

PRACA ORYGINALNA – Original Article

PAWEŁ ROBAK¹, BARBARA CEBULA-OBZUT¹, ANNA LINKE-SZEWCZYK²,
PIOTR SMOLEWSKI¹

Ocena aktywności cytotoksycznej nowych analogów etodolaku, SDX-101 i SDX-308 w połączeniu z wybranymi lekami przeciwnowotworowymi na komórki przewlekłej białaczki limfocytowej w warunkach *ex vivo*

Cytotoxic effect of new etodolac analogues: SDX-101 and SDX-308 in combination with selected anti-neoplastic agents on chronic lymphocytic leukemia cells *ex-vivo*

¹ Zakład Hematologii Doświadczalnej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Piotr Smolewski

² Klinika Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Tadeusz Robak

STRESZCZENIE

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest najczęstszą białaczką w Europie. Obecnie najskuteczniejszą metodą leczenia, zarówno u wcześniej nieleczonych chorych, jak i w przypadkach opornych na terapię pierwszoliniową, jest łączne stosowanie analogów puryn z cyklofosfamidem oraz przeciwciałem monoklonalnym anti-CD20, rytuksymabem (RIT). Istotne znaczenie w leczeniu tej choroby ma również inne przeciwciało monoklonalne – alemtuzumab (ALT).

W badaniach własnych dokonano oceny cytotoksyczności nowych analogów etodolaku: SDX-101 oraz SDX-308 w skojarzeniu z analogami nukleozydów purynowych (ANP) (kladrybiną, 2-CdA i fludarabiną, FA) oraz przeciwciałami monoklonalnymi (RIT i ALT).

Wszystkie badania przeprowadzono w oparciu o techniki cytometrii przepływowej na komórkach wyizolowanych od 99 nieleczonych wcześniej chorych na PBL. W badaniach własnych wykazano dużą skuteczność połączenia SDX-101 z ANP, przy czym efekt ten był mniej zaznaczony przy połączeniu SDX-101 z FA. Podobne działanie przeciwbiałaczkowe wykazywała kombinacja SDX-101 i RIT. Natomiast połączenie SDX-101 i ALT było znacznie skuteczniejsze jedynie w odniesieniu do samego ALT. SDX-308 okazał się być bardzo aktywny wobec komórek PBL zarówno w skojarzeniu z ANP, jak i z przeciwciałami monoklonalnymi. Zarówno SDX-101, jak i SDX-308 w skojarzeniu ze wszystkimi kojarzonymi lekami aktywnie indukowały apoptozę komórek PBL zależną od aktywacji kaspazy 3 w przypadku obu analogów etodolaku obserwowano w połączeniu z 2-CdA.

SŁOWA KLUCZOWE: SDX-101 – SDX-308 – Etodolac – Niesteroidowe leki przeciwzapalne – Przewlekła białaczka limfocytowa – Analogi nukleozydów purynowych – Przeciwciała monoklonalne

SUMMARY

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common adult leukemia in Europe and North America. Currently, the best treatment consists of the purine nucleoside analogues (fludarabine and cladribine), cyclophosphamide and the monoclonal antibody anti-CD20 (rituximab). There is also another clinically significant agent, an anti-CD52 monoclonal antibody, alemtuzumab.

The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of new analogues of etodolac: SDX-101 and SDX-308, combined with the purine nucleoside analogues, fludarabine and cladribine and the monoclonal antibodies, alemtuzumab and rituximab. All combinations of SDX-101 and SDX-308 proved to provide either synergistic or additive cytotoxic effects.

The cytotoxicity and specific pro-apoptotic effects of the study drugs on B-CLL cells were assessed *ex vivo* in samples obtained from 99 untreated CLL patients.

In this study we proved the efficacy of the combination of SDX-101 with PNA, especially with 2-CdA. The combination of SDX-101 and RIT was more effective than with ALT. SDX-308 was very active with all combined agents.

Both analogues of etodolac with all combinations induced the caspase dependent apoptosis of CLL cells.

KEY WORDS: SDX-101 – SDX-308 – Etodolak – Non-steroidal anti inflammatory drugs – B-cell chronic lymphocytic leukemia – Monoclonal antibodies

WSTĘP

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest najczęstszą białaczką w Europie. Mimo istotnych postępów w biologii i terapii, choroba ta pozostaje nieuleczalna, a czas przeżycia pacjentów tylko nieznacznie się wydłużył.

Największy postęp w leczeniu PBL uzyskano dzięki wprowadzeniu do leczenia analogów nukleozydów purynowych (ANP). Ich mechanizm działania polega na zahamowaniu reduktazy rybonukleozydowej i polimerazy DNA, zahamowaniu syntezy DNA i w dalszej kolejności indukcji apoptozy [1, 2]. Zastosowanie ANP pozwala uzyskać większy odsetek odpowiedzi, w tym również całkowitych remisji (*complete remission*, CR) oraz dłuższy czas wolny od progresji choroby (*progression free survival*, PFS) w porównaniu z leczeniem chlorambucylem, lekiem stosowanym do niedawna standardowo w pierwszej linii leczenia u chorych z PBL [3–6].

Obecnie najskuteczniejszą metodą leczenia, zarówno u wcześniej nieleczonych chorych, jak i w przypadkach opornych na terapię pierwszoliniową, jest łączne stosowanie ANP z rytuksymabem (RIT) (przeciwciało monoklonalne anty-CD20). RIT składa się z ludzkiej sekwencji stałej IgG1_K oraz z mysich sekwencji zmiennych [7]. Za pośrednictwem fragmentu Fab łączy się z cząsteczką CD20, której ekspresję stwierdza się na zdrowych i białaczkowych limfocytach B. Poprzez domenę Fc RIT uruchamia mechanizmy układu odpornościowego, prowadzące do lizy komórek B [8]. Mechanizmami odpowiedzialnymi za efekt cytotoksyczny działania RIT jest cytoliza zależna od układu dopełniacza (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) oraz cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) [9–12, 14]. Wykazano również, że RIT powoduje zależną od kaspaz apoptozę komórek PBL [13].

Istotne znaczenie w leczeniu tej choroby ma również inne przeciwciało monoklonalne – alemtuzumab (ALT), skierowane przeciw antygenowi CD52 [14]. Antygen CD52 jest glikoproteiną występującą na prawidłowych, ale również zmienionych nowotworowo limfocytach, monocytach i komórkach NK [15, 16, 17]. Wyniki badań przedklinicznych wskazują, że przeciwciało to działa synergistycznie z innymi lekami stosowanymi w PBL, jak kładrybina (2-CdA) czy fludarabina (FA) [18]. Przeciwciała monoklonalne są skuteczne również u pacjentów z delecją lub mutacją genu *P53*, identyfikowaną poprzez stwierdzenie delecji w ramionach krótkich chromosomu 17 (17p).

