

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Artykuł oryginalny/Original research article

Wpływ cytotoksyczny R-amfinazy, endorybonukleazy o działaniu przeciwnowotworowym, na komórki chłoniaka rozlanego z dużych komórek B w warunkach *in vitro*



Cytotoxic activity of R-amphinase, an anti-tumor endoribonuclease, on diffuse large B-cell lymphoma cells in vitro conditions

Małgorzata Zwolińska, Barbara Cebula-Obrzut, Magdalena Witkowska, Agata Majchrzak, Aleksandra Mędra, Piotr Smolewski*

Zakład Hematologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Kierownik: prof. dr hab. n. med. Piotr Smolewski, Łódź, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 30.09.2013

Zaakceptowano: 29.10.2013

Dostępne online: 06.11.2013

Słowa kluczowe:

- R-amfinaza
- doksorubicyna
- cytotoksyczność
- apoptoza
- DLBCL

Keywords:

- R-amphinase
- Doxorubicin
- Apoptosis
- Cytotoxicity
- Antitumor activity
- DLBCL lymphoma

ABSTRACT

Onconase (ONC) and R-Amphinase (R-AM) are enzymes with anti-tumor activity, belonging to pancreatic ribonuclease A family, received from eggs collected from frog *Rana pipiens*. Both proteins can induce death of some types of neoplastic cells by inhibition of protein synthesis, cell growth and proliferation. The aim of this study was to assess the cytotoxicity of R-AM, used alone or in combination with one of the most active anti-leukemic drug, doxorubicin (DOX), on diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)-derived cell line, Toledo. We found high cytotoxic activity of R-AM against DLBCL cells as well as influence on expression of several apoptosis-regulating proteins. Moreover, we observed increase in proapoptotic activity after combination of R-AM and DOX, combination of R-AM and DOX, compared with both drugs used alone. These results may justify further studies on interactions of R-AM with other drugs active in DLBCL.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Zakład Hematologii Doświadczalnej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Ciołkowskiego 2, 93-510 Łódź, Polska. Tel.: +48 42 689 51 91; fax: +48 42 689 51 92.

Adres email: piotr_smolewski@wp.pl (P. Smolewski).

Wstęp

Onkonaza (ONC) jest białkiem należącym do rodziny rybonukleaz trzustkowych otrzymanym po raz pierwszy z jaj i zarodków żaby *Rana pipiens* [1, 2]. Jej działanie biologiczne, a szczególnie przeciwnowotworowe, jest ściśle związane z aktywnością enzymatyczną cząsteczki. Odgrywa ona istotną rolę jako mediator reakcji wewnątrzkomórkowych, może tworzyć aktywne biologicznie dimery, zdolne do degradacji dsRNA. Uszkodzenie RNA zapoczątkowuje łańcuch zmian molekularnych prowadzących do śmierci komórki. Kulminacją tych reakcji jest aktywacja kaskady enzymów proteolitycznych – kaspaz, prowadząca do apoptozy komórki nowotworowej [3].

ONC wywiera wpływ na przekazywanie wewnątrzkomórkowych sygnałów regulujących wzrost i śmierć komórek nowotworowych. ONC wykazuje działanie proapoptotyczne, hamuje cykl komórkowy w fazie G_1 [4] i wzrost komórek w przypadku nowotworów wykazujących wielolekową oporność, niezależnie od ekspresji glikoproteiny P (P-gp) i mutacji p53. W odróżnieniu od prawidłowych komórek, które w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego mogą pozostać przez dowolnie długi czas, komórki nowotworowe pozostające w tej fazie szybko tracą swoją żywotność i ulegają apoptozie. Udowodniono aktywność cytotoksyczną ONC w różnych typach nowotworów, w tym międzybłonniaku (*mesothelioma*) oraz w opornych na chemioterapię nowotworach wieku dziecięcego, takich jak *neuroblastoma* i *rhabdomyosarcoma* [5, 6].

W ostatnich latach stwierdzono, że oocyty *Rana pipiens* zawierają jeszcze jedną rybonukleazę, amfinazę (AMF) o możliwym działaniu przeciwnowotworowym. AMF jest cząsteczką o masie około 13 000, występującą w czterech wariantach różniących się od siebie sekwencją aminokwasów w 87–99%, w tym R-AM. Aktywność cytostatyczna i cytotoksyczna R-AM jest podobna, a nawet wyższa od tej wykazywanej przez ONC, co wzbudza nadzieje na jej potencjalne zastosowanie w klinicznej praktyce onkologicznej [7–9].

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (*diffuse large B-cell lymphoma*; DLBCL) jest najczęściej występującym typem spośród chłoniaków niezaiamycznych [10]. Postęp w leczeniu DLBCL poczyniony w ostatnich latach wiąże się z wprowadzeniem tzw. immunochemioterapii. Dołączenie do standardowej chemioterapii CHOP (schemat: cyklofosfamid, doksorubicyna [DOX], winkrystyna, prednizon) monoklonalnego przeciwciała anti-CD20 rytuksymabu (RIT; schemat R-CHOP) znacząco zwiększyło odsetek całkowitych remisji (*complete remission*; CR), wydłużyło całkowity czas przeżycia i czas wolny od nawrotu choroby, przy niezwiększonej istotnie toksyczności leczenia [11, 12]. Standardowe leczenie pierwszej linii polega na podaniu 6–8 cykli R-CHOP w odstępach 21-dniowych [13]. Pozwala ono w tej chorobie na uzyskanie do 60% wyleczeń. Wciąż pozostaje więc duży margines chorych, u których poprawa efektywności leczenia pozwoliłaby na poprawę wieloletniego przeżycia.

