

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612-006.577.15

© Коллектив авторов

### ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA* ДЛЯ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ЛЕЙКЕМИЙ ЧЕЛОВЕКА И СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

**О.Ю. Абакумова<sup>1\*</sup>, О.В. Подобед<sup>1</sup>, П.А. Каралкин<sup>1</sup>,  
Л.И. Кондакова<sup>2</sup>, Н.Н. Соколов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии медицинских наук  
Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10;  
тел.: (+7/499)246-33-80; факс: (+7/499)245-08-59;

эл. почта: olabakumo@yandex.ru

<sup>2</sup>Учреждение Российской академии медицинских наук  
Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, г. Москва.

Проведено исследование дозовой и временной зависимости цитотоксической противоопухолевой активности L-аспарагиназ ECAR LANS и MEDAC (из *Erwinia carotovora* и *E. coli*, соответственно) в отношении клеток Т-клеточного острого лимобластного лейкоза человека Jurkat, Jurkat/A4 и Molt-4, хронического миелоидного лейкоза человека K-562 и промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, а также клеток солидных опухолей человека: карциномы простаты - LnCap, аденокарциномы молочной железы - MCF-7, аденокарциномы яичника - SCOV-3, карциномы яичника - CaOV, гепатокарциномы - Hep G2, фибросаркомы - HT-1080, а также клеток невриномы Гассерова узла крыс - НГУК1 и глиобластомы мышей - ЭПНТ-5. Исследована чувствительность к L-аспарагиназам опухолевых клеток, пассированных с различной плотностью, влияние L-аспарагиназ на их рост, синтез в них белка и ДНК в присутствии различных цитостатиков. Проведен цитофлуорометрический анализ клеточного цикла и определение числа клеток в состоянии апоптоза после их обработки L-аспарагиназами. Полученные результаты указывают на то, что L-аспарагиназа ECAR LANS подавляет рост клеток всех исследованных солидных опухолей. Определение количества лейкозных клеток через 24, 48 и 72 ч после обработки их аспарагиназами позволяет считать, что клетки, попавшие в условия дефицита аспарагина, не гибнут, а сразу перестают нормально делиться. Цитофлуорометрия солидных и лейкозных клеток, обработанных L-аспарагиназами, показала, что к 72-м ч практически не изменяется распределение клеток по фазам клеточного цикла и количество апоптотических клеток, исключая клетки HL-60. Увеличение количества апоптотических клеток MCF7, Jurkat и HL-60 до 60, 40 и 99%, соответственно, наблюдалось после их обработки смесью L-аспарагиназ с доксорубицином. Об отсутствии массового перехода опухолевых клеток в апоптоз под влиянием аспарагиназ свидетельствует также высокий уровень синтеза в них ДНК и белка. Индикатором отсутствия апоптоза, как главного механизма гибели опухолевых клеток после действия аспарагиназ, может служить подавление роста клеток Jurkat/A4, обладающих множественной резистентностью, у которых практически не возможно вызвать апоптоз. ECAR LANS не оказывает влияния на рост нормальных фибробластов человека, что указывает на отсутствие у нее цитотоксичности не связанной с дефицитом аспарагина.

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа, опухолевые клетки, цитотоксичность, синтез белка и ДНК, апоптоз, *Erwinia carotovora*.

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** L-аспарагиназы (L-аспарагинамидогидролазы КФ 3.5.1.1.) – ферменты класса треониновых амидогидролаз, которые преимущественно катализируют реакцию превращения L-аспарагина в L-аспартат с выделением аммиака. Известны 2 типа бактериальных L-аспарагиназ: цитоплазматическая L-аспарагиназа I типа с высоким  $K_m$  по отношению к L-аспарагину и активно расщепляющая L-глутамин, и периплазматическая L-аспарагиназа II типа с низким  $K_m$  по отношению к L-аспарагину и очень низкой активностью по отношению к L-глутамину [1, 2].

Бактериальные L-аспарагиназы на протяжении более 30 лет широко применяются в комбинированной химиотерапии острого лимфобластного лейкоза, лимфо- и ретикулосарком. В последнее время появились данные о высокой противоопухолевой активности L-аспарагиназ не только в отношении лейкозов, но и солидных опухолей [3-6].

Токсичность L-аспарагиназ обусловлена их глутаминазной активностью, поскольку снижение концентрации внеклеточного глутамина при терапии аспарагиназой вызывает тяжелое токсическое действие на клетки нормальных тканей [7]. Причем уровень дезаминирования глутамина, как правило, прямо пропорционально коррелирует с аспарагиназной активностью фермента.

В отличие от нормальных клеток в опухолевых клетках, чувствительных к действию аспарагиназы, либо отсутствует, либо имеется на очень низком уровне активность аспарагинсинтетазы, т.е. эти клетки слабо синтезируют аспарагин *de novo* и поэтому очень зависят от экзогенного поступления аспарагина для биосинтетических целей.

Известно, что L-аспарагиназа способна очень быстро “убирать” аспарагин из культуральной среды: при добавлении 0,01 МЕ/мл фермента это происходит через 4 ч, а при добавлении 1 МЕ/мл через 5 мин [8].

По другим данным [9], добавление 0,01, 0,1 или 1,0 МЕ/мл аспарагиназы к культуральной среде снижало концентрацию аспарагина на 95% через 5 мин после ее добавления. В присутствии очень низких концентраций аспарагиназы (0,001 и 0,0001 МЕ/мл) концентрация аспарагина снижалась на 95% в интервалах от 1 до 6 и от 12 до 24 часов, соответственно.

Из большого разнообразия L-аспарагиназ с известной противоопухолевой активностью самой низкой токсичностью обладают две L-аспарагиназы 2-го типа, полученные из двух видов бактерий: *E. coli* (L-аспарагиназа Medac) и *Erwinia carotovora* (L-аспарагиназа ECAR LANS) [10].

Несмотря на множество накопленных экспериментальных данных, механизмы цитотоксического противоопухолевого действия L-аспарагиназ на клеточном уровне и, в частности, механизм, при помощи которого аспарагиназа снижает синтез белка остаются неизвестными, и их изучение по-прежнему не утратило своей актуальности.

Мы провели сравнительное исследование цитотоксического противоопухолевого действия полученной в нашей лаборатории рекомбинантной периплазматической L-аспарагиназы II типа *Erwinia carotovora*, выделенной из модифицированного штамма *E. coli* L21(DE3)/pACYC\_LANS(KM), в опытах *in vitro* на культивируемых клетках различных лейкозиев человека и на клетках солидных опухолей человека и животных. В качестве препарата сравнения использовали L-аспарагиназу *E. coli* фирмы “Medac” (Германия).

Кроме сравнительного анализа дозовой и временной зависимости цитотоксической противоопухолевой активности L-аспарагиназ, без и с добавлением различных применяемых в химиотерапии опухолей цитостатиков, была исследована чувствительность к L-аспарагиназам опухолевых клеток, пассированных с различной плотностью, и синтез в них белка и ДНК. Также

был проведен цитофлуорометрический анализ клеточного цикла и измерение числа клеток в состоянии апоптоза после их обработки L-аспарагиназами.

