

Optimizacija postopka za določitev aktivnosti asparaginaze pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo

Optimisation of asparaginase activity assay in patients with acute lymphoblastic leukemia

Eva Kozjek¹, Alenka Trampuš Bakija¹

¹Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

doc. dr. Alenka Trampuš Bakija, spec. med. biokem.

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana, e-pošta: alenka.trampus@kclj.si

POVZETEK

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) je najpogostejša rakava bolezen pri otrocih. Eno ključnih komponent pri zdravljenju ALL predstavlja asparaginaza, katere aktivnost v krvi mora biti vsaj 100 U/L, da pride do celične smrti levkemičnih blastov. Veliko oviro pri zdravljenju ALL predstavlja razvoj protiteles proti asparaginazi, kar vodi v inaktivacijo encima. Prepoznavanje te inaktivacije encima in prilagoditev zdravljenja morata biti čim hitrejša, izbrana metoda pa ustrezati dobri laboratorijski praksi. Pri uvajanju in oceni metode smo optimizirali že opisano indooksiinsko spektrofotometrično metodo za določanje asparaginazne aktivnosti v serumu in določili statistične parametre. Pri tem smo spremenili temperaturo hranjenja substrata in podaljšali čas inkubacije substrata v reakci-

ji. Izračunane vrednosti koeficienta variacije za ponovljivost, točnost in celokupne analitske napake niso presegle meje 30 %, s čimer smo potrdili analitsko ustreznost postopka. Pri bolnikih, zdravljenih s PEG asparaginazo smo v različnih časovnih intervalih izmerili encimske aktivnosti, ki so padale od dneva aplikacije zdravila. Pri bolnikih z zapleti ob prejemanju asparaginaze smo izmerili vrednosti, ki kažejo na tiho inaktivacijo encima. Optimizirana metoda je primerna za klinično diagnostiko in omogoča identifikacijo bolnikov, pri katerih je potrebna sprememba vrste asparaginaze zaradi tihe inaktivacije.

Ključne besede: asparaginaza, encimska aktivnost, tiha inaktivacija

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children. One of the key components in the tre-

atment of ALL is asparaginase whose activity in the blood should be at least 100 U/L for certain cell death of le-

ukemic blasts. A major disadvantage in ALL treatment is the occurrence of anti-asparaginase antibodies leading to inactivation of the enzyme. It is of utmost importance to detect silent enzyme inactivation as soon as possible. The chosen method should be in accordance with good laboratory practice. In the process of method introduction and evaluation, we optimized the already described indooxin spectrophotometric method for the determination of asparaginase activity in serum and determined the statistical parameters. We changed the storage temperature of the substrate and extended the incubation time of the substrate in the reaction. The calculated values of the coefficient of variation for repeatability, accuracy, and total analyti-

cal error did not exceed the limit of 30%, thus confirming the analytical suitability of the procedure. In patients treated with PEG asparaginase, enzyme activities were measured at various time intervals. The values decreased from the day of drug administration. In patients with asparaginase complications values indicating silent enzyme inactivation were measured. The optimized method is suitable for clinical diagnostics and allows the identification of patients in whom asparaginase preparation needs to be changed due to silent inactivation.

Key words: asparaginase, enzyme activity, silent inactivation

UVOD

Akutna limfoblastna levkemija (ALL) je najpogostejša rakava bolezen pri otrocih, v Sloveniji v povprečju zbolijo od 10 do 15 otrok na leto. Preživetje bolnikov z ALL je precej visoko, saj se uspešno pozdravi več kot 80 % vseh pediatričnih bolnikov z ALL. K izboljššanemu preživetju je v zadnjih 50 letih pripomogla tudi asparaginaza, ki predstavlja eno ključnih komponent pri zdravljenju ALL. V državah po svetu so v uporabi različni protokoli zdravljenja bolnikov z B- in T-celično ALL. Asparaginaza se sicer uporablja tudi pri zdravljenju nekaterih drugih malignih boleznih, kot so ne-Hodgkinovi limfomi, med njimi T- in B-limfoblastni limfom, Burkittov limfom, difuzni velikecelični B-limfom idr. (1). Asparaginaza kot zdravilo je vključena v indukcijsko in reindukcijsko fazo zdravljenja s kombinacijo citostatikov. Intenzivnejše in daljše zdravljenje z asparaginazo izboljša preživetje teh bolnikov (2).

