

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Роль ферментативной активности в реализации антипролиферативного эффекта L-аспарагиназ

**В.С. Покровский¹, М.В. Комарова², С.С. Александрова³,
М.В. Покровская³, М.С. Калишьян¹, С.Ш. Каршиева¹,
Е.М. Трещалина¹**

¹ ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

² ФГАОУ ВО «Самарский государственный аэрокосмический университет им. акад. С.П. Королева (национальный исследовательский университет)», Московское ш., д. 34, Самара, Российская Федерация, 443086

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, Москва, Российская Федерация, 119121

РЕФЕРАТ

Актуальность и цели. Начиная с 70-х годов прошлого века и по настоящее время L-аспарагиназы *E. coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA) используются в составе схем противоопухолевой химиотерапии острых лимфобластных лейкозов. В последние годы появились сообщения об их эффективности в комбинированной терапии НК/Т-клеточных и кожных Т-клеточных лимфом. Цель исследования — изучить взаимосвязь антипролиферативной и ферментативной активности L-аспарагиназ различного происхождения.

Методы. Выполнено проспективное исследование ферментативной и антипролиферативной активности *in vitro* и *in vivo* ряда новых L-аспарагиназ: *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA), *Rhodospirillum rubrum* (RrA), *Wolinella succinogenes* (WsA), *Erwinia carotovora* (EwA) в сравнении с L-аспарагиназой *Escherichia coli* (EcA). Для оценки кинетических параметров рассчитывали K_m , k_{cat} и V_{max} . С целью анализа цитотоксической активности использовались клеточные линии перевиваемых опухолей человека, а для оценки противоопухолевой активности — мышей-самок линии DBA₂ массой тела 18–24 г с внутрибрюшинно трансплантированным лимфаденозом Фишера L5178Y (3–12-й пассаж) из банка ФГБНУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина».

Результаты. Использование L-аспарагиназы II типа (EcA, EwA, YpA и WsA) позволило выявить отчетливую тенденцию: с повышением K_m увеличивалась IC_{50} ($r = 0,66$; $p = 0,007$). В диапазоне разовой дозы 2000–8000 МЕ/кг лучшими по выживаемости и излечению оказались L-аспарагиназы с $K_m = 0,017$ и $0,054$ ммоль/л по сравнению с L-аспарагиназами с меньшей ферментативной активностью, что подтверждено соответствующими значениями относительных рисков

EXPERIMENTAL STUDIES

Role of Enzymatic Activity in Producing an Antiproliferative Effect of L-Asparaginases

**V.S. Pokrovskii¹, M.V. Komarova², S.S. Aleksandrova³,
M.V. Pokrovskaya³, M.S. Kalish'yan¹, S.Sh. Karshieva¹,
E.M. Treshchalina¹**

¹ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

² Samara State Aerospace University, 34 Moskovskoye sh., Samara, Russian Federation, 443086

³ V.N. Orekhovich Scientific Research Institute of Biomedical Chemistry, 10 bld. 8 Pogodinskaya str., Moscow, Russian Federation, 119121

ABSTRACT

Background & Aims. *E. coli* (EcA) and *Erwinia chrysanthemi* (ErA) L-asparaginases have been used in antitumor chemotherapy for acute lymphoblastic leukemias since 1970s. Reports of their effect in a combined therapy of NK/T-cell and skin T-cell lymphomas have been published lately. The aim of this paper is to evaluate the relation between antiproliferative and enzymatic activities of L-asparaginases of different origin.

Methods. We conducted a prospective study of *in vitro* and *in vivo* enzymatic and antiproliferative activity of several new L-asparaginases: *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA), *Rhodospirillum rubrum* (RrA), *Wolinella succinogenes* (WsA), *Erwinia carotovora* (EwA) in comparison with *Escherichia coli* L-asparaginase (EcA). K_m , k_{cat} and V_{max} were calculated for evaluation of kinetic parameters. Cell lines of human transplantable tumors were used to analyze the cytotoxic activity, and DBA₂ female mice with the body weight of 18–24 g with intraperitoneally transplanted Fisher lymphadenosis L5178Y (3–12 passage) from the bank of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center were used for assessment of the antitumor activity.

Results. The use of type II L-asparaginases (EcA, EwA, YpA and WsA) permitted to determine a clear tendency: IC_{50} rises simultaneously with K_m ($r = 0.66$; $p = 0.007$). Using single-dose range of 2000–8000 IU/kg in mice the highest efficacy was shown for L-asparaginases with $K_m = 0.017$ and 0.054 mM in comparison with L-asparaginases with lower enzymatic activity, as confirmed by corresponding odds ratio values in the stratified Cox proportional regression model. The pair-wise comparison of Kaplan-Meier curves and Cox regression method showed that WsA displays the best K_m /antiproliferative activity ratio both

лоты), обогащенный амидными группами L-аспарагина [11, 13]. Существует мнение, что L-аспарагиназа не только разрушает свободный L-аспарагин, но и способна расщеплять аспарагин в составе пептидных спейсеров гликопротеидных рецепторов опухолевых клеток [13]. Рецепторы с отщепленной подобным образом гликозидной частью не могут связываться с соответствующими лигандами-митогенами и стимулировать пролиферацию, что может объяснять еще один вероятный механизм антипролиферативного действия L-аспарагиназ. Таким образом, совокупность современных научных знаний предполагает наличие многофакторного механизма антипролиферативного действия L-аспарагиназ, ведущая роль в котором все же принадлежит расщеплению L-аспарагина. Вклад каждого механизма в реализацию противоопухолевого эффекта пока остается недостаточно выясненным. В опубликованных работах нет доказательства прямой связи между сродством к субстрату и антипролиферативной активностью L-аспарагиназ.

Выделение L-аспарагиназ из новых источников и получение новых данных об их кинетических характеристиках и антипролиферативной активности расширили возможности сопоставления различных параметров их ферментативной, цитотоксической и противоопухолевой активности с целью выявить возможные закономерности. Для обнаружения связи между антипролиферативной и ферментативной активностью мы использовали собственные данные, полученные при изучении пяти различных L-аспарагиназ: *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA), *Rhodospirillum rubrum* (RrA), *Wollinella succinogenes* (WsA), *Erwinia carotovora* (EwA) в сравнении с EcA [14–17].

Цель исследования — изучить взаимосвязь антипролиферативной и ферментативной активности L-аспарагиназ различного происхождения.

