

*Beata Olas, Barbara Wachowicz*

## WPLYW ZWIĄZKÓW PLATYNY NA GENEROWANIE ANIONORODNIKA PONADTLENKOWEGO W PŁYTKACH KRWI ŚWINI

Badano wpływ izomerów diaminodichloroplatyny (cis- i trans-) na tworzenie anionorodnika nadtlenkowego  $O_2^-$  w przemitych płytkach krwi świni. Zaobserwowano generowanie rodnika  $O_2^-$  zarówno w płytkach krwi aktywowanych trombiną, jak i w płytkach inkubowanych z cisplatyną (20  $\mu M$ ) i transplatyną (200  $\mu M$ ). Stwierdzono ponadto, że powstawanie anionorodnika zależy od reakcji związków platyny z glutationem.

### 1. WSTĘP

Cytotoksyczne działanie cisplatyny może być potęgowane wytwarzanym stresem oksydacyjnym i powstawaniem wolnych rodników tlenowych [8, 9].

Wcześniejsze badania *in vitro* prowadzone w naszym laboratorium wykazały, że cisplatyna hamuje aktywność enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy nadtlenkowej, peroksydazy glutationowej) w płytkach krwi świni i stymuluje peroksydację lipidów [10].

We wstępnych badaniach zarejestrowano również powstawanie rodnika nadtlenkowego w płytkach krwi świni po krótkotrwałej inkubacji tych komórek z cisplatyną [11].

Celem obecnych badań było ustalenie wpływu izomerów cis i transplatyny na proces wytwarzania wolnych rodników tlenowych w płytkach krwi świni i roli wolnych grup SH glutationu w tym procesie. Rejestrowano generowanie  $O_2^-$  w płytkach krwi pod wpływem izomerów platyny, jak i w układzie modelowym zawierającym zredukowany glutation i kompleksy platyny w określonych stosunkach molowych.

## 2. METODY

Płytki krwi otrzymywano metodą wirowania różnicowego krwi świni pobranej na roztwór ACD (65 mM kwas cytrynowy, 85 mM cytrynian sodu, 110 mM glukoza), 5 : 1, v/v. Następnie komórki przemywano dwukrotnie zmodyfikowanym buforem Tyroda i zawieszono w tym samym buforze do stężenia 5 mg/ml. Białko oznaczono zmodyfikowaną metodą Lawry'ego [4].

Stężenie anionorodnika nadadtlenkowego ( $O_2^+$ ) generowanego w zawieszynie płytek kontrolnych, aktywowanych trombiną (10 j/ml, 2 min) oraz w płytkach krwi inkubowanych w czasie 0–30 min z cisplatyną (20  $\mu$ M) bądź transplatyną (20 i 200  $\mu$ M) oznaczano metodą opisaną przez J a h n a i H a n s c h a [3]. Do określonej objętości prób badanych dodawano równą objętość roztworu cytochromu C o stężeniu 160  $\mu$ M. Następnie próbki wirowano przez 5 min i oznaczano absorbancję przy 550 nm. Do oznaczania  $O_2^+$  korzystano z molowego współczynnika absorpcji, który dla cytochromu C wynosi 18700  $M^{-1} cm^{-1}$ .

Powstawanie rodnika nadadtlenkowego w układzie modelowym zawierającym glutation i cisplatynę lub transplatynę w określonym stosunku molowym (1 : 1–4 : 1) określano wyżej opisaną metodą.

