

<b>Zeitschrift:</b>	Bollettino della Società ticinese di scienze naturali
<b>Herausgeber:</b>	Società ticinese di scienze naturali
<b>Band:</b>	84 (1996)
<b>Artikel:</b>	Tossicità ematologica e perturbazioni del ciclo cellulare indotte da nuovi farmaci antitumorali alchilanti il DNA a livello del solco minore
<b>Autor:</b>	Ghielmini, Michele / Soldati, Gianni / Bosshard, Giovanna
<b>DOI:</b>	<a href="https://doi.org/10.5169/seals-1003249">https://doi.org/10.5169/seals-1003249</a>

#### Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

#### Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

#### Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 22.12.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

## Tossicità ematologica e perturbazioni del ciclo cellulare indotte da nuovi farmaci antitumorali alchilanti il DNA a livello del solco minore

Michele Ghielmini, Gianni Soldati, Giovanna Bosshard, Giuditta Filippini, Cristiana Sessa, Hans Marie Eppenberger e Franco Cavalli

Servizio Oncologico Cantonale, Ospedale S. Giovanni, CH-6500 Bellinzona

La ricerca che si svolge al Laboratorio del Servizio Oncologico Cantonale (Ospedale La Carità, Locarno) si sviluppa su quattro temi principali: l'immunofenotipizzazione delle cellule neoplastiche nelle malattie tumorali ematologiche, la determinazione con metodi di biologia molecolare di anomalie genetiche nelle malattie linfoproliferative, la quantificazione della funzione ematopoietica per i pazienti che ricevono un trapianto di midollo e infine la valutazione in vitro della mielotossicità dei farmaci citostatici. Quest'ultima linea di ricerca ha preso avvio nella primavera del 1994 grazie ad un contributo del Fondo Nazionale Svizzero per la Ricerca Scientifica. Il progetto, che si svolge su tre anni, si propone di studiare gli effetti e i meccanismi di azione di una nuova serie di farmaci citostatici: gli alchilanti che agiscono fissandosi al solco minore del DNA (DNA-minor-grove binders). Questo lavoro si costituisce di tre parti principali: la prima studia l'effetto dei farmaci sui diversi progenitori ematopoietici midollari; la seconda ricerca il ruolo della proteina P53 nel loro meccanismo di azione ed infine la terza parte studia l'effetto di questi farmaci sulla cinetica cellulare nel midollo del topo. Quest'ultima parte viene eseguita all'Istituto Mario Negri a Milano e non verrà quindi trattata in questa sede. Illustriamo qui di seguito i risultati delle prime due linee di ricerca in corso presso il Laboratorio del Servizio Oncologico.

I «DNA-minor-grove binders» Tallimustina e Carzelesina hanno mostrato durante la fase iniziale del loro uso clinico uno spettro di tossicità molto diverso; il primo produce una leucopenia selettiva, profonda ma di corta durata, il secondo produce invece una pancitopenia di apparizione più tardiva ma di lunga durata. Abbiamo voluto stabilire un modello sul quale potesse essere riprodotta in vitro questa situazione, modello da utilizzare in seguito per predire la mielotossicità di altri nuovi farmaci prima del loro impiego clinico. Abbiamo iniziato usando come modello il test clonogenico: questo consiste nell'incubazione di cellule mononucleate di midollo osseo in presenza di fattori di crescita specifici che portano alla formazione, dopo una e due settimane, di colonie cellulari. Le colonie sono riconoscibili al microscopio come derivanti dalla linea mieloide o eritroide. Incubando le cellule con farmaci citostatici a diverse concentrazioni si riesce ad ottenere una curva dose-risposta che informa sulla dose potenzialmente mielotossica del farmaco. Le colonie rappresentano cellule ematopoietiche morfologicamente ancora non distinguibili l'una dalle altre, ma geneticamente già programmate per svilupparsi in eritrociti, monociti o granulociti. Nel paziente queste cellule producono eritrociti e globuli bianchi nel giro di 7 a 15 giorni. La determinazione della loro inibizione in vitro predice quindi la tossicità ematologica nel paziente durante la seconda settimana dopo la chemioterapia.

Vista la difficoltà a reperire midollo normale per il laboratorio, abbiamo usato sangue proveniente dalla placenta, contenente una quantità molto importante di progenitori ematopoietici. La prima parte del nostro lavoro è consistita nel testare uno di questi farmaci (Tallimustina) sia sul midollo osseo che sulle cellule ottenute dalla placenta. Abbiamo così potuto dimostrare che la concentrazione che inibisce il 70 % delle colonie (ID70) di midollo è praticamente equivalente alla ID70 per le cellule di origine placentare (Fig. 1).

