej podgrupie pacjentów mających daną cechę cytogenetyczną w stosunku do pacjentów niemających tej cechy. Wartość >1 oznacza większą oporność *in vitro* na badany lek. ND – nie określono (not done)

W drugiej części analizy oceniono wpływ najczęstszych ilościowych i strukturalnych aberracji cytogenetycznych występujących u dzieci z ALL oraz parametrów cyklu komórkowego na oporność *in vitro* na cytostatyki. W analizie uwzględniono korzystne aberracje występujące w limfoblastach, takie jak hiperdiploidia i rearanżacja TEL-AML1, oraz niekorzystne aberracje, jakimi są rearanżacje genów BCR-ABL i MLL.

Hiperdiploidia >50 chromosomów (ang. *high hyperdiploidy*) występuje w 25–30% przypadków ALL. Uważa się, że hiperdiploidia ma korzystną wartość rokowniczą w przypadku stwierdzenia potrójnej trisomii chromosomów 4, 10, 17 [21, 22]. Niewielka hiperdiploidia (45–50 chromosomów, ang. *low hyperdiploidy*), występuje w 6–15% przypadków ALL i nie ma znaczenia rokowniczego [23]. Z kolei hiperdiploidia bliska tetraploidii (82–92 chromosomów, ang. *near tetraploidy*) jest spotykana u ok. 1% dzieci, głównie w T-ALL i wiąże się z niekorzyst-

nym rokowaniem [24]. Pseudodiploidia (46 chromosomów + aberracja strukturalna) stanowi heterogenną grupę o rokowaniu uzależnionym od typu aberracji i występuje u ok. 40% dzieci z ALL [25]. Hipodiploidia <45 chromosomów w komórce białaczkowej występuje u <1% dzieci, a rokowanie jest niekorzystne [26].

Indeks DNA (DI) to stosunek fluorescencji badanych komórek krwi obwodowej, szpiku lub płynu mózgowo-rdzeniowego do fluorescencji komórek standardowych, tj. o prawidłowej ilości DNA. Wartość indeksu DNA w prawidłowych komórkach wynosi 1 (komórki diploidalne). Wartość indeksu DNA jest czynnikiem rokowniczym w ALL u dzieci. Wartość DI $\geq 1,16$ jest zmianą korzystną, podczas gdy DI <0,95 jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [27–30].

Wyróżnia się następujące fazy cyklu komórkowego:

- G0 – fazę spoczynkową, czyli fazę komórek nieuczestniczących w cyklu podziałowym,
- G1 – fazę poprzedzającą syntezę DNA,

Tabela 5. Oporność względna na cytostatyki w zależności od parametrów cytogenetycznych i molekularnych
Table 5. Relative resistance to drugs with respect to cytogenetic and molecular aberrations

Leki	TEL-AML obecna vs nieobecna	BCR-ABL obecna vs nieobecna	Rearanżacja MLL obecna vs nieobecna	Hiperdiploidia (1,16 vs <1,16)	Faza S (6 vs <6%)	Aktywność proliferacyjna (12 vs <12%)
prednizolon	0,6	2,3	4,2	0,7	2,0	2,6
deksametazon	0,5	2,2	8,1	0,8	2,1	5,4
winkrystyna	1,0	1,2	6,6	0,9	8,5*	3,1
L-asparaginaza	0,2*	4,9	1,7	0,5	1,3	8,7*
daunorubicyna	0,8	1,7	0,6	1,1	1,3*	1,6
doksorubicyna	0,6	1,3	0,9	1,6	6,0	2,1
idarubicyna	0,7	1,5	0,2*	1,7	2,1	3,6*
mitoksantron	0,9	2,6	0,4	3,2	1,2	1,8
etopozyd	0,6	3,7**	1,2	1,3	1,2	1,6
merkaptopuryna	0,5	1,3	2,3	0,5**	1,5	2,7
tioguanina	0,4	1,2	2,0	0,4**	1,3	1,6
cytarabina	0,8	1,2	0,6*	0,4**	1,1	1,4
kladrybina	0,8	4,3	6,2	0,6	3,6	4,4**
fludarabina	0,7	1,3	8,3	0,8	1,3	2,8
cyklofosfamid	0,3	3,5	0,5	0,9	0,8	0,8
ifosfamid	0,6	1,4	6,0	0,8	0,7	0,9
melfalan	1,1	1,2	4,0	2,3	0,9	0,9
tiotepa	1,0	0,9	2,1	1,8	0,4	0,2
treosulfan	0,8	0,6	0,9	0,8	2,9	3,7**

