

Wpływ karboplatyny na aktywność peroksydazy glutationu (GSH-Px), reduktazy glutationu (GR) oraz stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w mediach hodowlanych ludzkich komórek czerniaka złośliwego linii Me45 *in vitro*

In vitro study of the influence of carboplatin on glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR) activities and malondialdehyde (MDA) concentration in human malignant melanoma Me45 media cells

Rafał J. Bułdak¹, Renata Polaniak², Michał Kukla¹, Robert Kubina³,
Magdalena Skonieczna⁴, Magdalena Bułdak⁵, Dominika Stygar¹, Tomasz Sawczyn¹,
Marcin Gowarzewski¹, Krystyna Żwirska-Korczala¹

STRESZCZENIE

WSTĘP

Wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach nowotworowych zwykle następuje podczas ekspozycji na leki cytostaticzne, takie jak: karboplatyna, etopozyd, doksorubicyna oraz holoksan. Prawidłowe i nowotworowe komórki mają różne systemy zmiataczy wolnych rodników, w tym: enzymy antyoksydacyjne, które chronią je przed generowanym przez cytostatyki stresem oksydacyjnym we wnętrzu komórek.

MATERIAŁ I METODY

Hodowla ludzkich komórek czerniaka złośliwego linii Me45 była prowadzona w standardowych warunkach. Kolonie komórek były traktowane karboplatyną w dwóch różnych stężeniach (C₁) 10 µg/ml medium oraz (C₂) 100 µg/ml medium. Grupę kontrolną stanowiły komórki niezawierające w medium hodowlanym leku cytostaticznego. Medium zbierano po 24 godzinach od podania preparatu, wirowano i w supernatantach oznaczano aktywności badanych enzymów antyoksydacyjnych: peroksydazy glutationu (GSH-Px) i reduktazy glutationu (GR), oraz stężenie dialdehydu malonowego (MDA).

¹Katedra i Zakład Fizjologii oraz ²Katedra i Zakład Biochemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
³Zakład Patologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
⁴Katedra Automatyki Politechniki Śląskiej w Gliwicach
⁵Pracownia Bakteriologii SPSK nr 1 w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Rafał J. Bułdak
Katedra i Zakład Fizjologii Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
ul. H. Jordana 19
41-808 Zabrze-Rokitnica
tel. 32 272 23 62, fax 32 272 23 62
e-mail: rbuldak@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2011, 65, 3, 7-15
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ISSN 0208-5607

WYNIKI

Po 24 godzinach w grupie komórek traktowanych karboplatiną (C1 oraz C2) aktywność peroksydazy glutationu (GSH-Px) w medium hodowlanym znacząco wzrosła zależnie od stężenia w porównaniu z grupą kontrolną (K); ($12512 \pm 12,1$ IU/l, $99,1 \pm 13,3$ IU/l vs $91,6 \pm 12,1$ IU/l, odpowiednio, $p < 0,001$; $p < 0,05$). Aktywność reduktazy glutationu (GR) była obniżona w grupie komórek traktowanych karboplatiną (C₁) w odniesieniu do grupy kontrolnej (K); ($8,49 \pm 0,31$ IU/l vs $9,49 \pm 0,49$ IU/l; $p < 0,001$). Poziom MDA w medium komórkowym był niemal 2-krotnie niższy w grupie komórek traktowanych karboplatiną w stężeniu 10 µg/ml niż w komórkach grupy kontrolnej (K); $0,71 \pm 0,7$ µmol/ml vs $1,49 \pm 0,11$ µmol/ml, $p < 0,05$).

WNIOSKI

Karboplatyna w stężeniu 10 µg/ml zwiększa aktywność enzymu GSH-Px i zapobiega procesowi peroksydacji lipidów w mediach komórek czerniaka złośliwego linii Me45 *in vitro*.

SŁOWA KLUCZOWE

karboplatyna, enzymy antyoksydacyjne, dialdehyd malonowy, peroksydacja lipidów

ABSTRACT**INTRODUCTION**

Reactive oxygen species (ROS) production in cancer cells usually occurs following anticancer drug exposure such as: etoposide, carboplatin compounds, doxorubicin and holoxan treatment. Normal and malignant cells contain a variety of free radical scavenging systems such as antioxidant enzymes that protect them from the effects of drugs that generate oxidative stress inside the cells.

MATERIALS AND METHODS

The culture of human malignant *melanoma* Me45 cell line was performed in standard conditions. The colonies were treated with two concentrations of carboplatin: (C₁) 10 µg/ml and (C₂) 100 µg/ml of the culture medium. The control group were colonies without a cytostatic drug in the culture medium. The medium was collected at 24 hours from addition of the carboplatin preparation and used for determination of activity of the following antioxidative enzymes: glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), as well as the concentration of the malondialdehyde (MDA).