### МЕТОДИКА.

**Культуры клеток.** Линии клеток солидных опухолей человека LnCap (карцинома простаты), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), SKOV-3 (аденокарцинома яичника), HepG2 (гепатокарцинома), HT-1080 (фибросаркома) были получены из American Type Culture Collection (США), CaOV (карцинома яичника) была получена из коллекции НИИ канцерогенеза РАМН, НГУК1 (невринома Гассерова узла крыс) и ЭПНТ-5 (глиобластома мышей) были получены из коллекции НИИ морфологии человека РАМН. Фибробласты кожи здоровых людей (ФБЧ), которые использовали в экспериментах только на 2–8 пассажах, были получены из лаборатории биотехнологии 1-го МГМУ им. И.М. Сеченова. Клетки K-562 (хронический миелоидный лейкоз человека) были получены из Онкологического центра РАМН, Jurkat и Molt-4 (Т-клеточный острый лимобластный лейкоз человека), HL-60 (промиелоцитарный лейкоз человека) – из коллекции НИИ БМХ им. В.Н. Ореховича РАМН, клон клеток Jurkat A4 – из Института Патологии РАМН.

**Культивирование клеток** производили во влажной атмосфере (5% CO<sub>2</sub> 37°C), используя среды DMEM, RPMI 1640, а также термоинактивированные эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) и лошадиную сыворотку (ЛС) (фирмы “Gibco”, США, полученные через фирму “Invitrogen”, Москва).

Клетки MCF-7, CaOV, HT-1080 и ФБЧ культивировали в среде DMEM, клетки K-562, Jurkat, клон клеток Jurkat A4, Molt-4, HL-60, НГУК1 и ЭПНТ-5 в среде RPMI 1640, клетки Hep G2, LnCap и SKOV-3, в смеси сред DMEM и RPMI 1640 (1:1). Все среды содержали 10% ЭТС, при культивировании клеток LnCap и ФБЧ в среду также добавляли 5% ЛС. Среда содержала 2 мМ глутамин, антибиотики пенициллин и стрептомицин, 10 ед/мл и 10 мкг/мл, соответственно (“Панэко”, Россия).

**Определение цитотоксической активности аспарагиназ.** Энзиматическую активность препаратов L-аспарагиназ оценивали перед каждым экспериментом методом прямой несселеризации [11]. За единицу активности L-аспарагиназы МЕ/мл принимали такое количество фермента, которое катализирует освобождение 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C.

Для определения цитотоксической противоопухолевой активности L-аспарагиназ *Erwinia carotovora* (ECAR LANS) и “Medak” клетки пассировали в 96-тилуночные планшеты в 100 мкл среды с плотностью  $2,5 \times 10^3$  клеток/лунку для MCF-7, SKOV-3, HT-1080, CaOV, ФБЧ и Hep G2 и  $5 \times 10^3$  клеток/лунку для LnCap, НГУК1, ЭПНТ-5 и клеток всех лейкозов. Клетки преинкубировали в планшетах (“Costar”, США) в течение 24 часов для их адаптации перед добавлением препаратов. ECAR LANS и “Medak” добавляли к клеткам в диапазоне концентраций 0,02–10 МЕ/мл в 4-х повторях и через 24, 48, 72, 96 или 120 ч, в зависимости от поставленной задачи, эксперимент останавливали.

Количество выживших метаболически активных клеток измеряли, используя МТТ-тест [6], который основан на том, что дегидрогеназы митохондрий только метаболически активных клеток превращают МТТ-реактив в окрашенные кристаллы формазана. После того, как к культивируемым клеткам добавляли 10 мкл 0,5%-ного раствора МТТ, их инкубировали 3 часа при 37°C. Затем кристаллы формазана растворяли в 0,1 мл DMSO при встряхивании на шейкере Titramax 101. Оптическую плотность растворов измеряли на мультискане EX (“Lab. System”, Финляндия) при длине волны 540 нм. Количество выживших клеток рассчитывали

в процентах от контроля, которым служили клетки, культивированные без добавления препаратов L-аспарагиназ.

*Синтез белка и ДНК.* При анализе совместного действия аспарагиназ с цитостатиками на синтез белка и ДНК были использованы следующие цитостатики: метотрексат (5 мкл/мл), доксорубин (0,5 мкг/мл), этопозид (20 мкг/мл) и карбоплатина (10 мкг/мл). Концентрация L-аспарагиназы ECAR LANS составляла 5,0 МЕ/мл. Эксперименты проводили на линиях лейкозных клеток человека Molt-4 и Jurkat, а также на линиях клеток солидных опухолей MCF-7 и LnCap.

При измерении величины синтеза белка к клеткам добавляли за 5 часов до окончания эксперимента 1 мКи/лунку [ $^{14}\text{C}$ ]-аминокислоты, а при измерении величины синтеза ДНК столько же [ $^{14}\text{C}$ ]-тимидина (Чехословакия, 100 мКи/ммоль и 56 мКи/ммоль, соответственно). Эксперименты проводили с использованием 96-луночных планшетов.

В конце эксперимента тщательно удаляли ростовую среду, к осадку или монослою клеток для удаления радиоактивности кислоторастворимого пула из клеток добавляли 0,1 мл фиксирующего раствора спирт :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (9:1) и оставляли на ночь при  $-10^\circ\text{C}$  [12]. Затем осадок клеток промывали ледяной средой Хенкса, к нему добавляли 50 мкл 0,3 М КОН и помещали на 10-12 ч в термостат при  $37^\circ\text{C}$ . Гидролизат нейтрализовали до pH 7,0 1,0 М раствором хлорной кислоты и его радиоактивность измеряли в сцинтилляционном счётчике Tri Carb 2800 TR "Perkin Elmer" в жидкости Брея. Результаты рассчитывали в имп/мин на  $10^6$  клеток и в процентах к контролю. Число клеток определяли в МТТ-тесте, используя данные, предварительно полученные при подсчёте числа клеток в камере Горяева и величину экстинкции в МТТ-тесте.

Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с помощью компьютерной программы Excel, определяя средние величины и стандартные отклонения. Достоверными считались различия при  $p \leq 0,05$ .

Проточно-цитофлуориметрический анализ клеточного цикла и количества апоптотических клеток после обработки опухолевых клеток L-аспарагиназами проводили по методу [13].

Опухолевые клетки ( $0,5 \times 10^6$ ) пассировали в матрасы объёмом 25 см<sup>2</sup>, содержащие 5 мл ростовой среды и культивировали в стандартных условиях. Через 24 ч в среду добавляли препараты аспарагиназ (5 МЕ/мл). Через 72 ч после этого собирали осадок клеток для анализа в цитофлуориметре после их обработки йодистым пропидием "Sigma". Для проведения проточной цитофлуориметрии использовали цитофлуориметр FACSAria I ("Becton Dickinson", США).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Как видно из рисунка 1, инкубация различных линий опухолевых клеток из солидных опухолей человека с возрастающими количествами L-аспарагиназ приводит к значительному дозо-зависимому снижению числа жизнеспособных метаболически активных клеток по сравнению с контролем. Полученные результаты указывают на то, что L-аспарагиназа ECAR LANS подавляет рост клеток всех исследованных линий солидных опухолей, при этом по эффективности действия при определённых дозах (начиная с 2 МЕ/мл) сопоставима с L-аспарагиназой "Medac". Клетки НГУК1 и ЭПНТ5 (невринома и глиобластома крыс), а также SKOV-3 и Нер G2 оказались наиболее чувствительны к цитостатическому действию аспарагиназы ECAR LANS. Значение ЛД<sub>50</sub> ECAR LANS для этих клеток составляло 5 МЕ/мл. Менее чувствительными были клетки НТ1080, MCF7 и LnCap (ЛД<sub>50</sub> = 7,5 МЕ/мл), а наименее чувствительными оказались клетки CaOV (ЛД<sub>50</sub> = 10 МЕ/мл).