Jak dotąd opublikowano tylko jedno doniesienie na temat aktywności przeciwnowotworowej R-AM, które dotyczyło działania na komórki linii białaczkowych HL-60, U-937 i Jurkat T [14]. Celem niniejszej pracy była pierwsza w dostępnym

piśmiennictwie przedkliniczna analiza cytotoksyczności R-AM zastosowanej w warunkach *in vitro* w skojarzeniu z DOX na komórki linii wywodzącej się z DLBCL.

Materiał i metody

Materiał

Materiałem do badań *in vitro* była linia komórkowa Toledo, będąca linią pochodzącą z komórek chłoniaka DLBCL, Toledo. Komórki tej linii są limfocytami B morfologicznie wykazującymi cechy limfoblastów, prezentującymi antygeny: CD10+, CD19+, CD20+, CD38+, CD23-, CD39-, wykazującymi złożone aberracje chromosomowe. Komórki linii były inkubowane w odpowiednio dobranym medium (według zaleceń producenta) w cieplarni (37°C, w powietrzu atmosferycznym z zawartością 5% CO₂), pasażowane co 2-3 dni w okresie przed założeniem hodowli z badanymi lekami, w celu osiągnięcia wzrostu ekspontencjalnego.

Hodowle komórkowe

Hodowle zakładano w warunkach jałowych, przenosząc zawiesinę komórek na płytki hodowlane (Nunc, Roskilde, Dania) zawierające 48 dołków 1 ml lub do naczynek o 40 ml pojemności (Nunc, Roskilde, Dania). Wyjściowo zagęszczenie komórek w zakładanych hodowlach wynosiło 0,5 mln/ml. Do hodowli komórek dodawano odpowiednio przygotowane medium RPMI-1640 z dodatkiem 62 ml 10% surowicy bydlęcej, 3 ml L-glutaminy, 5 ml antybiotyku (penicyliny i streptomycyny) (Sigma, Taufkirchen, Niemcy).

W zakładanych hodowlach do komórek linii Toledo dodawano pojedynczo R-AM (otrzymaną dzięki uprzejmości Alphacell Corporation, New Jersey, USA, obecnie – TAmIR Biotechnology, Inc, Somerset, NJ, USA) pojedynczo lub w połączeniu z lekiem o udowodnionym działaniu w DLBCL – doksorubicyną (DOX; Doxorubicin Ebewe; Ebewe Arzneimittel Ges.m.b.H., Unterach, Austria).

Początkowo prowadzono hodowle 24-, 48- i 72-godzinne, po serii wstępnych doświadczeń do dalszych badań wybrano 72-godzinny punkt czasowy. Badano cytotoksyczność R-AM dla stężeń 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 i 100 µg/ml. W dalszych badaniach R-AM używano w optymalnym stężeniu 20 µg/ml (najmniejsze stężenie leku wywołujące znamienne statystycznie wzrost cytotoksyczności w odniesieniu do hodowli bez dodatku leków). Dawkę 20 ng/ml DOX ustalono podobnie, kierując się wcześniejszymi doświadczeniami. Oceniano efekt cytotoksyczny R-AM, DOX oraz skojarzenia R-AM+DOX. Kontrolę stanowiły równoległe hodowle prowadzone bez dodatku leków. Każde doświadczenie było powtarzane przynajmniej pięciokrotnie.

Ocena cytotoksyczności badanych leków

Barwienie jodkiem propydydy (JP) (Sigma-Aldrich; Saint Louis, USA) zostało zastosowane jako metoda pozwalająca na pomiar żywotności komórek. Po zakończeniu hodowli przeprowadzano dwukrotne płukanie w 1% PBS i przez 5 minut wirowano z częstością 1100 obrotów na minutę. Po

odwirowaniu do komórek dodawano 100 μ l PBS oraz 10 μ l JP, pozostawiając próbki w ciemności w temperaturze pokojowej na 10 minut. Po upływie tego czasu dokonywano pomiarów cytometrem przepływowym, określając procent komórek martwych (JP+).

Ocena działania proapoptotycznego leków

Pomiaru ilości komórek ulegających zaprogramowanej śmierci (apoptozie) dokonywano za pomocą testu z Aneksyną V (Ann-V). Badano także procent komórek wykazujących spadek potencjału mitochondrialnego ($\Psi\Delta m$) oraz aktywację kaspaz -3, -8 i -9.

Test z Ann-V i JP (BD Biosciences; San Jose, USA) pozwala na wykrycie zjawiska eksternalizacji fosfatydyloseryny, wczesnego markera apoptozy. Po zakończeniu hodowli do 100 μ l zawiesiny komórek dodawano Ann-V w ilości 5 μ l oraz 85 μ l buforu. Po inkubacji w ciemności, w temperaturze pokojowej przez okres 15 minut dodawano 10 μ l JP, a następnie ponownie inkubowano w tych samych warunkach przez 5 minut. Po upływie czasu inkubacji dokonywano pomiarów w cytometrze przepływowym. Komórki Ann-V+ określano jako apoptotyczne.