wartość <1 oznacza lepszą wrażliwość *in vitro* na badany lek w analizowanej podgrupie pacjentów mających daną cechę cytogenetyczną w stosunku do pacjentów niemających tej cechy. Wartość >1 oznacza większą oporność *in vitro* na badany lek

* $p < 0,05$; ** $p < 0,10$, w pozostałych przypadkach $p > 0,1$

- S – fazę syntezy DNA,
- G2 – fazę przedpodziałową,
- M – fazę podziału (mitozy).

Dzięki wyznaczeniu faz cyklu komórkowego określa się aktywność proliferacyjną jako sumę odsetka komórek w fazie syntezy (S) oraz fazie przedmitotycznej (G2) i mitozie (M). Istnieją dane sugerujące, że wielkość odsetka komórek w fazie S oraz aktywności proliferacyjnej koreluje z agresywnością choroby [29].

Pacjenci z hiperdiploidią limfoblastów wykazywali wrażliwość *in vitro* na większość badanych leków, a zwłaszcza na tiopuryny i cytarabinę. We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych przez innych naukowców, obserwowano wrażliwość hiperdiploidalnych limfoblastów na antymetabolity [31].

TEL-AML1 jest najczęstszą aberracją chromosomową w dziecięcej ALL. Stwierdza się ją u 20–25% pacjentów, zazwyczaj w pre-B-ALL o fenotypie CD10+CD19+HLA-DR+ [32]. Charakteryzuje się dużą lekowrażliwością, a indeks DNA zwykle wynosi 1 [33, 34]. Fuzja onkogenu TEL/AML1 w ALL wiąże się z pomyślnym rokowaniem [33, 35]. Pacjenci z lim-

foblastami z rearanżacją genów TEL-AML1 wykazywali lepszą wrażliwość wobec L-asparaginazy, co potwierdza wyniki wcześniejszych badań [33].

Drugą analizowaną rearanżacją genową była fuzja BCR-ABL. Wykrywa się ją u 2–5% dzieci i 20–25% ludzi dorosłych chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną [35, 36]. Obecności tej rearanżacji najczęściej towarzyszy wysoka leukocytoza, fenotyp CD10+CD19+ i bardzo niekorzystne rokowanie [32, 37]. W prezentowanych badaniach nie wykazano większej oporności *in vitro* na cytostatyki w limfoblastach z tą rearanżacją. W jedynych opublikowanych dotychczas danych dotyczących wrażliwości *in vitro* limfoblastów BCR-ABL stwierdzono oporność na prednizolon u pacjentów dorosłych [38], co z kolei podkreśla zjawisko steroidooporności występujące w ALL u dorosłych [39, 40].

Kolejną niekorzystną translokacją w ALL, zwłaszcza u niemowląt, jest rearanżacja genu MLL. Zazwyczaj występuje w limfoblastach o fenotypie CD19+CD10-HLA-DR+, często towarzyszy jej koekspresja antygenów mieloidalnych CD13, CD15, CD33 [32]. W tej grupie chorych stwierdza się zazwyczaj wysoką leukocytozę, zajęcie ośrodkowego układu

nerwowego i niekorzystne rokowanie [5, 37]. Chociaż niejednoznacznie, oporność *in vitro* na cytostatyki w tej grupie pacjentów była wyższa na większość testowanych leków, z wyjątkiem dobrej wrażliwości na cytarabinę i idarubicynę. W aktualnie stosowanych protokołach terapeutycznych u niemowląt z ALL, cytarabina jest jednym z podstawowych leków, co wynika z wcześniejszych badań [5].