RESULTS

After 24 hours in the carboplatin treated group (C₁-C₂) glutathione peroxidase (GSH-Px) media activity was significantly increased in concentration dependent manner in comparison to the control group (K); (125.2 ± 12.1 IU/l, 99.1 ± 13.3 IU/l vs 91.6 ± 12.1 IU/l, respectively, $p < 0.001$; $p < 0.05$). Glutathione reductase (GR) activity was decreased in carboplatin treated groups (C₁) with respect to control group (K); (8.49 ± 0.31 IU/l vs 9.49 ± 0.49 IU/l; $p < 0.05$). MDA media cells level was almost a 2-fold lower in carboplatin (C1) treated group compared with untreated control group (K); (0.71 ± 0.7 µmol/ml, 1.79 ± 0.15 µmol/ml vs 1.49 ± 0.11 µmol/ml, $p < 0.05$).

CONCLUSION

Carboplatin at the concentration of 10 µg/ml leads to an increase antioxidative enzyme activity (GSH-Px) and prevent to lipid peroxidation in malignant *melanoma* Me45 media cells.

KEY WORDS

carboplatin, antioxidant enzyme activities, malondialdehyde, lipid peroxidation

WSTĘP

Leki cytostatyczne, takie jak: karboplatyna, 5-fluorouracyl, doksorubicyna, etopozyd oraz holoksan, indukują powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach nowotworowych poddanych chemioterapii [1]. Karboplatyna jest związkiem koordynacyjnym platyny o właściwościach przeciwnowotworowych, alkilującym DNA, hamującym podziały komórkowe poprzez wytwarzanie wiązań poprzecznych w jądrowym DNA komórek. Lek ten jest powszechnie stosowany w terapii pierwszego rzutu w raku jajnika, macicy oraz płaskonabłonkowego raka płuc lub w przypadku chemioterapii przerzutów odległych czerniaka złośliwego [2].

Źródłem RFT w komórkach są mitochondria, gdzie RFT powstają podczas procesu oddychania komórkowego, zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych *in vitro* oraz *in vivo*. RFT ulegają detoksyfikacji za pomocą systemu enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej SOD, peroksydazy glutationowej (GSH-Px) czy katalazy (CAT). Reaktywne formy tlenu są wysoce toksyczne dla komórek; przyczyniają się do utleniania zasad azotowych w DNA jądrowym i mitochondrialnym, mogą także oddziaływać chemicznie i inaktywować białka czy fosfolipidy komórkowe [3]. Zaburzenie równowagi między nasileniem procesów oksydacyjnych wiodących do powstawania RFT a przeciwdziałającym ich aktywności systemem antyoksydacyjnym komórek, z przewagą procesów utleniania, prowadzi do stresu oksydacyjnego. Obecność leków cytostatycznych w hodowli *in vitro* komórek nowotworowych powoduje wzrost stężenia RFT w komórkach. Zależnie od użytych linii komórkowych, warunków doświadczenia oraz zastosowanych stężeń leków cytostatycznych, komórki nowotworowe wykazują różny potencjał adaptacyjny względem RFT w hodowli *in vitro* [4].

Wskaźnikiem stresu oksydacyjnego jest wzrost lub obniżenie aktywności enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej izoenzymu dysmutazy ponadtlenkowej, MnSOD, CuZn/SOD, katalazy (CAT) oraz peroksydazy glutationu (GSH-Px) [5,6,7,8,9].

Peroksydazy glutationu stanowią pierwszą i drugą linię obrony przed reaktywnymi formami tlenu. Enzymy te wykazują zdolność redukcji nadtlenków nieorganicznych (H_2O_2) oraz organicznych (ROOH) z wytworzeniem kwasu selenowego jako produktu pośredniego. Peroksydazy glutationowe, selenopeptydazy, posiadają w centrum aktywnym selen pod postacią selenocysteiny, występują w kilku izoformach w różnych kompartmentach i rodzajach komórek.

Katalizują reakcję między nadtlenkiem wodoru (H_2O_2) a glutationem. W wyniku redukcji H_2O_2 powstaje utleniona forma glutationu – disulfid glutationu (GSSG), wykazujący działanie toksyczne względem białek komórkowych. W odtworzeniu zredukowanego glutationu pomaga enzym reduktaza glutationu (GR), przy współudziale $NADPH+H^+$. Oba enzymy GSH-Px oraz GR wykazują działanie kompensacyjne i stanowią układ enzymatyczny usuwający nadtlenek wodoru z komórek [10,11].

Peroksydacja lipidów jest procesem utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w lipidach komórkowych. Podlegają jej reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów błon komórkowych. W wolnorodnikowym procesie peroksydacji kwasów tłuszczowych powstaje dialdehyd malonowy MDA (*malondialdehyde*), związek bardzo reaktywny względem białek, mogący dezaktywować enzymy komórkowe. Wykazano, że reaguje także z zasadami azotowymi kwasów nukleinowych [12]. Zwiększenie stężenia MDA w komórkach lub mediach hodowlanych komórek *in vitro* doprowadza do uszkodzeń w obrębie lipidów, białek oraz kwasów nukleinowych komórek, obniżając żywotność komórek w hodowli [10].