MitoTracker jest związkiem selektywnie wiążącym się z mitochondrium, który ulega dyfuzji przez błonę komórkową i kumuluje się w aktywnych mitochondriach. Pozwala on na ocenę różnicy potencjałów błonowych. Wykrycie spadku $\Psi\Delta m$ świadczy o apoptozie komórki, indukowanej drogą wewnętrzną (mitochondrialną) aktywacji kaspaz. Celem dokonania tych pomiarów do zawiesiny komórek otrzymanej po zakończeniu hodowli (odpowiednio z lekami i bez leków) dodawano po 2,5 μ l odczynnika M-Ros i inkubowano przez 30 minut w cieplarni (37°C). Po upływie tego czasu dodawano MitoTracker Red 580 (odczynniki firmy Molecular Probes; Eugene, USA) i odczytywano wyniki za pomocą cytometru przepływowego.

Celem oceny aktywnej kaspazy 3 zawieszono komórki (100 μ l) otrzymaną po zakończeniu hodowli permabilizowano i utrwalano w roztworze Cytofix/Cytoperm (przez 20 minut na lodzie), dwukrotnie przemywano i wirowano w roztworze Perm/Wash (wszystkie odczynniki firmy BD Biosciences; San Jose, USA). Następnie dodawano 10 μ l przeciwciała przeciw aktywnej kaspazie 3 i inkubowano otrzymany roztwór w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po upływie tego czasu komórki ponownie przemywano za pomocą roztworu Perm/Wash. Otrzymany roztwór pozwalał na pomiar aktywnej kaspazy 3 za pomocą cytometru przepływowego.

W celu oceny aktywności kaspaz 8 i 9 otrzymana zawiesina komórek była utrwalana i permabilizowana przez 20 minut na lodzie, w roztworze Cytofix/Cytoperm, następnie przemywana i wirowana dwa razy w roztworze Perm/Wash. Po zakończeniu tych czynności dodawano odpowiednie przeciwciała przeciw aktywnym kaspazom 8 i 9 (R&D Systems; Minneapolis, USA) i inkubowano przed odczytem przez 30 minut, w temperaturze pokojowej.

Ocena mechanizmów regulujących apoptozę

W regulację procesu apoptozy są zaangażowane białka promujące ten proces, jak i jej inhibitory. W komórkach, po

zakończeniu hodowli z badanymi lekami, wykonano pomiar ekspresji białek indukujących zaprogramowaną śmierć komórki: Bax, Bak, Bad, Smac/Diablo. Równolegle oceniono ekspresję białek antyapoptotycznych: Bcl-2, Mcl-1, XIAP, surviviny, c-IAP1, c-IAP2. Po zakończeniu hodowli (z badanymi lekami i kontroli bez dodatku leków), zawieszono komórki wirowano przez 5 minut z częstością obrotów 1100 na minutę, następnie płukano w 2 ml PBS i ponownie wirowano 5 minut, 1100 obrotów na minutę. Otrzymany materiał utrwalano najpierw w 4,5 ml 80% alkoholu (30 minut w lodówce), następnie po ponownym przepłukaniu w PBS i dwukrotnym odwirowaniu (5 minut 1100 obrotów/min.) dodawano 4,5 ml 1% formaldehydu w temperaturze 0°C na 15 minut. Po upływie tego czasu badany materiał był powtórnie płukany w PBS oraz wirowany, a następnie dodawano na 1 minutę 500 μ l saponiny i po raz kolejny wirowano w PBS 1100 obrotów na minutę przez 5 minut. Otrzymana zawiesina komórek była znakowana przeciwciałami monoklonalnymi przeciw białkom: przeciwciałem anti-Bax (DAKO Cytomation; Glostrup, Dania); przeciwciałem anti-Bak (Abcam; Cambridge, Wielka Brytania); przeciwciałem anti-Bad (Abcam; Cambridge, Wielka Brytania); przeciwciałem anti-Bcl-2 (DAKO Cytomation; Glostrup, Dania); przeciwciałem anti-Mcl-1 (Abcam; Cambridge, Wielka Brytania); przeciwciałem anti-XIAP (R&D Systems; Minneapolis, USA); przeciwciałem anti-cIAP1 (R&D Systems; Minneapolis, USA); przeciwciałem anti-cIAP2 (R&D Systems; Minneapolis, USA); przeciwciałem anti-Smac/Diablo (R&D Systems; Minneapolis, USA); przeciwciałem anti-survivin (R&D Systems; Minneapolis, USA). Po 30-minutowej (w ciemności, w temperaturze pokojowej) inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi dodawano do materiału komórkowego przeciwciała drugorzędowe związane z fluoresceiną. Po zakończeniu inkubacji dokonywano pomiaru ekspresji białek za pomocą cytometru przepływowego. Ekspresję białka oceniano na podstawie średniej intensywności fluorescencji (MFI; mean fluorescence intensity).

Analiza cytometryczna

Badania wykonywano z wykorzystaniem cytometru przepływowego FACS Calibur (Becton Dickinson, San Diego, California, USA). W każdej analizowanej próbce mierzono fluorescencję 10 000 komórek. Indeks cytotoxyczności (IC) oceniano na podstawie odsetka komórek JP+ w badanych hodowlach z lekami i kontrolnych. Skompensowany indeks cytotoxyczności (SIC), będący różnicą między odsetkiem komórek JP+ w poszczególnych hodowlach z badanymi lekami a odsetkiem komórek JP+ w kontrolach, posłużył do oceny stopnia cytotoxyczności dodanych do hodowli leków. Nasilenie apoptozy oceniano na podstawie odsetka komórek wykazujących aktywację kaspazy 3 w poszczególnych hodowlach (indeks apoptotyczny, IA). Obliczano skompensowany IA (SIA), będący różnicą pomiędzy odsetkiem komórek Ann-V+ w poszczególnych hodowlach z badanymi lekami a odsetkiem komórek Ann-V+ w próbkach kontrolnych.