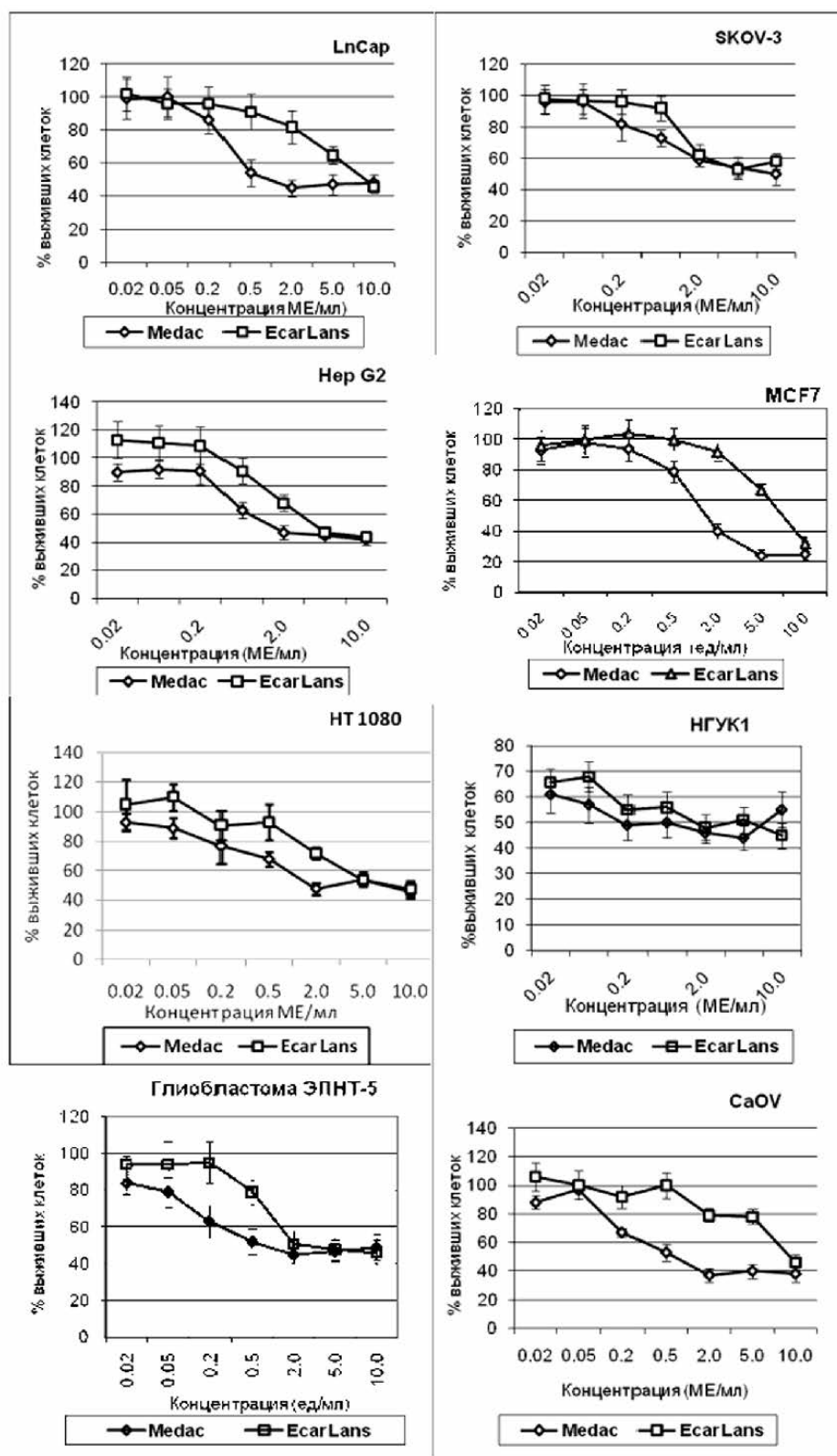


Рисунок 1.

Противоопухолевая цитотоксическая активность L-аспарагиназ ECAR LANS и "Medac" для клеток солидных опухолей человека и животных: LnCap, SKOV-3, Hep G2, MCF-7, HT-1080, НГУК1, ЭПНТ-5 и CaOV. Здесь и далее представлены средние значения и стандартные отклонения (n=4).

## ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA*

Нормальные фибробласты кожи человека (ФБЧ) были не чувствительными к действию и ECAR LANS и "Medac", их количество при различных концентрациях L-аспарагиназ составляло 102-106% к контролю. Это не противоречит данным, полученными другими исследователями при анализе действия на ФБЧ L-аспарагиназы *Helicobacter pylori* и L-аспарагиназы *E.coli* [14].

Результаты сравнительного исследования цитотоксичности и противоопухолевой активности ECAR LANS, и "Medac" на линиях клеток лейкоза человека K-562, Jurkat, HL-60 и Molt-4 представлены на рисунке 2. Исследуемые аспарагиназы были одинаково высоко активны при их добавлении к клеткам Jurkat, для аспарагиназ ECAR LANS и "Medac" значения ЛД<sub>50</sub> составили 5,0 и 1 МЕ/мл, соответственно. Для клеток Molt-4 ЛД<sub>50</sub> для обеих аспарагиназ составляло 1,0 МЕ/мл, а для клеток K-562 – 2 МЕ/мл. Слабее всего цитотоксическое противоопухолевое действие L-аспарагиназ проявилось на клетках HL-60, величина ЛД<sub>50</sub> в данном случае была больше 10 МЕ/мл.

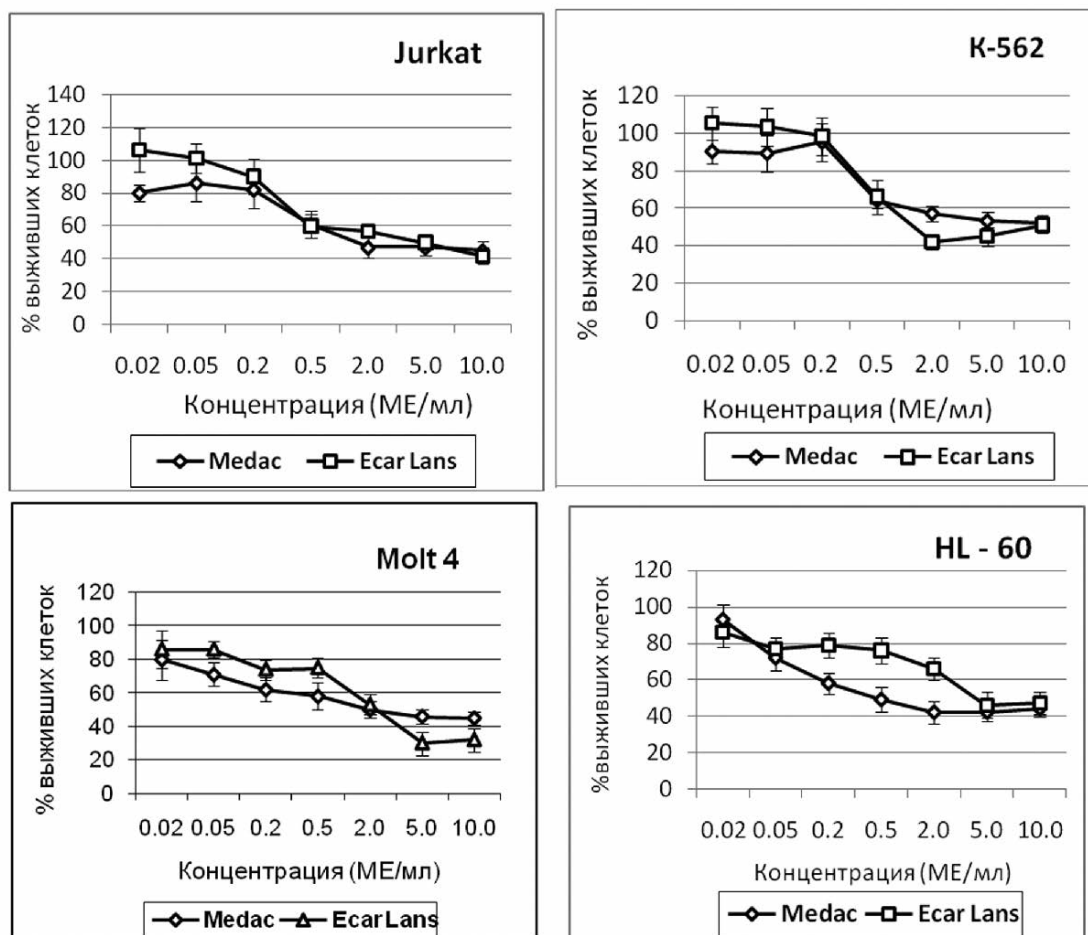


Рисунок 2.