Tabella 1: Tossicità su cellule ematopoietiche e su cellule tumorali di alcuni farmaci citostatici

	L-PAM	Tallimustine	FCE 25450	FCE 28102	FCE 28164	Carzelesin
<b>DOSE MIELOTOSSICA</b>	1	0.12	0.44	5.42	0.30	0.003
<b>DOSE CITOTOSSICA</b>	1	0.04	0.05	1.22	0.08	0.00006
<b>Indice terapeutico in vitro</b>	1	3.0	8.8	4.4	3.8	50

La dose mielotossica rappresenta le concentrazioni di farmaco che inibiscono la crescita del 70% delle colonie mielopietiche (ID70 per le GM-CFC). La dose citotossica è la concentrazione che uccide il 70% delle cellule tumorali (media di 5 linee cellulari tumorali). L'indice terapeutico è il rapporto tra i due precedenti. Tutti i risultati sono normalizzati al melphalan (L-PAM), un alchilante classico usato come riferimento. I 3 farmaci contrassegnati con FCE sono analoghi della Tallimustina non ancora usati in pratica clinica.

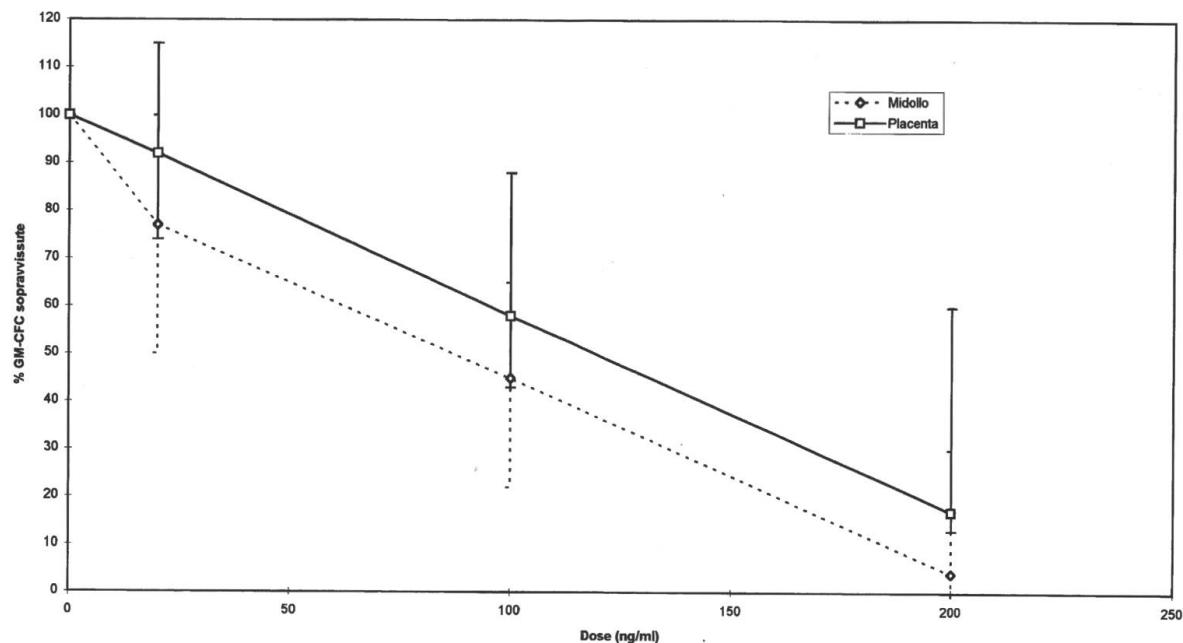
Lavorando in seguito solo su sangue di placenta abbiamo valutato la tossicità (ID70) di sei diversi citostatici. I risultati hanno dimostrato che la Carzelesina è estremamente più potente della Tallimustina e che la potenza dei derivati della Tallimustina differisce in maniera significativa da un analogo all'altro (tab. 1). Si è potuto anche notare che la tossicità di ogni farmaco si esprime diversamente sui vari progenitori: tutti i farmaci mostrano un'attività maggiore sulle cellule più differenziate (CFC7) rispetto ai progenitori più primitivi (CFC14) e alcuni citostatici sono più tossici sulla serie eritroide mentre altri più sulla linea mieloide.

Gli stessi farmaci sono stati usati alle stesse concentrazioni su 5 linee cellulari tumorali rappresentanti uno spettro di tumori incontrati nella pratica clinica. La media della loro dose efficace è riportata nella tabella 1 così come l'indice terapeutico, definito come il rapporto tra la tossicità sulle linee tumorali e la tossicità sul tessuto ematopoietico. Questo dato potrebbe essere predittivo dell'indice terapeutico nei pazienti. Un indice elevato (come per esempio per la Carzelesina) dimostra che, almeno in vitro, il farmaco è più potente sul tumore che sul tessuto normale.