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych MnSOD, CuZnSOD, CAT, GSH-Px w komórkach nowotworowych jest zmienna [7,8,9,13,14]. Komórki nowotworowe wskutek zwiększonej aktywności enzymów antyoksydacyjnych mogą adaptować się do stresu oksydacyjnego *in vitro* oraz *in vivo* [3]. Wzrost aktywności

izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationu oraz katalazy w komórkach nowotworowych może indukować proces chemooporności komórek nowotworowych, warunkując powstawanie populacji komórek opornych na działanie użytego leku cytostatycznego [7,8,9,15].

Celem pracy jest określenie wpływu karboplatyny w dwóch różnych stężeniach na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (GSH-Px, GR) oraz stężenie MDA (marker procesu peroksydacji lipidów) w mediach hodowlanych komórek ludzkiego czerniaka złośliwego linii Me45 *in vitro*.

MATERIAŁ I METODY

HODOWLA KOMÓRKOWA

Komórki po odbankowaniu z ciekłego azotu zostały namnożone w butelkach hodowlanych o powierzchni wzrostowej 25 cm² (T25), a następnie wybarwione 0,25% roztworem błękitu trypanu i policzone metodą bezpośrednią w komorze Bürkera (1 mm²) w celu określenia liczby komórek żywych i martwych. Procent martwych komórek wynosił mniej niż 5. Hodowlę komórek czerniaka złośliwego Me45 prowadzono w standardowych warunkach w 37°C oraz 5% nasyceniu CO₂. Komórki hodowane były w medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ze zwiększoną zawartością glukozy 4,5 g/l (z dodatkiem 15% płodowej surowicy bydlęcej (FBS GOLD) pochodzącej z firmy (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). Do medium hodowlanego z surowicą dodano antybiotyki: penicylinę (100 U/mL), streptomycynę (100 µg/ml) oraz amfoterycynę B (200 000 jednostek/l). Komórki czerniaka złośliwego linii Me45 umieszczono w butelkach hodowlanych (T25) firmy Sarsted w liczbie 1 x 10⁶/25 cm². Komórki ludzkiego czerniaka złośliwego były izolowane z ognisk przerzutowych (węzły chłonne) od 35-letniego pacjenta gliwickiego Centrum Onkologii przez p. doc. Marię Widel z Zakładu Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej Centrum Onkologii w Gliwicach.

Komórki linii Me45 są komórkami adherentnymi i w czasie wzrostu przylegają do dna butelki. Pasażu komórek w adherentach dokonywano przed uzyskaniem całkowitej monowarstwy na dnie butelki (80% konfluencji), w czasie wykładniczej fazy wzrostu. Na począt-

ku sterylnymi pipetami usuwano pożywkę z naczynia hodowlanego. Następnie hodowlę zalewano 1 ml roztworu trypsyny w celu odklejenia komórek od dna butelki hodowlanej i inkubowano w cieplarni ok. 3 min. Po inkubacji zalewano próbki 3 ml medium z surowicą w celu inaktywacji trypsyny. Następnie zawiesinę komórek w medium rozdzielano w zależności od potrzeb i przenoszono do nowych butelek hodowlanych, dodając odpowiednią ilość świeżego medium.

PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA

Komórki czerniaka złośliwego linii Me45 uzyskujące 90% konfluencji traktowano karboplatyną (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) w stężeniach 10 µg/ml oraz 100 µg/ml medium przez 24 godziny (wykonano 6 powtórzeń). Grupę kontrolną stanowiły komórki niezawierające w medium hodowlanym karboplatyny (wykonano 6 powtórzeń). Medium hodowlane zbierano po 24 godzinach po podaniu leku cytostatycznego, a następnie wirowano 327 g/5 minut, po czym pobierano supernatant i przystępowano do oznaczenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenia MDA.

PODZIAŁ NA GRUPY BADAWCZE:

- K – kontrola, komórki czerniaka złośliwego linii Me45 nietraktowane karboplatyną,
- C₁ – komórki czerniaka złośliwego linii Me45 stymulowane karboplatyną w stężeniu 10 µg/ml,
- C₂ – komórki czerniaka złośliwego linii Me45 stymulowane karboplatyną w stężeniu 100 µg/ml.

PO WIROWANIU MEDIUM HODOWLANEGO W SUPERNATANTACH OZNACZONO:

- 1) aktywność peroksydazy glutationu (GSH-Px),
- 2) aktywność reduktazy glutationu (GR),
- 3) stężenie dialdehydu malonowego (MDA), jako markera peroksydacji lipidów.

Aktywność peroksydazy glutationu (GSH-Px) została oznaczona według metody Paglia i Valentine'a, zmodyfikowanej w zabrzańskiej Katedrze i Zakładzie Biochemii Ogólnej SUM [16]. Zasadą metody jest reakcja zredukowanego glutationu (GSH), w obecności peroksydazy, z ponadtlenkiem t-butylu. Aktywność GSH-Px została wyrażona w jednostkach międzynarodowych I [IU/I]. Aktywność reduktazy glutationu (GR) została oznaczona według zmodyfikowanej metody Elmanna i wsp. [17].

