

**ВПЛИВ РЕКОМБІНАНТНОЇ АРГІНАЗИ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ
БЛАСТНИХ КЛІТИН ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ПАЦІЄНТІВ,
ХВОРИХ НА ЛЕЙКОЗ, *IN VITRO***

**О.Чень¹, М.Барська^{1*}, О.Вовк¹, І.Цимбалюк-Волошин²,
О.Козлова², Н.Сибірна³, О.Стасик¹**

¹Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

²Західноукраїнський спеціалізований дитячий медичний центр
вул. Дністерська, 27, Львів 79035, Україна

³Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: barska@cellbiol.lviv.ua

Лейкози є одними з найбільш небезпечних злоякісних онкозахворювань системи крові. Тому розробка та удосконалення методів діагностики і терапії цього типу новоутворень є актуальним завданням для сучасної науки та медицини. Фармакологічне зниження концентрації вільного аргініну в кров'яному руслі пацієнтів є новим методом боротьби з поширенням злоякісних клітин *in vitro* та *in vivo*. Однак ефективність його для терапії лейкозів потребує подальшого вивчення. Два аргінін-деградуючих ензими – рекомбінантна аргіназа людини (rhARG) і бактерійна аргініндеїміназа (ADI) продемонстрували значний антинеопластичний потенціал щодо визначених типів пухлин, який зараз перевіряється у II-III фазі клінічних випробувань. У даній роботі вперше проведено аналіз впливу препарату рекомбінантної аргінази людини (rhARG) на життєздатність первинно ізольованих лейкозних клітин від пацієнтів, хворих на гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ), *in vitro*. Об'єктом дослідження слугували бластні клітини лейкозу від пацієнтів, хворих на ГЛЛ, та нормальні лімфоцити від здорових донорів, на яких вивчали дію препарату rhARG. Імунофенотипування клітин проводилось у клініці методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл на апараті FACScan (Becton Dickinson, США) відповідно до рекомендацій фірми виробника. Мононуклеарні лейкоцити крові отримували з використанням градієнту густини фікол-верографін (1,076-1,078 г/см³). За умов дефіциту аргініну нами встановлено достовірне зниження життєздатності бластних клітин у 75 % хворих на ГЛЛ порівняно з контрольними взірцями цих клітин. Попередник аргініну, цитрулін, значно не впливав на цитотоксичність rhARG щодо лейкозних *in vitro*.

Ключові слова: гострий лімфобластний лейкоз, rhARG, голодування за аргініном, лейкозні клітини.

Гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ) – біологічно і клінічно гетерогенна група пухлинних захворювань крові, яким властива злоякісна проліферація незрілих лімфоїдних елементів кісткового мозку з ураженням неопластичними клітинами різних тканин і органів [1]. Ця група захворювань має вагомe соціальне значення, оскільки 50 % хворих на гострий лейкоз становлять діти віком до 7 років [5]. У попередніх дослідженнях показано, що селективно створена нестача деяких незамінних амінокислот є потенційно ефективним підходом у терапії злоякісних пухлин крові [8, 9, 10]. Наприклад, рекомбінантний ензим аспарагіназа ефективно використовується для лікування деяких форм гострого лейкозу та

кількох підтипів лімфом [4]. Іншим альтернативним методом терапії деяких форм раку може слугувати ензимотерапія на основі ензимів деградації аргініну [8-10].

Метою даної роботи було дослідити вплив препарату rhARG (recombinant human arginase) на життєздатність бластних клітин периферичної крові, виділених від хворих на ГЛЛ, *in vitro*.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження слугували бластні клітини лейкозу від пацієнтів, хворих на ГЛЛ, і нормальні лімфоцити від здорових донорів, на яких вивчали дію препарату rhARG. Для дослідження впливу дефіциту аргініну на виживання лейкозних клітин периферичної крові хворих на ГЛЛ нами було отримано фракцію мононуклеарів, представлених на 95-98 % лімфоцитами з цільної периферичної крові, надану у відділенні гематології та інтенсивної хіміотерапії КЗЛОП «Західноукраїнський дитячий медичний центр» в рамках договору про співпрацю з ІБК НАН України.