Stiamo ora sviluppando un nuovo modello di mielotossicità in vitro che possa informare anche sulle cellule più primitive. Questo si basa sulla coltura a lungo termine (8 settimane) di cellule staminali ematopoietiche di provenienza placentare su uno strato di stroma midollare murino. In questo modello abbiamo per il momento studiato l'effetto mielotossico del Melphalan (L-PAM). Nei primi esperimenti abbiamo dimostrato che la dose di Melphalan tossica per il 70 % dei progenitori più avanzati (CFC), uccide solo il 50 % dei progenitori intermedi (LTC week 5) e il 20% dei progenitori più precoci (LTC week 7). Stiamo ora ripetendo questi esperimenti con Carzelesina e Tallimustina per verificare se lo spettro di tossicità ottenuto nel nostro modello corrisponde a quanto è stato visto nei pazienti. In caso affermativo avremmo sviluppato un modello di mielotossicità utile per lo screening preclinico di nuovi farmaci.

Per capire il ruolo della p53, una proteina prodotta da un oncogene soppressore, nella successione di eventi che segue l'esposizione di cellule emopoietiche a vari agenti antitumorali, abbiamo inizialmente valutato in cellule derivate dalla linea emopoietica l'attivazione di questa proteina. Si voleva in seguito quantificare questa attivazione, determinarne la kinetica e il ruolo nella morte cellulare programmata (apoptosi). Abbiamo deciso di lavorare con una linea cellulare di tipo pre-B, che sta cioè a monte, da un punto di vista ontogenetico, dei linfociti B più maturi. La linea cellulare NALM-6, derivante da una leucemia acuta, risponde a questo criterio e ci interessa particolarmente dal momento che nel nostro laboratorio sono in corso altri lavori più specificamente centrati sulle malattie linfoproliferative. La linea NALM-6 possiede una p53 di tipo selvatico, cioè non mutata, come abbiamo potuto appurare tramite un test che verifica la funzionalità

Figura 1: Tossicità della Tallimustina sui precursori mieloidi di midollo o placenta



Mediana e range di 9 esperimenti su midollo e 10 esperimenti su cellule di placenta. È evidente come le due curve siano praticamente sovrapponibili.

del gene della p53. Questo sistema è stato utilizzato per lo studio sperimentale di agenti antitumorali come L-PAM, etoposide, la tallimustina e un suo analogo. L'effetto sull'espressione della p53 è stato analizzato in citometria di flusso, valutando l'espressione e il numero di molecole di p53 presenti nel citoplasma di cellule trattate o no con un farmaco antitumorale. Per i farmaci L-PAM, FCE296 e FCE 624 (tallimustina e analogo) sono state usate le dosi corrispondenti alla ID70 per le cellule emopoietiche (vedi sopra). Per l'etoposide abbiamo utilizzato una concentra-

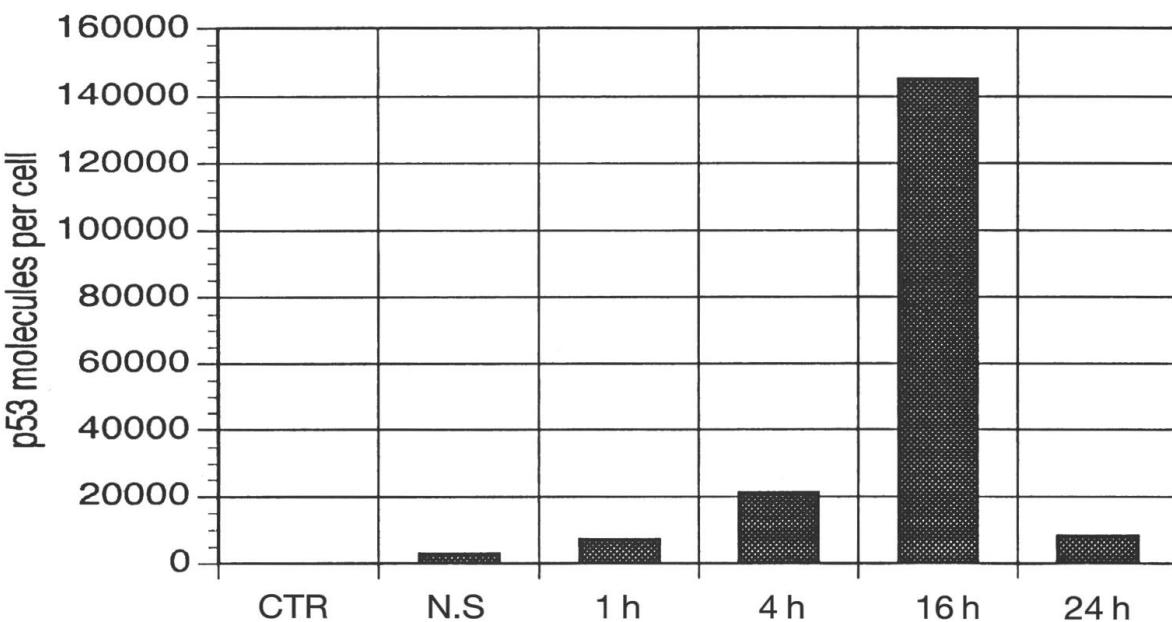


Figura 2: Induzione della p53 in una linea cellulare pre-B dopo incubazione con 10  $\mu$ M etoposide in funzione del tempo (h)