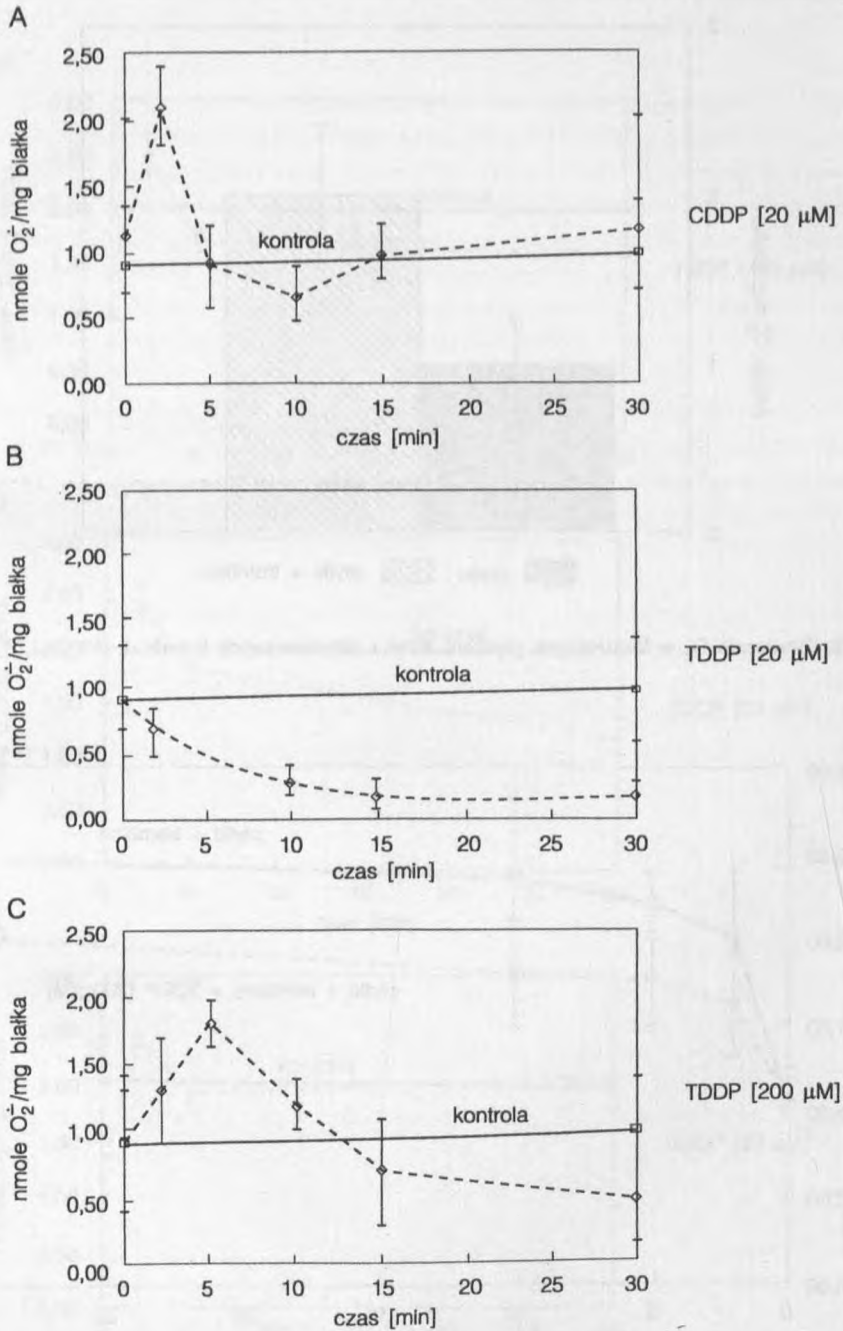
Odczynniki chemiczne stosowane w pracy (cisplatyna i transplatyna) pochodziły z firmy „Sigma”.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym (SD).

