

Received: 2005.12.09
Accepted: 2006.08.30
Published: 2006.10.04

Rodnikowy mechanizm ubocznej toksyczności hydroksymocznika*

Radical mechanism of hydroxyurea side toxicity

Waldemar M. Przybyszewski¹, Janusz Kasperczyk²

¹ Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

² Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny w Sosnowcu Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Streszczenie

Wykazano, że hydroksymocznik (HU) indukuje powstawanie wolnych rodników, które prawdopodobnie są odpowiedzialne za cytotoksyczność w komórkach poddanych jego działaniu. Molekularny mechanizm tej cytotoksyczności pozostaje niedostatecznie wyjaśniony. Uważa się, że mechanizmem działania HU powodującym śmierć komórki w wyniku wzrostu nie zrównoważonego może być: nadmierne wytwarzanie, nieprawidłowa akumulacja i postępujący wyciek licznych enzymów hydrolitycznych przez błonę komórkową, co w konsekwencji prowadzi do „litycznej” śmierci komórki. Działanie ochronne wywierane przez antyoksydanty i zmiatacze rodników wobec ubocznej toksyczności HU nie wpływa na efektywność hamowania syntezy DNA zależnej od reduktazy rybonukleotydowej – głównego mechanizmu przeciwnowotworowej aktywności HU. Obserwacje te potwierdzają hipotezę, że struktury błoniaste pozostają miejscem docelowym dla ubocznej toksyczności hydroksymocznika. Uszkodzenia erytrocytów i granulocytów wydają się mieć ważne znaczenie kliniczne ponieważ zwracają uwagę na elementy morfotyczne krwi, jako jedno z miejsc docelowych ubocznej toksyczności hydroksymocznika generującego wolne rodniki.

Słowa kluczowe:

hydroksymocznik • wolne rodniki • peroksydacja lipidów • wzrost nie zrównoważony • lizosomy • erytrocyty • granulocyty

Summary

It has been shown that hydroxyurea (HU) induces free radicals which exert cytotoxic effects on cells. However, the molecular mechanism of this effect is still obscure. A possible mechanism for HU-mediated cell death induced by unbalanced growth could be the overproduction, altered accumulation, and progressive leakage of many hydrolytic enzymes through the cell membrane, leading to “lytic” cell death. Protection by antioxidants and radicals scavengers does not change the inhibition of DNA synthesis dependent on ribonucleotide reductase, the main mechanism of the antineoplastic activity of HU. These observations support the hypothesis that membranes are targets for the side effects of HU toxicity. Damage of erythrocytes and granulocytes seems to be an important clinical feature of the HU side toxicity generating free radicals.

Key words:

hydroxyurea • free radicals • lipid peroxidation • unbalanced growth • lysosomes • erythrocytes • granulocytes

* Praca finansowana z grantu Fundacji na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny nr II/206/2003.

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9721.pdf

Word count: 4051

Tables: 1

Figures: 6

References: 73

Adres autora: dr Waldemar M. Przybyszewski, Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: wmp@io.gliwice.pl

Wykaz skrótów: **ADB** – adriblastyna; **Cytosar** – arabinozyd cytozyny; **dCR** – deoksycytydina; **dNR** – deoksynukleotydy; **dThR** – tymidyna; **HU** – hydroksymocznik; **MDA** – dialdehyd malonowy; **MetHb** – methemoglobina; **NADH** – zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy; **NBT** – błękit nitrotetrazoliowy; **TBA** – kwas tiobarbiturowy; **TBA-RS** – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym; **glukozaminidaza** – beta-N-acetyloglukozaminidaza EC 3.2.1.30; **DNaza II** – 3'-nukleotydohydrolaza deoksyrybonukleinianu EC 3.1.4.6, katalaza EC 1.11.1.6, kwaśna fosfataza EC 3.1.3.2; **LDH** – dehydrogenaza mleczanowa EC 1.1.2.3, peroksydaza EC 1.11.1.7; **reduktaza rybonukleotydowa** – reduktaza difosforanów rybonukleotydów EC 1.17.4.1; **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa EC 1.15.1.1.

Reakcje wolnorodnikowe, jak się uważa, powodują wiele uszkodzeń komórki, wśród nich bardzo destrukcyjne procesy peroksydacji lipidów błon plazmatycznych [42]. Znaczna liczba leków działa toksycznie wywołując stres oksydacyjny i reakcje rodnikowe. Spośród leków przeciwnowotworowych, antybiotyki antracyklinowe zawierające w swojej strukturze chemicznej pierścień chinonowy są znane z tego, że powodują cytotoxyczność na skutek generowania wolnych rodników, a ich dodatkowa toksyczność *in vivo* jest wynikiem zdolności do wywoływania uszkodzeń peroksydacyjnych [35]. Sygnalizowane są również pewne nieswoiste, prawdopodobnie peroksydacyjne, toksyczne skutki terapii lekami przeciwnowotworowymi o strukturze chemicznej innej aniżeli antracykliny, w tym także hydroksymocznik [5,11,12].

Zapobieganie ubocznej toksyczności leków przeciwnowotworowych przez stosowanie antyoksydantów i zmiataaczy rodników staje się ważnym zagadnieniem o charakterze klinicznym [11,12]. Takie próby ochrony przed peroksydacją lipidów indukowaną działaniem adriamycyny (doksorubicyna) podejmowano, z pozytywnym skutkiem u zwierząt z guzem nowotworowym nie obniżając przy tym indeksu terapeutycznego tego leku [56,57].

Uważa się, że zastosowanie antyoksydantów w trakcie chemioterapii nowotworów zwiększa efektywność działania cytostatyków przez obniżenie stężenia aldehydowych produktów peroksydacji, które indukują stres oksydacyjny. Produkty te wpływają hamująco, m.in. na aktywność kaspaz i proces apoptozy [10,12].

W pracy skoncentrowano się na wolnorodnikowym mechanizmie ubocznej cytotoxyczności hydroksymocznika, antymetabolitu stosowanego od wielu lat w terapii niektórych przypadków guzów litych oraz w chorobach mieloproliferacyjnych.

MECHANIZM DZIAŁANIA HYDROKSYMOCZNIKA

Hydroksymocznik (hydroxycarbamide, hydrea, hydroxyurea – HU) jest znanym lekiem przeciwnowotworowym

stosowanym w chemioterapii klinicznej [7,8,38,39,48,69] oraz odwracalnie działającym inhibitorem syntezy DNA w synchronizacji wzrostu komórek zarówno *in vitro* [27], jak i *in vivo* [23]. Podstawowym mechanizmem działania HU jest zahamowanie aktywności kompleksu enzymatycznego reduktazy rybonukleotydowej przez destrukcję wolnego rodnika tyrozyłowego w katalitycznej podjednostce enzymu [41]. Inaktywacja enzymu powoduje zahamowanie syntezy DNA w wyniku niedostatecznej podaży deoksyrybonukleotydów (dNR) [45,58,72].

Hydroksymocznik jest przedstawicielem grupy związków określanych mianem alifatycznych kwasów hydroksamowych o prostej budowie, ale o dużej aktywności chemicznej. Reszta hydroksamowa –CO-NHOH- cząsteczki HU chelatuje jony metali dwuwartościowych ze szczególnie silnym powinowactwem do jonów żelaza i miedzi. Reszta hydroksylaminowa =N-OH może podlegać jedno- lub dwuelektrowej reakcji utleniania z wytworzeniem rodników nitroksylowych, rodników pośrednich OH, NH₂O, OHN-HOO, tlenku azotu oraz nadtlenu wodoru [22,45,58].

Wyniki badań własnych [46] wykazały, że w układzie bezkomórkowym hydroksyloamina redukuje NBT w obecności NADH w stężeniach bliskich stężeniom stosowanym w doświadczeniach HU. Reakcja ta jest hamowana przez SOD.

Obserwowany we krwi pacjentów leczonych HU, wzrost stężenia metabolitów tlenku azotu oraz kwasu hydroksamowego dostarcza pośredniego dowodu *in vivo* na powstawanie hydroksyloaminy z HU [22].

Badania *in vivo* wykazały, że wynikiem metabolizmu HU podanego szczurom drogą pokarmową w dawce równoważnej dawce terapeutycznej jest tlenek azotu [21]. Tlenek azotu okazał się naturalnym inhibitorem aktywności enzymatycznej reduktazy rybonukleotydowej w komórkach. Jego wpływ na komórkową pulę dNR jest podobny do wpływu inhibitorów tego enzymu stosowanych w chemiotera-

pii nowotworów [52]. Wykazano jednak, że może on również chronić DNA komórek gruczolakoraka Ehrlicha *in vitro* przed toksycznością doksorubicyny (adriamycyny). Dostarczenie bowiem substancji generujących tlenek azotu powodowało wzrost syntezy DNA i w znaczącym stopniu zapobiegało śmierci apoptotycznej tych komórek indukowanej przez doksorubicynę [26].