Niektóre doświadczenia i obserwacje kliniczne wskazują, że działanie przeciwnowotworowe wykazują także nowe pochodne etodolaku – SDX-101 oraz SDX-308. SDX-101 jest prawo-skrętną formą izomeryczną etodolaku, leku z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), powszechnie stosowanego w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, natomiast SDX-308 jest nowym analogiem SDX-101. Uzyskano go przez podstawienie grupy bromkowej do pierścienia aromatycznego R-etodolaku oraz redukcję grupy ketonowej [19]. Według najnowszych badań, dzięki tym modyfikacjom cechuje się on silniejszym działaniem przeciwko komórkom PBL. W badaniach własnych podjęto próbę oceny działania obu analogów etodolaku w skojarzeniu z lekami już uznanymi w leczeniu PBL: analogami puryn (ANP) i przeciwciałami monoklonalnymi .

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na komórkach jednojądrowych, wyizolowanych od 99, wcześniej nieleczonych, chorych na PBL. Charakterystykę kliniczną badanych chorych przedstawiono w tabeli 1. Materiał do badań stanowiła krew obwodowa chorych, pobierana przy okazji rutynowych badań diagnostycznych. Grupę kontrolną stanowiło 9 zdrowych ochotników. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy UM w Łodzi, a wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

Tabela 1. Charakterystyka chorych
Table 1. Characteristics of the patients

Wiek (lata)	Mediana –	70
	Zakres –	37–100
Płeć	Kobiety –	49 (%)
	Mężczyźni –	51(%)
Leukocytoza ($1 \times 10^9/l$)	Mediana –	33
	Zakres –	6,9÷300
Stężenie hemoglobiny (g%)	Mediana –	12,9
	Zakres –	5,2÷17
Liczba płytek krwi ($1 \times 10^9/l$)	Mediana –	152
	Zakres –	2÷453
Okres kliniczny wg Rai	0 –	44
	I –	20
	II –	4
	III –	8
	IV –	23
Ekspresja antygenu CD38 (%)	Mediana –	8,25
	Zakres –	0,21÷98
Ekspresja białka ZAP-70 (%)	Mediana –	6,53
	Zakres –	0,02÷99,14

Izolacja komórek jednojądrowych

W celu izolacji komórek jednojądrowych krew heparynizowaną nanoszono na warstwę Histopaque-1077 i wirowano w gradiencie gęstości (Sigma Diagnostics, Inc. ST.Louis, Mo, USA) stosując 3600 obrotów na minutę przez 20 minut. Następnie, komórki odplukiwano przez wirowanie w płynie Hanksa (Biomed, Lublin, Polska), a następnie w medium hodowlanym RPMI-1640 (BioWhitaker, Lonza, Verviers, Belgia).

Limfocyty z pełnej krwi obwodowej znakowano za pomocą standardowego panelu przeciwciał monoklonalnych rozpoznających antygeny CD19, CD20, CD23, CD5, CD3, CD4, CD8, CD56. W celu oceny immunofenotypowej 50 μ l krwi inkubowano przez okres 15 minut z odpowiednimi przeciwciałami (dodawanymi w ilości zgodnej z zaleceniami producenta). Następnie materiał poddano 15-minutowej lizie, bez późniejszego płukania (metoda *lyse - no wash*). Wszystkich pomiarów dokonywano przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). W trakcie każdej analizy mierzono fluorescencję 10 000 komórek.

Hodowle

Zawiesinę komórek dodawano do 24- i 48- dołkowych płytek (Nunc, Roskilde, Dania) lub do naczynka o pojemności 1000 ml (Nunc Roskilde, Dania). Stężenie komórek w hodowlach wynosiło $0,5 \times 10^6/ml$. Komórki hodowano w przygotowanym medium RPMI-1640, z dodatkiem 10% surowicy by-

dłcej, 3 ml L-glutaminy, 5ml mieszanki streptomycyny i penicyliny (wszystkie odczynniki – Sigma, Taufkirchen, Niemcy). Izolacja komórek i zakładanie hodowli odbywały się w warunkach jałowych.

Wyizolowane komórki inkubowano przez 24 godziny z dodatkiem SDX-101 lub SDX-308 (Salmedix, Inc., San Diego, CA, USA) w skojarzeniach z 2-CdA (Biodribin; Bioton, Warszawa, Polska), FA (Fludara; Schering AG, Berlin, Niemcy), RIT (Mabthera; Roche, Bazylea, Szwajcaria) lub ALT (Campath-1H; ILEX Oncology, San Antonio, TX, USA).

W głównej części doświadczeń zakładano następujące hodowle komórek jednojądrowych krwi obwodowej z dodatkiem następujących leków:

1. 2-CdA
2. FA
3. RIT
4. ALT
5. SDX-101
6. SDX-308
7. skojarzenia SDX-101+2-CdA lub SDX-308+2-CdA
8. skojarzenia SDX-101+FA lub SDX-308+FA
9. skojarzenia SDX-101+RIT lub SDX-308+RIT
10. skojarzenia SDX-101+ALT lub SDX-308+ALT

Kontrolę stanowiły prowadzone równolegle hodowle komórek jednojądrowych krwi obwodowej bez dodatku leków.

Do wszystkich hodowli z RIT i ALT, na 30 minut przed podaniem tych leków – dodawano drugorzędowe przeciwciało klasy IgG (*goat anti-human Fcy*, Jackson Immuno Research, USA) – w celu spoutęgowania proapoptotycznego działania przeciwciał monoklonalnych, poprzez zjawisko „*cross-linking*”.

Dawki ANP i przeciwciał monoklonalnych wybrano na podstawie doświadczeń wstępnych na komórkach pochodzących od 12 chorych na PBL. Były to dawki, które powodowały spadek żywotności komórek o ok. 20% po 24 godzinach inkubacji. W efekcie 2-CdA stosowano w dawce 175nM, FA - 3,5 nM, RIT – 20 µg/ml, ALT – 20 µg/ml, SDX-101 – 800 µM, a SDX-308 w dawce 50 µM.

Stożenie cytotoksycznego działania leków oceniano stosując skompensowany indeks cytotoksyczności (SIC). Jest to różnica pomiędzy odsetkiem komórek JP+ (indeks cytotoksyczności, IC) w poszczególnych hodowlach z lekami, a IC w kontrolach. Oceny apoptozy dokonywano na podstawie wykrywania aktywnej kaspazy 3 oraz za pomocą testu z Aneksyną-V (Ann-V).