Asparaginaza je encim, ki katalizira hidrolizo asparagina v asparaginsko kislino in amonijak. Aminokislino asparagin dobimo v telo s hrano, organizem pa ga lahko sintetizira tudi sam iz asparaginske kisline, za kar je potreben encim asparagin sintetaza. Levkemični blasti imajo zmanjšano sposobnost sinteze asparagina (imajo zmanjšano aktivnost asparagin sintetaze) v primerjavi z normalnimi limfoblasti in so zato močno odvisni od zunanjih virov asparagina. Ob razgradnji asparagina v krvnem obtoku pride do zmanjšane sinteze DNA in RNA, zmanjšane sinteze celičnih proteinov, zavrtja celične rasti in okvar celičnih funkcij ter celične smrti (3, 4). Cilj zdravljenja z asparaginazo je, da dosežemo zadostno zmanjšanje aspa-

ragina v krvnem obtoku. Da pride do celične smrti levkemičnih blastov, mora biti aktivnost asparaginaze v krvi vsaj 100 U/L z zmanjšanjem koncentracije asparagina pod 0,1 $\mu\text{mol/L}$ (5).

V naravi asparaginazo najdemo v različnih rastlinah, živalih in mikroorganizmih. Večina asparaginaz v naravi v deležu do 10 % svoje aktivnosti hidrolizira tudi glutamin v glutaminsko kislino in amonijak. V klinični rabi so asparaginaze, pridobljene iz mikroorganizmov: izolirano iz *Escherichia coli* (nativna oblika), izolirano iz *Erwinia chrysanthemi* in modificirani (pegiliran-PEG) encim, izoliran iz *E. coli*. Vse tri vrste imajo enak mehanizem delovanja, med seboj pa se razlikujejo v določenih biokemičnih in farmakokinetičnih lastnostih. Zaradi tega se razlikujejo tudi protokoli zdravljenja ALL s posamezno vrsto asparaginaze (3). V splošnem velja, da je en odmerek 1000–2500 U/m² PEG asparaginaze na štirinajst dni enako učinkovit kot odmerki 5000–10000 U/m² nativne asparaginaze na tri dni oz. odmerki 10000–25000 U/m² *Erwinia* asparaginaze na dva dni (6, 7).

Kljub temu, da so normalne celice sposobne sintetizirati asparagin in jih pomanjkanje le-tega med zdravljenjem z asparaginazo manj prizadene, lahko zaradi zmanjšane sinteze proteinov vseeno pride do okvar celičnih funkcij in pojava neželenih učinkov. Ker se asparaginaza uporablja v kombinaciji z drugimi zdravili za zdravljenje ALL, sicer ni vedno mogoče povezati določenega neželenega učinka s specifično zdravilno učinkovino (3, 8).

»

Veliko oviro pri zdravljenju ALL predstavljajo preobčutljivostne reakcije (9). Razvoja protiteles proti asparaginazi ne spremljajo vedno klinično izražene reakcije, a kljub temu protitelesa zmanjšajo aktivnost encima. Opisano je, da do tega stanja pride pri 8–30 % bolnikov, zdravljenih z nativno asparaginazo. Ta delež je še večji pri bolnikih, pri katerih je prišlo do ponovitve bolezni. Tiha inaktivacija predstavlja resen zaplet pri zdravljenju ALL, saj brez kliničnih znakov, ki nakazujejo pojav protiteles in s tem zmanjšano delovanje asparaginaze, hiter odziv zdravnikov ni mogoč. Spremljanje encimske aktivnosti asparaginaze v krvi med samim zdravljenjem omogoča identifikacijo bolnikov s tiho inaktivacijo in prilagoditev zdravljenja z zamenjavo vrste asparaginaze (10–12). Zaradi manjše imunogenosti in manj pogostih odmerkov (v primerjavi z nativno asparaginazo) se je PEG asparaginaza uveljavila kot prva izbira zdravljenja, ki jo v primeru alergijske reakcije zamenjajo z *Erwinia* asparaginazo (7).