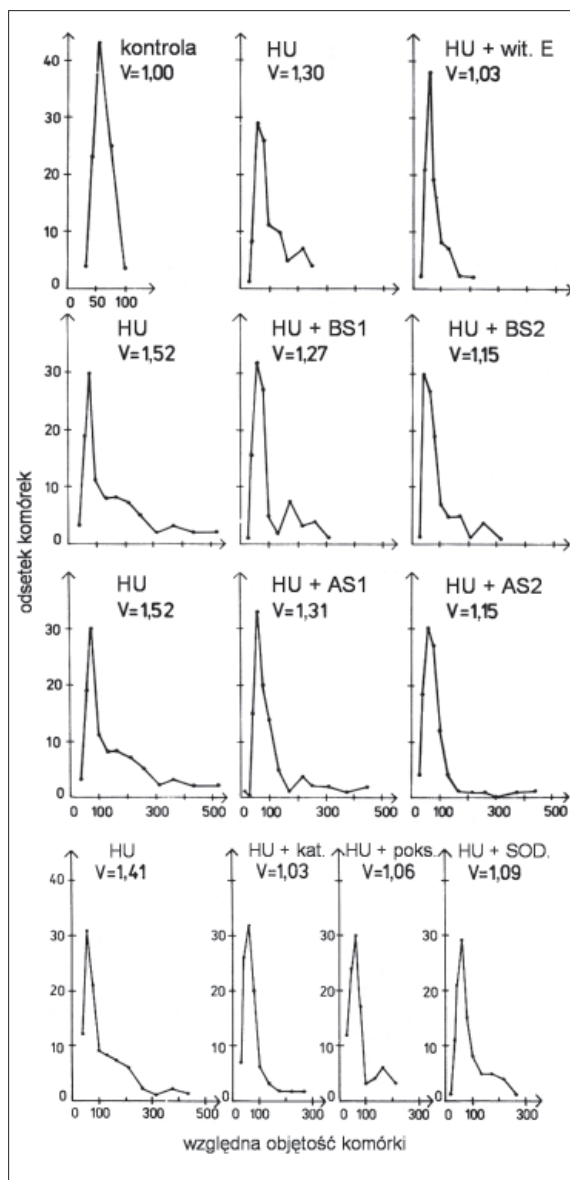
Inkubacja DNA z HU w obecności jonów miedzi indukuje pojawienie się 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG), która pośrednio stanowi wskaźnik stresu oksydacyjnego. Wzrostowi stężenia HU w mieszaninie inkubacyjnej towarzyszy wzrost poziomu 8-OHdG. Wzbogacenie badanego układu o NADH stymuluje wzrost oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Dlatego też dwuwartościowe jony metali mogą pośredniczyć w oksydacyjnym uszkodzeniu DNA przez HU oraz warunkować mutagenne i kancerogenne właściwości tego leku w trakcie długo trwającej terapii [54], choć są one niewielkie [17].

Wprawdzie uważa się, że pierwotnym mechanizmem cytotoksyczności HU jest zahamowanie enzymatycznej aktywności reduktazy rybonukleotydowej, to rozważa się istnienie dodatkowego mechanizmu jego cytotoksycznego działania [37,45]. Rozważania te są oparte o hipotezę DeSesso [13] sformułowaną celem wyjaśnienia teratogenego działania tego leku oraz szybkiej śmierci komórek. Hipoteza ta sugeruje również, że mechanizm ubocznej toksyczności HU jest wynikiem reakcji wolnorodnikowych. Jeżeli przyjąć możliwość ochrony komórek przed uboczną toksycznością HU przez jednocześnie dostarczenie antyoksydantów lub zmiataaczy rodników, to nasuwa się pytanie, czy podawanie takich związków nie zakłóci swobodnego działania leku, który powinien zniszczyć komórkę docelową poprzez zależną od aktywności enzymu reduktazy rybonukleotydowej blokadę syntezy DNA.

Ekspozycja komórek proliferujących na różne czynniki chemioterapeutyczne interferujące z syntezą DNA powoduje wzrost niezrównoważony (unbalanced growth), któremu towarzyszy nieprawidłowy wzrost objętości komórki. Hipoteza wyjaśniająca wzrost masy komórki stanowi, że komórki są pobudzane przez działanie tych czynników do osiągnięcia stanu abortywnego pseudocyklu komórkowego. Cykl ten charakteryzuje się nieproporcjonalną syntezą białek, RNA i prawdopodobnie innych makromolekuł przy braku innych etapów przygotowujących podział komórki [49,50].

Pytanie, w jaki sposób niezrównoważony wzrost jest zaangażowany w śmierć komórki pozostaje bez odpowiedzi.

Badania wykazały, że tylko zahamowanie syntezy DNA prowadzi do śmierci komórki, natomiast zahamowanie syntezy DNA z jednoczesnym zahamowaniem syntezy białka nie wywołuje tego procesu [28,51,67]. Dlatego też synteza białek jest ważna. Niektóre enzymy zaangażowane w metabolizm DNA mogą być indukowane poprzez inhibitory syntezy DNA, takie jak np. kinaza tymidylanowa [24,61], deaminaza deoksycytidynomonofosforanu (dCMP) [24], reduktaza dihydrofolianowa [14] oraz kwaśna i zasadowa deoksyrybonukleaza [62]. W związku z tym zasugerowano, że niezrównoważony wzrost indukujący śmierć komórki może być bezpośrednią konsekwencją biochemicznych zmian właściwych metabolizmowi DNA [28].



Ryc.1. Porównanie rozkładu objętości komórek L5178Y i średniej objętości komórki (V) poddanych 3-godzinnej inkubacji z 1 mM HU lub 1 mM HU + związek ochronny, uzupełnionej 24-godzinnej inkubacją w pożywce bez HU i związku ochronnego; wit. E 0,060 mM, BS1-benzoosan sodu 4 mM, BS2-benzoosan sodu 5 mM, AS1-kwas acetylosalicylowy 0,05 mM, AS2-kwas acetylosalicylowy 0,15 mM, Kat – katalaza 14 ug/ml, Poks – peroksydaza 10 ug/ml, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa 5 ug/ml. Każdy punkt pomiaru jest średnią z czterech próbek doświadczalnych uzyskanych w dwóch niezależnych doświadczeniach [47]

Wyniki badań własnych nad zależnym od dawki i czasu działaniem HU na komórki limfoblastów L5178Y białaczki mysiej wykazały, że w warunkach hodowli prowadzących do wzrostu niezrównoważonego, wzrasta procent komórek nieprawidłowo powiększonych, wypełnionych lizosomami co wykazało przyżyciowe barwienie euchryzyną. Wysłunęto wniosek, że wzrost niezrównoważony indukujący śmierć komórki może być konsekwencją postępującego nadmiernego wytwarzania, nieprawidłowego groma-

dzenia i wycieku licznych enzymów lizosomalnych oraz litycznych uszkodzeń komórki [30].