Противоопухолевая цитотоксическая активность L-аспарагиназ ECAR LANS и "Medac" для клеток острых лейкозов человека - Jurkat и Molt-4, промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 и хронического лейкоза человека K-562.

Полученные нами экспериментальные данные о противоопухолевой цитотоксической активности L-аспарагиназ ECAR LANS и “Medac” в опытах *in vitro* вселяют определенный оптимизм, подкрепленный исследованиями Asselin B.L. и соавт. [9], которые выявили линейную корреляцию между гибелью лейкозных клеток после действия аспарагиназы в опытах *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, результаты измерения активности аспарагиназы, полученные в опытах *in vitro*, могут быть использованы для предсказания активности аспарагиназы или чувствительности к её действию *in vivo* при лечении острой лимфобластной лейкемии, и возможно солидных опухолей человека.

В то же время анализ клеточного цикла, полученный при цитофлуорометрии клеток LnCap, MCF7, а также лейкозных клеток Jurkat, Molt-4 и K-562, обработанных аспарагиназами (табл. 1) и определение количества лейкозных клеток через 24, 48 и 72 ч в опыте и в контроле (табл. 2), позволяют считать, что клетки попавшие в условия дефицита аспарагина, не гибнут, а сразу перестают нормально делиться (по сравнению с контролем). Уже начиная с 24 ч и до 72 ч эксперимента их количество не уменьшается, а даже несколько увеличивается. К 72 ч практически не изменяется распределение лейкозных клеток по фазам клеточного цикла. Такое же отсутствие гибели клеток острой лимфобластической лейкемии *in vivo* и *in vitro* в течение 4-х дней после их обработки L-аспарагиназой наблюдали Asselin B.L. и соавт. [9].

Таблица 1. Цитофлуорометрический анализ апоптоза и различных фаз клеточного цикла опухолевых клеток после их культивирования с L-аспарагиназами (5 МЕ/мл) в течение 72 ч. Окрашивание йодистым пропидием.

Группы	MCF7	LnCap	Jurkat	HL-60	Molt-4	K-562
Контроль						
Апоптоз	<b>11,0</b>	<b>6,0</b>	<b>6,6</b>	<b>57,1</b>	<b>4,05</b>	<b>8,7</b>
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	40,5	66,9	62,3	66,4	56,0	48,6
S	17,1	13,3	23,2	19,6	25,7	18,9
G <sub>2</sub> /M	42,4	19,6	14,6	13,9	18,1	19,9
L-аспарагиназа <i>E.coli</i> (Medac)						
Апоптоз	<b>12,5</b>	<b>18,0</b>	<b>5,5</b>	<b>87,5</b>	<b>5,9</b>	<b>9,1</b>
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	41,3	69,4	62,1	78,8	52,1	54,0
S	17,7	10,6	22,4	10,6	28,5	21,3
G <sub>2</sub> /M	41,3	19,9	15,5	10,6	17,9	14,5
L-аспарагиназа ECAR LANS						
Апоптоз	<b>7,1</b>	<b>10,8</b>	<b>14,0</b>	<b>83,1</b>	<b>7,7</b>	<b>10,6</b>
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	43,9	64,4	59,1	74,7	51,8	52,1
S	13,9	13,4	25,2	15,6	30,7	31,2
G <sub>2</sub> /M	42,2	22,0	15,3	10,4	17,2	16,7

Таблица 2. Количество клеток в контроле и после обработки L-аспарагиназой ECAR LANS (5 МЕ/мл), представленное в виде величины экстинкции при длине волны 540 нм во время выполнения МТТ-теста через 24, 40 и 72 часа эксперимента.

Линия лейкозных клеток	24 ч	48 ч	72 ч
К-562, контроль	0,160	0,196	0,312
К-562, опыт	0,125	0,156	0,166
Jurkat, контроль	0,328	0,881	1,0166
Jurkat, опыт	0,229	0,454	0,628
Molt-4, контроль	0,904	1,340	1,500
Molt-4, опыт	0,318	0,504	0,605
HL-60, контроль	0,230	0,595	1,110
HL-60, опыт	0,133	0,468	0,470

Как видно из таблицы 1, обработка L-аспарагиназами незначительно изменяет количество апоптотических клеток в линиях MCF7, Jurkat, Molt-4 и К-562. Аспарагиназа “Medac” несколько больше, чем ECAR LANS, увеличивает число апоптотических клеток LnCar. Только у клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, которые уже в контроле содержат почти 60% апоптотических клеток, их количество значительно возрастает после обработки L-аспарагиназами. Таким образом, в этих экспериментах мы не получили убедительных доказательств того, что апоптоз, вызываемый L-аспарагиназами у лейкозных клеток и клеток солидных опухолей, является главным процессом, ведущим к гибели этих клеток. Исключение составляют клетки HL-60.

Вероятно, это связано со сверхэкспрессией антиапоптотических белков семейства Bcl-2, наблюдаемой в лейкозных клетках и в клетках ряда солидных опухолей [15].

Увеличение количества апоптотических клеток в линиях клеток MCF7, Jurkat и HL-60 к 72-м часам эксперимента до 60, 40 и 99%, соответственно, наблюдалось только тогда, когда их обрабатывали смесью L-аспарагиназ с цитостатиком доксорубицином в концентрации 0,5 мкг/мл.

Интересно отметить, что распределение клеток солидных опухолей MCF7 и LnCar по фазам клеточного цикла  $G_0/G_1$  и  $G_2/M$  в контроле значительно различается. У клеток LnCar это распределение похоже на распределение



лейкозных клеток, а у MCF7 меньше клеток в фазе  $G_0/G_1$  и в 2 раза больше в фазе  $G_2/M$ , и оно не меняется после обработки этих линий клеток аспарагиназами.

Предположение, что в гибели опухолевых клеток после их обработки аспарагиназами основную роль играет апоптоз, не поддерживает эксперимент, проведенный нами с клоном клеток Jurkat/A4.

Известно, что на поверхности Т-лимфобластных клеток человека Jurkat присутствует проапоптотический рецептор Fas и они способны гибнуть в результате апоптоза при применении тех противоопухолевых лекарств, которые эффективно активируют программу апоптоза. Однако клетки Jurkat не способны экспрессировать белок p53 и поэтому они обладают геномом, способным к накоплению мутаций. В 2001 г. в результате Fas-опосредованной селекции был получен клон A4 клеток Jurkat не имеющий рецептора Fas и проявляющий фенотип множественной лекарственной устойчивости [16].