Pomiaru aktywnej kaspazy 3 dokonywano przy użyciu zestawu firmy Becton Dickinson (San Jose, Ca, USA). Komórki po inkubacji z lekami permabilizowano i utrwalano za pomocą roztworu Cytifix/Cytoperm (czas 20 minut, na lodzie), a następnie dwukrotnie przemywano i wirowano w roztworze Perm/Wash (BD Pharmingen, San Jose, Ca, USA).

Do komórek przygotowanych w opisany sposób dodawano przeciwciało przeciw aktywnej kaspazie 3 w ilości 50 µl na 100 µl zawiesiny komórek. Następnie otrzymany roztwór inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki przemywano roztworem Perm/Wash i przy użyciu cytometru przepływowego (FACSCalbur, Becton Dickinson, San Jose, Ca, USA). Dla oceny nasilenia apoptozy w poszczególnych hodowlach obliczano indeks apoptotyczny (IA), czyli odsetek komórek apoptotycznych, wykazujących aktywację kaspazy 3. Różnica pomiędzy IA w hodowlach z lekami, a IA w równoległych kontrolach była określana pojęciem skompensowanego IA (SIA).

Do pomiaru ekspresji białek zaangażowanych w proces apoptozy użyto komórek, które po inkubacji z badanymi związkami zostały utrwalone w 1% formaldehydzie (10 minut, w temperaturze 0°C), a następnie w 80% alkoholu etylowym (30 minut, w temperaturze 0°C). Po dwukrotnym przemyciu komórek w PBS dokonano ich znakowania przeciwciałami skierowanymi przeciw poszczególnym białkom (30 minut, w temperaturze pokojowej, w ciemności). Użyto następujących przeciwciał:

1. Przeciwciało anti-p73 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA);
2. Przeciwciało anti-Bax (DAKO Cytomation, Glostrup, Dania);
3. Przeciwciało anti-Bak (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania);
4. Przeciwciało anti-Bcl-2 (DAKO Cytomation, Glostrup, Dania);
5. Przeciwciało anti-Mcl-1 (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania).

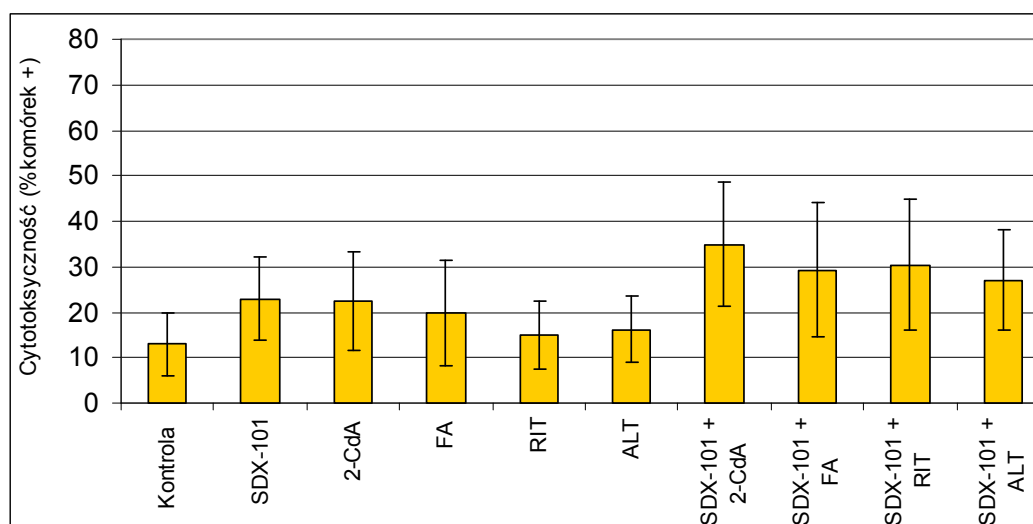
Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA 5.0 (Tulsa, USA). Określano średnią arytmetyczną (\bar{X}), odchylenie standardowe (SD), medianę oraz zakres wartości. Do porównania różnic pomiędzy próbkami traktowanymi lekami, a odpowiednimi kontrolami stosowano test Mann-Whitney'a. Do oceny istnienia związków statystycznych pomiędzy wynikami używano test korelacji rang R Spearman'a. Za istotne statystycznie uznawane były różnice, dla których poziom istotności p był mniejszy od 0,05.

WYNIKI

Po 24 godzinach hodowli *in vitro* badane leki stosowane pojedynczo wywierały następujący efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek PBL: mediana SIC dla 2-CdA – 8,4%, FA – 6,4%, RIT – 0,9% oraz ALT – 4,0%. Skojarzenie SDX-101 z 2-CdA indukowało znamienne wyższą cytotoksyczność niż 2-CdA stosowany pojedynczo (mediana SIC: 31,4% dla SDX-101+2-CdA vs. 8,4% dla 2-CdA; $p < 0,009$).

Mediana SIC dla pozostałych kombinacji SDX-101 wynosiła: 19,7% dla SDX-101+FA ($p < 0,05$ w porównaniu z pojedynczymi lekami), 23,6% dla SDX-101+RIT ($p < 0,02$ w porównaniu z pojedynczymi lekami) oraz 17,7% dla SDX-101+ALT ($p = 0,004$ w porównaniu z ALT stosowanym pojedynczo).

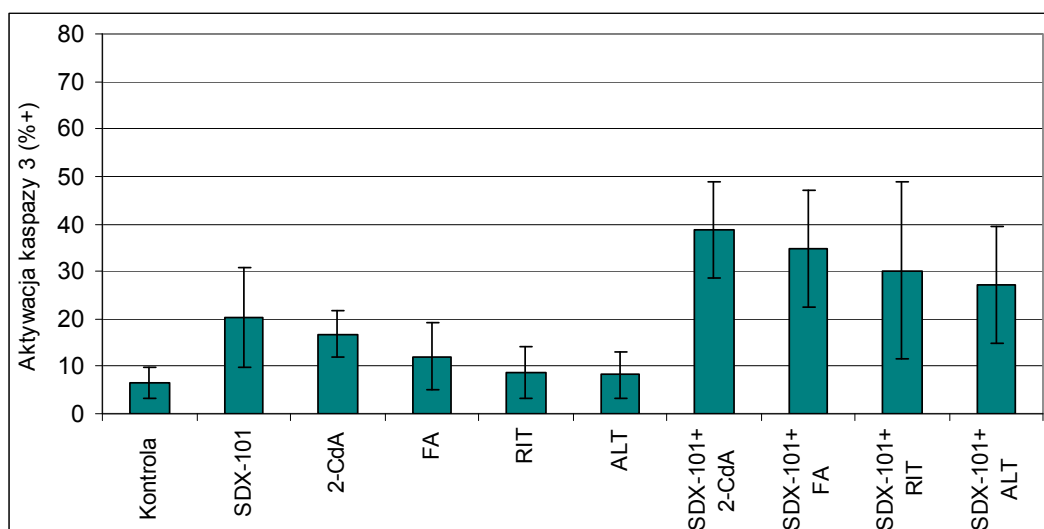


Ryc. 1. Cytotoksyczność SDX-101 stosowanego pojedynczo i w skojarzeniu z ANP i przeciwciałami monoklonalnymi w 24 godzinnych hodowlach komórek PBL. Na Rycinie przedstawiono wartości $\bar{X} \pm SD$

