

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI

Ewa Jasek

**BADANIE LEKOWRAŻLIWOŚCI KOMÓREK
BIAŁACZKOWYCH IN VITRO.**

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Jadwiga Mirecka

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Histologii CM UJ

Kierownik jednostki: prof. dr hab. med. Tadeusz Cichocki

Kraków 2005

*Składam serdeczne podziękowania Pani
prof. dr hab. Jadwidze Mireckiej za opiekę
naukową, pomoc merytoryczną
i okazywaną cierpliwość w wykonaniu
niniejszej pracy.*

*Słowa wdzięczności kieruję również do
Pana prof. dr hab. Tadeusza Cichockiego
za życzliwość i udzielenie mi wielu
cennych sugestii.*

Spis treści:

STRESZCZENIE	1
SUMMARY	3
I WSTĘP	5
1. Transformacja nowotworowa	5
1.1. Ostra białaczka szpikowa (acute myeloid leukemia, AML).....	6
2. Chemioterapia nowotworów	6
2.1. Chemioterapeutyki stosowane w leczeniu AML i mechanizm ich działania	7
2.1.1. Antymetabolity - arabinozyd cytozyny (Ara-C)	7
2.1.2. Antracykliny - daunorubicyna, mitoksantron.	8
2.1.3. Leki pochodzenia naturalnego - etopozyd.	9
2.2. Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na cytostatyki.....	9
2.3. Lekowrażliwość komórek nowotworowych w warunkach <i>in vitro</i>	11
2.3.1. Ocena wpływu cytostatyków na proliferację i żywotność komórek <i>in vitro</i> (test Alamar Blue).....	12
3. Apoptoza	12
3.1. Cechy charakterystyczne komórek apoptotycznych.	13
3.2. Szlaki prowadzące do apoptozy	14
3.3. Chemioterapia a indukcja apoptozy	15
4. Hemopoeza.....	16
4.1. Granulocytopenia i monocytopenia	18
4.2. Antygeny różnicowania.....	19
4.3. Linie komórkowe ostrej białaczki szpikowej (HL60 i NB4)	19
5. Indukcja różnicowania komórek AML <i>in vitro</i>	20
5.1. Kwas retinowy (ATRA)	21
5.2. Estry forbolu (PMA).....	22
5.3. Inne czynniki indukujące różnicowanie komórek.	23
5.4. Proces różnicowania a lekowrażliwość	24
II CEL PRACY	26
III MATERIAŁY I METODY	27

1. Hodowle komórkowe	27
2. Ocena wrażliwości komórek na cytostatyki	27
3. Ocena apoptozy	29
4. Indukcja procesu różnicowania komórek.....	30
4.1. Ocena potencjału podziałowego.	30
4.2. Morfologiczna ocena hodowli po indukcji różnicowania	31
4.3. Test redukcji NBT	31
4.4. Immunohistochemiczna ocena ekspresji antygenów powierzchniowych.	31
5. Badanie lekowrażliwości komórek indukowanych do różnicowania.....	33
6. Analiza wyników	34
IV WYNIKI	35
1. Wpływ Ara-C, daunorubicyny, mitoksantronu i etopozydu na proliferację i przeżycie komórek HL60 i NB4.....	35
1.1. Test Alamar Blue	35
1.2. Ocena apoptozy	60
2. Ocena zależności pomiędzy wskaźnikiem przeżycia a wskaźnikiem apoptozy komórek	77
3. Porównanie wrażliwości komórek obu linii w stosunku do tej samej dawki badanych leków	86
4. Ocena procesu różnicowania komórek.....	89
4.1. Ocena potencjału podziałowego (liczba komórek w 1ml)	89
4.2. Ocena morfologiczna	91
4.3. Test NBT	96
4.4. Immunofluorescencyjna ocena antygenów powierzchniowych CD11b i CD14	98
5. Lekowrażliwość komórek HL60 i NB4 po indukcji różnicowania.....	101
5.1. Efekt działania leków po preinkubacji komórek z ATRA	101
5.2. Efekt działania leków po preinkubacji komórek z PMA	105
V DYSKUSJA	109
VI WNIOSKI.....	119
VII PIŚMIENNICTWO	120

STRESZCZENIE

Badanie wrażliwości komórek nowotworowych na leki *in vitro* stanowi ważny element planowania badań klinicznych.

Celem pracy było określenie w warunkach *in vitro* wrażliwości komórek linii ostrej białaczki szpikowej HL60 i NB4 na cytostatyki (arabinozyd cytozyny, daunorubicyna, mitoksantron, etopozyd), a także zbadanie czy i w jaki sposób stymulacja procesu różnicowania komórek przy udziale ATRA (*all-trans retinoic acid*) oraz PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) wpływa na lekowrażliwość komórek.

Efekt działania leków na komórki określano cytofluorymetrycznie przy pomocy testu Alamar Blue, na podstawie którego wyznaczono wskaźniki przyrostu i przeżycia oraz przez ocenę rozmazów barwionych przy użyciu Hoechst 33342 i określenie wskaźnika apoptozy.

W pierwszej części badań zaobserwowano, że:

- komórki obu linii wykazały wrażliwość na zastosowane cytostatyki, przejawiającą się spadkiem zarówno wskaźnika proliferacji (efekt cytostatyczny), jak i wskaźnika przeżycia populacji (efekt cytotoksyczny);
- spadek przeżycia komórek wynikał z indukcji apoptozy;
- wrażliwość komórek na leki wykazywała wykładniczą zależność od dawki;
- efekt działania leków nasilał się wraz z przedłużeniem czasu inkubacji;
- najsłabsze działanie na komórki obu linii zaobserwowano w przypadku arabinozydu cytozyny, najsilniejsze – po zastosowaniu daunorubicyny;
- różnice wrażliwości obu linii nie były jednoznaczne: przy wspólnej dawce 0,8 μM nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic, natomiast przy dawkach wzrastających większy spadek przyrostu i przeżycia obserwowano generalnie dla linii NB4, czemu nie towarzyszyły jednak różnice w zachowaniu się wskaźnika apoptozy.

Różnicowanie komórek w kierunku granulocytów segmentowanych (po stymulacji ATRA) i monocytów/makrofagów (po stymulacji PMA) dowiedziono za pomocą: spadku potencjału podziałowego komórek, zmian morfologicznych, zwiększonej zdolności komórek do redukcji NBT oraz wzrostu ekspresji antygenów: CD11b i CD14.

Badanie chemiowrażliwości komórek pobudzonych do różnicowania wykazało, iż:

- wejście komórek na szlak różnicowania powoduje zmianę ich wrażliwości na leki
- stymulacja różnicowania przy udziale ATRA zwiększa wrażliwość komórek na arabinozyd cytozyny i mitoksantron, natomiast zmniejsza wrażliwość na etopozyd;
- różnicowanie przy udziale PMA obniża wrażliwość komórek na wszystkie zastosowane leki.

SUMMARY

The *in vitro* studies of cancer cells drug sensitivity are essential in planning clinical trials.

The main aim of present studies was to define the *in vitro* sensitivity of AML cell lines: HL60 and NB4 towards chemotherapeutic drugs (arabioside cytosine, daunorubicin, mitoxantrone and etoposide) as well as to investigate whether differentiation of these cells induced by ATRA (*all-trans retinoic acid*) and PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) alters their drug sensitivity.

The drug effect was examined by cytofluorimetric measurement using Alamar Blue assay leading to determination of proliferation and survival rates, as well as by evaluation of cell smears stained with Hoechst 33342 and calculation of apoptosis index.

In the first part of studies it was found that:

- both cell lines revealed varying sensitivity towards all drugs manifesting itself by the decrease of both the cell growth index (cytostatic effect) and the cell survival index (cytotoxic effect);
- the decrease of cell survival resulted from an induction of apoptosis;
- the sensitivity of cells was exponentially dependent on drug concentration;
- an effect of drug action increased with an extension of the incubation period;
- arabioside cytosine seemed to cause the weakest cytotoxic effect whereas daunorubicin - the most prominent one;
- the differences in chemosensitivity of both cell lines were not identical: there were no statistically significant differences at the same dose 0,8 μM , the greater decrease of both cell growth index and survival index was observed for NB4 cell line but it was not associated with apoptotic index.

The differentiation along the neutrophil lineage (upon stimulation with ATRA) and along the monocyte/macrophage lineage (upon stimulation with PMA) was proved by decreased proliferative potential of cells, changes in their morphology, increased ability for NBT reduction and increased expression of the cell surface markers: CD11b and CD14.

Investigation of chemosensitivity of cells stimulated to differentiation showed that:

- initiation of differentiation resulted in the change of cell drug-sensitivity;
- the differentiation along the neutrophil pathway (after stimulation with ATRA) increased cell sensitivity to arabinoside cytosine and mitoxantrone but decreased their sensitivity towards etoposide;
- the differentiation along the monocyte/macrophage pathway (induced by PMA) resulted in the decreased sensitivity of both cell lines to all drugs tested.

I WSTĘP

1. Transformacja nowotworowa.

Nowotwór jest nieprawidłowym i nadmiernym rozrostem tkanki ustroju, nieskoordynowanym z pozostałymi tkankami i nie reagującym na mechanizmy regulacyjne organizmu [1,2].

Transformacja nowotworowa zostaje zainicjowana w pojedynczej komórce w wyniku różnych zmian mutacyjnych dotyczących genów regulujących proliferację, różnicowanie i śmierć komórki. Nowotwór może powstać w wyniku mutacji aktywujących w protoonkogenach, nazywanych wtedy onkogenami i/lub dezaktywujących w genach supresorowych. Onkogeny stymulują wzrost i podziały komórki. Białka kodowane przez onkogeny wchodzą w skład systemu transmisji sygnału mitotycznego od receptora dla czynnika wzrostowego, znajdującego się w błonie komórkowej, poprzez cytoplazmę do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do aktywacji transkrypcji genów związanych z cyklem komórkowym. Białka te mogą być związane z błoną komórkową (np. Erb, Abl, Src), mogą występować w cytoplazmie (np. Raf, Mos) lub jądrze (np. c-Myc, c-Jun). Czynnościowo mogą pełnić rolę czynników wzrostu, receptorów dla odpowiednich czynników wzrostu (np. Sis, Hst), kinazy tyrozynowej (Src, Abl) i serynowo-treoninowej (Raf, Mos), czynników transkrypcyjnych (np. Myc, Jun, Fos) [2,3].

Geny supresorowe odpowiedzialne są w normalnych warunkach za skierowanie komórek na szlak różnicowania lub śmierci, a tym samym zapobiegają powstawaniu fenotypu nowotworowego. Kodowane przez nie białka mogą działać jako fosfatazy (defosforylacja aktywowanych białek), czynniki dezaktywujące Ras lub jądrowe represory transkrypcji [2].

W procesie nowotworzenia uczestniczą nie tylko protoonkogeny i geny supresorowe, ale także geny związane np. z angiogenezą, inwazyjnością, tworzeniem przerzutów. W

zależności od tego, jakie geny ulegną uszkodzeniu nowotwór może wykazywać różny poziom złośliwości [1,2,3].

1.1. Ostra białaczka szpikowa (acute myeloid leukemia, AML).

Terminem ostra białaczka szpikowa określa się grupę nowotworów złośliwych wywodzących się z prekursorowych komórek hemopoetycznych szpiku kostnego. Do rozwoju białaczki ostrej dochodzi w wyniku transformacji nowotworowej we wczesnej lub ukierunkowanej komórce hemopoetycznej szpiku, co prowadzi do niekontrolowanej proliferacji patologicznego klonu komórkowego, zahamowania dojrzewania, często z wyparciem innych linii komórkowych prawidłowego szpiku [4,5]. Zmiany chromosomalne stwierdzone w AML są specyficzne, związane z charakterystycznym fenotypem komórki białaczkowej. Większość z nich to dobrze scharakteryzowane translokacje i inwersje prowadzące do powstania genów fuzyjnych. Mutacje punktowe, delecje i amplifikacje są stosunkowo rzadkie. Przykładem zmiany cytogenetycznej, będącej przyczyną rozwoju AML, może być obecność translokacji między chromosomem 15 i 17, t(15;17) (q22;q21), co prowadzi do fuzji genów PML (*promyelocytic leukemia protein*) i RAR α (*retinoid acid receptor α*). Rearanżacja genu RAR α skutkuje zaburzeniem budowy i utratą funkcji receptora dla kwasu retinowego. W wyniku tego do stymulacji i dojrzewania komórek nie wystarcza prawidłowy poziom retinoidów, co objawia się obecnością w szpiku promielocytów zatrzymanych w dalszym różnicowaniu [4,6].

2. Chemioterapia nowotworów.

Chemioterapia jest podstawową metodą leczenia wielu nowotworów układu krwiotwórczego, w tym także ostrej białaczki szpikowej [5,7].

Leki cytostatyczne charakteryzują się różną aktywnością w stosunku do poszczególnych typów nowotworów i różnymi mechanizmami działania. Aktywność większości leków przeciwnowotworowych skierowana jest przeciwko komórkom proliferującym, znajdującym się w cyklu podziałowym. Powodzenie leczenia nowotworów wrażliwych na określony rodzaj chemioterapii, zależy od zastosowania odpowiedniej dawki cytostatyków we właściwym czasie [7].

2.1. Chemioterapeutyki stosowane w leczeniu AML i mechanizm ich działania.

2.1.1. Antymetabolity – arabinozyd cytozyny (Ara-C).

Leki cytotoksyczne zaliczane do antymetabolitów blokują specyficzne szlaki metaboliczne poprzez konkurowanie o miejsce wiązania z enzymami.

Arabinozyd cytozyny jest jednym z najbardziej efektywnych leków przeciwbiałaczkowych i wchodzi w skład większości schematów leczniczych w AML [8,9]. Jest on syntetyczną pochodną 2-alfa-hydroksycytydyny należąca do antagonistów pirymidyn. Ara-C działa szczególnie aktywnie w fazie S cyklu komórkowego, hamuje także przejście komórek z fazy G1 do S. Pod wpływem kinaz nukleotydowych Ara-C przechodzi w postać trójfosforylowaną (Ara-CTP) i staje się aktywnym metabolitem. Mechanizm działania arabinozydu cytozyny polega na kompetycyjnym hamowaniu polimeraz DNA na drodze konkurencji z ich naturalnym substratem, trifosforanem deoksycytydyny (dCTP) [8]. Również małe ilości Ara-CTP mogą być przyłączane do DNA, gdzie reszty Ara-C zachowują się jak względne zakończenia łańcucha DNA. Pozostałe sugerowane mechanizmy działania cytostatycznego leku dotyczą hamowania ligazy DNA oraz wpływu na funkcje mitochondriów [8].

2.1.2. Antracykliny – daunorubicyna, mitoksantron.

Mechanizm działania antracyklin polega na wbudowywaniu się do nici DNA, co prowadzi do jej miejscowego rozerwania i zahamowania polimerazy DNA. Wykazano, że leki te również łączą się z lipidami błony komórkowej powodując zmiany jej przepuszczalności dla jonów sodu, zmniejszenie przepływu selenu oraz wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia [10,11].

Daunorubicyna jest antybiotykiem aminoglikozydowym. Jej działanie polega przede wszystkim na hamowaniu syntezy DNA i RNA [12,13].

Mitoksantron to syntetyczny cytostatyk należący do grupy antracenodionów [10,14]. Prawdopodobny mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy kwasów nukleinowych poprzez tworzenie pęknięć w pojedynczej lub podwójnej nici DNA, wbudowywaniu się do łańcuchów DNA i oddziaływaniu z topoizomerazami typu II. Enzymy te katalizują zmiany struktury przestrzennej DNA w procesach replikacji, transkrypcji oraz rekombinacji, poprzez przecięcie i następnie przemieszczenie dwóch łańcuchów DNA [14].

Przeciwnowotworowe działanie leków związane jest również ze wzrostem poziomu wolnych rodników, co wykazano w badaniach *in vivo* oraz *in vitro* [15]. Oprócz indukcji w komórkach stresu oksydacyjnego poprzez zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu na efekt ten może wpływać upośledzenie przeciwutleniających mechanizmów obronnych komórek. Wolne rodniki tlenowe powodują między innymi oksydacyjne niszczenie błon lipidowych oraz fragmentację DNA. To ostatnie prawdopodobnie jest czynnikiem indukującym apoptozę [16].

2.1.3. Leki pochodzenia naturalnego – etopozyd.

Etopozyd jest półsyntetyczną pochodną epipodofilotoksyny. Główny mechanizm działania polega na zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G₂ i uniemożliwieniu wejścia

komórki w profazę mitozy. Wykazano, iż lek ten powoduje rozrywanie jednego lub obu łańcuchów DNA. Efekt działania etopozydu jest wynikiem zaburzenia aktywności topoizomerazy II na skutek blokowania przez lek kompleksu przecinalnego DNA-topoizomeraza. Stwierdzono, że stabilizacja tego kompleksu zachodzi poprzez przyłączenie leku do DNA w miejscu przecięcia, co uniemożliwia ligację łańcucha DNA w końcowym etapie działania topoizomerazy. W wyniku tego dochodzi do fragmentacji DNA, co może być sygnałem do apoptozy [9,17,18].

2.2. Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na cytostatyki.

Powodzenie leczenia nowotworów często zostaje ograniczone ze względu na istnienie zjawiska oporności komórek nowotworowych na stosowane cytostatyki. Wykazano, iż klony komórek opornych na leki chemioterapeutyczne obecne są od samego początku transformacji nowotworowej lub wykształcają się na drodze mutacji w czasie trwania choroby. Komórek tych przybywa poprzez selekcję w trakcie leczenia, a następnie zaczynają dominować nad komórkami wrażliwymi [19,20].

Mechanizmy powstawania oporności są różne, dotyczą jednego lub wielu cytostatyków i mogą być związane z zaburzeniami metabolizmu leku (oporność farmakologiczna), czy brakiem oddziaływania danego chemioterapeutyku na komórki będące poza cyklem podziałowym (oporność kinetyczna) [20].

Oporność wielolekowa jest mechanizmem odpowiedzialnym za brak wrażliwości komórek nowotworowych na wiele cytostatyków jednocześnie. Dotyczy to leków, które wykazują pewne podobieństwa strukturalne, takie jak niewielkie rozmiary, hydrofobowość i dwupłaszczyznowość cząsteczki oraz obecność atomów azotu w ich pierścieniach aromatycznych [19,20]. Ten rodzaj oporności wiąże się ze zwiększoną ekspresją transporterów błonowych należących do rodziny białek ABC (*ATP-binding cassette*),

będących pompami zależnymi od ATP, których zadaniem jest obrona przed cytotoksycznym działaniem związków oraz dostosowanie komórek do zmian środowiska. Zwiększona ekspresja białek ABC nasila usuwanie cytostatyków z komórek nowotworowych przez co zmniejsza się wewnątrzkomórkowa akumulacja leku, co z kolei przejawia się opornością na leczenie. Funkcje takich transporterów pełnią białka: glikoproteina P (Pgp), MRP (*multidrug resistance-associated protein*), LRP (*lung resistance-related protein*). Różnią się one sposobem usuwania leków z komórki oraz specyficznością substratów [20].

Glikoproteina P jest produktem genu MDR1 zlokalizowanym na chromosomie 7. Jej działanie polega na usuwaniu z komórki ksenobiotyków w postaci niezwiązanej [19].

MRP kodowane jest przez amplifikowany gen na chromosomie 16 i stanowi pompę błonową usuwającą leki w postaci koniugatów z glutationem [19,21].

LRP, produkt genu znajdującego się na chromosomie 16, reguluje transport substratów, w tym leków cytostatycznych. Zaobserwowano, że linie komórkowe posiadające nadmierną ekspresję LRP wykazują oporność wielolekową połączoną ze zmniejszoną jądrową akumulacją leków [22].

Inny mechanizm oporności wielolekowej związany jest z mutacjami genu kodującego topoizomerazy II. Zmiany poziomu lub aktywności enzymu hamują jego oddziaływanie z chemioterapeutykami i mogą odpowiadać za zjawisko oporności [20].

Zidentyfikowano również wiele mechanizmów detoksykacyjnych, które mogą być związane z lekoopornością. Należą do nich zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu (GTH), S-transferaz glutationu (GST), peroksydazy glutationowej i metalotioneiny. Wykazano, że oporność na antracykliny może być spowodowana nadmierną ekspresją GST [23].

Zjawisko oporności wielolekowej próbuje się ominąć stosując inne leki, inhibitory kinazy białkowej C, np. staurosporynę oraz substancje, które przywracają akumulację leku na

drodze konkurencji z cytostatykami o miejsca wiążące: blokery kanałów wapniowych, inhibitory kalmoduliny, środki immunosupresyjne, chinolony, sterydy [24].

2.3. Lekowrażliwość komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*.

Testowanie wrażliwości nowotworów na cytostatyki *in vitro* może być prowadzone na komórkach pochodzących od pacjentów lub odpowiednich liniach komórkowych.

Koniecznym warunkiem powodzenia tego rodzaju testów jest przeprowadzenie serii doświadczeń standaryzujących warunki oceny (czas inkubacji z lekiem, metody pomiaru, sposoby obliczania wrażliwości). Również warunki hodowli, takie jak gęstość komórek, mogą mieć wpływ na ich wrażliwość w stosunku do chemioterapeutyków. Wykazano, że zwiększenie gęstości komórek HL60 obniża efekt cytotoksyczny daunorubicyny i Ara-C [25].

W testach *in vitro* ważne jest również zastosowanie odpowiedniego stężenia leków. Pierwsze doświadczenia powinny określić krzywą odpowiedzi na dawkę, a rozcieńczenia powinny się różnić rzędem wielkości. W przypadku dostępności badań *in vivo* stężenie badanego leku dobiera się najczęściej na podstawie średnich stężeń we krwi występujących podczas chemioterapii [26].

2.3.1. Ocena wpływu cytostatyków na proliferację i żywotność komórek *in vitro* (test Alamar Blue).

Test Alamar Blue stanowi prostą, szybką i czułą metodę oceny proliferacji i cytotoksyczności *in vitro*. Zastosowany w teście barwnik jest związkiem stabilnym, nietoksycznym, istnieje więc możliwość stałego monitorowania proliferacji komórek w hodowli. Alamar Blue zawiera indykator oksydacyjno-redukcyjny i wykorzystuje naturalne procesy metaboliczne zachodzące w komórkach. żywe komórki powodują chemiczną redukcję medium hodowlanego zachodzącą w mitochondriach, w wyniku czego dochodzi do zmiany koloru barwnika z niebieskiego na czerwony. Stopień redukcji mierzony jest spektro- lub fluorymetrycznie. Wykazano, że intensywność mierzonej fluorescencji jest proporcjonalna do liczby żywych komórek [27-29].

3. Apoptoza.

Badania prowadzone w różnych modelach doświadczalnych wykazały, że proces śmierci komórek może przebiegać z odmienną kinetyką i według różnych mechanizmów. Nagłe zahamowanie procesów metabolicznych i rozpad komórki określa się jako śmierć martwiczą (nekrozę). Natomiast zaprogramowana, fizjologiczna śmierć określonych komórek organizmu definiowana jest jako apoptoza [30,31].

Apoptoza jest aktywnym, fizjologicznym i podlegającym regulacji rodzajem śmierci komórki, podczas którego dochodzi do wielu charakterystycznych przemian. Stanowi odpowiedź komórki na działanie wielu czynników stresogennych, w tym zwłaszcza na uszkodzenia DNA, wywołane różnymi lekami czy też promieniowaniem γ i UV. Do induktorów apoptozy zalicza się też niedotlenienie, szok termiczny, deficyt czynników wzrostowych, zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego, aktywację określonych receptorów błonowych i wiele innych [30-32].

3.1. Cechy charakterystyczne komórek apoptotycznych.

Komórka, która spontanicznie włączy program śmierci lub została do tego zmuszona, oddziela się od pozostałych komórek i obkurcza, tracąc pewną ilość wody, a na jej powierzchni pojawiają się liczne pofałdowania. Wczesnym objawem apoptozy jest pojawienie się fosfatydyloseryny w zewnętrznej blaszce lipidowej błony komórkowej [33,34]. Chromatyna ulega kondensacji, która rozpoczyna się w strefie obwodowej jądra komórkowego, bezpośrednio przylegającej do otoczki jądrowej. Cytoplazma jest zbita, z gęsto upakowanymi organellami. W dalszym etapie destrukcji apoptotycznej dochodzi do fragmentacji jądra komórkowego oraz formowania tzw. ciałek apoptotycznych, zbudowanych z fragmentów zagęszczonej chromatyny, cytozolu i błony komórkowej. Dzięki dodatkowym wiązaniom pomiędzy białkami błonowymi tworzy się nierozpuszczalna osłona stabilizująca integralność najpierw całej komórki apoptotycznej, a później ciałek apoptotycznych. Zapobiega to wydostawaniu się zawartości komórki na zewnątrz i powstawaniu odczynów zapalnych. W warunkach fizjologicznych komórki ulegające apoptozie i ich fragmenty są szybko pochłaniane i trawione przez komórki sąsiednie [30,35].

Zmiany morfologiczne swoiste dla apoptozy znalazły zastosowanie w ocenie tego typu śmierci badanej komórki lub populacji komórek. Uwidocznienie jąder komórkowych, pozwalające na ocenę ich morfologii oraz stanu kondensacji chromatyny, np. przy użyciu barwników wiążących się z DNA, umożliwia rozróżnienie pomiędzy martwiczą a apoptotyczną śmiercią badanych komórek [30].

3.2. Szlaki prowadzące do apoptozy.

Proces śmierci apoptotycznej może zostać indukowany sygnałem zewnętrznym poprzez pobudzenie tzw. receptorów śmierci dla ligandów należących do nadrodziny TNF (*tumour-necrosis factor*), np. TNF α , Fas-L, TRAIL-R1 i R2 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand-R1, R2*). Cechą receptorów śmierci jest obecność wewnątrzkomórkowej domeny zwanej domeną śmierci. W wyniku związania liganda dochodzi do oligomeryzacji receptora, a następnie do tworzenia kompleksu DISC (*death-inducing signaling complex*). Kompleks ten powstaje poprzez połączenie domen śmierci z białkami adaptorowymi oraz prokaspazą 8 lub 10. Konsekwencją tego jest aktywacja przez proteolizę prokaspazy 8, która jest bezpośrednim aktywatorem kaspazy 3. Rola kaspazy 10 nie jest do końca poznana i postuluje się, że może być istotna w komórkach, w których nie występuje kaspaza 8 [36].

Drugi szlak prowadzący do apoptozy przebiega z udziałem mitochondriów. Sygnałem do śmierci komórki jest w tym przypadku oddziaływanie z błoną mitochondrialną np. reaktywnych form tlenu. W dalszym etapie dochodzi do uwolnienia cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej. Odbywa się to za pośrednictwem specjalnych kanałów tworzonych przez proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2. Wypływ cytochromu c jest sygnałem do tworzenia kompleksu zwanego apoptosomem, w skład którego wchodzi, oprócz cytochromu c, prokaspaza 9, ATP oraz cytozolowe białko Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) [6]. Utworzenie tego kompleksu jest konieczne do autoproteolizy kaspazy 9, która jest bezpośrednim aktywatorem kaspazy 3 [36,37].

Obydwa szlaki apoptozy prowadzą do aktywacji proteaz cysteinowych zwanych kaspazami. Centralną rolę w apoptozie odgrywa kaspaza 3, będąca kaspazą egzekutorową. Efektem jej aktywacji jest proteoliza lamin jądrowych, co prowadzi do kondensacji chromatyny i obkurczenia jądra, proteoliza inhibitora DNA-zy, czego wynikiem jest

aktywacja endonukleazy, przemieszczenie jej do jądra i fragmentacja DNA na odcinki będące wielokrotnością nukleosomów [38,39].

3.3. Chemioterapia a indukcja apoptozy.

Jednym z podstawowych założeń chemioterapii jest indukcja mechanizmów apoptotycznych w komórkach docelowych [40,41]. Molekularne mechanizmy indukowanej przez cytostatyki apoptozy komórek nowotworowych, a także związanej z apoptozą wrażliwości lub oporności nowotworów na chemioterapię nie są dokładnie poznane. W pierwszej fazie działania cytostatyków dochodzi do uszkodzenia ważnych składników komórkowych, przede wszystkim DNA, co aktywuje szlaki biochemiczne prowadzące do apoptozy [41]. Wewnątrzkomórkowy mechanizm odpowiedzialny za transdukcję sygnału apoptotycznego generowanego przez cytostatyki nie jest w pełni wyjaśniony. Istotną rolę w apoptotycznej odpowiedzi nowotworu na chemioterapię, w przypadku leków uszkadzających DNA, przypisuje się białku p53. Nieprawidłowe funkcjonowanie p53, które obserwuje się w około 50% różnych nowotworów, może powodować utratę zdolności komórki do apoptozy. Jednak badania na liniach białaczkowych *in vitro*, wykazujących brak prawidłowego p53 (np. HL60, NB4, U937) wskazują, iż komórki te traktowane chemioterapeutykami mogą ulegać apoptozie [42,43].

Ważną rolę w odpowiedzi na leki cytostatyczne przypisuje się również białkom z rodziny Bcl-2 [44-46]. O efektywności tego procesu decyduje m.in. równowaga pomiędzy produktami genów Bcl-2 i Bax. Zwiększona ekspresja Bcl-2, Bcl-XL lub zaburzenia w proporcji białek pro- i antyapoptotycznych (np. niski poziom Bax – inhibitora Bcl-2) mogą niekorzystnie wpływać na indukcję apoptozy [45].

W badaniach *in vitro* wykazano, iż po zadziałaniu na komórki nowotworowe różnych cytostatyków (m.in. doksorubicyny, bleomycyny, metotreksatu, etopozydu) dochodzi do

wzrostu ekspresji genu receptora Fas, przy czym efekt ten występuje najczęściej w komórkach z nieuszkodzonym genem p53 [45]. Ale indukowana lekami apoptoza może przebiegać także bez udziału układu (Fas/Fas-L), jak np. w ostrej białaczce limfatycznej (T-ALL) czy też komórkach białaczkowych Jurkat [9,43]. Inny przykład receptorowej indukcji apoptozy zaobserwowano w komórkach HL60 przy udziale TNF- α . Prawdopodobnie czynnik ten, uwalniany do medium hodowlanego przez komórki w odpowiedzi na etopozyd, funkcjonuje jako auto- lub parakryny induktor [18,47].

Interesującym białkiem o postulowanym związku z indukcją apoptozy przez leki cytostaticzne jest czynnik transkrypcyjny NF κ B. Wykazano, iż może on stymulować lub hamować proces apoptozy w zależności od rodzaju komórek i bodźca stymulującego. W badaniach na linii HL60 stwierdzono, że leki działające poprzez hamowanie topoisomerazy II w komórkach (np. mitoksantron) aktywują NF κ B, promując jego proapoptotyczną funkcję [10].

Uszkodzenie mechanizmów prowadzących do apoptozy może przyczyniać się do oporności na chemioterapię. Dokładne poznanie szlaków apoptotycznych w komórce dla leków cytostaticznych może być podstawą konstruowania bardziej skutecznych terapii oraz indywidualnego doboru chemioterapeutyków.

4. Hemopoeza.

Hemopoeza jest procesem ciągłym, w wyniku którego powstają wyspecjalizowane krążące we krwi komórki, czyli tzw. elementy morfotyczne krwi. Czynność tych komórek określa rolę krwi w ustroju. Od sprawności, jakości, liczby i wzajemnych proporcji komórek krwi zależy czynność wszystkich tkanek i narządów [48].

Końcowymi komórkami wytwarzanymi w procesie krwiotworzenia są: erytrocyty, granulocyty obojętne-, kwaso- i zasadochłonne, limfocyty, monocyty a także płytki krwi.

Według powszechnie przyjętych obecnie poglądów wszystkie komórki układu krwiotwórczego i limfopoetycznego wywodzą się z wielopotencjalnej komórki macierzystej, która posiada jednocześnie zdolność do samoodnawiania się i tworzenia zróżnicowanego potomstwa. Macierzysta komórka krwiotwórcza w wyniku podziałów i kolejnych etapów różnicowania może odtworzyć różnorodność wszystkich typów komórkowych krwi. W kolejnych stadiach różnicowania komórek potomnych można wyróżnić populację komórek przejściowych (tzw. komórki ukierunkowane), które nie mają zdolności do samoodnawiania się, ale intensywnie proliferują, a ich losy są ograniczone do jednego kierunku różnicowania. Zdarzenia związane z dojrzewaniem, czyli ze zmianami ilościowymi w procesie różnicowania, prowadzą od komórek ukierunkowanych do prekursorowych. Wyróżnialne morfologicznie komórki prekursorowe przekształcają się w dojrzałe i niezdolne do podziału zróżnicowane komórki krwi.

Proces odnowy pozwala komórce na odtworzenie siebie samej poprzez podział na dwie jednakowe komórki potomne, identyczne z komórką matczyną pod względem morfologicznym, genetycznym, biochemicznym i funkcjonalnym.

Podczas procesu różnicowania dochodzi do stopniowej specjalizacji strukturalnej i funkcjonalnej komórek. W ciągu szeregu przemian biochemicznych, sterowanych przez układ genetyczny komórka zaczyna syntetyzować charakterystyczne białka warunkujące pełnienie przez nią określonych funkcji biologicznych. Postęp procesu różnicowania łączy się ze stopniową utratą zdolności komórki do podziałów; im komórka bardziej zróżnicowana, tym rzadziej się dzieli [48,49].

4.1. Granulocytopoeza i monocytopenia.

Macierzysta komórka ukierunkowana jest jednakowa dla linii granulocytowej i monocytowej (CFU-GM, *colony forming unit-granulocyte,macrophage*). Komórki ukierunkowane CFU-GM przekształcają się w komórki ukierunkowane linii neutrofilów (CFU-G, *colony forming unit-granulocyte*) i linii makrofagów (CFU-M, *colony forming unit-macrophage*) [48,49].

Z komórek CFU-G powstają kolejno: mieloblasty, promielocyty i mielocyty tworzące pulę komórek dzielących się. Dalszy etap rozwoju komórek szpiku linii neutrofilów, to ich dojrzewanie bez mitotycznego podziału. Do puli komórek dojrzewających i rezerwy szpikowej należą metamielocyty i neutrofile o jądrach komórkowych pałeczkowatych i segmentowanych. Prolifercja i dojrzewanie komórek szpikowych zachodzi pod wpływem czynników wzrostowych, takich jak: CSF-G (*ang. colony-stimulating factor-granulocyte*), CSF-1 (*ang. colony-stimulating factor 1*) i CSF-GM (*ang. colony-stimulating factor-granulocyte/macrophage*) [48,49].

Komórki CFU-M proliferują, różnicują się i dojrzewają przechodząc kolejno etapy: monoblastów, promonocytów i monocytów. Procesy te kończą się przejściem monocytów ze szpiku do krwi krążącej. Czynnikiem pobudzającym komórki macierzyste CFU-M jest CSF-GM (*ang. colony-stimulating factor-granulocyte/macrophage*), działający wspólnie z CSF-1 (*ang. colony-stimulating factor 1*), IL-3 [50,51].

4.2. Antygeny różnicowania.

W czasie różnicowania i dojrzewania komórek hemopoetycznych dochodzi do zmian w ekspresji genów kodujących różne antygeny powierzchniowe zwane cząsteczkami różnicującymi – CD (ang. *Cluster Differentiation*). Obserwacja ta ułatwia diagnostykę prawidłowych, a także nowotworowych komórek.

Antygen CD11b to glikoproteina o masie 160 kDa. Występuje na neutrofilach, monocytach i makrofagach. Stanowi ona α podjednostkę receptora CR3 dla składników dopełniacza, którego rola polega na ułatwianiu adhezji tych komórek do śródbłonka i udziale w mechanizmach odpornościowych [52,53].

Antygen CD14 jest integralną glikoproteiną błony komórkowej o masie 55 kDa, wykazującą wysoką ekspresję na monocytach, makrofagach i słabą na neutrofilach. Cząsteczka CD14 stanowi receptor dla składników ścian komórkowych bakterii, szczególnie dla lipopolisacharydu (LPS). Postuluje się również udział CD14 w niezapalnej fagocytozie komórek apoptotycznych [52-54].

4.3. Linie komórkowe ostrej białaczki szpikowej (HL60 i NB4).

Białaczkowe linie komórkowe stanowią doskonały model *in vitro* dla badań mechanizmów komórkowych i molekularnych dotyczących proliferacji i różnicowania prawidłowych oraz nowotworowych komórek układu hemopoetycznego.

Komórki należące do różnych linii AML wykazują specyficzne cechy morfologiczne, cytogenetyczne i immunofenotypowe w zależności od tego, na jakim etapie różnicowania i dojrzewania doszło do zatrzymania ich rozwoju.

Linia komórkowa HL60 została wyprowadzona jako pierwsza w 1976 roku z komórek białaczkowych obecnych we krwi obwodowej 36-letniej pacjentki z AML. Komórki wykazują cechy mieloblastów, z których część może dojrzewać do etapu

promielocyta. W badaniach immunofenotypowych stwierdzono obecność następujących antygenów powierzchniowych: CD13, CD15, CD33 [53,77]. Komórki HL60 wykazują specyficzne mutacje w obrębie onkogenów. Stwierdzono między innymi amplifikację genu *c-myc* i mutację punktową *N-ras*. Wykazano również obecność zmutowanego genu *p53* [53,55,56].

Linie komórkową NB4 wyprowadzono w 1991 roku z długoterminowej hodowli komórek blastycznych pochodzących ze szpiku kostnego pacjenta z ostrą białaczką promielocytową (ang. *acute promyelocytic leukemia, APL*). Komórki tej linii, zatrzymane w dojrzewaniu na etapie promielocyta, charakteryzują się obecnością translokacji *t(15;17)*, której towarzyszy produkcja białka fuzyjnego *PML/RAR α* . W ocenie immunofenotypowej obserwuje się ekspresję antygenów CD13, CD15, CD33. W komórkach NB4 stwierdzono obecność zmutowanego genu *p53* [53,56-59].

5. Indukcja różnicowania komórek AML *in vitro*.

W licznych danych eksperymentalnych wykazano istnienie wielu czynników, pozwalających na przełamanie bloku dojrzewania komórek blastycznych *in vivo* oraz *in vitro* [60-62].

5.1. Kwas retinowy (ATRA).

Kwas retinowy, endogeny produkt witaminy A, jest silnym morfogenem i regulatorem wzrostu i różnicowania komórek u płodu i w dorosłych organizmach. Wpływa też na działanie wielu hormonów i enzymów. W wątrobie powstaje z karotenu, natomiast w innych tkankach z retinolu. Występuje w komórce w co najmniej trzech postaciach izomerycznych: *all-trans* – (ATRA), *9-cis*- i *13-cis*, które mogą przechodzić wzajemnie w siebie. W cytoplazmie kwas retinowy wiąże się ze swoistymi nośnikami białkowymi: CRABPI i CRABPII (ang. *cytoplasmic retinoid acid binding protein I i II*). Jądrowe receptory kwasu retinowego, RAR i RXR, należą do nadrodziny czynników transkrypcyjnych, indukowanych przez ligandy. Występują w postaci podtypów: α , β i γ , kodowanych przez oddzielne geny. Receptory klasy RAR mają zdolność wiązania wszystkich izomerów kwasu retinowego, natomiast klasy RXR – wiążą tylko formę *9-cis*. Wykazano, że jedynie heterodimer RAR/RXR jest formą biologicznie aktywną. Interakcja z DNA stymuluje funkcję transaktywacyjną receptora, a w następstwie indukcję lub represję docelowych genów [63-65].

ATRA jest od wielu lat przedmiotem szczególnego zainteresowania, przede wszystkim w terapii antynowotworowej, ze względu na jego działanie prowadzące do zahamowania wzrostu i podziałów komórkowych oraz stymulację procesu różnicowania. Związek ten, od szeregu lat jest stosowany w leczeniu APL, jako tzw. czynnik różnicujący, a efektem jego działania są długoletnie remisje i wyleczenia [66,67]. Farmakologiczne dawki ATRA w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej z translokacją t(15;17) powodują w efekcie degradację białka fuzyjnego PML/RAR α i przywrócenie prawidłowego szlaku sygnałowego kwasu retinowego [65].

Działanie kwasu retinowego wykazano *in vitro*, zarówno w badaniach na liniach komórkowych ostrej białaczki szpikowej (m.in. HL60, NB4, THP-1), jak i na komórkach

pochodzących bezpośrednio od pacjentów. W licznych pracach wykazano, że linie komórkowe HL60 i NB4 hodowane w obecności ATRA wykazują zahamowanie wzrostu i ulegają różnicowaniu do granulocytów segmentowanych [66,68,69]. W ocenie immunofenotypu tych komórek stwierdza się zwiększenie ekspresji antygenu CD11b w miarę czasu trwania inkubacji z ATRA [68,70].

5.2. Estry forbolu (PMA).

PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) to stabilny, niespecyficzny analog 2,3-diacyloglicerolu (DAG), który aktywuje klasyczne (α , β_1 , β_2 , γ) i nowe (δ , ϵ , η , θ , μ) izoformy kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C*, PKC). W przeciwieństwie do fizjologicznego aktywatora, jakim jest 2,3-diacyloglicerol, PMA stymuluje PKC w sposób trwały. Efektem jego działania jest aktywacja białek regulujących wzrost komórki i jej różnicowanie [71-76].

