

Renata Polaniak, Beata Birkner, Natalia Matysiak<sup>1)</sup>, Jolanta Zalejska-Fiolka,  
Aleksandra Fidyk, Marek Rokicki, Roland Heiduk, Ewa Birkner

## WPŁYW HOLOKSANU NA AKTYWNOŚĆ IZOENZYMÓW DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ I STĘŻENIE DIALDEHYDU MALONOWEGO W HODOWLI MEGAKOLONII KOMÓREK RAKA PŁASKONABŁONKOWEGO *IN VITRO*

Zakład Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. E. Birkner

<sup>1)</sup> Katedra i Zakład Histologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach  
Kierownik: doc. dr hab. n. med. R. Wojnicz

*Holoksan jest lekiem cytostatycznym należącym do związków alkilujących o mechanizmie działania podobnym do cyklofosfamidu. Celem pracy była ocena wpływu holoksanu, w różnych dawkach i przedziałach czasowych na aktywność izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej, SOD (mitochondrialnego i cytoplazmatycznego), jako enzymów układu oksydoredukcyjnego, oraz stężenie dialdehydu malonowego MDA, jako markera peroksydacji lipidów, w medium hodowlanym raka płaskonabłonkowego, hodowanego in vitro w postaci megakolonii. Hodowlę prowadzono na linii raka płaskonabłonkowego AT478, w warunkach standardowych. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że holoksan w zastosowanej dawce (10 i 40 µg/cm<sup>3</sup>) i przedziale czasowym 24 i 72 godz. wpływa na zaburzenia układu oksydoredukcyjnego megakolonii komórek nowotworowych raka płaskonabłonkowego linii AT478 hodowanego in vitro.*

Hasła kluczowe: rak płaskonabłonkowy, hodowla komórkowa, izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej, aldehyd dimalonowy.

Key words: squamous cell carcinoma, cell culture, isoenzymes SOD, MDA.

Holoksan jest lekiem cytostatycznym, należącym do grupy związków alkilujących. Jego mechanizm działania jest podobny do cyklofosfamidu i podobnie, jak trofosfamid jest jego pochodną (1). Działanie holoksanu jest niezależne od fazy cyklu komórkowego, powodując powstawanie wiązań mostkowych pomiędzy dwiema nićmi DNA (1). Jak wszystkie cytostatyki alkilujące, hamuje wzrost komórek, ich podział, czynności i aktywność mitotyczną. W działaniu leczniczym i toksycznym, wykazuje zdolność do zaburzeń mitozy i podziału komórek szybko rosnących. Słabiej działa mielotoksycznie, a silniej neurotoksycznie od cyklofosfamidu (2). Metabolizowany jest w wątrobie do 4-hydroksyifosfamidu, który rozkłada się do akroleiny i ifosfamidu musztard, jako formy aktywnej (1). Jego metabolity są wydalane z moczem, głównie w postaci czynnej (1). Okres półtrwania tego preparatu wynosi ok. 7 godz. Stosowany jest w leczeniu paliatywnym

różnych nowotworów. Podczas leczenia mogą jednak wystąpić między innymi zaburzenia ze strony układu pokarmowego, czynności krwiotwórczej, supresja szpiku oraz upośledzenie pęcherza moczowego i wątroby, a także wykazuje niepożądane działanie kardio- i pneumotoksyczne. Stosowany równocześnie z napromienianiem, nasila reakcję popromienną (1, 2). Prowadzenie hodowli komórkowych *in vitro* jest obecnie bardzo rozpowszechnionym modelem badawczym. Hodowle są prowadzone na różnych liniach komórkowych: hepatocytach, limfocytach, itp. (3, 4, 5, 6). Natomiast prowadzenie *in vitro* hodowli raka płaskonabłonkowego AT478 w postaci megakolonii jest nowatorskim przedsięwzięciem naukowym opracowanym w Instytucie Badań nad Promieniotwórczością w Monachium (7) i zmodyfikowanym w Zakładzie Biochemii Ogólnej w Zabrze ŚAM. Istnieją doniesienia dotyczące zmian chorobowych związanych z występowaniem raków płaskonabłonkowych (8). Nie znaleziono jednak w piśmiennictwie danych dotyczących wpływu holoksanu lub innych preparatów cytostatycznych na hodowlę megakolonii raka płaskonabłonkowego AT478 *in vitro*. Bardzo istotny i interesujący wydaje się być wpływ leków, w tym leków o działaniu cytostatycznym, na wzrost i przemiany metaboliczne badanych linii komórkowych *in vitro*, w tym właśnie holoksanu.