Pri zdravljenju s PEG asparaginazo je tiha inaktivacija opredeljena kot encimska aktivnost pod 100 U/L sedmi dan po aplikaciji zdravila pri bolnikih brez kliničnih znakov alergije in/ali encimska aktivnost pod mejo kvantifikacije štirinajsti dan po aplikaciji zdravila. Pri zdravljenju z nativno asparaginazo je tiha inaktivacija opredeljena kot aktivnost pod mejo kvantifikacije tretji dan po aplikaciji, pri zdravljenju z *Erwinia* asparaginazo pa drugi dan po aplikaciji (13). Zaradi možnosti pojava tihe inaktivacije raven encimske aktivnosti običajno preverjamo pred naslednjim odmerkom, lahko pa tudi pogosteje (13).

Za zagotovitev optimalnega odziva bolnika na zdravljenje z asparaginazo je priporočljivo spremljanje učinkovitosti delovanja asparaginaze. Opisanih je več metod. Merjenje

koncentracije asparagina v krvi ob prisotnosti asparaginaze je tehnično zahtevno in ima veliko predanalizno variabilnost (14, 15). Samo *določanje protiteles* proti asparaginazi v krvi ne zadošča za spremljanje uspešnosti zdravljenja, saj se pri bolnikih lahko razvijejo tudi protitelesa, ki ne vplivajo na delovanje encima, a sprožijo preobčutljivostno reakcijo s podobnimi simptomi kot protitelesa, ki nevtralizirajo encimsko aktivnost asparaginaze (11, 16). Za spremljanje se je najbolj uveljavilo *merjenje encimske aktivnosti asparaginaze* v krvi, ki je tehnično lažje izvedljivo in ponovljivo. Večinoma se uporabljajo kolorimetrične metode, ki temeljijo na hidrolizi L-asparagina z L-asparaginazo (17).

Lanvers s sodelavci je opisala analizo metodo za terapevtsko spremljanje L-asparaginaze, ki temelji na indooksinski metodi in se izvaja na mikrotitrski ploščici. Metoda ima dobro občutljivost, saj omogoča zaznavanje asparaginazne aktivnosti v serumu pri vrednosti 2×10^{-5} U asparaginaze z območjem linearnosti med 2,5 in 75 U/L (nižje območje) ter med 75 in 1250 U/L (višje območje). Omogoča tudi določitev aktivnosti različnih vrst asparaginaze (18). V Univerzitetnem medicinskem centru Erasmus MC v Rotterdamu so na osnovi opisane metode razvili modificiran protokol za kvantifikacijo asparaginaze v serumu, ki je prilagojen serumskim koncentracijam asparaginaze pri bolnikih ob tihi inaktivaciji in brez nje (19).

Namen raziskave na Kliničnem inštitutu za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, je optimizirati že opisano indooksinsko encimsko spektrofotometrično metodo in opredeliti njeno natančnost in točnost. Ugotoviti želimo, ali bo metoda primerna za določanje encimske aktivnosti asparaginaze v serumu tistih bolnikov, ki se zdravijo z asparaginazo, ter za prepoznavanje tihe preobčutljivostne reakcije.

MATERIALI IN METODA

Materiali: TRIS/BSA pufer (1,955 g TRIS; 37,5 mg BSA; 250 mL destilirane vode; pH 7,3); L-aspartat β -hidroksimat (Sigma Aldrich, 2 mM in 10 mM v TRIS/BSA pufru), trikloroocetna kislina (24,5 %); hidroksikinolin (8-Hydroxyquinoline, Sigma Aldrich, 2-odstotna raztopina v absolutnem alkoholu); Na_2CO_3 (1,0 M); reagent Oxin (2-odstotni hidroksikinolin in 1,0 M Na_2CO_3 1:3); PEG asparaginaza 750000 U/L (Oncaspar® – 3750 enot PEG asparaginaze, prašek za raztopino za injiciranje, Ser-

vier Laboratories); sveža zamrznjena plazma.