Fig. 1. Cytotoxic effect of SDX-101 alone and in combination with purine analogues and monoclonal antibodies. $\bar{X} \pm SD$ values are shown

Wyodrębniliśmy grupę kilku chorych, u których zaobserwowaliśmy brak istotnej cytotoksyczności 2-CdA (n=6) i FA (n=5) w monoterapii (SIC mniejszy od 5%). W próbkach tych obserwowano zachowaną wrażliwość komórek PBL na cytotoksyczne działanie SDX-101 ($p < 0,05$ w porównaniu do efektów 2-CdA i FA). W dalszej części badań analizowano cytotoksyczność SDX-308 skojarzonego z lekami: 2-CdA, FA, RIT i ALT wobec komórek PBL (Rycina 1). Po 24 godzinach hodowli *in vitro* leki te stosowane pojedynczo wywierały efekt cytotoksyczny na następującym poziomie: mediana SIC dla 2-CdA – 0,9%, FA – 0,0%, RIT – 0,0% oraz ALT – 2,1%.

Skojarzenie SDX-101 z innymi lekami nasilało apoptozę komórek PBL. Mediana SIA dla SDX-101+2-CdA wynosiła 28,0% (vs. 2-CdA – $p=0,017$), dla SDX-101+FA – 23,9% (vs. FA – $p=0,026$), dla SDX-101+RIT – 19,6% (vs. RIT – $p=0,005$), natomiast dla SDX-101+ALT – 18,4% (vs. ALT – $p=0,004$).

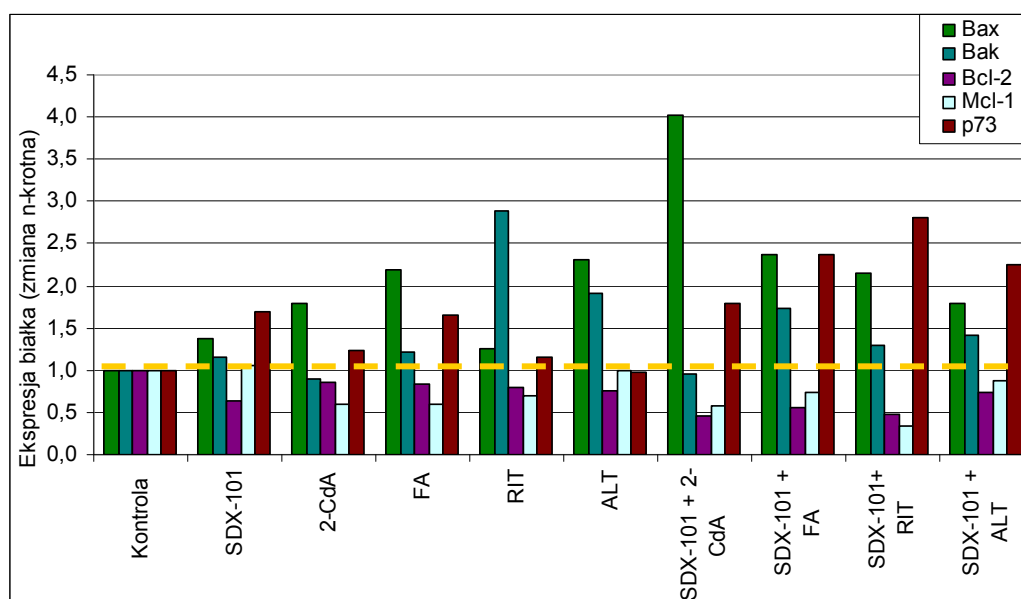


Ryc. 2. Odsetek komórek PBL z aktywną kaspazą 3 w 24 godzinnych hodowlach z SDX-101, stosowanym pojedynczo oraz w skojarzeniach z ANP i przeciwciałami monoklonalnymi. Na Rycinie przedstawiono wartości $X \pm SD$

Fig. 2. Caspase 3 activation in the 24 hour cultures of B-CLL cells with SDX-101 alone and in combination with purine analogues and monoclonal antibodies. $X \pm SD$ values are shown

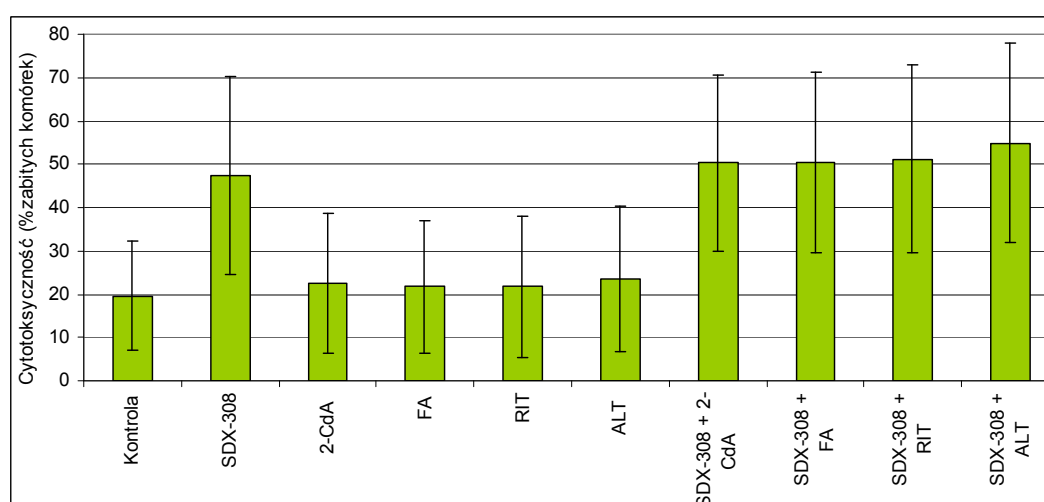
SDX-101 zastosowany łącznie z badanymi lekami wywoływał zmiany w ekspresji białek zaangażowanych w proces apoptozy, jednakże tylko w kilku przypadkach zmiany te były istotne statystycznie. Kombinacja SDX-101+2-CdA istotnie zwiększała stężenie białka Bax ($p < 0,01$ w porównaniu do efektu obydwu leków stosowanych pojedynczo) oraz istotnie zmniejszała ekspresję białka Bcl-2 w komórkach ($p < 0,05$). Ponadto, podczas gdy SDX-101 pojedynczo zwiększał ekspresję antyapoptotycznego białka Mcl-1, w skojarzeniu z RIT powodował znaczące obniżenie ekspresji tego białka ($p < 0,05$ w porównaniu do efektu obydwu leków stosowanych pojedynczo). Kombinacje SDX-101+FA i SDX-101+ALT hamowały ekspresję białek Bcl-2 i Mcl-1, ale różnice w porównaniu do efektu poszczególnych leków stosowanych pojedynczo były nieistotne statystycznie. Żadne ze skojarzeń badanych leków nie wpływały na ekspresję białka Bak.