Badania *in vitro* wskazują, iż PMA indukuje różnicowanie komórek linii HL60 i NB4 w kierunku monocytów/makrofagów oraz stymuluje ekspresję antygenów powierzchniowych CD11b i CD14 [77 – 80]. Podczas tego procesu dochodzi do zatrzymania komórek w fazie G₀/G₁ cyklu w wyniku aktywacji inhibitorów kinaz zależnych od cyklin p21^{WAF1} i p27^{KIP1} [81,82]. Zaobserwowano również aktywację kinazy ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) w komórkach HL60 pod wpływem PMA [83]. Związek ten indukuje także różnicowanie hemopoetycznych komórek progenitorowych CD34⁺ szpiku kostnego do komórek dendrytycznych [84,85].

Zastosowanie PMA jest jednak terapeutycznie ograniczone ze względu na pronowotworowe działanie estrów forbolu [80].

5.3. Inne czynniki indukujące różnicowanie komórek.

Fizjologicznie aktywna forma witaminy D - 1,25D₃ i jej analogi (np. 1,25(OH)₂D₃) hamują proliferację i indukują proces różnicowania prawidłowych i białaczkowych komórek szeregu mieloidalnego w kierunku monocytów/makrofagów. Działanie 1,25D₃ może zachodzić na drodze zależnej od interakcji z jądrowym receptorem witaminy D (VDR_{nuc}) lub niezależnej od tego receptora [86]. Zaobserwowano, że linie komórkowe HL60, NB4, THP-1, U937 hodowane w obecności 1,25(OH)₂D₃ wykazują cechy dojrzałych monocytów z ekspresją antygenów CD11b i CD14. W badaniach stwierdzono ponadto, że związek ten działa synergistycznie z PMA, wzmacniając indukcję różnicowania w komórkach HL60 i NB4 na drodze niezależnej od jądrowego receptora VDR_{nuc} [87].

Dimetylosulfotlenek (DMSO) to niespecyficzny czynnik stymulujący różnicowanie komórek białaczkowych *in vitro* w kierunku neutrofilów oraz indukujący ekspresję CD11b. Mechanizm działania nie jest dokładnie poznany. Wykazano, że pod wpływem DMSO dochodzi do zmiany ekspresji genów czynników transkrypcyjnych, m.in. obniżenia aktywności c-Myc, w komórkach HL60 [88].

Badania *in vitro* dowodzą, iż niektóre leki przeciwnowotworowe (m.in. Ara-C, daunorubicyna, 6-tioguanina) mogą indukować proces różnicowania linii komórkowych AML. Zjawisko to obserwuje się dla dawek leków mniejszych, niż wymagane w celu uzyskania efektu cytotoksycznego [61].

5.4. Proces różnicowania a lekowrażliwość.

Istnieją dane wskazujące na to, że poziom zróżnicowania może mieć wpływ na wrażliwość komórek w stosunku do leków cytotoksycznych. Od dawna wiadomo, że istnieje odwrotna zależność pomiędzy zaawansowaniem poziomu zróżnicowania komórek a ich potencjałem podziałowym. Komórki różnicują się najczęściej wchodząc w fazę G_0 z fazy G_1 lub rzadziej z fazy G_2 [80]. Ewentualne zachowanie się komórek zróżnicowanych w stosunku do leków cytostatycznych nie jest do końca wyjaśnione. Z jednej strony można oczekiwać, iż komórki pozostające w fazie G_0 okażą się mniej wrażliwe na efekt cytotoksyczny leku, gdyż działanie wielu obecnie stosowanych cytostatyków jest najsilniejsze w przypadku, gdy komórki znajdują się w fazie S i G_1 . Na tym opiera się pogląd, że podczas chemioterapii nowotworów eliminowane są komórki będące w cyklu podziałowym, natomiast pozostają nienaruszone komórki G_0 , które po pewnym czasie podejmują podziały i są przyczyną odnowy nowotworu. Z drugiej strony możliwe jest, iż konsekwencją procesu różnicowania będzie pojawienie się lub odtworzenie białek wewnątrzkomórkowych lub błonowych, uwrażliwiających komórki na działanie leków cytostatycznych. Przykładem może być białko p21, którego defekt w komórkach nowotworowych uniemożliwia indukcję apoptozy. Stwierdzono, że komórki HL60 traktowane różnymi czynnikami indukującymi różnicowanie (m.in. ATRA) wykazały aktywację p21 [65,70].

Rozpatrzyć należy również inne możliwe relacje pomiędzy procesem różnicowania komórek a apoptozą. Podczas indukcji różnicowania *in vitro* dochodzi do zmian w ekspresji genów kodujących zarówno białka pro- jak i antyapoptotyczne. Indukcja dojrzewania blastów pod wpływem ATRA i PMA powoduje, że komórki ulegają dalszemu różnicowaniu, a następnie mogą ginąć poprzez apoptozę [65]. Istnieją doniesienia, w których dowodzi się iż retinoidy obniżają aktywność genów kodujących inhibitory apoptozy [89,90]. Ponadto w badaniach klinicznych zaobserwowano, że zastosowanie ATRA i chemioterapii zwiększa

częstość uzyskiwania całkowitych remisji [68]. Z drugiej jednak strony istnieją doniesienia, iż proces różnicowania, na przykład pod wpływem PMA, może zmniejszyć lub zahamować zdolność do apoptozy indukowanej przez chemioterapeutyki [44,46,91,92].

II CEL PRACY

1. Porównanie w warunkach *in vitro* wrażliwości komórek linii HL60 i NB4 w stosunku do wybranych cytostatyków (arabinozyd cytozyny, daunorubicyna, mitoksantron, etopozyd).
2. Określenie czy efekt cytotoksyczny powyższych leków związany jest z indukcją apoptozy.
3. Zbadanie czy i w jaki sposób indukcja różnicowania się komórek przy udziale ATRA lub PMA wpływa na ich chemiowrażliwość.

III MATERIAŁY I METODY

1. Hodowle komórkowe.

Badania przeprowadzono na liniach komórkowych ostrej białaczki szpikowej: HL60 (ATTC CCL 240) i NB4 (DSM ACC 207). Komórki hodowano w butelkach o powierzchni 25cm² (Corning, USA), w medium RPMI 1640 (GIBCO, USA) uzupełnionym 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) (GIBCO), 2 mM L-glutaminą i gentamycyną (50 µg/ml; Sigma, Niemcy), w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO₂.

2. Ocena wrażliwości komórek na cytostatyki.

Badanie lekowrażliwości komórek białaczkowych przeprowadzono przy użyciu testu Alamar Blue (Biosource, USA).

Komórki badanych linii odwirowywano (7 minut, 400 x g), zawieszano w koncentracji 2×10^5 / ml w podłożu hodowlanym medium RPMI 1640 uzupełnionym 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), 2 mM L-glutaminą i gentamycyną i dodawano Alamar Blue (końcowe stężenie 0,2%). Tak przygotowane zawiesiny komórek nakładano do płytek 96-dołkowych (Costar, USA) w ilości 100 µl na każdy dołek. Komórki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO₂. Następnie płytki analizowano przy użyciu aparatury Microplate Fluorescence Reader FL600 (ekscytacja: 530 – 560 nm, emisja: 590 nm) celem oceny wyjściowego poziomu fluorescencji przed nałożeniem cytostatyków.

Po dokonaniu pomiaru, do hodowli w dołkach dodawano odpowiednie leki (Tab. 1).

Kontrolę stanowiły dołki, do których nie dodano cytostatyków.

Wyjściowe stężenia leków dobrano na podstawie doniesień literaturowych prezentujących średnie stężenia w surowicy leczonych nimi pacjentów oraz dawki stosowane w testach *in vitro* [9,12,14,26,43,44]. Niezależnie od tego, w eksperymentach ze wszystkimi lekami zastosowano tę samą wspólną dawkę 0,8 μM .

Tab.1. Stosowane cytostatyki.

Cytostatyki	Stosowane stężenia (μM)					Producent
	0,2	0,8	8*	24	48	
Ara-C	0,2	0,8	8*	24	48	Sigma (Niemcy)
daunorubicyna	0,008	0,08*	0,16	0,4	0,8	Sigma (Niemcy)
mitoksantron	0,01	0,04	0,2*	0,8	1,6	Sigma (Niemcy)
etopozyd	0,08	0,8*	8	16	32	Sigma (Niemcy)

* wyjściowe stężenia

Tak przygotowane hodowle prowadzono przez 24- i 48 godzin w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO₂. Po tym czasie wymieniano środowisko hodowlane. W tym celu komórki odwirowywano (7 minut, 400 x g), zawieszano w podłożu hodowlanym opisanym wyżej wraz z Alamar Blue (0,2%). Komórki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO₂, a następnie analizowano przy użyciu czytnika fluorescencji.

Dane liczbowe pomiaru poziomu fluorescencji pozwoliły na określenie i porównanie procentu przyrostu oraz procentu przeżycia komórek po 24- i 48 godzinach inkubacji z lekami według następujących wzorów:

$$\% \text{ przyrostu: } \frac{\text{poziom fluorescencji po inkubacji z lekiem}}{\text{poziom fluorescencji przed inkubacją z lekiem}} \times 100\%$$

$$\% \text{ przeżycia: } \frac{\text{poziom fluorescencji po inkubacji z lekiem}}{\text{poziom fluorescencji w kontroli*}} \times 100\%$$

*kontrola = komórki hodowane równolegle bez leków

3. Ocena apoptozy.

Obserwacji dokonywano na podstawie zmian w chromatynie jądrowej po wybarwieniu fluorescencyjnym barwnikiem Hoechst 33342 (Sigma, Niemcy). W tym celu na szkiełkach podstawowych sporządzano rozmazy z hodowli po inkubacji z lekami oraz z komórek kontrolnych. Następnie przepłukiwano w PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,4), utrwalano formaldehydem (4% roztwór w PBS) przez 15 minut w temperaturze pokojowej i płukano trzykrotnie w PBS. Na szkiełka z komórkami nakładano barwnik Hoechst 33342 (roztwór w wodzie destylowanej, 5 µg/ml) na 10 minut w temperaturze pokojowej chroniąc od światła. Następnie płukano pięciokrotnie w PBS.

Preparaty sporządzano poprzez nakropienie 20 µl roztworu gliceryna/PBS (1:2) na szkiełko podstawowe i nałożenie szkiełka nakrywkowego.

Tak wybarwione komórki oglądano w mikroskopie Olympus BX-50 z opcją epifluorescencji z użyciem filtra (MNU2) dla wzbudzenia niebieskiej fluorescencji i określano odsetek jąder apoptotycznych.

4. Indukcja procesu różnicowania komórek.

Komórki linii HL60 i NB4 hodowano w koncentracji 1×10^5 / ml w podłożu hodowlanym RPMI 1640 uzupełnionym 10% FBS, 2 mM L-glutaminą i gentamycyną w obecności 1×10^{-6} M kwasu transretinowego (ATRA) (Sigma, Niemcy) lub 1,6 nM octanu mirystynianu forbolu (PMA) (Sigma, Niemcy). Kontrolę stanowiły komórki nie indukowane do różnicowania.

Proces indukcji prowadzono przez 24-, 48- lub 72 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO₂.

Skuteczność indukcji różnicowania sprawdzano poprzez:

- ocenę proliferacji komórek (ocenę potencjału podziałowego)
- morfologiczną ocenę hodowli
- test redukcji NBT
- immunohistochemiczną ocenę ekspresji antygenów powierzchniowych

4.1. Ocena potencjału podziałowego.

W każdym punkcie czasowym eksperymentu liczone komórki w komorze Bürkera porównując gęstość komórek po stymulacji z hodowlami kontrolnymi.

4.2. Morfologiczna ocena hodowli po indukcji różnicowania.

Po upływie wymaganego czasu inkubacji z ATRA/PMA hodowle oglądano w mikroskopie odwróconym Nikon TMS oraz barwiono komórki metodą May – Grünwalda – Giemsy. W tym celu z każdego rodzaju hodowli sporządzano rozmazy komórkowe. Następnie na preparaty nakrapiano roztwór May – Grünwalda (Merk, Niemcy), barwiono przez 2 minuty i płukano wodą destylowaną. W kolejnym etapie nakrapiano odczynnik Giemsy (0,4% roztwór w metanolu, Sigma, Niemcy) i barwiono przez 10 minut. Następnie preparaty dokładnie wypłukano wodą destylowaną i wysuszono. Morfologię komórek oceniano w mikroskopie świetlnym pod immersją.

4.3. Test redukcji NBT.

Komórki kontrolne (nie indukowane do różnicowania) oraz komórki po 24-, 48- i 72 godzinach indukcji z ATRA/PMA w ilości $0,5 \times 10^6$ dwukrotnie płukano w medium RPMI 1640, następnie zawieszano w 2ml tego medium zawierającym 0,1% NBT (*nitroblue tetrazolium salt*, Sigma, Niemcy) i 100 ng/ml PMA i inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C. W dalszym etapie komórki płukano trzykrotnie w 3 ml PBS poprzez wirowanie (7 minut, 400 x g), zawieszano w 100 µl PBS, nakładano na szkiełko podstawowe przykrywając szkiełkiem nakrywkowym. Komórki oglądano w mikroskopie świetlnym i określano odsetek komórek z ciemnoniebieskimi złogami.

4.4. Immunohistochemiczna ocena ekspresji antygenów powierzchniowych.

Komórki kontrolne i hodowane w obecności ATRA/PMA po upływie 24-, 48- i 72 godzin zawieszano w koncentracji $0,5 \times 10^6$ / ml w 0,5 ml medium RPMI 1640 z 10% FBS, 2 mM L-glutaminą i gentamycyną, nakładano na szkiełka podstawowe pokryte 0,1% roztworem poli-L-lizyny (Sigma, USA) zabezpieczającym przed odrywaniem się komórek i inkubowano

przez 1,5 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO₂ celem zwiększenia adherencji komórek. Następnie ściągano płyn znad komórek, przepłukiwano ciepłym (37°C) PBS i utrwalano w roztworze metanol-aceton (1:1) (ochłodzonym uprzednio w temperaturze -20°C) przez 10 minut w temperaturze 4°C. Po trzykrotnym wypłukaniu w PBS nakładano 100 µl PAD (*primary antibody dilutor*: 10% nieimmunogenna surowica kozia, 0,1% albumina surowicy wołowej, 0,05% thimerosal, 0,01% NaN₃; wszystkie składniki z Sigma, USA) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w celu zmniejszenia niespecyficznego wiązania przeciwciał. W kolejnym etapie na preparaty nakrapiano 100 µl roztworu pierwszorzędowych mysich monoklonalnych przeciwciał (Novocastra, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1:100 w PAD) skierowanych przeciwko antygenom: CD11b (preparaty sporządzone z komórek hodowanych w obecności ATRA oraz PMA) i CD14 (preparaty przygotowane z komórek hodowanych w obecności PMA), a następnie inkubowano przez 18 godzin w komorze wilgotnej, w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu w PBS nakładano roztwór drugorzędowej koziej surowicy przeciw immunoglobulinom mysim, sprzężonej z fluorochromem Cy3 (Jackson IR, USA; rozcieńczenie 1:400 w PAD) i inkubowano przez 1 godzinę w komorze wilgotnej, w temperaturze pokojowej. Preparaty wypłukano w PBS i zamknięto w roztworze gliceryna-PBS (2:1).

Dla wszystkich inkubacji wykonano reakcje kontrolne z pominięciem pierwszorzędowych i drugorzędowych przeciwciał, które zastąpiono PAD.

Preparaty oglądano w mikroskopie Olympus BX-50 z opcją epifluorescencji z użyciem filtru (U-MNG) i oceniano odsetek komórek wykazujących czerwoną fluorescencję.

5. Badanie lekowrażliwości komórek indukowanych do różnicowania.

Lekowrażliwość komórek obu linii stymulowanych do różnicowania badano stosując 24-godzinne hodowle z lekami po przedłużonym działaniu czynnika różnicującego:

24-, 48- i 72 godziny dla ATRA oraz 24- i 48 godzin dla PMA. Hodowlę 72-godzinną z PMA pominięto w tej części eksperymentu ze względu na znaczny spadek liczby komórek i stwierdzenie w hodowli oznak apoptozy.

Komórki preinkubowane z ATRA/PMA oraz komórki hodowane przez odpowiedni okres czasu bez czynnika stymulującego odwirowywano dwukrotnie (7 minut, 400 x g), zawieszano w koncentracji 2×10^5 / ml w medium RPMI 1640 uzupełnionym 10% FBS, L-glutaminą i gentamycyną i dodawano Alamar Blue (0,2%). Tak przygotowane zawiesiny komórek nakładano do płytek 96-dołkowych (Sigma, Niemcy) po 100 ul na każdy dołek. Komórki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO₂, a następnie analizowano przy użyciu czytnika fluorescencji. Po dokonaniu pomiaru do odpowiednich dołków dodawano cytostatyki, których stężenia odpowiadały wyznaczonej uprzednio dawce powodującej około 50% redukcję przeżycia komórek (Tab. 2). Kontrolę stanowiły dołki, do których nie dodano leków.

Tab.2. Stężenia leków powodujące 50% redukcję przeżycia komórek po 24 godzinach hodowli.

Leki	Stosowane stężenie (μM)
Arabinozyd cytozyny	48
Daunorubicyna	0,16
Mitoksantron	0,8
Etopozyd	16

Hodowle w obecności leków prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO₂, a dalej postępowano w sposób opisany na str. 28. Na podstawie danych liczbowych pomiaru fluorescencji uzyskanych z czytnika oceniano i porównywano % przyrostu i % przeżycia komórek w zależności od czasu trwania uprzedniej stymulacji z ATRA/PMA (24-, 48- i 72 godziny).

Komórki preinkubowane z ATRA/PMA przez 24-, 48- i 72 godziny i hodowane w obecności cytotatyków (24 godziny) wybarwiano również odczynnikiem Hoechst 33342 zgodnie z wcześniej opisaną procedurą, po czym określano i porównywano odsetek jąder apoptotycznych w zależności od czasu trwania stymulacji ATRA/PMA.

6. Analiza wyników.

Wartości uzyskanych wyników (z pięciu eksperymentów) przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm błąd standardowy średniej (\pm SD). Do przeprowadzenia analizy statystycznej wykorzystano: jednoczynnikową analizę wariancji (porównanie wskaźników przyrostu, przeżycia i apoptozy komórek traktowanych lekami, ocena potencjału podziałowego komórek po indukcji różnicowania, ocena redukcji NBT oraz ekspresji antygenów CD11b i CD14), dwuczynnikową analizę wariancji z wyznaczeniem współczynnika determinacji R^2 (porównanie wskaźników przyrostu, przeżycia i apoptozy w zależności od dawki i czasu trwania hodowli z lekiem) oraz analizę regresji z wyznaczeniem współczynnika korelacji r (zależność pomiędzy przeżyciem i apoptozą komórek). Za poziom istotności przyjęto wartości $p < 0,05$.

Wyniki analizy statystycznej zilustrowano odpowiednimi wykresami.

IV WYNIKI

1. Wpływ Ara-C, daunorubicyny, mitoksantronu i etopozydu na proliferację i przeżycie komórek HL60 i NB4.

1.1. Test Alamar Blue.

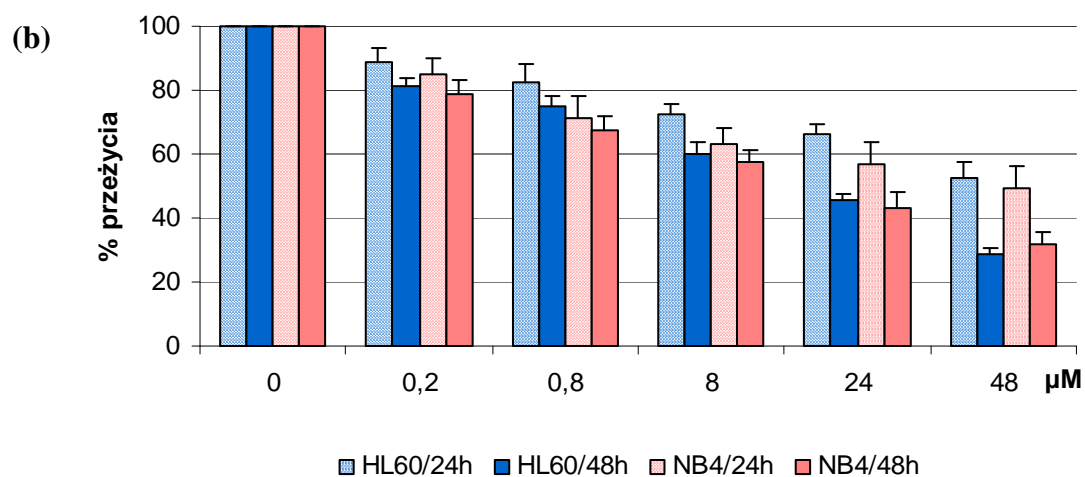
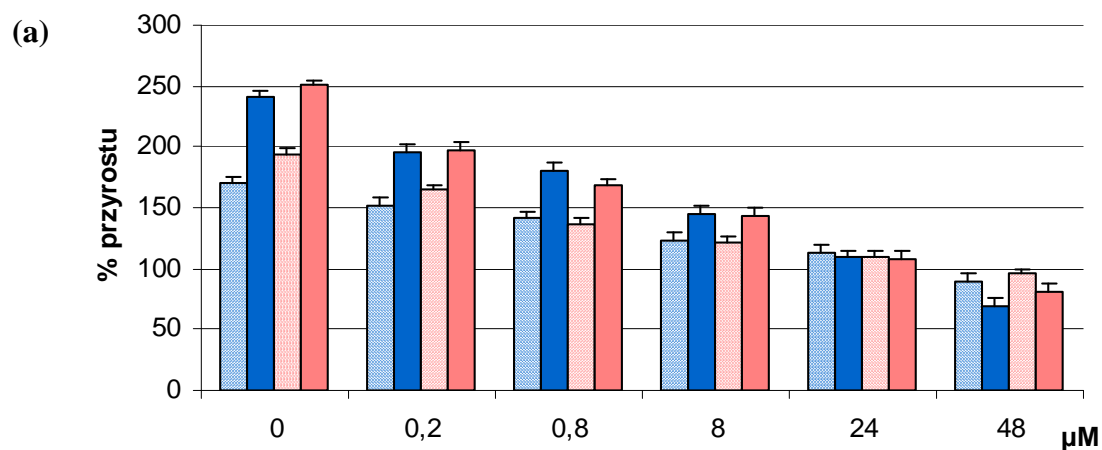
Komórki obu linii wykazały wrażliwość na zastosowane dawki cytostatyków, przejawiającą się spadkiem wskaźnika przyrostu (efektem cytostatycznym) jak i przeżycia populacji (efektem cytotoksycznym).

Arabinozyd cytozynny.

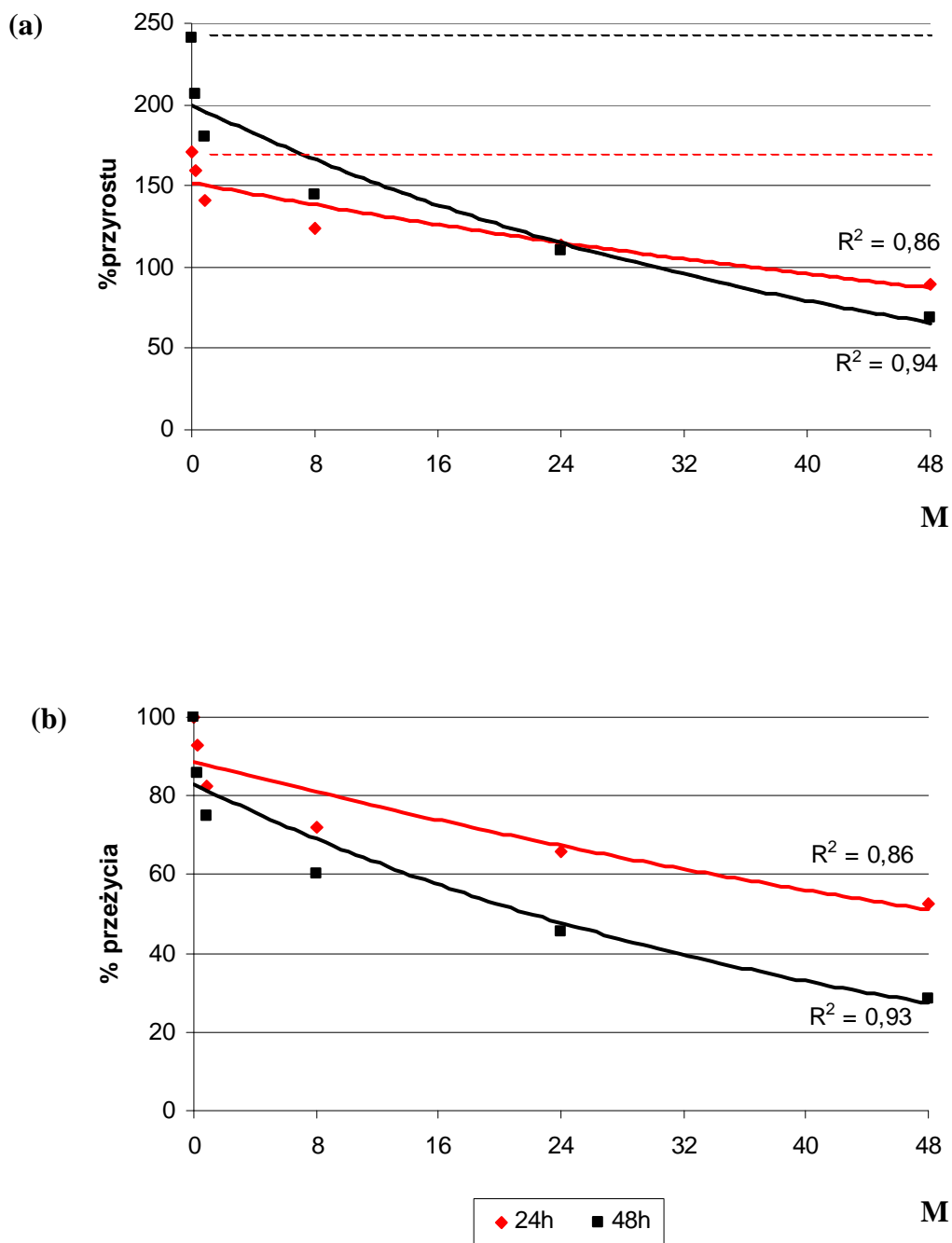
Zaobserwowano znaczny spadek proliferacji komórek po 24- i 48 godzinach hodowli z Ara-C (Ryc. 1a) W przypadku obu linii komórkowych stwierdzono istotną statystycznie ($p < 0,05$) wykładniczą zależność spadku poziomu przyrostu komórek od dawki leku. Czas inkubacji z Ara-C wpływał istotnie ($p < 0,01$) na spadek wskaźników przyrostu obu linii komórkowych (w stosunku do poziomu przyrostu kontroli) (Ryc. 2a i 3a). Stwierdzono znamienne statystycznie ($p < 0,05$) różnice w spadku wartości tego wskaźnika pomiędzy linią HL60 i NB4 po 24 godzinach trwania hodowli z lekiem, przy czym silniejsze działanie cytostatyczne zaobserwowano dla linii NB4. Powyższych różnic nie stwierdzono po 48-godzinach hodowli z Ara-C (Ryc. 4a i 4b).

W przypadku obu linii zaobserwowano obniżenie wartości wskaźnika przeżycia po 24- i 48 godzinach hodowli z Ara-C oraz stwierdzono istotną ($p < 0,01$) wykładniczą zależność spadku tego wskaźnika od stężenia leku (Ryc. 3b i 4b). Dla stężenia $48 \mu\text{M}$ zaobserwowano około 50% spadek przeżycia komórek obu linii po 24-godzinnej hodowli

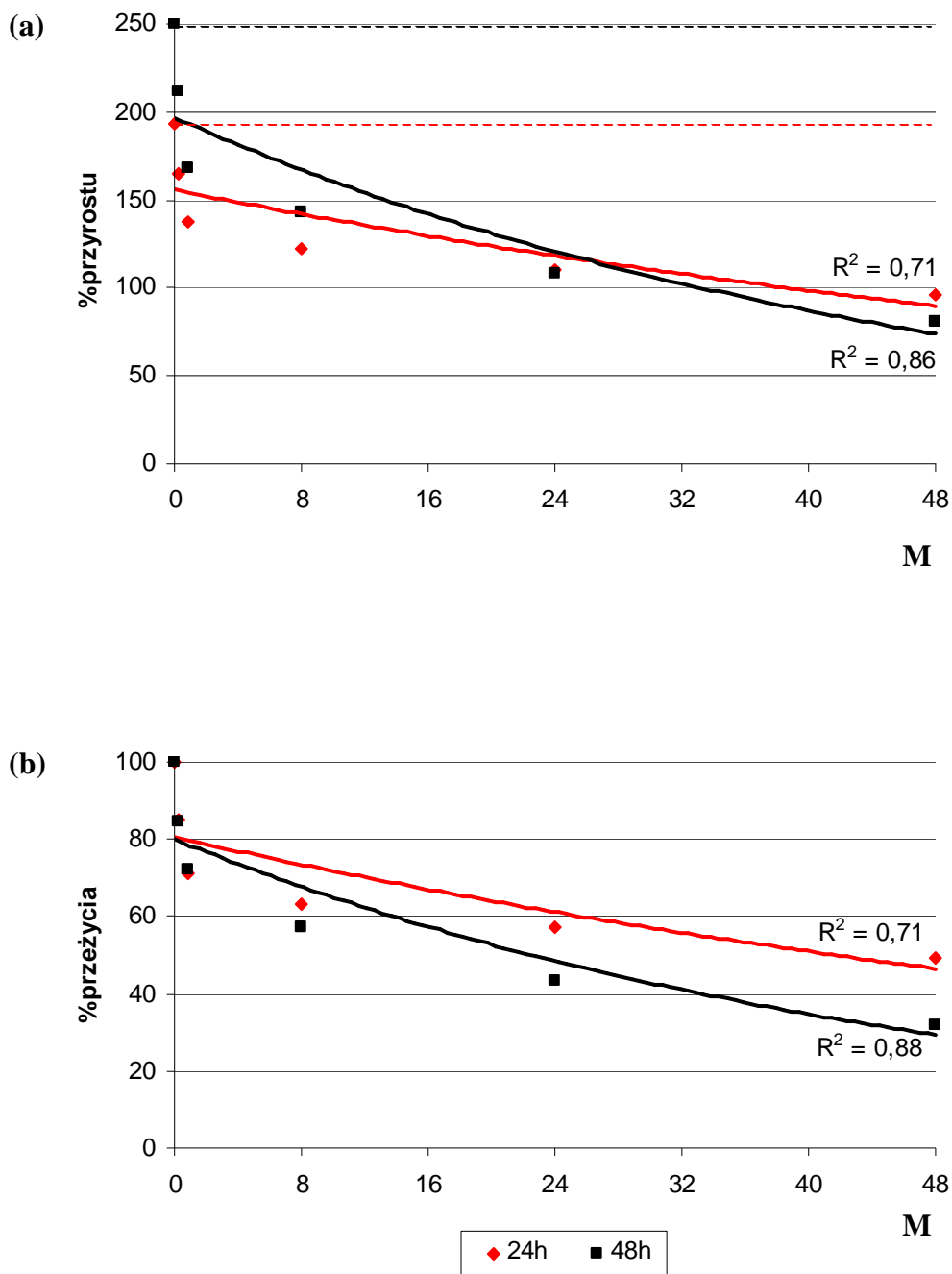
(Ryc. 1b). Czas trwania hodowli z Ara-C miał znamienne ($p < 0,05$) wpływ na obniżenie wartości % przeżycia dla obu linii (Ryc. 3b i 4b). W stosunku do tego wskaźnika wykazano również istotne ($p < 0,05$) różnice pomiędzy liniami komórkowymi tylko po 24 godzinach hodowli z lekiem z tym jednak, że efekt cytotoksyczny był silniejszy w stosunku do linii NB4 (Ryc. 5a i 5b).



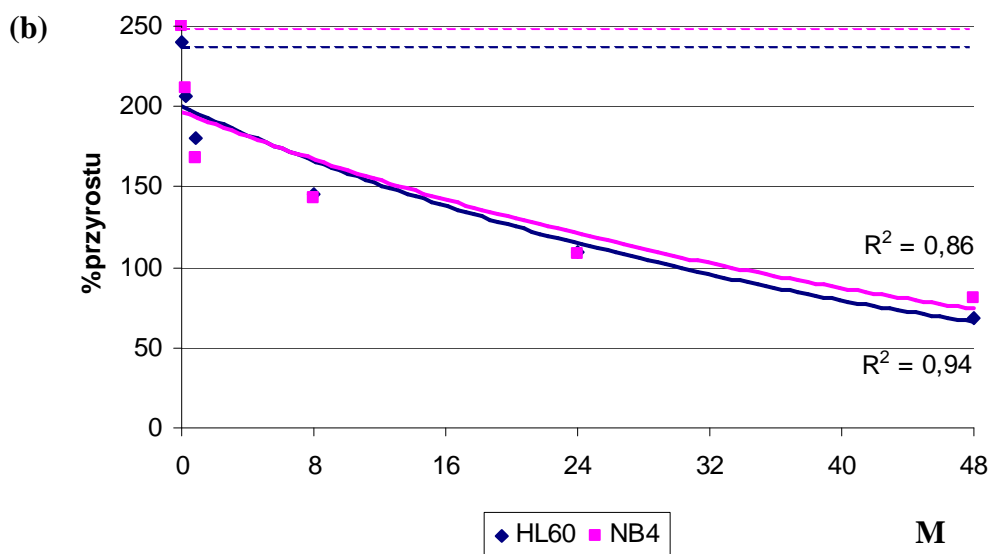
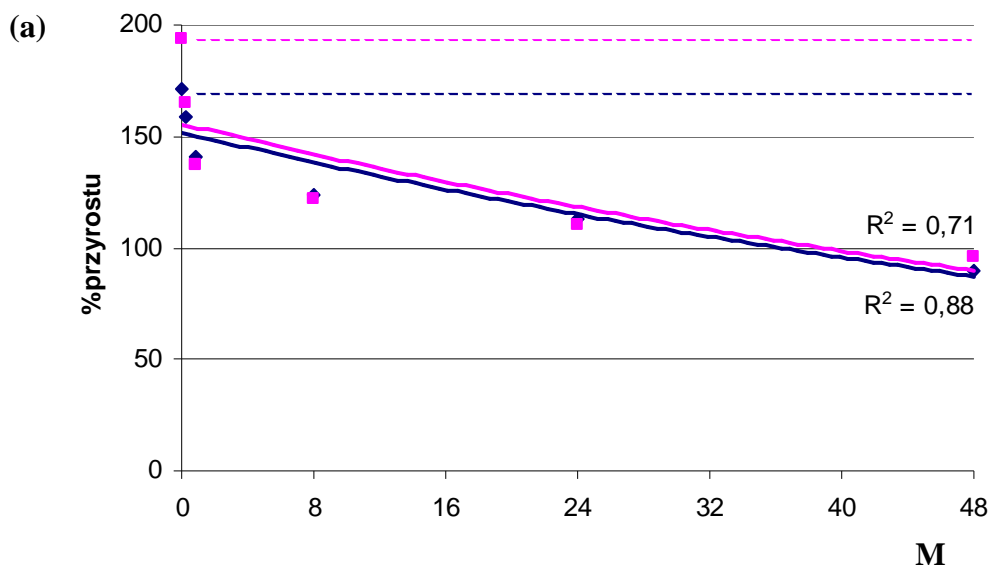
Ryc. 1. Porównanie wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z arabinozydem cytozyny.



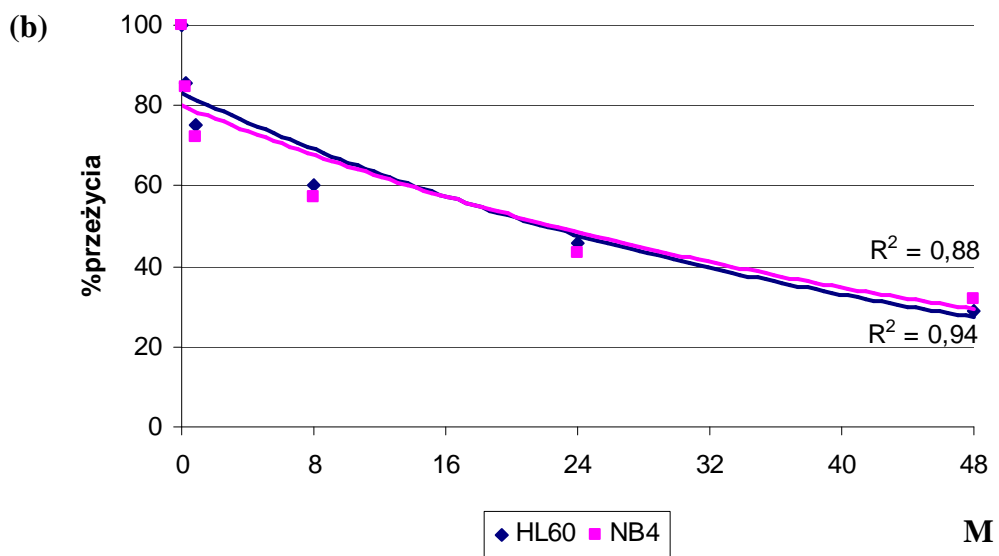
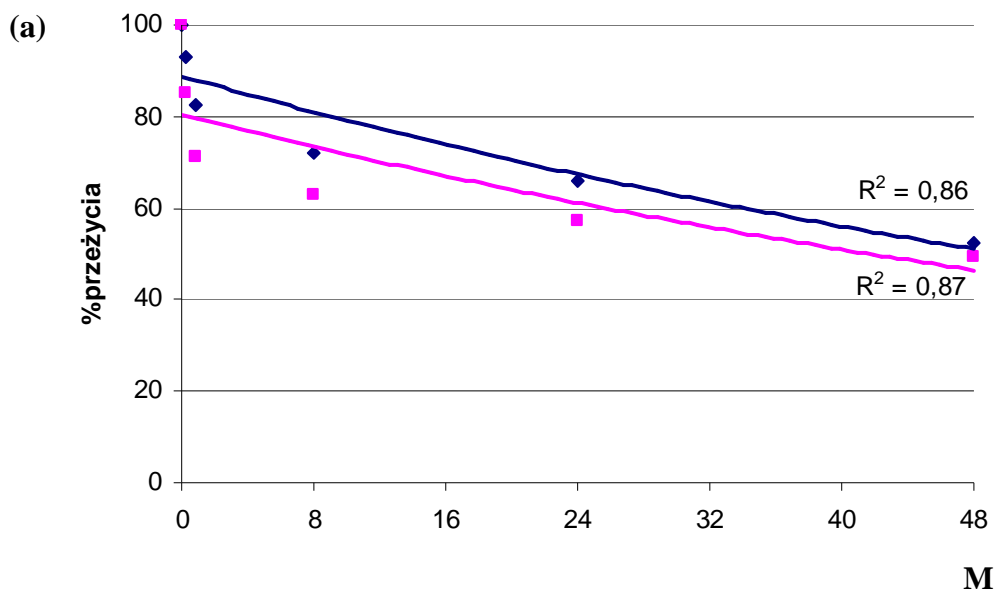
Ryc. 2. Zależność wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek linii HL60 od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z arabinozydem cytozyny (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).



Ryc. 3. Zależność wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek linii NB4 od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z **arabinozydem cytozyny** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).



Ryc. 4. Porównanie wskaźników przyrostu komórek linii **HL60** i **NB4** po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **arabinozydem cytozyny** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).