Дослідження імунофенотипу клітин проводили у клініці методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл на апараті FACScan (Becton Dickinson, США) відповідно до рекомендацій фірми виробника. Виділення фракції мононуклеарних клітин з периферичної крові проводили у градієнті густини фікол-верографіну, яка становила 1,076-1,078 г/см³. Одержану фракцію клітин ресуспендували у культуральному середовищі RPMI-1640 з 20 % ембріональною сироваткою телят і культивували протягом 24 год для прикріплення моноцитів та їх елімінації. Під час досліду *in vitro* клітини обробляли препаратом рекомбінантної аргінази людини rhARG (експресована як секреторний протеїн у метилотрофних дріжджах *Hansenula polymorpha* й афінно очищена в ІБК НАНУ) в концентрації 2 Од/мл. Активність аргінази визначали спектрофотометричним методом [6]. Кількість живих і мертвих клітин обраховували після фарбування барвником трипановим синім у гемоцитометрі. Показники клітинного росту відображали у % від контролю. Дослідження морфології клітин проводили на мазках з ізольованих лімфоцитів, які фарбували за Романовським – Гімзою [3]. Отримані результати обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Згідно з імунофенотипуванням клітин крові хворих на ГЛЛ у клінічній лабораторії для пацієнтів № 1 та № 2 був притаманний B₂ імунофенотип (commonB): CD34⁺CD19⁺CD10⁺CD20⁺sCD22⁺ варіант, тоді як у пацієнта № 3 спостерігався B₃ імунофенотип(пре-B): CD34⁺CD19⁺CD10⁺CD20⁺sCD22⁺ варіант, а у пацієнта № 4 виявлено T₂ (пре-T): Dr⁻CD34⁺CD7⁺CD2⁺CD5⁺sCD3⁻CD1⁻CD4⁻CD8⁻ варіант. Розподіл лімфоцитів за імунофенотипом не тільки дає уявлення про проходження неопластичного процесу, але й допомагає вибрати і застосувати адаптовані протоколи лікування з урахуванням чутливості бластних клітин до хіміопрепаратів [2].

Показано, що у разі додавання в середовище rhARG через кожні 24 години протягом 72 годин значно знижувалася життєздатність лейкозних клітин від хворих на ГЛЛ порівняно з контрольними клітинами (рис. 1). Проте клітини від хворого № 3 із B₃ імунофенотипом (пре-B) були резистентними до дії rhARG. Нами також було досліджено життєздатність лейкозних клітин периферичної крові пацієнтів за наявності цитруліну в середовищі. Відомо, що попередник аргініну – цитрулін – здатний синтезуватись в тонкому кишківнику людини і, потрапляючи у кров, може конвертуватись до аргініну, підтримуючи проліферацію пухлинних клітин [7]. Нами показано, що додавання цитруліну не сприяє суттєво відновленню життєздатності лімфоцитів від усіх пацієнтів (рис. 1).

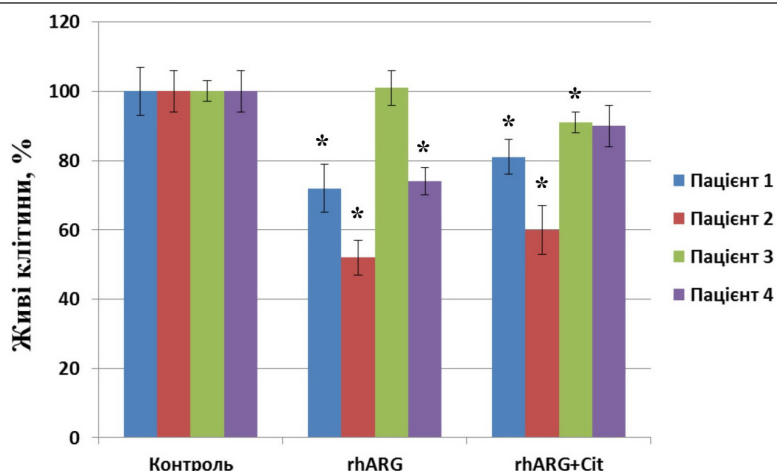


Рис. 1. Виживання лімфоцитів пацієнтів, хворих на ГЛЛ, за дії препарату рекомбінантної аргінази у тесті з трипановим синім протягом 72-годинного культивування. Контроль – клітини, культивовані на повному поживному середовищі (100 %); rhARG – середовище з доданою rhARG у концентрації 2 U/ml; rhARG+Cit – середовище з доданою rhARG та з попередником аргініну цитруліном, у концентрації 0,4 mM. Вірогідність відмінностей порівняно з показниками в контролі: * - $p < 0,05$

Результати проведенного нами порівняльного аналізу цитоморфологічних препаратів нормальних лімфоцитів здорових донорів (А) і бластних клітин пацієнтів, хворих на Т- і В-лімфобластний лейкоз, представлено на рис. 2 (Б, В, Г, Д). За умови ГЛЛ на мазках детектуються збільшені у розмірах бластні клітини, які характеризуються неконденсованим ядром і наявністю ядерця. Також спостерігаються плазматичні клітини, які в нормі у русло крові не потрапляють.