Skojarzenie SDX-308 ze wszystkim lekami indukowało większą cytotoksyczność niż leki stosowane pojedynczo. Jednak różnice istotne statystycznie stwierdzono jedynie dla cytotoksyczności poszczególnych skojarzeń w porównaniu do efektów samego 2-CdA, FA, RIT czy ALT.

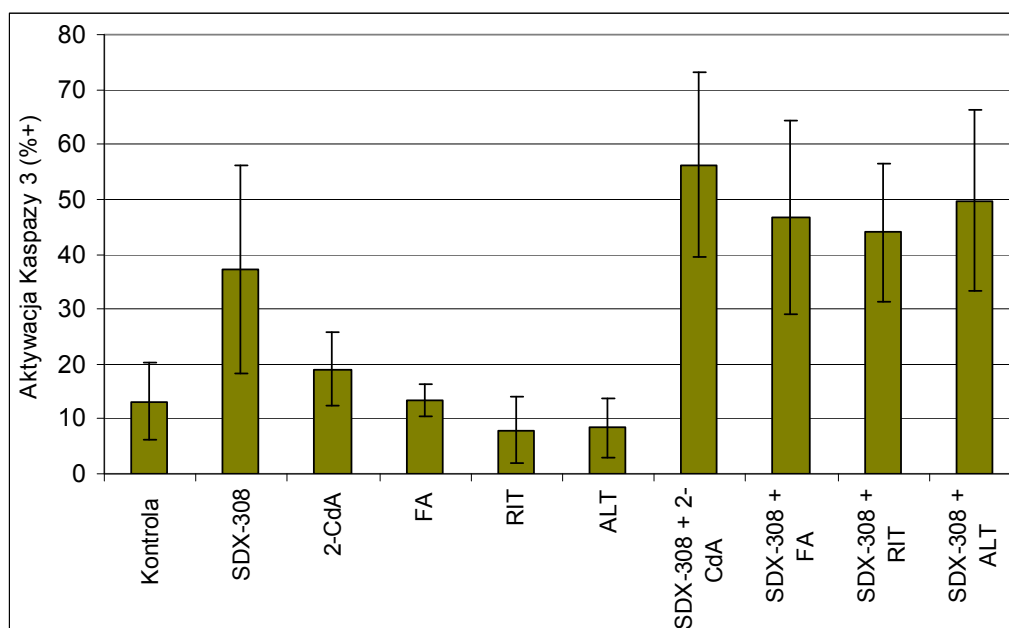


Ryc. 3. Ekspresja białek regulujących apoptozę w 24 godzinnych hodowlach z SDX-101 stosowanym pojedynczo oraz w skojarzeniu z ANP i przeciwciałami monoklonalnymi. Na osi Y przedstawiono wielokrotność zmiany ekspresji badanych białek
Fig. 3. Expression of apoptosis regulating proteins in the 24-hours cultures with SDX-101 and in combination with purine analogues and monoclonal antibodies. Y-axis shows a grade of change in protein expression

W przypadku SDX-308 zastosowanego łącznie z 2-CdA mediana SIC wynosiła 34,4%, w porównaniu do 0,9% dla 2-CdA stosowanego pojedynczo ($p < 0,0001$). Mediana SIC dla skojarzenia SDX-308+FA wynosiła 36,3%, podczas gdy dla FA stosowana pojedynczo była na poziomie 0,0% ($p < 0,0001$). Skojarzenie SDX-308 z RIT indukowało cytotoksyczność na poziomie 36,9% (mediana SIC), natomiast mediana SIC dla RIT zastosowanego pojedynczo wynosiła 0,0% dla RIT ($p < 0,0001$). Mediana SIC dla kombinacji SDX-308 z ALT wynosiła 39,8%, podczas gdy dla ALT stosowanego pojedynczo wynosiła 2,1% ($p < 0,0001$).

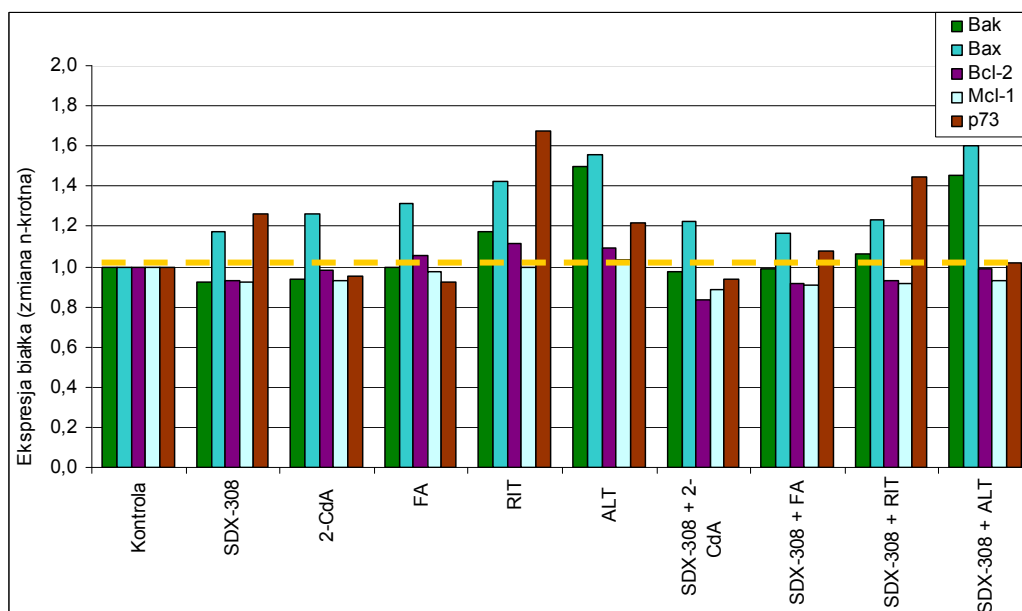


Ryc. 4. Cytotoksyczność SDX-308 stosowanego pojedynczo oraz w skojarzeniu z ANP i przeciwciałami monoklonalnymi w 24 godzinnych hodowlach komórek PBL. Na rycinie przedstawiono wartości $X \pm SD$
Fig. 4. Cytotoxic effect of SDX-308 alone and in combination with purine analogues and monoclonal antibodies. $X \pm SD$ values are shown