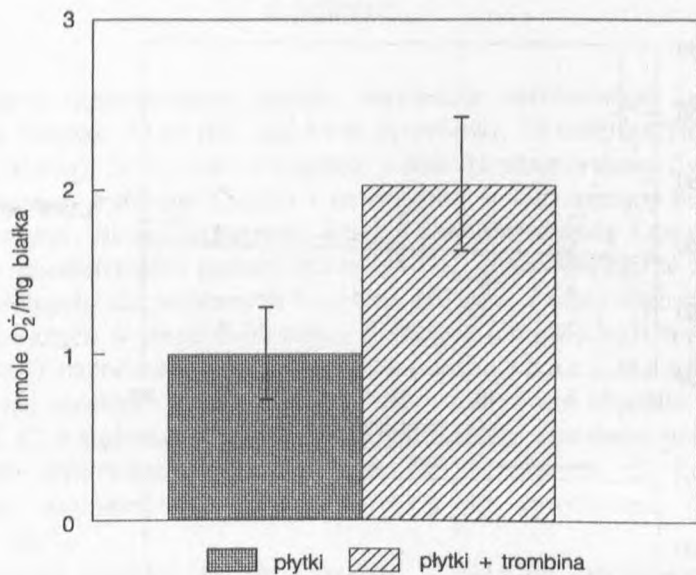
## 3. WYNIKI

Stwierdzono, że związki platyny – cisplatyna i transplatyna – stymulują w warunkach *in vitro* proces powstawania rodnika  $O_2^+$  w badanych komórkach. Obecność dysmutazy nadadtlenkowej redukowała ilość obecnych rodników.

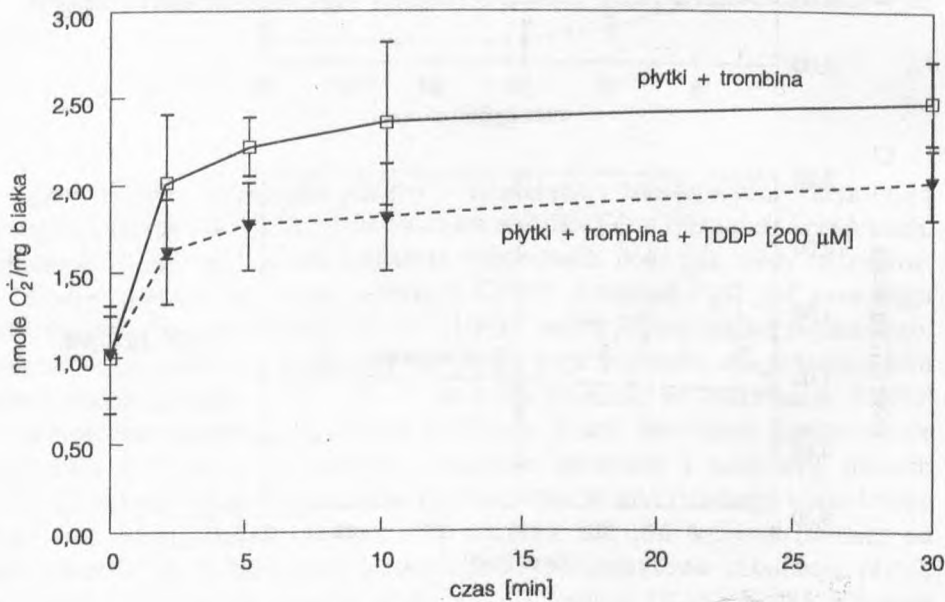
Dwuminutowa inkubacja płytek z CDDP o stężeniu 20  $\mu$ M powoduje natychmiastowy wzrost ilości  $O_2^+$  do  $2,1 \pm 0,3$  nmoli  $O_2^+$ /mg białka płytkowego. Dłuższy czas działania cisplatyny na płytki krwi prowadzi do zahamowania generowania rodnika (rys. 1A). Wykazano również, że dodawanie TDDP o tym samym stężeniu (20  $\mu$ M) do zawiesiny płytek, powoduje zahamowanie tworzenia  $O_2^+$  już w pierwszych minutach inkubacji i najniższy poziom  $0,2 \pm 0,1$  nmoli  $O_2^+$ /mg białka zaobserwowano po 30 min działania transplatyny (rys. 1B). Transplatyna stosowana w stężeniu 200  $\mu$ M wpływa również na generowanie  $O_2^+$  w badanych komórkach. Pięciominutowa inkubacja płytek z TDDP powoduje powstanie około  $1,2 \pm 0,2$  nmoli  $O_2^+$ /mg białka. Dłuższy czas inkubacji z tym związkiem prowadzi do zahamowania tworzenia  $O_2^+$  w płytkach krwi (rys. 1C).