Задачи:

- определить кинетические параметры реакции расщепления L-аспарагина, а также антипролиферативную активность *in vitro* и *in vivo* L-аспарагиназ EcA, YpA, RrA, WsA, EwA;
- выбрать сопоставимые количественные параметры ферментативной и антипролиферативной активности изученных ферментов;
- оценить статистическую значимость взаимосвязи параметров ферментативной и антипролиферативной активности изученных L-аспарагиназ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ферменты

В экспериментах были использованы полученные и очищенные в ФГБНУ ИБМХ им. В.Н. Ореховича периплазматические L-аспарагиназы *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA) и *Erwinia carotovora* (EwA), а также цитоплазматическая L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum* (RrA), выделенная и очищенная в ФГУП «ГосНИИГенетика». Кроме того, использовались L-аспарагиназа *Wollinella succinogenes* (WsA) [14–17] и коммерческий лиофилизированный препарат EcA (Medak, Германия).

Оценка кинетических параметров

Рассчитывали K_m (константу Михаэлиса, которая описывает зависимость скорости реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата), k_{cat}

(константа каталитическая — прочность связывания субстрата с соответствующим ферментом) и V_{max} (максимальная скорость ферментативной химической реакции или плотность связывания). Определение K_m проводили по скорости образования аммиака при ферментативном гидролизе L-аспарагина. Аспарагиназную активность измеряли в термостатируемой ячейке при 37 °С, pH 8,0. Аликвоту (определенный объем раствора) 1 мл раствора субстрата аспарагина (0,01–0,04 моль/л) смешивали с 0,2 мл 12,5 ммоль/л боратного буфера, затем вносили 0,1 мл раствора RrA (0,5–10 мг/мл). Измерение аммиака проводили с помощью реактива Несслера. Реакцию останавливали, добавляя 0,6 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Величину поглощения определяли при длине волны 480 нм. Графическую обработку полученных данных и расчет K_m и V_{max} проводили с помощью программы Microsoft Excel по методу двойных обратных величин Лайнуивера — Берка.

Оценка цитотоксической активности

Использовали клеточные линии перевиваемых опухолей человека: хронический миелолейкоз человека K562, аденокарцинома легкого человека A549, рак яичников человека SCOV-3 из коллекции ФГБНУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина» [18], меланома мышей B16 из банка ФГБНУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина» [19], а также линии рака простаты человека DU145 и рака молочной железы человека MDA-MB-231 и MCF-7 из ATCC. Клетки культивировали при температуре 37 °С и 5% CO₂ в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone Laboratories, Великобритания), инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 2 ммоль/л L-глутамина, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл сульфата стрептомицина («ПанЭко», Россия). Достижение логарифмической фазы роста клетки выращивали в плоскодонные 96-луночные микропланшеты (Costar, США) по 5–6 × 10⁴ клеток на лунку и преинкубировали в течение 24 ч перед добавлением тестируемых ферментов в указанных выше условиях. Световую микроскопию клеток проводили с помощью системы AxioVision 4 (Zeiss, Германия). Жизнеспособность клеток определяли по исключению красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия). Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Препараты L-аспарагиназ в растворе Хенкса («ПанЭко», Россия) в диапазоне уменьшающихся концентраций 0,000062–50,0 МЕ/мл добавляли в лунки с клеточной культурой и коинкубировали в течение 72 ч. В контрольные лунки добавляли раствор Хенкса в том же объеме. Количество живых клеток в лунках по окончании периода инкубации определяли с помощью МТТ-теста. Оптическое поглощение окрашенных растворов измеряли на планшетном фотометре MultiScan MS (Labsystem, Финляндия) при $\lambda = 540$ нм. Цитотоксичность тестируемых растворов соединений оценивали по формуле: $(1 - No/Nk) \times 100 \%$, где No — оптическое поглощение в опытных пробах, Nk — оптическое поглощение в контроле. Для каждого фермента методом нелинейной регрессии рассчитывали IC₅₀ — концентрацию фермента в среде, которая вызывает уменьшение количества живых клеток на 50 %. Кроме того, определяли минимальную эффективную концентрацию (C_{min}), вызывающую достоверное ингибирование пролиферации по отношению к контролю.

Оценка противоопухолевой активности

Использованы мыши-самки линии DBA₂ массой тела 18–24 г с внутрибрюшинно (в/б) трансплантированным лимфаденозом Фишера L5178Y (3–12-й пассаж) из банка ФГБНУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина» [20, 21]. Перед лечением животные были определены в экспериментальную и контрольную группы. На 1–10-й день после трансплантации мышам опытной группы ежедневно вводили в/б раствор фермента в 0,9% растворе натрия хлорида. Мышам контрольной группы вводили 0,3 мл растворителя по той же схеме. Эффективность лечения оценивали по увеличению продолжительности жизни (ПЖ) в сравнении с контрольной группой (Т/С, treatment/control), которое рассчитывали как соотношение средней продолжительности жизни (СПЖ) в обеих группах и выражали в процентах. В контрольной группе Т/С = 100 %. Излеченными считали мышей, проживших более 60 дней без признаков опухолевого процесса на аутопсии (отсутствие асцита, узлового роста, поражения брыжеечных лимфатических узлов) [20]. При расчете СПЖ излеченных мышей не учитывали. Переносимость лечения оценивали по изменению поведения, состояния и массы тела мышей, а также наличию изменений внутренних органов павших или выведенных из эксперимента животных на аутопсии. Излеченных животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации на 90-е сутки после трансплантации.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполняли с помощью компьютерной программы SPSS21. Статистический анализ результатов экспериментов на культурах клеток проводили путем расчета значения медианы и межквартильного интервала (25–75-й перцентиль) в группах. Критическое значение уровня значимости (p) при всех исследованиях принимали равным 0,05. Сравнение долей излеченных животных проводили с помощью анализа таблиц сопряженности с расчетом критерия χ^2 либо точного метода Фишера и меры связи для данных в порядковой шкале Сомерса [22]. Параметр D Сомерса интерпретируется аналогично коэффициенту корреляции, рассчитываемому для количественных признаков: положительные значения означают прямую связь, отрицательные — обратную, и чем ближе абсолютные значения показателя D к единице, тем теснее взаимосвязь между признаками. Рассчитывали также 95%-е доверительные интервалы (95% ДИ) для долей по методу Клоппера—Пирсона [23]. Для оценки взаимосвязи между K_m L-аспарагиназы и показателями эффективности *in vitro* (IC_{50}) и *in vivo* (СПЖ) рассчитывали коэффициенты корреляции Спирмена. В опытах *in vivo* показателю «время жизни» излеченных мышей присвоен максимальный срок наблюдения 90 дней, который при расчете коэффициента корреляции Спирмена получал максимальный ранг. В основе анализируемой экспериментальной модели лежит гипотеза, что если животные были живы на 60-й день после трансплантации лимфаденоза, то в дальнейшем на их ПЖ будут влиять преимущественно иные факторы риска, нежели опухолевый процесс.