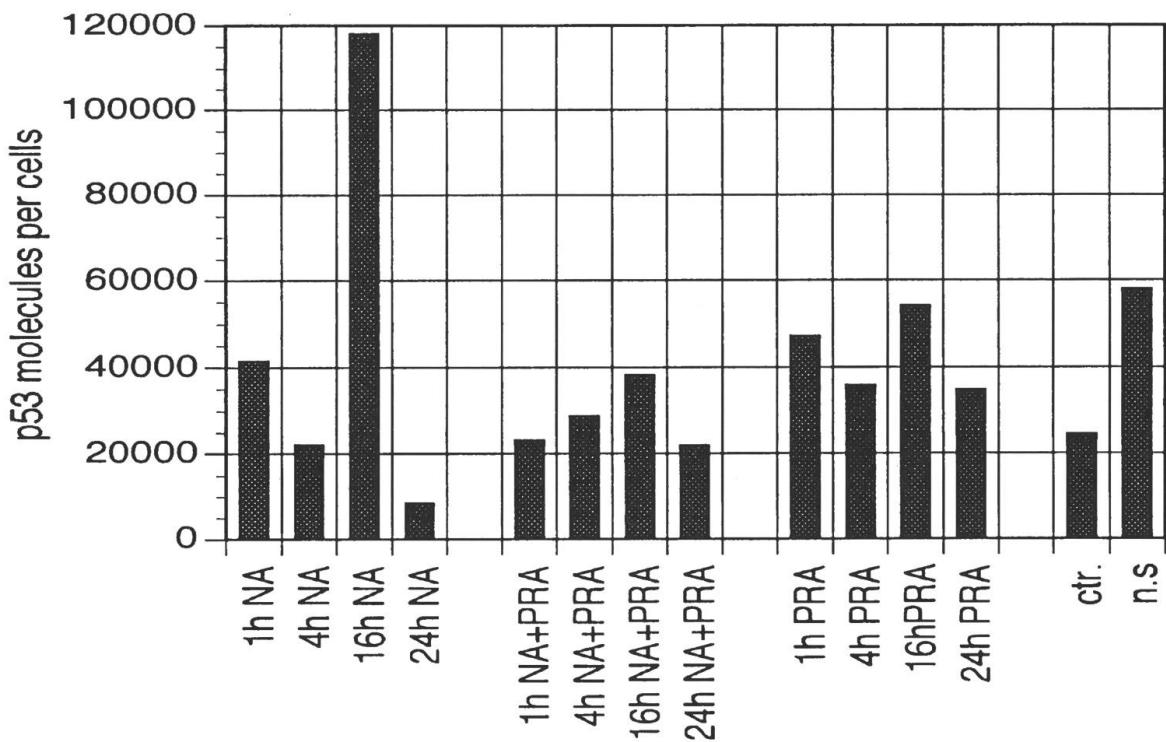


Figura 3: Induzione della p53 in una linea cellulare pre-B (NALM-6) dopo esposizione con  $10^{-4}$ M Noradrenalina (NA),  $10^{-4}$ M NA e  $-12$ M prazosina e solo  $-12$ M prazosina. L'espressione della p53 è stata determinata ai tempi specificati (0, 1, 4, 16 e 24 ore).

zione di  $10 \mu\text{M}$ , corrispondente alla dose riportata in letteratura in esperimenti equivalenti. Tutte le sostanze testate hanno prodotto un aumento significativo dell'espressione della p53 dopo 16 ore di incubazione (Fig. 2).

Abbiamo in seguito voluto verificare in quali altre condizioni la p53 di questa linea cellulare venisse attivata. Esprimendo queste cellule dei recettori alfa-1 in superficie, specifici per la noradrenalina (NA), l'effetto della NA sull'attivazione della p53 nelle NALM-6 è stato ricercato rivelando una sovraespressione della p53 dopo 16 ore di stimolazione. Questo effetto è inibito dalla Prazosina, un antagonista della NA, dimostrando che l'attivazione è veramente da attribuire a un effetto diretto della catecolamina. (Fig. 3)

I prossimi passi nella comprensione del meccanismo d'azione dei "DNA-minor-groove binders" dovranno ricercare se esistono fenomeni specifici a questi farmaci che, via l'attivazione della p53, portano all'apoptosi delle cellule emopoietiche.