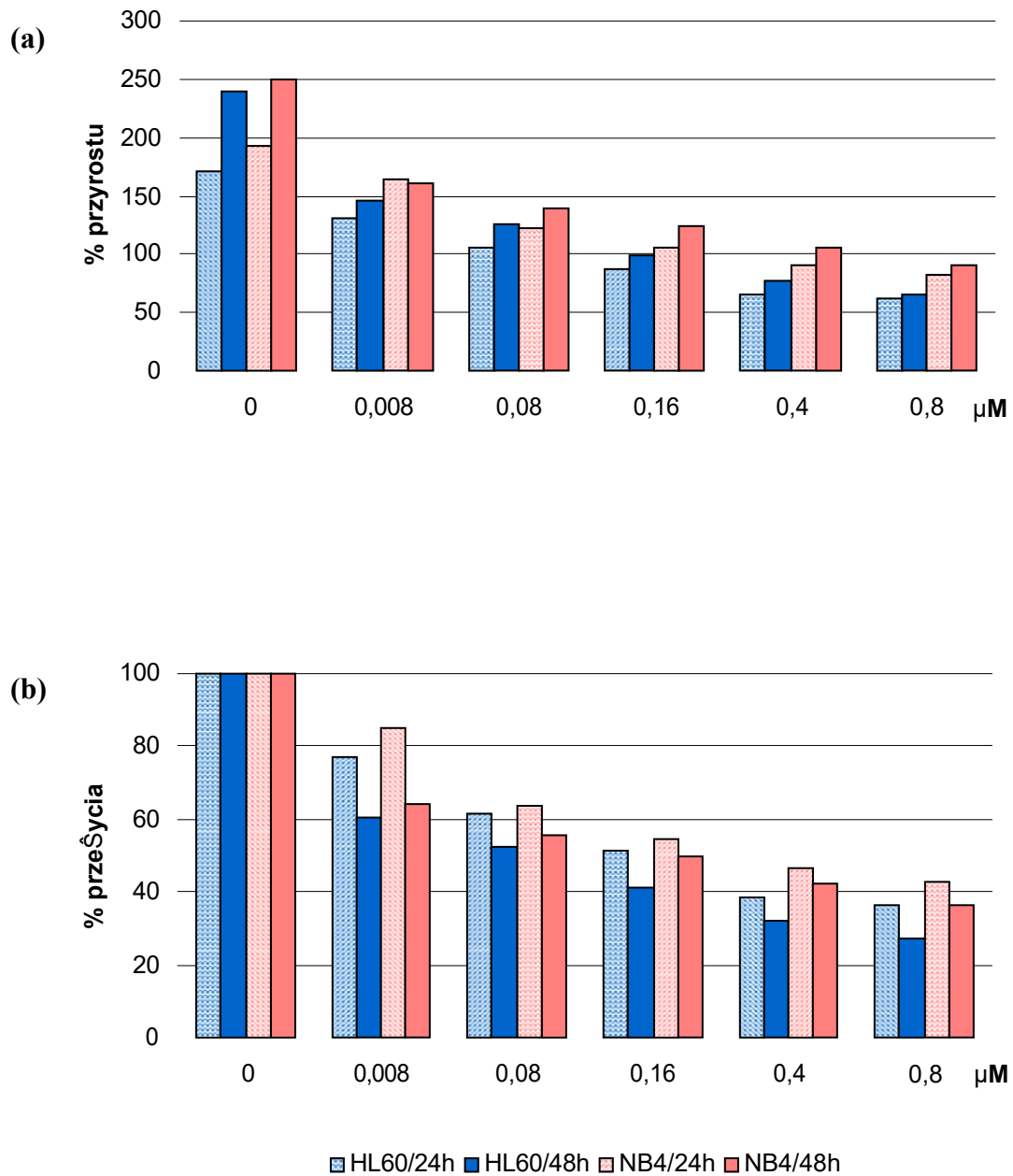


Ryc. 5. Porównanie wskaźników przeżycia komórek linii HL60 i NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z arabinozydem cytozyny.

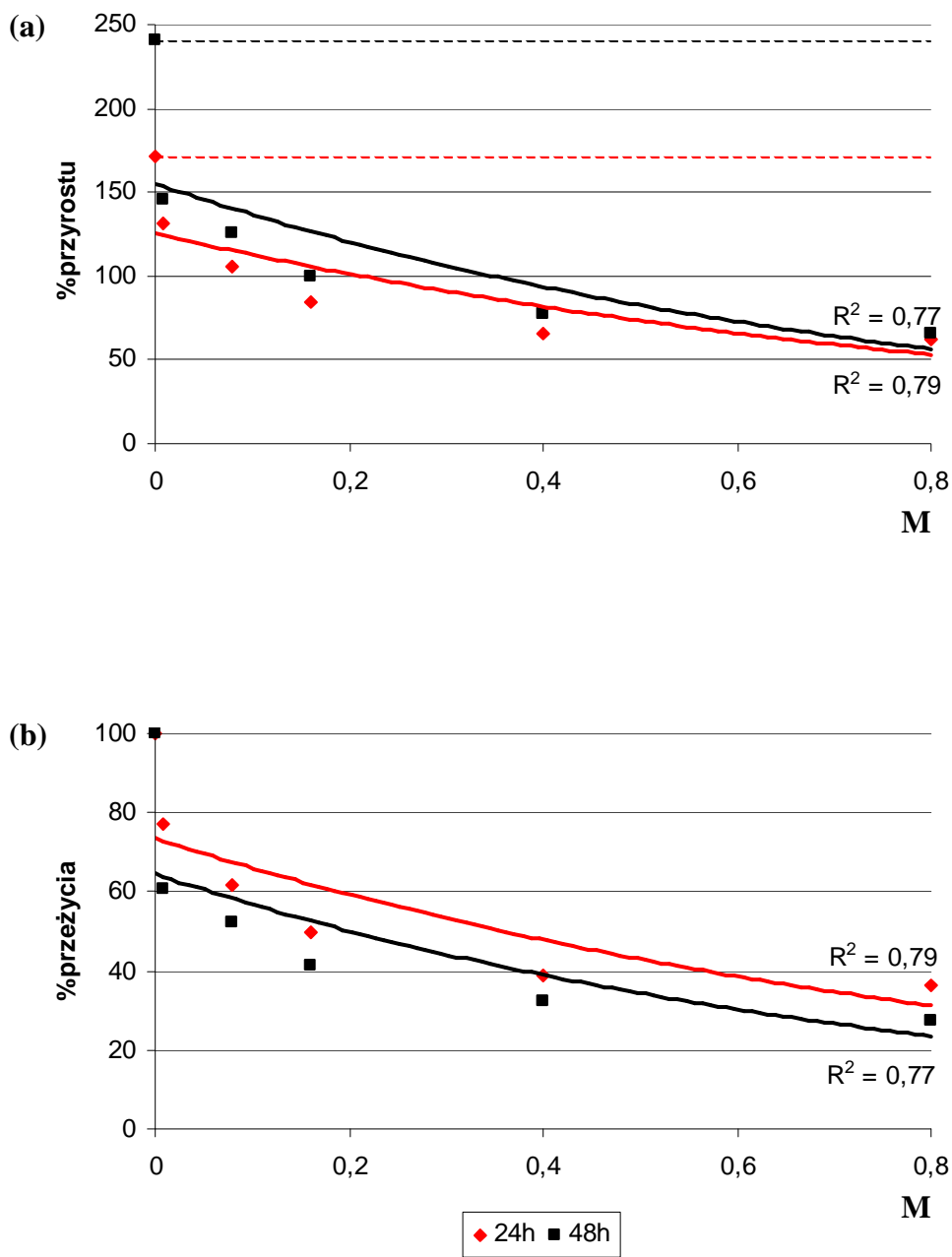
Daunorubicyna.

Zastosowanie daunorubicyny spowodowało znaczny spadek wskaźnika przyrostu komórek po 24- i 48 godzinach hodowli (Ryc. 6a). Wykładnicza zależność wskaźnika przyrostu od dawki była znamienna statystycznie ($p < 0,01$) dla obu linii. Czas trwania hodowli z lekiem wpływał istotnie ($p < 0,05$) na spadek wartości tego wskaźnika komórek obu linii (w stosunku do poziomu przyrostu kontroli) (Ryc. 7a i 8a). Stwierdzono istotne statystycznie ($p < 0,05$) różnice w zakresie obniżenia wartości wskaźnika przyrostu pomiędzy linią HL60 i NB4 zarówno po 24- jak i 48 godzinach hodowli z daunorubicyną, przy czym silniejszy efekt cytostatyczny zaobserwowano dla linii HL60 (Ryc. 9a i 9b).

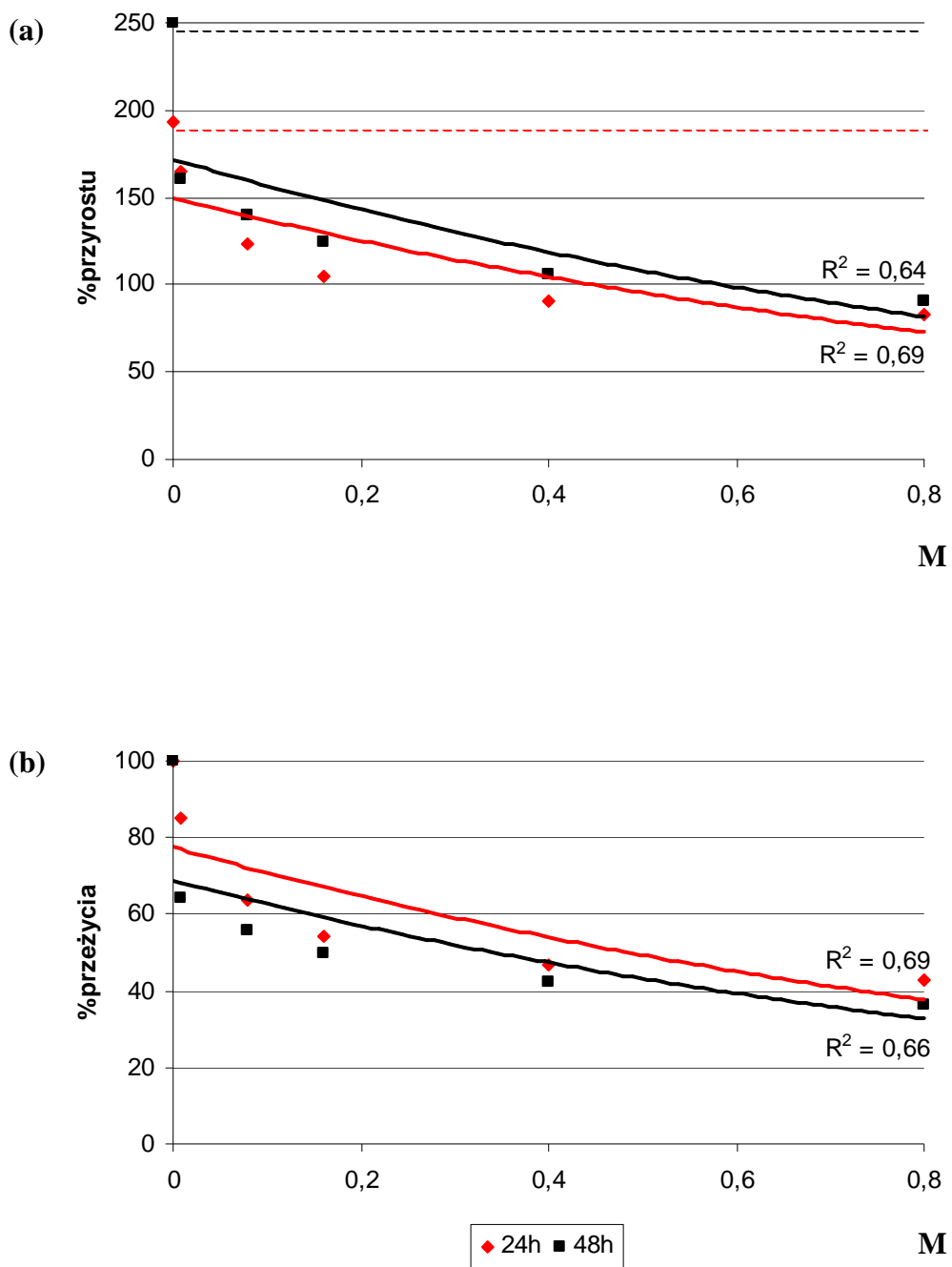
Odsetek przeżycia komórek obu linii zmniejszał się stopniowo i był również wykładniczo zależny od dawki leku ($p < 0,01$) (Ryc. 6b, 7b i 8b). Dla stężenia $0,16 \mu\text{M}$ stwierdzono około 50% spadek przeżycia komórek po 24- godzinnej hodowli (Ryc. 6b). Czas trwania hodowli z daunorubicyną wykazywał znamienny ($p < 0,05$) wpływ na spadek wskaźnika przeżycia komórek obu linii. (Ryc. 7b i 8b). Linie komórkowe różniły się istotnie ($p < 0,01$) pod względem obniżenia wartości tego wskaźnika, a silniejszy efekt cytotoksyczny stwierdzono dla linii HL60 (Ryc. 10a i 10b).



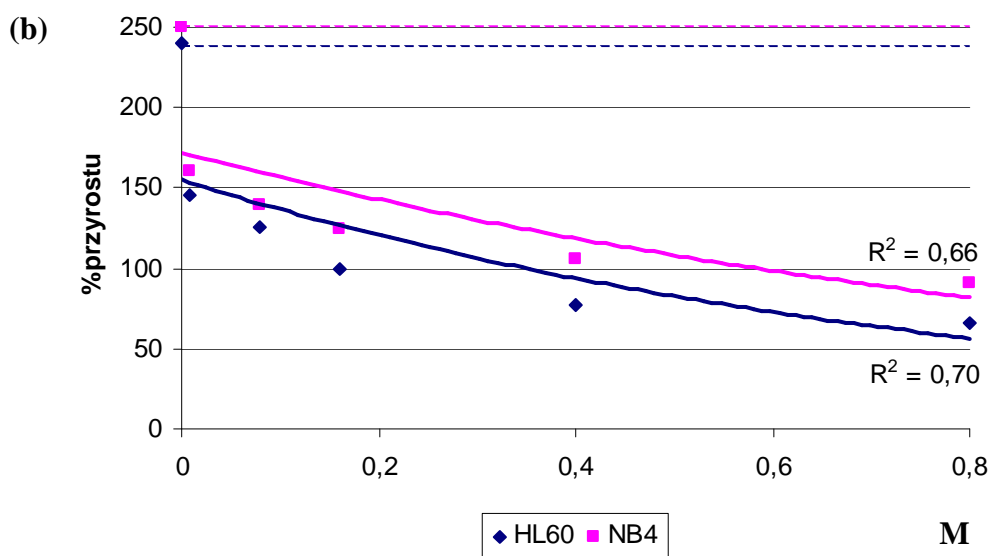
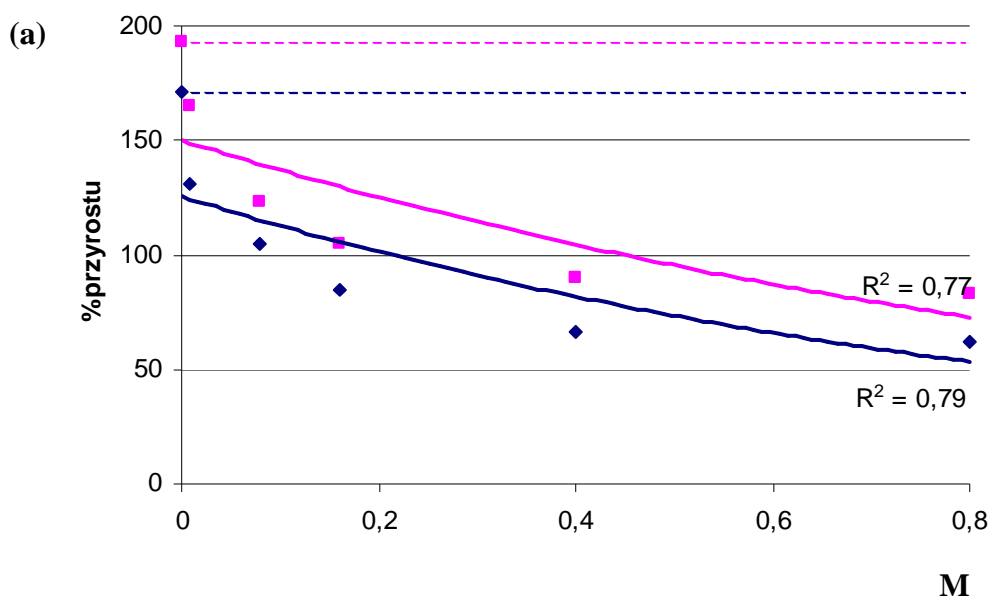
Ryc. 6. Porównanie wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z **daunorubicyną**.



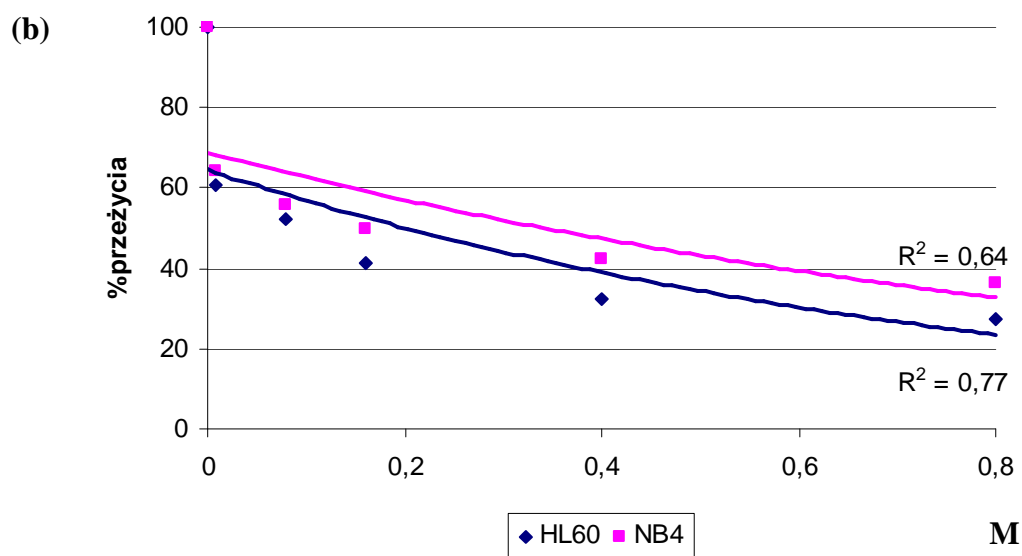
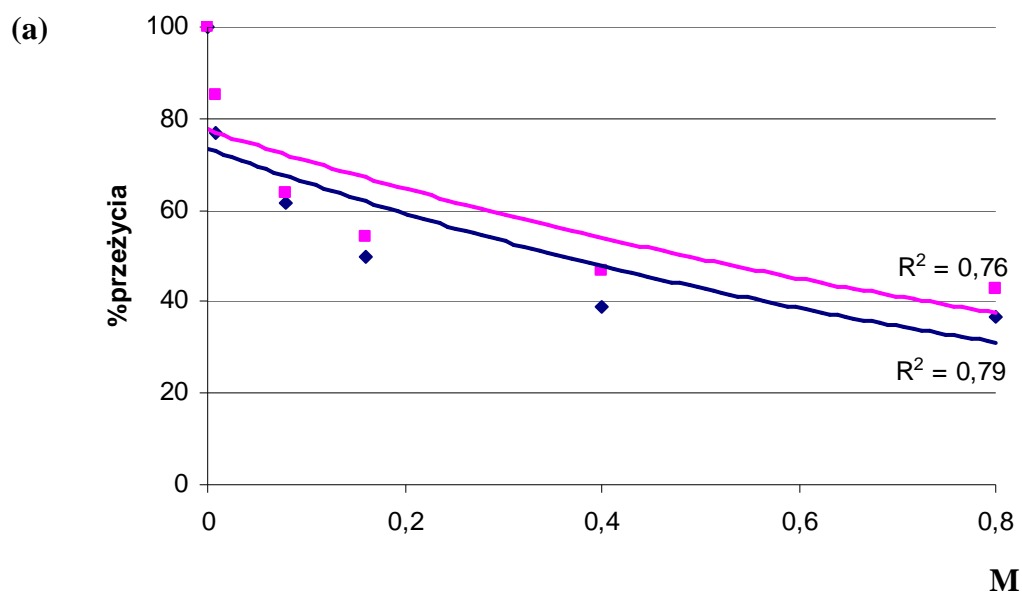
Ryc. 7. Zależność wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek linii HL60 od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z **daunorubicyną** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).



Ryc. 8. Zależność wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek linii NB4 od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z **daunorubicyną** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).



Ryc. 9. Porównanie wskaźników przyrostu komórek linii HL60 i NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **daunorubicyną** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).

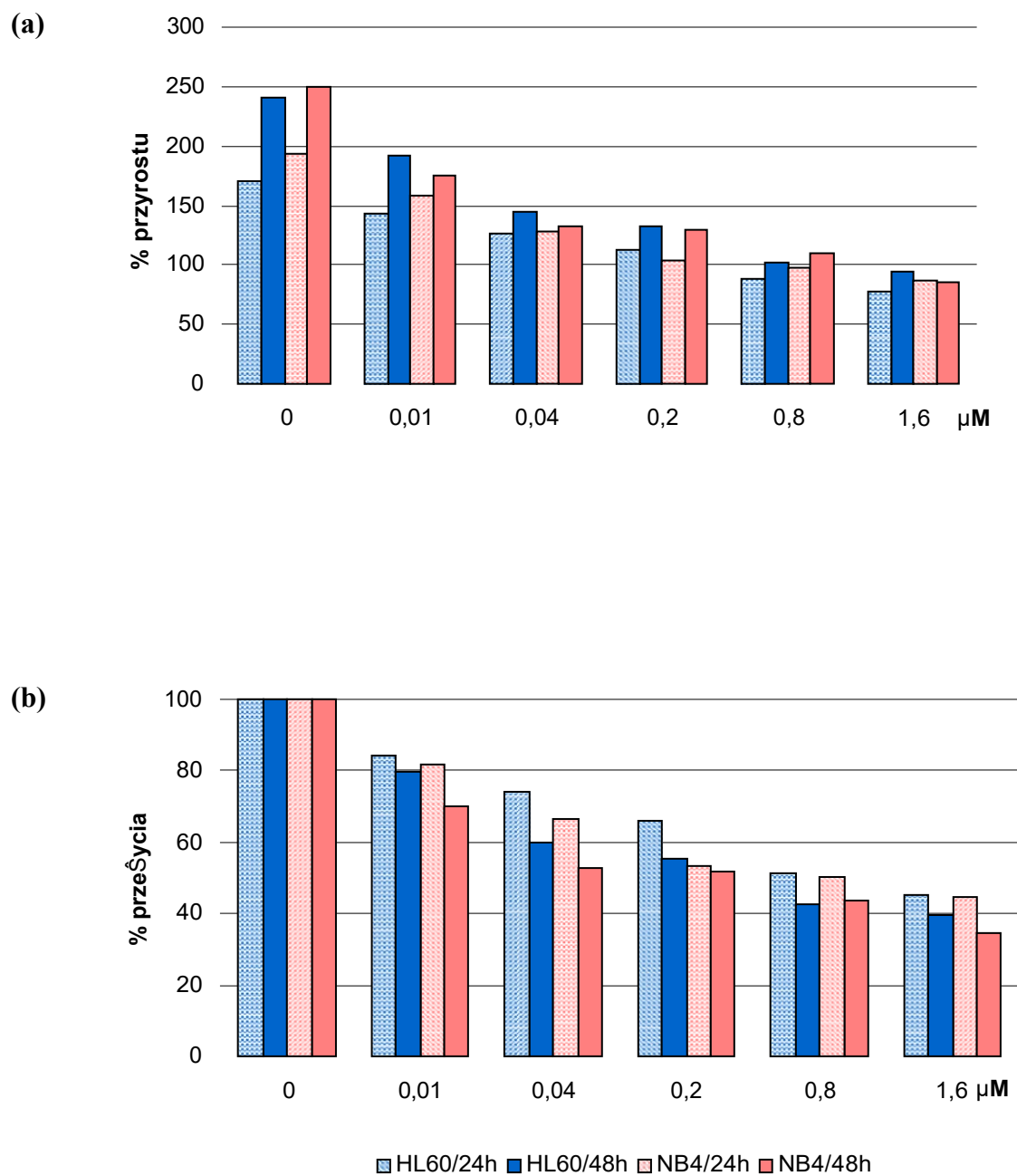


Ryc. 10. Porównanie wskaźników przeżycia komórek linii HL60 i NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **daunorubicyną**.

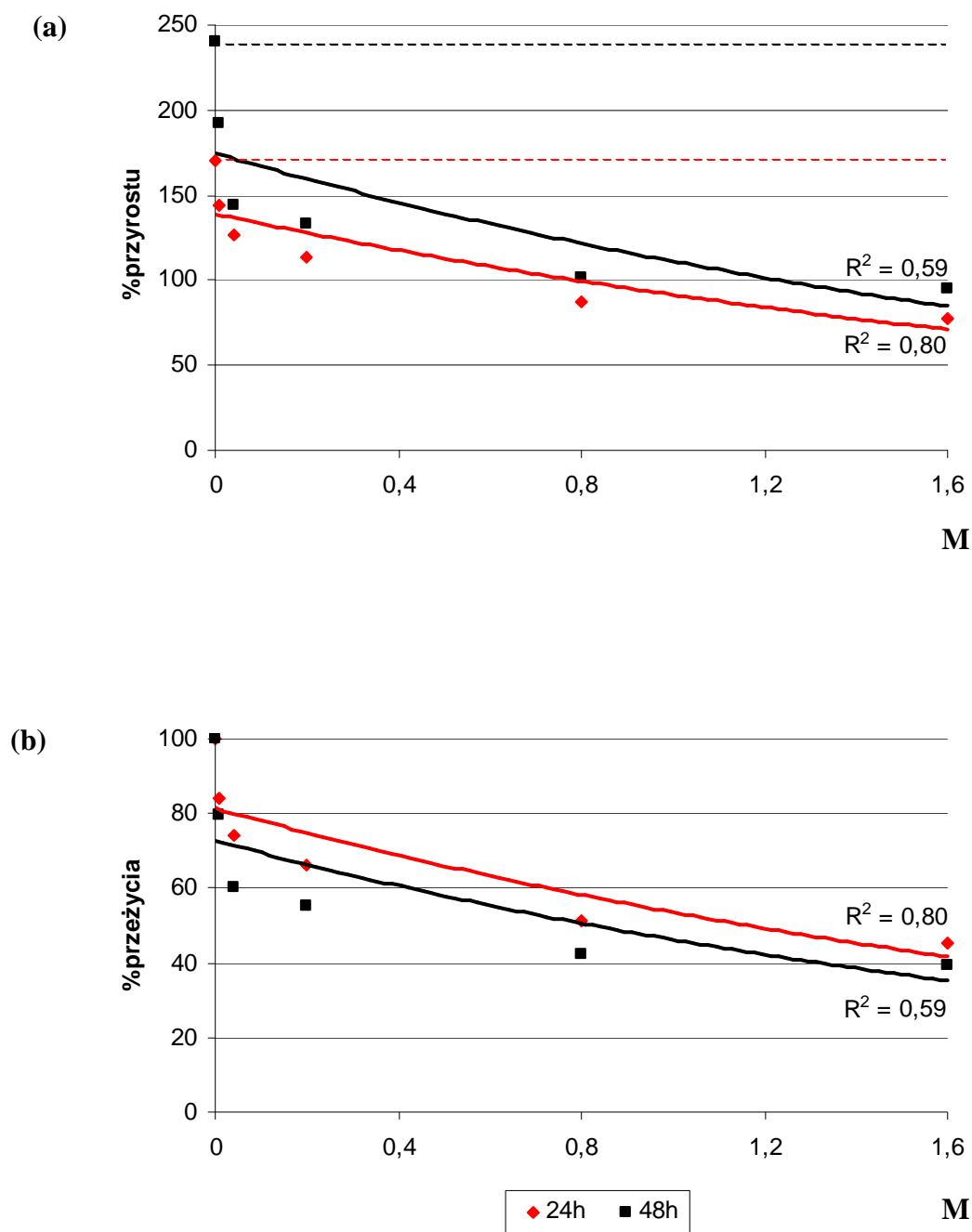
Mitoksantron.

Inkubacja z mitoksantronem również powodowała wyraźny efekt cytostatyczny (Ryc. 11a). W przypadku obu linii spadek poziomu wskaźnika przyrostu był wykładniczo zależny od dawki ($p < 0,01$). Czas trwania hodowli z lekiem również miał istotny ($p < 0,05$) wpływ na obniżenie wartości tego wskaźnika w przypadku obu linii (w stosunku do poziomu przyrostu kontroli) (Ryc.12a i 13a). Stwierdzono znamienne statystycznie ($p < 0,05$) różnice w zakresie spadku wartości wskaźnika przyrostu pomiędzy komórkami obu linii po 24 godzinach hodowli z mitoksantronem, a silniejszy efekt cytostatyczny zaobserwowano dla linii NB4 (Ryc.14a i 14b).

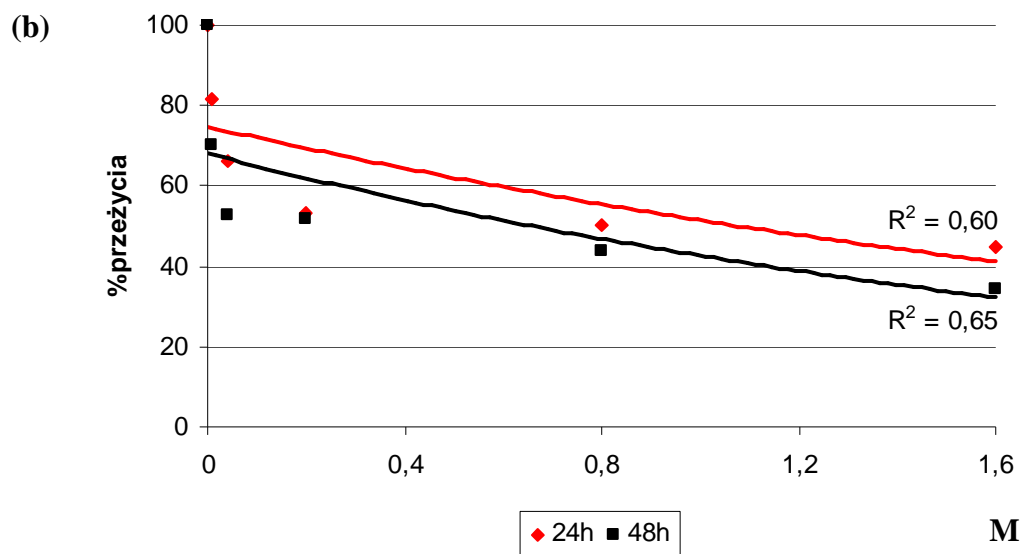
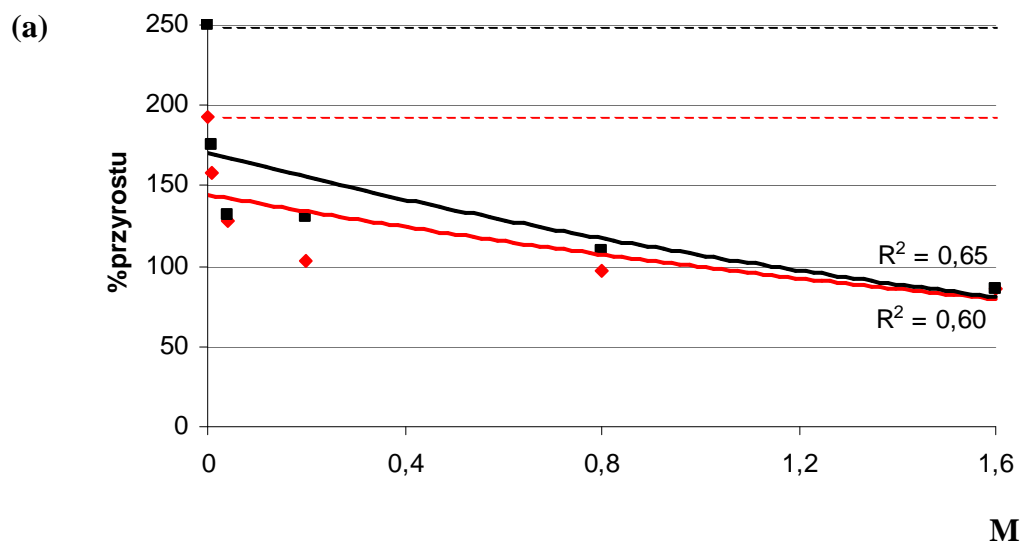
Drugi z obserwowanych wskaźników, tj. odsetek przeżycia komórek, w obu liniach ulegał stopniowemu obniżeniu (zależność wykładnicza) wraz ze wzrostem stężenia leku ($p < 0,01$) (Ryc. 11b, 12b i 13b). Dla dawki $0,8 \mu\text{M}$ zaobserwowano około 50% spadek przeżycia komórek po 24- godzinnej hodowli (Ryc. 11b). Czas trwania hodowli z lekiem miał istotny ($p < 0,05$) wpływ na spadek przeżycia komórek obu linii (Ryc.12b i 13b). W stosunku do tego wskaźnika wykazano znamienne statystycznie ($p < 0,01$) różnice pomiędzy liniami komórkowymi tylko po 48 godzinach hodowli z mitoksantronem, przy czym efekt cytotoksyczny był silniejszy w stosunku do linii NB4 (Ryc. 15a i 15b).



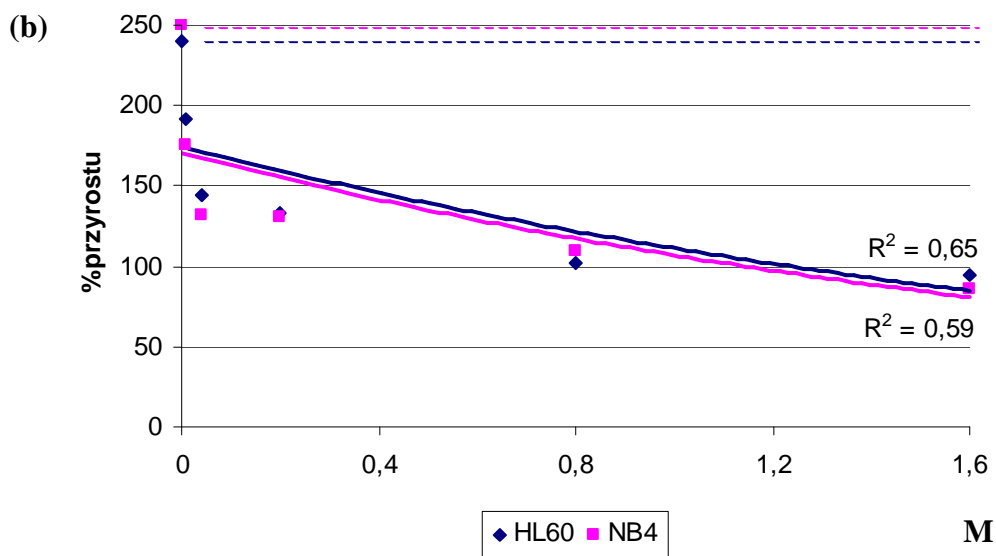
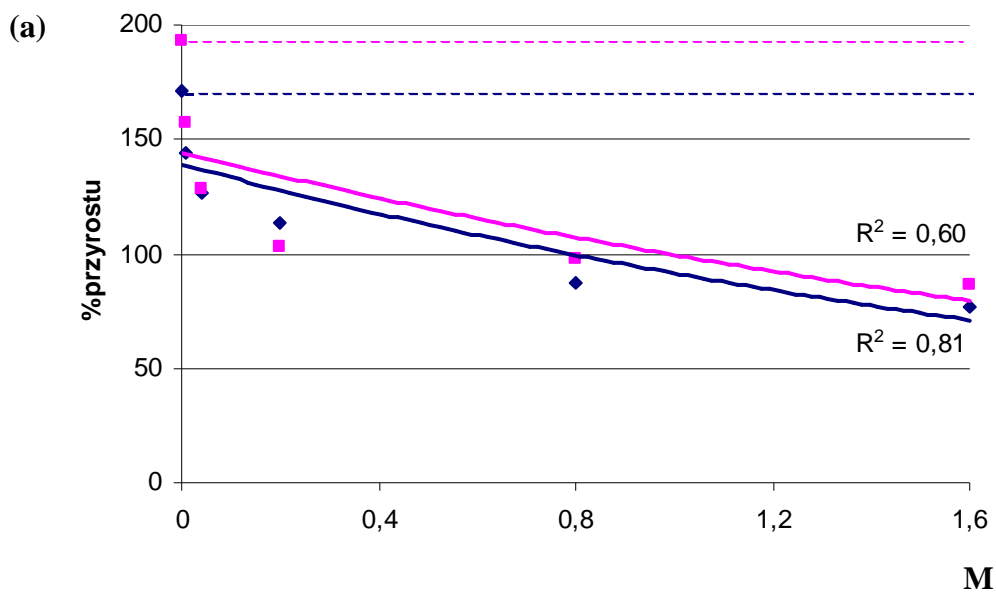
Ryc. 11. Porównanie wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z mitoksantronem.



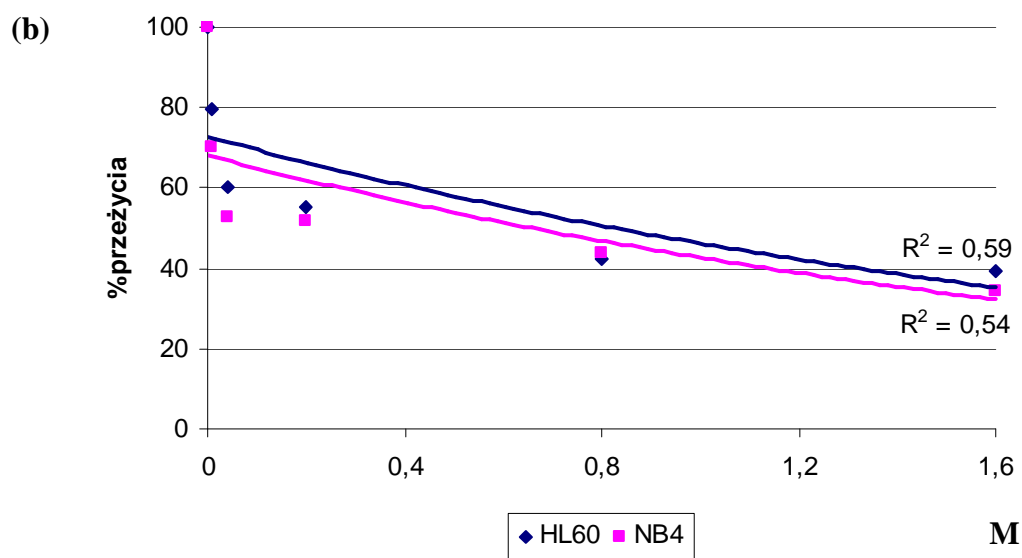
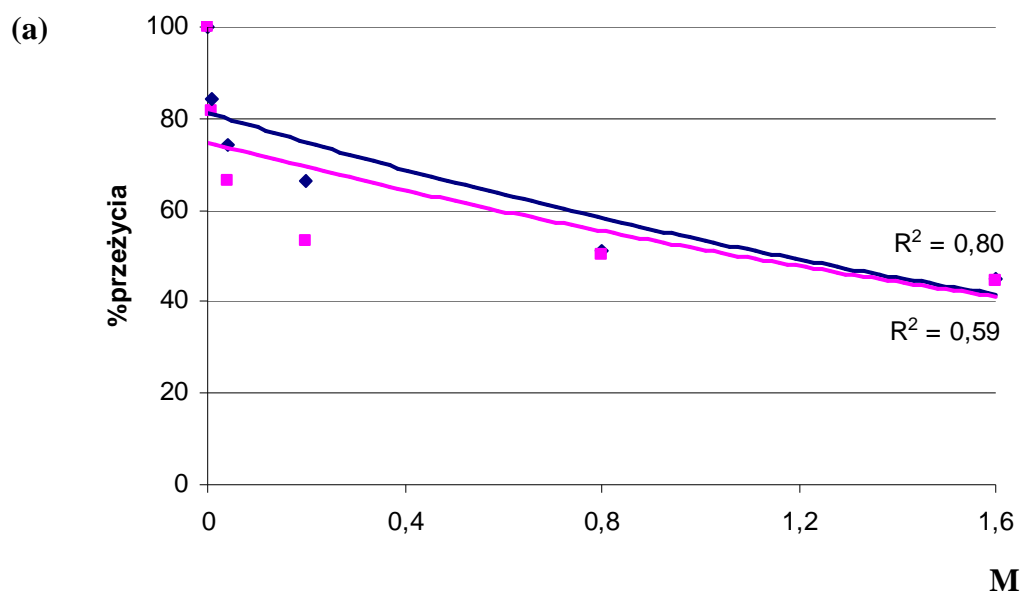
Ryc. 12. Zależność wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek linii **HL60** od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z **mitoksantronem** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).



Ryc.13. Zależność wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek linii NB4 od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z **mitoksantronem** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).



Ryc. 14. Porównanie wskaźników przyrostu komórek linii **HL60** i **NB4** po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **mitoksantronem** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).