При исследовании действия аспарагиназ на клетки A4 мы получили такое же дозозависимое действие аспарагиназ на эти клетки, как и на клетки Jurkat (рис. 3). Поскольку в наших экспериментах аспарагиназы практически не вызывают апоптоза у опухолевых клетках, а у клеток A4 он невозможен, этот результат служит подтверждением того, что основным действием аспарагиназ является остановка синтеза тех белков, которые необходимы для деления клеток. Через 24 часа после добавления аспарагиназ при дефиците аспарагина и, возможно, глутамина в культуральной среде клетки переходят в состояние, свойственное фидерным клеткам – они сохраняют способность к синтезу каких-то белков и ДНК, но теряют способность делиться. Их количество практически не изменяется с 24 ч к 72 ч (табл. 2).

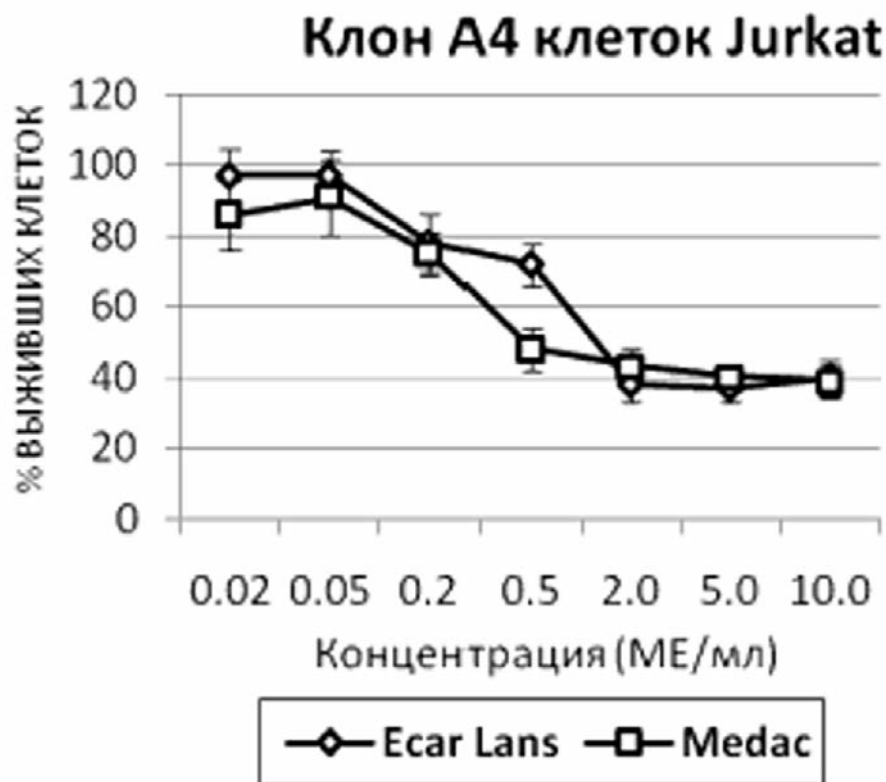


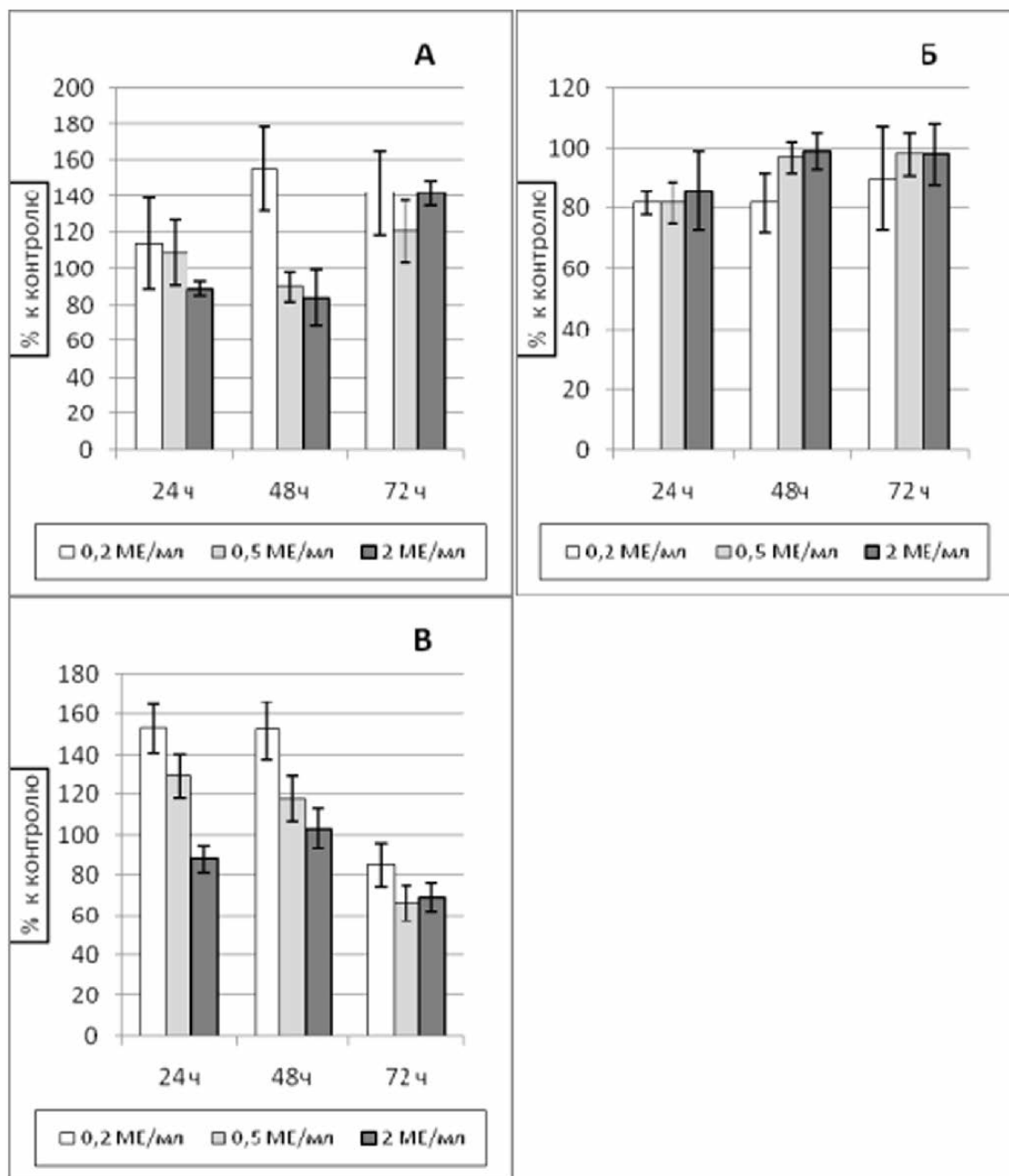
Рисунок 3.

Противоопухолевая цитотоксическая активность L-аспарагиназ ECAR LANS и "Medac" для клона A4 клеток Jurkat.

# ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA*

Далее мы решили проверить устоявшееся мнение, что после введения аспарагиназы и её гидролиза под её действием внеклеточного аспарагина останавливается аспарагин-зависимый синтез белка, что приводит затем к ингибированию синтеза ДНК и далее к снижению пролиферации лейкозных клеток [17].

Результаты исследования синтеза и секреции белка клетками Jurkat и LnCap после обработки их L-аспарагиназой ECAR LANS представлены на рисунках 4 и 5.