Za kalibracijo smo pripravili raztopine standardov z redčenjem PEG asparaginaze s TRIS/BSA pufrom do koncentracije 3000 U/L, nato s svežo zamrznjeno plazmo do končnih koncentracij (5–100 U/L za nižje območje in 100–1000 U/L za višje območje). Kontrolne vzorce smo pripravili na enak način kot raztopine standardov.

Vzorci bolnikov: v raziskavo smo vključili pediatrične bolnike (starost 3–15 let), ki so bili v času izvajanja raziskave na kemoterapiji in so se zdravili s PEG asparaginazo (Oncaspar®). Uporabili smo alikvote vzorcev serumov osmih bolnikov z ALL ali T-limfoblastnim limfomom, odvzetih za druge biokemične preiskave. Vzorce seruma smo do analize hranili na temperaturi ≤ -70 °C.

Metoda: Za določitev aktivnosti PEG asparaginaze uporabljamo indooksinsko metodo na mikrotitrski ploščici. V prvem koraku L-asparaginaza (20 μ L vzorca seruma, kalibratorja, kontrole) med 10-minutno inkubacijo na 37 °C hidrolizira AHA substrat (180 uL) v L-asparaginsko kislino in hidroksilamin. Z dodatkom TCA ustavimo reakcijo. V naslednjem koraku k supernatantu prve reakcije doda-

mo reagent Oxin in inkubiramo eno minuto na 95 °C ter 20 minut na sobni temperaturi. Oxin reagira s hidroksilaminom, da nastane indooksin (5,8-kinolinkinon-5-(8-hidroksi-5-kinolilimid)). Slednji je intenzivno zelene barve in ga lahko določimo spektrofotometrično pri valovni dolžini med 690 in 710 nm (20). Aktivnost PEG asparaginaze je premo sorazmerna z absorbanco. Za pripravo kalibracijske krivulje v nizkem in visokem koncentracijskem območju merjenja uporabimo 4-parametrično krivuljo Marquardt, ki zagotovi maksimalno prileganje točk. Rezultate aktivnosti izrazimo v U/L (1 U = 16,7 nkat). Ena enota (U) L-asparaginaze je opredeljena kot količina encima, ki je potrebna za pretvorbo 1 μ mol L-asparagina v 1 μ mol L-asparaginske kisline in 1 μ mol amonijaka na minuto pri 37 °C (18).

REZULTATI

Pri uvajanju in oceni lastnosti metode smo optimizirali že opisani postopek (19) za določanje asparaginazne aktivnosti v serumu in pogoje ravnanja z reagenti. Zaradi slabe stabilnosti substrata smo tako temperaturo njegovega hranjenja spremenili z 2–8 °C na –20 °C. Fazo inkubaci-

je pred odčitavanjem absorbance smo podaljšali za 10 minut, da smo dobili višje absorbance, ustrezno prileganje kalibracijskih točk, odstopanje od ciljnih vrednosti kontrol pa se je s tem zmanjšalo za 10 % (Tabela 1).

Tabela 1: Primerjava odstopanja kontrolnih vzorcev od ciljne vrednosti v nizkem in visokem kalibracijskem območju glede na čas po inkubaciji; *n* – število meritev

Table 1: Comparison of deviation of control samples from the target value in the low and high calibration range in different incubation time; *n* – number of measurements

	Odstopanje od ciljne vrednosti [%] nizko kalibr. območje			Odstopanje od ciljne vrednosti [%] visoko kalibr. območje			Povprečno odstopanje
	10	50	100	150	500	1000	
Aktivnost asparaginaze ciljna vrednost [U/L]							
n	24			24			
Po 10 min	20,4	22,8	21,9	15,1	19,8	29,4	21,6
Po 20 min	10,6	15,5	13,4	7,2	9,1	13,6	11,6

Aktivnost asparaginaze smo določali v visokem kalibracijskem območju (100–1000 U/L) z uporabo višje koncentracije substrata. Pri aktivnosti asparaginaze pod 100 U/L

smo analizo ponovili v nizkem kalibracijskem območju (5–100 U/L) z uporabo nižje koncentracije substrata. Aktivnost asparaginaze v serumskem vzorcu smo odčitali iz »

kalibracijske krivulje, ki smo jo določili z merjenjem absorbanc indooksina pri 690 nm v raztopinah standardov pri vsaki seriji meritev.