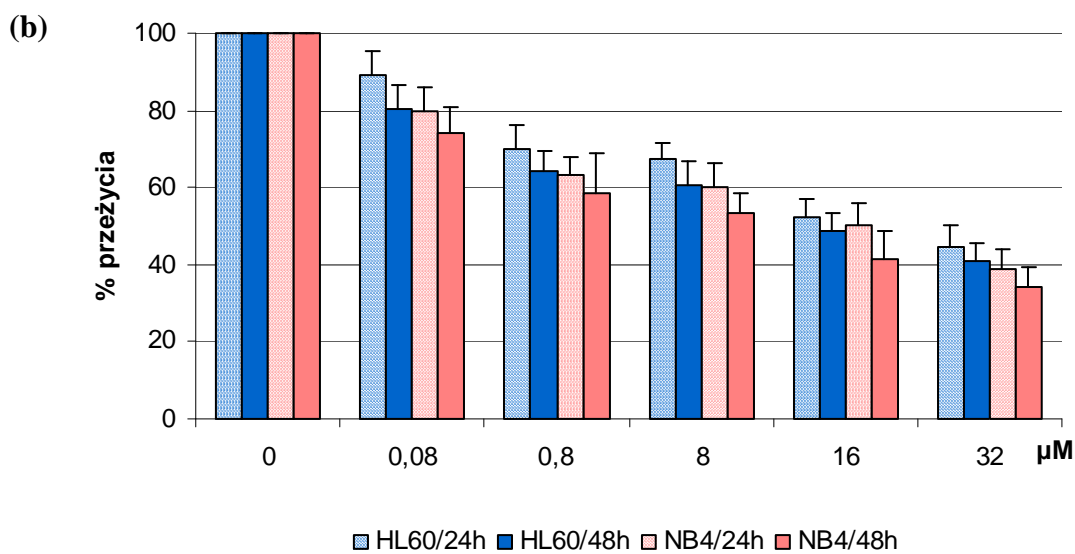
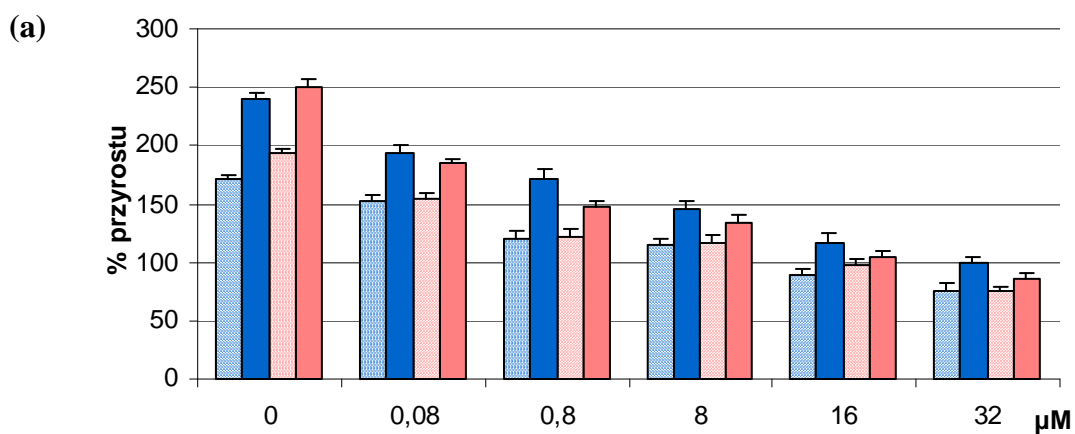


Ryc. 15. Porównanie wskaźników przeżycia komórek linii HL60 i NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z mitoksantronem.

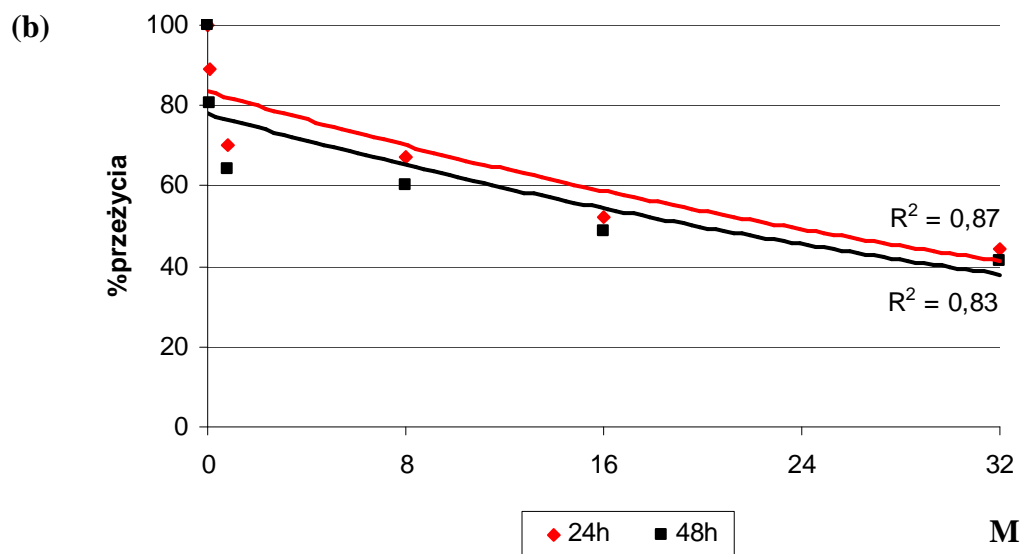
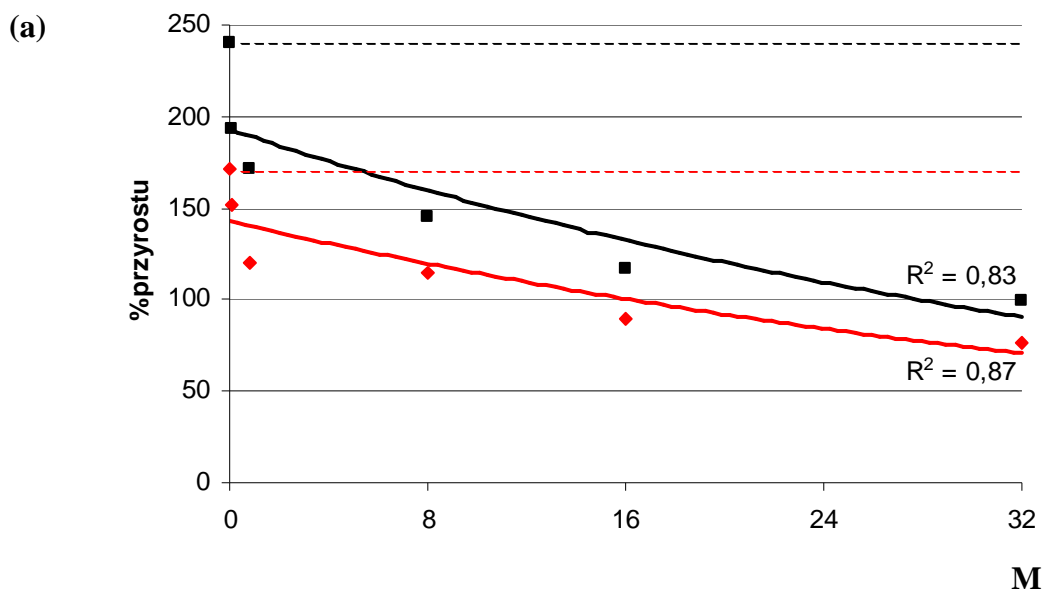
Etopozyd.

Pod wpływem etopozydu wskaźnik przyrostu komórek obu linii ulegał zmniejszeniu (zależność wykładnicza) wraz ze wzrostem dawki leku ($p < 0,01$). Czas trwania hodowli z lekiem miał istotny ($p < 0,05$) wpływ na spadek poziomu przyrostu komórek obu linii (w porównaniu do kontroli)(Ryc. 16a, 17a i 18a). Zaobserwowano znamienne statystycznie różnice w obniżeniu wartości tego wskaźnika pomiędzy liniami tylko po 24 godzinach hodowli z etopozydem, a silniejszy efekt cytostatyczny stwierdzono dla linii NB4 (Ryc.19a i 19b).

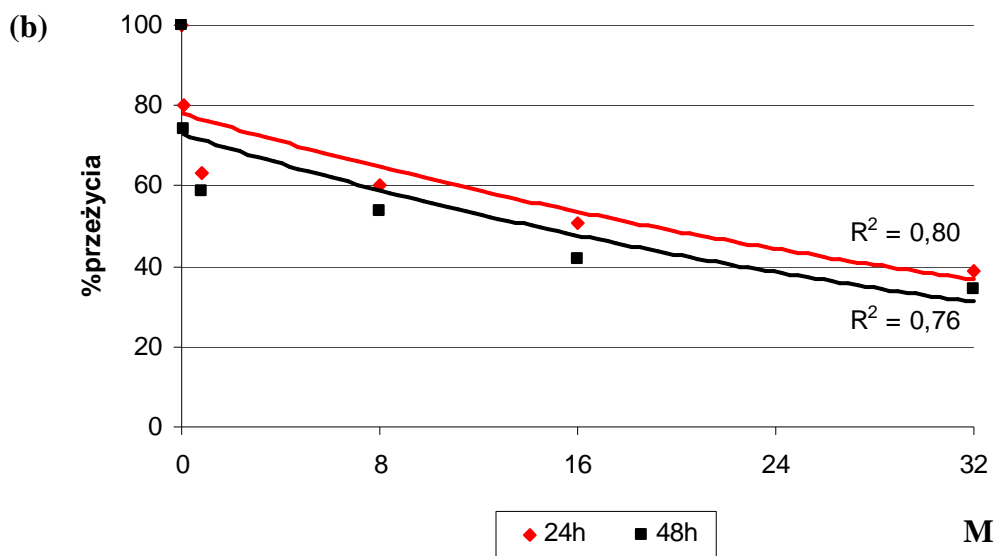
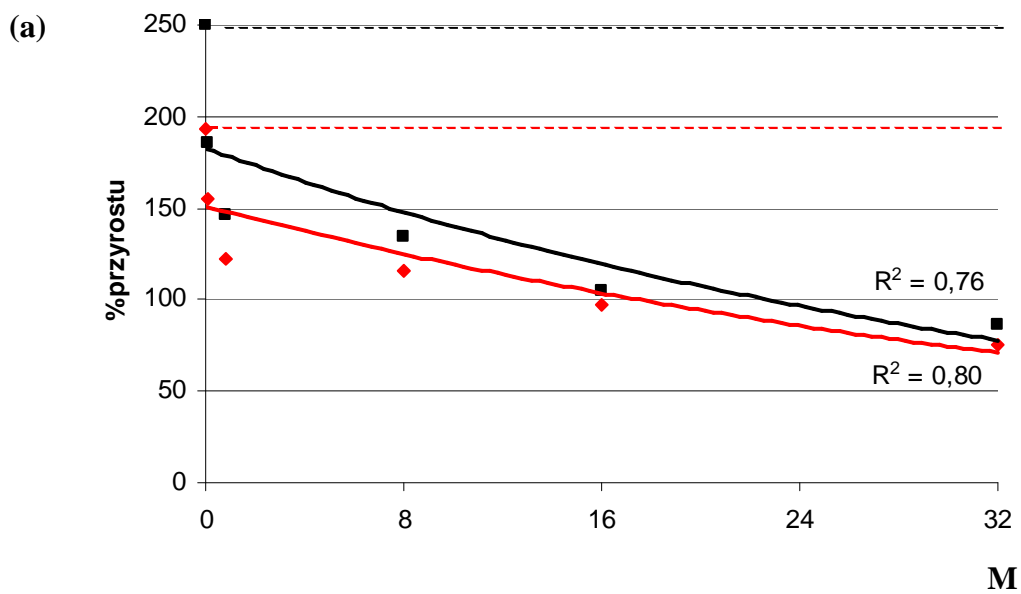
Odsetek przeżycia komórek linii HL60 i NB4 ulegał stopniowemu obniżeniu wraz ze wzrostem stężenia leku. Stwierdzono wykładniczą zależność spadku wskaźnika przeżycia komórek obu linii od dawki ($p < 0,005$) (Ryc. 17b i 18b). Dla stężenia $16 \mu\text{M}$ wykazano około 50% spadek przeżycia komórek po 24- godzinnej hodowli (Ryc. 16b). Czas trwania hodowli z etopozydem miał istotny wpływ na spadek wartości tego wskaźnika dla obu linii ($p < 0,01$) (Ryc. 17b i 18b). Linie komórkowe różniły się istotnie ($p < 0,05$) pod względem obniżenia wartości odsetka przeżycia po 24 i 48 godzinach hodowli z lekiem (silniejszy efekt cytotoksyczny stwierdzono w przypadku linii NB4) (Ryc. 20a i 20b).



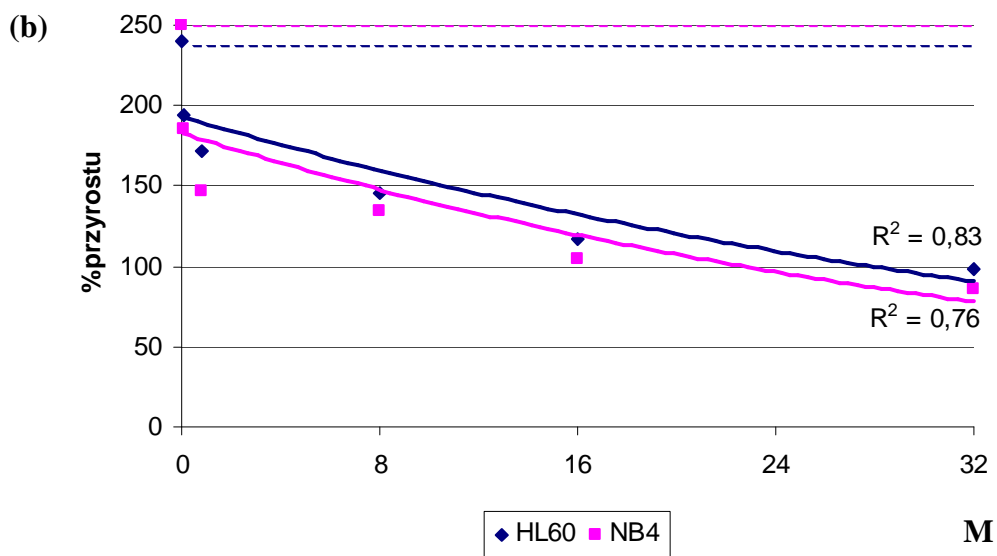
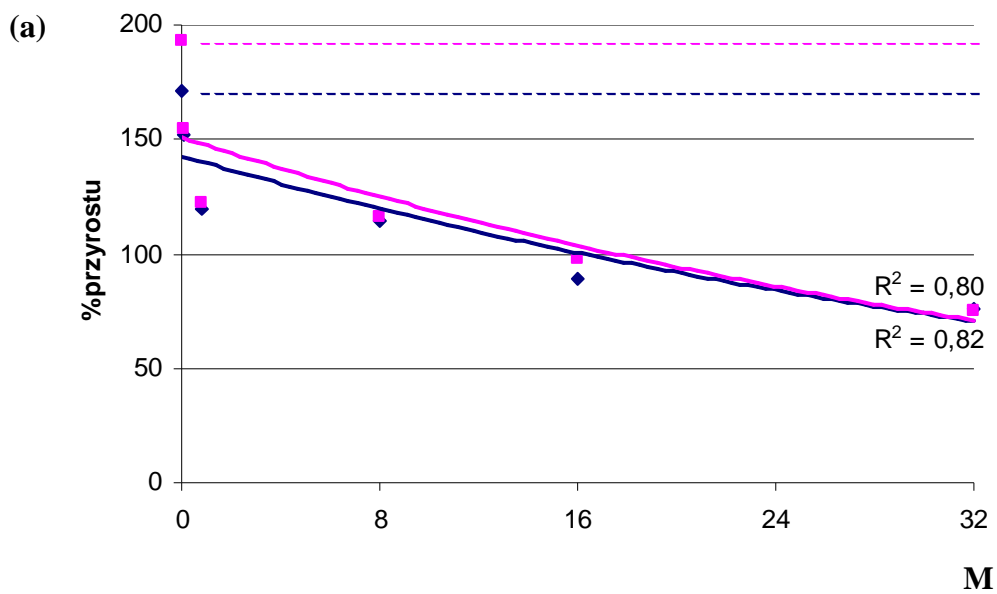
Ryc. 16. Porównanie wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z etopozydem.



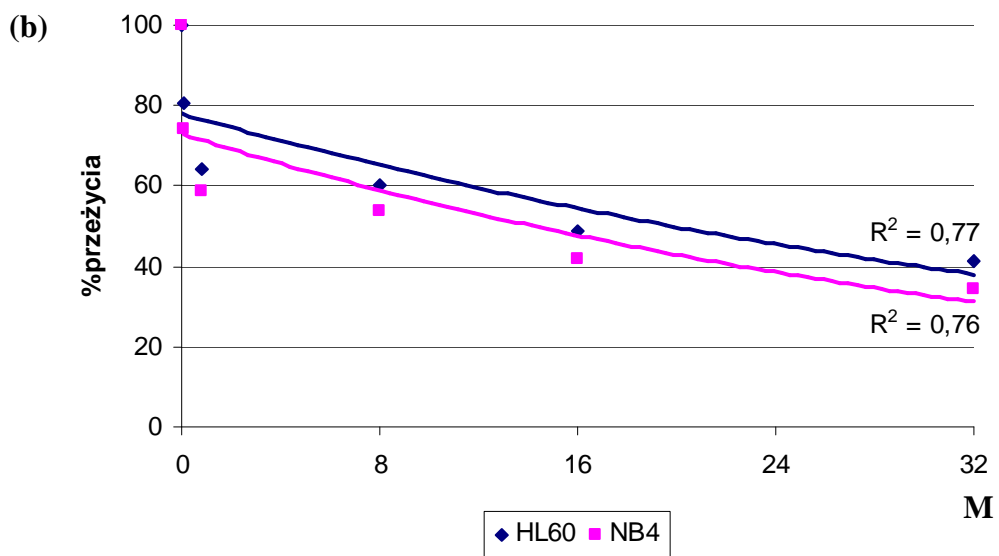
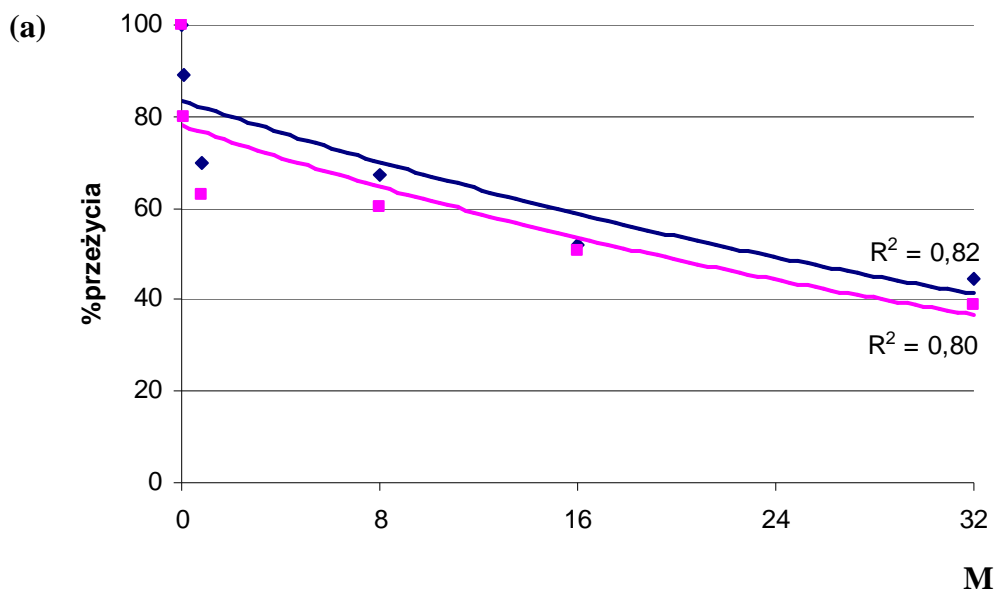
Ryc. 17. Zależność wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek linii **HL60** od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z **etopozydem** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).



Ryc. 18. Zależność wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) komórek linii NB4 od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z **etopozydem** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).



Ryc. 19. Porównanie wskaźników przyrostu komórek linii **HL60** i **NB4** po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **etopozydem** (liniami przerywanymi oznaczono poziom przyrostu kontroli).

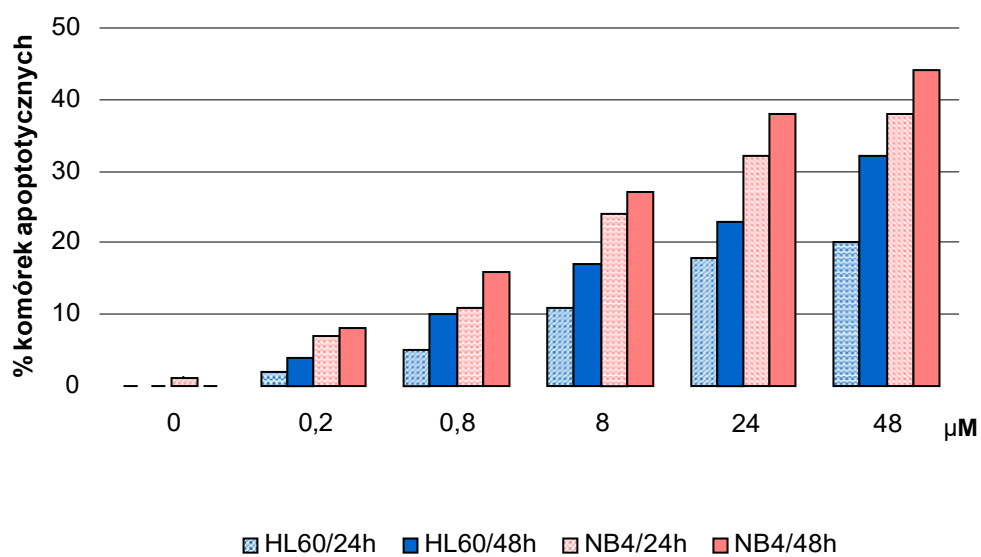


Ryc. 20. Porównanie wskaźników przeżycia komórek linii HL60 i NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z etopozydem.

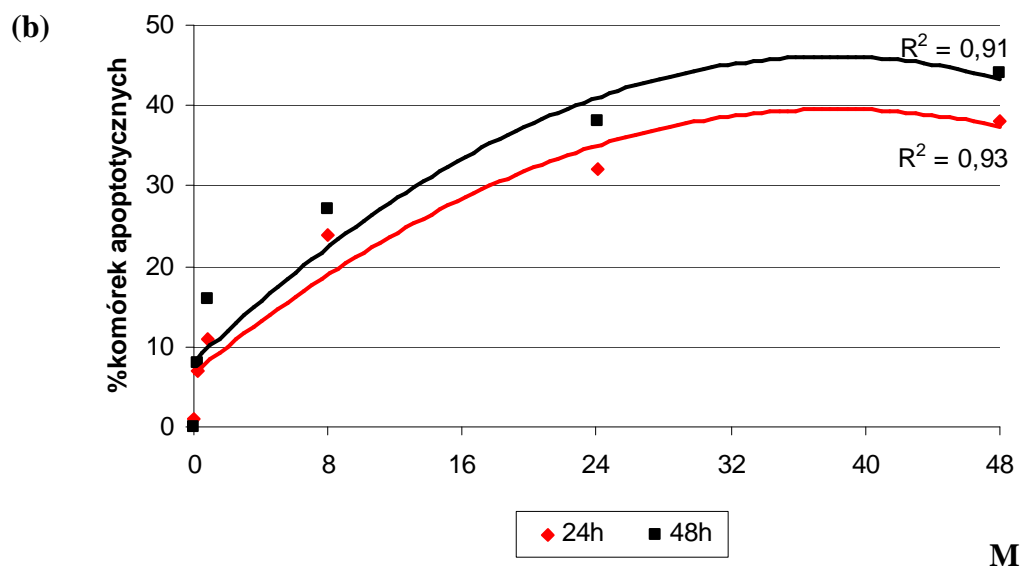
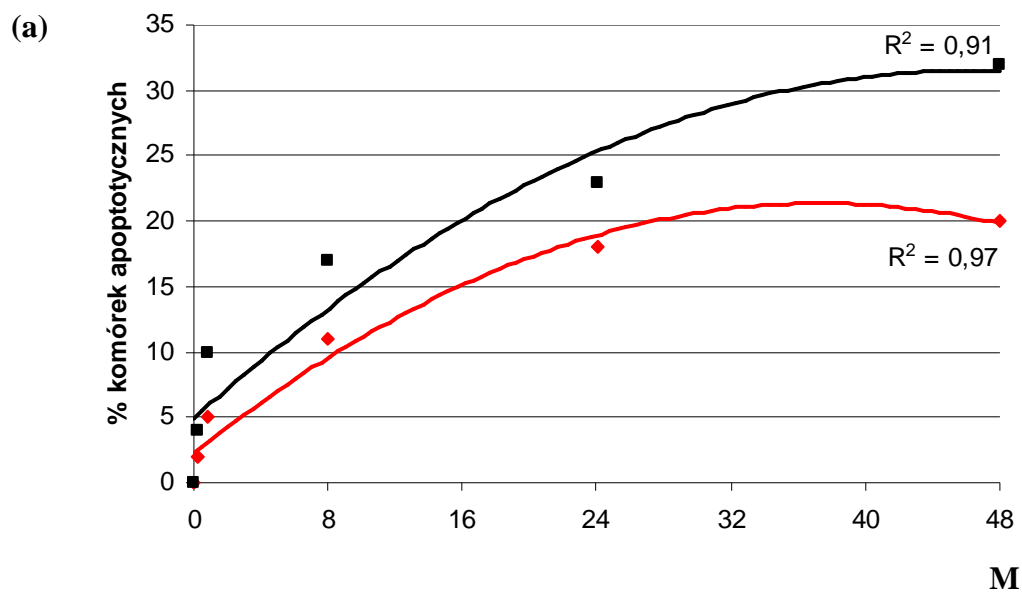
1.2. Ocena apoptozy.

Arabinozyd cytozyny.

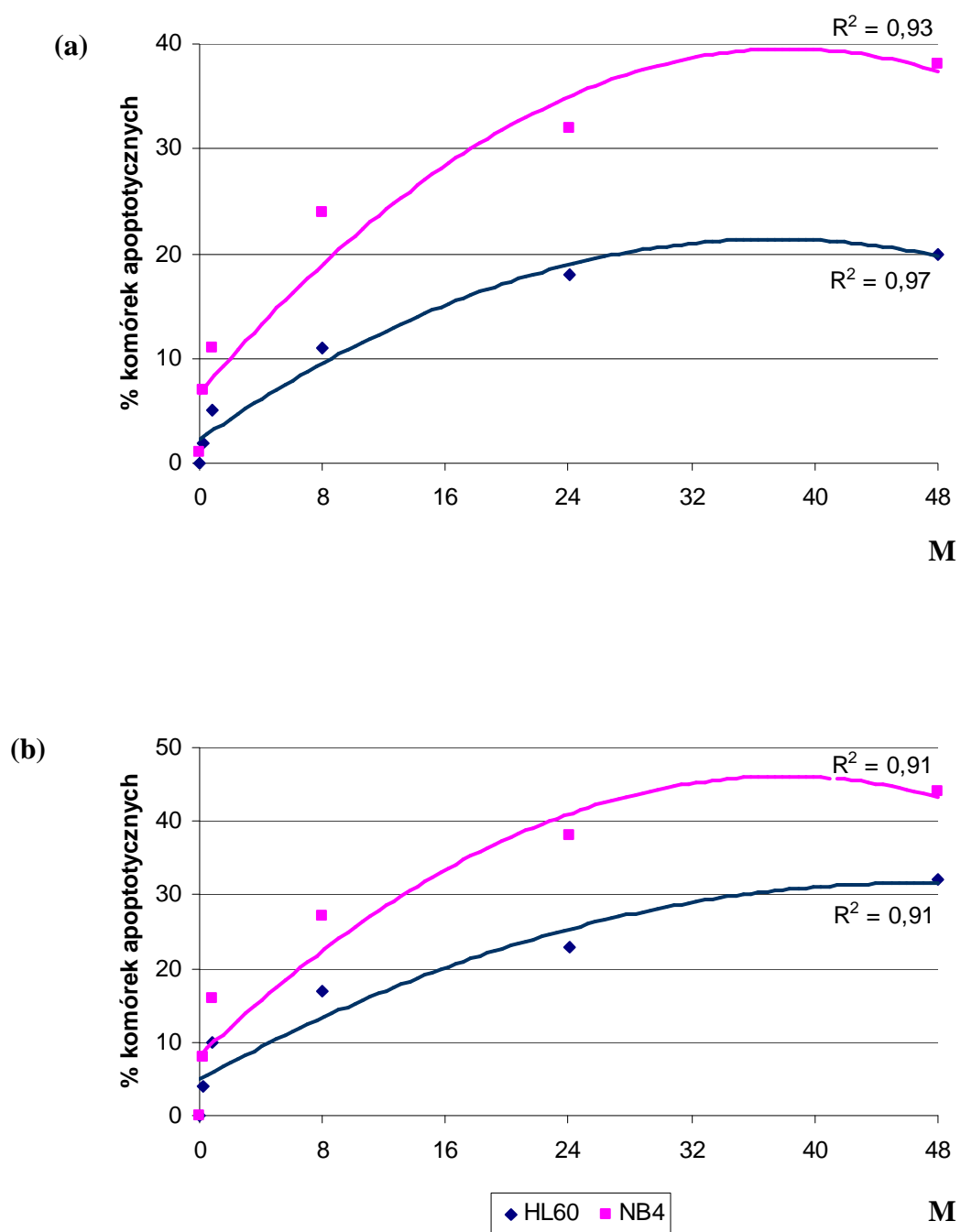
Analiza mikroskopowa jąder komórkowych wykazała wzrost odsetka komórek apoptotycznych w populacji obu linii po inkubacji z Ara-C (zależność kwadratowa, $p < 0,01$)(Ryc. 21, 22a i 22b). W przypadku obu linii czas hodowli z lekiem wpływał istotnie ($p < 0,05$) na wzrost wartości wskaźnika apoptozy. Linię HL60 charakteryzował istotnie niższy ($p < 0,001$) odsetek komórek apoptotycznych w porównaniu z NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z lekiem, co zgodne jest z zachowaniem się wskaźnika przeżycia (po 24 godzinach hodowli)(Ryc.23a i 23b).



Ryc. 21. Porównanie wskaźników apoptozy komórek HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z Ara-C .



Ryc. 22. Zależność wskaźnika apoptozy komórek HL60 (a) i NB4 (b) od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z arabinozydem cytozyny.

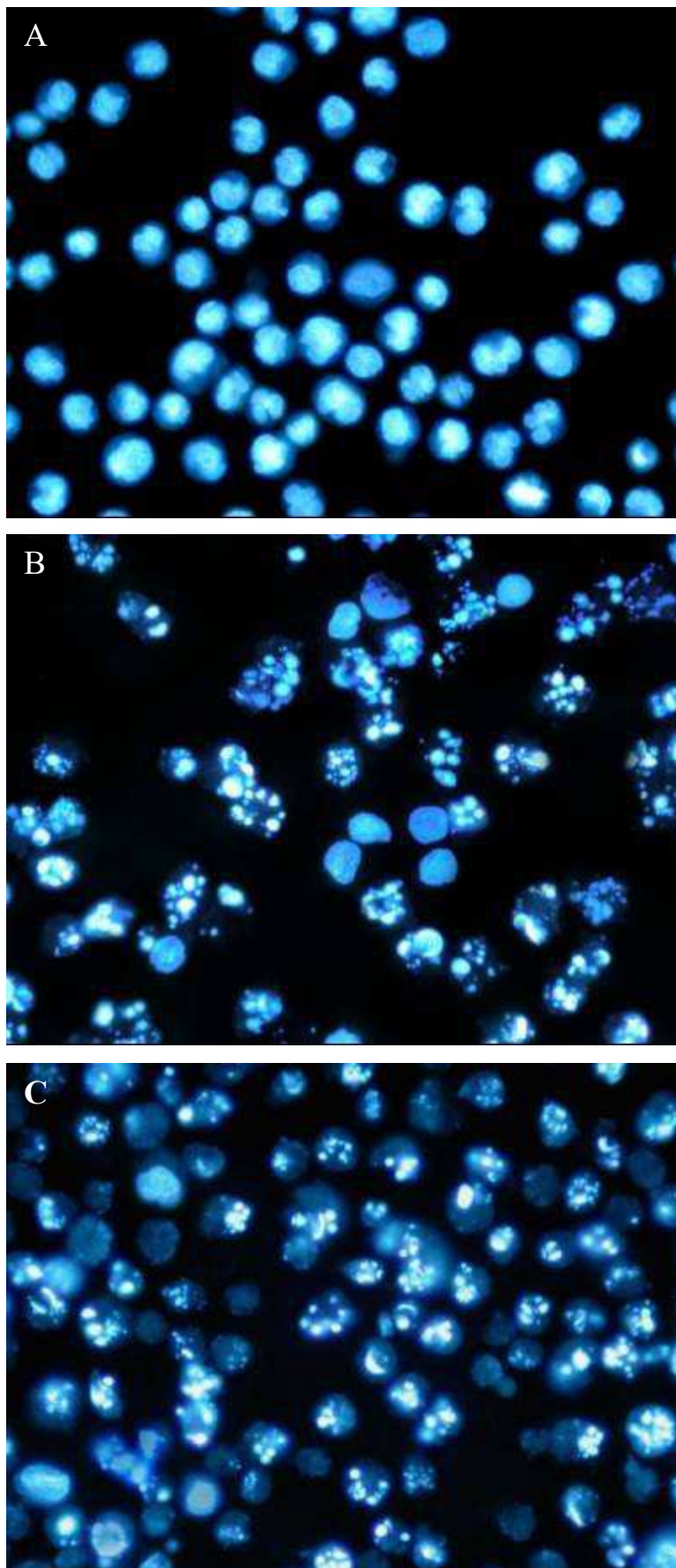


Ryc. 23. Porównanie wskaźników apoptozy komórek linii **HL60** i **NB4** po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **arabinozydem cytozyny**.

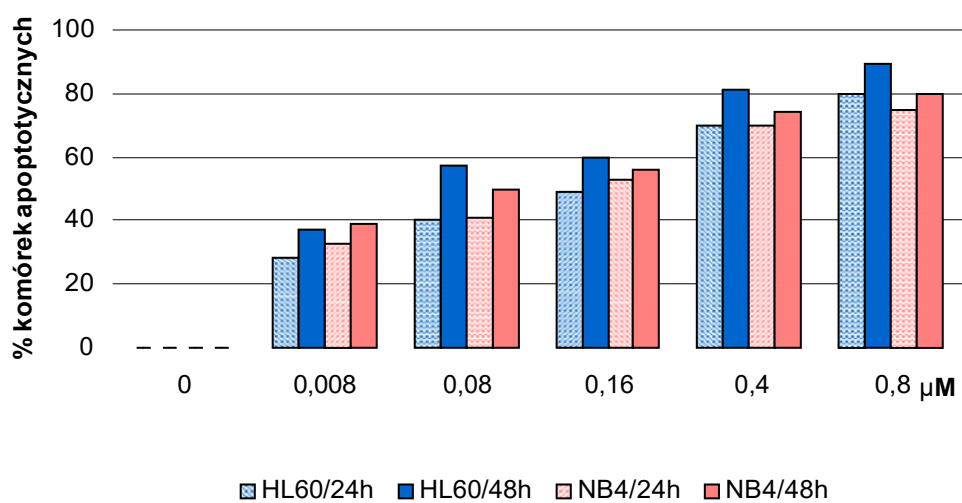
Daunorubicyna.

Wskaźnik apoptozy dla obu linii wzrastał znamienne wraz ze wzrostem dawki leku (zależność kwadratowa, $p < 0,005$). Również czas inkubacji z daunorubicyną miał znamienne ($p < 0,05$) wpływ na wzrost wskaźnika apoptozy w przypadku obu linii (Fot. 1, Ryc.24, 25a i 25b).

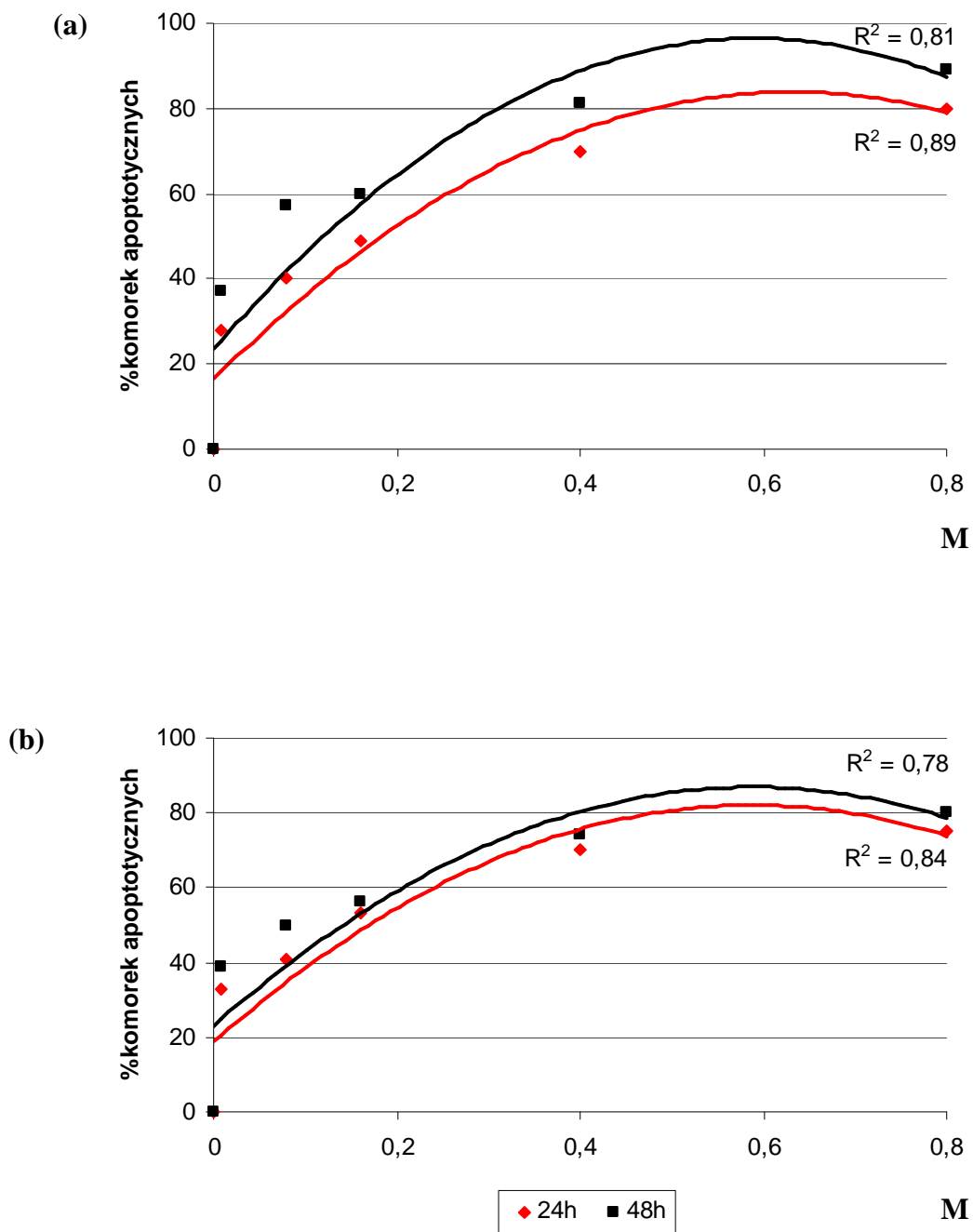
Nie stwierdzono istotnych różnic w zachowaniu się tego wskaźnika pomiędzy obiema liniami komórkowymi zarówno po 24- jak i 48 godzinach hodowli z lekiem (Ryc. 26a i 26b). W tym względzie wynik uzyskany przy ocenie apoptozy odbiegał od wyniku uzyskanego przez pomiar wskaźnika przeżycia, przy którym wrażliwość obu linii różniła się znamienne.



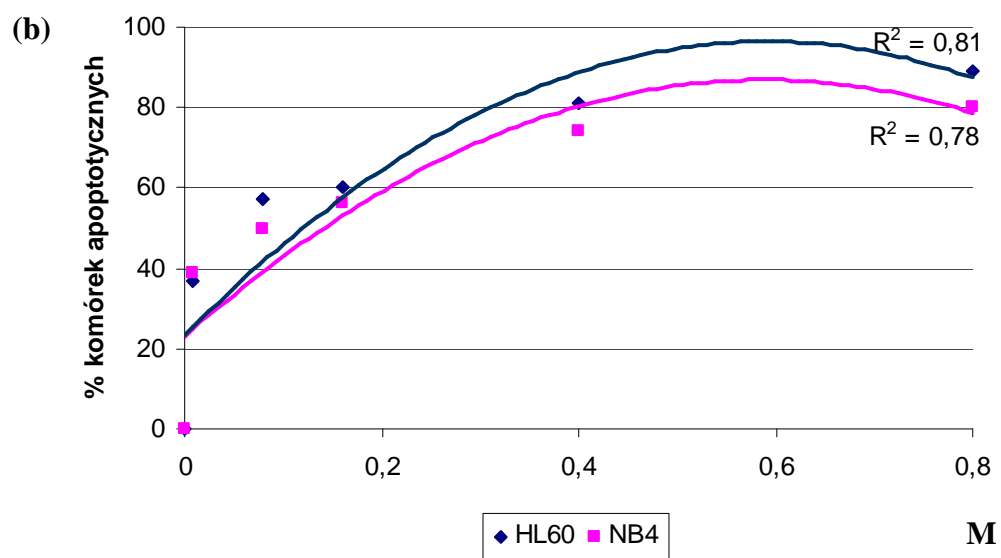
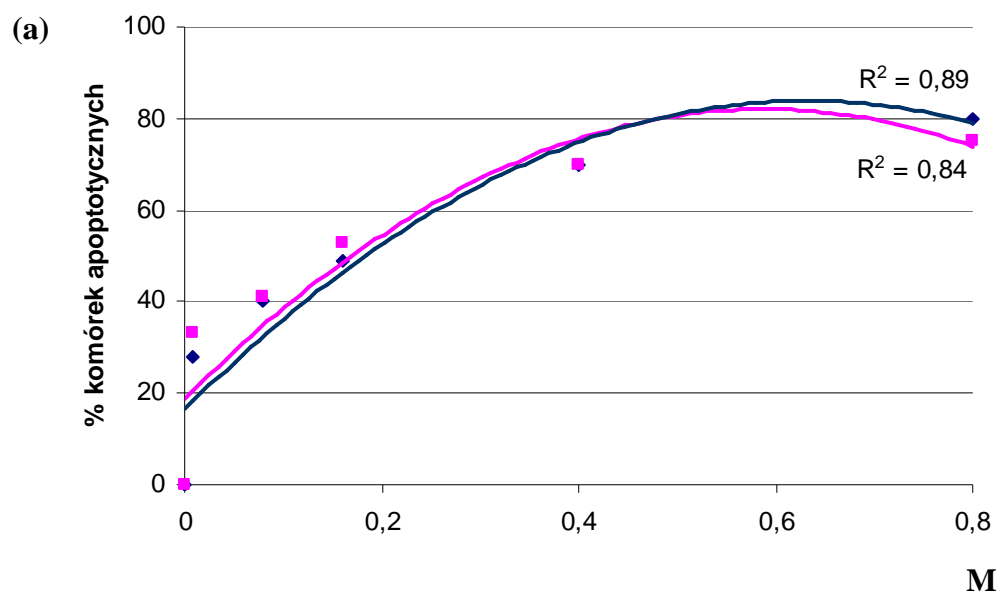
Fot. 1. Apoptoza komórek **HL60** traktowanych $0,8 \mu\text{M}$ **daunorubicyną**.
(A) komórki nie inkubowane z lekiem,
(B) komórki po 24-godzinnej hodowli z lekiem,
(C) komórki po 48-godzinnej hodowli z lekiem.
(powiększenie x 200)



Ryc. 24. Porównanie wskaźników apoptozy komórek HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z **daunorubicyną**.