Celem badań była ocena wpływu holoksanu w różnych dawkach i przedziałach czasowych na aktywność izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), mitochondrialnej (MnSOD) i cytoplazmatycznej (Cu/ZnSOD), jako enzymów układu oksydoredukcyjnego, oraz stężenie dialdehydu malonowego, MDA, jako markera peroksydacji lipidów, w medium hodowli raka płaskonabłonkowego hodowanego *in vitro* w postaci megakolonii.

## MATERIAŁ I METODY

Do hodowli zastosowano linię raka płaskonabłonkowego AT478, pochodzącego od myszy C3H. Jako podłoża hodowlanego użyto podłoże Dulbeco's z L-glutaminą, wzbogacone wołową surowicą płodową firmy Sigma. Hodowla prowadzona była w standardowych warunkach temperatury i ciśnienia, w atmosferze wzbogaconej dwutlenkiem węgla. Do hodowli użyto butelek hodowlanych, firmy Sarstedt, w każdej po 4 megakolonie. Megakolonie potraktowano dwoma stężeniami holoksanu: 10 i 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  medium w dwóch przedziałach czasowych: 24 i 72 godz. Grupę kontrolną stanowiły megakolonie w 5 butelkach hodowlanych, nie zawierających w medium hodowlanym holoksanu.

Hodowlę megakolonii prowadzono wg standartowej procedury:

- butelkę zawierającą odpowiednią liczbę komórek trypsynizowano mieszaniną trypsyny i EDTA przez kilka minut;
- usuwano mieszaninę trypsynizującą i przepłukiwano komórki medium hodowlanym;
- mechanicznie uwalniano komórki do medium wzbogaconego płodową surowicą wołową (FSC) o określonym stężeniu;
- w butelkach hodowlanych w zaznaczonych miejscach nakrapiano zawiesinę komórek i inkubowano w określonych parametrach eksperymentu (2).

Medium hodowlane zbierano po 24 i 72 godz. od podania preparatu i oznaczano:  
– aktywność izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej – SOD

[E.C. 1.15.1.1]:

- mitochondrialnego – MnSOD;
  - cytoplazmatycznego – Cu/ZnSOD;
- stężenie dialdehydu malonowego – MDA.

Aktywność izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej oznaczano za pomocą metody opisanej przez *Oyanagui* (9), wykorzystując ich różną podatność na inhibicję cyjankiem i wyrażono ją w jednostkach nitrowych/cm<sup>3</sup> medium hodowlanego (NU/cm<sup>3</sup>). Jednostka Nitrowa jest to taka ilość enzymu, która rozkłada w jednostce czasu 50% powstałego rodnika ponadtlenkowego (9, 10). Stężenie dialdehydu malonowego oznaczano za pomocą metody *Ohkawy* i współpr. (11), wykorzystując jego reakcję z kwasem tiobarbiturowym i wyrażono w µmolach MDA/dm<sup>3</sup> medium hodowlanego (12, 13).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W przeprowadzonym eksperymencie stwierdzono, że holoksan, lek cytostatyczny, w zastosowanej dawce i przedziale czasowym, powoduje zaburzenia w procesach oksydo-redukcyjnych badanych linii komórkowych hodowanych *in vitro*. Proces ten zaobserwować można na podstawie zmian aktywności badanych izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD): izoenzymu mitochondrialnego (MnSOD), oraz izoenzymu cytoplazmatycznego (Cu/ZnSOD), a także zmian stężenia dialdehydu malonowego (MDA), jako markera perosydacji lipidów. We wszystkich grupach badanych (B<sub>10</sub>; B<sub>40</sub>), po podaniu holoksanu w dawce 10 µg i 40 µg, w czasie 24 i 72 godz., nastąpił znamienny statystycznie wzrost aktywności obu izoenzymów SOD, w stosunku do grup kontrolnych (K<sub>24</sub>; K<sub>72</sub>). Z wyjątkiem grupy badanej Cu/ZnSOD, która otrzymała dawkę 40 µg holoksanu w czasie 24 godz. Wzrost aktywności Cu/ZnSOD był nieznamienny statystycznie. Podobne wyniki otrzymano dla stężenia dialdehydu malonowego (MDA), jedynie po podaniu 40 µg holoksanu po 72 godz. nastąpił znamienny statystycznie spadek stężenia tego parametru w stosunku do grupy kontrolnej (tab. I). Uzyskane wyniki opracowano testem *t-Studenta*, po uprzednim sprawdzeniu normalności rozkładu, przyjmując jako poziom istotności  $p < 0,005$ . Wyniki przedstawiono w tab. II.