Smets i wsp. [29] wykazali, że pacjenci z odsetkiem limfoblastów >6% w fazie S cyklu komórkowego mają gorsze rokowanie. W badaniach własnych autorów, w analizie wpływu parametrów cyklu komórkowego na oporność *in vitro* na cytostatyki stwierdzono, że pacjenci, których limfoblasty miały odsetek komórek w fazie S powyżej 6% lub wykazywały aktywność proliferacyjną powyżej 12%, charakteryzowali się nieznamienią opornością limfoblastów *in vitro* na większość testowanych cytostatyków, z wyjątkiem leków o działaniu alkilującym, takich jak cyklofosfamid, ifosfamid, melfalan czy tiotepa.

Podsumowując, oporność *in vitro* na cytostatyki w ALL u dzieci częściowo wyjaśnia znaczenie parametrów biologicznych limfoblastów.

Piśmiennictwo

1. Styczynski J, Wysocki M. Mechanisms of drug resistance in acute leukemias: therapeutic problem. *Adv Clin Exp Med* 2000; 9: 153-61.
2. Veerman AJ, Kaspers GJ, Pieters R. Cellular drug resistance in childhood leukemia. *Ann Hematol* 1994; 69 Suppl 1: S31-34.
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
4. Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, Hahlen K, van der Does-van den Berg A, van Wering ER, Veerman AJ. Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1991; 338: 399-403.
5. Pieters R, den Boer ML, Durian M, Janka G, Schmiegelow K, Kaspers GJ, van Wering ER, Veerman AJ. Relation between age, immunophenotype and *in vitro* drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia – implications for treatment of infants. *Leukemia* 1998; 12: 1344-8.
6. Den Boer ML, Harms DO, Pieters R, et al. Patient stratification based on prednisolone-vincristine-asparaginase resistance profiles in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3262-8.
7. Styczynski J, Wysocki M. Is the *in vitro* drug resistance profile the strongest prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia? *J Clin Oncol* 2004; 22: 963-4.
8. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 2004; 351: 533-42.
9. Lugthart S, Cheok MH, den Boer ML, et al. Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2005; 7: 375-86.
10. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 117-29.
11. Cheok MH, Lugthart S, Evans WE. Pharmacogenomics of acute leukemia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 317-53.
12. Pieters R, Huismans DR, Leyva A, Veerman AJ. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer Lett* 1988; 41: 323-32.
13. Pieters R, Loonen AH, Huismans DR, Broekema GJ, Dirven MW, Heyenbrok MW, Hahlen K, Veerman AJ. *In vitro* drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood* 1990; 76: 2327-36.
14. Pieters R, Huismans DR, Leyva A, Veerman AJ. Comparison of the rapid automated MTT-assay with a dye exclusion assay for chemosensitivity testing in childhood leukaemia. *Br J Cancer* 1989; 59: 217-20.
15. Styczynski J, Wysocki M, Debski R, et al. Ex vivo drug resistance profile in childhood acute myelogenous leukemia: no drug is more effective in comparison to acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 1843-8.
16. Styczynski J, Pieters R, Huismans D, Schuurhuis G, Veerman A, Wysocki M. Comparison of cellular drug resistance in acute lymphoblastic leukemia in children and in adults. *Acta Haematol Pol* 1999; 30: 283-90.
17. Styczynski J, Pieters R, Huismans D, Schuurhuis G, Veerman A, Wysocki M. Cellular drug resistance in fresh and cryopreserved lymphocytes and lymphoblasts. *Acta Haematol Pol* 1999; 30: 275-82.
18. Wysocki M, Styczynski J, Debski R, et al. Drug resistance profile in childhood acute lymphoblastic leukemia on diagnosis and at relapse with respect to percentile values. Report of Polish Pediatric Leukemia and Lymphoma Study Group. *Acta Haematol Pol* 2002; 33: 341-50.
19. Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, et al. *In vitro* cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86: 3861-8.
20. Kaspers GJ, Wijnands JJ, Hartmann R, et al. Immunophenotypic cell lineage and *in vitro* cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1300-3.
21. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, et al. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol* 2000; 18: 1876-87.
22. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 102-31.
23. Forestier E, Johansson B, Borgstrom G, Kerndrup G, Johansson J, Heim S. Cytogenetic findings in a population-based series of 787 childhood acute lymphoblastic leukemias from the Nordic countries. The NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group. *Eur J Haematol* 2000; 64: 194-200.
24. Raimondi SC, Zhou Y, Shurtleff SA, Rubnitz JE, Pui CH, Behm FG. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 169: 50-7.
25. Uckun FM, Pallisgaard N, Hokland P, Navara C, Narla R, Gaynon PS, Sather H, Heerema N. Expression of TEL-AML1 fusion transcripts and response to induction therapy in standard risk acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 41-56.
26. Kebriaei P, Anastasi J, Larson RA. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15: 597-621.
27. Olah E, Balogh E, Kajtar P, Pajor L, Jakab Z, Kiss C. Diagnostic and prognostic significance of chromosome abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 824: 8-27.
28. Forestier E, Holmgren G, Roos G. Flow cytometric DNA index and karyotype in childhood lymphoblastic leukemia. *Anal Cell Pathol* 1998; 17: 145-56.
29. Smets LA, Slater R, van Wering ER, van der Does-van den Berg A, Hart AA, Veerman AJ, Kamps WA. DNA index and % S-phase cells determined in acute lymphoblastic leukemia of children: a report from studies ALL V, ALL VI, and ALL VII (1979-1991) of the Dutch Childhood Leukemia Study Group and The Netherlands Workgroup on Cancer Genetics and Cytogenetics. *Med Pediatr Oncol* 1995; 25: 437-44.
30. Pui CH, Hancock ML, Head DR, Rivera GK, Look AT, Sandlund JT, Behm FG. Clinical significance of CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82: 889-94.
31. Kaspers GJ, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJ. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an *in vitro* study. *Blood* 1995; 85: 751-6.
32. Szczepanski T, van der Velden VH, van Dongen JJ. Classification systems for acute and chronic leukaemias. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16: 561-82.
33. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, et al. TEL/AML1