Ryc. 25. Zależność wskaźnika apoptozy komórek HL60 (a) i NB4 (b) od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z daunorubicyną.

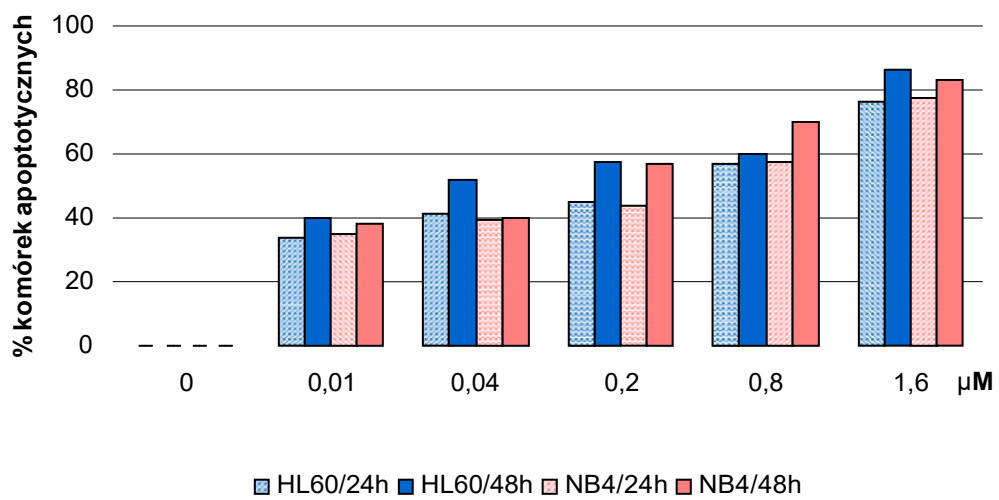


Ryc. 26. Porównanie wskaźników apoptozy komórek linii HL60 i NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z daunorubicyną.

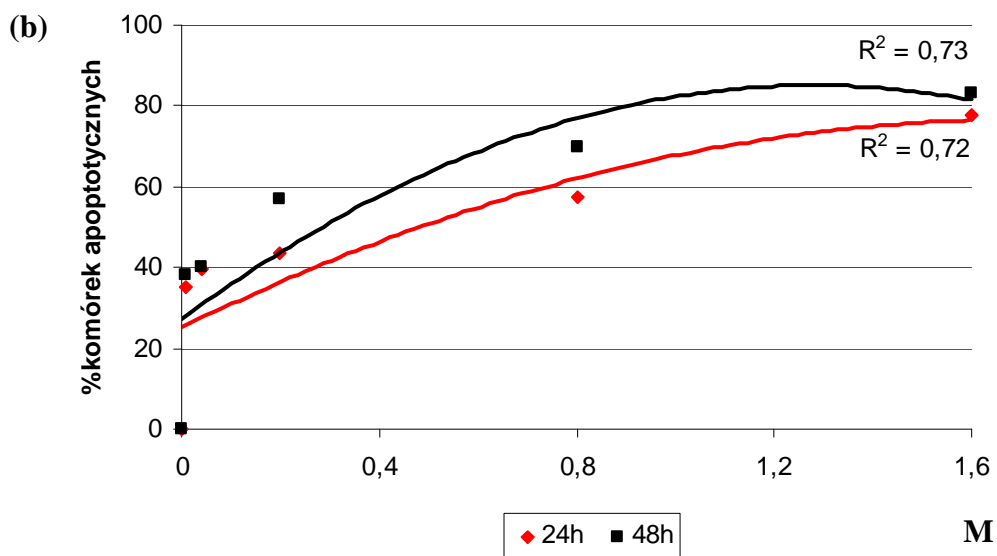
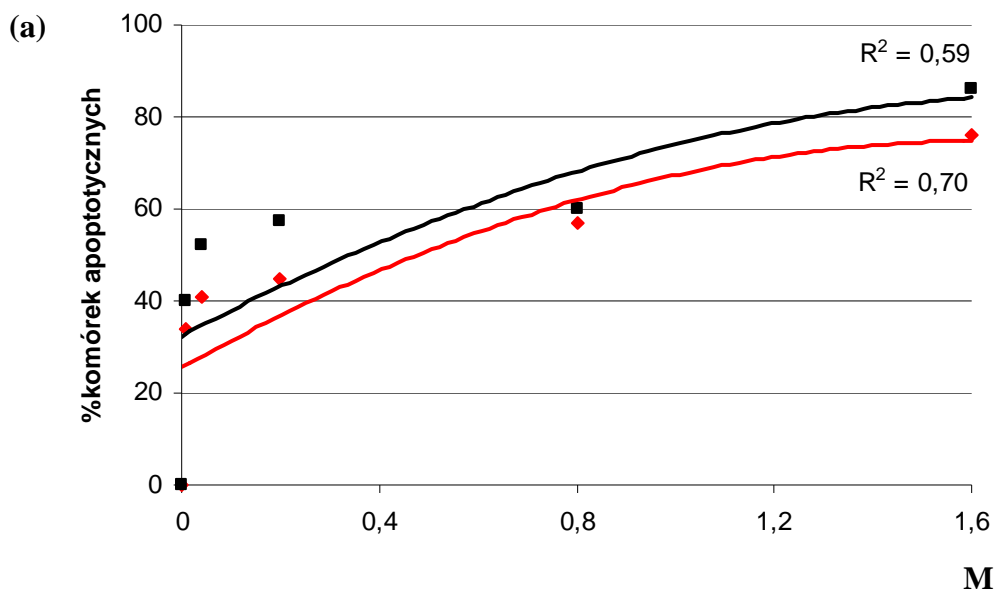
Mitoksantron.

Wskaźnik apoptozy zwiększał się stopniowo wraz ze wzrostem stężenia leku (zależność kwadratowa, $p < 0,01$). Czas trwania hodowli z lekiem wpływał istotnie ($p < 0,05$) na wzrost odsetka komórek apoptotycznych tylko w przypadku linii HL60 (Ryc.27, 28a i 28b).

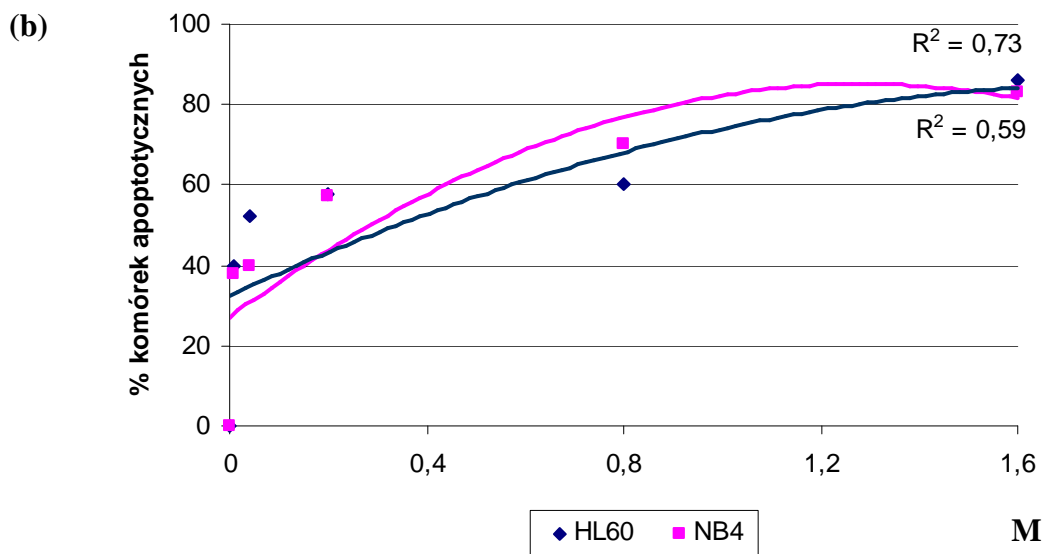
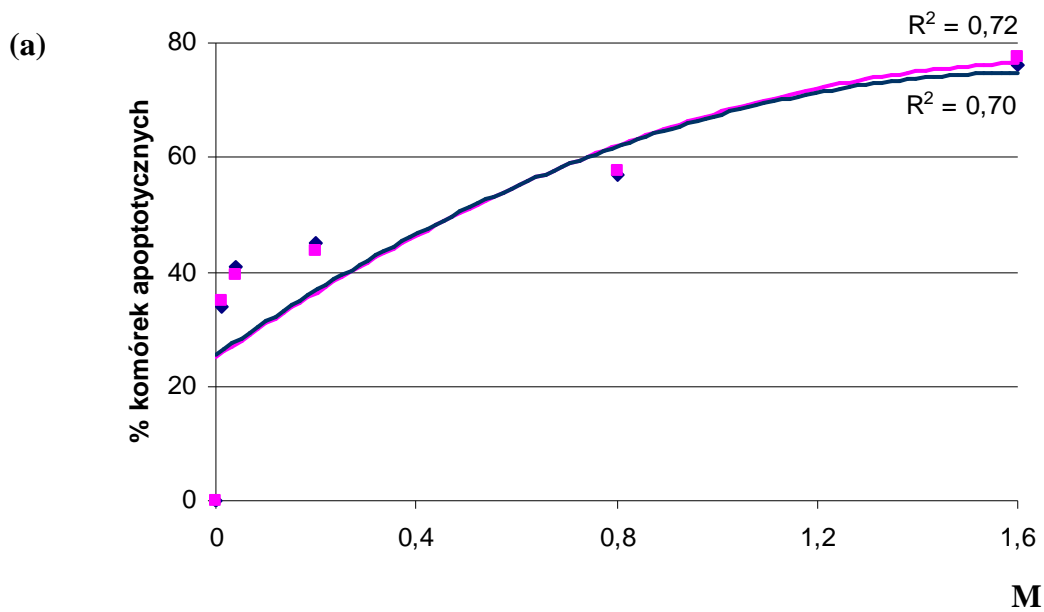
Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wartościami wskaźnika apoptozy dla obu populacji komórkowych (Ryc. 29a i 29b).



Ryc. 27. Porównanie wskaźników apoptozy komórek HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z **mitoksantronem**.



Ryc. 28. Zależność wskaźnika apoptozy komórek HL60 (a) i NB4 (b) od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z mitoksantronem.

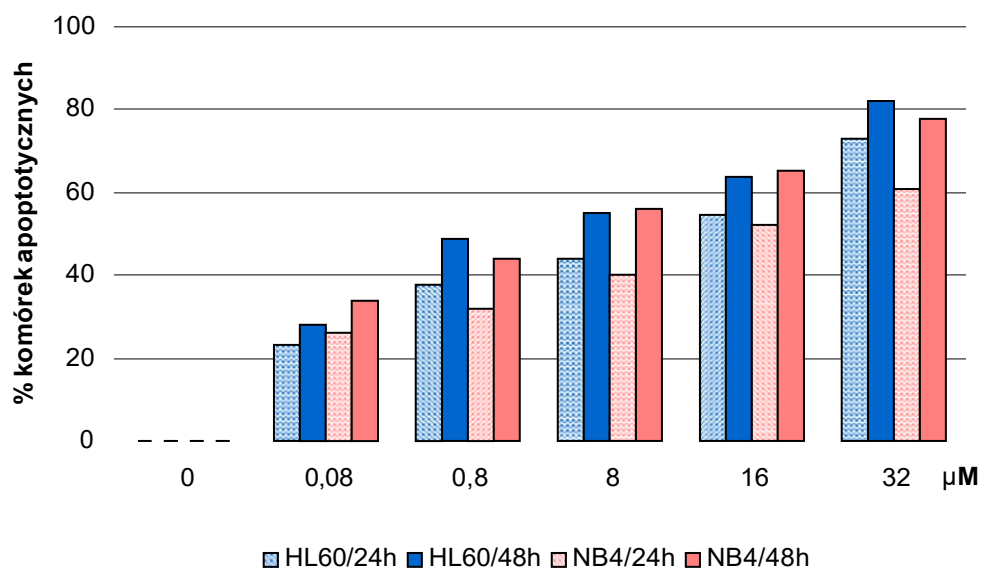


Ryc. 29. Porównanie wskaźników apoptozy komórek linii **HL60** i **NB4** po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **mitoksantronem**.

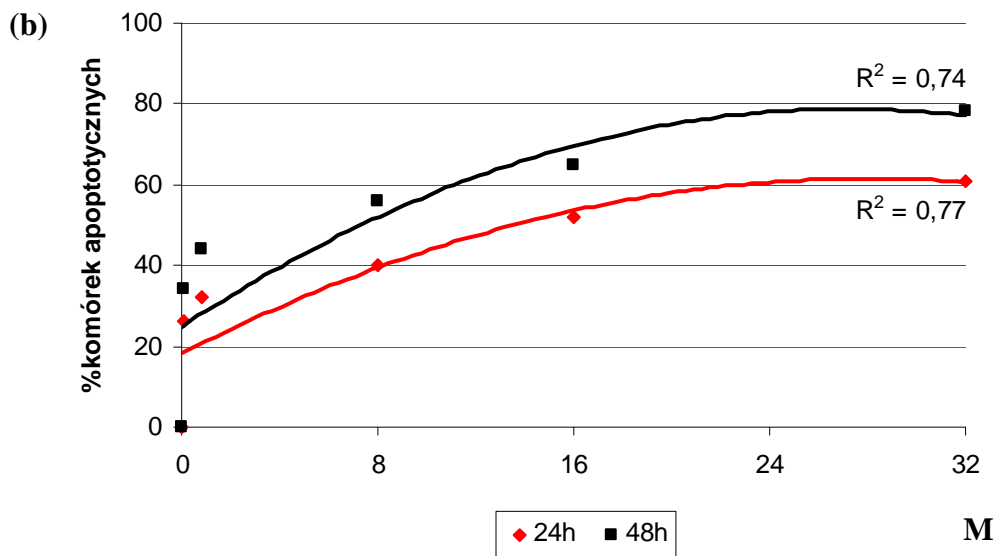
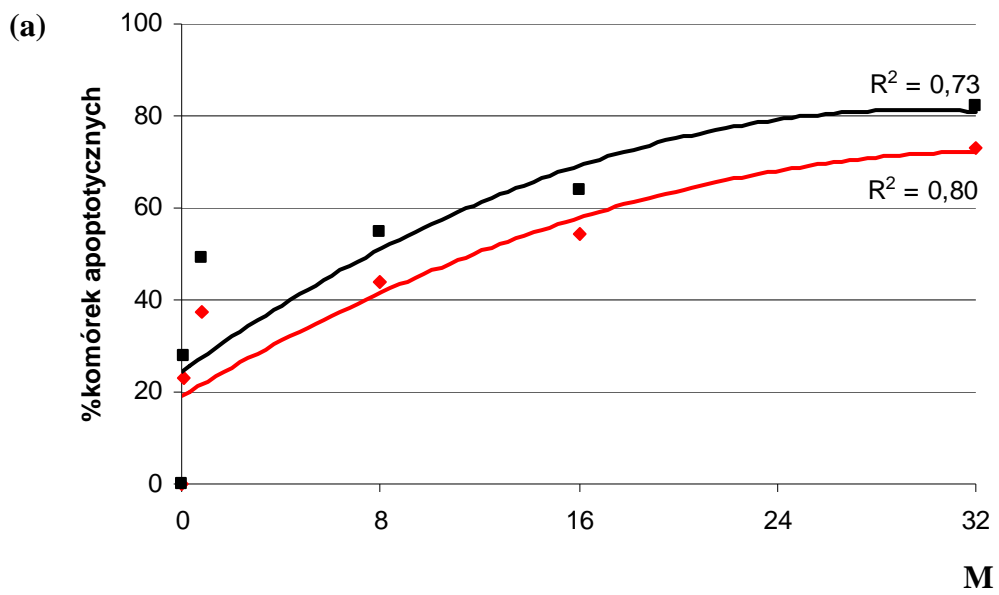
Etopozyd.

Wskaźnik apoptozy komórek obu linii poddanych działaniu etopozydu wykazywał stopniowy wzrost, zależny (kwadratowo) od dawki leku ($p < 0,001$). Czas trwania hodowli z etopozydem również miał istotny ($p < 0,05$) wpływ na wzrost wartości wskaźnika apoptozy komórek obu linii (Ryc.30, 31a i 31b).

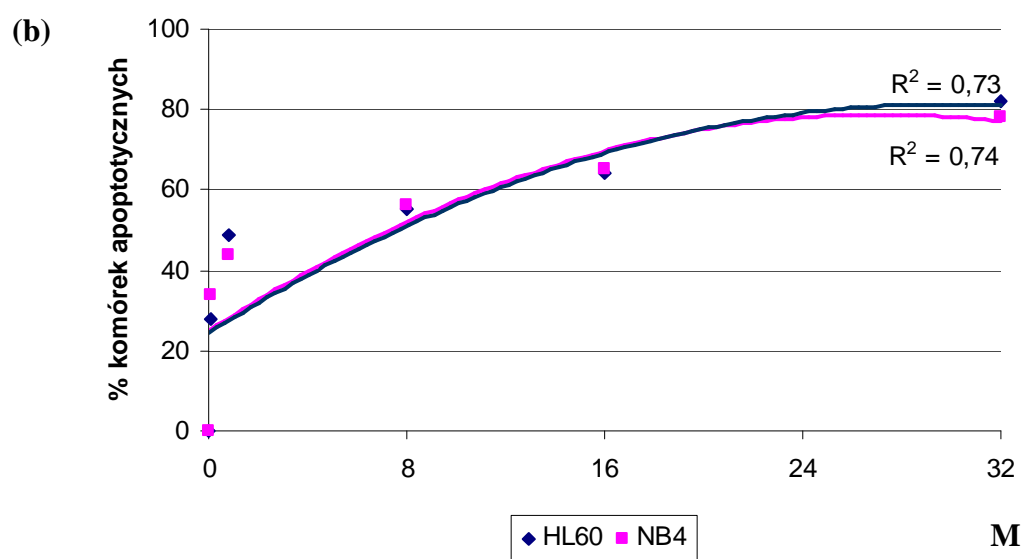
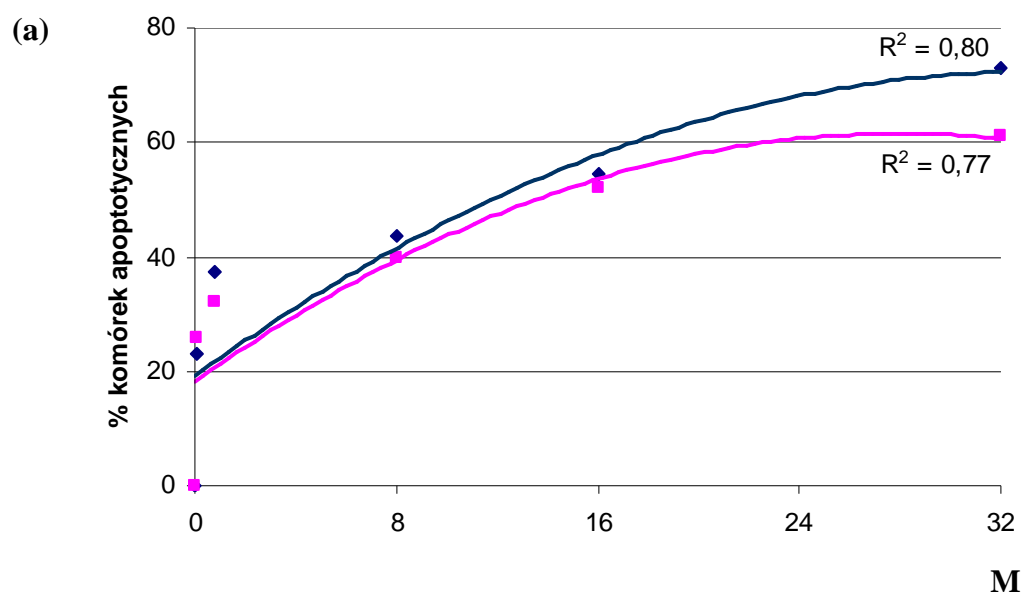
Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic w ilości komórek apoptotycznych pomiędzy linią HL60 i NB4 (Ryc. 32a i 32b).



Ryc. 30. Porównanie wskaźników apoptozy komórek HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z etopozydem.



Ryc. 31. Zależność wskaźnika apoptozy komórek HL60 (a) i NB4 (b) od dawki przy różnych czasach hodowli (24- i 48 godzin) z etopozydem.



Ryc. 32. Porównanie wskaźników apoptozy komórek linii **HL60** i **NB4** po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **etopozydem**.

2. Ocena zależności pomiędzy wskaźnikiem przeżycia a wskaźnikiem apoptozy komórek.

Dla wszystkich stosowanych leków zaobserwowano zależność odwrotnie proporcjonalną pomiędzy spadkiem przeżycia a apoptozą komórek obu linii. Podkreślić należy, że w niektórych przypadkach oba te wskaźniki wzajemnie się uzupełniały (np. 27% przeżycia i 88% apoptozy dla daunorubicyny) (Tab. 3 i 4, Ryc. 33-40 a i b).

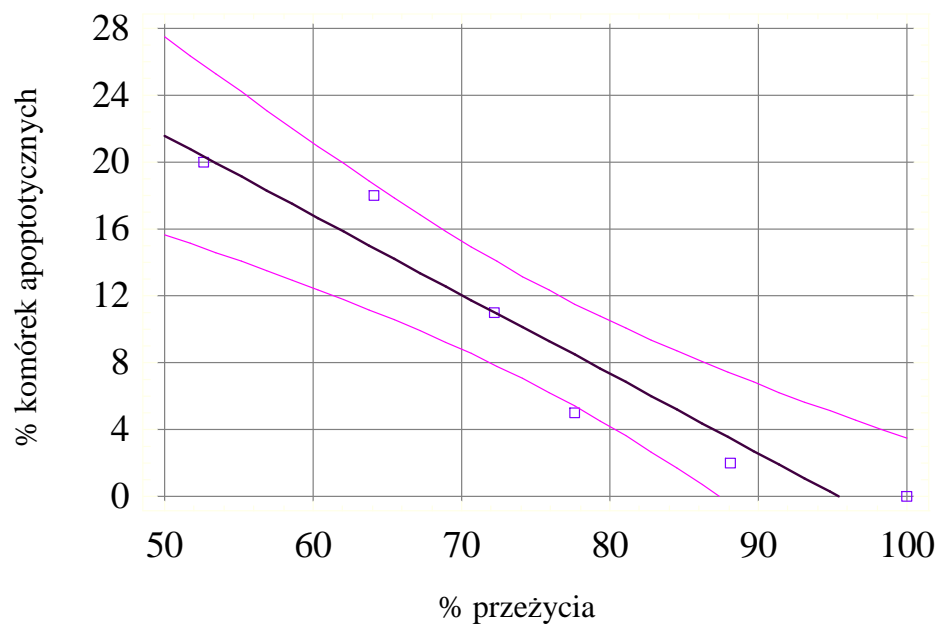
Tab. 3. Wartości współczynnika korelacji (r) i prawdopodobieństwa (p) pomiędzy przeżyciem a apoptozą komórek HL60 po 24- i 48 godzinach hodowli z lekami.

HL60/24h	Ara-C	Daunorubicyna	Mitoksantron	Etopozyd
r =	-0,96	-0,98	-0,97	-0,97
p =	0,0026	0,0003	0,0016	0,0007
HL60/48h				
r =	-0,98	-0,98	-0,97	-0,98
p =	0,0002	0,0003	0,001	0,0003

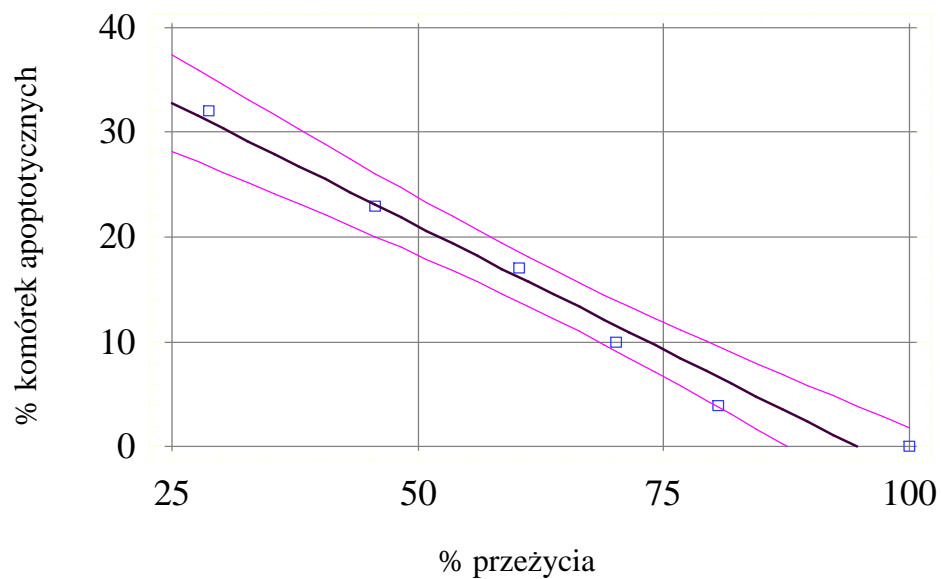
Tab. 4. Wartości współczynnika korelacji (r) i prawdopodobieństwa (p) pomiędzy przeżyciem a apoptozą komórek NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z lekami.

NB4/24h	Ara-C	Daunorubicyna	Mitoksantron	Etopozyd
r =	-0,97	-0,98	-0,93	-0,97
p =	0,0006	0,0006	0,0066	0,001
NB4/48h				
r =	-0,98	-0,98	-0,94	-0,98
p =	0,0002	0,0003	0,0046	0,0002

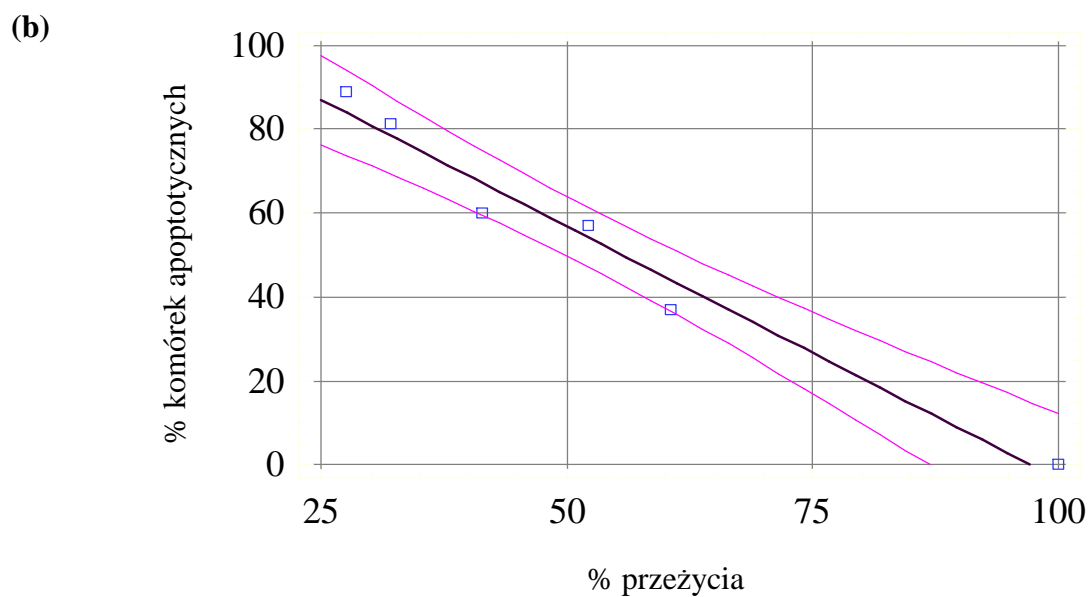
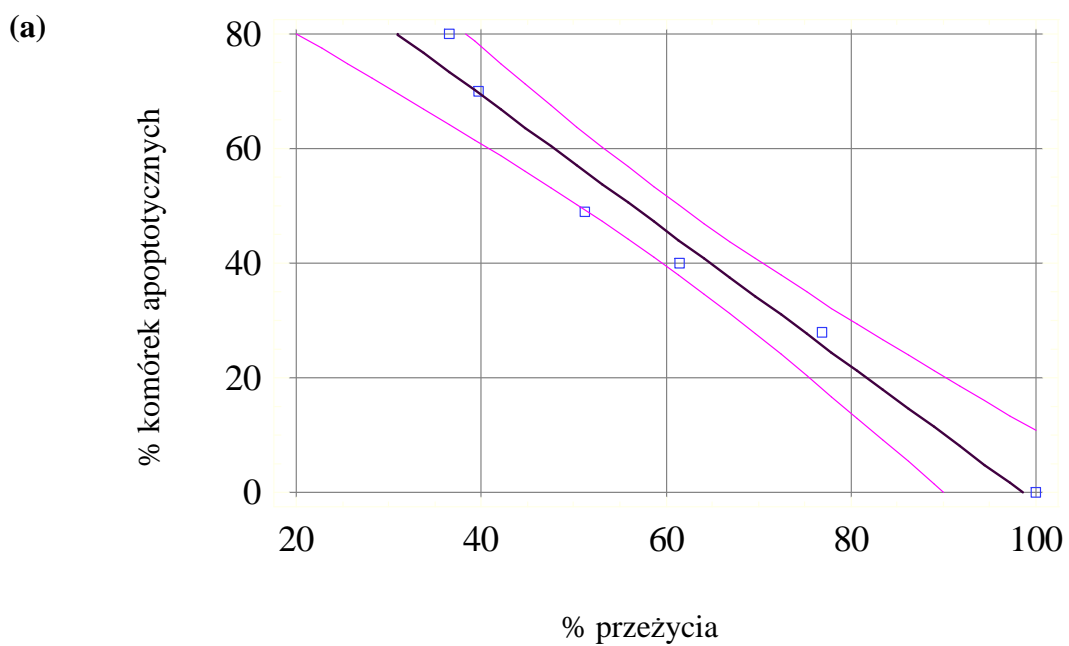
(a)



(b)

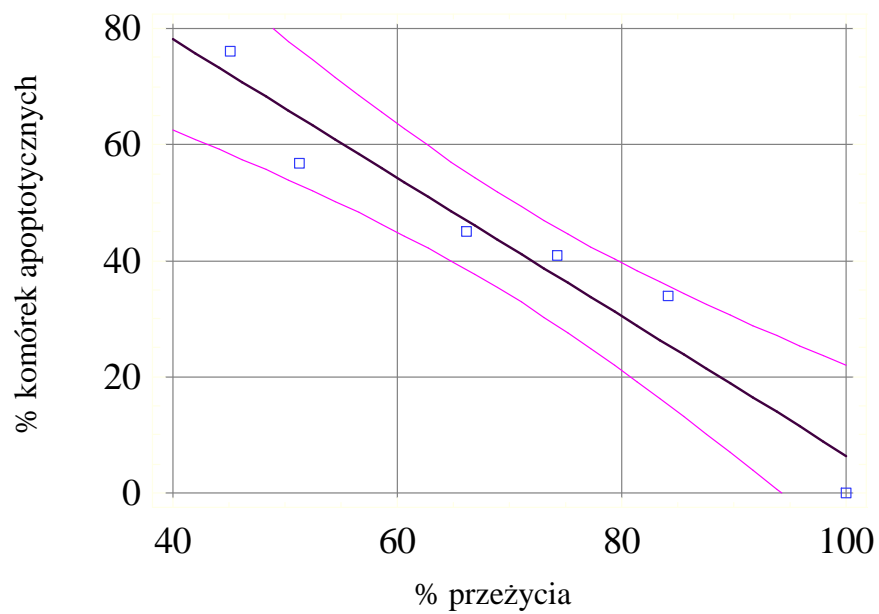


Ryc. 33. Korelacja pomiędzy przeżyciem i apoptozą komórek **HL60** po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **arabinozydem cytozynowym**.

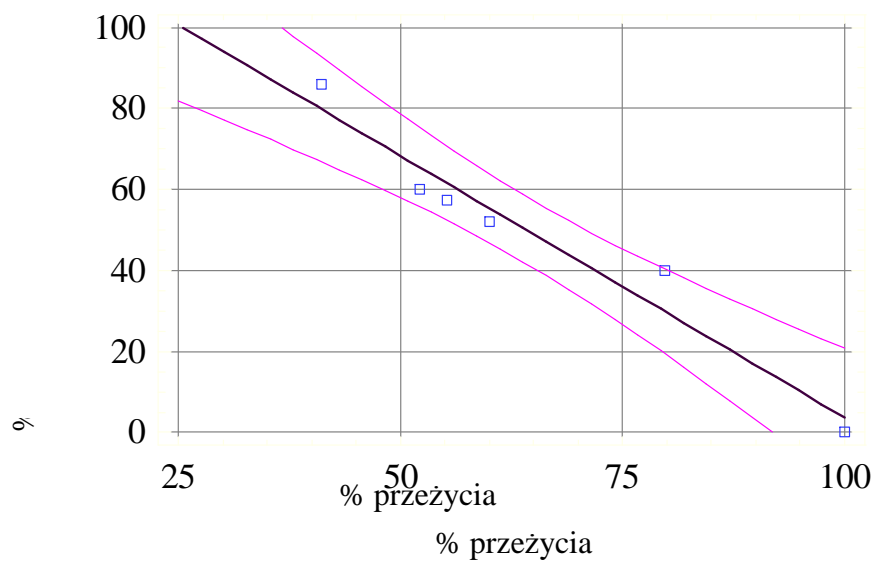


Ryc. 34. Korelacja pomiędzy przeżyciem i apoptozą komórek **HL60** po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **daunorubicyną**.

(a)

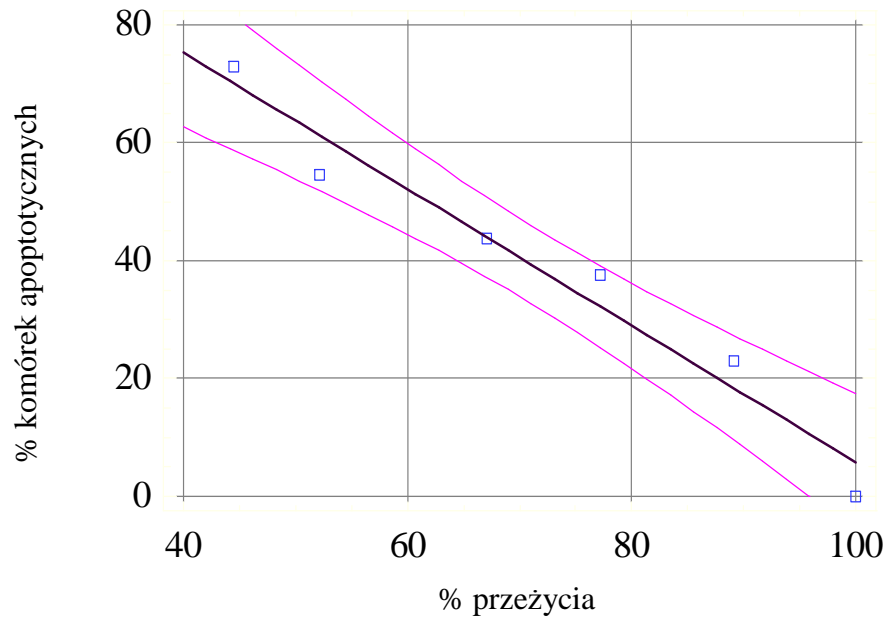


(b)

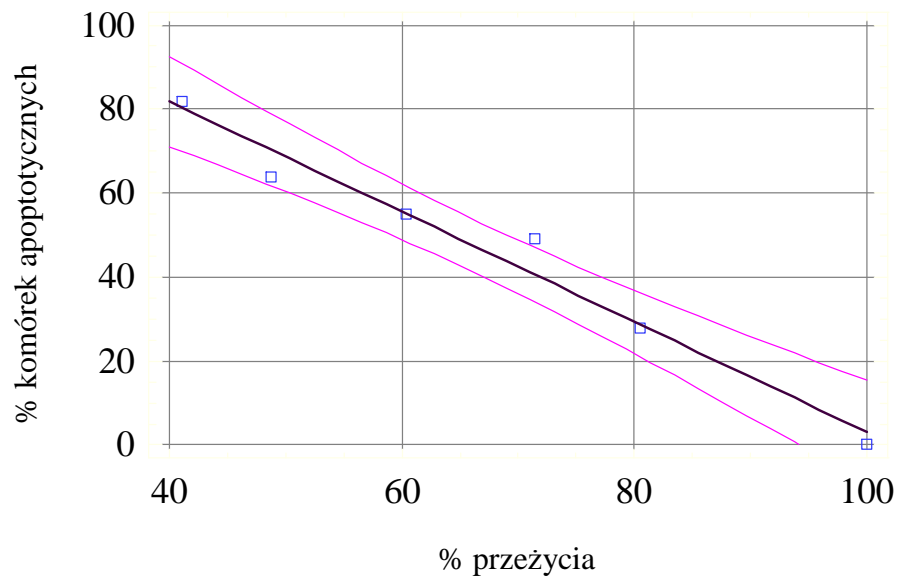


Ryc. 35. Korelacja pomiędzy przeżyciem i apoptozą komórek HL60 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z mitoksantronem.

(a)

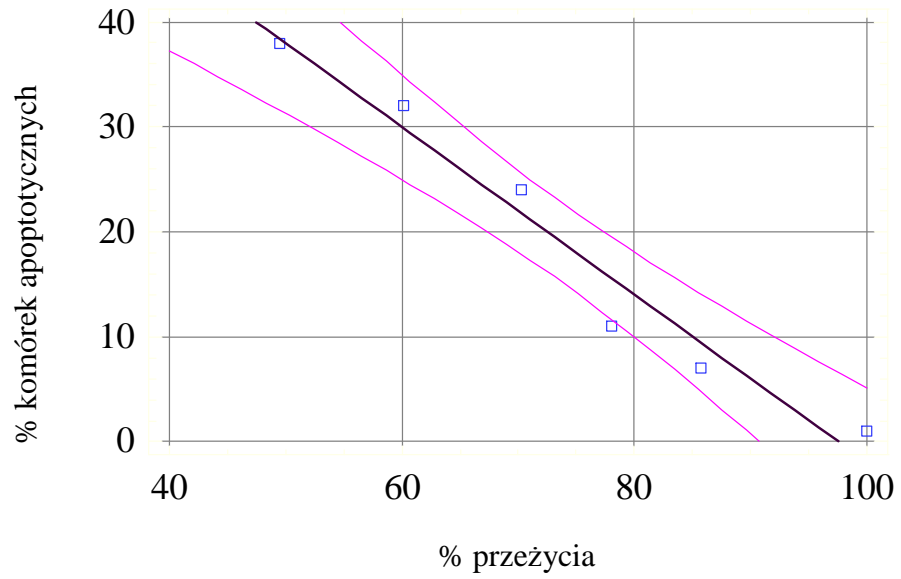


(b)

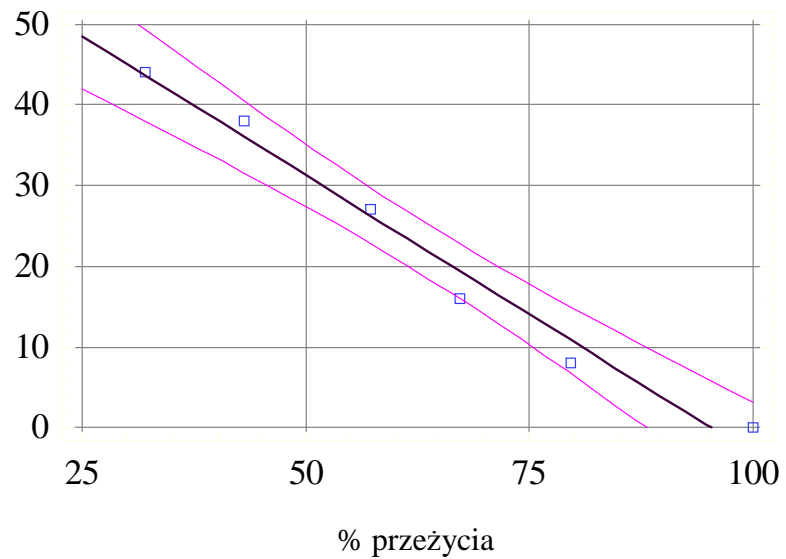


Ryc. 36. Korelacja pomiędzy przeżyciem i apoptozą komórek **HL60** po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **etopozydem**.