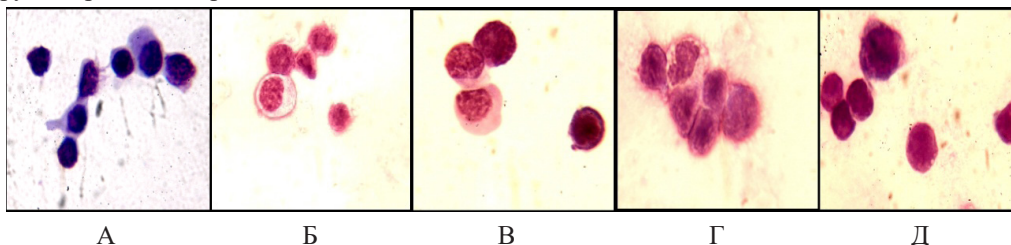


Рис. 2. Морфологія мононуклеарів периферичної крові: А – здорового донора; Б, В, Г, Д – хворих з ГЛЛ у режимі світлової мікроскопії. Фарбування за Романовським – Гімзою, збільшення $\times 1500$

У здорових донорів бластні форми лімфоцитів детектувались у дуже малій кількості: від 2 до 8 % від загальної кількості клітин (рис. 2, А). За своїми цитоморфологічними характеристиками клітини відповідали параметрам мононуклеарів периферичної крові у нормі.

Отже, за даними імунофенотипування лейкоцитів крові у хворих спостерігалися такі варіанти гострих лімфобластних лейкозів: у пацієнтів № 1 та № 2 наявний В2 (commonВ): $CD34^+CD19^+CD10^+CD20^+sCD22^+$ варіант; у пацієнта № 3 – В3 (пре-В): $CD34^+CD19^+CD10^+CD20^+sCD22^+$ варіант; у пацієнта № 4 виявлено Т2 (пре-Т): $DrCD34^+CD7^+CD2^+CD5^+sCD3^+CD1^+CD4^+CD8^-$ варіант. Життєздатність лімфоцитів від хворих ГЛЛ № 1, № 2 та № 4 достовірно знижувалась в умовах голодування за аргініном *in vitro* порівняно з контрольними збірками цих клітин. Лімфоцити від хворого № 3 виявили відносно меншу чутливість до дії rhARG.

Додавання попередника аргініну, цитруліну не впливало суттєво на токсичний ефект рекомбінантної аргінази щодо досліджуваних лейкозних клітин *in vitro*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ковалева Л.Г. Острые лейкозы. М.: Медицина, 1990. 272 с.
2. Логінський В.О., Лебедь Г.Б., Дорош І.О. Імунофенотипічна діагностика гострої лімфобластної лейкемії у дітей // Онкологія. 2002. Т. 4. С. 256-258.
3. Сибірна Н. О., Великий М. М. Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові: метод. посіб. Львів: ЛДУ, 1997. 69 с.
4. Avramis V. I., Panosyan E. H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations. The past, the present and recommendations for the future // Clin. Pharmacokinet. 2005. Vol. 44. P. 367–393.
5. Hernandez C. P., Morrow K., Lopez-Barcons L. A. et al. Pegylated arginase I: potential therapeutic approach in T-ALL // Blood. 2010. Vol. 115. P. 5214–5221.
6. Marsh W.H., Fingerhut B., Miller H. Automated and manual direct methods for the determination of blood urea // Clin. Chem. 1965. Vol. 11. P. 624–627.
7. Delage B., Fennell D.A., Nicholson L. Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer // Int. J. Cancer. 2010. Vol. 126. P. 2762–2772.
8. Qiu F., Huang J., Sui M. Targeting arginine metabolism pathway to treat arginine-dependent cancers // Cancer Letters. 2015. Vol. 364. P. 1–7.
9. Stasyk O. V., Boretsky Yu. R., Gonchar M. V. et al. Recombinant arginine-degrading enzymes in metabolic anticancer therapy and bioanalytics // Cell Biol. Int. 2015. Vol. 39. P. 246–252.
10. Wheatley D. N. Arginine deprivation and metabolomics: important aspects of intermediary metabolism in relation to the differential sensitivity of normal and tumour cells // Semin. Cancer Biol. 2005. Vol. 15. P. 247–253.