Статистический анализ выживаемости мышей проводили с использованием лог-рангового критерия и построения кривых Каплана—Мейера. Для оценки совместного влияния дозы L-аспарагиназы и ее K_m на выживаемость

животных с опухолями применяли регрессионную модель Кокса. Последнюю строили в трех вариантах для различных диапазонов разовой дозы ферментов: 500–1000, 2000–8000 и 12 000 МЕ/кг и более. Метод построения модели — пошаговый с включением. В качестве возможных факторов риска гибели рассматривали K_m фермента и разовую дозу, а каждый из предикторов — как номинальный признак. Таким образом, с помощью компьютерного алгоритма вычислялись коэффициенты регрессии отдельно для каждого из заданных значений признака по сравнению с референсной категорией. Для K_m за референсное было принято самое низкое значение активности с $K_m = 0,017$ ммоль/л, а для разовой дозы 2000–8000 МЕ/кг — минимальная доза 2000 МЕ/кг.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение кинетических параметров аспарагиназы

В качестве базовой оценки ферментативной активности использовали показатель K_m , прямо характеризующий сродство фермента к субстрату. Расчетные значения K_m составили 0,017, 0,017, 0,054, 0,073 и 0,221 ммоль/л для YpA, EcA, WsA, EwA и RrA соответственно.

Оценка зависимости цитотоксического эффекта от K_m

Предварительный графический анализ на парном графике разброса (рис. 2) показал, что цитотоксическая активность RrA с $K_m = 0,221$ ммоль/л не укладывалась в общую закономерность, поэтому мы провели два варианта корреляционного анализа: по всем проведенным наблюдениям и только по внеклеточным L-аспарагиназам II типа WsA, YpA, EcA и EwA (табл. 1). Для этих ферментов выявлена отчетливая тенденция: с повышением K_m увеличивалась IC_{50} ($r = 0,66$; $p = 0,007$). Однако при включении в анализ всех полученных L-аспарагиназ

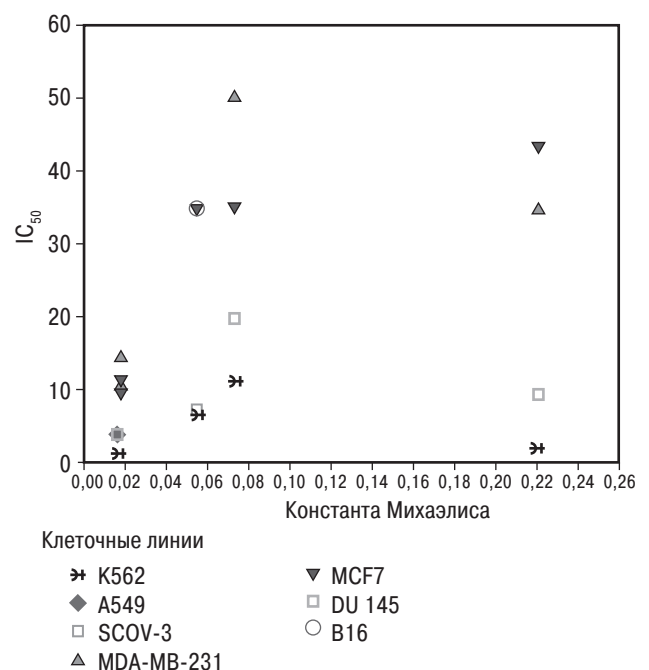
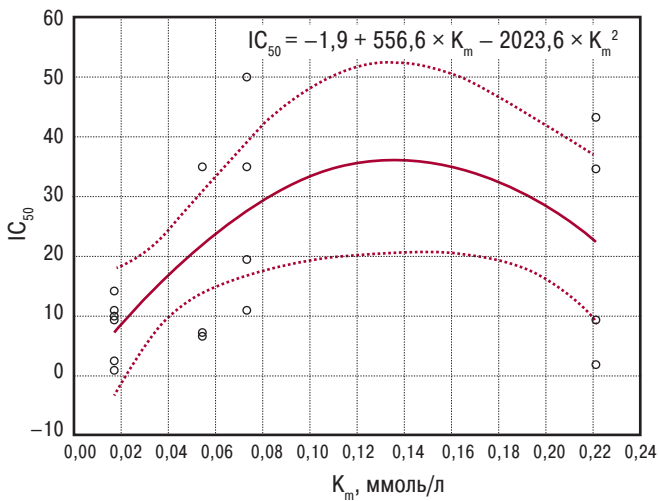


Рис. 2. Диаграмма рассеивания зависимости цитотоксичности L-аспарагиназы от ферментативной активности по соотношению IC_{50}/K_m для разных клеточных линий перевиваемых опухолей

Fig. 2. L-asparaginase-enzymatic activity scatterplot according to IC_{50}/K_m ratio for different cell lines of transplantable tumors

Таблица 1. Коэффициенты корреляции между IC_{50} и K_m изученных L-аспарагиназ

Вариант изучения	n	r	p
Только по периплазматическим L-аспарагиназам, без RrA	15	0,66	0,007
По всему исследованному массиву сравнения	19	0,39	0,097

**Рис. 3.** Моделирование зависимости цитотоксичности L-аспарагиназ от их ферментативной активности методом нелинейной регрессии**Fig. 3.** Modeling the dependence of L-asparaginases cytotoxicity on their enzymatic activity using a non-linear regression technique**Таблица 2.** Распределение мышей по группам в зависимости от разовой дозы L-аспарагиназы

Доза, МЕ/кг	Число мышей в каждой группе					Всего
	YpA	EcA	WsA	EwA	RrA	
500	0	8	7	0	7	22
1000	13	13	13	8	8	55
2000	0	8	14	8	8	38
4000	0	7	7	8	7	29
8000	0	8	7	8	8	31
12 000	0	0	0	8	0	8
16 000	0	0	0	8	6	14
20 000	0	0	0	8	0	8
Итого	57*	48	56	44	205	

* $K_m = 0,017$ ммоль/л, значения объединены.