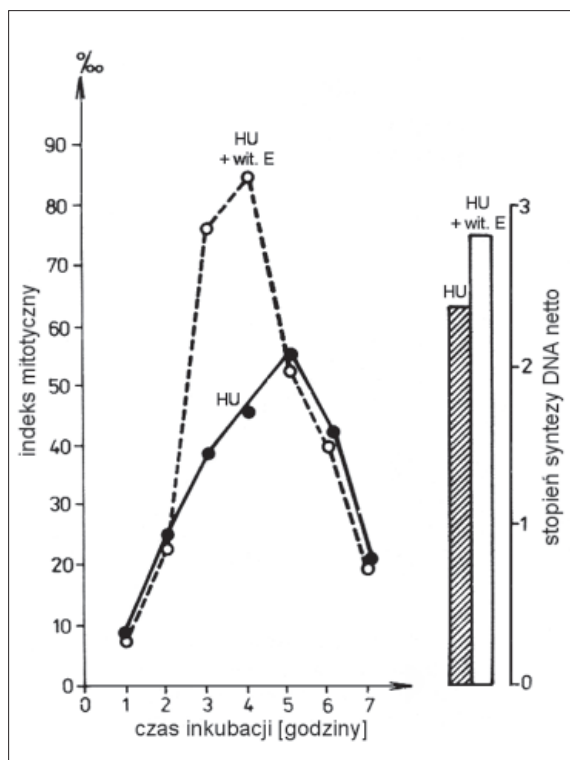
TOKSYCZNOŚĆ HU WOBEC KOMÓREK PROLIFERUJĄCYCH

Wyniki badań własnych [47] wykazały, że inkubacja limfoblastów L5178Y w hodowli z 1 mM HU przez trzy godziny uzupełniona 24-godziną inkubacją tych komórek w pożywce bez HU powodowała nieprawidłowy wzrost objętości u około 40% komórek całej populacji oraz postinkubacyjną redukcję syntezy DNA w porównaniu z hodowlą komórek bez HU (ryc. 1). Wykorzystano to do określenia stopnia ochrony komórek przez zastosowanie antyoksydantów: witaminy E, witaminy C, katalazy, peroksydazy, dysmutazy ponadtlenukowej i zmiataczy rodników: benzoenu sodu, kwasu acetylosalicylowego. Obserwowana ochrona komórek poddanych działaniu HU przed nieprawidłowym wzrostem objętości i redukcją syntezy DNA sugerowała, że szybkie cytotoksyczne efekty HU łącznie z uszkodzeniem DNA są spowodowane przez mechanizm niezwiązany z zahamowaniem aktywności reduktazy rybonukleotydowej.

Na potwierdzenie tej tezy wykorzystano test Paintera [40] do wykrywania czynników, które uszkadzają DNA. Wyniki badań wykazały, że zahamowanie syntezy DNA przez HU nie zmienia się przez obecność witaminy E czy katalazy, natomiast okres postinkubacyjnego powrotu syntezy DNA był różny w komórkach inkubowanych tylko z HU lub HU + związek ochronny. Różnica ta oznaczała rozróżnienie między działaniem czynników, które uszkadzają DNA i czynników, które hamują syntezę, ale nie uszkadzają DNA. Obserwowana ochrona przez antyoksydanty i zmiatacze rodników potwierdzała hipotezę o udziale wolnych rodników w działaniach cytotoksycznych HU.

Powstaje pytanie, jaki jest molekularny mechanizm toksycznego działania HU w komórce.

Wolne rodniki są znanymi czynnikami uszkadzającymi DNA, które działają podobnie jak promieniowanie jonizujące [34]. Jednak reakcje rodnikowe mogą inicjować peroksydację lipidów w błonach komórkowych [1,42]. Stopień peroksydacji lipidów w komórkach poddanych trzygodzinnej inkubacji z HU w obecności lub przy braku związków ochronnych nie wykazał jednak różnic. Celem porównania efektywności indukowania śmierci komórek przez HU w obecności witaminy E, komórki L5178Y znajdujące się w logarytmicznej fazie wzrostu inkubowano 48 godzin z 0,2 mM HU i witaminą E lub bez witaminy E [44]. Zastosowano stężenie HU 0,2 mM ponieważ znajduje się ono w zakresie stężeń rekomendowanych w chemioterapii klinicznej [4]. Zahamowanie syntezy DNA jest jednym z pierwszych następstw działania HU, dlatego też porównano inkorporację ³H-tymidyny w DNA w ciągu pierwszych 60 minut inkubacji z HU. Wykazano, że inkubacja komórek zarówno z HU, jak i HU + witamina E powodowała obniżenie inkorporacji znakowanej tymidyny o prawie 20% w porównaniu z komórkami z hodowli kontrolnej. Podobny brak różnicy między komórkami inkubowanymi tylko z HU lub HU + witamina E pojawił się w zahamowaniu syntezy DNA netto w czasie 48-godzinnej inkubacji. Zaobserwowano natomiast różnice w przeżywalności komórek, ponieważ w hodowli bez witaminy E śmiertelność komórek wyniosła około 20% po 24 godzinach in-



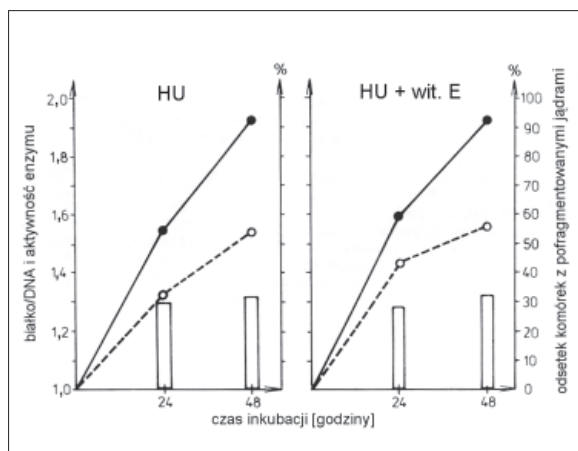
Ryc. 2. Porównanie szybkości proliferacji i syntezy DNA netto w komórkach L5178Y inkubowanych 24 godziny z 0,2 mM HU i HU+wit. E po ich przeniesieniu do medium bez HU i wit. E.; inkubacja z HU —, inkubacja z HU+wit. E ---. Każda wartość jest średnią z czterech próbek doświadczalnych uzyskanych w dwóch niezależnych doświadczeniach [44]

kubacji z HU, zaś w hodowli z HU + witamina E wszystkie komórki pozostawały żywe. Po 48 godzinach inkubacji śmiertelność komórek wyniosła około 80% zarówno w hodowli z HU, jak i hodowli z HU + witamina E. Ochronny wpływ witaminy E w czasie 24 godzin ujawnił się wzrostem ilości mitoz oraz wzrostem zawartości DNA w komórkach inkubowanych z HU + witamina E w porównaniu z komórkami inkubowanymi tylko z HU po ich przeniesieniu do medium bez HU (ryc. 2).

Stosunkowo wczesna ochrona komórek nie zmieniła tempa niezrównoważonego wzrostu, co oceniono przez pomiar stosunku DNA/białko oraz aktywność kwaśnej fosfatazy (ryc. 3). Dodatkowo, oceniano fragmentację jądra komórkowego, która stanowi nieswoisty, prenekrotyczny etap uszkodzenia komórki przez promieniowanie jonizujące [25].

Inkubacja komórek proliferujących z odpowiednim stężeniem HU powodowała nie tylko zahamowanie syntezy DNA, lecz także szybką śmierć w fazie S cyklu komórkowego [65].

W celu wyjaśnienia mechanizmu tak selektywnej, szybkiej śmierci komórki, która przecież jest trudna do wytłumaczenia blokowaniem syntezy DNA przez zahamowanie aktywności enzymu reduktazy rybonukleotydowej, DeSesso [13] hipotetycznie założył, że HU ma takie szybkie działania cytotoksyczne na skutek reakcji rodnikowych.



Ryc. 3. Porównanie stosunku DNA/białko, aktywności kwasnej fosfatazy i fragmentacji jądra w komórkach inkubowanych z HU lub HU + wit. E. Stosunek DNA/białko —, aktywność kwasnej fosfatazy (jednostki/ug białka) ---. Wartości wyrażono w liczbach względnych w stosunku do kontroli przyjętej za 1. Słupki obrazują zawartość procentową komórek z pofragmentowanym jądrem komórkowym. Każdy punkt przedstawia średnią z czterech próbek doświadczalnych uzyskanych w dwóch niezależnych doświadczeniach [44]

Jeżeli rodnikowa hipoteza działania HU jest słuszna, to nie-swoista toksyczność tego leku może uszkadzać zarówno komórki docelowe, jak i niedocelowe, a można jej przeciwdziałać przez zastosowanie antyoksydantów i zmiataaczy rodników.

Na mechanizm działania HU powodujący śmierć komórki mogłyby składać się dwa niezależne procesy:

- wczesny – szybkie rodnikowe uszkodzenie komórki, oraz
- późny – będący konsekwencją wydłużonego zahamowania syntezy DNA poprzez zanik aktywności reduktazy rybonukleotydowej z towarzyszącym temu zjawisku pogłębiającym się w czasie wzrostem nie zrównoważonym.

Wydaje się, że wzajemne proporcje między tymi dwoma procesami mogą być zmienne w różnym czasie trwania inkubacji z HU. Im dłuższy czas inkubacji z HU tym więcej komórek jest uśmiercanych w konsekwencji nie zrównoważonego wzrostu powodującego uszkodzenie komórki.