Analiza statystyczna wyników

Analizując uzyskane wyniki, w celu porównania różnic pomiędzy poszczególnymi badanymi parametrami stosowano

test t-Studenta. Określano średnią arytmetyczną oraz odchylenia standardowe. Za istotne statystycznie przyjmowano różnice, dla których poziom istotności p był mniejszy niż 0,05. Program STATISTICA 7.0 (Tulsa, USA) posłużył do przeprowadzenia analizy statystycznej otrzymanych wyników.

Wyniki

Ocena cytotoksyczności R-AM

Prowadzone doświadczenia rozpoczęto od ustalenia optymalnej dawki R-AM. Hodowle *in vitro* z R-AM w dawkach 1–100 $\mu\text{g/ml}$, trwające 24, 48 i 72 godziny, pozwoliły na wybranie dawki stosowanej w dalszej części badań. Największy efekt cytotoksyczny był obserwowany po 72 godzinach hodowli. Dla komórek linii Toledo przy stężeniu leku 20 $\mu\text{g/ml}$ po 72 godzinach hodowli obserwowany odsetek komórek z dodatnim efektem cytotoksycznym był statystycznie znamienne wyższy w porównaniu z osiągniętym w komórkach prowadzonych równolegle hodowli kontrolnych ($p < 0,05$). Dlatego stężenie R-AM 20 $\mu\text{g/ml}$ oraz powyższy punkt czasowy wybrano dla hodowli prowadzonych w dalszym etapie badań.

Ocena aktywności R-AM w skojarzeniu z DOX

Dalsze doświadczenia prowadzone w hodowlach komórek linii Toledo miały na celu ocenę cytotoksyczności R-AM skojarzonej z klasycznym cytostatykiem, stosowanym standardowo w badanej chorobie, DOX. Połączenie R-AM z DOX wykazywało znaczący wzrost cytotoksyczności (mediana SIC 70,5%), w porównaniu z zastosowanymi pojedynczo R-AM czy DOX (mediana SIC odpowiednio 16,1% i 37,3%; odpowiednio $p < 0,001$ i $p = 0,003$). Wykazano znamienne większe działanie cytotoksyczne R-AM na komórki linii Toledo w porównaniu z kontrolą (Ryc. 1 A). Efekt cytotoksyczny R-AM (mediana SIA 68,5%), DOX (mediana SIA 36,2%) oraz jej skojarzenia z DOX ewidentnie zależał od działania proapoptotycznego (mediana SIA 65,9%), (Ryc. 1B).

Mechanizmy cytotoksycznego działania R-AM

Działanie proapoptotyczne R-AM oceniano na podstawie wywoływanych zmian w mitochondrialnym potencjale błonowym, zmian w strukturze błony komórkowej – test z Ann-V oraz wpływu na aktywność kaspaz (wykrywanie komórek z aktywną kaspazą 8, 9 czy 3). Linia komórkowa chłoniaka DLBCL, przy medianie odsetka komórek Ann-V+ wynoszącej 17,0%, wykazywała istotny wzrost mechanizmów aktywujących apoptozę, mierzonych spadkiem $\Psi\Delta\text{m}$ oraz wzrostem aktywności kaspaz 8, 9 i 3 (Ryc. 2).

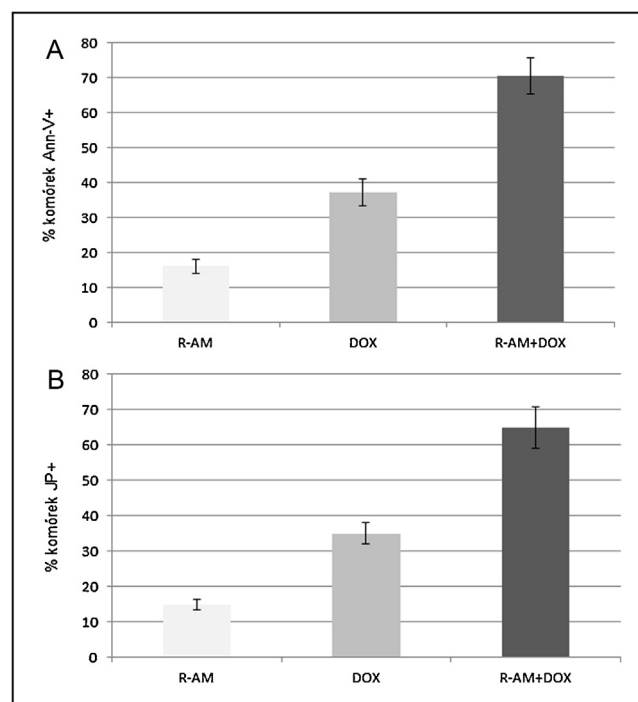
Wpływ R-AM na ekspresję białek regulujących apoptozę

W dalszych doświadczeniach badano wpływ R-AM na ekspresję białek uczestniczących w regulacji procesu apoptozy. R-AM we wszystkich hodowlach istotnie zwiększała stężenie białka proapoptotycznego Bax ($p = 0,041$) i Bad ($p = 0,013$). Obserwowano również istotne statystycznie zmniejszenie

ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-2 ($p = 0,009$), Mcl-1 ($p = 0,002$) i XIAP ($p = 0,019$) (Ryc. 3).