**Рисунок 4.**

Синтез белка в клетках Jurkat (А), рост клеток (Б) и секреция синтезированного белка в среду (В) через 24, 48 и 72 часа после добавления аспарагиназы ECAR LANS.

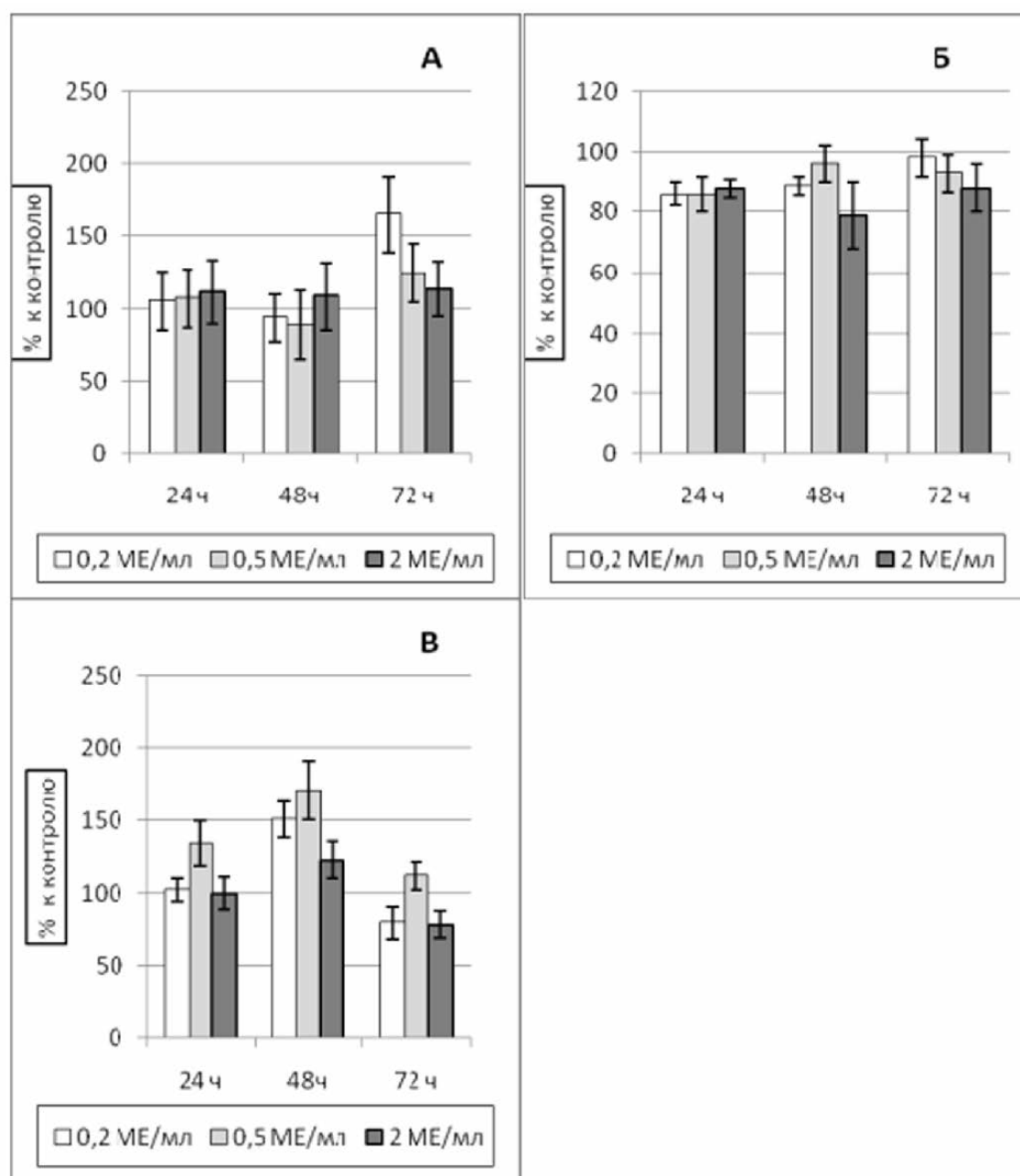


Рисунок 5.

Синтез белка в клетках LnCar (А), рост клеток (Б) и секреция белка в среду (В) через 24, 48 и 72 ч после добавления аспарагиназы ECAR LANS.

Синтез белка в клетках Jurkat незначительно снижался на 24 и 48 ч, затем повышался к 72 ч только при концентрации ECAR LANS 2 ME/мл, но оставался увеличенным при концентрациях аспарагиназы 0,5 ME/мл, и особенно при концентрации 0,2 ME/мл. При этом рост клеток, несколько сниженный на 24 ч, практически не отличался от роста контрольных клеток к 48 и 72 ч. Повышенный синтез белка клетками при концентрациях аспарагиназы 0,2 и 0,5 ME/мл сопровождался секрецией этого белка в культуральную среду, но только на 24 и 48 ч. Уровень секреции был обратно пропорционален концентрации препарата. При концентрации аспарагиназы

#### ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA*

2 МЕ/мл секрция была практически равна контрольным величинам. К 72 ч секрция белка резко снижалась, хотя синтез белка оставался высоким (рис. 4).

Синтез белка в клетках LnCar практически не снижался ниже контрольных величин через 24 и 48 ч после добавления аспарагиназы ECAR LANS, но значительно повышался к 72 ч особенно при концентрации аспарагиназы 0,2 МЕ/мл (рис. 5). Однако здесь также, как и у клеток Jurkat, увеличение синтеза белка не коррелировало с увеличением роста числа клеток. Увеличение секреции новосинтезированного белка было особенно значительным на 48 ч эксперимента. К 72 ч секрция белка клетками LnCar снижалась, как и у клеток Jurkat.

Далее мы провели сравнительный анализ совместного действия на синтез белка и ДНК в опухолевых клетках L-аспарагиназ и цитостатиков доксорубина, метотрексата, этопозиды и карбоплатина. Оптимальные концентрации последних для возможного подбора наиболее эффективных комбинаций препаратов были взяты из экспериментов, проведенных на клетках Jurkat, Molt-4, MCF7 и LnCar.

Смесь L-аспарагиназы ECAR LANS с метотрексатом уже через 24 ч эффективно снижала число выживших клеток Jurkat по сравнению с действием одной L-аспарагиназы, а к 72 ч выжившие клетки составляли уже 20% к контролю. При обработке клеток Jurkat одной L-аспарагиназой увеличение синтеза белка в них наблюдалось через 48 ч. Однако, при добавлении смеси аспарагиназы с метотрексатом синтез белка увеличивался уже с 24 ч и был особенно значительным в выживших клетках Jurkat через 48 и 72 ч (рис. 6).