Ochronne działanie antyoksydantów i zmiataaczy rodników może być efektywne tylko na wczesnym etapie inkubacji z HU, gdy zahamowana aktywność enzymu reduktazy rybonukleotydowej pośredniczącej w zahamowaniu syntezy DNA jest w pełni odwracalna. Z postępującym wzrostem nie zrównoważonym, gdy rozwinęły się już destrukcyjne konsekwencje tego stanu, ochronne działanie antyoksydantów i zmiataaczy rodników nie może być efektywne, ponieważ uszkodzenie letalne prawdopodobnie wynika z innego mechanizmu aniżeli wolnorodnikowy.

Jeżeli założymy, że fundamentalnym działaniem cytotoksycznym HU *in vivo* jest zależne od enzymu reduktazy rybonukleotydowej zahamowanie syntezy DNA prowadzące poprzez stan wzrostu nie zrównoważonego do śmierci ko-

mórki, to można oczekiwać, że ewentualna ochrona komórek witaminą E przed rodnikową toksycznością HU może zapobiegać działaniom niepożądanym bez naruszania indeksu terapeutycznego tego leku.

Podobna sugestia znalazła swoje potwierdzenie we wstępnych próbach klinicznych z dostarczaniem witaminy E i witaminy C pacjentom leczonym zestawem cytostatyków: HU-cytosar-rubidomycyna. Wyniki tych prób wykazały, że stosowanie witamin przed i jednocześnie z tymi lekami chemioterapeutycznymi może być zastosowane w czasie różnych cykli leczenia przeciwbiałaczkowego bez wpływu na ich indeks terapeutyczny [31].

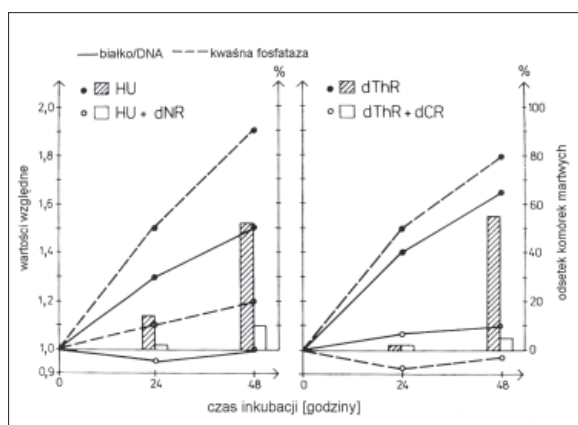
Ostateczna ocena ewentualnych działań ochronnych tych antyoksydantów wymaga jeszcze wielu kontrolowanych prób klinicznych, ponieważ obserwuje się duże różnice w indywidualnej odpowiedzi na uboczną toksyczność, które mogą odzwierciedlać różny stopień wydolności ustrojowej obrony antyoksydacyjnej organizmu pacjenta i efektywności naprawy uszkodzeń oksydacyjnych.

WZROST NIEZRÓWNOWAŻONY

W badaniach własnych nad zahamowaniem reprodukcji limfoblastów L5178Y z towarzyszącym temu wzrostem nie zrównoważonym zastosowano dwa inhibitory syntezy DNA: 0,2 mM HU oraz 5 mM tymidynę (dThR). Związki te są znane jako czynniki powodujące wzrost objętości komórek [50].

Inkubacja limfoblastów z HU lub dThR powodowała wydajne zahamowanie proliferacji ze znaczącym efektem letalnym po 48 godzinach. Podobny stopień zahamowania proliferacji nastąpił w wyniku jednoczesnej inkubacji komórek z HU i nadmiarem czterech dNR, ale śmiertelność komórek była znacząco zredukowana. Dodanie 1 μ M dCR do hodowli komórek z dThR częściowo redukowało zarówno zahamowanie wzrostu, jak i śmiertelność. Przyżyciowe barwienie lizosomów euchryzyną w hodowlach tylko z HU lub tylko z dThR wykazało postępujący wzrost liczby powiększonych komórek wypełnionych licznymi lizosomami, często nieprawidłowo dużymi. Podobnych komórek nie stwierdzano w hodowlach bez inhibitora a tylko sporadycznie pojawiały się one w hodowlach komórkowych inkubowanych z HU + dNR lub dThR + dCR. Porównanie stosunku między białkiem i zawartością DNA w komórkach, aktywnością kwasnej fosfatazy i przeżyciem komórek wykazało, że postępujący brak równowagi białko/DNA w komórkach inkubowanych z HU lub dThR jest skorelowany z postępującym wzrostem aktywności enzymu lizosomalnego i wysoką śmiertelnością (ryc. 4).

W komórkach inkubowanych z HU + dNR, aktywność enzymu była znacząco mała a przeżycie komórek znacznie lepsze, to synteza DNA i białka w tych komórkach była zahamowana w równym stopniu. Bliskie wartościom kontrolnym były również te trzy parametry obserwowane w komórkach poddanych działaniu dThR indukującemu działanie hamujące któremu przeciwdziałał dCR. Podobne relacje zaobserwowano między: objętością komórki, stężeniem białka na komórkę i aktywnością kwasnej fosfatazy na komórkę po 18 godzinach inkubacji. Po tym czasie komórki pozostawały wciąż żywe. Jednoczesne oznacze-



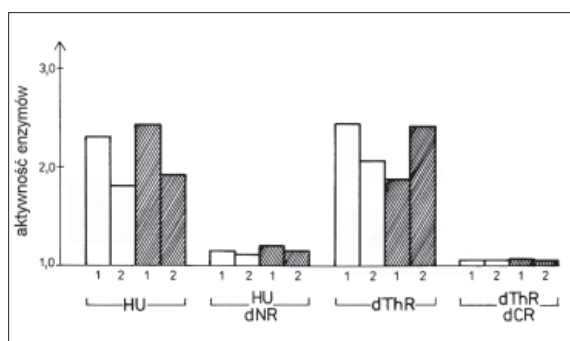
Ryc. 4. Relacje między nie zrównoważonym wzrostem (białko/DNA) —, aktywnością kwasnej fosfatazy (jednostki/mg białka) --- a przeżyciem komórek — słupki. Wykres po lewej: stosunek białko/DNA i aktywność kwasnej fosfatazy wyrażone w liczbach względnych w stosunku do kontroli przyjętej za 1. Każdy punkt pomiaru jest średnią z trzech próbek doświadczalnych uzyskanych w dwóch niezależnych doświadczeniach [30]

nie aktywności kwasnej fosfatazy i dehydrogenazy mleczanowej w komórkach i medium po 18 godzinach inkubacji wykazało, że stan wzrostu nie zrównoważonego korelował ze wzrostem aktywności hydrolaz nie tylko lizosomalnych, ale również i nielizosomalnych zarówno w komórkach, jak i w medium (ryc. 5).

Jednakże stosunek aktywności kwasnej fosfatazy i aktywności dehydrogenazy mleczanowej w medium komórek inkubowanych z dThR był odwrócony w stosunku do poziomu aktywności tych enzymów w medium komórek inkubowanych z HU. Zniesienie nierównowagi białko/DNA w komórkach inkubowanych z HU + dNR lub dThR + dCR powodowało normalizację aktywności obu hydrolaz zarówno w komórkach, jak i w medium.

Aktywność enzymów mierzona w medium w stanie wzrostu nie zrównoważonego komórek wskazywała, że stan ten wpływa na zmianę przepuszczalności błon komórkowych. Dlatego też zbadano przepuszczalność błon lizosomalnych w warunkach izo- i hipoosmotycznych przez oznaczenie aktywności glukozaminidazy. Zaobserwowano, że w komórkach inkubowanych z HU lub dThR, znajdujących się w stanie wzrostu nie zrównoważonego, podwyższona aktywność całkowita enzymu koreluje z podwyższoną aktywnością wolnego pozalizosomalnego enzymu zarówno w roztworach izo- jak i hipoosmotycznych. Relatywne proporcje enzymu uwolnionego z lizosomów były zbliżone we wszystkich rodzajach hodowli komórkowych poddanych doświadczeniu. Należy dodać, że wzrost całkowitej aktywności glukozaminidazy w komórkach znajdujących się w stanie wzrostu nie zrównoważonego był znacznie mniejszy w porównaniu z aktywnością kwasnej fosfatazy czy dehydrogenazy mleczanowej [30].