Ryc. 5. Odsetek komórek PBL z aktywną kaspazą 3 w 24 godzinnych hodowlach z SDX-308 stosowanym pojedynczo i w skojarzeniach z ANP i przeciwciałami monoklonalnymi. Na rycinie przedstawiono wartości $X \pm SD$

Fig. 5. Caspase 3 activation in the 24 hour cultures of B-CLL cells with SDX-308 alone and in combination with purine analogues and monolonal antibodies. $X \pm SD$ values are shown



Ryc. 6. Ekspresja białek regulujących apoptozę w 24 godzinnych hodowlach z SDX-308 stosowanym pojedynczo oraz w skojarzeniu z ANP i przeciwciałami monoklonalnymi. Na osi Y przedstawiono wielkość zmiany ekspresji białek w stosunku do kontroli

Fig. 6. Expression of apoptosis regulating proteins in the 24-hours cultures with SDX-308 and in combination with purine analogues and monolonal antibodies. Y-axis shows a grade of change in protein expression

Skojarzenie SDX-308 z innymi lekami nasilało apoptozę komórek PBL, jednak różnice te nie były istotne statystycznie w odniesieniu do poszczególnych leków stosowanych pojedynczo. Mediana SIA dla SDX-308 zastosowanego łącznie z 2-CdA wynosiła 36,8% (vs. 2-CdA – $p>0,05$), z FA – 25,3% (vs. FA – $p>0,05$), z RIT – 24,3% (vs. RIT – $p>0,05$) z kolei połączenie z ALT – 32,0% (vs. ALT – $p>0,05$).

Poszczególne skojarzenia SDX-308 z ALT charakteryzował wyraźny wzrost ekspresji białka Bax. Ekspresja pozostałych białek zaangażowanych w proces apoptozy różniła się w poszczególnych skojarzeniach, jednak tylko w kilku przypadkach różnice wykazywały istotność statystyczną. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ekspresji białka Bak przy skojarzeniu SDX-308 i ALT ($p<0,05$ w stosunku do kontroli). Kombinacja SDX-308+2-CdA zmniejszała stężenie białka Mcl-1 w porównaniu do kontroli ($p<0,01$). W sposób istotny zmniejszała się również ekspresja białka Bcl-2 dla skojarzenia SDX-308 i RIT w porównaniu z kontrolą ($p<0,05$).

DYSKUSJA

Przez wiele lat FA i 2-CdA stosowane były w monoterapii i były uważane za najskuteczniejsze leki w terapii PBL. W kolejnych latach, w badaniach przedklinicznych i klinicznych udowodniono ich synergistyczne działanie z innymi lekami, takimi jak cyklofosfamid czy antybiotyki antracyklinowe [1, 20].

RIT jest pierwszym przeciwciałem monoklonalnym zaaprobowanym przez amerykańską agencję FDA (*US Food and Drug Administration*) do leczenia PBL [21]. Najnowsze randomizowane badania wielośrodkowe (REACH, CLL-8) potwierdziły większą skuteczność FA i cyklofosfamidu (FC) kojarzonych z RIT (schemat R-FC) w porównaniu ze schematem FC [22, 23]. ALT jest kolejnym przeciwciałem o dużej aktywności u chorych na PBL, zarówno w pierwszej linii leczenia jak i u chorych opornych na wcześniejszą terapię [21, 24, 25].

W badaniach własnych oceniono wpływ łącznego zastosowania powyższych leków o uznanej aktywności w PBL z analogami etodolaku. Nakładające się różne mechanizmy działania tych związków mogłyby bowiem zwiększyć ich cytotoksyczność w odniesieniu do komórek PBL.

FA i 2-CdA mają podobną budowę chemiczną oraz mechanizm działania i wykazują działanie cytotoksyczne zarówno wobec komórek proliferujących, jak i nieaktywnych, pozostających w fazie G_0/G_1 cyklu komórkowego [26]. Wśród komórek proliferujących, cytotoksyczność tej grupy leków związana jest głównie z zahamowaniem syntezy deoksyrybonukleotydów kluczowych w replikacji i naprawie DNA. Apoptoza wywoływana przez ANP może być indukowana zarówno przez szlak białka p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA jak i bezpośrednio przez szlak mitochondrialny aktywacji kaspaz [27]. 2-CdA wywiera dodatkowy efekt cytotoksyczny w postaci bezpośredniego uszkodzenia mitochondriów [28].

Przeciwciała monoklonalne które zastosowano w badaniach własnych, RIT i ALT, działają cytolytycznie na komórki PBL wywołując podobny efekt immunologiczny poprzez mechanizm cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) oraz cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza (CDC). Dane z piśmiennictwa wskazują, że RIT indukuje ponadto apoptozę komórek PBL zależną od aktywacji kaspaz [29, 30, 31]. Mechanizm ten, mimo iż do końca nie wyjaśniony, może być istotny w kojarzeniu RIT z cytostatykami, które w większości są lekami przeciwnowotworowymi o działaniu proapoptotycznym.

W badaniach własnych wykazano dużą skuteczność połączenia SDX-101 z ANP. Skojarzenie SDX-101 z 2-CdA nasila efekt cytotoksyczny w porównaniu do 2-CdA stosowanego pojedynczo. Połączenie SDX-101 z FA również zwiększa indywidualną cytotoksyczność FA, chociaż efekt ten jest mniej wyraźny, niż w przypadku kombinacji SDX-101+2-CdA. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na istnienie dodatkowego mechanizmu działania 2-CdA indukującego apoptozę, być może wspomnianego bezpośredniego wpływu na mitochondria [28]. Podobne działanie przeciwbiałaczkowe wykazywała kombi-

nacja SDX-101 i RIT. Natomiast połączenie SDX-101 i ALT było znacznie skuteczniejsze jedynie w odniesieniu do samego ALT.