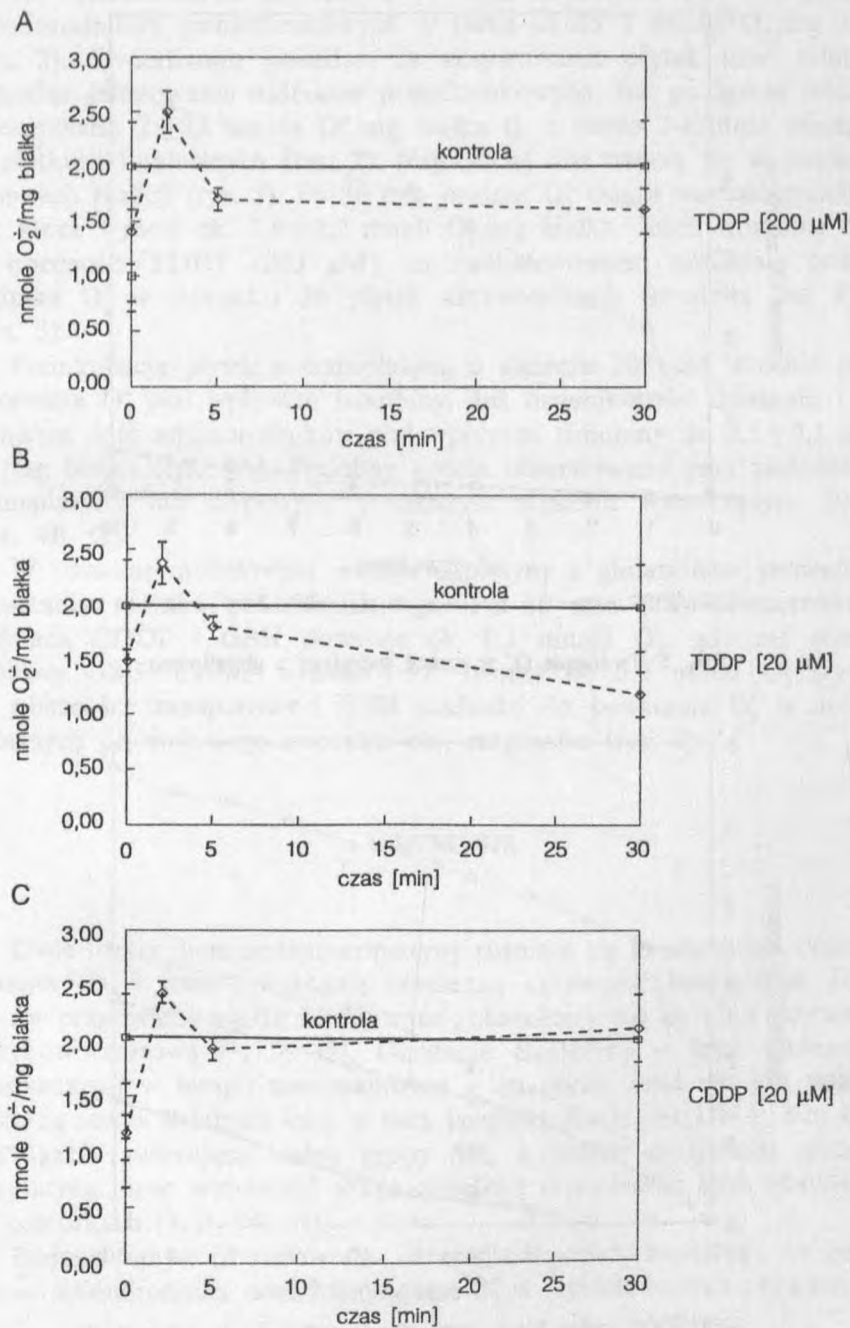
Rys. 1. Wpływ kompleksów platyny na generowanie rodnika ponadtlenkowego w wyizolowanych płytkach krwi świni. Poziom  $\text{O}_2^-$  w płytkach krwi: A – inkubowanych z CDDP (20  $\mu\text{M}$ ), B – z TDDP (20  $\mu\text{M}$ ), C – z TDDP (200  $\mu\text{M}$ )