Wyniki te są zgodne z wynikami otrzymanymi przez innych autorów wskazujących, że stopień zmian w aktywnościach enzymów lizosomalnych zależy nie tylko od warunków hodowli komórek, ale i od rodzaju enzymu [53]. Postępująca synteza białka jest krytycznym momentem w stanie wzrostu

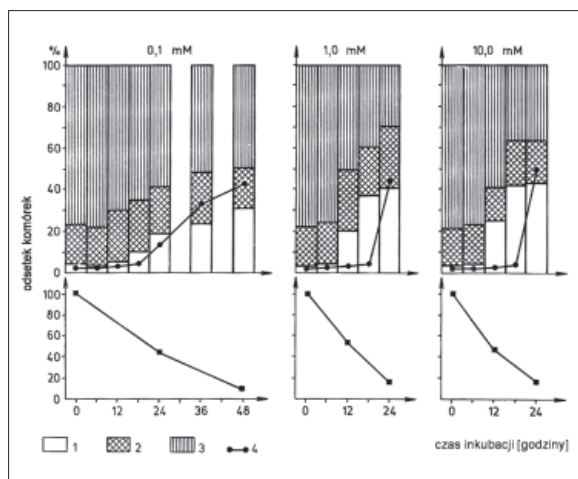


Ryc. 5. Aktywność kwasnej fosfatazy i LDH w komórkach (puste słupki) i w medium (słupki pełne) po 18 godzinach inkubacji z zaznaczonym na wykresie inhibitorem syntezy DNA. Kwasna fosfataza (1), LDH (2) aktywność enzymów oznaczona w jednostkach/106 komórek i wyrażona w liczbach względnych w stosunku do kontroli przyjętej za 1 [30]

nie zrównoważonego odpowiedzialnego za śmierć komórki. Jakkolwiek natura nowo powstałego białka lub białek odpowiedzialna za śmierć komórki jest nieznana. Jak sugeruje Lieberman i wsp. [28] proces ten może odpowiadać indukcji enzymu lub enzymów najprawdopodobniej związanych z metabolizmem DNA. Obserwowano, że brak równowagi białko/DNA oraz nieprawidłowy wzrost objętości komórki był skorelowany ze wzrostem aktywności DNazy II i w komórkach, i w medium prowadząc do postępującego uszkodzenia DNA [55]. Hipotetycznie, wyciek enzymów lizosomalnych do cytoplazmy może spowodować nie tylko uwolnienie cytochromu c przez uszkodzenie mitochondriów, ale również wzrost generowania aktywnych form tlenu powodujących dalszą fragmentację lizosomów oraz zapoczątkowanie procesu apoptozy [73].

Badania limfocytów uzyskanych od chorych na przewlekłą białaczkę szpikową, inkubowanych z cytostatykami w tym i hydroksymocznikiem wykazały nasilenie apoptozy oraz fragmentację DNA [3]. Podobne wyniki badań otrzymano inkubując komórki ludzkiej białaczki erytroblastycznej (erythroblastosis acuta essentialis) z hydroksymocznikiem [16]. Jednakże, komórki B limfoblastycznej linii transformowanej wirusem Epsteina-Barr inkubowane z HU nie wykazywały fragmentacji DNA ani aktywacji kaspaz. Obserwowano natomiast wzrost ekspresji białka Bcl-2 przeciwdziałającego apoptozie oraz genu supresorowego p53 [19].

Z kolei wyniki badań własnych [30] wykazały, że zahamowanie syntezy DNA prowadzące do śmierci komórki poprzez wzrost nie zrównoważony jest związane z postępującym wzrostem aktywności cytoplazmatycznych i lizosomalnych enzymów hydrolitycznych. Podobny stopień zahamowania syntezy DNA z jednoczesnym zahamowaniem syntezy białka nie był związany ze wzrostem aktywności tych enzymów, a przeżywalność komórek była znacząco lepsza. Dlatego też śmierć komórki może odzwierciedlać nadmierne wytwarzanie i nieprawidłowe gromadzenie licznych hydrolaz. Gromadzenie się hydrolaz wewnątrz komórki jest powiązane ze wzrostem ich aktywności w medium pozakomórkowym. Znaczący wzrost obserwowano w czasie, gdy komórki pozostawały ciągle żywe. Wydaje się prawdopodobne, że „wejście” komórki w stan wzrostu



Ryc. 6. Wpływ różnych stężeń HU na barwność lizosomów, przeżywalność komórek i proliferację. Komórki inkubowano w obecności stężeń 0,1, 1,0 i 10,0 mM HU; 1 – komórki o typie lizosomalnym 0 (komórki bez wykrywalnych lizosomów), 2 – komórki o typie lizosomalnym 1, 3 – komórki o typie lizosomalnym 2, 4 – komórki barwiące się błękitem trypanu. Każda wartość jest średnią z czterech próbek doświadczalnych uzyskanych w dwóch niezależnych doświadczeniach [15]

niezrównoważonego jest połączone z zaburzeniem przepuszczalności błon komórkowych. Jednak badacze donoszą o zmianach aktywności enzymów lizosomalnych zależnych od warunków wzrostu komórek; wyższy wzrost zachodził wtedy, gdy proliferację zahamowano przez napromienienie lub wyznakowanie trytem [53]. Zahamowanie czy opóźnienie podziału komórki, jak się sugeruje, jest pierwotną przyczyną pobudzenia aktywności enzymów lizosomalnych, aczkolwiek powód takiego wzrostu aktywności enzymów jest niepewny. Hydrolazy lizosomalne są odpowiedzialne za degradację molekuł internalizowanych przez komórkę oraz autofagię w warunkach stresu [36]. Wzrost autofagii komórkowej wydaje się niezbędnym celem skompensowania ograniczonej podaży małych molekuł z medium w chwili nadmiernego zagęszczenia hodowli [38].

LIZOSOMY JAKO DOCELOWA STRUKTURA WEWNĄTRKOMÓRKOWA TOKSYCZNOŚCI RODNIKOWEJ HU

W hodowlach komórkowych poddanych długotrwałej inkubacji z HU obserwuje się stopniowy, zależny od czasu, wzrost proporcji komórek bez wykrywalnych lizosomów [15]. W celu identyfikacji lizosomów zastosowano technikę fluorescencji [6]. Technika ta jest oparta o przyżyciowe barwienie błon lizosomalnych euchryzyną, co ma również zastosowanie do oceny ich właściwości fizykochemicznych. Wykorzystanie tej techniki zostało oparte na dwóch założeniach:

- reakcje rodnikowe są generowane w komórkach z HU,
- lizosomy są wrażliwe na substancje, które zarówno katalizują/hamują reakcje rodnikowe, jak również promują lub opóźniają utlenienie nienasyconych lipidów [64].

Inkubacja komórek z różnymi stężeniami HU: 0,1 mM, 1 mM, 10 mM wykazała postępujący wzrost liczby komórek bez wykrywalnych euchryzyną lizosomów. Było to poprzedzone śmiercią komórek, zwłaszcza w hodowlach

poddanych dużemu stężeniu HU (ryc. 6), ocenianą po wybarwieniu błękitem trypanu.

Sugerowało to zmianę postaci komórek bogatych w lizosomy w postać komórek o niewykrywalnych lizosomach jako wcześniejsze ujawnienie uszkodzenia przez HU w porównaniu do barwności błękitem trypanu. Takie uszkodzenie lizosomów może stanowić prosty i stosunkowo wczesny marker ubocznej rodnikowej toksyczności HU. Wszystkie rodzaje zastosowanych związków ochronnych, tj. witamina E, kwas acetylosalicylowy, benzoetan sodu, witamina C modyfikowały działanie HU w stosunku do lizosomów obserwowane dzięki barwieniu lizosomów euchryzyną. Właściwie dobrane stężenie każdego z nich powodowało częściową ochronę komórek przed toksycznością HU, ocenianą na podstawie barwienia przyżyciowego błękitem trypanu.

W przeciwieństwie do promieniowania jonizującego lub innych czynników generujących wolne rodniki, które labilizują lizosomy, HU cechuje tendencja do stabilizowania tych struktur [43]. Zgodnie z hipotezą, że HU wywiera uboczną toksyczność poprzez interferencję z reakcjami rodnikowymi taki efekt był nieoczekiwany, jakkolwiek wyniki doświadczeń na erytrocytach poddanych działaniu HU wykazały zmianę oporności osmotycznej, która różniła się w zależności od warunków inkubacji i wydawała się zależna od temperatury [29].