SDX-308 okazał się być bardzo aktywny wobec komórek PBL zarówno w skojarzeniu z ANP, jak i z przeciwciałami monoklonalnymi, a istotność statystyczną efektu tych skojarzeń obserwowano zarówno w porównaniu do stosowanych pojedynczo ANP jak i przeciwciał monoklonalnych. Znamienność siły działania cytotoksycznego testowanych skojarzeń była natomiast maskowana przez wysoką cytotoksyczność samego SDX-308.

Zarówno SDX-101, jak i SDX-308 w skojarzeniu ze wszystkimi kojarzonymi lekami aktywnie stymulowały apoptozę komórek PBL zależną od aktywacji kaspaz. Najsilniejszy wzrost aktywacji kaspazy 3 w przypadku obu analogów etodolaku obserwowano w połączeniu z 2-CdA. Kombinacje SDX-101 z FA i z przeciwciałami monoklonalnymi wykazywały nieco słabszy efekt. Z kolei SDX-308 silnie aktywował kaspazę 3 również w pozostałych skojarzeniach, a w kombinacji z ALT poziom aktywacji kaspazy 3 był zbliżony do skojarzenia z 2-CdA.

W badaniach własnych oceniano ekspresję białek regulujących procesy apoptozy, zarówno promotorów apoptozy – p73, Bax i Bak, jak i inhibitorów apoptozy – Bcl-2 i Mcl-1. Kombinacja SDX-101+2-CdA istotnie zwiększała stężenie białka Bax w porównaniu do efektu obydwu leków stosowanych pojedynczo ($p < 0,01$) oraz istotnie zmniejszała ekspresję białka Bcl-2 w komórkach ($p < 0,05$). Ponadto, SDX-101 w skojarzeniu z RIT powodował znaczące obniżenie ekspresji tego białka w porównaniu do efektu RIT stosowanego pojedynczo ($p < 0,05$). Skojarzenia SDX-101+FA i SDX-101+ALT hamowały ekspresję białek Bcl-2 i Mcl-1, ale różnice w porównaniu do efektu poszczególnych leków stosowanych pojedynczo były nieistotne statystycznie. Żadne ze skojarzeń badanych leków nie wpływało na ekspresję białka Bak.

Poszczególne skojarzenia SDX-308 z badanymi lekami charakteryzował wyraźny, choć nieznamienisty wzrost ekspresji białka Bax. Tylko w kilku przypadkach poziom zmian wykazywał istotność statystyczną. Kombinacja SDX-308+2-CdA zmniejszała stężenie antyapoptotycznego białka Mcl-1 ($p < 0,01$ w porównaniu do kontroli). W sposób istotny zmniejszała się również ekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2 dla skojarzenia SDX-308 i RIT ($p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą). Zaobserwowano również istotny statystycznie wzrost ekspresji proapoptotycznego białka Bak przy skojarzeniu SDX-308 i ALT ($p < 0,05$).

Ekspresja badanych białek była więc różna w zależności od rodzaju stosowanej kombinacji. Badane białka z rodziny Bcl-2, oprócz białka p73, biorą udział w indukcji apoptozy szlakiem wewnętrznym, czyli mitochondrialnym, zależnym od aktywacji kaspazy 9 [31]. Można przypuszczać, że zwiększenie aktywności kaspazy 3 w wyniku działania badanych skojarzeń leków wywoływane jest przy dodatkowym udziale zewnątrzpochoźnego szlaku apoptozy, zależnego od kaspazy 8. Potwierdzeniem tego przypuszczenia może być m.in. indukowana przez SDX-308 redukcja ekspresji czynnika NF κ B w komórkach szpiczaka mnogiego (SzM) [32]. Wyjaśnienie tego wymaga jednakże dalszych badań na komórkach PBL.

W chwili rozpoczęcia badań własnych nie było doniesień na temat skuteczności kojarzenia SDX-101 czy SDX-308 z ANP czy stosowanymi w PBL przeciwciałami monoklonalnymi. Kilka publikacji dotyczyło natomiast efektu skojarzenia powyższych analogów etodolaku z innymi cytostatykami, szczególnie w odniesieniu do komórek SzM. Badania Neri i wsp. [35] wykazały, że leczenie SDX-101 w skojarzeniu z deksametazonem nasila indukowaną deksametazonem aktywację kaspaz w komórkach SzM OPM1. Połączenie to wywołało 81,4% cytotoksyczność i wykazało silnie synergistyczny mechanizm działania badanych leków. Autorzy wykazali ponadto, że skojarzone leczenie tymi lekami indukuje znaczne zahamowanie aktywności przeszczepu ksenograficznego ludzkich komórek SzM u myszy, u których przeszczepiono odporne na deksametazon komórki OPM1. Istotne jest, że w modelu tym leczenie SDX-101 lub deksametazonem pojedynczo nie indukowało redukcji wielkości guza w porównaniu z kontrolą [35].

Lindhagen i wsp. [33] zaobserwowali, że SDX-101 i SDX-308 nasilają cytotoksyczne działanie chlorambucylu, winkrystyny i doksorubicyny na komórki linii U937-gtb. Większość kombinacji leków wykazywała działanie addytywne, jednak 70% synergizm stwierdzono po skojarzeniu SDX-308 i chlorambucylu na linii komórkowej U937-gtb w dwóch trzecich próbek.

Co interesujące, w badaniach własnych wyodrębniono grupę pacjentów pierwotnie opornych na ANP, u których leki te stosowane pojedynczo wykazywały indeks SIC poniżej 5%. Wykazano, że w grupach tych zarówno SDX-101 jak i SDX-308 wykazywały niezmiennie silny efekt cytotoksyczny. Podobne wyniki przedstawili Yasui i wsp. [34] w odniesieniu do komórek SzM *in vitro*. Wykazali oni, że SDX-308 indukuje cytotoksyczność komórek SzM zarówno wrażliwych, jak i opornych na leczenie deksametazonem, doksorubicyną i melfalanem, oraz komórek białaczkowych i chłoniakowych opornych na bortezomib. SDX-308 okazał się skuteczny również w obecności IL-6, IGF-1 i komórek podścieliska szpiku [34]. Z kolei Neri i wsp. [35] wykazali, że SDX-308 przełamuje oporność na deksametazon w populacji komórek SzM OPM1 opornych na ten lek. Tak więc badane analogi etodolaku, w szczególności SDX-308 mogą znaleźć zastosowanie nawet w przypadku nowotworów krwi opornych na leczenie pierwszoliniowe, w tym w przypadkach PBL opornych na ANP.