Stężenie dialdehydu malonowego oznaczano według metody Ohkawy i wsp. [18], wykorzystując reakcję z kwasem tiobarbiturowym, i wyrażono w μmol MDA/ml medium hodowlanego. Pomiarów dokonano przy długości fali 515 nm (absorbancja) i 522 nm (emisja). Stężenie MDA odczytano z krzywej standardowej, stosując jako standard 1,1,3,3-tetraetoksypropan, i wyrażano w jednostkach [$\mu\text{mol}/\text{ml}$].

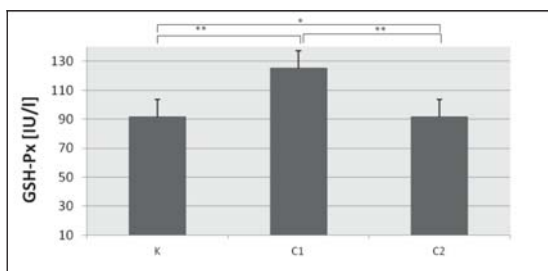
Praca została wykonana w ramach badań statutowych umowa KNW-1-093/10 finansowanych ze środków SUM.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Zgodność rozkładu zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym Gaussa weryfikowano testem zgodności Shapiro-Wilka. Analizę porównawczą dla zmiennych ciągłych realizowano za pomocą testu parametrycznego t-Studenta. Wyniki badań przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SEM (błąd standardowy). Za znamienne statystycznie przyjęto zmiany przy poziomie istotności $p < 0,05$ oraz $p < 0,001$.

WYNIKI

Karboplatyna w stężeniu $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ (C_1) oraz 10-krotnie wyższym (C_2) dodana do hodowli ludzkich komórek czerniaka złośliwego linii Me45, powoduje zależnie od stężenia, zwiększenie aktywności peroksydazy glutationu

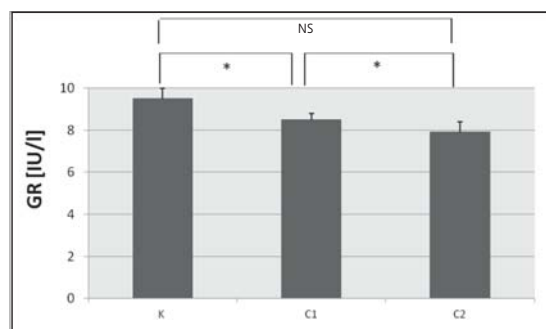


Ryc. 1. Wpływ karboplatyny w stężeniu (C_1 - C_2) na aktywność peroksydazy glutationu (GSH-Px) w medium hodowlanym komórek linii Me45 (po 24h) wyrażona w [IU/ml]. K – kontrola; C_1 – karboplatyna ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$); C_2 – karboplatyna ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$). Wartości średnie \pm błąd standardowy (SEM); $n = 6$; test t-Studenta: * $p < 0,05$ vs K, ** $p < 0,001$ vs K.

Fig. 1. Influence of different concentration of carboplatin (C_1 - C_2) on glutathione peroxidase activity (GSH-Px) in human malignant melanoma Me45 media cells (after 24 h) and expressed in [IU/ml]. K – control group; C_1 – Carboplatin ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$); C_2 – Carboplatin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$). Mean values \pm standard error (SEM); $n = 6$; Student's t-test: * $p < 0.05$ vs K, ** $p < 0.001$ vs K.

(GSH-Px) po 24 godzinach w mediach hodowlanych w porównaniu z grupą kontrolną, odpowiednio: $125,2 \pm 12,1$ IU/l, $99,1 \pm 13,3$ vs $91,6 \pm 12,1$; ($p < 0,001$, $p < 0,05$) (ryc. 1).

Zależnie od stężenia, karboplatyna wpływa także na aktywność enzymu reduktazy glutationu GR – kofaktora reakcji katalizowanej przez GSH-Px. W stężeniu $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ (C_1) po 24 godzinach hamuje aktywność enzymu GR w medium hodowlanym komórek linii Me45 w porównaniu z aktywnością tego enzymu w grupie komórek nietraktowanych lekiem cytostaticznym, odpowiednio: $8,49 \pm 0,31$ IU/l, vs $9,49 \pm 0,49$ IU/l, ($p < 0,001$) (ryc. 2). Wykazano brak znamienności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$ w aktywności GR w grupie komórek linii Me45 stymulowanych karboplatyną w stężeniu $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ (C_2) względem grupy kontrolnej.