Z merjenjem kontrolnih plazem pri šestih različnih koncentracijah PEG asparaginaze smo ocenili natančnost (koeficient variacije), točnost (relativna napaka) in merilno negotovost (celokupna analitska napaka) optimizira-

ne metode. Koeficient variacije za ponovljivost je znašal < 10 %, relativna napaka za točnost < 9 %, celokupna napaka pa okoli 24 % (Tabela 2). Statistični parametri, ki smo jih določili, so potrdili analitsko ustreznost postopka. Tri vzorce smo primerjalno izmerili v zunanjem laboratoriju, ki uporablja enako metodo kot mi. Relativna napaka je znašala < 10 %, rezultati so med sabo bili primerljivi (21).

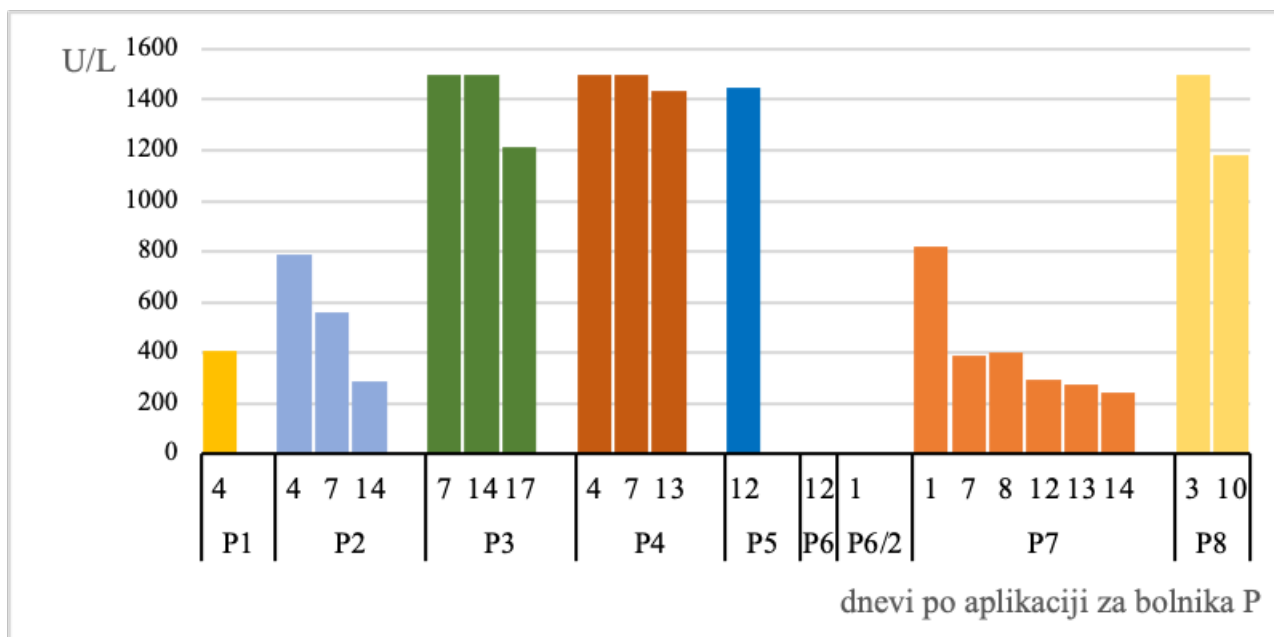
Tabela 2: Ponovljivost, točnost in celokupna analitska napaka indooksinske spektrofotometrične metode za nizko (5–100 U/L) in visoko kalibracijsko območje (100–1000 U/L); število meritev je 24

Table 2: Repeatability, accuracy and total analytical error of the indoxin spectrophotometric method for low (5–100 U/L) and high calibration range (100–1000 U/L); the number of measurements is 24