Badania wpływu promieniowania jonizującego indukującego uwolnienie enzymów z lizosomów wykazały zależność uszkodzenia od rodzaju medium w którym inkubowano lizosomy, temperatury inkubacji i warunków preparatyki [70]. Dlatego też należy wziąć pod uwagę, że różne egzogenne, jak i endogenne czynniki oddziałujące na lizosomy w trakcie inkubacji z HU, czy też w trakcie preparatyki mogą determinować charakter odpowiedzi błony lizosomalnej. Ochrona przed działaniem HU – powodującego stabilizację błony – uzyskana przez zastosowanie katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej wydaje się potwierdzać ideę o rodnikowym mechanizmie działania HU. Należy dodać, że wydajność preparatyki frakcji lizosomów z komórek inkubowanych i nieinkubowanych z HU była podobna. Obserwowane zmiany we wrażliwości błon lizosomalnych nie były związane ze zmianą latencji enzymu kwaśnej fosfatazy, a rozkład jej aktywności między wolną, latentną dostępną w wodzie oraz latentną pozostałą nie różnił się w komórkach inkubowanych trzy godziny z HU i bez HU. Nie obserwowano zmian w aktywności kwaśnej fosfatazy i glukozaminidazy w trakcie inkubacji z HU oraz w medium inkubacyjnym [43].

TOKSYCZNOŚĆ HU WOBEC KOMÓREK NIEPROLIFERUJĄCYCH

Wolne rodniki powstające w wyniku działania promieniowania jonizującego oraz innych czynników stresowych są wyjątkowo szkodliwe dla systemu błon komórkowych [1]. Dlatego też jest sprawą ważną określenie działania toksycznego HU, zwłaszcza w odniesieniu do błon komórkowych nie tylko w komórkach proliferujących docelowych dla HU, lecz także nieproliferujących.

Użytecznym modelem badawczym w badaniach toksyczności różnych leków, wśród nich również leków przeciw-

Tabela 1. Hemoliza osmotyczna erytrocytów człowieka, inkubowanych w izotonicznym roztworze soli fizjologicznej, z H_2O_2 , HU i HU + związek ochronny, uzupełniona godziną inkubacją w hipotonicznym roztworze soli (60 mM NaCl) w 37°C; przedstawione wartości stanowią średnią pomiarów u trzech dawców. Każdy pomiar powtórzony dwukrotnie [29]

Stężenie HU [mM]	Czas inkubacji z HU [godz.]	Temperatura inkubacji [°C]	Związek ochronny	Hemoliza (kontrola = $1,0 \pm SD$)
1	1	37	–	$1,36 \pm 0,10$
1	24	37	–	$1,76 \pm 0,24$
1	24	4	–	$0,77 \pm 0,04$
10	1	37	–	$1,49 \pm 0,05$
10	24	4	–	$0,71 \pm 0,08$
10	1	37	–	$1,65 \pm 0,04$
10	1	37	witamina E (60 µg/ml)	$1,20 \pm 0,10$
10	1	37	witamina E (90 µg/ml)	$1,80 \pm 0,14$
10	1	37	benzoesan sodu (2 mM)	$1,70 \pm 0,08$
10	1	37	benzoesan sodu (3 mM)	$1,74 \pm 0,02$
Stężenie nadtlenu wodoru [mM]				
10	1	37	–	$1,56 \pm 0,18$

nowotworowych, mogą być erytrocyty człowieka. Uważa się, że zmiany w oporności osmotycznej są przejawem zmian właściwości fizyko-chemicznych błony komórkowej erytrocytu [2].

Porównano stopień hemolizy osmotycznej erytrocytów inkubowanych z HU i bez HU (tab. 1) [29].

Inkubacja komórek z HU powodowała znaczącą zmianę oporności osmotycznej, jakkolwiek charakter tych zmian różnił się w zależności od warunków inkubacji. Nadtlenek wodoru powodował podobne zmiany. Dodanie witaminy E do mieszaniny inkubacyjnej powodowało częściową ochronę erytrocytów przed uszkodzeniami indukowanymi przez HU. Zastosowanie innego związku ochronnego, tj. benzoesanu sodu nie zapobiegało uszkodzeniom erytrocytów przez HU, mimo iż związek ten w identycznym stężeniu był skuteczny w ochronie granulocytów [63]. Ponieważ reakcja erytrocytów na HU wykazywała znaczącą zmienność u różnych dawców, dlatego też celem zmniejszenia indywidualnej zmienności zastosowano w badaniach azydek sodu. Działanie azydku sodu polega na zablokowaniu ochrony enzymatycznej przed rodnikami tlenowymi. Takie działanie azydku sodu wykorzystano już wcześniej w układach komórkowych inkubowanych z nadtlenu wodoru [9,59]. Zablockowanie systemu ochrony enzymatycznej w erytrocytach wykazało mniej zróżnicowaną odpowiedź dawców na toksyczny efekt HU.

Przez hipotetyczną analogię z uszkodzeniem erytrocytów przez promieniowanie jonizujące lub nadtlenek wodoru założono, że uszkodzenia spowodowane przez HU mają charakter peroksydacyjny. Wiadomo, że na peroksydacyjne uszkodzenie komórki najbardziej podatne są struktury bogate w lipidy. Dlatego też podjęto próby oznacze-

nia końcowych produktów peroksydacji lipidów w reakcji barwnej z kwasem ditiobarbiturowym [29]. Wolne rodniki mogą utleniać nienasycone fosfolipidy błon komórkowych [1,42]. Jednym z końcowych produktów peroksydacji lipidów jest dialdehyd malonowy, który w reakcji z kwasem ditiobarbiturowym tworzy kompleks TBA-RS absorbujący światło widzialne przy długości fali 532 nm [20]. Wprawdzie i erytrocyty i błony erytrocytarne inkubowane z nadtlenu wodoru w obecności azydku sodu wykazywały znaczący wzrost stężenia TBA-RS, to analogicznie stosowany HU nie powodował wzrostu stopnia peroksydacji lipidów mierzonego poziomem TBA-RS. Kompleks TBA-RS powstały w erytrocytach inkubowanych z nadtlenu wodoru wykazywał dodatkową absorpcję światła przy długości fali 460 nm, która jest wynikiem interferencji hemoglobiny w oznaczanej reakcji [60]. Taki wzrost absorpcji nie zaznaczył się jednak w erytrocytach inkubowanych z HU.

Innym wskaźnikiem wewnątrzkomórkowego generowania wolnych rodników jest powstawanie methemoglobiny (MetHb) [33]. Dlatego też oznaczono poziom MetHb w erytrocytach inkubowanych zarówno z nadtlenu wodoru, jak i HU w obecności lub braku związków ochronnych w medium inkubacyjnym. Wyniki badań wykazały, że HU – podobnie jak nadtlenek wodoru – stymuluje wzrost stężenia MetHb w erytrocytach, nawet w małym stężeniu 0,1 mM, jeśli czas inkubacji jest wystarczająco długi. Toksycznemu działaniu HU częściowo przeciwdziałały zastosowane związki ochronne [29].

Procesowi starzenia się erytrocytów towarzyszą zmiany oporności osmotycznej połączone ze wzrostem peroksydacji lipidów, co jest skorelowane ze stopniem wrażliwości oksydacyjnej [66]. W związku z tym porównano sto-

pień hemolizy erytrocytów inkubowanych z HU i bez HU poddanych działaniu stresu oksydacyjnego z zastosowaniem askorbinianu sodu. Doświadczenia te oparto na założeniu, że uszkodzenie błony komórkowej erytrocytu czyni tę komórkę bardziej podatną na hemolizę i mniej oporną na peroksydację. Po trzech godzinach inkubacji zaobserwowano wzrastającą hemolizę zależną od stężenia askorbinianu sodu. Porównanie w tych samych warunkach reakcji erytrocytów inkubowanych z HU i bez HU ujawniło zwiększoną hemolizę komórek z HU. Proces ten był ograniczony do małych stężeń askorbinianu sodu. Czynnikiem powodującym zwiększenie hemolizy krwinek poddanych działaniu HU był askorbinian sodu akcelerujący peroksydację lipidów zapoczątkowaną przez wolne rodniki wywołujące się z HU. Porównanie widm absorpcji krwinek inkubowanych z askorbinianem sodu i z askorbinianem sodu + HU ujawniło, że HU generuje wzrost absorpcji przy długości fali 450–460 nm oraz stosunkowo małe widmo absorpcji w obszarze 530–540 nm.

Ostatnia seria doświadczeń z udziałem lektyn wykazała, że serologiczne właściwości erytrocytów inkubowanych z HU pozostawały niezmienione [29].