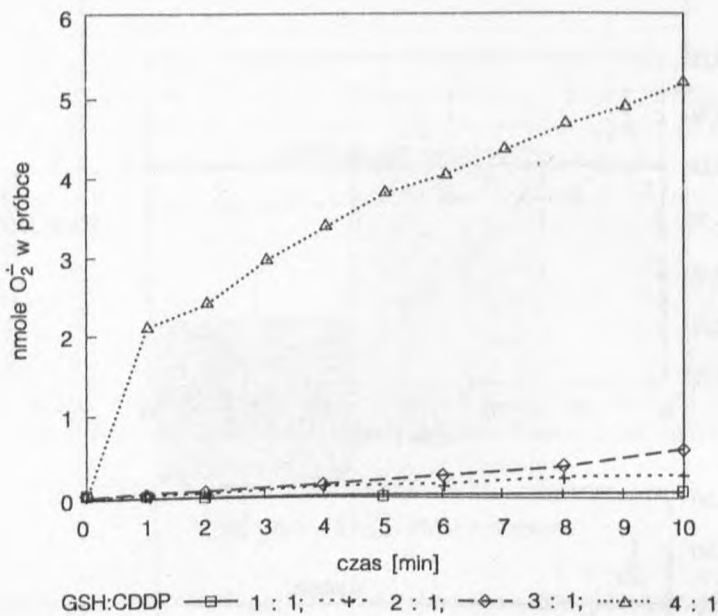
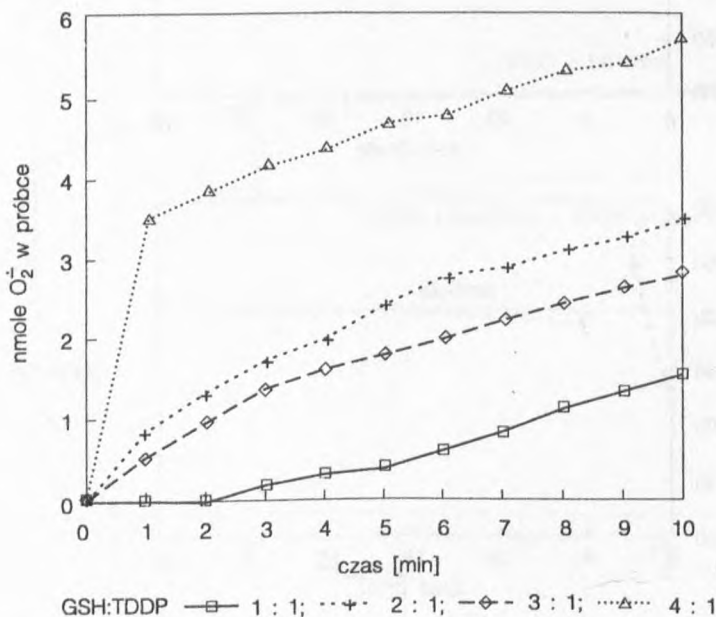
Rys. 2. Tworzenie  $O_2$  w kontrolnych płytkach krwi i aktywowanych trombiną (10 j/ml, 2 min)



Rys. 3. Generowanie  $O_2^*$  w płytkach krwi aktywowanych trombiną (10 j/ml) w obecności i przy braku TDDP (200  $\mu$ M)