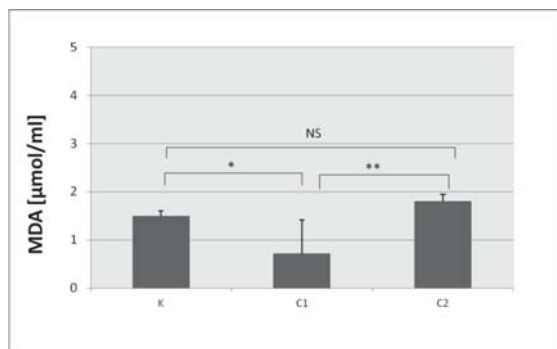


Ryc. 2. Wpływ karboplatyny w stężeniu (C_1 - C_2) na aktywność reduktazy glutationu (GR) w medium hodowlanym komórek linii Me45 (po 24h) wyrażona w [IU/ml]. K – kontrola; C_1 – karboplatyna ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$); C_2 – karboplatyna ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$). Wartości średnie \pm błąd standardowy (SEM); $n = 6$; test t-Studenta: * $p < 0,001$ vs K, NS – brak istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Fig. 2. Influence of different concentration of carboplatin (C_1 - C_2) on glutathione reductase activity (GSH-Px) in human malignant melanoma Me45 media cells (after 24 h) and expressed in [IU/ml]. K – control group; C_1 – Carboplatin ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$); C_2 – Carboplatin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$). Mean values \pm standard error (SEM); $n = 6$; Student's t-test: * $p < 0.001$ vs K, NS – statistical insignificant at level $\alpha = 0.05$.

W mediach hodowlanych komórek ludzkiego czerniaka złośliwego linii Me45 *in vitro* zaobserwowano 2-krotne obniżenie intensywności procesu peroksydacji lipidów pod wpływem karboplatyny w stężeniu $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ (C_1) w porównaniu z grupą kontrolną: $0,71 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\text{ml}$, vs $1,49 \pm 0,11 \mu\text{mol}/\text{ml}$ ($p < 0,05$). W stężeniu 10-krotnie wyższym (C_2) karboplatyna powoduje zwiększenie stężenia MDA w mediach hodowlanych komórek linii Me45

in vitro (ryc. 3), niemniej uzyskane wartości stężeń MDA w tej grupie badawczej nie są istotne statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$ względem grupy kontrolnej.



Ryc. 3. Wpływ karboplatyny w stężeniu (C_1 - C_2) na stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w medium hodowlanym komórek linii Me45 (po 24 h) wyrażonego w [µmol MDA/ml]. K – kontrola; C_1 – karboplatyna (10 µg/ml); C_2 – karboplatyna (100 µg/ml). Wartości średnie ± błąd standardowy (SEM); n = 6; test t-Studenta: * p < 0,05 vs K, ** p < 0,001 vs K, NS – brak istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Fig. 3. Influence of different concentration of carboplatin (C_1 - C_2) on malondialdehyde (MDA) concentration in human malignant melanoma Me45 media cells (after 24 h) and expressed in [IU/ml]. K – control group; C_1 – Carboplatin (10 µg/ml); C_2 – Carboplatin (100 µg/ml). Mean values ± standard error (SEM); n = 6; Student's t-test: * p < 0.05 vs K, ** p < 0.001 vs K, NS – statistical insignificant at level $\alpha = 0.05$.

DYSKUSJA

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych można badać w komórkach [7,8, 9,13,15,19] oraz mediach hodowlanych [20,21,22,23].

W pracy zbadano wpływ leku cytostatycznego, karboplatyny, w dwóch różnych stężeniach na aktywność enzymu GSH-Px katalizującego reakcję dysmutacji nadtlenu wodoru (H_2O_2) z udziałem glutationu (GSH) do cząsteczki tlenu (O_2) oraz wody (H_2O). Peroksydaza glutationu jest enzymem występującym w różnych kompartmentach komórkowych oraz w przestrzeni pozakomórkowej, stąd można oznaczyć jej aktywność także w mediach hodowlanych znad komórek, prowadzonych w warunkach *in vitro* [22,23]. Kofaktorem enzymatycznym GSH-Px jest enzym reduktaza glutationu (GR), który współdziała z GSH-Px w odtworzeniu zredukowanego glutationu [11].

W pracy zaobserwowano wzrost aktywności enzymu GSH-Px w mediach hodowlanych komórek ludzkiego czerniaka złośliwego linii Me45 po stymulacji karboplatyną w obydwu

stężeniach, przy czym wzrost aktywności tego enzymu był większy w grupie komórek stymulowanych karboplatyną w stężeniu 10 µg/ml względem grupy komórek stymulowanych karboplatyną w stężeniu 10-krotnie większym od wyjściowego. Badanie wpływu leków cytostacyjnych lub innych czynników generujących stres oksydacyjny na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w mediach hodowlanych komórek nowotworowych było także przedmiotem innych badań [20,21,22,23]. Polaniak i wsp. wykazali 1,5-krotny wzrost aktywności enzymu GSH-Px w mediach hodowlanych komórek raka płaskonabłonkowego linii AT478 poddanych stymulacji polem elektromagnetycznym o niskiej częstotliwości (ELF-EMF), czynnikiem generującym RFT w hodowli. Efekt ten autorzy tłumaczą procesem adaptacji komórek nowotworowych linii AT478 do stresu oksydacyjnego powstającego pod wpływem stymulacji pola elektromagnetycznego o niskiej częstotliwości [22].