Omówienie

R-AM jest endorybonukleazą, która może okazać się skuteczną w leczeniu chorób onkologicznych, w tym nowotworów układu krwiotwórczego. Przedstawione powyżej badania

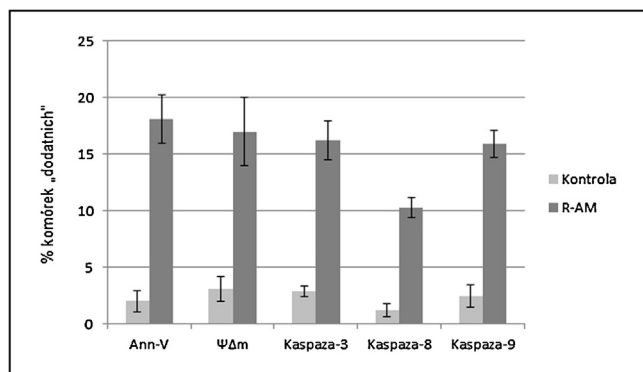


Ryc. 1 – A. Cytotoksyczność R-amfinazy (R-AM) zastosowanej pojedynczo oraz w skojarzeniu z doksorubicyną (DOX) w stosunku do komórek chłoniaka rozlanego z dużych komórek B, Toledo. Podano wartości średnie i odchylenia standardowe skorygowanego indeksu cytotoksycznego (SIC), mierzonego testem z jodkiem propydydny (JP)

Ryc. 1 – B. Działanie proapoptotyczne R-amfinazy (R-AM) zastosowanej pojedynczo oraz w skojarzeniu z doksorubicyną w stosunku do komórek linii chłoniaka rozlanego z dużych komórek B, Toledo. Podano wartości średnie i odchylenia standardowe skorygowanego indeksu apoptotycznego (SIA), mierzonego testem z Aneksyną V (Ann-V)

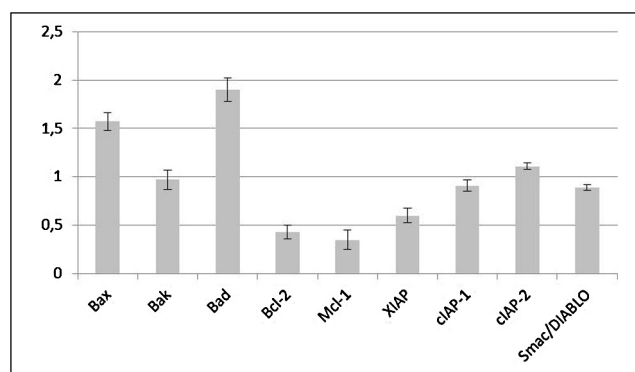
Fig. 1 – A. Cytotoxic activity of R-amphinase (R-AM) used alone or in combination with doxorubicin (DOX) on diffuse large B-cell lymphoma-derived cell line, Toledo. The figure shows mean values (and standard deviations) of corrected cytotoxic index (SIC), assessed by propidium iodide test

Fig. 1 – B. Proapoptotic activity of R-amphinase (R-AM) used alone or in combination with doxorubicin (DOX) on diffuse large B-cell lymphoma-derived cell line, Toledo. The figure shows mean values (and standard deviations) of corrected apoptotic index (SIA), assessed by Annexin V test



Ryc. 2 – Mechanizmy działania proapoptycznego R-amfinazy (R-AM) na komórki linii chłoniaka rozlanego z dużych komórek B, Toledo. Podano wartości średnie i odchylenia standardowe odsetka komórek dodatnich do Aneksyny V, komórek ze spadkiem potencjału mitochondrialnego ($\Psi\Delta m$) oraz wykazujących aktywację kaspaz 3, 8 i 9

Fig. 2 – Mechanisms of proapoptotic activity of R-amphinase (R-AM) on diffuse large B-cell lymphoma-derived cell line, Toledo. The figure shows mean values (and standard deviations) of the rates of Annexin V-positive cells, cells with drop of mitochondrial potential as well as cells with activation of caspases -3, -8 or -9



Ryc. 3 – Ekspresja białek regulujących apoptozę w odpowiedzi na działanie R-amfinazy (R-AM) w komórkach linii chłoniaka rozlanego z dużych komórek B Toledo, mierzona wartościami średniej intensywności fluorescencji (mean fluorescence intensity; MFI). Podano wartości wzrostu/spadku ekspresji białek w hodowlach z lekiem w stosunku do hodowli kontrolnych

Fig. 3 – Expression of apoptosis-regulating proteins in response to R-amphinase (R-AM) in diffuse large B-cell lymphoma-derived cell line, Toledo, as measured by mean fluorescence intensity, MFI. N-fold increase/decrease in protein expression in relation to the control cultures are shown

własne przeprowadzone *in vitro* na linii komórkowej DLBCL wykazały wysoką aktywność cytotoksyczną R-AM, zarówno zastosowanej pojedynczo, jak i w połączeniu z DOX, lekiem cytostatycznym o udowodnionym działaniu w tej chorobie.

Wyniki wskazujące na synergizm działania ONC, wcześniej opisanej endorybonukleazy pochodzącej z jaj i zarodków *Rana pipiens*, z innymi lekami o działaniu cytostatycznym znajdują potwierdzenie w dostępnych publikacjach. Dotychczas udowodniono korzystne współdziałanie ONC z wieloma lekami przeciwnowotworowymi. Między innymi, wykazano wzrost skuteczności działania ONC skojarzonej z cisplatyną, DOX, winkrystyną, tamoksyfenem i trifluoperazyną, interferonem α/β , TNF- α czy przeciwciałem anti-CD95 (FasL) [6, 18–23]. Wykazano także, że ONC zwiększa wrażliwość komórek śródbłonna CCL-209 oraz komórek nowotworowych na napromienianie [24–26]. Uważa się, że ONC może spełniać rolę adiuwantu w przypadku chemioterapii oraz radioterapii.