Rys. 4. Poziom  $O_2^-$  w płytkach krwi aktywowanych trombiną (10 j/ml, 2 min) po inkubacji komórek z TDDP (200  $\mu$ M) (A), z TDDP (20  $\mu$ M) (B) oraz CDDP (20  $\mu$ M) (C)

Rys. 5. Tworzenie  $O_2^+$  w reakcji cisplatyny z glutationemRys. 6. Tworzenie  $O_2^+$  w reakcji transplatyny z glutationem



W wyizolowanych płytkach krwi świni zaobserwowano tworzenie się anionorodników ponadtlenkowych w ilości około 1 nmoli  $O_2^+$ /mg białka (rys. 2). Stwierdzono ponadto, że aktywowanie płytek krwi trombiną pobudza generowanie rodników ponadtlenkowych. Już po 2 min inkubacji rejestrowano  $2 \pm 0,4$  nmole  $O_2^+$ /mg białka tj. o około 2-krotnie więcej, niż w płytkach kontrolnych (rys. 2). Najszybciej one tworzą się w pierwszych minutach reakcji (rys. 3). Po 30 min poziom  $O_2^+$  osiąga wartość maksymalną, która wynosi ok.  $2,4 \pm 0,2$  nmoli  $O_2^+$ /mg białka. Jeżeli trombina działa w obecności TDDP ( $200 \mu M$ ), to zaobserwowano obniżenie poziomu rodnika  $O_2^+$  w stosunku do płytek aktywowanych trombiną bez TDDP (rys. 3).

Preinkubacja płytek z transplatyną o stężeniu  $200 \mu M$  zmienia proces tworzenia  $O_2^+$  pod wpływem trombiny. Już dwuminutowe działanie TDDP zwiększa ilość anionorodników pod wpływem trombiny do  $2,5 \pm 0,1$  nmola  $O_2^+$ /mg białka (rys. 4A). Podobny proces obserwowano przy zastosowaniu transplatyny lub cisplatyny o niższym stężeniu wynoszącym  $20 \mu M$  (rys. 4B, C).

W układzie modelowym reakcja cisplatyny z glutationem prowadzi do powstania rodnika ponadtlenkowego. Po 10 min przy równomolowych ilościach CDDP i GSH powstaje ok. 0,1 nmola  $O_2^+$ , gdy zaś stosunek molowy GSH : CDDP wynosi 4 : 1, tworzy się 5,2 nmoli  $O_2^+$  (rys. 5). W obecności transplatyny i GSH dochodzi do powstania  $O_2^+$  w ilościach zależnych od molowego stosunku obu reagentów (rys. 6).

#### 4. DYSKUSJA

Dwie formy diaminodichloroplatyny różniące się konformacją cząsteczki (izomer cis- i trans-) wykazują odmienną aktywność biologiczną. Izomer cis-, w przeciwieństwie do formy trans-, charakteryzuje się silną aktywnością antynowotworową [1, 6, 12]. Działanie cisplatyny – leku powszechnie stosowanego w terapii nowotworowej – na płytki krwi nie jest poznane. Główną tarczą działania leku w tych komórkach nie jest DNA, lecz białka i związki zawierające wolne grupy SH, a przede wszystkim glutation. Cisplatyna może wytwarzać wolne rodniki i powodować stres oksydacyjny w komórkach [8, 9, 10, 11].

Badano wpływ izomerów cis- i transdiaminodichloroplatyny na generowanie anionorodnika ponadtlenkowego  $O_2^+$  w wyizolowanych płytkach krwi świni.