Wpływ ekspozycji komórek AT478 na działanie ELF-EMF w kombinacji z melatoniną był także przedmiotem badań Żwirskiej-Korczali i wsp., którzy wykazali zwiększenie aktywności enzymu GSH-Px w terapii kombinowanej z użyciem ELF-EMF oraz melatoniny w różnych stężeniach w porównaniu z grupą komórek poddanych monoterapii oraz komórek grupy kontrolnej [20].

W niniejszej pracy uzyskanemu wzrostowi aktywności enzymu GSH-Px w mediach hodowlanych komórek linii Me45 pod wpływem karboplatyny w stężeniu 10 µg/ml towarzyszył spadek stężenia MDA w medium hodowlanym. Dialdehyd malonowy jest markerem procesu peroksydacji lipidów błonowych i jest wydzielany do medium hodowlanego, a jego stężenie w medium może być skutecznym markerem procesu peroksydacji lipidów komórkowych [12]. Zależność między aktywnością GSH-Px a stężeniem końcowym MDA wynika z faktu, że peroksydaza glutationu redukuje nie tylko H_2O_2 , ale także ROOH. Nadtlenek organiczny (ROOH) zostaje zredukowany do odpowiedniego alkoholu (ROH), stąd wysoka aktywność enzymu GSH-Px jest czynnikiem hamującym proces peroksydacji lipidów błonowych w komórkach [11,12]. Niektóre badania dowodzą, iż leki cytostatyczne, takie jak holoksan, zwiększają stres oksydacyjny i intensyfikują proces peroksydacji w mediach hodowlanych komórek raka płaskonabłonkowego linii AT478 *in vitro*. Pola-

niak i wsp. wykazali 3,5-krotny wzrost stężenia MDA w medium hodowlanym komórek linii AT478 poddanych monoterapii holoksanem w stężeniu 40 µg/ml [21]. Linden i wsp. zaobserwowali 4-krotny wzrost stężenia MDA oraz 2-krotne obniżenie aktywności GSH-Px w komórkach szczurzego glejaka linii C6 *in vitro* poddanych terapii z użyciem nadtlenków organicznych, wykazując 6-krotnie większy odsetek martwych komórek nowotworowych linii C6 w hodowli, poddanych terapii kombinowanej z użyciem wodorotlenku tert-butylu oraz nadtlenku kumenu [24].

W poprzedniej pracy wykazaliśmy ponad 4,5-krotny wzrost aktywności GSH-Px po 24-godzinnej stymulacji komórek czerniaka złośliwego linii Me45 etopozydem w stężeniu 20 µg/ml w stosunku do aktywności tego enzymu w medium hodowlanym komórek grupy kontrolnej, odpowiednio: 450,45 ± 34 [IU/l] vs 93,51 ± 8,96 [IU/l] [23]. W obecnej pracy z użyciem tej samej linii komórkowej oraz innego leku cytostatycznego – karboplatyny w stężeniu 10 µg/ml, stwierdzono wzrost aktywności enzymu GSH-Px o 37% w porównaniu z grupą kontrolną, odpowiednio: 125,2 ± 12,1 IU/l vs 91,6 ± 12,1 IU/l. W obydwu pracach wzrostowi aktywności GSH-Px towarzyszył spadek stężenia MDA w mediach hodowlanych komórek linii Me45. W obydwu przypadkach wykazano adaptację do stresu oksydacyjnego komórek czerniaka złośliwego linii Me45 w hodowli *in vitro* względem różnych leków cytostatycznych.

Odpowiedź komórek nowotworowych na leki cytostatyczne zależy od użytego stężenia chemioterapeutyku oraz rodzaju linii komórkowej. Istnieją doniesienia o braku adaptacji komórek nerwiaka płodowego (*neuroblastoma*) *in vitro* względem czynników generujących stres oksydacyjny. W hodowli komórek nowotworowych *neuroblastoma* pod wpływem trójtlenku arsenu oraz berberyny zaobserwowano 2-krotny wzrost stężenia MDA w medium komórkowym, czemu towarzyszył spadek potencjału transbłonowego mitochondriów, obniżenie o 60% żywotności komórek w hodowli oraz aktywację kaspazy-3 w komórkach *neuroblastoma* [25].