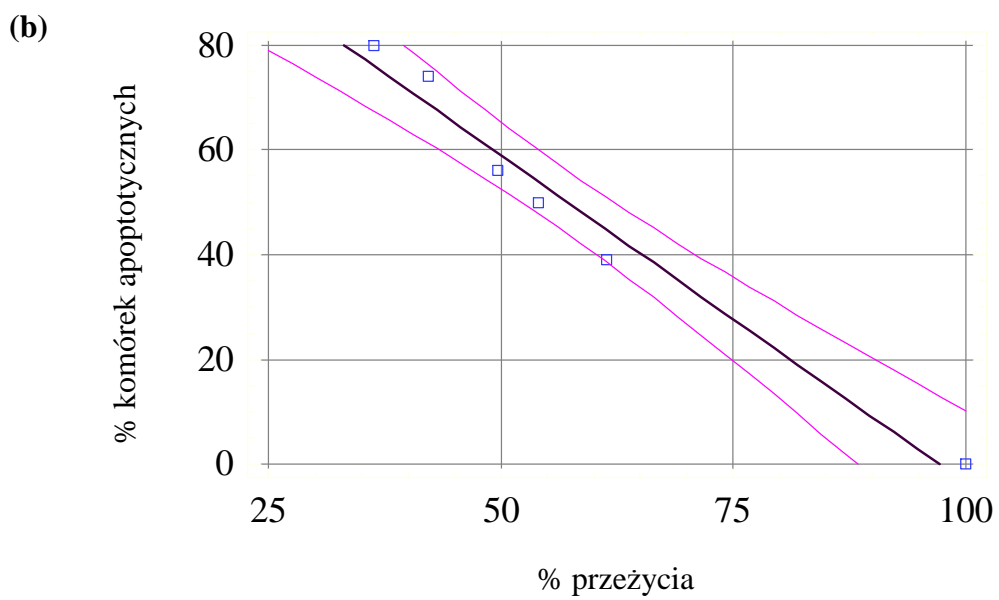
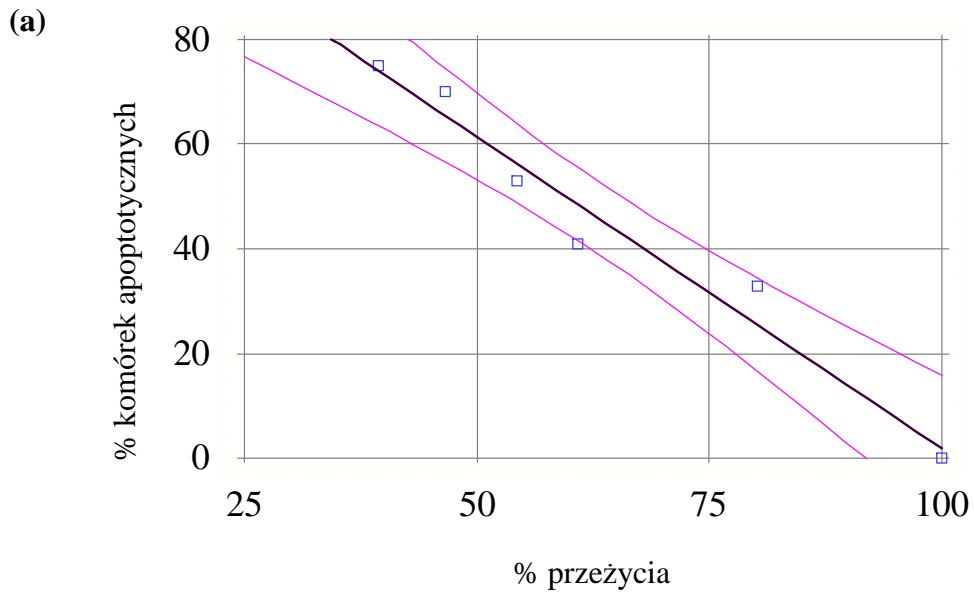
(a)



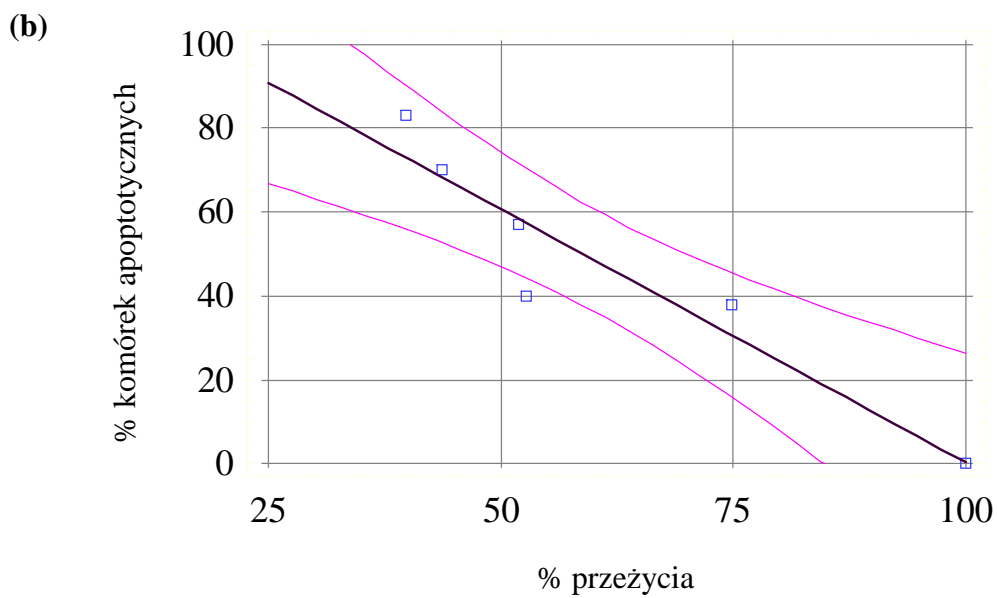
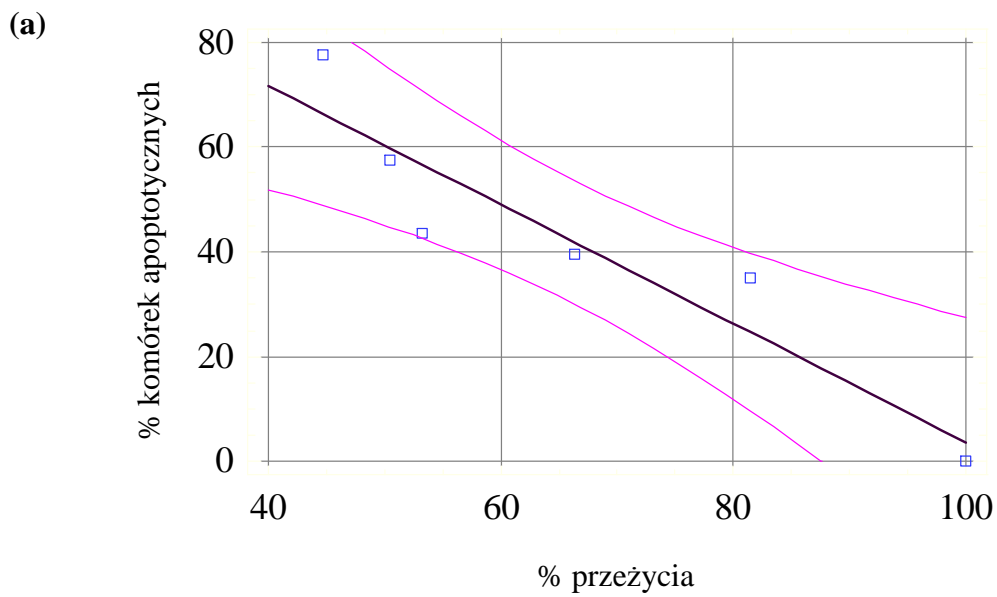
(b)



Ryc. 37. Korelacja pomiędzy przeżyciem i apoptozą komórek NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **arabinozydem cytozyny**.

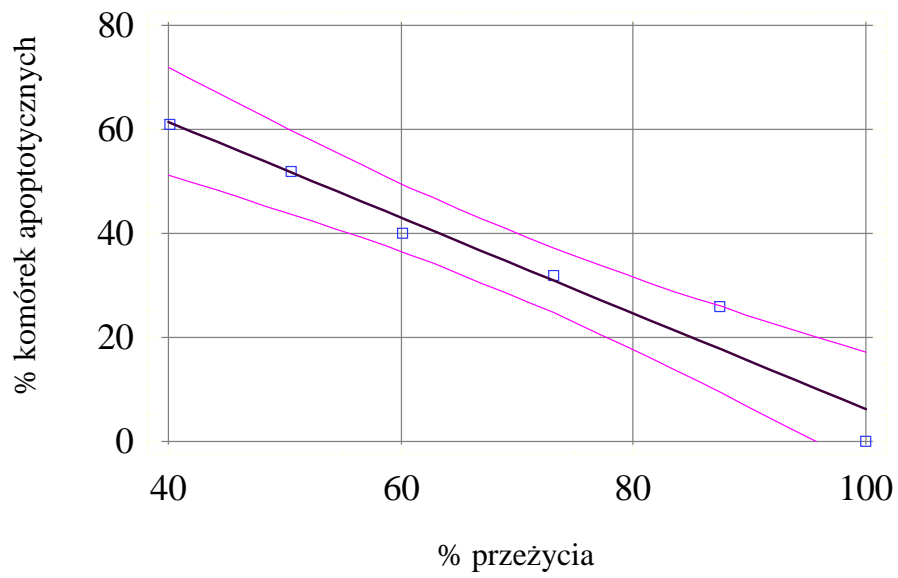


Ryc. 38. Korelacja pomiędzy przeżyciem i apoptozą komórek NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **daunorubicyną**.

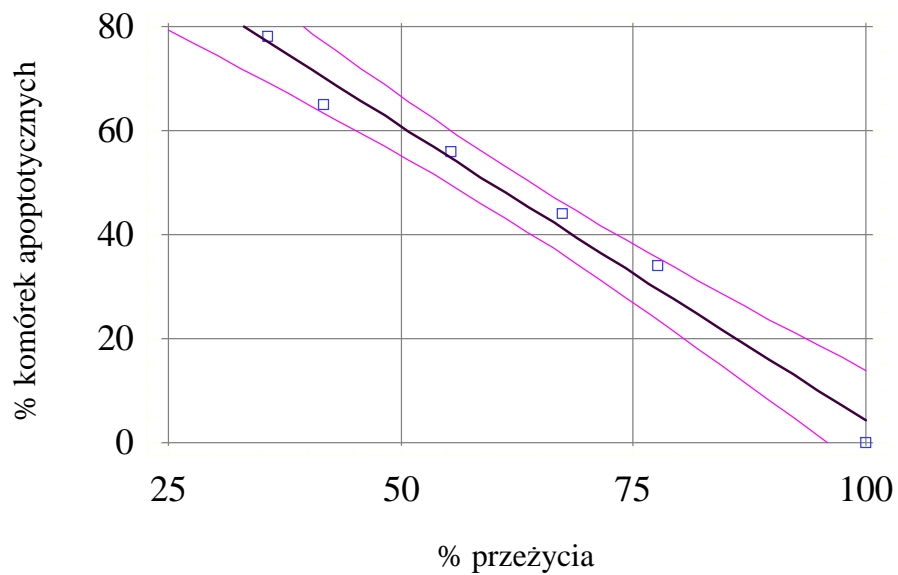


Ryc. 39. Korelacja pomiędzy przeżyciem i apoptozą komórek NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z mitoksantronem.

(a)



(b)

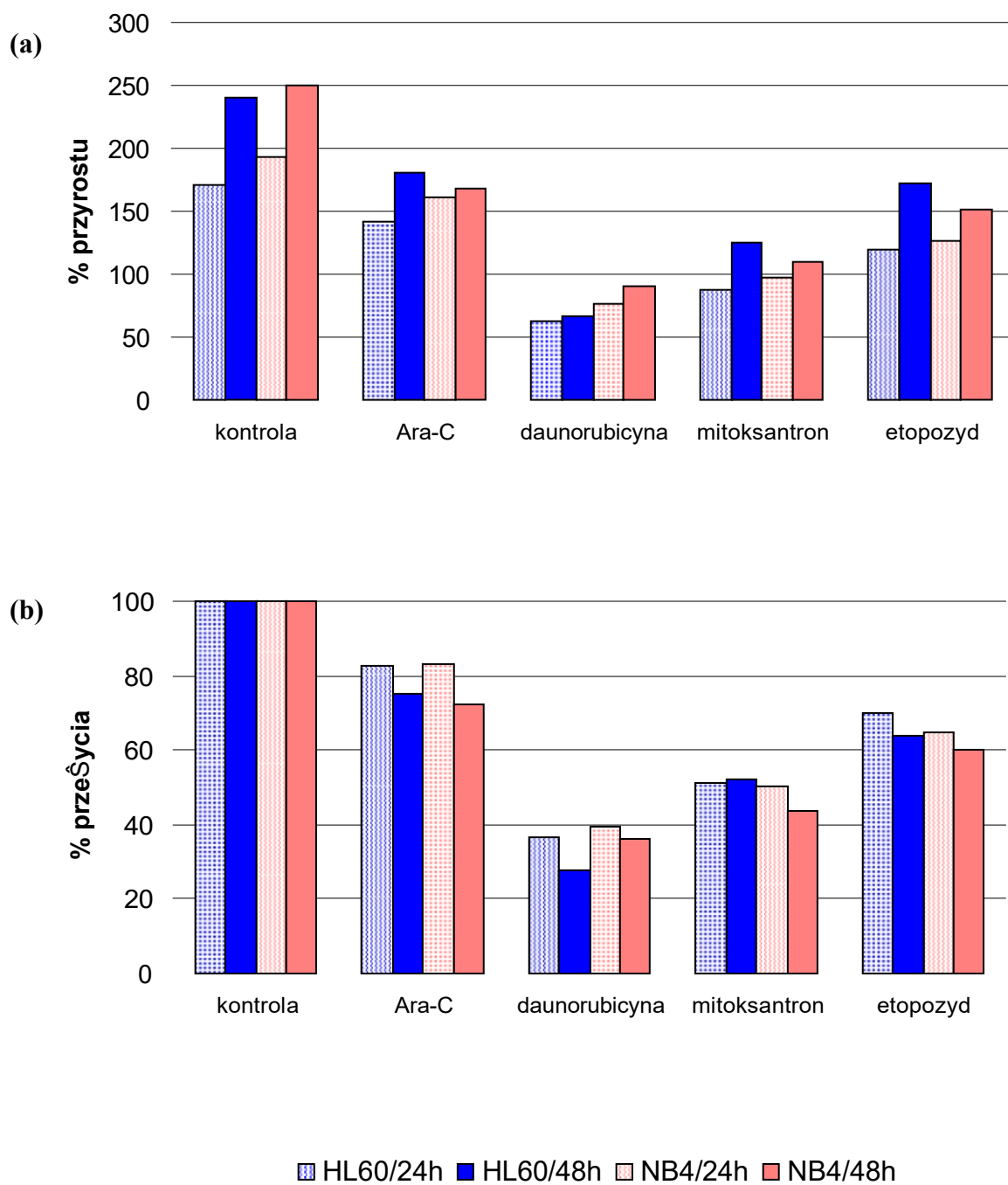


Ryc. 40. Korelacja pomiędzy przeżyciem i apoptozą komórek NB4 po 24- (a) i 48 godzinach (b) hodowli z **etopozydem**.

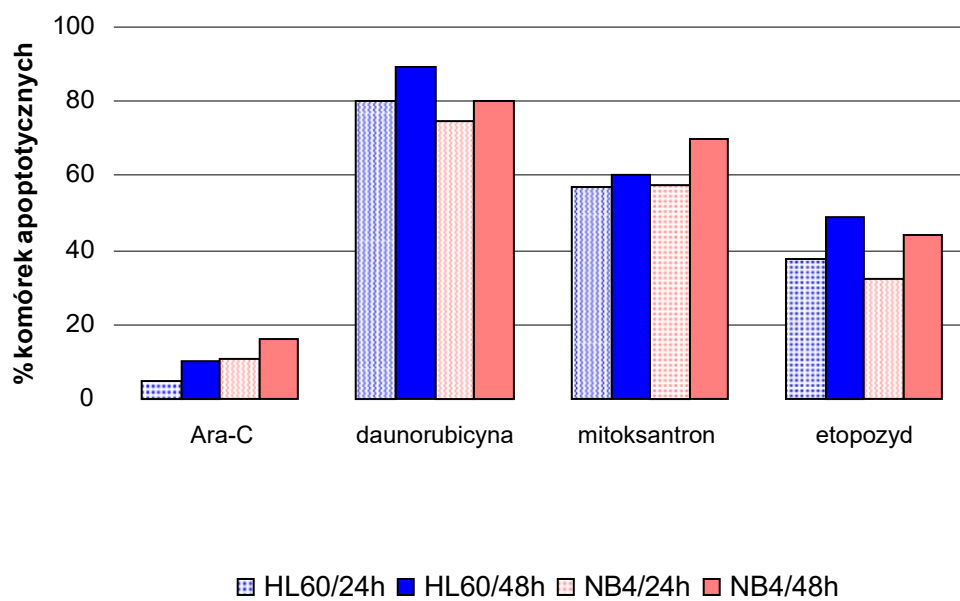
3. Porównanie wrażliwości komórek obu linii w stosunku do tej samej dawki badanych leków.

Wszystkie leki zastosowane w tej samej dawce (0,8 μ M) spowodowały statystycznie znamienne spadki wskaźników przyrostu i przeżycia ($p < 0,01$). Wrażliwość komórek była najwyższa w stosunku do daunorubicyny. Efekt działania mitoksantronu był nieco słabszy, a najmniejszą wrażliwość wykazano po zastosowaniu arabinozydu cytozyny i etopozydu (Ryc. 41a i 41b). Obie linie nie różniły się znacząco wrażliwością na leki mierzoną w powyższy sposób.

Podobny wynik otrzymano porównując odsetek komórek apoptotycznych uzyskany dla dawki 0,8 μ M. Wrażliwość komórek była najwyższa dla daunorubicyny, potem mitoksantronu, a najniższa wobec etopozydu i arabinozydu cytozyny (różnice istotne statystycznie, $p < 0,05$) (Ryc.42). Przy tej dawce leków obie linie komórkowe nie wykazały różnic we wrażliwości na badane leki.



Ryc. 41. Porównanie wskaźników przyrostu (a) i przeżycia komórek (b) HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z lekami w stężeniu **0,8 μ M**.



Ryc. 42. Porównanie wskaźnika apoptozy komórek HL60 i NB4 po 24- i 48 godzinach hodowli z lekami w stężeniu **0,8 μM**.

4. Ocena procesu różnicowania komórek.

Komórki poddane działaniu czynników różnicujących: ATRA i PMA porównywano z komórkami hodowanymi bez obecności tych czynników.

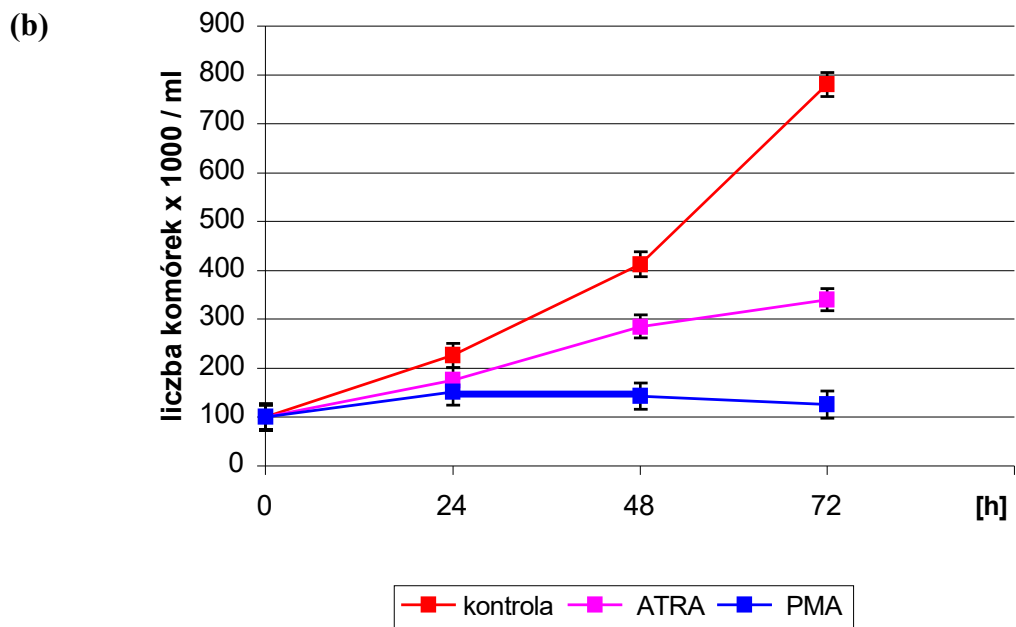
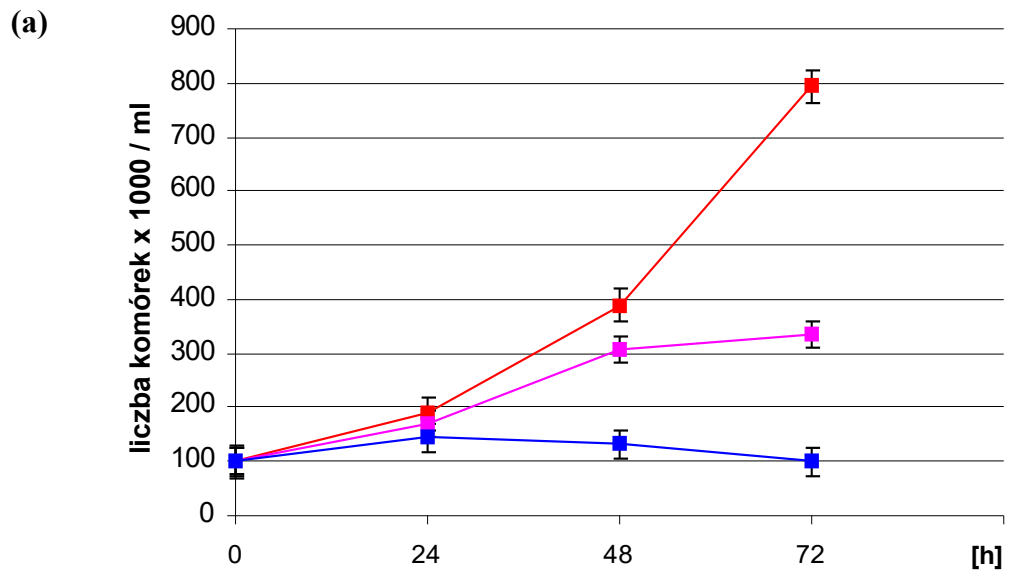
Za wyznaczniki postępującego różnicowania komórek przyjęto:

- spadek ich potencjału podziałowego
- zmiany w morfologii komórek
- wzrost aktywności enzymów utleniających wyrażony redukcją soli tetrazolowych
- pojawienie się markerów powierzchniowych charakterystycznych dla bardziej dojrzałych form komórkowych

4.1. Ocena potencjału podziałowego (liczba komórek w 1ml).

W hodowlach obu linii stymulowanych ATRA lub PMA stwierdzono spadek liczby komórek zaznaczający się po 48 godzinach hodowli i bardzo wyraźny po 72 godzinach (różnice istotne statystycznie: $p < 0,001$) (Ryc. 43a i 43b). Wskazuje to na obniżenie potencjału podziałowego komórek pod wpływem czynnika różnicującego. Silniejszy efekt w tym względzie wywierała inkubacja z PMA ($p < 0,05$).

Nie stwierdzono istotnych różnic w tempie proliferacji pomiędzy komórkami HL60 i NB4 stymulowanymi do różnicowania.

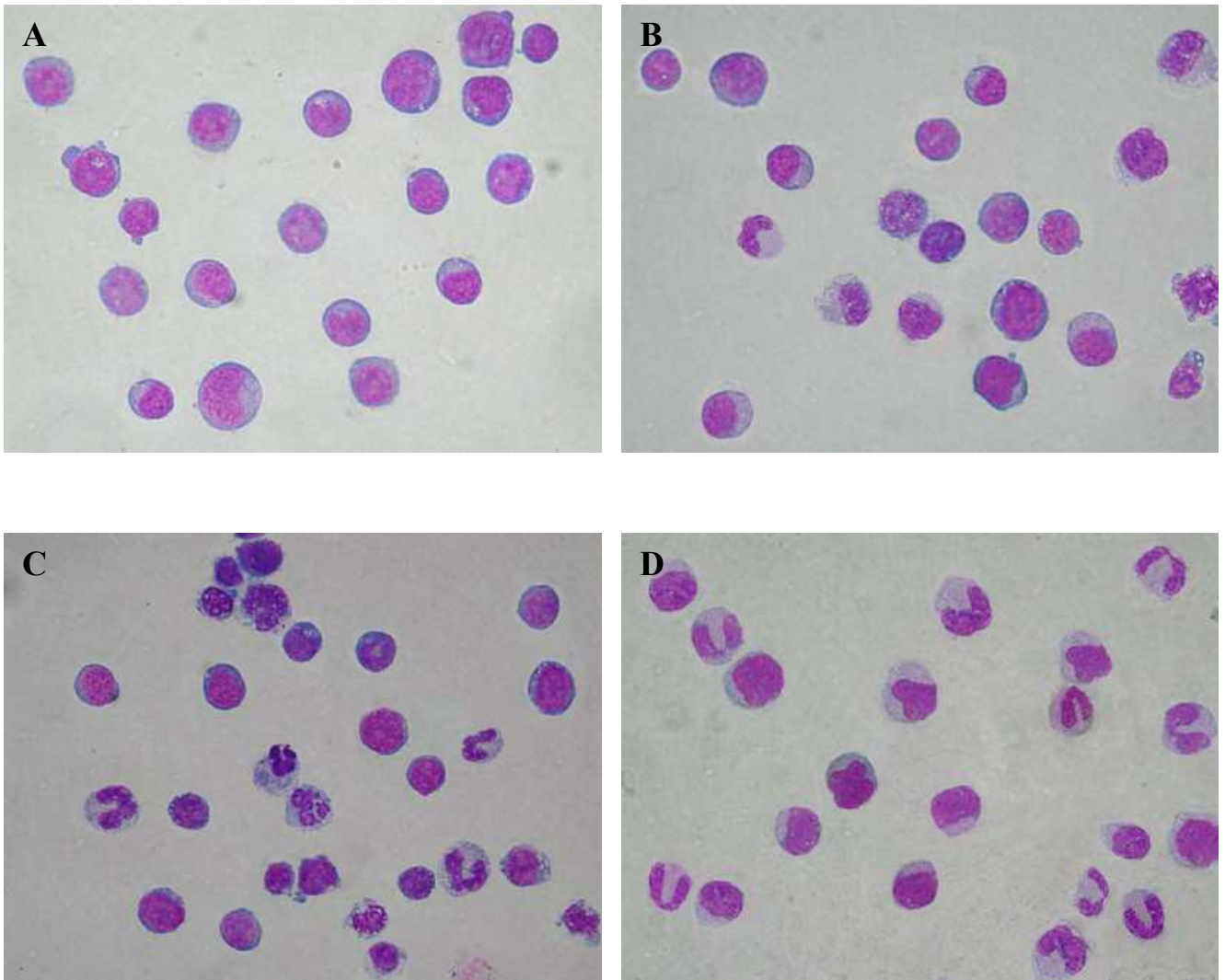


Ryc. 43. Proliferacja komórek HL60 (a) i NB4 (b) po indukcji różnicowania przy udziale ATRA i PMA.

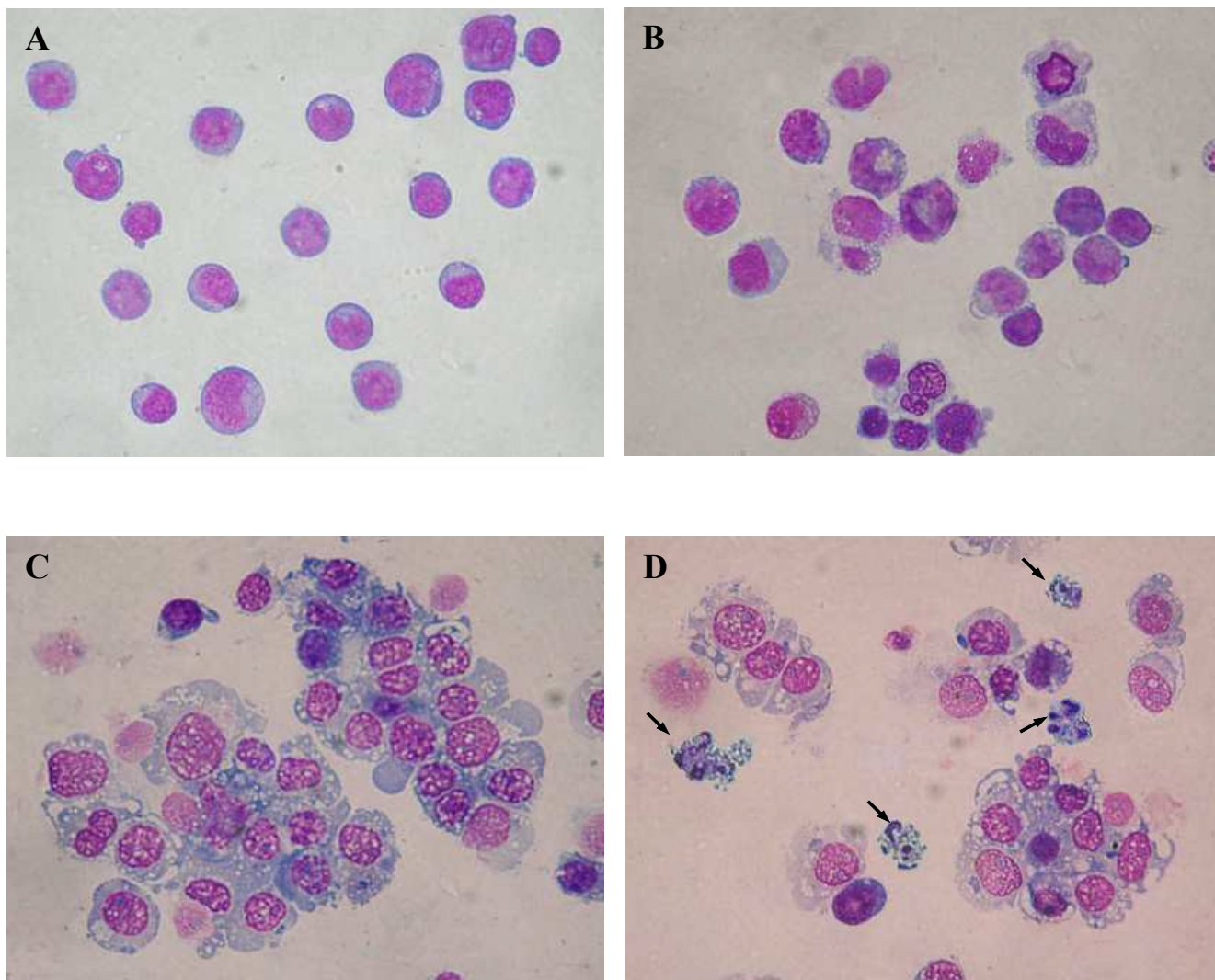
4.2. Ocena morfologiczna.

Obie linie komórkowe zmieniały się morfologicznie pod wpływem zastosowanych induktorów różnicowania. Końcowy obraz hodowli nie zależał od wyjściowej linii komórkowej lecz od rodzaju induktora. Po stymulacji różnicowania przy udziale ATRA zauważono zmianę obrazu hodowli: zróżnicowanie kształtu i wielkości komórek. Na barwionych rozmazach, oprócz komórek o dużych, okrągłych lub nerkowatych jądrach i niewielkiej ilości silnie zasadochłonnej cytoplazmy, pojawiły się komórki o jądrach głęboko wciętych (podkowiastych lub pałeczkowatych) i jaśniejszą cytoplazmą. Można było też zauważyć zmniejszenie stosunku jądro-cytoplazma w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Świadczy to o przejściu komórek z etapu mieloblastów i promielocytów do form bardziej dojrzałych odpowiadających metamielocytom i granulocytom pałeczkowatym. Proporcja komórek bardziej zróżnicowanych wzrastała w miarę przedłużania czasu hodowli z czynnikiem stymulującym różnicowanie (Fot. 2 i 4).

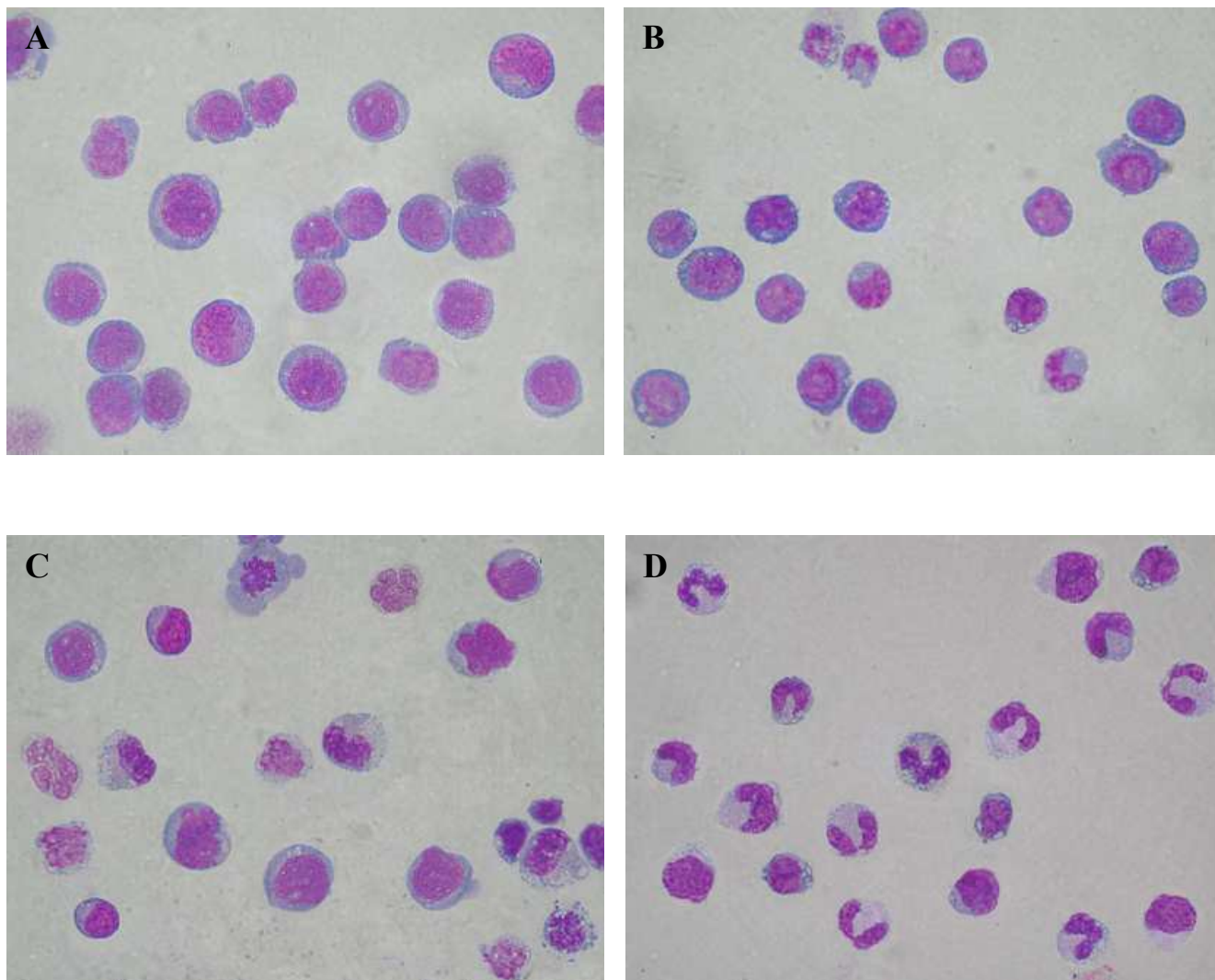
Na rozmazach komórek poddanych działaniu PMA obserwowano stopniowe powiększanie się rozmiarów komórek, rozrzedzenie chromatyny jądrowej, przejaśnienie i wakuolizację cytoplazmy. Tak zmienione komórki przylegały często do siebie tworząc duże skupiska, liczące po kilkanaście komórek. Taki obraz komórek stymulowanych odpowiadał monoblastom, a nawet monocytom czy makrofagom. W hodowlach dłuższych (od 48 godzin) obserwowano komórki apoptotyczne (Fot. 3 i 5).



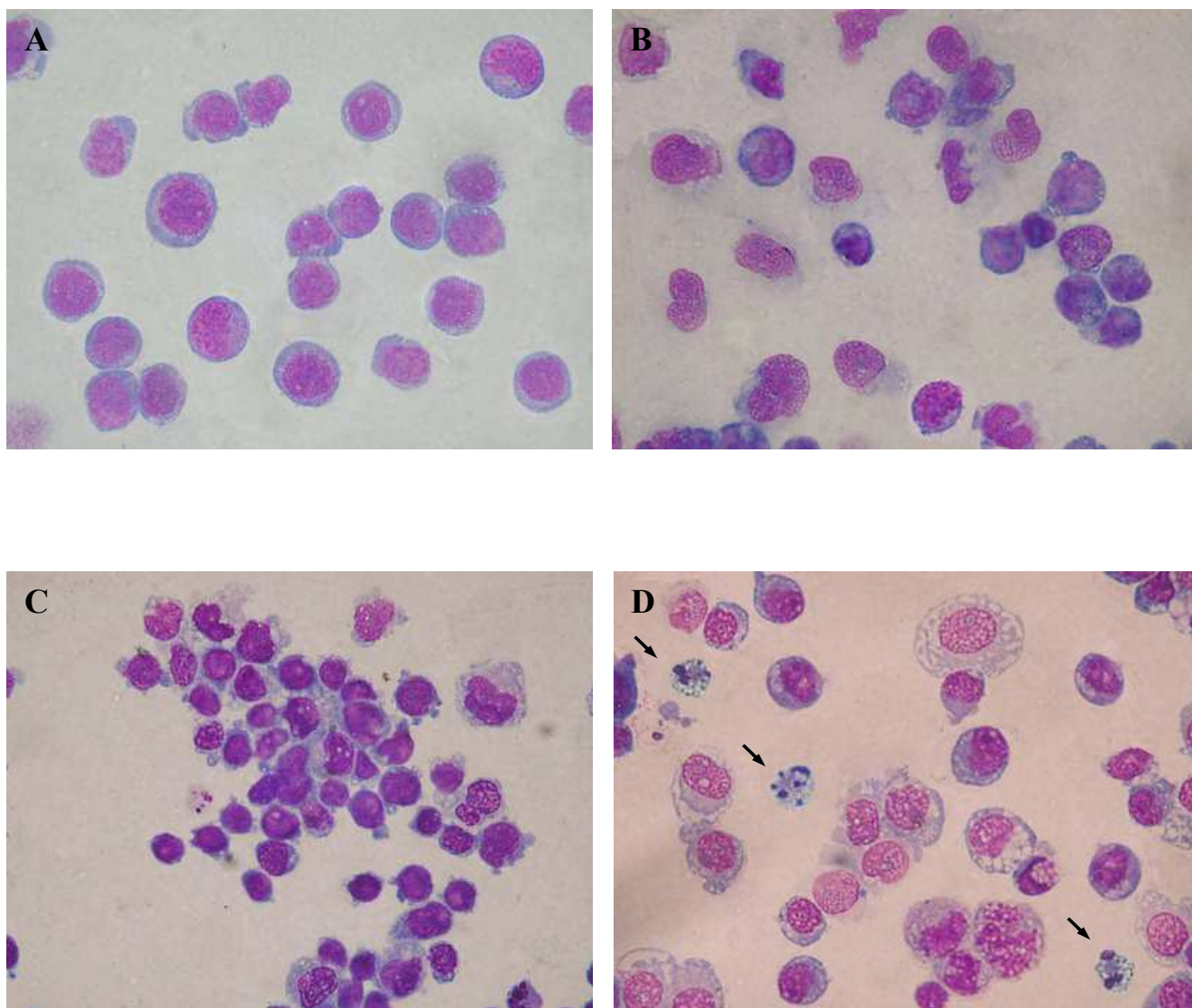
Fot.2. Obraz komórek **HL60** barwionych metodą May-Grünwalda-Giemsy nie stymulowanych (**A**) oraz stymulowanych do różnicowania przy udziale **ATRA** przez 24-**(B)**, 48-**(C)** i 72 **(D)** godziny (powiększenie x 400).