W świetle opublikowanych danych literaturowych istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące udziału wolnych rodników w patomechanizmie toksycznego działania holoksanu. Organizmy żywe, w tym także hodowle komórkowe prowadzone *in vitro*, posiadają mechanizmy antyoksydacyjne, które osłaniają przemiany ustrojowe przed działaniem wolnych rodników. Należą do nich między innymi układy enzymatyczne. Dysmutaza ponadtlenkowa, SOD i jej izoenzymy są właśnie przedstawicielami tej grupy enzymatycznej. Dysmutaza ponadtlenkowa, SOD, [EC 1.15.1.1] jest enzymem występującym we wszystkich organizmach żywych. Przede wszystkim w jądrze komórkowym i lizosomach. Kompleksowe związanie wchodzących w skład enzymów jonów metali prowadzi do jego dezaktywacji. Jest to proces odwracalny (14, 15, 16, 17). Natomiast, dialdehyd malonowy, MDA, jako

Tabela I. Aktywność dysmutazy mitochondrialnej i cytoplazmatycznej oraz stężenie dialdehydu malonowego w zależności od stężenia holoksanu i czasu trwania doświadczenia (24 i 72 godz.)

Table I. Activity of SOD isoenzymes and concentration of MDA depend on holoxane concentration and time of examination

Mierzony parametr	Kontrola (K)		Holoksan w stęż. 10 µg (B <sub>10</sub> )		Holoksan w stęż. 40 µg (B <sub>40</sub> )	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Mn SOD IU/cm <sup>3</sup>	1,203	1,405	9,282	13,752	14,680	15,31
CuZn SOD IU/cm <sup>3</sup>	1,404	1,820	3,799	4,076	4,169	4,492
MDA (µg/cm <sup>3</sup> )	6,523	7,276	19,065	10,166	17,131	8,434

Tabela II. Opracowanie statystyczne otrzymanych wyników

Table II. Summary statisty of obtained results

Badany parametr	Poziom istotności statystycznej p			
	czas ekspozycji (h)	vs k		vs B <sub>40</sub>
		B <sub>10</sub>	B <sub>40</sub>	B <sub>10</sub>
MnSOD (IU/cm <sup>3</sup> )	24	<0,001	<0,001	<0,001
	72	<0,001	<0,001	<0,001
CuZnSOD (IU/cm <sup>3</sup> )	24	<0,005	<0,005	<0,138
	72	<0,001	<0,001	<0,121
MDA (µg/cm <sup>3</sup> )	24	<0,001	<0,001	<0,006
	72	<0,001	<0,109	<0,045

marker peroksydacji lipidów, pozwala określić nasilenie procesów peroksydacyjnych zachodzących w organizmie żywym (11). W przypadku przeprowadzonego eksperymentu nasilenie peroksydacji lipidów dotyczyło procesów wolnorodnikowych zachodzących w medium hodowlanym komórek nowotworowych linii AT478.

W przeprowadzonych badaniach zajęto się zmianami aktywności izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej, SOD: mitochondrialną, MnSOD i cytoplazmatyczną, Cu/ZnSOD, oraz zmianami stężenia dialdehydu malonowego, MDA, pod wpływem holoksanu w zastosowanej dawce i przedziale czasowym. Uzyskane zmiany aktywności badanych enzymów, oraz stężenia MDA sugerują, wpływ holoksanu na reakcje układu oksydoredukcyjnego w komórce raka płaskonabłonkowego linii AT478, hodowanych *in vitro*.

Wpływ holoksanu analizowano również na wzrost oraz przemiany metaboliczne komórek raka płaskonabłonkowego AT478 myszy C3H. Oceniano wpływ holoksanu w określonej dawce i przedziale czasowym na przyrosty powierzchni megakolonii, mierzonych za pomocą mikroskopu oraz specjalnie do tego celu skonstruowanego pozycjonera. Stwierdzono, że holoksan hamuje wzrost megakolonii raka płasonabłonkowego AT478 w zastosowanej dawce i przedziale czasowym (2).

Na podstawie piśmiennictwa wiadomo, że hodowle komórkowe *in vitro* są niezwykle dogodną formą prowadzenia badań (18, 19). Dostarczają one bogatych

możliwości oceny aktywności i stężenia produktów przemian biochemicznych szlaków metabolicznych. Między innymi aktywności enzymatycznej nie tylko enzymów omawianych w wykonanym eksperymencie, ale także enzymów biorących udział w innych procesach. Na przykład aktywność dehydrogenazy mleczanowej, LDH. Metabolizm komórki nowotworowej opiera się na procesie glikolizy, więc aktywność całkowitego LDH może wskazywać na stopień uszkodzenia komórki nowotworowej. Specyficznym przypadkiem aktywności enzymatycznej w medium hodowlanym raka płaskonabłonkowego hodowanego *in vitro* jest lizozym [EC 3.2.1.17], enzym o działaniu bakteriobójczym (15). Badania przeprowadzono także na linii komórkowej AT478. Nie stwierdzono aktywności badanego enzymu, zarówno w grupach badanych, jak i grupie kontrolnej. W dyskusji próbowano przeanalizować fakt braku aktywności enzymatycznej lizozymu w medium hodowlanym *in vitro* w porównaniu ze znamienne statystycznie aktywnym lizozymem w surowicy krwi kobiet z chorobami nowotworowymi narządów rodnych (20). Na uwagę zasługuje praca dotycząca układu oksydoredukcyjnego linii raka płaskonabłonkowego AT478, w której omówiono zagadnienia zmian aktywności enzymatycznych zmiataczy wolnych rodników (izoenzymów dysmutazy nadadtlenkowej i peroksydazy glutationowej), stężenia aldehydu dimalonowego, jako markera peroksydacji lipidów, oraz zmian struktury DNA w komórkach AT478 hodowanych *in vitro*. Badana linia komórkowa była poddana działaniu napromienienia o wartości 5 Gy (60 Co). W rezultacie przeprowadzonych badań stwierdzono wpływ napromienienia zarówno na aktywność badanych enzymów jak i na zmiany morfologiczne występujące w komórkach megakolonii raka płaskonabłonkowego linii AT478 (21, 22). Na podstawie przeprowadzonych badań megakolonii linii raka płaskonabłonkowego stwierdzono, że jednym z najistotniejszych antyoksydantów jest melatonina (23), zaś wolnozmiennie pole elektromagnetyczne również może spełniać rolę zmiatacza wolnych rodników w zależności od zastosowanego natężenia pola i przedziału czasowego ekspozycji. Podobne badania przeprowadzono na innych liniach komórkowych, np. na fibroblastach mysich 3T3L (24, 25).

Hodowla raka płaskonabłonkowego w postaci megakolonii zmodyfikowana w Zakładzie Biochemii Ogólnej ŚUM, jest eksperymentem pozwalającym na długotrwałe prowadzenie obserwacji megakolonii i sugerującym potrzebę dalszych badań nad wpływem cytostatyków w różnych dawkach i przedziałach czasowych na aktywność enzymatyczną komórek megakolonii linii AT478 hodowanych *in vitro*.

R. Polaniak, B. Birkner, N. Matysiak, J. Zalejska-Fiolka, A. Fidyk,  
M. Rokicki jr, R. Heiduk, E. Birkner

#### INFLUENCE OF HOLOXAN ON ACTIVITY OF SOD ISOENZYMES AND LIPID PEROXIDATION IN MEGACOLONIES OF CELL CULTURE AT478 – IN VITRO STUDY

##### Summary

Investigations were carried out on the effect of different holoxane concentrations on the isoenzymes SOD (MnSOD and Cu/ZnSOD) activity and MDA of aquamous cell carcinoma *in vitro* at different time intervals.

The observation period was 24 and 72 hours, and the surface areas of experimental and control colonies.

The strongest inhibitory effect of holoxane on the activity of isoenzymes SOD and MDA of aquamous cell carcinoma megacolonies at 40 µg/ml after 72 hours.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Czukowska L.*: Indeks leków medycyny praktycznej. Wyd. Med. Prakt., Kraków 1999; 238. – 2. *Polaniak R., Birkner E., Kasperczyk A.* i wspópr.: Wpływ holoksanu na wzrost hodowli megakolonii raka płaskonabłonkowego *in vitro*. *Diagn. Lab.*, 2001; 37: 289-293. – 3. *Lind M.*: Growth factor of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomyias, and implants fixation. *Acta Orthop. Scand.*, 1998; suppl. 283: 2. – 4. *Parchment R.E., Gordon M., Grieshaber C.K.* i wspópr.: Predicting hematological toxicity (myelosuppression) of cytotoxic drug therapy from *in vitro* test. *Annales of Onkology*, 1998; 9(4): 357-362. – 5. *Slesak B., Nowicky J.W., Harlozinska A.*: *In vitro* effects of cholidonium majus. *Drugs under experimental & Clinical Research*, 1992; 18 suppl. 17. – 6. *Tabata M.J., Matsumura T., Liu J.G.* i wspópr.: Expression of cytokeratin 14 in ameloblast-lineage cells of the developing tooth of rat, both *in vivo* and *in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 1998; 46(2): 209-215. – 7. *Tarnawski R., Kummermehr J., Trott K.R.*: The radiosensitivity of recurrent clones of a irradiated murine squamous cell carcinoma in the *in vitro* megacolon system. *Radiotherapy & Oncology*, 1998; 46: 209-214. – 8. *Kulpa J., Kołodziejki L., Wójcik E.*: CYFRA21-1, SCC-Ag, CEA i NSE przed operacją radykalną z powodu płaskonabłonkowego raka płuca. *Diagn. Lab.*, 1999; 35(4): 593. – 9. *Oyanagui Y.*: Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Analyt. Biochem.*, 1984; 142: 290-296. – 10. *Spitz D.R., Oberley L.W.*: An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Annal. Biochem.*, 1989; 179: 8-18.

11. *Ohkawa H., Ohishi N., Kunio Y.*: Assay for peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annal. Biochem.*, 1979; 95: 351-358. – 12. *Lin Y., Jamieson D.*: Effect of antioxidants on oxygen toxicity *in vivo* and lipid peroxidation *in vitro*. *Pharmacol. and Toxicol.*, 1992; 70: 271-277. – 13. *Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A.*: Peroxynitrite – induced membrane lipid peroxidations: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991; 2: 001-007. – 14. *Basaga H.S.*: Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell. Biol.*, 1990; 68: 989-998. – 15. *Hagar J.M., Hale S.L., Ilvento J.P., Kloner R.A.*: Lack of significant effects of superoxide dismutase and catalase on development of reperfusion arrhythmias. *Basic Res. Cardiol.*, 1991; 86: 127-136. – 16. *Senga S., Onituka A., Hirose H.*: Protective effect of liposomal encapsulated superoxide dismutase on ischemically injured liver in the rat. *Transplantation Proceedings*, 1990; 22(4): 2025-2026. – 17. *Tetsuya O., Inoue M., Ando Y.*: Chemical modification of superoxide dismutase. *Snt. J. Peptide Protein Res.*, 1998; 153-159. – 18. *Beck E., Polaniak R., Widel M.* i wspópr.: Influence of electromagnetic field on murine squamous cell *in vitro*. 12<sup>th</sup> Nordic Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics (ISBEMP), IFMBE Proceedings, 2002; vol. 2: 142-143. – 19. *Przybyszewski W., Widel M., Polaniak R.* i wspópr.: Contrasting effects of low vs high dose-rate radiation on lipid peroxidation, DNA damage, and antioxidant enzyme activities in tumor cells. *Progress in Medical Research*, 2005; vol. 3: 12. – 20. *Polaniak R., Birkner E., Beck B.* i wspópr.: Aktywność lizozymu w medium hodowlanym megakolonii komórek raka płaskonabłonkowego *in vitro*. *Diagn. Lab.*, 2004; 40: 553-556.

21. *Przybyszewski W., Widel M., Szurko A., Lubecka B., Matulewicz Ł., Maniakowski Z., Polaniak R.* i wspópr.: Multiple bystander effect of irradiated megakolonies of melanoma cells on non-irradiated neighbours. *Conser Letters*, 2004; 214(1): 91-102. – 22. *Kumala S., Niemiec P., Widel M.* i wspópr.: Apoptosis and clonogenic survival in three tumour cell lines exposed to gamma rays or chemical genotoxic agents. *Cell. Mol. Bio. Lett.*, 2003; 8: 655-665. – 23. *Żwirska-Korczała K., Adamczyk-Sowa M., Polaniak R.* i wspópr.: Influence of extremely low frequency magnetic field on antioxidative melatonin properties in AT478 murine squamous cell carcinoma culture. *Biological Trace Element Research*, 2004; vol. 102(1-3): 227-243. – 24. *Żwirska-Korczała K., Jochem J., Adamczyk-Sowa M., Sowa P., Polaniak R.* i wspópr.: Influence of melatonin on cell proliferation, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in 3T3-L1 preadipocytes – an *in vitro* study. *J. of Physiology and Pharmacology*, 2005; 56 (6): 91-99. – 25. *Żwirska-Korczała K., Jochem J., Adamczyk-Sowa M., Sowa P., Polaniak R.* i wspópr.: Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on cell proliferation, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in 3T3-L1 preadipocytes – *in vitro* study. *J. of Physiology and Pharmacology*, 2005; 56 (6): 101-108.