Granulocyty obwodowe wydają się również odpowiednim modelem do badań ze względu na swoiste funkcje które pełnią. Wiele leków uszkadza *in vitro* aktywność fagocytarną neutrofilów [71]. Również promieniowanie X *in vitro* uszkadza fagocytozę i właściwości migracyjne tych komórek [70]. Wyniki badań własnych ujawniły *in vitro* supresję fagocytozy przez HU, która była modyfikowana działaniem zastosowanych w doświadczeniach związków ochronnych [63].

TOKSYCZNOŚĆ UBOCZNA HU *IN VIVO*

Jednorazowa dawka HU 150 mg/kg m.c. podana dożylnie zdrowym zwierzętom powodowała wczesne efekty toksyczne w komórkach krwi i w wątrobie. Liczba erytrocytów ulegała stopniowemu obniżeniu w ciągu pierwszych kilku dni. Stężenie erytrocytów normalizowało się po dwóch tygodniach osiągając wartość zbliżoną do war-

tości kontrolnych. Ich oporność osmotyczna stawała się znacząco większa. Zwiększona oporność erytrocytów utrzymywała się w czasie trwania doświadczenia. Nie odnotowano znaczących różnic w liczbie krwinek białych. Zaobserwowano jednak istotne stłumienie zdolności fagocytarnej granulocytów krwi obwodowej. Wzrost aktywności kwaśnej fosfatazy w surowicy krwi zwierząt następował siódmego dnia, co stanowiło już późny efekt toksyczny. Podanie zwierzętom antyoksydantów: witaminy E i witaminy C zapobiegało tym efektom toksycznym spowodowanym przez HU [32].

Stres oksydacyjny wywołany rodnikorodnym mechanizmem działania niektórych leków przeciwnowotworowych może wpływać na takie funkcje komórki jak przebieg cyklu komórkowego i proces apoptozy, a tym samym na zabicie komórki przez leki przeciwnowotworowe. Podczas chemioterapii nowotworów stres oksydacyjny indukując procesy peroksydacji lipidów generuje powstanie wielu aldehydowych produktów, których działanie może zarówno uszkadzać komórki, jak i obniżyć działanie cytotoksyczne przez spowolnienie cyklu komórki, inaktywację receptorów śmierci i zahamowanie aktywności kaspaz [10]. Zastosowanie antyoksydantów (witaminy E i C, β -karotenu), czy naturalnych antyoksydantów, takich jak genisteina i quercetyna jako suplementacja diety nie tylko obniżało uboczną toksyczność leczenia, ale poprawiało efektywność chemioterapii [11].

PODSUMOWANIE

Zaprezentowane wyniki literaturowe i uzyskane w badaniach własnych potwierdzają radiomimetyczną toksyczność działania HU. Rodnikowy mechanizm toksyczności wykazano wobec komórek proliferujących, lizosomów, komórek nieproliferujących oraz w badaniach *in vivo*. Uważa się, że ten mechanizm rodnikowego działania HU jest główną przyczyną ubocznej toksyczności tego leku w warunkach klinicznych. Próby zastosowania antyoksydantów w chemioterapii chorych onkologicznych z użyciem różnych cytostatyków wykazują obniżenie działań niepożądanych tej terapii z jednoczesną poprawą indeksu terapeutycznego.

PIŚMIENICTWO

- [1] Agrawal A., Kale R.K.: Radiation induced peroxidative damage: mechanism and significance. *Indian J. Exp. Biol.*, 2001; 39: 291–309
- [2] Akesson S.P., Mel H.C.: Osmotic hemolysis and fragility. A novel model based on membrane disruption, and a potential clinical test. *Biochem. Biophys. Acta*, 1982; 718: 201–211
- [3] Anand S., Verma H., Kumar L., Singh N.: Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia lymphocytes by hydroxyurea and adriamycin. *Cancer Lett.*, 1995; 88: 101–105
- [4] Belt R.J., Haas C.D., Kennedy J., Taylor S.: Studies of hydroxyurea administered by continuous infusion: toxicity, pharmacokinetics, and cell synchronization. *Cancer*, 1980; 46: 455–462
- [5] Bienvenu P., Caron L., Gasparutto D., Kergonou J.F.: Assessing and counteracting the prooxidant effects of anticancer drugs. *EXS*, 1992; 62: 257–265
- [6] Blume R.S., Glade P.R., Chessin L.N.: Euchrisine, a supravital fluorescent lysosomal stain: technics and application for hematologic investigation. *Blood*, 1969; 33: 87–99
- [7] Boyd A.S., Neldner K.H.: Hydroxyurea therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1991; 25: 518–524
- [8] Cheung A.Y., Browne B., Capen C.: Hydroxyurea induced fever in cervical carcinoma: case report and review of the literature. *Cancer Invest.*, 1999; 17: 245–248
- [9] Clemens M.R., Remmer H.: Volatile alkanes produced by erythrocytes: an assay for *in vitro* studies on lipid peroxidation. *Blut*, 1982; 45: 329–335
- [10] Conklin K.A.: Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr. Cancer Ther.*, 2004; 3: 294–300
- [11] Conklin K.A.: Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr. Cancer*, 2000; 37: 1–18
- [12] Conklin K.A.: Cancer chemotherapy and antioxidants. *J. Nutr.*, 2004; 134: 3201S–3204S
- [13] DeSesso J.M.: Cell death and free radicals: a mechanism for hydroxyurea teratogenesis. *Med. Hypotheses*, 1979; 5: 937–951
- [14] Frearson P.M., Kit S., Dubbs D.R.: Induction of dihydrofolate reductase activity by SV40 and polyoma virus. *Cancer Res.*, 1966; 26: 1653–1660