Fot.3. Obraz komórek **HL60** barwionych metodą May-Grünwalda-Giemsy nie stymulowanych (**A**) oraz stymulowanych do różnicowania przy udziale **PMA** przez 24-**(B)**, 48-**(C)** i 72 **(D)** godziny (powiększenie x 400); strzałki wskazują komórki apoptotyczne.



Fot.4. Obraz komórek NB4 barwionych metodą May-Grünwalda-Giemsy nie stymulowanych (A) oraz stymulowanych do różnicowania przy udziale ATRA przez 24-(B), 48-(C) i 72 (D) godziny (powiększenie x 400).



Fot.5. Obraz komórek NB4 barwionych metodą May-Grünwalda-Giemsy nie stymulowanych (A) oraz stymulowanych do różnicowania przy udziale PMA przez 24-(B), 48-(C) i 72 (D) godziny (powiększenie x 400); strzałki wskazują komórki apoptotyczne.

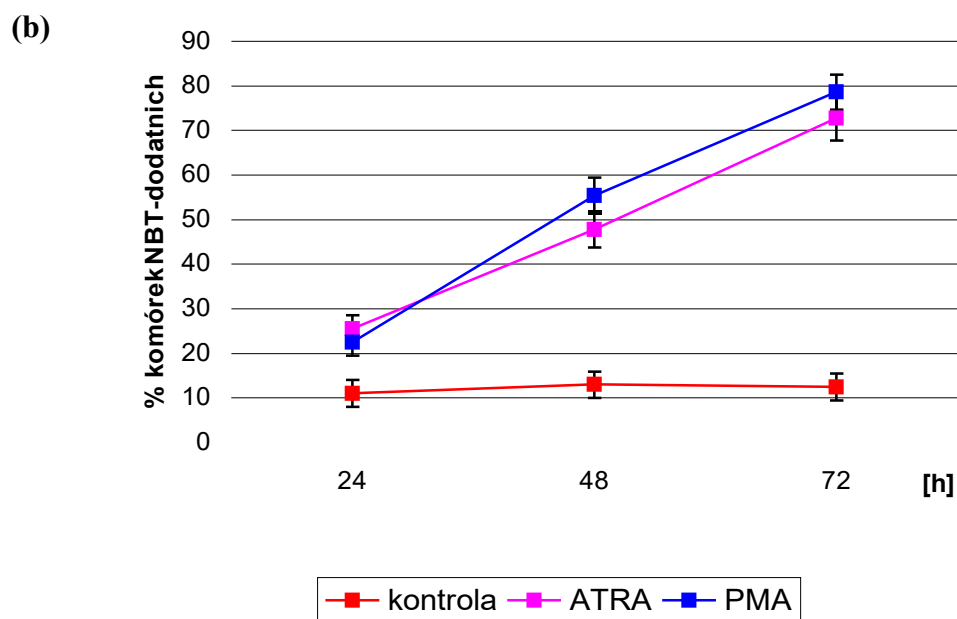
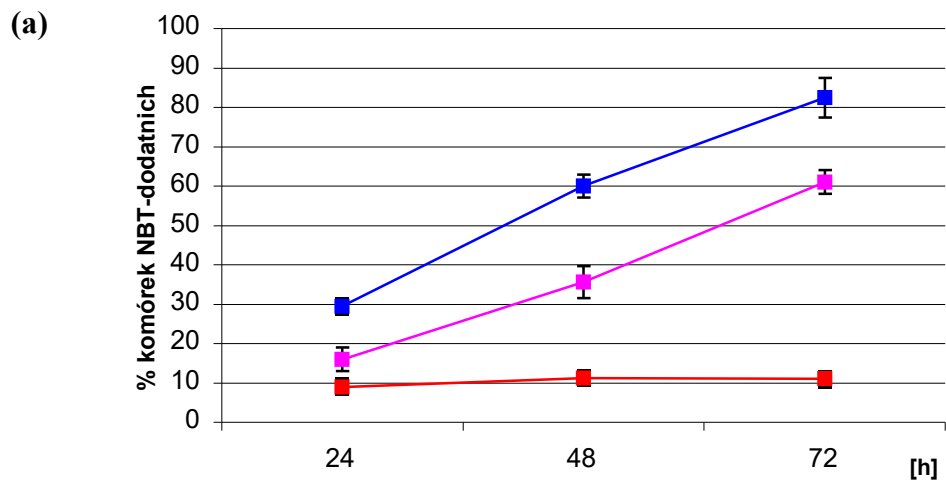
4.3. Test NBT.

W celu oceny stymulacji różnicowania badano również zdolność komórek do indukcji „wybuchu tlenowego” przy użyciu testu NBT. Hodowle kontrolne wykazały około 10% odsetek komórek z ciemnoniebieskimi złożami zredukowanej soli tetrazolowej (komórki NBT-dodatnie) dla wszystkich analizowanych punktów czasowych. Po inkubacji z ATRA lub PMA zaobserwowano wzrost liczby komórek zdolnych do redukcji NBT w porównaniu z kontrolą, przy czym liczba takich komórek wzrastała w miarę przedłużania inkubacji z czynnikiem różnicującym (Tab. 5, Ryc. 44a i 44b). Komórki linii HL60 okazały się w tym teście bardziej wrażliwe na stymulację PMA niż ATRA. Odsetek komórek NBT-dodatnich w tej linii był bowiem znamienne ($p < 0,005$) wyższy po stymulacji za pomocą PMA niż po stymulacji z użyciem ATRA. Efekt działania ATRA na komórki HL60 był przy tym istotnie ($p < 0,005$) niższy od efektu wywieranego na komórki NB4.

W odniesieniu do komórek linii NB4 oba czynniki użyte do indukcji różnicowania spowodowały podobny wzrost odsetka komórek NBT-dodatnich (porównywalny z wartościami uzyskanymi dla linii HL60 po zastosowaniu PMA).

Tab. 5. Wartości odsetka komórek NBT-dodatnich stymulowanych do różnicowania.

czas hodowli	% komórek NBT-dodatnich (\pm SD)			
	ATRA		PMA	
	HL60	NB4	HL60	NB4
24 h	16,0 (\pm 2,5)	25,5 (\pm 3,5)	29,4 (\pm 3,0)	22,5 (\pm 3,2)
48 h	35,6 (\pm 2,0)	47,8 (\pm 4,3)	60,0 (\pm 3,3)	55,4 (\pm 4,1)
72 h	61,0 (\pm 5,2)	72,8 (\pm 5,0)	82,4 (\pm 5,5)	78,6 (\pm 4,4)



Ryc. 44. Redukcja NBT w komórkach **HL60** (a) i **NB4** (b) po indukcji różnicowania przy udziale ATRA i PMA.

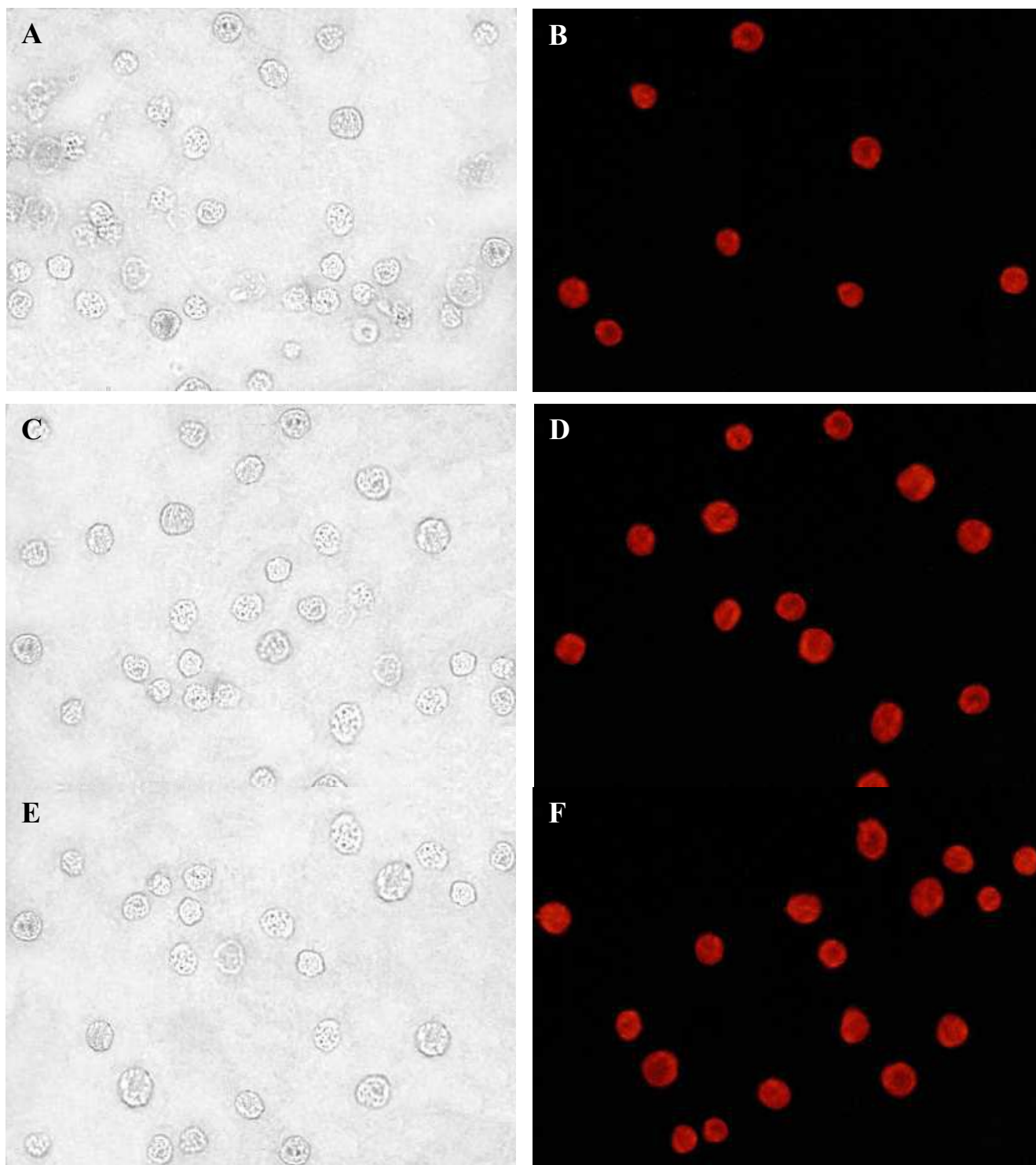
4.4. Immunofluorescencyjna ocena antygenów powierzchniowych CD11b i CD14.

Hodowle kontrolne, nie stymulowane do różnicowania, wykazywały niski (około 3%) odsetek komórek z ekspresją CD11b i CD14. Już po 24 godzinach od podania czynników stymulujących różnicowanie zaobserwowano statystycznie istotny ($p < 0,001$) wzrost liczby komórek wykazujących czerwoną fluorescencję (do 20-40%) (Tab. 6, Fot. 6, Ryc. 45a i 45b). W przypadku obu linii liczba komórek wykazujących obecność antygeny CD11b osiągała najwyższe wartości po stymulacji ATRA. Przy hodowli trwającej 72 godziny liczba komórek linii HL60 wykazujących ekspresję CD11b, uzyskana pod wpływem ATRA, nie odbiegała znacząco od liczby komórek z tym antygenem po indukcji PMA.

Drugi z antygenów powierzchniowych CD14, wykrywany był tylko po stymulacji PMA. Wyższy poziom ekspresji CD14 (wyrażony liczbą komórek) obserwowano w populacji HL60 niż w populacji NB4, różnice te były istotne statystycznie ($p < 0,05$) w przedziale czasowym 48-72 godziny.

Tab. 6. Odsetek komórek wykazujących ekspresję antygenów CD11b i CD14 po inkubacji z czynnikami różnicującymi.

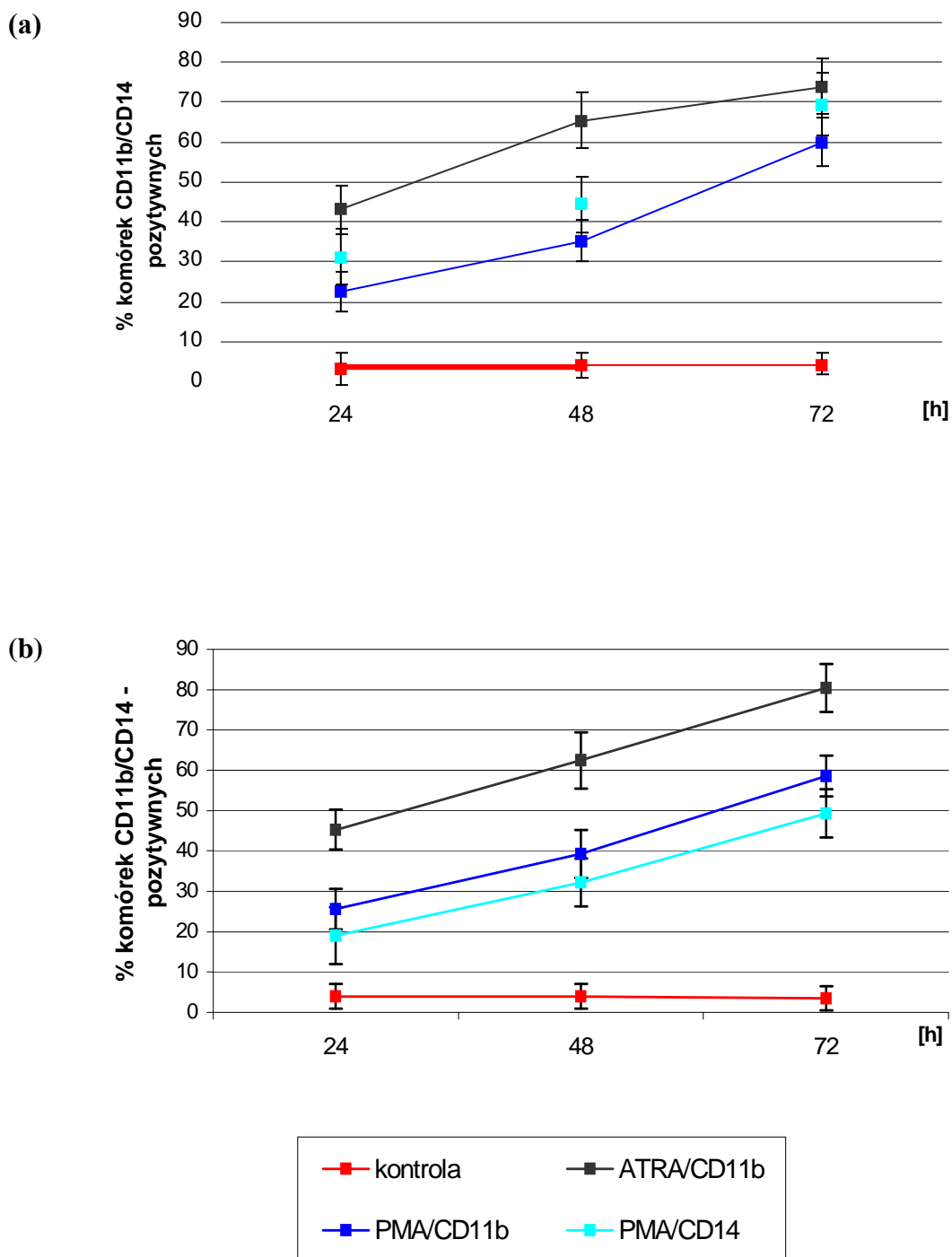
rodzaj komórek	czas inkubacji	% komórek pozytywnych (\pm SD)		
		ATRA CD11b	PMA CD11b	PMA CD14
HL60	24 h	43,0 (\pm 5,0)	22,5 (\pm 6,4)	31,2 (\pm 7,5)
	48 h	65,3 (\pm 6,5)	35,3 (\pm 6,3)	44,5 (\pm 6,5)
	72 h	74,0 (\pm 5,2)	70,0 (\pm 7,2)	69,5 (\pm 6,4)
NB4	24 h	45,3 (\pm 7,0)	25,6 (\pm 5,5)	19,0 (\pm 6,0)
	48 h	62,5 (\pm 5,6)	39,3 (\pm 6,2)	32,2 (\pm 5,3)
	72 h	80,4 (\pm 7,6)	58,6 (\pm 6,6)	49,3 (\pm 6,7)



Fot.6. Ekspresja antygenu **CD11b** na komórkach **HL60** stymulowanych do różnicowania przy udziale **ATRA** przez **24-(A,B)**, **48-(C,D)** i **72 (E,F)** godziny.

A, C, E - obrazy komórek w świetle przechodzącym;

B, D, F - obrazy tych samych komórek po wzbudzeniu fluorescencji umożliwiają ocenę proporcji komórek wykazujących obecność badanego antygenu.
(powiększenie x 200)



Ryc. 45. Ekspresja antygenów powierzchniowych **CD11b** i **CD14** na komórkach HL60 (a) i NB4 (b) po stymulacji różnicowania przy udziale ATRA oraz PMA. Kontrola przedstawia średnie wartości odsetka komórek pozytywnych dla CD11b i CD14.

5. Lekowrażliwość komórek HL60 i NB4 po indukcji różnicowania.

5.1. Efekt działania leków po preinkubacji komórek z ATRA.

Po preinkubacji z ATRA, a następnie 24-godzinnej hodowli z Ara-C i mitoksantronem następowało wyraźne, statystycznie znamienne ($p < 0,005$) obniżenie wskaźników przyrostu i przeżycia w stosunku do komórek niestymulowanych do różnicowania (Ryc. 46a i 46b, 47a i 47b).

Preinkubacja z ATRA nie zmieniała wrażliwości komórek na daunorubicynę.

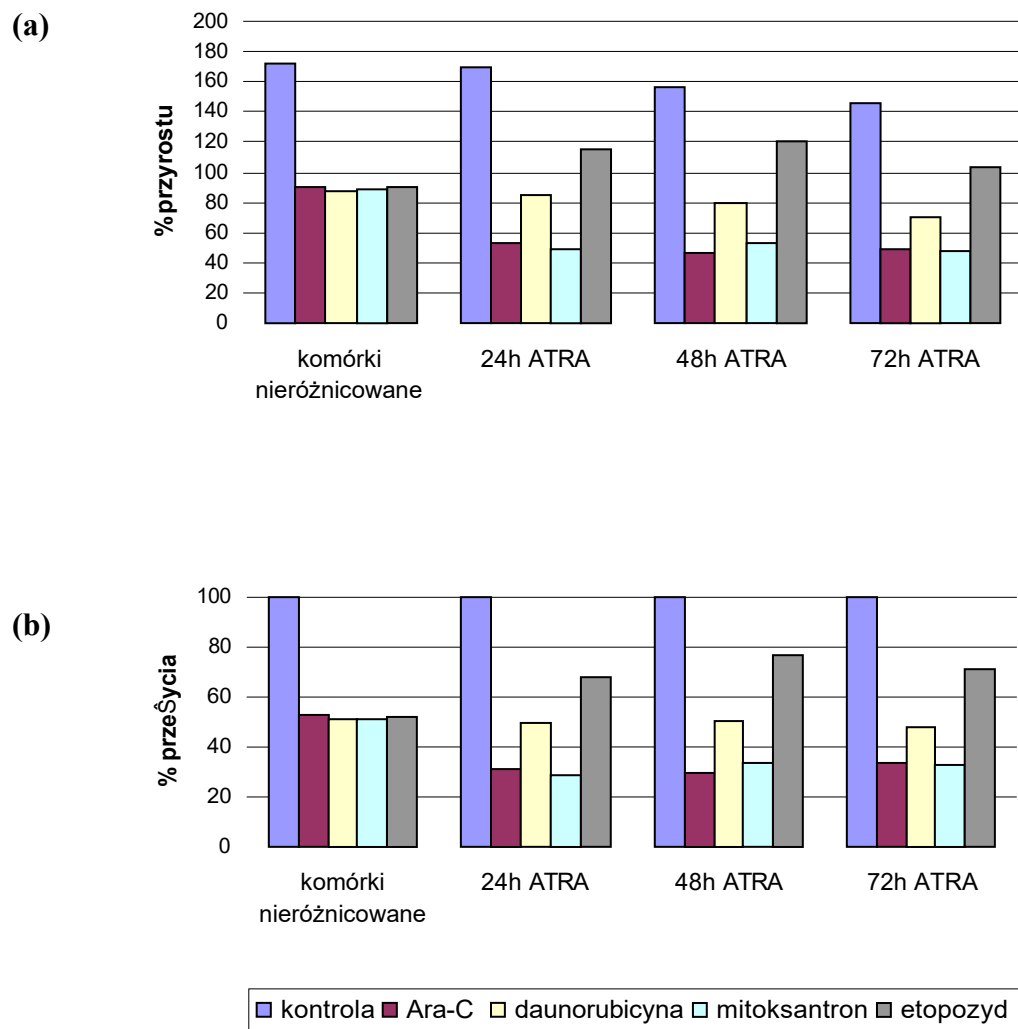
W stosunku do etopozydu stymulacja różnicowania przez ATRA skutkowałą znacznie słabszym zahamowaniem przyrostu i przeżycia, gdyż oba wskaźniki osiągały wartości istotnie wyższe ($p < 0,005$) niż dla komórek nieróżnicowanych.

Pewnym dopełnieniem tych obserwacji było zachowanie się wskaźnika apoptozy, który wzrastał przy spadku przyrostu i przeżycia (pod wpływem Ara-C), a spadał przy wzroście przyrostu i przeżycia (pod wpływem etopozydu).

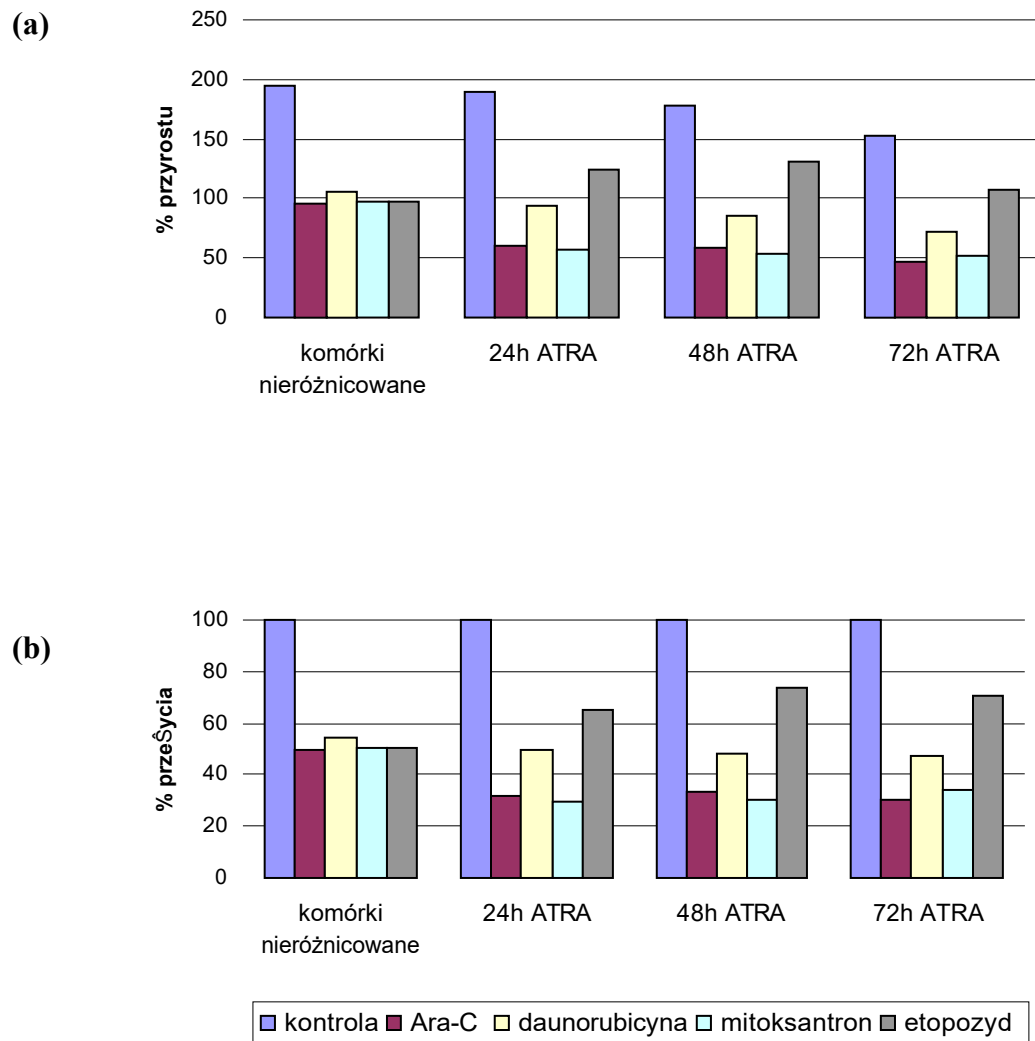
W stosunku do daunorubicyny i mitoksantronu nie obserwowano takiej równoległości.

Wskaźnik apoptozy wywołanej daunorubicyną wykazywał bowiem znamienne statystycznie ($p < 0,005$) spadek po preinkubacji z czynnikiem różnicującym, podczas gdy wpływ ATRA na apoptozę wywołaną mitoksantronem był mniej wyraźny w porównaniu do hodowli natywnych (Ryc. 48a i 48b).

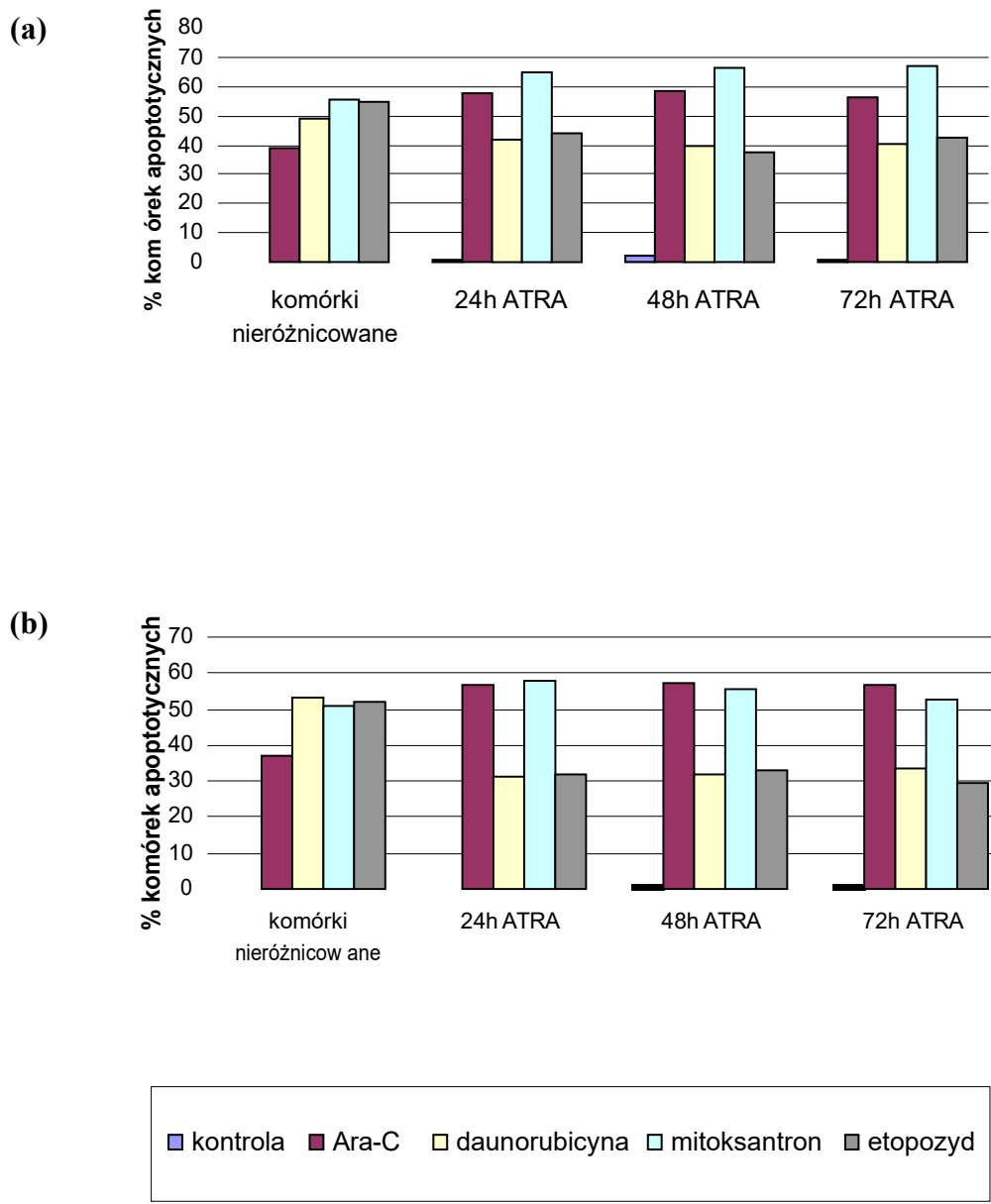
Obie linie komórkowe indukowane do różnicowania wykazały podobną wrażliwość na wszystkie leki (różnice nieznamienne statystycznie). Efekt ten był niezależny od długości trwania preinkubacji z ATRA.



Ryc. 46. Porównanie wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) po 24 godzinach hodowli z lekami komórek linii **HL60** traktowanych **ATRA** (24-, 48- i 72 godziny).



Ryc. 47. Porównanie wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) po 24 godzinach hodowli z lekami komórek linii **NB4** traktowanych ATRA (24-, 48- i 72 godziny).

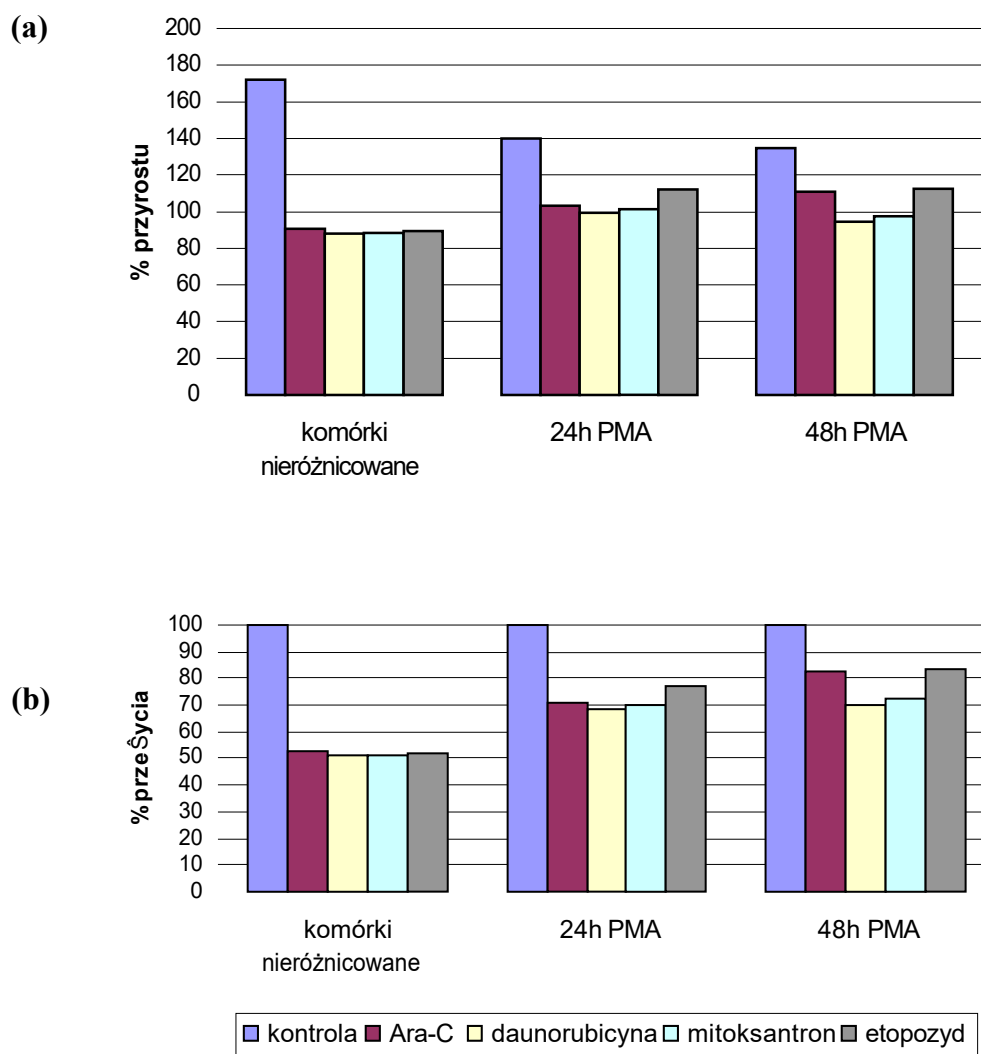


Ryc. 48. Porównanie wskaźników apoptozy po 24 godzinach inkubacji z lekami komórek linii **HL60** (a) i **NB4** (b) traktowanych **ATRA** (24-, 48- i 72 godziny).

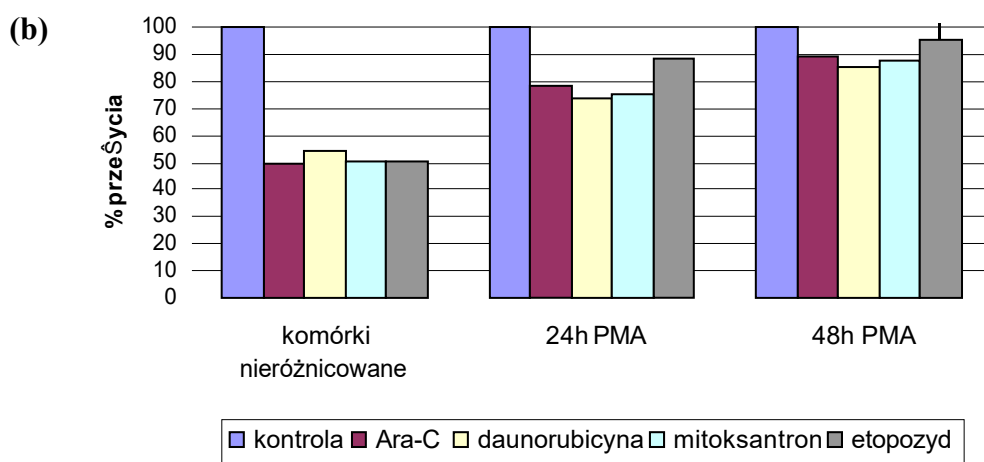
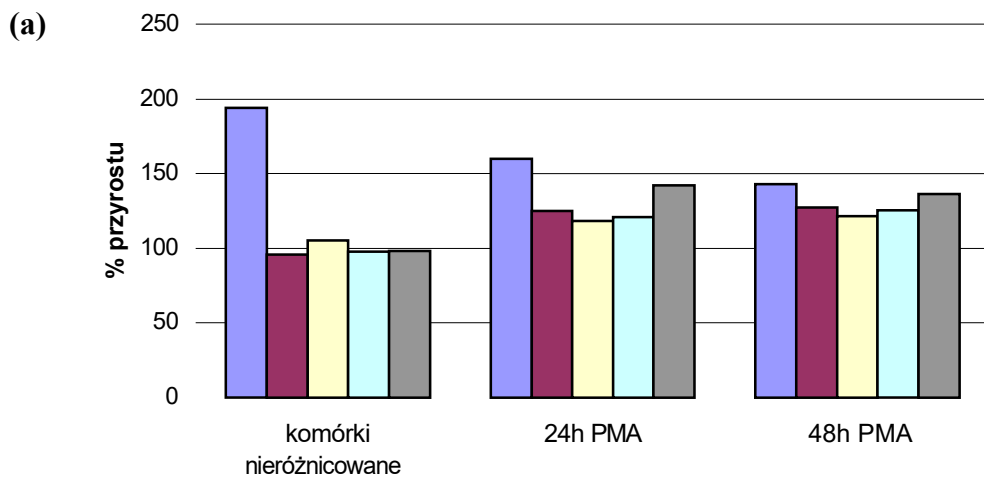
5.2. Efekt działania leków po preinkubacji komórek z PMA.

Indukcja różnicowania przy udziale PMA spowodowała porównywalne zmniejszenie wrażliwości obu linii komórkowych w stosunku do wszystkich stosowanych leków. Zarówno wskaźnik przyrostu jak i przeżycia osiągały znamienne statystycznie ($p < 0,001$) wyższe wartości dla komórek poddanych różnicowaniu niż w hodowlach natywnych (Ryc. 49a i 49b, 50a i 50b). Efekt ten był podobny dla wszystkich leków i nie zależał do czasu trwania preinkubacji z PMA.

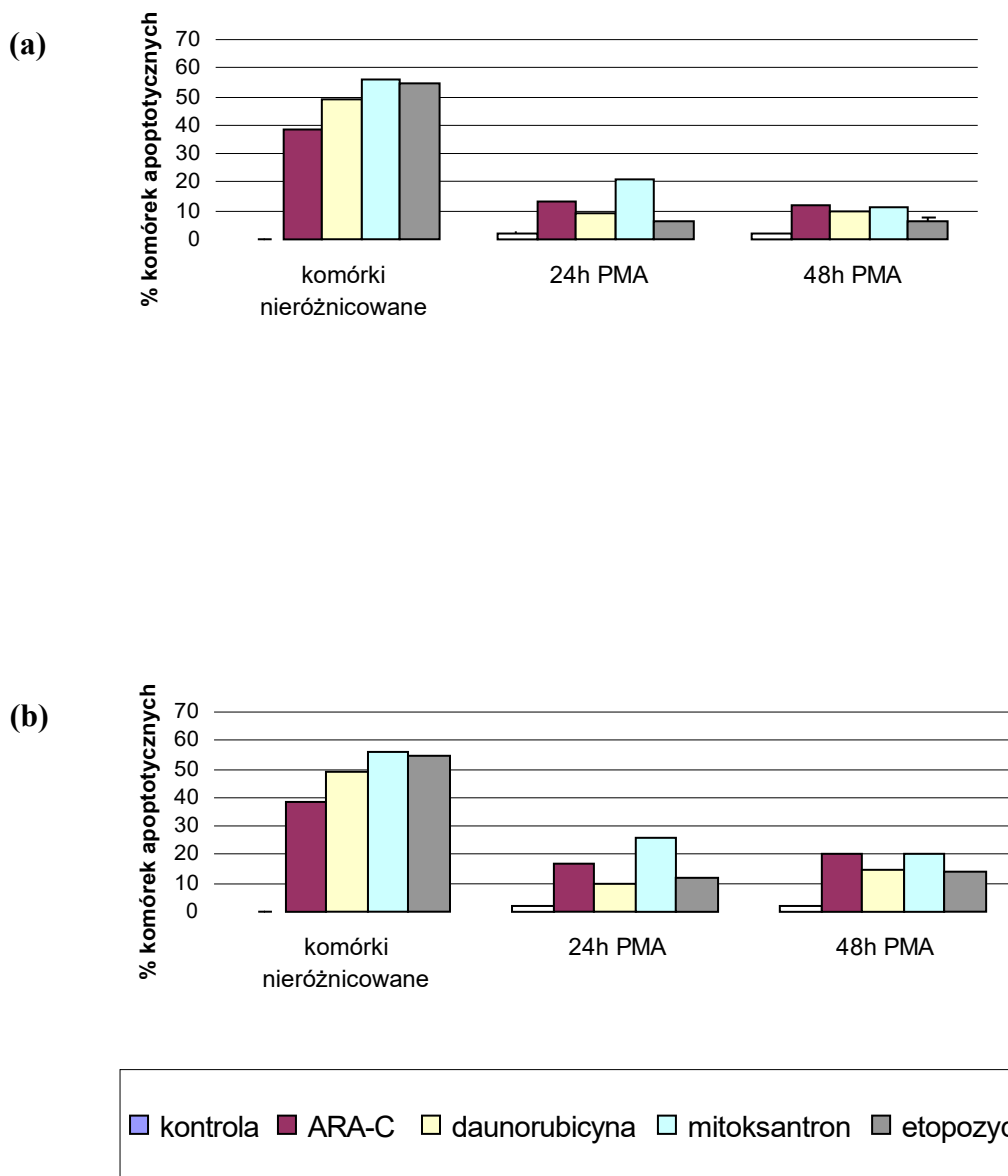
Uzupełnieniem powyższych obserwacji był wyraźny, kilkukrotny spadek wskaźnika apoptozy w komórkach zróżnicowanych poddanych działaniu leków (Ryc. 51a i 51b).



Ryc. 49. Porównanie wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) po 24 godzinach hodowli z lekami komórek linii **HL60** traktowanych **PMA** (24- i 48 godzin).



Ryc. 50. Porównanie wskaźników przyrostu (a) i przeżycia (b) po 24 godzinach hodowli z lekami komórek linii **NB4** traktowanych z **PMA** (24- i 48 godzin).



Ryc. 51. Porównanie wskaźników apoptozy po 24 godzinach hodowli z lekami komórek linii **HL60** (a) i **NB4** (b) preinkubowanych z **PMA** przez 24- i 48 godzin.

V DYSKUSJA

Skuteczność działania chemioterapeutyków na komórki nowotworowe może przejawiać się zahamowaniem przyrostu (efekt cytostatyczny) oraz obniżeniem przeżycia komórek (efekt cytotoksyczny). W niniejszej pracy wykazano wrażliwość linii HL60 i NB4 na wszystkie zastosowane leki, manifestującą się zarówno spadkiem proliferacji jak i żywotności komórek, przy czym wrażliwość komórek na działanie cytostatyczne i cytotoksyczne nie zawsze była jednakowa. Dodatkowym miernikiem skuteczności działania leków był wskaźnik apoptozy. Ponieważ wykazano bardzo wysoką, ujemną korelację pomiędzy wskaźnikiem apoptozy a wskaźnikiem przeżycia można uznać, że spadek liczby komórek wywołany był przede wszystkim poprzez uruchomienie mechanizmów śmierci zaprogramowanej.

Arabinozyd cytozyny, jeden z najbardziej efektywnych leków przeciwbiałaczkowych [20], wykazał najsłabsze działanie na komórki HL60 i NB4 spośród zastosowanych cytostatyków. Podobny efekt obserwowano w eksperymentach Wen i wsp. [9], gdzie arabinozyd cytozyny użyty w wysokim stężeniu (100 μ M) powodował około 45% spadek przeżycia komórek HL60 i U937. Również w innych badaniach stwierdzono, że Ara-C wykazywał najsłabszy efekt cytotoksyczny (w porównaniu z mitoksantronem i paclitaxelem) na komórki HL60 [14]. Być może przyczyną była nasilona inaktywacja leku w komórkach. Stwierdzono bowiem, iż w warunkach *in vitro* obserwuje się często zwiększony poziom deaminazy cytydyny lub deaminazy monofosforanu deoksycytydyny (dCMP) w komórkach linii białaczkowych. W efekcie dochodzi do deaminacji Ara-C i Ara-CMP do nieaktywnych metabolitów Ara-U i Ara-UMP [8,25].

Daunorubicyna, lek należący do grupy antracyklin, wykazała najwyższą skuteczność w zahamowaniu wzrostu i przeżycia komórek. Efekt ten nasilał się w miarę upływu czasu hodowli. Natomiast mitoksantron spowodował słabsze niż daunorubicyna zahamowanie proliferacji i przeżycia. Główny mechanizm działania tych leków polega na indukcji uszkodzeń DNA poprzez oddziaływanie z topoizomerazą II oraz na tworzeniu wolnych rodników [13]. Jak wykazały inne badania, mitoksantron, powoduje jednak zaledwie śladowy stres oksydacyjny w komórkach docelowych [10]. Inny zastosowany cytostatyk, etopozyd, hamujący topoizomerazę II, ale nie indukujący powstawania wolnych rodników [13], również wykazał mniejszą skuteczność działania na komórki HL60 i NB4, w porównaniu z daunorubicyną. Być może ten podwójny mechanizm działania wyjaśnia fakt większej skuteczności daunorubicyny w zahamowaniu proliferacji i przeżycia komórek białaczkowych.

Działanie większości chemioterapeutyków zależy od zastosowania odpowiedniej dawki, a także od właściwego czasu ekspozycji komórek nowotworowych na dany lek. Obserwacje własne wykazały wykładniczą zależność spadku wskaźników przyrostu i przeżycia od zastosowanych dawek wszystkich leków. Również czas inkubacji z lekami generalnie miał wpływ na zachowanie się wskaźników przyrostu i przeżycia badanych komórek. Come i wsp. [12] potwierdzili wyższą skuteczność działania daunorubicyny na obniżenie żywotności komórek HL60 przy dłuższej ekspozycji na działanie leku (24-, 48- i 72 godziny).

Podczas stosowania chemioterapii, poprzez odpowiedni dobór dawek dąży się do tego, aby śmierć komórek nowotworowych następowała na drodze apoptozy, a nie nekrozy. Wszystkie zastosowane w eksperymentach leki wykazały efekt proapoptotyczny manifestujący się charakterystycznym obrazem jąder komórkowych. Szczególną uwagę zwraca fakt, że w przeprowadzonych badaniach efekt apoptozy uzyskiwano przy dawkach leków różniących się o 1-2 rzędy wielkości (np. etopozyd), choć można było oczekiwać

wywołania śmierci o charakterze martwicy przez znacznie wyższe stężenia leków. Obserwacje własne potwierdzają dane Ray i wsp. [14], którzy wykazali, że Ara-C i mitoksantron stosowane w stężeniach różniących się o 1-3 rzędy wielkości wywołują apoptozę komórek HL60. W badaniach własnych stwierdzono, że bezwzględne wartości wskaźników przeżycia i apoptozy mimo, iż korelowały ze sobą, nie zawsze się uzupełniały. Po podaniu Ara-C najwyższy odsetek apoptozy nie przekroczył 45%, natomiast wskaźnik przeżycia osiągnął wartości o połowę niższe. Mogło to być związane z faktem, że obserwacja morfologiczna pozwala na identyfikację komórek w późnej fazie apoptozy, o zaawansowanej kondensacji chromatyny. Obecność komórek we wczesnych stadiach apoptozy, o obniżonej aktywności metabolicznej ale jeszcze bez zmian w chromatynie mogła mieć w pewnym stopniu wpływ na wartości wskaźników przeżycia uzyskane przy pomocy testu Alamar Blue.

Chemioterapeutyki mogą aktywować różne szlaki biochemiczne, prowadzące w efekcie do apoptozy. Przyjmuje się na ogół, że zarówno radio- jak i chemiowrażliwość komórek uwarunkowana jest prawidłowym funkcjonowaniem białka p53, które z kolei reguluje ekspresję innego białka supresorowego p21. Utrata białka p21 może powodować załamanie się systemu kontroli dotyczącej syntezy DNA. Tymczasem komórki obu badanych linii HL60 i NB4 wykazują brak prawidłowego białka p53. W ich przypadku apoptoza wywołana lekami jest więc niezależna od tego genu [9]. Zamiast mechanizmu wywołanego uszkodzeniem DNA uruchomiony być musi alternatywny szlak apoptozy. Na możliwość indukcji apoptozy na drodze bezpośrednio związanej z udziałem mitochondriów wskazują badania Wen i wsp.[9] z użyciem między innymi Ara-C i etopozydu.

Ważną rolę w apoptotycznej śmierci komórek nowotworowych przypisuje się również ceramidowi. Wykazano bowiem, iż wiele chemioterapeutyków, między innymi Ara-C, etopozyd, daunorubicyna, mitoksantron, aktywuje w komórkach białaczkowych sfingomielinazę. Enzym ten katalizuje hydrolizę sfingomieliny w błonie komórkowej

i wytwarzanie ceramidu, odpowiedzialnego za indukcję apoptozy [35].

W eksperymentach z użyciem wzrastających dawek leków stwierdzono różnice wrażliwości obu linii. Linia NB4 była bardziej podatna na efekt cytotoksyczny arabinozydu cytozyny, mitoksantronu a także etopozydu (dla dwóch ostatnich leków tylko wskaźnik przeżycia wykazywał znamiennej różnicę, której nie stwierdzono przy zastosowaniu wskaźnika apoptozy). Wydaje się, że taka odpowiedź komórek obu linii białaczkowych na leki może wynikać z różnic w ich tempie proliferacji: szybciej dzielące się komórki mogą być bardziej wrażliwe na chemioterapeutyki. W niniejszych badaniach komórki linii NB4, nie traktowane lekami, charakteryzowały się bowiem większym przyrostem niż komórki linii HL60. Gieseler i wsp. [13] stwierdzili ponadto, iż szybciej proliferujące komórki linii białaczkowych wykazały większą aktywność topoizomerazy II, a tym samym były bardziej wrażliwe na inhibitory tego enzymu, między innymi etopozyd. Allouche i wsp. [44] również potwierdzili większy efekt cytotoksyczny etopozydu i mitoksantronu na komórki linii NB4 niż linii HL60. Natomiast w eksperymencie z użyciem jednakowej dawki wszystkich leków (0,8 μM) wykazano co prawda różną wrażliwość komórek w stosunku do zastosowanych leków: największą wobec daunorubicyny, a najmniejszą w stosunku do etopozydu i arabinozydu cytozyny, przy czym nie stwierdzono znamiennych różnic pomiędzy liniami.

Kliniczne ograniczenia stosowania chemioterapii, przede wszystkim ze względu na efekty uboczne oraz zjawisko oporności komórek nowotworowych na leki, prowadzą do poszukiwania innych metod terapeutycznych. Zjawisko zatrzymania procesu różnicowania komórek mieloidalnych, obserwowane w przypadku AML, doprowadziło do stosowania czynników indukujących ten proces, zarówno samych jak i w połączeniu z chemioterapią. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na istnienie czynników indukujących dalsze różnicowanie komórek białaczkowych *in vitro* [61,62,77,80,96]. W aktualnych eksperymentach udowodniono, że linie HL60 i NB4 poddane działaniu kwasu

transretinowego (ATRA) oraz octanu mirystynianu forbolu (PMA) ulegają odpowiednio różnicowaniu w kierunku granulocytów segmentowanych i monocytów. Stymulowane komórki reagowały zmianą morfologii oraz obniżeniem proliferacji. Postęp procesu różnicowania łączy się ze stopniową utratą zdolności komórki do podziałów: im komórka jest bardziej zróżnicowana, tym rzadziej się dzieli. Ketley i wsp. [70] stwierdzili, że pod wpływem ATRA i PMA komórki linii białaczkowych HL60, NB4, U937 zatrzymują się w fazie G₀/G₁ lub G₁.

Dodatkowo oceniano czy i do jakiego stopnia komórki stymulowane do różnicowania wykazują przestrojenie metaboliczne wyrażone w postaci „wybuchu tlenowego”. Wiadomo bowiem, że podczas dojrzewania do granulocytów i monocytów dochodzi do specjalizacji funkcjonalnej tych komórek związanej ze zdolnością do fagocytozy [48]. W trakcie procesu fagocytozy dochodzi do pobudzenia komórkowych procesów oddechowych i powstania reaktywnych utleniaczy [95]. Na podstawie tego zjawiska dokonano oceny poziomu różnicowania komórek HL60 i NB4 stosując test NBT. Wysoko reaktywne nadtlarki generowane w zróżnicowanych komórkach redukują NBT, co objawia się powstaniem wewnątrzkomórkowych ciemnoniebieskich złogów [54]. W przedstawionych badaniach stwierdzono znaczny wzrost odsetka komórek NBT-pozytywnych w hodowlach preinkubowanych z ATRA lub PMA, w porównaniu z komórkami nie stymulowanymi do różnicowania. Wyniki te potwierdzają również obserwacje innych autorów, którzy wykazali zwiększoną zdolność komórek linii: HL60, NB4, THP-1 i U937 do redukcji NBT po stymulacji różnicowania pod wpływem kwasu retinowego i estrów forbolu [53,54,93].

Kolejnym dowodem indukcji procesu różnicowania w komórkach HL60 i NB4 pod wpływem ATRA i PMA była zwiększona ekspresja antygenów powierzchniowych CD11b i CD14. Zjawisko to stwierdzono także w wielu innych eksperymentach, w których linie komórkowe AML i APL traktowane ATRA lub PMA wykazywały zwiększoną ekspresję

między innymi CD11b (pod wpływem ATRA i PMA) oraz CD14 (pod wpływem PMA) [52,53,70].

Chociaż wszystkie badane parametry wskazujące na różnicowanie komórek narastały pod wpływem inkubacji z ATRA lub PMA, to jednak dynamika ich zmian była niejednakowa. Po pierwsze, na podstawie wyników uzyskanych w teście NBT można sądzić, iż komórki linii HL60 wykazały większą specjalizację funkcjonalną po stymulacji PMA, natomiast komórki linii NB4 – podobną po stymulacji ATRA i PMA. Po drugie, ekspresja wybranych antygenów powierzchniowych najwyraźniej narastała pod wpływem ATRA, podczas gdy potencjał podziałowy komórek podlegał największemu ograniczeniu pod wpływem PMA. Mogłoby to wskazywać na fakt, iż różne cechy komórek ulegających różnicowaniu regulowane są na drodze odmiennych sygnałów metabolicznych.

Obecne badania potwierdzają zatem, że linie HL60 i NB4 są zdolne do różnicowania w kierunku granulocytów i monocytów/makrofagów pod wpływem egzogennych induktorów. W świetle ostatnich doniesień proces ten w nowotworowych komórkach blastycznych wydaje się być jednak nieco inny niż w prawidłowych komórkach hemopoetycznych. Stwierdzono bowiem, że linia HL60 ulega różnicowaniu pod wpływem ATRA w kierunku neutrofilów, a pod wpływem PMA w kierunku monocytów, które nie są jednak identyczne jak normalne dojrzałe komórki. W badaniach ekspresji antygenów zaobserwowano bowiem odmienny profil cząsteczek powierzchniowych w komórkach białaczkowych linii traktowanych *in vitro* ATRA oraz PMA w porównaniu z prawidłowymi neutrofilami i monocytami. W liniach białaczkowych nie stwierdzono między innymi obecności antygenów CD16, CD66 i CD88, których ekspresja jest wysoka na granulocytach [77]. W innych eksperymentach zauważono ponadto, że ani świeżo izolowane od pacjentów komórki ostrej białaczki promielocytowej (APL) ani linie komórkowe APL nie wykazują obecności wtórnych ziarnistości po traktowaniu ATRA [54].

W literaturze istnieje znacząca liczba doniesień wskazujących na to, że proces różnicowania komórek białaczkowych może mieć wpływ na ich wrażliwość w stosunku do chemioterapeutyków [44,46,91].

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że pod wpływem kwasu transretinowego zwiększa się wrażliwość komórek HL60 i NB4 w stosunku do Ara-C i mitoksantronu.

W świetle ostatnich danych literaturowych indukcja różnicowania komórek białaczkowych w kierunku neutrofilów pod wpływem ATRA, nasila cytotoksyczne działanie arabinozydu cytozyny w stosunku do tych komórek [61]. Istnieją doniesienia, że kwas transretinowy powoduje zmiany w ekspresji genów kodujących białka pro- i antyapoptotyczne. Stwierdzono między innymi redukcję wewnątrzkomórkowego poziomu jednego z inhibitorów apoptozy Bcl-2 podczas stymulacji różnicowania zarówno linii komórkowych AML jak i prawidłowych prekursorów szpikowych [60,90]. W innych badaniach zaobserwowano ponadto, że komórki NB4 hodowane w obecności ATRA wykazały zwiększoną ekspresję białka TRAIL, jednego z mediatorów zewnętrznego szlaku apoptozy [97]. Pewne znaczenie może mieć również fakt, że niektóre leki przeciwnowotworowe, między innymi Ara-C, stosowane w niskich dawkach mogą indukować różnicowanie komórek AML [61]. A więc spadek przeżycia komórek hodowanych uprzednio z ATRA, a następnie traktowanych lekami mógłby wynikać z powstania dodatkowego bodźca do różnicowania i w efekcie prowadzić do apoptozy.

Odmienne rezultaty uzyskano indukując różnicowanie w kierunku monocytów/makrofagów poprzez użycie PMA. Komórki linii HL60 i NB4 stymulowane w ten sposób wykazały obniżoną wrażliwość w stosunku do wszystkich zastosowanych chemioterapeutyków. Efekt ten wyrażony był wzrostem wartości liczbowych wskaźników przyrostu i przeżycia oraz drastyczną redukcją wartości wskaźnika apoptozy. Powyższe obserwacje potwierdzają badania tych autorów, którzy wykazali, że PMA hamuje indukowaną etopozydem apoptozę komórek HL60 i U937 [92]. Obserwowane obniżenie

chemiowrażliwości komórek traktowanych PMA stoi w zgodzie z doniesieniami o hamowaniu apoptozy (indukowanej promieniowaniem i glukokortykoidami) komórek linii NALM6 przez trwałą stymulację kinazy białkowej C [76]. Pojawiły się również doniesienia, że PMA ogranicza proces apoptozy także na drodze niezależnej od PKC. Wykazano, iż hamuje on aktywność sfingomielinazy i obniża produkcję ceramidu [73]. W innych badaniach stwierdzono, iż komórki różnicowane przy udziale PMA były odporne na apoptozę indukowaną Fas-L [97]. Pod wpływem estrów forbolu obserwowano również podwyższenie poziomu białek antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) szczególnie w komórkach adherentnych ulegających różnicowaniu [75,92].

Rozważając związek pomiędzy poziomem zróżnicowania komórek a ich chemiowrażliwością należy również zwrócić uwagę na bezpośredni wpływ induktorów różnicowania na cykl komórkowy. Podczas stymulacji różnicowania *in vitro* przy udziale ATRA obserwowano zmniejszenie proporcji komórek linii białaczkowych znajdujących się w fazach S i G₂+M [70]. Ze względu na to można oczekiwać, że cała populacja okaże się mniej wrażliwa na stosowane leki, ponieważ działanie wielu chemioterapeutyków jest najsilniejsze, gdy komórki znajdują w fazie S. Zaobserwowany w obecnej pracy wyraźny spadek wrażliwości komórek obu linii w stosunku do etopozydu po indukcji różnicowania zarówno przy pomocy ATRA jak i PMA może wynikać z jego działania hamującego topoisomerazę II, które najsilniej wyraża się w fazie S. Możliwe jest również, że mniejsza wrażliwość komórek stymulowanych do różnicowania w stosunku do używanych leków wynika z usprawnienia procesów naprawy DNA zachodzących przy udziale białka p21 [70,72]. Białko p21 należy do inhibitorów cyklu komórkowego, a jego ekspresja w prawidłowych komórkach jest w zasadzie regulowana przez białko p53. Z doniesień literaturowych wynika jednak, że aktywacja p21 może zachodzić również na drodze niezależnej od p53. Opisano bowiem, iż komórki HL60, pozbawione jak wspomniano czynnego białka p53, po traktowaniu różnymi

induktorami różnicowania, między innymi ATRA, wykazywały wysoką ekspresją białka p21 [70].

Przedłużone działanie czynnika różnicującego generalnie nie miało wpływu na poziom lekowrażliwości komórek. Można sądzić zatem, iż samo zainicjowanie procesu różnicowania w zasadniczy sposób wpływa na reakcję komórek w stosunku do leków. Z opublikowanych danych wynika bowiem, że już w ciągu 8- 24 godzin od dodania ATRA do hodowli HL60 i NB4 dochodzi do zmian w ekspresji genów ważnych dla indukcji różnicowania (np. receptora dla retinoidów RAR β), po czym dopiero następują zmiany w ekspresji genów zaangażowanych w procesach dojrzewania i apoptozy [58].

Należy również wziąć pod uwagę, że wpływ na chemiowrażliwość może mieć nie tylko samo różnicowanie, ale przede wszystkim sposób jego indukcji. Zaobserwowano bowiem różne efekty działania leków po traktowaniu ATRA oraz PMA.

Warto podkreślić, iż po indukcji różnicowania nie stwierdzono różnic we wrażliwości pomiędzy liniami komórkowymi.

Jednak mimo wielu doniesień, molekularne mechanizmy procesów różnicowania i apoptozy nie są w pełni wyjaśnione, a dostępne wyniki nie zawsze są całkowicie zgodne, co z pewnością świadczy o stopniu złożoności tego zagadnienia. Na pewno nie bez wpływu na uzyskiwane rezultaty pozostaje fakt, że dotychczasowe eksperymenty prowadzone były na różnorodnym materiale: pierwotne hodowle komórkowe lub linie komórkowe.

Z punktu widzenia praktyki klinicznej ważną informację stanowi zmniejszanie się wrażliwości komórek linii białaczkowych na niektóre leki obserwowane pod wpływem stosowanych induktorów różnicowania. Jeżeli poprzez odpowiednią kombinację leków uda się doprowadzić do różnicowania się komórek *in vivo*, to równocześnie może spadać wrażliwość tych komórek na dotychczas stosowane chemioterapeutyki.

W badaniach lekowrażliwości *in vitro* i późniejszej korelacji uzyskanych wyników z sytuacją *in vivo* należy brać pod uwagę to, iż metabolizm cytostatyku jest inny *in vitro* i *in vivo* (między innymi inaktywacja, wydalanie). Ponadto w warunkach hodowli komórkowej leki są zwykle testowane pojedynczo, a przy różnych kombinacjach stosowanych podczas leczenia może dochodzić do znoszenia lub wspomagania ich działania [26].

Testowanie chemiowrażliwości w warunkach hodowli komórkowej może stanowić jednak ważny czynnik oceny klinicznej, ponieważ brak cytotoksycznego działania leku *in vitro* oznacza, że z pewnością nie będzie on skuteczny klinicznie. Natomiast w przypadku stwierdzenia lekowrażliwości istnieje prawdopodobieństwo, że cytostatyk będzie działał także *in vivo* [26].

VI WNIOSKI

Przeprowadzone badania wskazują na to, iż:

1. Komórki linii HL60 i NB4 okazały wrażliwość w stosunku do zastosowanych leków (arabinozydu cytozyny, daunorubicyny, mitoksantronu i etopozydu), która wyrażała się zarówno zahamowaniem proliferacji (efekt cytostatyczny) jak i spadkiem przeżycia komórek (efekt cytotoksyczny).
2. Najsłabsze działanie na komórki obu linii zaobserwowano w przypadku arabinozydu cytozyny, najsilniejsze – po zastosowaniu daunorubicyny.
3. Komórki linii NB4 wykazały większą wrażliwość na trzy spośród zastosowanych leków (arabinozyd cytozyny, mitoksantron, etopozyd).
4. Zarówno efekt cytostatyczny jak i efekt cytotoksyczny wykazywał wykładniczą zależność od dawki.
5. Efekt działania leków nasilał się wraz z przedłużeniem czasu inkubacji.
6. Spadek liczby żywych komórek pod wpływem zastosowanych leków wynikał z indukcji apoptozy.
7. Wpływ procesu różnicowania się komórek na ich lekowrażliwość zależał od czynnika stymulującego różnicowanie i kierunku tego procesu.
8. Różnicowanie komórek w kierunku granulocytów segmentowanych indukowane ATRA nasilało ich wrażliwość na arabinozyd cytozyny i mitoksantron, natomiast zmniejszało wrażliwość na etopozyd.
9. Stymulacja różnicowania w kierunku monocytów/makrofagów przy udziale PMA obniżała wrażliwość komórek na wszystkie zastosowane leki.

VII PIŚMIENICTWO

1. Paduch R, Klatka J: Markery nowotworowe. *Onkol. Pol.* 2003; 2: 77-82.
2. Chorąży M, Szala S: Udział genów w procesie nowotworzenia. *Genetyka molekularna; Węgleński P; PWN Warszawa* 1998; 385-411.
3. Nebert DW: Transcription factors and cancer: an overview. *Toxicol.* 2002; 27: 131-41.
4. Golub TR: The Genetics of AML: An Update. *Haematol.* 1999: 102-105.
5. Skotnicki AB, Nowak WS: Układ białokrwinkowy. *Podstawy hematologii; Med. Prakt.* 1998: 67-143.
6. Degos L: Historical Review (The history of acute promyelocytic leukaemia). *Br. J. Haematol.* 2003; 122: 539-553.
7. Skotnicki AB, Machaczka M: Założenia i metody chemioterapii wysokodozowanej w onkologii. *Przegl. Lek.* 1999; 56: 5-9.
8. Machaczka M, Rucińska M, Jabłoński M, Skotnicki AB: Przyczyny nieskuteczności leczenia ostrej białaczki szpikowej – rola oporności blastów na cytostatyki. *Przegl. Lek.* 1998; 8: 407-413.
9. Wen J: Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukaemia cells. *Blood* 2000; 12: 3900-3906.
10. Boland MP, Fitzgerald KA, O'Neill LA: Topoisomerase II is required for mitoxantrone to signal nuclear factor NFκB activation in HL60 cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 33: 25231-25238.
11. Ciftci O, Ullrich O, Schmidt CA, Diestel A, Hass R: Regulation of the nuclear proteasome activity in myelomonocytic human leukemia cells after adriamycin treatment. *Blood* 2001; 9:2830-2838.
12. Come MG, Skladanowski A, Larsen AK, Laurent G: Dual mechanism of daunorubicin-induced cell death in both sensitive and MDR-resistant HL60 cells. *Br. J. Cancer* 1999; 79: 1090-1097.
13. Gieseler F, Bauer E, Nuessler V, Clark M, Valsamas S: Molecular effects of topoisomerase II inhibitors in AML cell lines: correlation of apoptosis with topoisomerase II activity but not with DNA damage. *Leukemia* 1999; 13: 1859-1863.
14. Ray S, Ponnathpur V, Huang Y, Tang C, Mahoney ME, Ibrado AM, Bullock G, Bhalla K: 1β-D-Arabinofuranosylcytosine-, mitoxantrone-, and paclitaxel-induced apoptosis in HL60 cells: improved method for detection of internucleosomal DNA fragmentation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1994; 34: 365-371.

15. Ravi D, Muniyappa H, Dask C: Endogenous thioredoxin is required for redox-cycling of anthracyclines and p53-dependent apoptosis in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 13: 432-441.
16. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC: p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 2004; 64: 2350-2356.
17. Kudo K, Yoshida H, Kiyoi H, Numata S, Horibe K, Naoe T: Etoposide-related acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 1171-1175.
18. Bjorling-Poulsen M, Issinger OG: cDNA array analysis of alterations in gene expression in the promyelocytic leukemia cell line, HL-60, after apoptosis induction with etoposide. *Apoptosis* 2003; 8: 377-388.
19. Blagosklonny MV: Targeting cancer cells by exploiting their resistance. *Trends in Mol. Med.* 2003; 7: 307-312.
20. Skotnicki AB, Machaczka M, Rucińska M: Oporność wielolekowa na cytostatyki w ostrej białaczce szpikowej - mechanizmy i znaczenie kliniczne. *Acta Haem. Pol.* 1998; 29: 25-37.
21. Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T, Di Pietro A: Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med. Res. Rev.* 2005; 25: 453-472.
22. Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, Wiemer EA, Scheper RJ: Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2000; 12: 550-556.
23. Duvoix A, Schnekenburger M, Delhalle S, Blasius R, Borde-Chiche P, Morceau F, Dicato M, Diederich M: Expression of glutathione S-transferase P1-1 in leukemic cells is regulated by inducible AP-1 binding. *Cancer Lett.* 2004; 28: 207-19.
24. Volm M: Multidrug resistance and its reversal. *Anticancer Res.* 1998; 18: 2905-2917.
25. Masquelier M, Vitols S: Drastic effect of cell density on the cytotoxicity of daunorubicin and cytosine arabinoside. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 67: 1639-1646.
26. Zabel M, Kaczmarek A, Łukianow R, Ramlau R, Górny A: Testowanie wrażliwości komórek nowotworowych na cytostatyki w warunkach hodowli komórkowej. *Nowotwory* 1992; 42: 187-192.

27. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F: Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 5421-5426.
28. Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C: A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 1998; 213: 157-167.
29. Kwack K, Lynch RG: A New Non-radioactive Method for IL-2 Bioassay. *Mol. Cells* 2000; 5: 575-578.
30. Sulejczak D: Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post. Biol. Kom.* 2000; 27: 527-568.
31. Nicotera P, Melino G: Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 2004; 23: 2757-2765.
32. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B: Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. *Adv. Cancer Res.* 2005; 94: 143-96.
33. Droin N, Rebe C, Bichat F, Hammann A, Bertrand R, Solary E: Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization. *Oncogene* 2001; 20: 260-269.
34. Macnamara B, Palucka KA, Porwit-McDonald A: Balance between proliferation and apoptosis in leukemic cell lines resistant to cytostatics. *Leuk. Lymphoma* 1999; 36:179-189.
35. Widłak P: Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie. *Post. Biol. Kom.* 2000; 27: 583-597.
36. Bielak-śmijewska A: Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos* 2003; 52: 157-171.
37. Kim R, Emi M, Tanabe K: Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review). *Oncol. Rep.* 2005; 14: 595-599.
38. Chen M, Wang J: Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; 7: 313-319.
39. Salvesen GS: Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* 2002; 38: 9-19.
40. Dartsch DC, Schaefer A, Boldt S, Kolch W, Marquardt H: Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis* 2002; 7: 537-548.
41. Kupryjańczyk J, Szymańska T: Upośledzenie apoptozy jako potencjalny mechanizm oporności nowotworów na chemioterapię. *Nowotwory* 2002; 52: 84-89.

42. Banker DE, Groudine M, Willman CL, Norwood T, Appelbaum FR: Cell cycle perturbations in acute myeloid leukemia samples following *in vitro* exposures to therapeutic agents. *Leuk. Res.* 1998; 22: 221-239.
43. McGahon A, Costa Pereira AP, Daly L, Cotter TG: Chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human leukaemic cells is independent of the Fas (Apo-1/CD95) receptor/ligand system. *Br. J. Haematol.* 1998; 10: 539-547.
44. Allouche M, Charrad RS, Bettaieb A, Greenland C, Grignon C, Smadja-Joffe F: Ligation of the CD44 adhesion molecule inhibits drug-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Blood* 2000; 96: 1187-1190.
45. Grzelakowska-Sztabert B: Apoptoza i Nowotwory. *Post. Biol. Kom.* 2000; 27: 9-43.
46. Solary E: Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in haematological malignancies. *Leukemia* 2000; 14: 1833-1849.
47. Martins LM, Kottke TJ, Kaufmann SH, Earnshaw WC: Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood* 1998; 92: 3042-3049.
48. Janicki K, Kałuża J, Stachura J: Morfologia komórek krwi i szpiku. *Hematologia kliniczna*; Janicki K; PZWL Warszawa 2001; 39-66.
49. Skotnicki AB, Jabłoński M, Szostek M, Libura M: Charakterystyka macierzystej komórki hemopoezy i jej biologicznego markera – molekuly CD34. *Przegl. Lek.* 1999; 56: 17-20.
50. Thomas D, Vadas M, Lopez A: Regulation of haematopoiesis by growth factors - emerging insights and therapies. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2004; 4: 869-879.
51. Ward AC, Loeb DM, Touw IP, Friedman AD: Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia* 2000; 14: 973-990.
52. Hmama Z, Nandan D, Sly L, Knutson KL, Herrera-Velit P, Reiner NE: $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ –induced Myeloid Cell Differentiation Is Regulated by a Vitamin D Receptor–Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Complex. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 1583-1594.
53. Charrad RS, Gadhoom Z, Qi J, Glachant A, Allouche M, Jasmin C, Chomienne C, Joffe-Smadja F: Effect of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 2002; 99: 290-299.
54. Riccioni R, Saulle E, Militi S, Sposi NM, Gualtierio M, Mauro N, Mancini M, Diverio D, Cocco FL, Peschle C, Testa U: C-fms expression correlates with monocytic

- differentiation in PML-RAR α ⁺ acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 98-113.
55. Dalton WT, Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM: HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 1988; 71: 242-247.
 56. Drexler HG, Quentmeier H, MacLeod RA, Uphoff CC, Hu ZB: Leukemia cell lines: *in vitro* models for the study of acute promyelocytic leukaemia. *Leuk. Res.* 1995; 19: 681-691.
 57. Roussel M, Lannote M: Maturation sensitive and resistant t(15;17) NB4 cell lines as tool for APL physiopathology: nomenclature of cells and repertory of their known genetic alterations and phenotypes. *Oncogene* 2001; 20: 7287-7291.
 58. Lee KH, Chang MY, Ahn JI, Yu DH, Jung SS, Choi JH, Noh YH, Lee YS, Ahn MJ: Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 296: 1125-1133.
 59. Bocchia M, Xu Q, Wesley U, Xu Y, Korontsvit T, Loganzo F, Albino A, Scheinberg D: Modulation of p53, WAF/p21 and Bcl-2 expression during retinoic acid-induced differentiation of NB4 promyelocytic cells. *Leuk. Res.* 1997; 21: 439-447.
 60. Meade-Bolanos J, Karp JE, Guo C, Adoo CB, Rapoport AP, Tidwell ML, Buddharaju LN, Chen TT: Timed sequential therapy of acute myelogenous leukaemia in adults: a phase II study of retinoids in combination with the sequential administration of cytosine arabinoside, idarubicin and etoposide. *Leuk. Res.* 2003; 27: 313-321.
 61. Bruserud O, Gjertsen BT: New Strategies for the treatment of Acute Myelogenous leukemia: Differentiation Induction-Present Use and Future Possibilities. *Stem Cells* 2000; 18: 157-165.
 62. Cassinat B, Chevret S, Zassadowski F, Balitrand N, Giullemot I, Menot ML, Degos L, Fenaux P, Chomienne C: In vitro all-*trans*-retinoic acid sensitivity of acute promyelocytic leukemia blasts: a novel indicator of poor patient outcome. *Blood* 2001; 98: 2862-2864.
 63. Kwiatkowska D, Kwiatkowska-Korczak J: Kwas retinowy: jego metabolizm i mechanizm działania. *Post. Biol. Kom.* 1999; 26: 579-592.
 64. Russo J, Barnes A, Berger K, Desgrosellier J, Henderson J, Kanters A, Merkov L: 4-(N,N-dipropylamino)benzaldehyde inhibits the oxydation of all-*trans*-retinal to all-*trans*-

- retinoic acid by ALDHIA1, but not the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells exposed to all-*trans*-retinal. *BMC Pharmacol.* 2002; 2-4.
65. James SY, Williams MA, Newland AC, Colston KW: Leukemia Cell Differentiation: Cellular and Molecular Interactions of Retinoids and Vitamin D. *Gen. Pharmacol.* 1999; 32: 143-154.
 66. Jing Y: The PML-RAR α Fusion Protein and Targeted Therapy for Acute Promyelocytic Leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2004; 45: 639-648.
 67. Matsui WH, Gladstone DE, Vala MS, Barber JP, Brodsky RA, Smith DB, Jones RJ: The role of growth factors in the activity of pharmacological differentiation agents. *Cell Growth Differ.* 2002; 13: 275-283.
 68. Seiter K, Feldman EJ, Halicka HD, Deptala A, Traganos F, Burke HB, Hoang A, Goff H, Pozzuoli M, Kancherla R, Darzynkiewicz Z, Ahmed T: Clinical and laboratory evaluation of all-*trans*-retinoic acid modulation of chemotherapy in patients with acute myelogenous leukemia. *Br. J. Haematol.* 2000; 108: 40-47.
 69. Wang J, Barsky LW, Shum CH, Jong A, Weinberg KI, Collins SJ, Triche TJ, Wu L: Retinoid-induced G1 Arrest and Differentiation Activation Are Associated with a Switch to Cyclin-dependent Kinase-activating Kinase Hypophosphorylation of Retinoic Acid Receptor. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 43369-43376.
 70. Ketley NJ, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC: Modulation of Idarubicin-Induced Apoptosis in Human Acute Myeloid Leukemia Blasts by All-Trans Retinoic Acid, 1,25(OH) $_2$ Vitamin D $_3$, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 1997; 90: 4578-4587.
 71. Lachowicz A, Rębas E, śylińska L, Lachowicz L: Różnorodne aspekty działania kinaz białkowych w apoptozie. *Post.Biol. Kom.* 2000; 27: 111-124.
 72. Kim HH, Bang SS, Choi JS, Han H, Kim IH: Involvement of PKC and ROS in the cytotoxic mechanism of anti-leukemic decursin and its derivatives and their structure-activity relationship in human K562 erythroleukemia and U937 myeloleukemia cells. *Canc. Let.* 2005; 223: 191-201.
 73. Gutcher I, Webb PR, Anderson NG: The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60: 1061-1070.
 74. Nakashima S: Protein Kinase C α (PKC α): Regulation and Biological Function. *J Biochem.* 2002; 132: 669-675.

75. Meinhardt G, Roth J, Hass R: Activation of protein kinase C relays distinct signaling pathways in the same cell type: differentiation and caspase-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2000; 7: 795-803.
76. Ito C, Ribeiro R, Behm F, Raimondi S, Pui C, Campana D: Cyclosporin A induces apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia cells. *Blood* 1998; 91: 1001-1007.
77. Trayner ID, Bustorff T, Etches AE, Mufi GJ, Foss Y, Farzaneh F: Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-*trans*-retinoic acid, α 1,25-dihydroxyvitamin D₃ or 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk. Res.* 1998; 22: 537-547.
78. Touhami M, Bourge JF, Legrand C: Increased adhesion of the promyelocytic leukaemia cell line, NB4, to fibronectin and thrombospondin upon all-*trans*-retinoic acid treatment. *Br. J. Haematol.* 1999; 104: 706-714.
79. Yang M, Chen T, Han C, Li N, Wan T, Cao X: Rab7b, a novel lysosome-associated small GTPase, is involved in monocytic differentiation of human acute promyelocytic leukemia cells. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 2004; 318: 792-799.
80. Clark CS, Konyer JE, Meckling KA: $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and bryostatin-1 synergize to induce monocytic differentiation of NB4 acute promyelocytic leukemia cells by modulating cell cycle progression. *Exp. Cell Res.* 2004; 294: 301-311.
81. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S: Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21^{Cip1/WAF1} in monocytic differentiation. *EMBO J.* 1999; 18: 1223-1234.
82. Gate L, Lunk A, Tew K: Resistance to phorbol 12-myristate 13-acetate-induced cell growth arrest in an HL60 cell line chronically exposed to a glutathione *S*-transferase π inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 65: 1611-1622.
83. Cho YJ, Kim JY, Jeong SW, Lee SB, Kim ON: Cyclic AMP induces activation of extracellular signal-regulated kinases in HL-60 cells: role in cAMP-induced differentiation. *Leuk. Res.* 2003; 27: 51-56.
84. Davis TA, Saini AA, Blair PJ, Levine BL, Craighead N, Harlan DM, June CH, Lee KP: Phorbol Esters Induce Differentiation of Human CD34⁺ Hemopoietic Progenitors to Dendritic Cells: Evidence for Protein Kinase C-Mediated Signaling. *J. Immunol.* 1998; 160: 3689-3697.
85. Louis DC, Woodcock JB, Fransozo G, Blair PJ, Carlson LM, Murillo M, Wells MR, Williams AJ, Smoot SD, Kaushal S, Grimes JL, Harlan DM, Chute JP, June CH, Siebenlist U, Lee KP: Evidence for Distinct Intracellular Signaling Pathways in CD34⁺

- Progenitor to Dendritic Cell Differentiation from a Human Cell Line Model. *J. Immunol.* 1999; 3237-3248.
86. Berry DM, Clark CS, Meckling-Gill KA: $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ stimulates phosphorylation of I κ B α and synergizes with TPA to induce nuclear translocation of NF κ B during monocytic differentiation of NB4 leukemia cells. *Exp. Cell Res.* 2002; 272: 176-184.
 87. Prudovsky I, Popov K, Akimov S, Serov S, Zelenin A, Meinhardt G, Baier P, Sohn C, Hass R: Antisense CD11b integrin inhibits the development of a differentiated monocyte/macrophage phenotype in human leukemia cells. *Eur. J. Cell Biol.* 2002; 81: 36-42.
 88. Xu D, Popov N, Hou M, Wang Q, Bjorkholm M, Gruber A, Menkel A, Henriksson M: Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Cell Biol.* 2001; 98: 3826-3831.
 89. Grant S: Modulation of Ara-C-induced apoptosis in leukemia by the PKC activator bryostatin 1. *Front. Biosci.* 1997; 1: 242-252.
 90. Hu ZB, Minden MD, McCulloch EA: Phosphorylation of BCL-2 after exposure of human leukemic cells to retinoid acid. *Blood* 1998; 5:1768-1775.
 91. Blagosklonny MV, Bishop PC, Robey R, Fojo T, Bates S: Loss of cell cycle control allows selective microtubule-active drug-induced Bcl-2 phosphorylation and cytotoxicity in autonomus cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 3425-3428.
 92. Sordet O, Rebe C, Leroy I, Bruey JM, Garrido C, Miguet C, Lizard G, Plenchette S, Corcos L, Solary E: Mitochondria-targeting drugs arsenic trioxide and lonidamine bypass the resistance of TPA-differentiated leukemic cells to apoptosis. *Blood* 2001; 12: 3931-3939.
 93. Gianni M, Kalac Y, Ponzanelli I, Rambaldi A, Terao M, Garattini E: Tyrosine kinase inhibitor STI571 potentiates the pharmacologic activity of retinoic acid promyelocytic leukemia cells: effects on the degradation of RAR α and PML-RAR α . *Blood* 2001; 97: 3234-3242.
 94. Erkel G, Gehrt A, Anke T, Sterner O: Induction of differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by the verticillin derivative Sch 52900. *Z. Naturforsch.* 2002; 57: 759-767.

95. Launay S, Gianni M, Kovacs T, Bredoux R, Bruel A, Gelebart P, Zassadowski F, Chomienne C, Enouf J, Papp B: Lineage-Specific Modulation of Calcium Pump Expression During Myeloid Differentiation. *Blood* 1999; 93: 4395-4405.
96. Song X, Norman W: $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and phorbol ester mediate the expression of alkaline phosphatase in NB4 acute promyelocytic leukaemia cells. *Leuk. Res.* 1998; 22: 69-76.
97. Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, Reitmair A, Chomienne C, Gronemeyer H: Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat. Med.* 2001; 6: 680-686.
98. Micheau O, Solary E, Hamman A, Dimanche-Boitrel MT: Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 7987-7992.