Стаття: надійшла до редакції 19.07.16

доопрацьована 30.08.16

прийнята до друку 31.08.16

IMPACT OF THE RECOMBINANT ARGINASE ON THE VIABILITY OF PERIPHERAL BLOOD BLAST CELLS FROM PATIENTS WITH LEUKEMIA *IN VITRO*

O. Chen¹, M. Barska^{1*}, I. Tsybalyuk-Voloshyn², O. Kozlova², N. Sybirna³, O. Stasyk¹

¹Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine

14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

²West-Ukrainian Specialized Children's Medical Center

27, Dnisterska St. Lviv 79035, Ukraine

³Ivan Franko National University of Lviv

4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: barska@cellbiol.lviv.ua

Leukemia is one of the most dangerous malignancies of the blood system. Therefore, the challenge of modern science and medicine is to develop new methods of its diagnostic and therapy. Pharmacological depletion of circulating in blood arginine is a novel approach to control malignant cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. However, its efficacy against leukemic cells needs to be further monitored. Two arginine-degrading enzymes – human recombinant arginase (rhARG) and bacterial arginine deiminase (ADI) have demonstrated strong anticancer potential against some types of tumors, which is currently verified in phase II–III of clinical trials. This paper describes for the first time the impact of the recombinant human arginase (rhARG) on the viability of blast cells isolated from patients with acute

lymphoblastic leukemia (ALL) *in vitro*. Leukemia blast cells from patients with ALL and normal lymphocytes from healthy donors under the effect of rhARG were as the subject of studies. Immunophenotyping of cells was carried out in the clinic by flow cytometry using monoclonal antibodies on the unit FACScan (Becton Dickinson, USA) according to the recommendations of the manufacturer. Blood mononuclear leukocytes obtained using density gradient fikol-verohrafin (1,076-1,078 g / cm³). Under arginine deprivation we found a significant decrease in the viability of blast cells in 75 % of patients with ALL compared to control samples of these cells. Citrulline as a precursor of arginine had no significant effect on the cytotoxic potential of rhArg against primary ALL *in vitro*.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia (ALL), rhARG, arginine deprivation, leukemic cells.

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ АРГИНАЗЫ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛЕЙКОЗОМ *IN VITRO*

О.Чень¹, М.Барская^{1*}, Е.Вовк¹, И.Цимбалюк-Волошин²,
Е.Козлова², Н. Сибирная³, О.Стасык¹

Институт биологии клетки НАН Украины

ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина

Западноукраинский специализированный детский медицинский центр

ул. Днестровская, 27, Львов 79035, Украина

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

e-mail: barska@cellbiol.lviv.ua

Лейкозы являются одними из наиболее опасных злокачественных заболеваний системы крови опухолевого характера. Поэтому разработка новейших методов диагностики и терапии этой формы патологии человека – актуальная задача для современной науки и медицины. Фармакологическое истощение свободного аргинина из циркулирующей крови является новым потенциально эффективным способом борьбы с распространением злокачественных клеток *in vitro* и в естественных условиях и обнадеживающим подходом для лечения лейкозов. Два аргинин-деградирующих фермента – рекомбинантная аргиназа человека (rhARG) и бактериальная аргининдеиминаза (ADI) показали мощное противораковое действие на определенные типы опухолей в фазе II-III клинических испытаний. В данной работе впервые проведен анализ влияния препарата рекомбинантной аргиназы человека (rhARG) на жизнеспособность первично изолированных бластных клеток от пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) *in vitro*. Объектом исследования служили бластные клетки лейкоза от пациентов с ОЛЛ и нормальные лимфоциты от здоровых доноров, на которых изучали действие препарата rhARG. Иммунофенотипирование клеток проводилось в клинике методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител на аппарате FACScan (Becton Dickinson, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Мононуклеарные лейкоциты крови получали с использованием градиента плотности фикол-верографина (1,076-1,078 г / см³). В условиях голодания по аргинину нами установлено достоверное снижение жизнеспособности бластных клеток у 75 % больных ОЛЛ по сравнению с контрольными образцами этих клеток. Цитруллин в качестве прекурсора аргинина не имел существенного влияния на токсический эффект рекомбинантной аргиназы на лейкозные клетки *in vitro*.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), rhARG, голодание по аргинину, лейкозные клетки.