Proces nabywania oporności lekowej komórek nowotworowych względem leków cytostatycznych nie jest związany wyłącznie ze zwiększeniem ekspresji genów kodujących białka oporności wielolekowej MDR (*multidrug resistance*) czy glikoproteiny-P, ale także może zależeć od

statusu aktywności enzymów antyoksydacyjnych [1,3]. Wysoka aktywność GSH-Px w komórkach lub mediach hodowlanych przyczynia się do większej oporności komórek nowotworowych na leki cytostatyczne w terapii *in vitro* [7,8]. W pracach Dusre i wsp. [7] oraz Samuels i wsp. [8] wykazano wpływ aktywności enzymu GSH-Px w komórkach nowotworowych na indukcję procesu chemooporności komórek nowotworowych na leki cytostatyczne *in vitro*. Dusre i wsp. [7] zaobserwowali większą oporność komórek raka piersi linii MCF-7^{ADR} względem mitomycyny C oraz adriamycyny w warunkach *in vitro*, gdyż wykazują one 14-krotnie większą aktywność enzymu GSH-Px w porównaniu z komórkami linii dzikiej. Stężenie mitomycyny C powodujące zahamowanie wzrostu 50% komórek linii wielolekoopornej MCF-7^{ADR} w hodowli (IC_{50}) osiągało wartość 22,5 µmol względem stężenia 0,36 µmol tego leku cytostatycznego w przypadku komórek raka piersi linii dzikiej [7].

Samuels i wsp. [8] wykazali różną cytotoksyczność doksorubicyny względem różnych linii komórek nowotworowych wywodzących się z tkanki łącznej. Komórki nowotworowe linii STSAR90 izolowane z ludzkich mięsaków były 6-krotnie mniej wrażliwe na apoptozę indukowaną przez doksorubicynę względem komórek nowotworowych linii STSAR11. Traktowanie obydwu linii komórkowych doksorubicyną w stężeniu 100 µg/ml spowodowało różną odpowiedź komórek na lek: komórki linii STSAR90 wykazywały 6-krotnie wyższą aktywność enzymu GSH-Px oraz 2-krotnie wyższe stężenie glutationu w komórkach poddanych terapii doksorubicyną.

Wyższa aktywność enzymu GSH-Px w komórkach nowotworowych linii STSAR90 skutkowała większą opornością na apoptozę i nekrozę indukowaną przez ten lek cytostatyczny względem komórek nowotworowych linii STSAR11. Większa aktywność enzymu GSH-Px skutkuje także obniżeniem stężenia wewnątrzkomórkowego H₂O₂, zmniejszając tym samym intensywność tworzenia rodnika hydroksylowego (OH^{*·}) w cyklu Fentona w hodowli komórek nowotworowych linii STSAR90 [8]. Leki cytostatyczne, takie jak: holoksan, doksorubicyna czy karboplatyna, działają prooksydacyjnie względem komórek nowotworowych, zwiększając wewnątrzkomórkowe stężenie H₂O₂. Nadtlenek wodoru jest czynnikiem inicjującym proces apoptozy komórek [6,13,26]. Podczas terapii z użyciem karboplatyny wzglę-

dem komórek czerniaka złośliwego linii Me45 zwiększa się aktywność GSH-Px w mediach hodowlanych, tym samym maleje stężenie H_2O_2 w hodowli, mogąc skutecznie ograniczać odsetek komórek uczestniczących w programowanej śmierci (apoptozie).

Wysoka aktywność enzymu GSH-Px oraz ograniczenie intensywności procesu peroksydacji lipidów w mediach komórek czerniaka złośliwego linii Me45 może stanowić mechanizm adaptacyjny komórek do stresu oksydacyjnego generowanego oddziaływaniem karboplatyny. W niniejszej pracy wzrostowi aktywności GSH-Px oraz obniżeniu stężenia MDA w grupie komórek stymulowanych karboplatyną w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ towarzyszyło niewielkie 10% obniżenie aktywności enzymu GR. Reduktaza glutationu współdziała z GSH-Px w odtworzeniu zredukowanego glutationu (GSH) z disulfidu glutationu (GSSG) oraz cząsteczki wody przy współdziałaniu $NADPH H^+$. Tak niewielki procent zahamowania aktywności GR nie wpływa hamująco na enzym GSH-Px, niewykluczone jest jednak zwiększenie stę-

żenia GSSG w hodowli, który może dezaktywować białka komórkowe wskutek utleniania grup tiolowych białek komórkowych [10].

Z obserwacji dostępnych w piśmiennictwie wynika, że wysoka aktywność enzymu GSH-Px w komórkach nowotworowych może być jednym z czynników warunkujących indukcję procesu oporności na leki cytostatyczne w hodowli *in vitro*. Obecnie trwają próby poszukiwania skutecznych, szybkich i tanich bezpośrednich i pośrednich markerów służących do oceny wrażliwości komórek nowotworowych na leki cytostatyczne stosowane w terapii *in vitro* oraz *in vivo* [6,7,14,15].

WNIOSEK

Karboplatyna w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ (C_1) zwiększa aktywność enzymu (GSH-Px) i zapobiega procesowi peroksydacji lipidów w mediach hodowlanych komórek czerniaka złośliwego linii Me45 *in vitro*, pomimo wpływu hamującego na enzym reduktazę glutationu (GR).