Badania Deptały i wsp. [18] miały na celu porównanie proliferacji i żywotności komórek chłoniaka U937 inkubowanych z ONC lub TNF- α . Połączenie ONC i TNF- α spowodowało całkowite zahamowanie wzrostu i śmierć ponad połowy komórek. Mechanizm, dzięki któremu ONC wzmacnia działanie TNF- α , jest być może zależny od aktywności czynnika NF κ B i związanej z nią supresji ekspresji genów odpowiedzialnych za przeżycie komórki.

Lee i wsp. [27] w badaniach *in vivo* i *in vitro* na hodowlach ludzkiego raka niedrobnokomórkowego płuc A549 sprawdzali efektywność terapeutyczną ONC podanej samodzielnie lub w skojarzeniu z cisplatyną lub karboplatyną. Stwierdzono synergizm działania leków podanych równocześnie i wzrost

efektywności cisplatyny oraz karboplatyny. Skojarzenie obydwu leków opóźniło wzrost guza o 25 dni.

Badania przeprowadzone przez Rybak i wsp. [22] na modelach *in vitro* i *in vivo* komórek raka okrężnicy HT-29 potwierdziły synergistyczny efekt działania przeciwnowotworowego ONC i winkrystyny na komórki wykazujące oporność wielolekową. Wykazano zahamowanie wzrostu komórek oraz zwiększenie cytotoksyczności. Mechanizm, dzięki któremu ONC pokonuje oporność komórek na leczenie przeciwnowotworowe, nie został w pełni poznany. Leczenie to ponadto zwiększało istotnie czas przeżycia.

Doświadczenia Mikulskiego i wsp. [19] zostały przeprowadzone na dwóch modelach badawczych *in vivo* raka piersi MDA-MB-231 i wykazały synergizm działania ONC i doksorubicyny. Chemioterapia skojarzona w obu modelach hamowała wzrost nowotworu w znacznie większym stopniu niż leki podawane osobno, a czas przeżycia wydłużył się znacząco.

Wyniki dotychczasowych badań przedklinicznych i klinicznych (zakończono badanie III fazy u chorych na międzybłonniaka) wskazują na dużą aktywność cytotoksyczną ONC w niektórych nowotworach litych. Jak wspomniano, AMF jest stosunkowo niedawno zsyntetyzowaną rybonukleazą, o właściwościach fizykochemicznych podobnych do ONC. Jak dotąd, Ardelt i wsp. [14] opisali aktywność cytostatyczną i cytotoksyczną wszystkich czterech znanych izoform AMF, w tym R-AM, w stosunku do komórek ludzkiej białaczki promielocytowej (HL-60), jak też komórek białaczki monocytarnej U-937 i komórek Jurkat T. Aktywność R-AM była nieco bardziej zaznaczona niż w przypadku ONC. Dotyczyło to zarówno zatrzymania komórek nowotworowych w fazie G₁ cyklu komórkowego, jak i indukcji apoptozy przejawiającej się we fragmentacji DNA (obecność frakcji sub-G₁, dodatnia reakcja TUNEL) oraz aktywacją transglutaminazy.

Dotychczas nie prowadzono doświadczeń z R-AM *in vitro* na komórkach chłoniaka DLBCL. Ponadto, dokładny mechanizm działania przeciwnowotworowego tego białka nie został do tej pory w pełni ustalony. Obserwowane działanie biologiczne jest spowodowane aktywnością enzymatyczną jej cząsteczki. Znaczący wpływ na prezentowaną przez nie cytotoksyczność może mieć brak wrażliwości na działanie inhibitora rybonukleaz [8].

Udowodniono, że ONC wywołuje śmierć komórki, rozkładając wewnątrzkomórkowe RNA, hamując syntezę białek i hamując wzrost oraz proliferację komórki [9]. Wcześniejsze doświadczenia wykazały jej zdolność do wywoływania apoptozy niektórych komórek nowotworowych u człowieka [4; 14]. Podobnie R-AM wykazała aktywność przeciwnowotworową przeciw komórkom ostrej białaczki szpikowej [28]. W ostatnich badaniach własnych udowodniono, że mechanizmy cytotoksycznego działania R-AM na komórki DLBCL polegają głównie na indukowaniu zaprogramowanej śmierci komórki poprzez wpływ na aktywność kaspaz, z eksternalizacją fosfatydyloseryny błony komórkowej w teście z Ann-V oraz spadkiem potencjału mitochondrialnego w teście z MitoTracker Red. Po 72 godzinach hodowli z R-AM wykazano istotne zwiększenie aktywności kaspaz 3, 8 i 9, a więc indukcję obydwu dróg ich aktywacji zewnętrznej (receptorowej) oraz wewnętrznej (mitochondrialnej). Może to wpływać korzystnie na potencjalne interakcje z innymi lekami przeciwnowotworowymi, które mają podobne lub uzupełniające się mechanizmy działania cytotoksycznego.