PODSUMOWANIE

Badano efekty skojarzenia SDX-101 i SDX-308 z ANP (2-CdA i FA) oraz przeciwciałami monoklonalnymi (RIT i ALT). Skojarzenie SDX-101 z 2-CdA nasilało efekt cytotoksyczny w porównaniu do obydwu leków stosowanych pojedynczo. Połączenie SDX-101 z FA również zwiększało indywidualną cytotoksyczność SDX-101 czy FA, chociaż efekt ten był mniej wyraźny niż w przypadku kombinacji SDX-101+2-CdA. Podobne działanie przeciwbiałaczkowe wykazywała kombinacja SDX-101 i RIT. Natomiast połączenie SDX-101 i ALT było znacznie skuteczniejsze jedynie w odniesieniu do samego ALT.

SDX-308 okazał się być znacznie bardziej aktywny wobec komórek PBL zarówno w skojarzeniu z ANP, jak i przeciwciałami monoklonalnymi. Uniemożliwiło to jednak właściwą ocenę interakcji tych leków, gdyż siła działania leków zastosowanych w skojarzeniach była maskowana wysoką cytotoksycznością samego SDX-308.

PIŚMIENNICTWO

1. Robak T, Jamrozik K, Robak P. Current and emerging treatments for chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2009; **69**: 2415-49.
2. Cheson BD. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006; **55**: 188-196.
3. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR i wsp. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2000; **343**: 1750-1757.
4. Lepage M, Chevret S, Cazin B i wsp. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Randomized comparison of fludarabine, CAP and CHOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients *Blood*. 2001; **98**: 2319-2325.
5. Johnson S, Smith AG, Loffler H i wsp. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin and prednisone (CAP) for treatment of advanced stage chronic lymphocytic leukemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet* 1996; **347**: 1432-1438.
6. Steurer M, Pall G, Richards S i wsp. Single agent purine analogues for the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a systematic review and meta analysis. *Cancer Treat. Rev.* 2006; **32**: 377-389.
7. Onrust SV, Lamb HM, Balfour JA. Rituximab. *Drugs* 1999; **58**: 79-88.
8. Nabhan C, Patton D, Gordon LI i wsp. A pilot trial of rituximab and alemtuzumab combination therapy in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk. Lymphoma*. 2004; **45**: 2269-2273.
9. Maloney G. Mechanism of action of rituximab. *Anti-Cancer Drugs* 2001; **12**: (supl 2), 1-4.
10. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T i wsp. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab *in vitro*: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cells lysis. *Blood* 2000; **95**: 3900-3908.

11. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT i wsp. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood*. 2003; **101**, 1045-1052.
12. Manches O, Lui G, Chaperot L i wsp. *In vitro* mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2003; **101**: 949-954.
13. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW i wsp. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab *in vitro* in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*. 2002; **99**, 1038-1043.
14. Robak T. Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphoid leukemias. *Leuk. Lymphoma*. 2004; **45**: 205-219.
15. Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D i wsp. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 1997; **15**: 1567-1574.
16. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E i wsp. Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with *in vivo* therapeutic responses to Campath-1H. *Leuk. Res.* 1998; **22**: 185-191.
17. Moreton P, Hillmen P. Alemtuzumab therapy in B-cell lymphoproliferative disorders. *Semin. Oncol.* 2003; **30**: 493-501.
18. Smolewski P, Szmigielska-Kaplon A, Cebula B i wsp. Proapoptotic activity of alemtuzumab alone and in combination with rituximab or purine nucleoside analogues in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk. Lymphoma*. 2005; **46**: 87-100.
19. Lentzsch S., Elliott G., Roodman D. SDX-308 and SDX-309, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, as Therapeutic Candidates for Treating Hematologic Malignancies Including Myeloma. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2007; **340**: 511-516.
20. Robak T, Kasznicki M. Alkylating agents and nucleoside analogues in the treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; **16**: 1015.
21. Robak T. Alemtuzumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *BioDrugs* 2005; **19**: 9-22.
22. Hallek M, Fingerle-Rowson G, Fink A-M i wsp. Immunochemotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab versus fludarabine and cyclophosphamide improves response rates and progression-free survival of previously untreated patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **112**: Abstract 325.
23. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Céligny P, i wsp. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2010; **28**: 1756-65.
24. Robak T. New agents in chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2006; **7**: 200-212.
25. Wierda WG, Kipps TJ, Keating MJ. Novel immune-based treatment strategies for chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2005; **23**: 6325 – 6332.
26. Lee N, Russell N, Ganeshaguru K i wsp. Mechanisms of deoxyadenosine toxicity in human lymphoid cells in vitro: relevance to the therapeutic use of inhibitors of adenosine deaminase. *Br. J. Haematol.* 1984; **56**: 107-119.
27. Genini D, Budihardjo I, Plunkett W i wsp. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998; **281**: 1509-1512.
28. Marzo I, Pérez-Galán P, Giraldo P i wsp. Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem J.* 2001; **359**: 537-546.
29. Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A i wsp. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab *in vivo* in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 1999; **1038** –1043.
30. Chow KU, Sommerlad WD, Boehrer S i wsp. Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes *in vitro*: role of cytokines, complement and caspases. *Haematologica* 2002; **87**: 33-43.
31. Smolewski P, Darzynkiewicz Z, Robak T. Caspase-mediated cell death in hematological malignancies: theoretical considerations, methods of assessment, and clinical implications. *Leuk. Lymphoma*. 2003; **44**: 1089-1104.
32. Feng R, Anderson G, Xiao G i wsp. SDX-308, a nonsteroidal anti-inflammatory agent, inhibits NF-kappaB activity, resulting in strong inhibition of osteoclast formation/activity and multiple myeloma cell growth. *Blood* 2007; **109**: 2130-2138.
33. Lindhagen E., Nissle S., Aleskog A i wsp. R – etodolac (SDX-101) and the related indole-pyran analogues SDX-308 and SDX-309 potentiate the antileukemic activity of standard cytotoxic agents in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007; **60**: 545-553.
34. Yasui H, Hideshima T, Hamasaki M i wsp. SDX -101, the R-enantiomer of etodolac, induces cytotoxicity, overcomes drug resistance and enhances the activity of dexamethasone in multiple myeloma. *Blood* 2005; **106**: 706-712.
35. Neri P, Yasui H, Hideshima T i wsp. *In vivo* and *in vitro* cytotoxicity of R-etodolac with dexamethasone in glucocorticoid-resistant multiple myeloma cells. *Br. J. Haematol.* 2006; **134**: 37 – 44.

Praca wpłynęła do Redakcji 13.09.2010 r. i została zakwalifikowana do druku 27.09.2010 r.

Adres Autora:

Zakład Hematologii Doświadczalnej
Ul. Ciołkowskiego 2, 93-510 Łódź
e-mail: robakpawel@op.pl