- [15] Grabarczyk M., Przybyszewski W.M., Kwiatkowska J., Sitarska E., Malec J.: Alteration in lysosome supravital staining as a marker of hydroxyurea-induced cytotoxicity and its modification by radical scavengers in L5178Y cells in culture. *Neoplasma*, 1983; 30: 541–545
- [16] Gui C.Y., Jiang C., Xie H.Y., Qian R.L.: The apoptosis of HEL cells induced by hydroxyurea. *Cell Res.*, 1997; 7: 91–97
- [17] Hanft V.N., Fruchtmann S.R., Pickens C.V., Rosse W.F., Howard T.A., Ware R.E.: Acquire DNA mutations associated with *in vivo* hydroxyurea exposure. *Blood*, 2000; 95: 3589–3593
- [18] Horvat A., Acs G.: Induction of lysosomal enzymes in contact inhibited 3T3 cells. *J. Cell Physiol.*, 1974; 83: 59–68
- [19] Huyghe P., Dassonneville L., Fenaux P., Bailly C.: Hydroxyurea-induced apoptosis in an EBV-immortalized lymphoblastoid cell line. *Oncol. Res.*, 2004; 14: 235–245
- [20] Janero D.R.: Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 1990; 9: 515–540
- [21] Jiang J., Jordan S.J., Barr D.P., Gunther M.R., Maeda H., Mason R.P.: *In vivo* production of nitric oxide in rats after administration of hydroxyurea. *Mol. Pharmacol.*, 1997; 52: 1081–1086
- [22] King S.B.: Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 37: 737–744
- [23] Kinsella T.J.: Radiosensitization and cell kinetics: clinical implications for S-phase-specific radiosensitizers. *Semin. Oncol.*, 1992; 19 (3 Suppl.9): 41–47
- [24] Kit S., DeTorres R.A., Dubbs D.R.: Arabinofuranosylcytosine-induced stimulation of thymidine kinase and deoxycytidylic deaminase activities of mammalian cultures. *Cancer Res.*, 1966; 26: 1859–1866
- [25] Klein-Szanto A.J., de Rey B.L., Conti C.J., Cabrini R.L.: Ultrastructure of irradiated nuclei. *Strahlentherapie*, 1974; 147: 263–270
- [26] Kondakova I.V., Zagrebelnaya G.V., Choinzonov E.T.: NO-generating compounds modify tumoricidal effect of doxorubicin. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2004; 137: 585–587
- [27] Li V., Kelly K., Schrot R., Langan T.J.: Cell cycle kinetics and commitment in newborn, adult, and tumoral astrocytes. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 1996; 96: 138–147
- [28] Lieberman M.W., Verbin R.S., Landay M., Liang H., Farber E., Lee T.N., Starr R.: A probable role for protein synthesis in intestinal epithelial cell damage induced *in vivo* by cytosine arabinoside, nitrogen mustard or X-irradiation. *Cancer Res.*, 1970; 30: 942–951
- [29] Malec J., Przybyszewski W.M., Grabarczyk M., Sitarska E.: Hydroxyurea has the capacity to induce damage to human erythrocytes which can be modified by radical scavengers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984; 120: 566–573
- [30] Malec J., Przybyszewski W.M., Grabarczyk M., Sitarska E., Czartoryska B.: Mechanism of unbalanced growth-induced cell damage. I. A probable role for hydrolytic enzymes synthesis. *Chem. Biol. Interact.*, 1986; 57: 315–324
- [31] Malec J., Przybyszewski W.M., Szczepańska I., Sitarska E., Zdziechowska H., Pawelski S.: Preliminary trials of the modification of toxic side effects in patients after administration of Hydroxyurea-Cytosar-Rubidomycin. Tschechoslovak-German-Polish Trilateral Meeting, Zakopane, 1984; Abstracts: 85
- [32] Malec J., Szczepańska I., Grabarczyk M., Przybyszewski W.M., Kopeć-Szlęzak J., Sitarska E.: Hydroxyurea-induced toxic side-effects in animals and an attempt at reducing them with vitamins E and C. *Neoplasma*, 1989; 36: 427–435
- [33] Maridonneau I., Braquet P., Garay R.P.: Na⁺ and K⁺ transport damage induced by oxygen free radicals in human red cell membranes. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 3107–3113
- [34] Meneghini R., Hoffmann M.E.: The damaging action of hydrogen peroxide on DNA of human fibroblasts is mediated by a non-dialyzable compound. *Biochem. Biophys. Acta*, 1980; 608: 167–173
- [35] Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.: Anthracyclines: Molecular and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, 2004; 56: 185–229
- [36] Mitcher J.S., Shelbourne J.D., Bradford N.D., Hawkins H.K.: Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and aminoacids in HeLa cells. *Am. J. Pathol.*, 1976; 83: 485–489
- [37] Moore E.C., Hurlbert R.B.: The inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrazoloimidazole (IMPY). *Pharmacol. Ther.*, 1985; 27: 167–196
- [38] Navarra P., Preziosi P.: Hydroxyurea: new insight on an old drug. *Critic. Rev. Oncol. Hematol.*, 1999; 29: 249–255
- [39] Orringer E.P., Parker J.C.: Hydroxyurea and sickle cell disease. *Hematol. Pathol.*, 1992; 6: 171–178
- [40] Painter R.B.: Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature*, 1977; 265: 650–651
- [41] Przybyszewski W.M.: Kompleks reduktazy rybonukleotydowej. *Post. Biochem.*, 1983; 29: 321–333
- [42] Przybyszewski W.M.: Udział produktów peroksydacji lipidów w przeciwnowotworowym mechanizmie działania promieniowania jonizującego i cytostatyków radiomimetycznych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2001; 55: 803–813
- [43] Przybyszewski W.M., Czartoryska B., Malec J.: Effect of hydroxyurea treatment on lysosomal membrane stability and enzyme latency in L5178Y cells in culture. *Neoplasma*, 1986; 33: 27–31
- [44] Przybyszewski W.M., Kopeć-Szlęzak J., Malec J.: Protection of L5178Y cells by vitamin E against acute hydroxyurea toxicity does not change the efficiency of ribonucleotide reductase-mediated hydroxyurea-induced cytotoxic events. *Cancer Lett.*, 1987; 34: 337–344
- [45] Przybyszewski W.M., Malec J.: Molekularne i komórkowe efekty działania hydroksymocznika. *Post. Biochem.*, 1982; 28: 353–372
- [46] Przybyszewski W.M., Malec J.: Hydroxyurea, methotrexate and adriablastine can mediate non-enzymatic reduction of nitroblue tetrazolium with NADH which is inhibited by superoxide dismutase. *Biochem. Pharmacol.*, 1987; 36: 3312–3314
- [47] Przybyszewski W.M., Malec J.: Protection against hydroxyurea-induced cytotoxic effects in L5178Y cells by free radical scavengers. *Cancer Lett.*, 1982; 17: 223–228
- [48] Ravandi-Kashani F., Cortes J., Cohen P., Talpaz M., O'Brien S., Markowitz A., Kantarjian H.: Cutaneous ulcers associated with hydroxyurea therapy in myeloproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma*, 1999; 35: 109–118
- [49] Ross D.W.: The nature of unbalanced cell growth caused by cytotoxic agents. *Virchows Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 1981; 37: 225–235
- [50] Ross D.W.: Cell volume growth after cell cycle block with chemotherapeutic agents. *Cell Tissue Kinet.*, 1976; 9: 379–387
- [51] Ross D.W.: Unbalanced cell growth and increased protein synthesis induced by chemotherapeutic agents. *Blood Cells*, 1983; 9: 57–68
- [52] Roy B., Guittet O., Beuneu C., Lemaire G., Lepoivre M.: Depletion of deoxyribonucleotide triphosphate pools in tumor cells by nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 507–516
- [53] Saha B.K., Sameshima M., Sameshima F., Schlessinger D.: Lysosomal enzyme activities and RNA turnover rates in growing and nongrowing WI-38 and HeLa cells. *In Vitro*, 1981; 17: 816–824
- [54] Sakano K., Oikawa S., Hasegawa K., Kawanishi S.: Hydroxyurea induces site-specific DNA damage via formation hydrogen peroxide and nitric oxide. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2001; 92: 1166–1174
- [55] Sawecka J., Golos B., Malec J.: Mechanism of unbalanced growth-induced cell damage II. A probable relationship between unbalanced growth, DNA breakage and cell death. *Chem. Biol. Interact.*, 1986; 60: 47–55
- [56] Singal P.K., Siveski-Iliskovic N., Hill M., Thomas T.P., Li T.: Combination therapy with probucol prevents adriamycin-induced cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1995; 27: 1055–1063
- [57] Siveski-Iliskovic N., Hill M., Chow D.A., Singal P.K.: Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*, 1995; 91: 10–15
- [58] Stevens M.R.: Hydroxyurea: an overview. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 1999; 13: 172–175
- [59] Stocks J., Dormandy T.L.: The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br. J. Haematol.*, 1971; 20: 95–111
- [60] Stocks J., Dormandy T.L.: A direct thiobarbituric acid-reacting chromogen in human red blood cells. *Clin. Chim. Acta*, 1970; 27: 117–120
- [61] Stubblefield E., Mueller G.C.: Thymidine kinase activity in synchronized HeLa cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965; 20: 535–538
- [62] Studzinski G.P., Cohen L.S.: Mitomycin C-induced increase in the activities of the deoxyribonucleases of HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966; 23: 506–512
- [63] Szczepańska I., Kwiatkowska J., Przybyszewski W.M., Sitarska E., Malec J.: Amelioration of hydroxyurea-induced suppression of phagocytosis in human granulocytes by free radical scavengers. *Scand. J. Haematol.*, 1985; 34: 35–38
- [64] Tappel A.L.: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.*, 1973; 32: 1870–1874
- [65] Timson J.: Hydroxyurea. *Mutation Res.*, 1975; 32: 115–132

- [66] Tyan M.L.: Age-related increase in erythrocyte oxidant sensitivity. Mech. Ageing Dev., 1982; 20: 25–32
- [67] Vadlamundi S., Krishna B., Reddy V.S., Goldin A.: Schedule dependent therapeutic synergism for L-asparaginase and methotrexate in leukemic L5178Y mice. Cancer Res., 1973; 33: 2014–2019
- [68] Valerius N.H., Johansen K.S., Nelsen S., Platz P., Rosenkvist J., Sorensen H.: Effect of *in vitro* X-irradiation on lymphocyte and granulocyte function. Scand. J. Haematol., 1981; 27: 9–18
- [69] Wadler S., Hayes H., Schechner R., Rozenblit A., Wiernik P.H.: Phase I trial of high-dose infusional hydroxyurea, high-dose infusional 5-fluorouracil and recombinant interferon-alpha-2a in patients with advanced malignancies. Invest. New Drugs, 1996; 13: 315–320
- [70] Wills E.D., Wilkinson A.E.: Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release. Biochem. J., 1966; 99: 657–666
- [71] Whittaker J.A., Hughes H.N., Khurshid H.: The effect of cytotoxic and antiinflammatory drugs on the phagocytosis of neutrophil leukocytes. Br. J. Haematol., 1975; 29: 273–279
- [72] Yarbrow J.W.: Mechanism of action of hydroxyurea. Semin. Oncol., 1992; 19 (3 Suppl.9): 1–10
- [73] Zhao M., Antunes F., Eaton J.W., Brunk U.T.: Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. Eur. J. Biochem., 2003; 270: 3778–3786