Dalsze wyniki bieżących badań własnych, dotyczące działania proapoptotycznego, wykazały w badanych hodowlach istotny wzrost stężenia proapoptotycznego białka Bax i Bad. Stwierdzono również istotne obniżenie stężenia białek antyapoptotycznych Bcl-2, Mcl-1 i XIAP. Obserwacje te częściowo potwierdzają doniesienia na temat ONC, w których obserwowano wzrost stężenia białka Bax w komórkach nowotworowych [15]. Podaje się także spadek ekspresji białka Bcl-2, Fra1 i surwiwiny [15, 16]. Nie ma dotychczas badań donoszących o zmianach aktywności białek regulujących apoptozę indukowaną działaniem R-AM.

Ocena skojarzonego działania R-AM i DOX

Przedstawione badania kompleksowo oceniały aktywność przeciwnowotworową R-AM skojarzonej ze standardowym cytostatkiem o działaniu biologicznym charakteryzującym się potwierdzoną już aktywnością przeciwnowotworową – DOX. Różne mechanizmy działania tych leków, nakładając się na siebie, mogłyby spowodować zwiększenie ich aktywności cytotoksycznej w odniesieniu do badanych komórek. Uszkodzenie DNA komórki nowotworowej jest głównym mechanizmem działania związków rutynowo stosowanych w onkohematologii. Niestety obserwowana cytotoksyczność tych leków wpływa także na aktywnie proliferujące zdrowe komórki, co wywołuje szereg objawów niepożądanych. Cytotoksyczność antybiotyków antracyklinowych, do których należy DOX, związana jest z ich hamującym wpływem na replikację, transkrypcję i naprawę DNA oraz indukcję apoptozy [17]. Przeprowadzone badania własne wykazały zwiększenie efektu cytotoksycznego i dużą skuteczność działania R-AM w skojarzeniu z DOX. W hodowlach linii

komórkowej Toledo zaobserwowano istotne nasilenie działania cytotoksycznego połączenia R-AM z DOX w porównaniu z działaniem tych leków stosowanych w monoterapii. Badania te są, jak dotąd, jedynymi dostępnymi publikacjami oceniającymi współdziałanie R-AM i DOX.

Co istotne, w naszych badaniach R-AM wykazywała cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych, bez istotnego wpływu na zdrowe limfocyty od dawców honorowych w hodowlach 72-godzinnych. Wykazana specyfika działania leku może wynikać między innymi z faktu, że rybonukleazy o budowie zbliżonej do ONC wykazują większe powinowactwo do komórek nowotworowych niż do komórek prawidłowych. Może to wynikać z różnic w budowie sialoglikopeptydów błony komórkowej [29, 30-32] lub zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej komórek nowotworowych dla makrocząstek, takich jak rybonukleazy [33, 34].

Podsumowując, w warunkach *in vitro* R-AM wykazuje wybiórczą aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek linii chłoniaka DLBCL. Skojarzenie R-AM z DOX w warunkach hodowli *in vitro* komórek linii chłoniaka DLBCL istotnie zwiększa efekt cytotoksyczny w porównaniu ze standardowym chemioterapeutykiem. W działaniu przeciwnowotworowym R-AM istotnym mechanizmem jest aktywacja kaspazozależnej apoptozy. Wpływ na ekspresję białek biorących udział w regulacji procesu apoptozy widocznie jest powiązany z pobudzeniem mitochondrialnego szlaku aktywacji kaspaz. Stanowi to przesłankę do kojarzenia endorybonukleaz o działaniu przeciwnowotworowym, w tym R-AM, z działającymi za pośrednictwem tego mechanizmu standardowymi chemioterapeutykami.