	Nizko kalibr. območje			Visoko kalibr. območje			Povprečna vrednost
	10	50	100	150	500	1000	
Aktivnost asparaginaze Ciljna vrednost [u/l]							
Ponovljivost med serijami kv [%]	14,4	8,1	5,2	7,8	8,9	13,5	9,6
Ponovljivost znotraj serije kv [%]	7,8	7,0	4,8	3,2	5,6	7,3	6,0
Točnost med serijami relativna napaka [%]	25,3	4,5	2,5	5,1	3,6	8,8	8,3
Celokupna analitska napaka [%]							24,2

V času ocenjevanja metode smo pri osmih bolnikih z ALL ali T-limfoblastnim limfomom, ki so se zdravili s PEG asparaginazo, v različnih časovnih intervalih po odmerkih določili encimsko aktivnost v serumu. Od posameznih bolnikov (P1– P8, slika 1) smo pridobili različno število vzorcev krvi, ki so jim bili odvzeti v različnih časovnih intervalih po aplikaciji PEG asparaginaze (od enega do dva-
indvajset dni po aplikaciji).

Encimsko aktivnost smo najprej določali v visokem kalibracijskem območju (100–1000 U/L), saj smo predvidevali, da bo v večini vzorcev aktivnost asparaginaze nad 100 U/L. V primerih, ko je bila določena manjša aktivnost, smo analizo ponovili v nizkem kalibracijskem območju (5–100 U/L). Skupno smo analizirali 33 vzorcev v več serijah, od tega smo jih 7 analizirali v obeh območjih merjenja. Visoko stopnjo aktivnosti (> 200 U/L) v 1 do 14 dneh po aplikaciji zdravila smo izmerili pri sedmih bolnikih. Tiho inaktivacijo smo odkrili pri enem izmed bolnikov (21); (Slika 1).



Slika 1: Aktivnosti asparaginaze (U/L) pri bolnikih P1–P8 v vzorcih seruma, odvzetih v različnih dneh po aplikaciji

Figure 1: Asparaginase activities (U/L) in patients P1–P8 in serum samples taken on different days after the administration

RAZPRAVA

V klinično uporabo smo vpeljali metodo, ki je že v uporabi v drugih kliničnih laboratorijih. Kot izhodišče pri uvedbi naše metode je služil protokol Univerzitetnega medicinskega centra Erasmus MC v Rotterdamu (19).

Pri optimizaciji metode smo ugotovili, da smo s spremembo pogojev shranjevanja substrata stabilizirali njegovo obstojnost v obdobju dveh mesecev. Substrat je primeren za shranjevanje na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z znižanjem temperature preprečimo tudi njegovo razgradnjo in zmanjšamo spremembo pH.

Ugotovili smo, da so bili rezultati kontrol bližje ciljni vrednosti, mera odstopanja pa nižja za 10 %, če smo absorbanco izmerili šele 20 minut po inkubaciji. Tudi iz literature je znano, da se barva nastalega produkta indooksina v celoti razvije v 15 minutah po inkubaciji pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ostane stabilna še 30 minut (20). Zato smo se odločili, da bomo podaljšali čas, ob katerem merimo nastali produkt, za dodatnih 10 minut.

KV med serijami so za našo metodo znašali med 5,2 in 14,4 %. Pričakovali bi, da bodo KV manjši pri večjih aktivnostih, a tega nismo dokazali. KV se je zmanjševal od najmanjše do največje aktivnosti v nizkem kalibracijskem območju, v visokem kalibracijskem območju pa je naraščal. Podoben trend z nizko vrednostjo KV je določila tudi Lanvers s sodelavci, a le v nizkem kalibracijskem območju (18). Kljub temu je bila naša povprečna ponovljivost (KV = 9,6 %) dovolj dobra, saj so bile vse vrednosti KV manjše od 20 %, kar ustreza smernicam Evropske agencije za zdravila (EMA) (22). KV znotraj serije so znašali med 3,2 in 7,8 %. V literaturi so opisani manjši KV (med 2 in 5,7 %), a so izračuni opravljene le na podlagi osmih meritev (18). Relativna napaka (RE) med serijami je znašala med 2,5 in 25,3 %. Podobno opisuje tudi Lanvers s sodelavci, ki je prav tako določila največji odklon od ciljne vrednosti pri aktivnosti 10 U/L, v povprečju pa so določili manjšo RE (5,1%). Z izjemo kontrolnega vzorca najnižje koncentracije RE ni preseгла priporočene meje točnosti pri 20 %. Pri tej koncentraciji je vrednost relativne napake manj pomembna, saj koncentracija ni v ob- »