коэффициент корреляции закономерно снижался до статистически незначимой величины 0,39 ($p = 0,097$), т. к. связь оказалась нелинейной. На основе полученных

данных формально можно построить нелинейную регрессию с квадратичной формой зависимости (рис. 3): $IC_{50} = -1,9 + 556,6 \times K_m - 2023,6 \times K_m^2$.

Модель статистически значима ($F = 3,65$; $p = 0,049$), коэффициент детерминации модели $R^2 = 0,31$ (соответственно коэффициент множественной корреляции $R = 0,56$). Однако, каков биохимический механизм улучшения противоопухолевых свойств RrA с $K_m = 0,221$ ммоль/л, остается непонятным.

Оценка зависимости противоопухолевого эффекта от K_m

Общий анализ выполнен в популяции из 205 мышей, получивших лечение L-аспарагиназами, и 40 мышей из контрольных групп (табл. 2).

Показано, что в контрольных группах все мыши погибли, ПЖ = $17,05 \pm 2,17$ дня (среднее \pm стандартное отклонение). В группах мышей, получавших препараты L-аспарагиназ, достигнут статистически значимый дозозависимый противоопухолевый эффект, вплоть до полного излечения в отдельных случаях. Для сравнения L-аспарагиназ с различными K_m по уровню противоопухолевой активности разовые дозы сгруппировали в три диапазона: 500–1000, 2000–8000, 12 000–20 000 МЕ/кг — с выделением доли павших мышей в каждом из них (табл. 3).

При невысоких дозах ферментов (500–1000 МЕ/кг), несмотря на отличия в доле неизлеченных мышей от 35 до 100 % ($\chi^2 = 23,22$; $p < 0,001$), зависимости числа павших животных от K_m фермента выявить не удалось ($D = 0,13$). Этот результат обусловлен высокой противоопухолевой активностью L-аспарагиназы WsA, не согласующейся с ее умеренной K_m и не соответствующей ее положению в ряду ферментных препаратов, ранжированных по родству к L-аспарагину.

Наиболее наглядные результаты получены в дозовом диапазоне 2000–8000 МЕ/кг ($n = 98$). В группах ферментов с различной K_m статистически значимым оказалось число неизлеченных мышей ($\chi^2 = 17,8$; $p < 0,001$), но также статистически доказана взаимосвязь противоопухолевой активности от K_m : чем больше K_m , тем выше летальность ($D = 0,52$; $p < 0,001$).

Внутри выделенных дозовых диапазонов расчет доверительных интервалов для частоты неизлеченных животных показал сопоставимый уровень противоопухолевой активности (рис. 4). Так, в группе высокоактивных аспарагиназ YpA и EcA с $K_m = 0,017$ ммоль/л доля неизлеченных мышей составила 35 % (95% ДИ 16–57 %), а для WsA с $K_m = 0,054$ ммоль/л — 7 % (95% ДИ

Таблица 3. Статистическая значимость соотношения числа излеченных и неизлеченных мышей с лимфаденозом Фишера для L-аспарагиназ с различной K_m в зависимости от дозы

Дозовый диапазон, МЕ/кг	Исход	Абсолютное число мышей, %				Статистическая значимость и мера связи
		Величина K_m , ммоль/л				
		0,017	0,054	0,073	0,221	
500–1000, n = 77	Излечение	8 (24 %)	13 (65 %)	—	—	$p < 0,001$
	Гибель	26 (76 %)	7 (35 %)	8 (100 %)	15 (100 %)	$\chi^2 = 23,22$ $D = 0,13$
2000–8000, n = 98	Излечение	15 (65 %)	26 (93 %)	1 (4 %)	3 (13 %)	$p < 0,001$
	Гибель	8 (35 %)	2 (7 %)	23 (96 %)	20 (87 %)	$\chi^2 = 51,1$ $D = 0,50$
$\geq 12 000$, n = 30	Излечение	—	—	7 (29 %)	3 (50 %)	$p = 0,333$
	Гибель	—	—	17 (71 %)	3 (50 %)	$\chi^2 = 0,94$ $D = -0,17$

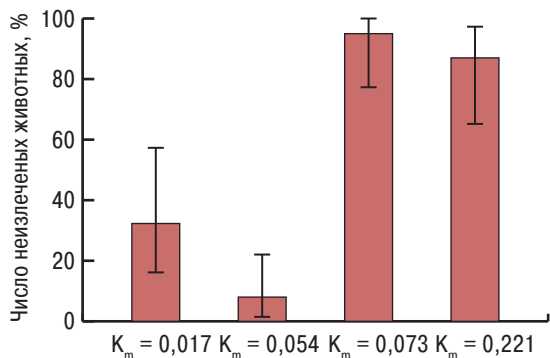


Рис. 4. Соотношение излеченных и неизлеченных мышей после применения L-аспарагиназа с различной K_m в разовой дозе 2000–8000 МЕ/кг

Fig. 4. Ratio between healed and unhealed mice after administration of L-asparaginases with different K_m values using single doses of 2000–8000 IU/kg

1–24 %). Доверительные интервалы перекрываются, что свидетельствует о сопоставимой эффективности L-аспарагиназа с $K_m = 0,017$ и $0,054$ ммоль/л.

Аналогично, среди ферментов с низкой противоопухолевой активностью число неизлеченных животных составило 96 % (95% ДИ 79–100 %) для EwA с $K_m = 0,073$ ммоль/л и 87 % (95% ДИ 66–97 %) для RrA с $K_m = 0,221$ ммоль/л. Таким образом, сопоставляя критерий излечения с уровнем ферментативной активности при дозовом диапазоне 2000–8000 МЕ/кг, прогностически благоприятными по излечению можно считать L-аспарагиназы с $K_m = 0,017$

и $0,054$ ммоль/л, а неблагоприятными — ферменты с $K_m = 0,073$ и $0,221$ ммоль/л соответственно.

При оценке антипролиферативной активности L-аспарагиназа по показателю выживаемости мышей с лейкезом показано, что при дозе более 12 000 МЕ/кг соотношение числа выживших и погибших мышей идентично ($p = 0,333$), значение по шкале Сомерса низкое ($D = -0,17$; $p > 0,05$). Это свидетельствует об отсутствии связи между антипролиферативной и ферментативной активностью L-аспарагиназа при достижении высоких доз.

Оценка этой взаимосвязи выполнена также по ПЖ мышей с лимфаденозом Фишера. При расчете медианы ПЖ учитывали только дозы, не позволяющие вылечить животных. Кривые Каплана—Мейера, построенные по индивидуальным показателям ПЖ мышей, приведены на рис. 5. Поскольку после применения WsA более половины мышей излечены, медиана выживаемости не может быть определена. При дозе 500–1000 МЕ/кг медианы выживаемости составили 31 день для L-аспарагиназа с $K_m = 0,017$ ммоль/л, 15 дней — с $K_m = 0,073$ ммоль/л и 19 дней — с $K_m = 0,221$ ммоль/л. При использовании разовой дозы 2000–8000 МЕ/кг медианы выживаемости для L-аспарагиназа с $K_m = 0,017$ ммоль/л не могут быть определены (более половины животных излечены), для $K_m = 0,073$ и $0,221$ ммоль/л медианы составили 17 и 25 дней соответственно.

Лог-ранговый тест позволил заключить, что при сравнении K_m L-аспарагиназа и ПЖ мышей для L-аспарагиназа с $K_m = 0,054$ и $0,017$ ммоль/л различия значимы: $p = 0,001$ при разовой дозе 500–1000 МЕ/кг,

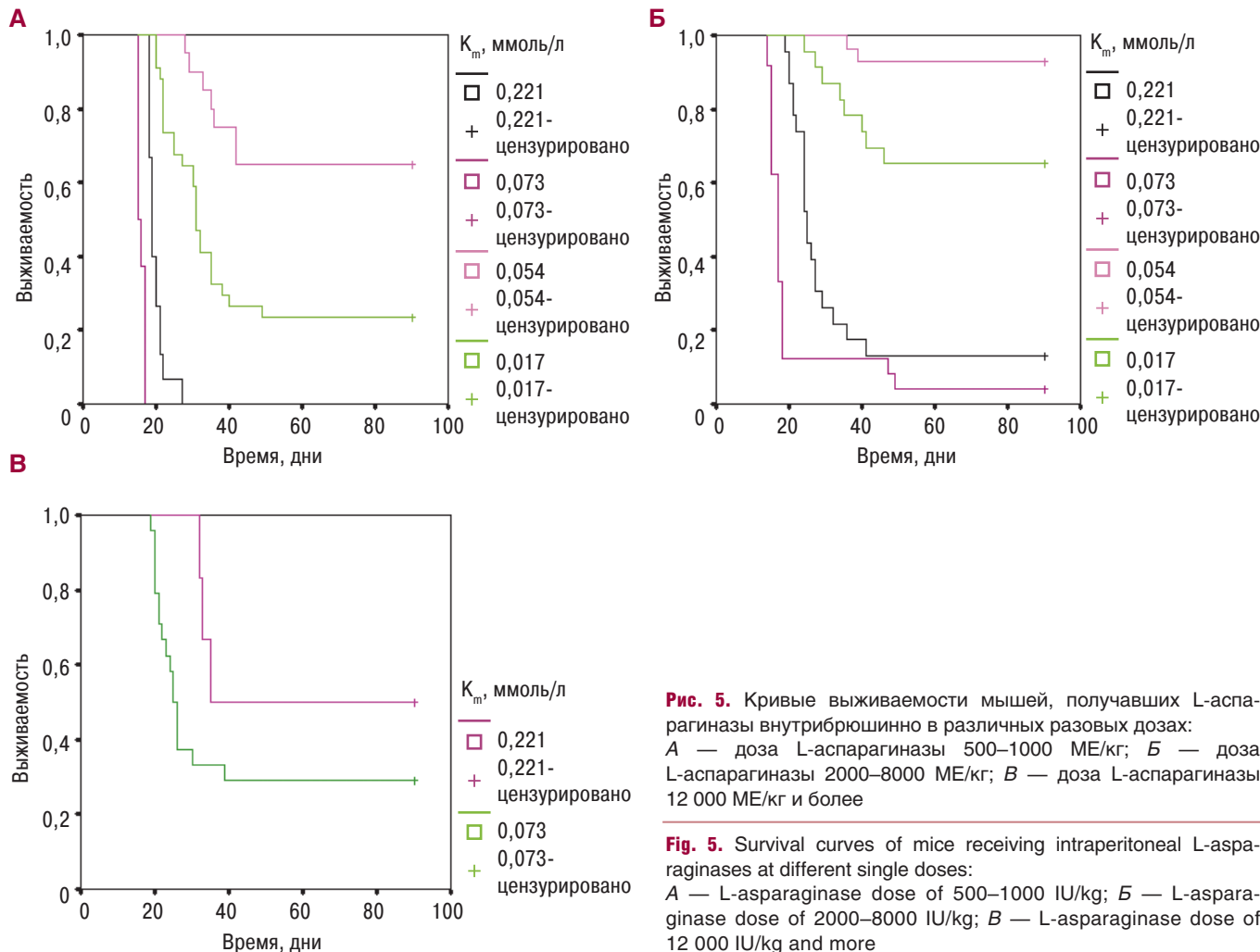


Рис. 5. Кривые выживаемости мышей, получавших L-аспарагиназы внутрибрюшинно в различных разовых дозах: А — доза L-аспарагиназы 500–1000 МЕ/кг; Б — доза L-аспарагиназы 2000–8000 МЕ/кг; В — доза L-аспарагиназы 12 000 МЕ/кг и более

Fig. 5. Survival curves of mice receiving intraperitoneal L-asparaginases at different single doses: А — L-asparaginase dose of 500–1000 IU/kg; Б — L-asparaginase dose of 2000–8000 IU/kg; В — L-asparaginase dose of 12 000 IU/kg and more

Таблица 4. Статистическая значимость различий кривых выживаемости мышей при применении трех дозовых диапазонов L-аспарагиназа с различной ферментативной активностью

K_m сравниваемых пар ферментов, ммоль/л	Диапазон доз, МЕ/кг		
	500-1000	2000-8000	$\geq 12\ 000$
0,017 и 0,054	$p = 0,001$	$p = 0,013$	—
0,017 и 0,073	$p < 0,001$	$p < 0,001$	—
0,017 и 0,221	$p < 0,001$	$p < 0,001$	—
0,054 и 0,073	$p < 0,001$	$p < 0,001$	—
0,054 и 0,221	$p < 0,001$	$p < 0,001$	—
0,073 и 0,221	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,160$

ПРИМЕЧАНИЕ. Все p по лог-ранговому критерию.

Таблица 5. Статистические показатели взаимосвязи между K_m L-аспарагиназа и продолжительностью жизни мышей с лимфаденозом

Диапазон доз, МЕ/кг	n	r	p
500–1000	77	–0,47	$< 0,001$
2000–8000	98	–0,58	$< 0,001$
$\geq 12\ 000$	30	0,37	0,045

$p = 0,013$ при 2000–8000 МЕ/кг; для L-аспарагиназа с $K_m = 0,073$ и 0,221 ммоль/л значение $p < 0,001$ (табл. 4). При применении L-аспарагиназа с $K_m = 0,017$ ммоль/л выживаемость мышей была значимо лучше по сравнению с двумя менее активными ферментами ($p < 0,001$). При лечении L-аспарагиназами в разовой дозе 12 000 МЕ/кг и выше различия в выживаемости между ферментами EwA и RrA не выявлены.

Следует отметить, что кривые Каплана—Мейера не дают оценку направленности взаимосвязи факторов риска и выживаемости или смертности. Именно по этой причине для оценки силы связи между выживаемостью и биохимическими свойствами фермента мы провели корреляционный анализ.

Расчет коэффициентов корреляции при диапазоне разовых доз 500–1000 МЕ/кг показал обратную зависимость между K_m и антипролиферативной активностью L-аспарагиназа: чем больше K_m , тем меньше ПЖ ($r = -0,47$; $p < 0,001$) (табл. 5). При разовой дозе 2000–8000 МЕ/кг данная взаимосвязь была подтверждена ($r = -0,58$; $p < 0,001$), а при высоких дозах отмечена обратная зависимость ($r = 0,37$; $p = 0,045$), возможно,

из-за неодинаковой выборки для сравнения: в дозах до 8000 МЕ/кг сравнивались все ферменты из 5 микроорганизмов, а в разовой дозе 12 000 МЕ/кг и более — только EwA и RrA. Поскольку в высокодозные группы по этическим соображениям не включены самые активные ферменты с $K_m = 0,017$ и 0,054 ммоль/л, при дозе 12 000 МЕ/кг и более ПЖ неизвестна, сравнение коэффициентов корреляции в группах с разным числом ферментов не вполне корректно. При корреляционном анализе в общей популяции из 205 животных, получивших ферменты в различных дозах, подтверждается обратная зависимость между K_m и ПЖ животного ($r = -0,44$; $p < 0,001$).

Помимо описанных выше расчетов для выявления влияния ферментативной активности на антипролиферативную была использована регрессионная модель Кокса. Хотя эта модель и не предлагает никакой меры для оценки силы связи, она хорошо отражает цензурированные наблюдения (излеченные животные, у которых истинная ПЖ неизвестна, показано только время до окончания наблюдения за ними). Регрессионная модель Кокса — полупараметрическая, т. е. она не позволяет вычислять непосредственно риск гибели от опухолевого процесса (неизлеченности), но показывает, во сколько раз он возрастает с увеличением значений предикторов — предсказывающих переменных в модели.

K_m и доза препарата были рассмотрены как номинальные признаки, когда каждая градация (т. е. каждая отдельная K_m или дозовый диапазон) сравнивается с референсной категорией. Это обусловлено отсутствием достоверных признаков линейности взаимосвязи K_m и дозы препарата с риском неизлеченности. При этом параметры модели — экспоненциальные коэффициенты — показывают, во сколько раз больше риск неизлеченности при данном значении признака по сравнению с референсным (табл. 6).

Результаты моделирования показали, что при разовой дозе 1000 МЕ/кг K_m L-аспарагиназа не имеет выраженной однонаправленной связи с антипролиферативной активностью. Так, для WsA с $K_m = 0,054$ ммоль/л прогноз риска неизлеченности меньше по сравнению с референсным ферментом с $K_m = 0,017$ ммоль/л (относительный риск [ОР] 0,28; 95% ДИ 0,12–0,65), а для RrA со значительно меньшей ферментативной активностью риск неизлеченности был больше (ОР 10,77; 95% ДИ 4,6–24,75). Для EwA с $K_m = 0,073$ ммоль/л анализ по

Таблица 6. Моделирование риска неизлеченности мышей с лимфаденозом с помощью регрессионной модели Кокса в зависимости от предиктора (K_m /дозы L-аспарагиназы)

Дозовый диапазон, МЕ/кг	Число наблюдений		Предиктор	Градации предиктора	ОР (95% ДИ)	p
	всего	излеченные				
500–1000	77	21	K_m	0,017*	1	—
				0,054	0,28 (0,12–0,65)	0,003
				0,073	$4,84 \times 10^6$ ($7,42 \times 10^{94}$ – $3,16 \times 10^{106}$)	0,896
				0,221	10,77 (4,69–24,75)	$< 0,001$
2000–8000	98	45	K_m	0,017*	1	—
				0,054	0,16 (0,03–0,75)	0,020
				0,073	26,83 (9,82–73,33)	$< 0,001$
				0,221	6,63 (2,72–16,18)	$< 0,001$
			Доза, МЕ/кг	2000*	1	—
				4000	0,53 (0,26–1,05)	0,136
	8000	0,19 (0,08–0,44)	$< 0,001$			

* Референсное значение.

ОР — относительный риск неизлеченности.

данному параметру оказался статистически незначимым, поскольку влияние на выживаемость мышей отсутствует.

При средней разовой дозе L-аспарагиназ (2000–8000 МЕ/кг) на выживаемость мышей с лимфаденозом оказывала влияние и K_m , и доза. При увеличении разовой дозы до 8000 МЕ/кг риск неизлеченности, как и ожидалось, уменьшался (ОР 0,19; 95% ДИ 0,08–0,44). Что касается K_m , то зависимость противоопухолевой активности от K_m и в этой модели оказалась нелинейной. Использование WsA с $K_m = 0,054$ ммоль/л снижало риск неизлеченности (ОР 0,16; 95% ДИ 0,03–0,75), а ферментов с $K_m = 0,073$ и 0,221 ммоль/л — резко его увеличивало по сравнению с референсным ферментом с $K_m = 0,017$ ммоль/л: ОР 26,83 (95% ДИ 9,82–73,33) и ОР 6,63 (95% ДИ 2,72–16,18) соответственно.

В представленных в табл. 6 результатах референсными были L-аспарагиназы с максимальной ферментативной активностью ($K_m = 0,017$ ммоль/л). Если построить аналогичные модели, но использовать в качестве референсного фермент с минимальной активностью ($K_m = 0,221$ ммоль/л), риск неизлеченности статистически значимо снижался для L-аспарагиназ с $K_m = 0,017$ и 0,054 ммоль/л. При использовании эквивалентных доз ОР для самых активных ферментов (YpA и EcA) составил 0,09 (95% ДИ 0,04–0,21) и 0,15 (95% ДИ 0,06–0,37) для 500–1000 и 2000–8000 МЕ/кг соответственно; для WsA — ОР 0,03 (95% ДИ 0,01–0,08) и 0,02 (95% ДИ 0,01–0,11) соответственно. При этом для ферментов с $K_m = 0,017$ ммоль/л по сравнению с RrA ($K_m = 0,221$ ммоль/л) риск неизлеченности снижался в 7–10 раз в зависимости от примененной дозы, а для WsA — в 39–42 раза.

Таким образом, в изученном диапазоне доз по уменьшению риска неизлеченности мышей ферменты распределяются следующим образом: EwA ($K_m = 0,073$ ммоль/л), RrA ($K_m = 0,221$ ммоль/л), YpA/EcA ($K_m = 0,017$ ммоль/л), WsA ($K_m = 0,054$ ммоль/л). Следовательно, применение WsA, в отличие от математически предполагаемых исходов, снижает риск неизлеченности.

ОБСУЖДЕНИЕ

С момента выявления противоопухолевой активности L-аспарагиназ взаимосвязь антипролиферативного эффекта и кинетических параметров ферментативных реакций статистически не анализировали [14]. Оценка структурно-функциональных особенностей различных L-аспарагиназ позволила лишь сгруппировать ферменты по наличию или отсутствию активности и особенностям первичной структуры. На основании первичной структуры и локализации (внутриклеточной или периплазматической) было выделено два типа ферментов бактериального происхождения [24]. При этом постулировалось, что антипролиферативное действие проявляют только периплазматические бактериальные аспарагиназы II типа с существенно более высоким сродством к L-аспарагину.

Отсутствие данных по установлению взаимосвязи ферментативной и антипролиферативной активности L-аспарагиназ можно объяснить невозможностью сопоставления количественных показателей этих видов активности, полученных с ферментами различного происхождения, разными исследователями и в разнообразных экспериментах, что служит причиной существенной вариабельности указанных параметров. Так, в экспериментах, выполненных на разных

культурах клеток, при различном числе клеток в момент внесения фермента, разной продолжительности коинкубации и с разными методиками оценки цитотоксичности, получаются неодинаковые величины IC_{50} для одного и того же фермента. Это обстоятельство справедливо и для экспериментов *in vivo*: прививочная доза опухолевых клеток, схема применения и чувствительность опухолевой модели, как правило, определяют ответ на лечение.

Поскольку ретроспективные данные оказались несопоставимыми для анализа искомой взаимосвязи, нами в условиях одинакового дизайна выполнено проспективное исследование значимых показателей кинетической ферментативной и антипролиферативной активности *in vitro* и *in vivo* ряда новых L-аспарагиназ. В качестве основных сопоставляемых параметров были выбраны константа Михаэлиса (K_m), прямо характеризующая сродство фермента к конкретному субстрату, и количественные параметры цитотоксической (IC_{50}) или противоопухолевой активности (увеличение ПЖ, излечение, гибель от опухоли). Идентичность дизайна и одномоментность определения показателей активности позволяют считать результаты экспериментов полностью сопоставимыми.

Анализ зависимости цитотоксической активности от K_m в ряду периплазматических L-аспарагиназ II типа (EcA, EwA, YpA и WsA) позволил выявить отчетливую тенденцию: с повышением K_m увеличивалась IC_{50} ($r = 0,66$; $p = 0,007$).

Соотношение показателей выживаемости и K_m для диапазона разовых доз 2000–8000 МЕ/кг активных L-аспарагиназ позволило выделить группы, сочетающие высокую или низкую ферментативную активность и высокую или низкую эффективность при соответственно низком или высоком числе неизлеченных животных. При данном диапазоне доз лучшими по выживаемости и излечению оказались L-аспарагиназы с $K_m = 0,017$ и 0,054 ммоль/л по сравнению с L-аспарагиназами с меньшей ферментативной активностью, что подтверждено соответствующими значениями ОР в регрессионной модели Кокса. Под действием L-аспарагиназ ПЖ животных до гибели от опухоли или до прекращения наблюдения тем больше, чем меньше K_m . При этом обратная связь показателей наиболее тесная при дозовом диапазоне 2000–8000 МЕ/кг ($r = -0,58$) и несколько меньше в других диапазонах дозы.

Исключение составляет RrA с $K_m = 0,221$ ммоль/л, которая обладает не столь низкой противоопухолевой активностью, как можно было бы предположить, исходя из гипотезы линейной зависимости биохимических свойств и антипролиферативного эффекта. Это проявилось как *in vivo* на модели лимфаденоза, так и в культуре клеток, где прослежена нелинейная зависимость IC_{50} от K_m . Лучший профиль соотношения K_m и антипролиферативной активности *in vitro* и *in vivo* показала WsA. Это продемонстрировано не только с помощью кривых Каплана—Мейера и попарным их сравнением лог-ранговым критерием, но и методом регрессии Кокса, позволяющим рассчитать ОР отсутствия излечения. По сравнению с препаратами L-аспарагиназ с $K_m = 0,017$ ммоль/л у мышей с L5178 WsA риск неизлеченности статистически значимо снижался в 4–6 раз в случае применения разовых доз 500–1000 и 2000–8000 МЕ/кг (ОР 0,16 и 0,28 соответственно).

Таким образом, полученные результаты позволили установить прогностическую значимость активности ферментов, обозначенных в исследовании, для проявления

статистически значимой антипролиферативной активности *in vitro* и *in vivo*. В то же время статистический анализ показал, что для отдельных ферментов или дозовых диапазонов этот прогноз не является абсолютным. В частности, для диапазона высоких эффективных доз более 12 000 МЕ/кг такая взаимосвязь может отсутствовать. Очевидно, что сродство к L-аспарагину, хотя и служит в ряде случаев достоверным признаком активности L-аспарагиназ в отношении определенных типов злокачественных клеток, не является обязательным фактором в этой зависимости. В качестве возможных альтернативных причинно-следственных связей биологической активности в данной группе ферментов известны по крайней мере две: сродство к другим аминокислотам (прежде всего, к L-глутамину) и возможность связывания с другими эндогенными белками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Множественность биохимических реакций, протекающих с участием различных L-аспарагиназ, остается предметом пристального внимания для выявления факторов прогноза эффективности противоопухолевых ферментов. Это особенно важно на этапе конструирования первичной аминокислотной последовательности и определения биохимических свойств потенциального ферментного препарата с оптимизированной фармакологической активностью, разработка и выведение на рынок которого направлены на улучшение результатов лечения пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при частичной поддержке гранта благотворительного фонда «Протек».