- gene fusion is related to *in vitro* drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 1094-9.
34. Frost BM, Forestier E, Gustafsson G, et al. Translocation t (12; 21) is related to *in vitro* cellular drug sensitivity to doxorubicin and etoposide in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004; 104: 2452-7.
35. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1535-48.
36. Styczyński J, Gil L. Ostra białaczka limfoblastyczna: różnice u dzieci i dorosłych. *Acta Haematol Pol* 2006; 37: 185-201.
37. ALL-IC-BFM: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Therapy Protocol Hannover 2002.
38. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Hoelzer D, et al. *In vitro* drug resistance profile of Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia is heterogeneous and related to age: a report of the Dutch and German Leukemia Study Groups. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38: 379-86.
39. Styczynski J, Pieters R, Huisman DR, Schuurhuis GJ, Wysocki M, Veerman AJ. *In vitro* drug resistance profiles of adult versus childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 110: 813-8.
40. Styczynski J, Wysocki M. *In vitro* drug resistance profiles of adult acute lymphoblastic leukemia: possible explanation for difference in outcome to similar therapeutic regimens. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 301-7.

Adres do korespondencji

dr hab. med. **Jan Styczyński**
Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz
tel. +48 52 585 48 60
faks +48 52 585 48 67
e-mail: jstyczynski@cm.umk.pl