Wkład autorów/Authors' contributions

PS – koncepcja pracy, analiza statystyczna, interpretacja danych, przygotowanie pracy, pozyskanie środków (finansowania). MZ – zebranie i interpretacja danych, analiza statystyczna, przygotowanie pracy, przygotowanie literatury. BC-O – zebranie i interpretacja danych. AgM, AlM – zebranie danych, MW – przygotowanie pracy, przygotowanie literatury.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Badania były sponsorowane przez grant z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego No 507-18-010 oraz, częściowo, przez grant Uniwersytetu Medycznego w Łodzi No 503/8-093-01/503-01.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Ardel W, Mikulski SM, Shogen K. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J Biol Chem* 1991;266:245-251.
- [2] Mosimann SC, Johns KL, Ardel W, Mikulski SM, Shogen K, James MNG. Comparative molecular modeling and crystallization of P-30 protein: a novel anti-tumor protein of *Rana pipiens* oocytes and early embryos. *Proteins Structure Function and Genetics* 1992;14:392-400.
- [3] Grabarek J, Ardel B, Du L, Darzynkiewicz Z. Activation of caspase and serine proteases during apoptosis induced by onconase (ranpirnase). *Exp Cell Res* 2002;278:61-71.
- [4] Halicka HD, Juan G, Ardel B, Mittelman A, Ardel W, Mikulski SM, et al. Induction of differentiation and apoptosis of U937 and HL-60 cells by onconase: potentiation by inhibitors of protein kinases. *ASCO Proceedings (Abstract 18)* 1996.
- [5] Michaelis M, Cinatl J, Anand P, Rothweiler F, Kotchetkov R, von Deimling A, et al. Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. *Cancer Lett* 2007;250:107-116.
- [6] Zhao H, Ardel B, Ardel W, Shogen K, Darzynkiewicz Z. The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA). *Cell Cycle* 2008;7:3258-3261.
- [7] Singh UP, Ardel W, Saxena SK, Holloway DE, Vidunas E, Lee HS, et al. Enzymatic and structural characterisation of amphinase, a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes. *J Mol Biol* 2007;371:93-111.
- [8] Ardel W, Ardel B, Darzynkiewicz Z. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. *Eur J Pharmacol* 2009;625:181-189.
- [9] Ardel W, Shogen K, Darzynkiewicz Z. Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes. *Curr Pharm Biotechnol* 2008;9:215-225.
- [10] Griffiths R, Gleeson M, Knopf K, Danese M. Racial differences in treatment and survival in older patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *BMC Cancer* 2010;10:625.
- [11] Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:235-242.
- [12] Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 2006;7:379-391.
- [13] Smolewski P. Standardy leczenia chłoniaków niezwołnowych B komórkowych. *Acta Haematologica Polonica* 2010;41:325-334.
- [14] Ardel B, Ardel W, Pozarowski P, Kunicki J, Shogen K, Darzynkiewicz Z. Cytostatic and cytotoxic properties of amphinase: a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes. *Cell Cycle* 2007;6:3097-3102.
- [15] Ardel B, Juan G, Burfeind P, Salomon T, Wu JM, Hsieh TC, et al. Onconase, an anti-tumor ribonuclease suppresses intracellular oxidative stress. *Int J Oncol* 2007;31:663-669.
- [16] Ramos-Nino ME, Littenberg B. A novel combination: ranpirnase and rosiglitazone induce a synergistic apoptotic effect by down-regulating Fra-1 and Survivin in cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1871-1879.
- [17] Czyż M, Szulawska A. Molekularne mechanizmy działania antacyklin. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2006;60:78-100.
- [18] Deptala A, Halicka H, Ardel B, Ardel W, Mikulski S, Shogen K, et al. Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase. *Int J Oncol* 1998;13:11-16.
- [19] Mikulski S, Newton D, Wiltout R, Rybak S. Onconase and doxorubicin synergy in prolonging survival of MDA-MB-231 human breast cancer bearing nude mice. Presented at the Annual American Association for Cancer Research 1999.
- [20] Mikulski SM, Viera A, Ardel W, Menduke H, Shogen K. Tamoxifen trifluoroperazine (stelazine) potentiate cytostatic/cytotoxic effects of P-30 protein, a novel protein possessing anti-tumor activity. *Cell Tissue Kinet* 1990;23:237-246.
- [21] Mikulski SM, Viera A, Shogen K. In vitro synergism between a novel amphibian oocytic ribonuclease (onconase) and tamoxifen, lovastatin and cisplatin in human OVCAR-3 ovarian carcinoma cell line. *Int J Oncol* 1992;1:779-785.
- [22] Rybak SM, Pearson JW, Fogler WE, Volker K, Spence SE, Newton DL, et al. Enhancement of vincristine cytotoxicity in drug resistant cells by simultaneous treatment with onconase, an antitumor ribonuclease. *J NCI* 1996;88:747-753.
- [23] Vasandani VM, Castelli JC, Hott JS, Saxena S, Mikulski SM, Youle RJ. Interferon enhances the activity of the anticancer ribonuclease, onconase. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:447-454.
- [24] Lee I, Kim DH, Sunar U, Magnitsky S, Shogen K. The therapeutic mechanisms of ranpirnase-induced enhancement of radiation response on A549 human lung cancer. *In Vivo* 2007;21:721-728.
- [25] Lee I, Lee YH, Mikulski SM, Lee J, Shogen K. Enhanced cellular radiation sensitivity of androgen-independent human prostate tumor cells by onconase. *Anticancer Res* 2000;20:1037-1040.
- [26] Lee I, Shui C, Shogen K, Mikulski SM, Nunno M, Wallner PE. Changes in radiation response and physiological parameters in various tumors by onconase. *The Annual Meeting of Radiation Research Society Proceedings (Poster No P06-95)* 1996.
- [27] Lee I, Kim D, Kim E, Shogen K, Glickson J. Physiological mechanisms of the enhanced efficacy of cisplatin and carboplatin by onconase. Presented at the Annual American Association for Cancer Research (Abstract 4951) *Proc AACR* 2005.
- [28] Smolewski P, Cebula B, Zwolinska M, Linke-Szewczyk A, Wozniak D, Shogen K, et al. Ex vivo cytotoxic activity of endoribonucleases, onconase (ranpirnase) and R-Amphinase, against acute myeloblastic leukemia cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2008;112:4010.
- [29] Nitta K, Ozaki K, Ishikawa M, Furusawa S, Hosono M, Kawauchi H, et al. Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily. *Cancer Res* 1994;54:920-927.
- [30] Nitta K, Ozaki K, Tsukamoto Y, Furusawa S, Ohkubo Y, Takimoto H, et al. Characterization of a *Rana catesbeiana* lectin mutant. *Cancer Res* 1994;54:928-934.
- [31] Chao TY, Lavis LD, Raines RT. Cellular uptake of ribonuclease A relies on anionic glycans. *Biochemistry* 2010;49:10666-10673.
- [32] Zhao HL, Xue C, Du JL, Ren M, Xia S, Cheng YG, et al. Sustained and cancer cell targeted cytosolic delivery of Onconase results in potent antitumor effects. *J Control Release* 2012;159:346-352.
- [33] Easty DM, Ledoux L, Ambrose EJ. The action of ribonuclease on neoplastic growth. III Studies by interference microscopy *Biochim Biophys Acta* 1956;20:528-537.
- [34] Sundlass NK, Eller CH, Cui Q, Raines RT. Contribution of electrostatics to the binding of pancreatic-type ribonucleases to membranes. *Biochemistry* 2013;52:6304-6312.