močju kliničnih odločitev. Izračunana celokupna analitska napaka (24,2 %) je ustrezala smernicam, ki jih je postavila EMA za ocenitev točnosti in natančnosti analize metode in postavlja mejo pri 30 % (22).

Pri analizi vzorcev bolnikov je aktivnost asparaginaze padala s časom, kar je seveda bilo pričakovano. Absolutnih vrednosti aktivnosti med seboj nismo mogli neposredno primerjati, saj so bolniki dobivali asparaginazo v različnih odmerkih na podlagi različnih protokolov zdravljenja.

Pri bolniku P6 z relapsom ALL je bil vzorec odvzet v fazi indukcije po prvi in drugi aplikaciji, obakrat je bila aktivnost encima nizka, kar je dokaz tihe inaktivacije encima. Bolnik ni imel znakov preobčutljivostne reakcije (21). V nizkem kalibracijskem območju smo določili aktivnosti 5,9 U/L v prvem vzorcu in 5,5 U/L v drugem vzorcu.

V literaturi so opisana priporočila in pričakovane vrednosti asparaginazne aktivnosti po dnevih glede na farmakokinetične podatke o intravenski aplikaciji PEG asparaginaze. Med četrtem in sedmim dnevom po aplikaciji encima je pričakovana aktivnost asparaginaze med 600 in 1200 U/L, večina bolnikov pa ob normalnem poteku zdravlje-

nja ne bi smela imeti aktivnosti pod 200 U/L še približno 21 dni po aplikaciji zdravila (10). Takšno aktivnost smo izmerili pri petih bolnikih (P2, P3, P4, P5, P8), pri bolnikih P1 in P6 pa smo že pred četrtem dnevom po aplikaciji določili asparaginazno aktivnost pod 600 U/L. Bolnik P7 je imel še pred pretekom 21 dni po aplikaciji encimsko aktivnost pod 200 U/L. Na podlagi rezultatov ne moremo sklepati, kaj pomeni nekoliko nižja aktivnost encima za uspešnost zdravljenja, saj je podatkov o tem premalo (21).

Zaenkrat še ni jasno, kakšna je optimalna encimska aktivnost na določen dan po aplikaciji zdravila, ki bi omogočala zadostno aktivnost encima pred naslednjim odmerkom (pred štirinajstim dnevom po aplikaciji PEG asparaginaze), saj se je večina raziskav osredotočila na določitev asparaginazne aktivnosti na štirinajsti dan po aplikaciji zdravila (11, 13). Prav tako še ni povsem raziskano, kakšen odmerek asparaginaze je treba aplicirati bolnikom za maksimalno učinkovitost zdravila in hkrati čim manjšo možnost za pojav stranskih učinkov. Za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja bi bila potrebna postavitev smernic za prilagajanje odmerjanja asparaginaze za posameznega bolnika na podlagi meritev asparaginazne aktivnosti.

ZAKLJUČEK

Spremljanje encimske aktivnosti asparaginaze v krvi pri bolnikih z ALL, ki se zdravijo z asparaginazo, je pomembno, ker med zdravljenjem omogoča prepoznavanje bolnikov s tiho inaktivacijo in s tem prilagoditev zdravljenja. Optimizirali smo indooksinsko metodo za spremljanje aktivnosti PEG asparaginaze in v postopku ocene natančnosti in točnosti ugotovili, da je analitsko ustrezna in tako primerna za klinično uporabo. Optimizirana meto-

da omogoča identifikacijo bolnikov, pri katerih je potrebna sprememba vrste asparaginaze zaradi tihe inaktivacije encima. Za klinično uporabo je treba natančneje določiti protokol za odvzem vzorcev pred naslednjim odmerkom. Individualno prilagajanje odmerkov asparaginaze na podlagi meritev asparaginazne aktivnosti zaenkrat še ni mogoče.