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: В.С. Покровский, Е.М. Трещалина.
Сбор и обработка данных: В.С. Покровский, М.В. Комарова, С.С. Александрова, М.В. Покровская, М.С. Калишьян, С.Ш. Каршиева.
Предоставление материалов исследования: В.С. Покровский.
Анализ и интерпретация данных: В.С. Покровский.
Подготовка рукописи: В.С. Покровский.
Окончательное одобрение рукописи: В.С. Покровский, Е.М. Трещалина.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Rizzari C., Conter V., Stary J. et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* 2013; 1(Suppl.): S1–9. doi: 10.1097/CCO.0b013e32835d7d8.
- Salzer W., Seibel N., Smith M. Erwinia asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2012; 12(10): 1407–14. doi: 10.1517/14712598.2012.718327.
- Gui W., Yang B., Shen Q. et al. Successful treatment with L-asparaginase based regimen for primary pulmonary NK/T cell lymphoma: a case report and review of the literature. *Clin. Respir. J.* 2014. doi: 10.1111/crj.12156; Online Version of Record published before inclusion in an issue.

- Emadi A., Zokaei H., Sausville E.A. Asparaginase in the treatment of non-ALL hematologic malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2014; 73(5): 875–83. doi: 10.1007/s00280-014-2402-3.
- Tse E., Kwong Y.L. Practical management of natural killer/T-cell lymphoma. *Curr. Opin. Oncol.* 2012; 24(5): 480–6. doi: 10.1097/CCO.0b013e3283556142.
- Avramis V.I., Panosyan E.H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin. Pharmacokinet.* 2005; 44: 367–93.
- Avramis V.I., Tiwari P.N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Nanomed.* 2006; 1(3): 241–54.
- Panosyan E.H., Grigoryan R.S., Avramis I.A. et al. Deamination of glutamine is a prerequisite for optimal asparagine deamination by asparaginases *in vivo* (CCG-1961). *Anticancer Res.* 2004; 24: 1121–5.
- Rotoli B.M., Uggeri J., Dall'Asta V. et al. Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2005; 15(6): 281–92.
- Tardito S., Uggeri J., Bozzetto C. et al. The inhibition of glutamine synthetase sensitizes human sarcoma cells to L-asparaginase. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007; 60(5): 751–8.
- Ankel E.G., Zirneski J., Ring B.J., Holcenberg J.S. Effect of asparaginase on cell membranes of sensitive and resistant mouse lymphoma cells. *In Vitro.* 1984; 20(5): 376–84.
- Liu J.J., Dai X.J., Xu Y. et al. Inhibition of lymphoma cell proliferation by peroxisomal proliferator-activated receptor- γ ligands via Wnt signaling pathway. *Cell. Biochem. Biophys.* 2012; 62(1): 19–27.
- Fidler I.J., Montgomery P.C. Effects of L-asparaginase on lymphocyte surface and blastogenesis. *Cancer Res.* 1972; 32(11): 2400–6.
- Покровский В.С., Лесная Н.А., Трещалина Е.М., Лукашева Е.В., Березов Т.Т. Перспективы разработки новых ферментных противоопухолевых препаратов. *Вопросы онкологии.* 2011; 57(2): 155–64. [Pokrovskii V.S., Lesnaya N.A., Treshchalina E.M., Lukashcheva E.V., Berезov T.T. Perspectives of development of new enzymatic antitumor agents. *Voprosy onkologii.* 2011; 57(2): 155–64. (In Russ.)]
- Сидорук К.В., Покровский В.С., Борисова А.А., Омелянюк Н.М., Александрова С.С., Покровская М.В., Гладиллина Ю.А., Богуш В.Г., Соколов Н.Н. Создание продуцента, оптимизация экспрессии и очистки рекомбинантной L-аспарагиназы *Yersinia pseudotuberculosis*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2011; 152(8): 179–84. [Sidoruk K.V., Pokrovskii V.S., Borisova A.A., Omel'yanuk N.M., Aleksandrova S.S., Pokrovskaya M.V., Gladilina Yu.A., Bogush V.G., Sokolov N.N. Creation of producer, optimization of expression and purification of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny.* 2011; 152(8): 179–84. (In Russ.)]
- Pokrovskaya M.V., Pokrovsky V.S., Aleksandrova S.S., Anisimova N.Yu., Andrianov R.M., Treshchalina E.M., Ponomarev G.V., Sokolov N.N. Recombinant intracellular *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. *Biochemistry (Mosc.). Suppl. B: Biomed. Chem.* 2012; 6: 121–31.
- Покровский В.С., Анисимова Н.Ю., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н., Трещалина Е.М. Антипролиферативная активность рекомбинантной L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum*. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.* 2011; 22(4): 24–31. [Pokrovskii V.S., Anisimova N.Yu., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N., Treshchalina E.M. Antiproliferative activity of recombinant *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN.* 2011; 22(4): 24–31. (In Russ.)]
- Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. М.: Практическая медицина, 2009. 171 с. [Treshchalina E.M. *Kolleksiya opukholevykh shtammov cheloveka.* (Collection of human tumor strains.) Moscow: Prakticheskaya Meditsina Publ., 2009. 171 p.]
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. М.: Гриф и К, 2012: 642–57. [Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V., Garin A.M. Guidelines for preclinical studies of antitumor activity of medicinal agents. In: *Guidelines for preclinical studies of medicinal agents. Part one.* Moscow: Grif & K Publ., 2012. pp. 642–57.]
- Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. М.: Практическая медицина, 2005. [Treshchalina E.M. *Protivoopukholevaya aktivnost' veshchestv prirodnogo proiskhozhdeniya.* (Antitumor activity of substances of natural origin.) Moscow: Prakticheskaya Meditsina Publ., 2005.]
- Chabner B.A., Longo D.L. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001.
- Newson R. Parameters behind "nonparametric" statistics: Kendall's tau, Somers' D and median differences. *Stata J.* 2002; 2(1): 45–64.
- Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statist. Med.* 1998; 17: 857–872.
- Borek D., Jaskolski M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica.* 2001; 48(4): 893–902.