PIŚMIENNICTWO

- Alexandre J, Nicco C, Chéreau C i wsp. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2006; 98(4): 236–244.
- Pflugfelder A., Eigentler T.K., Keim U. i wsp. Effectiveness of Carboplatin and Paclitaxel as first- and second-line treatment in 61 patients with metastatic melanoma. *PLoS One* 2011; 6(2): e16882.
- Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2009; 8(7): 579–591.
- Jawniak D, Jawniak R., Małek M. i wsp. Wpływ stresu oksydacyjnego na przebieg kliniczny ostrych białaczek mieloblastycznych. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* 2004; 9: 157–160.
- Yilmaz M.I., Saglam K., Sonmez A. i wsp. Antioxidant system activation in prostate cancer. *Biol. Trace Elem. Res.* 2004; 98(1): 13–19.
- Nelson K.K., Ranganathan A.C., Mansouri J. i wsp. Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(1): 424–432.
- Dusre L., Rajagopalan S., Eliot H.M., Covey J.M., Sinha B.K. DNA interstrand cross-link and free radical formation in a human multidrug-resistant cell line from mitomycin C and its analogues. *Cancer Res.* 1990; 50(3): 648–652.
- Samuels B.L., Murray J.L., Cohen M.B. i wsp. Increased glutathione peroxidase activity in a human sarcoma cell line with inherent doxorubicin resistance. *Cancer Res.* 1991; 51(2): 521–527.
- Lenehan P.F., Gutiérrez P.L., Wagner J.L., Milak N., Fisher G.R., Ross D.D. Resistance to oxidants associated with elevated catalase activity in HL-60 leukemia cells that overexpress multidrug-resistance protein does not contribute to the resistance to daunorubicin manifested by these cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1995; 35(5): 377–386.
- Gałecka E., Jacewicz R., Mrowicka M., Florkowski A., Gałecki P. Enzymy antyoksydacyjne, struktura, właściwości, funkcje. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2008; 25(147): 266–268.
- Michelson A.M. Selenium glutathione peroxidase: some aspects in man. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 1998; 17(3–4): 233–239.
- Gaweł S., Wardas M., Niedworok E., Wardas P. Dialdehyd malonowy (MDA) jako wskaźnik procesów peroksydacji lipidów w organizmie. *Wiad. Lek.* 2004; 57(9–10): 453–455.
- Hur G.C., Cho S.J., Kim C.H. i wsp. Manganese superoxide dismutase expression correlates with chemosensitivity in human gastric cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(15): 5768–5775.
- Yokoe H., Homura H., Yamano Y. i wsp. Characterization of intracellular superoxide dismutase alterations in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with lymph node metastasis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2009; 135(11): 1625–1633.
- Connor K.M., Hempel N., Nelson K.K. i wsp. Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. *Cancer Res.* 2007; 67(21): 10260–10267.
- Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70(1): 158–169.
- Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82(1): 70–77.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95(2): 351–358.
- Weydert C., Roling B., Liu J. i wsp. Suppression of the malignant phenotype in human pancreatic cancer cells by the overexpression of manganese superoxide dismutase. *Mol. Cancer Ther.* 2003; 2(4): 361–369.
- Żwirska-Korczała K., Adamczyk-Sowa M., Polaniak R. i wsp. Influence of extremely-low-frequency magnetic field on antioxidative melatonin properties in AT478 murine squamous cell carcinoma

- culture. Biol. Trace. Elem. Res. 2004; 102(1-3): 227-243.
21. Polaniak R., Wideł M., Beck B., Chwalińska E., Gruca-Mamczar E., Birkenner E. Wpływ holoksanu na aktywność izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej i stężenie dialdehydu malonowego w hodowli megakolonii komórek raka płaskonabłonkowego *in vitro*. Bromat. Chem. Toksykol. 2008; 1: 89-94.
22. Polaniak R., Bułdak R.J., Karoń M. i wsp. Influence of an extremely low frequency magnetic field (ELF-EMF) on antioxidative vitamin E properties in AT478 murine squamous cell carcinoma culture *in vitro*. Int. J. Toxicol. 2010; 29(2): 221-230.
23. Bułdak R.J., Polaniak R., Kukla M. i wsp. Wpływ etopozylu na aktywność enzymów stresu oksydacyjnego oraz stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w hodowli ludzkich komórek czerniaka złośliwego linii Me45 *in vitro*. Farm. Przegł. Nauk. 2010, 11, 11-19.
24. Linden A., Güllden M., Martin H.J., Maser E., Seibert H. Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. Toxicol. In Vitro 2008; 22(5): 1371-1376.
25. Kim D.W., Ahan S.H., Kim T.Y. Enhancement of Arsenic Trioxide (As₂O₃)-Mediated Apoptosis Using Berberine in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. J. Korean. Neurosurg. Soc. 2007; 42(5): 392-399.
26. Efferth T., Giaisi M., Merling A., Kramer P.H., Li-Weber M. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. PLoS One. 2007; 2(1): e693.