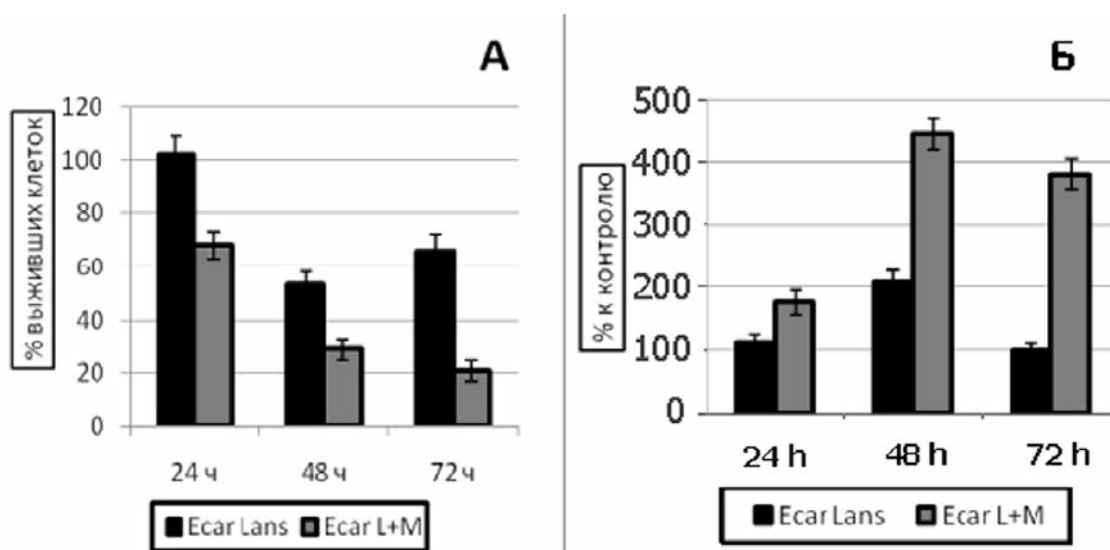


Рисунок 6.

Анализ действия L-аспарагиназы ECAR LANS (5 МЕ/мл) и добавляемого к ней цитостатика метотрексата (5 мкг/мл) на рост (А) и синтез белка (Б) клетками Jurkat через 24, 48 и 72 ч.

Также значительное увеличение синтеза белка и особенно ДНК наблюдалось и в клетках Molt-4 после добавления к ним аспарагиназы ECAR LANS с цитостатиками этопозидом и карбоплатином (рис. 7). Увеличение синтеза ДНК в этих клетках также подтверждает данные цитофлуорометрии об отсутствии апоптоза в качестве основной причины гибели опухолевых клеток после действия L-аспарагиназ.

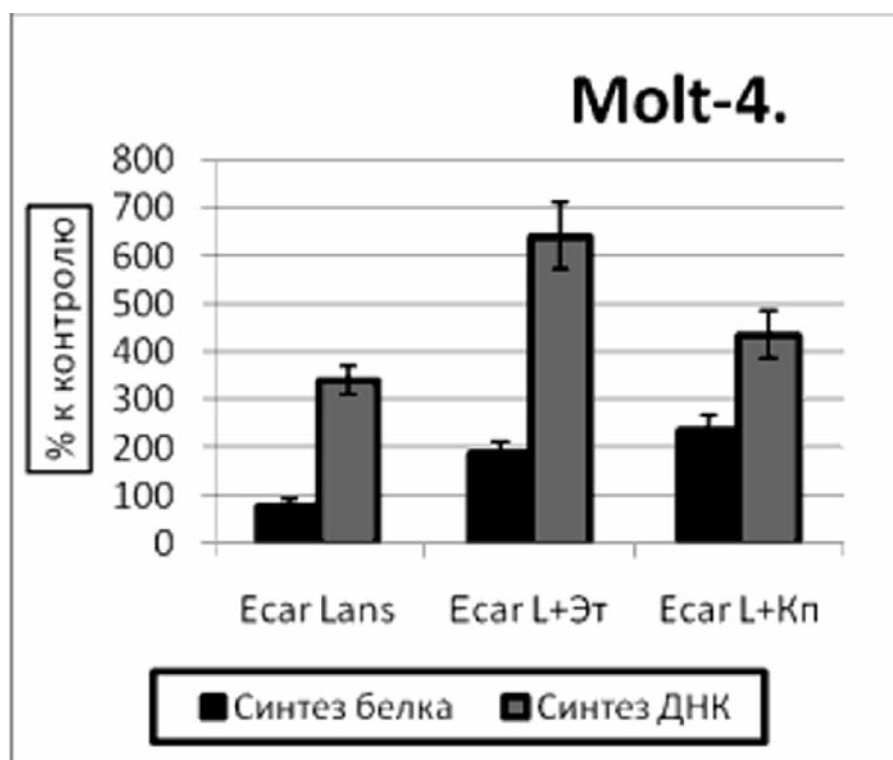


Рисунок 7.

Синтез белка и ДНК клетками Molt-4 через 72 ч после их инкубации с L-аспарагиназой ECAR LANS и цитостатиками этопозидом (Эт) и карбоплатином (Кп).

При действии смеси различных цитостатиков с аспарагиназой “Medac” на клетки MCF7 и LnCap все цитостатики, кроме карбоплатина, более значительно увеличивали синтез белка в этих клетках, чем одна аспарагиназа (рис. 8). Синтез белка был, как и в предыдущих экспериментах, был тем выше, чем меньше оставалось живых клеток.

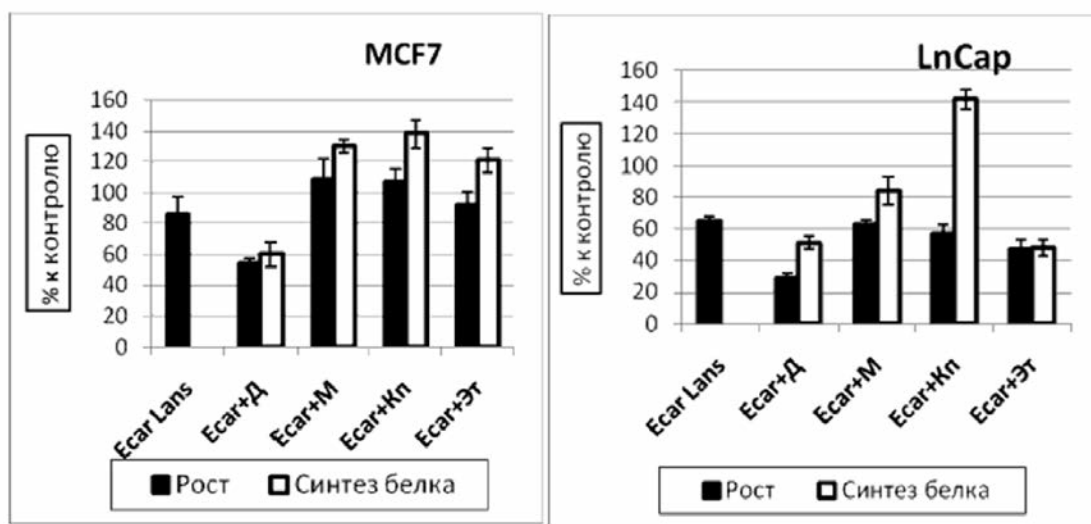


Рисунок 8.

Сравнительный анализ действия L-аспарагиназы “Medac” (5 МЕ/мл) с различными цитостатиками (метотрексатом, М; доксорубицином, Д; этопозидом, Эт; карбоплатином, Кп) на синтез белка и рост клеток MCF-7 и LnCap через 72 ч инкубации.



Остается неясным, откуда опухолевые клетки в данном случае черпают материал для синтеза белка и ДНК. При культивировании клеток в среде с низким содержанием сыворотки (0,1% ЭТС) апоптоз в этих клетках обнаруживается уже через 8 ч культивирования [18]. При предварительной синхронизации клеток перед добавлением L-аспарагиназы также резко увеличивается гибель клеток в результате апоптоза [19], скорее всего потому, что в этих случаях в опухолевых клетках не может осуществляться синтез антиапоптотических белков Bcl-2. Способность клеток синтезировать белок в наших экспериментах при их культивировании в присутствии L-аспарагиназы в полной ростовой среде, содержащей 10% ЭТС, может быть связана с тем, что здесь происходит извлечение аминокислот из белков ЭТС при их ферментативном гидролизе в ростовой среде ферментами, поступившими из лизосом погибших клеток. Для стимуляции синтеза ДНК, вероятно, достаточно ростовых факторов из ЭТС, присутствующих в среде. Поскольку состав ростовой среды для культивирования клеток похож на состав крови по содержанию белка, ростовых факторов и других метаболитов, можно предположить, что и *in vivo* лейкозные клетки и клетки солидных опухолей могут синтезировать белки и ДНК при лечении аспарагиназами.

Дефицит аспарагина, необходимого для синтеза белка в опухолевых клетках, может быть устранен за счёт повышенной экспрессии аспарагинсинтетазы после обработки клеток L-аспарагиназой [20]. В этом случае аспарагинсинтетаза может играть решающую роль в регуляции биологического поведения клетки после резкого снижения концентрации аспарагина.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Рекомбинантная L-аспарагиназа *Erwinia carotovora*, выделенная из модифицированного штамма *E. coli* L21(DE3)/pACYC\_LANS(KM), подавляет рост не только клеток различных лейкозов человека, но и солидных опухолей человека и животных. По эффективности действия она вполне сопоставима с L-аспарагиназой *E. coli* "Medac". Об отсутствии цитотоксичности L-аспарагиназы ECAR LANS, не связанной с дефицитом аспарагина, свидетельствует то, что она не оказывает влияния на рост в культуре нормальных фибробластов человека, которые обладают высокой активностью аспарагинсинтетазы. Полученные данные о достаточно высокой противоопухолевой активности L-аспарагиназы, тестированной на линиях клеток солидных опухолей, указывают на возможность её применения для терапии солидных опухолей человека. Механизм противоопухолевого действия L-аспарагиназ неизвестен. Данные, полученные нами при цитофлуорометрических исследованиях и при анализе синтеза белка и ДНК в опухолевых клетках, обработанных L-аспарагиназами ставят новые вопросы, требующие дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке грантов МНТЦ №2828 и РФФИ 06-04-49792, а также Госконтрактом № 16.740.11. 0616 с Министерством образования и науки РФ (от 31.05.2011).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Michalska K., Jaskolski M. (2006) Acta Biochim. Pol., **53**, 627- 640.
2. Sanches M., Krauchenco K., Polikarpov I. (2007) Curr. Chem. Biol., **1**, 75-86.
3. Taylor C.W., Dorr R.T., Fanta P., Hersh E.M., Salmon S.E. (2001) Cancer Chemother. Pharmacol., **47**(1), 83-88.

4. *Vieira Pinheiro J.P., Lanvers C., Boos J.* (2001) *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **48**, 421-422.
5. *Pritsa A.A., Papazisis K.T., Kortsaris A.H., Geromichalos Kyriakidis D.A.* (2001) *Anti-Cancer Drugs*, **12**, 137-142.
6. *Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А., Сидорук К.В., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Покровская М.В., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н.* (2008) *Биомед. химия*, **54**, 712-719.
7. *Oettgen H.F., Stephenson P.A., Schwartz M.R. et al.* (1970) *Cancer*, **25**, 253-278.
8. *Li B.S., Luo C.Y., He Y.Y., Jiang H., Gu L.J.* (2010) *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, **12**(7), 557-562.
9. *Asselin B.L., Ryan D., Frantz Ch.N., Bernal S.D., Leavitt P., Sallan S.E., Cohen H.J.* (1989) *Cancer Res.*, **49**, 4363-4368.
10. *Duval M., Suci S., Ferster A., Rialland X., Nelken B., Lutz P., Benoit Y., Robert A., Manel A.M., Vilmer E., Otten J., Philippe N.* (2002) *Blood*, **99**, 2734-2739.
11. *Wriston J.C., Yellin T.O.* (1973) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **39**, 185-248.
12. *Hashimoto K., Suzuki F., Sakagami H.* (2009) *Anticancer Res.*, **29**, 1303-1308.
13. *Walker P.R., Kwast-Welfeld J., Gourdeau H., Leblanc J., Neugebauer W., Sikorska M.* (1993) *Exp. Cell Res.*, **207**, 1420-1451.
14. *Cappelletti D., Chiarelli L.R., Pasquetto M.V., Stivala S., Valentini G., Scotti C.* (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**, 1222-1226.
15. *High L.M., Szymanska B., Wilczynska-Kalak U., Barber N., O'Brien N., Khaw S.L., Vikstrom I.B., Roberts A.W., Lock R.B.* (2010) *Mol. Pharmacol.*, **77**, 483-494.
16. *Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Y., Inshakov A.N., Mikhailov A.D., Kadagidze Z.G., Baryshnikov A.Y.* (2001) *Exp. Oncol.*, **23**, 174-180.
17. *Блохин Д.Ю.* (2009) *Химия и жизнь*, № 3, 20-25.
18. *Macho A., Calzado M.A., Jimenez-Reina L., Ceballos E., Leon J., Munoz E.* (1999) *Oncogene*, **18**, 7543-7551.
19. *Papageorgiou A.C., Posypanova G.A., Andersson Ch.S., Sokolov N.N., Krasotkina J.* (2008) *FEBS J.*, **275**, 4306-4316.
20. *Panosyan E.H., Grigoryan R.S., Avramis I.A., Seibel N.L., Gaynon P.S., Siewgel S.E., Avramis V.I.* (2003) *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **22**, (abstr. 3246).

Поступила: 12. 09. 2011.

ANTITUMOR ACTIVITY OF L-ASPARAGINASE FROM *ERWINIA CAROTOVORA*  
FROM AGAINST DIFFERENT LEUKEMIC AND SOLID TUMOURS CELL LINES

*O.Yu. Abakumova<sup>1</sup>, O.V. Podobed<sup>1</sup>, P.A. Karalkin<sup>1</sup>, L.I. Kondakov<sup>2</sup>, N.N. Sokolov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; tel./fax: (499)246-33-80/ 245-08-57 ; e-mail olabakumo@yandex.ru

<sup>2</sup>Research Institute of Human Morphology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

We have studied dose- and time-dependent antitumor and cytotoxic effects of *Erwinia carotovora* L-asparaginase (ECAR LANS) and *Escherichia coli* L-asparaginase (MEDAC) on human leukemic cells and human and animal solid tumor cells. We determined the sensitivity of tumor cells to L-asparaginases, as well the effect L-asparaginases on cell growth rate, protein and DNA synthesis *per se* and with addition of different cytostatics. The data obtained demonstrated that ECAR LANS L-asparaginase suppressed growth of all tested solid tumor cells. Evaluation of leukemic cell number after treatment with L-asparaginases for 24, 48 and 72 h demonstrated that asparagine deficiency did not kill cells but stopped normal cell division and had no effect on protein and DNA synthesis. Cytofluorometric study of solid and leukemic cells demonstrated that the treatment with L-asparaginase for 72 h did not change cell cycle phase distribution and did not increase the number of apoptotic cells. The HL-60 cell line was only exemption. At the same time, cells treatment with L-asparaginase and doxorubicin combination led to increase of apoptotypical cell number to 60% for MCF7 cells, to 40% for Jurkat cells and to 99% for HL-60 cells. We have excluded apoptosis as main reason for tumor cell death after asparaginase treatment because multi resistant Jurkat/A4 cells have been asparaginase sensitive. We have not found ECAR LANS L-asparaginase effect on normal human fibroblasts growth ability and we had come to conclusion that enzyme cytotoxicity related only with asparagine deficiency.

**Key words:** L-asparaginase, tumor cells, cytotoxicity, synthesis of protein and DNA, apoptosis, *Erwinia carotovora*.