LITERATURA

1. Kitanovski L, Rajić V, Jazbec J. Novosti v otroški onkologiji. v: Novaković S (ur.), et al. Razvojni trendi v onkologiji - onkologija čez desetletje : izbrana poglavja in državni program obvladovanja raka 2017-2021: zbornik. Ljubljana: Kancerološko združenje slovenskega zdravniškega društva: Onkološki inštitut. 2016;95-111.
2. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*. 2001; 97:1211-1218.
3. Müller HJ, Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1998; 28:97-113.
4. Kiriya Y, Kubota M, Takimoto T, Kitoh T, Tanizawa A, Akiyama Y, et al. Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. *Leukemia*. 1989;3:294-297.
5. Rizzari C, Conter V, Starý J, Colombini A, Moericke A, Schrappe M. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(Suppl 1): S1-S9.
6. Boos J, Werber G, Ahlke E, Schulze-Westhoff P, Nowak-Göttl U, Würthwein G, et al. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer*. 1996;32(9):1544-1550.
7. Asselin B, Rizzari C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leuk Lymphoma*. 2015; 56(8):2273-2280.
8. Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC) za Spectrila 10.000 e., prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje.
9. Burke MJ. How to manage asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Future Oncol*. 2014;10(16):2615-2627.
10. Salzer W, Bostrom B, Messinger Y, Perissinotti AJ, Marini B. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(8): 1797-1806.
11. Tong WH, Pieters R, Kaspers GJL, W M te Loo DM, Bierings MB, van den Bos C et al. A prospective study on drug monitoring of PEGasparaginase and Erwinia asparaginase and asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(13):2026-2033.
12. Kurtzberg J, Asselin B, Bernstein M, Buchanan GR, Pollock BH, Camitta BM. Polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase versus native L-asparaginase in combination with standard agents for children with acute lymphoblastic leukemia in second bone marrow relapse: a Children's Oncology Group Study (Pog 8866). *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011;33(8): 610-616.
13. van der Sluis IM, Vrooman LM, Pieters R, Baruchel A, Escherich G, Goulden N, et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica*. 2016;101(3):279-285.
14. Asselin BL, Lorenson MY, Whitin JC, Coppola DJ, Kende AS, Blakley RL, et al. Measurement of serum L-asparagine in the presence of L-asparaginase requires the presence of an L-asparaginase inhibitor. *Cancer Res*. 1991;51(24):6568-6573.
15. Lanvers-Kaminsky C, Westhoff PS, D'Incalci M, Zucchetti M, Boos J. Immediate cooling does not prevent the ex vivo hydrolysis of Lasparagine by asparaginase. *Ther Drug Monit*. 2014;36(4):549-552.
16. Kloos RQ, Pieters R, Escherich G, van der Sluis IM. Allergic-like reactions to asparaginase: Atypical allergies without asparaginase inactivation. *Pediatr Blood Cancer*. 2016; 63(11):1928-34.
17. Magri A, Soler MF, Lopes AM, Cilli EM, Barber PS, Pessoa A, et al. A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods-colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410:6985-6990.
18. Lanvers C, Vieira Pinheiro JP, Hempel G, Wuerthwein G, Boos J. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum. *Anal Biochem*. 2002; 309:117-126.
19. Protokol - interni vir:
20. Asparaginase assay manual; assay protocol for the measurement of asparaginase in children with acute lymphoblastic leukaemia. Erasmus MC University Medical Center Rotterdam, Paediatric Oncology Laboratory Rotterdam.
21. Frear DS, Burrell RC. Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants. *Anal Chem* 1955;27:1664-1665.
22. Kozjek E. Spremljanje stopnje aktivnosti asparaginaze pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo. Magistrsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. 2019.
23. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. European Medicines Agency [Internet]. Dostopno: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf