

lek. Katarzyna Jędrzejowska

**Wpływ cisplatyny i doksorubicyny na układ
prooksydacyjno/antyoksydacyjny oraz ekspresję białka p53
w komórkach gruczolaka płuc *in vitro***

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor pracy:

dr hab. n. med. Renata Polaniak

**Zakład Żywienia Człowieka Katedry Dietetyki
Wydziału Zdrowia Publicznego w Bytomiu
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach**

Bytom '2016

STRESZCZENIE

Wstęp: Nowotwory płuc to najczęstsze nowotwory złośliwe u mężczyzn, u kobiet są na trzecim miejscu wśród zachorowalności. Ogólny podział, bazujący na budowie histologicznej obejmuje raka drobnokomórkowego płuc (SCLC) i raka niedrobnokomórkowego płuc (NSCLC). Wybór metody leczenia zależy od klinicznego zaawansowania nowotworu. Wśród leków cytostatycznych cisplatyna (CIS) jest najczęściej stosowana w leczeniu NSCLC. CIS jest pochodną platyny, o właściwościach alkilujących, charakteryzującą się dużą cytotoksycznością. Dokсорubicyna (DOX) jest szeroko stosowanym lekiem cytostatycznym z grupy antybiotyków antracyklinowych. DOX zaburza transkrypcję DNA komórki. Trwają badania nad stosowaniem liposomalnej dokсорubicyny w leczeniu raka płuc.

Reaktywne formy tlenu (RFT) to atomy lub grupy atomów posiadające niesparowany elektron, wykazujące wysoką reaktywność. Ich głównym źródłem są przemiany metaboliczne zachodzące w mitochondriach. Proces zaburzenia równowagi pomiędzy powstawaniem, a usuwaniem RFT oraz naprawianiem wywołanych przez nie uszkodzeń to stres oksydacyjny. Markerami stresu oksydacyjnego są zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych, do których należą: dysmutaza nadadtlenkowa (SOD) i jej izoenzymy- mangan-zależna dysmutaza nadadtlenkowa (MnSOD) oraz cynkowo-miedziowa dysmutaza nadadtlenkowa (Cu/ZnSOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPX), reduktaza glutationowa (GR), transferaza S-glutationowa (GST). Dialdehyd malonowy (MDA) powstaje w procesie peroksydacji lipidów, jest także markerem stresu oksydacyjnego komórki.

Białko p53 reguluje cykl komórkowy, umożliwiając naprawę uszkodzonego DNA komórki lub kierując komórkę na drogę śmierci komórkowej.

Celem pracy była:

1. Ocena aktywności i stężenia parametrów układu prooksydacyjno/antyoksydacyjnego w komórkach ludzkiego gruczolaka płuc linii A549 *in vitro* pod wpływem zastosowanych dawek i przedziału czasowego badanych cytostatyków.
2. Ocena stężenia dialdehydu malonowego w komórkach ludzkiego gruczolaka płuc linii A 549 *in vitro* pod wpływem działania cisplatyny i dokсорubicyny.
3. Ocena stężenia białka p53 w komórkach ludzkiego gruczolaka płuc linii A 549 *in vitro* pod wpływem działania cisplatyny i dokсорubicyny.

Materiał i metody: Badanie prowadzono na hodowli komórek gruczolaka płuc linii A549 *in vitro*. Hodowlę komórkową prowadzono na podłożu Dulbecco's z L-glutaminą,

wzbogaconym wołową surowicą płodową (FCS), w temperaturze 37°C, w atmosferze wysyczonej CO₂ do 6%. Komórki poddano oddziaływaniu cisplatyny i doksorubicyny w trzech dawkach w czasie 72 godzin. Oznaczenia biochemiczne wykonywano w supernatantach komórkowych.

Oznaczono aktywność następujących enzymów antyoksydacyjnych:

1. całkowitej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz jej izoenzymów: mitochondrialnego (MnSOD) i cytoplazmatycznego (Cu/ZnSOD) metodą Oyanagui.
2. katalazy (CAT) metodą kinetyczną wg Aebiego.
3. peroksydazy glutationowej (GPX) wg metody Paglia i Valentine'a
4. reduktazy glutationowej (GR) metodą swoistą, wykorzystującą zdolność utleniania NADPH₂
5. transferazy S-glutationowej (GST) metodą wg Habiga

Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) oznaczono metodą fluorymetryczną wg Ohkawy.

Ekspresję genu kodującego białko p53 oznaczono na poziomie transkryptu, jako stosunek liczby jego mRNA do całkowitego mRNA. Analizy dokonano z użyciem reakcji łańcuchowej polimeryzacji (RT-PCR) i elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.

Wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem programu Statistica 6.0.

Wyniki: Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci tabel i rycin.

Wnioski:

1. Pod wpływem zastosowanych dawek i przedziału czasowego zarówno cisplatyna, jak i doksorubicyna naruszają status oksydacyjny w komórkach ludzkiego gruczolaka płuca linii A549 hodowanego in vitro.
2. Pod wpływem cisplatyny dochodzi do zwiększenia nasilenia stresu oksydacyjnego, a pod wpływem doksorubicyny do zmniejszenia nasilenia stresu oksydacyjnego w komórkach ludzkiego gruczolaka płuca linii A549 in vitro.
3. Cisplatyna i doksorubicyna powodują spadek ekspresji białka p53 w komórkach ludzkiego gruczolaka płuca linii A549 in vitro. Im wyższe stężenie cytostatyku w badanej próbce, tym mniejsza ekspresja białka p53.

słowa kluczowe: cisplatyna, doksorubicyna, NSCLC, stres oksydacyjny

SUMMARY

Background: Lung cancer is the most common malignant tumor in men and the third of malignancies in women. Lung cancer is classified according to histological type. Two main types are small-cell lung carcinoma (SCLC) and non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). Treatment depends on staging. Cisplatin (CIS) is a platinum-based drug, known as an alkylating agent. CIS is most commonly used in the treatment of NSCLC. Doxorubicin (DOX) is an anthracycline used as an anticancer drug. DOX interferes with DNA transcription. There are some studies of liposomal doxorubicin in the treatment of lung cancer.

Reactive oxygen species (ROS) are reactive molecules containing oxygen. Mitochondria are the main source of endogenous ROS. Oxidative stress is an imbalance between ROS production and utilization. Markers of oxidative stress are alterations in antioxidant enzyme activity, such as superoxide dismutase (SOD) and isoenzymes: mitochondrial (MnSOD) and cytoplasmic (Cu/ZnSOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST). Malonyl dialdehyde (MDA) is the marker of lipid peroxidation. Tumor protein p53 plays a role in cell cycle regulation and apoptosis.

Aim of study was evaluation of:

1. antioxidant enzyme activity as the parameters of prooxidative/antioxidative system in human A549 lung adenocarcinoma cell line culture *in vitro* exposed to cisplatin and doxorubicin.
2. malonyl dialdehyde level as the lipid peroxidation marker in human A549 lung adenocarcinoma cell line culture *in vitro* exposed to cisplatin and doxorubicin.
3. gene p53 expression in human A549 cell line culture *in vitro*.

Material and methods: Human lung adenocarcinoma, A549 cell line was used. Cells were cultured in Dulbecco's with L-glutamine medium supplemented with FCS. Tests were carried out in standard conditions of temperature and concentration of CO₂ up to 6%. Cells were incubated for 72 hours with cisplatin or doxorubicin (three doses). The parameters were defined in culture media:

1. The superoxide dismutase (SOD) and isoenzymes: mitochondrial (MnSOD) and cytoplasmic (Cu/ZnSOD) activities were assayed using the Oyanagui method.
2. The catalase (CAT) activity was assayed by the method according to Aebi.

3. The glutathione peroxidase (GPX) activity was assayed by the method according to Paglia and Valentine.
4. The glutathione reductase (GR) activity was assayed by the method monitoring oxidation of NADPH₂ according to Richterich method.
5. The S-glutathione transferase (GST) activity was assayed by Habig method.

The malonyl dialdehyde (MDA) level was estimated by fluorometric method according to Ohkawa et al. method.

The p53 expression was analysed as the transcription level of gene coding p53 protein. It is defined as the number of p53 mRNA in total number of extracted mRNA.

Statistical analysis was performed with Statistica 6.0.

Results: presented in tables and diagrams.

Conclusions:

1. Cisplatin and doxorubicin alter the parameters of prooxidative/antioxidative system in human adenocarcinoma A549 cells cultured in vitro.
2. Oxidative stress increased in culture cells exposed to cisplatin and decreased in culture cells exposed to doxorubicin.
3. p53 expression decreases in cells exposed to cisplatin and doxorubicin in human adenocarcinoma cells culture line A549 in vitro.

key words: cisplatin, doxorubicin, NSCLC, oxidative stress