Stosując metodę oznaczania  $O_2^+$  opartą na redukcji cytochromu C potwierdzono, że w wyizolowanych i zawieszonych w buforze Tyroda płytkach

krwi świni powstają rodniki  $O_2^+$ . Obecność dysmutazy ponadtlenkowej hamowała ten proces. W zawieszynie płytek krwi w buforze Tyroda poziom rodników  $O_2^+$  wynosił ok. 1 nmola  $O_2^+$ /mg białka (rys. 2). Aktywacja płytek trombiną (10 j, 2 min) powodowała ponad dwukrotny wzrost ilości powstających  $O_2^+$  (rys. 2).

Mechanizm generowania  $O_2^+$  w płytkach nie jest wyjaśniony [3, 13]. Jahn i Hansch sugerują, że proces ten związany jest z cyklem glutationowym i przemianą arachidonianu przy udziale 12-lipooksygenazy [3].

Obserwowane przez nas generowanie  $O_2^+$  w płytkach zachodzące pod wpływem trombiny, silnego aktywatora płytek, może częściowo zależeć od stymulowanej trombiną przemiany endogennego arachidonianu płytkowego.

Jak zaobserwowano, trombina stymuluje generowanie  $O_2^+$  w sposób zależny od czasu działania. Inkubacja płytek krwi równocześnie z trombiną i związkami platyny hamuje ten proces (rys. 3). Można przypuszczać, że izomery platyny zmieniają aktywność trombiny lub jej receptory na płytkach.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że badane izomery platyny o tym samym stężeniu (20  $\mu$ M) wykazują różnice w generowaniu wolnych rodników. Transplatyna nawet ma działanie hamujące, podczas gdy cisplatyna stymuluje generowanie  $O_2^+$  w pierwszych 2 min inkubacji. Przy 10-krotnie wyższym stężeniu transplatyna ma podobne działanie do cisplatyny o stężeniu 20  $\mu$ M. Różnice te mogą zależeć od różnego sposobu wnikania izomerów platyny do komórki i reagowania przede wszystkim z wolnym GSH.

Droga tworzenia wolnych rodników tlenowych w komórce przez związki platyny nie jest wyjaśniona. Cisplatyna po wnikięciu do komórki reaguje z wolnymi grupami SH zredukowanego glutationu i tworzy kompleksy GS-Pt, które mogą być usuwane z komórki prawdopodobnie przy udziale aktywnego transportu zależnego od ATP. Powstawanie kompleksów i ich obecność może potęgować toksyczność i antynowotworowe działanie CDDP [2, 5, 9].

Przeprowadzone modelowe doświadczenia wykazały, że podczas reakcji izomerów platyny z GSH i tworzenia kompleksu GS-Pt dochodzi do generowania  $O_2^+$ . Po 1 min inkubacji najwięcej  $O_2^+$  powstaje, gdy stosunek molowy GSH : Pt wynosi 4 : 1. Spadek ilości  $O_2^+$  w płytkach po kilkunastominutowej inkubacji komórek z izomerami platyny wynikać może ze spadku GSH w komórce, spowodowanego reakcją platyny i przy równoczesnym hamowaniu aktywności reduktazy glutationowej.

Dalsze badania mechanizmu działania leków antynowotworowych (kompleksów platyny) na inne komórki krwi, w tym na płytki krwi, pozwolą na stosowanie terapii nowotworowej bez skutków ubocznego działania.



## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Akaboshi M., Kawai K., Ujeno Y., Takada S., Miyahara T. (1994), *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 106-111.
- [2] Ishikawa, T., Ali-Osman F. (1993), *J. Biol. Chem.*, **268**, 20116-20125.
- [3] Jahn B., Hansch G. M. (1990), *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **93**, 73-79.
- [4] Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. (1978), *Anal. Biochem.*, **87**, 206-210.
- [5] Odenhaimer B., Wolf W. (1992), „*Inorganica Chimica Acta*”, **65**, 41-43.
- [6] Oliński R., Zastawny T. H. (1991), „*Postepy Biochemii*”, **1**, 40-47.
- [7] Pendyala L., Creaven P. J. (1993), *Cancer Res.*, **53**, 5970-5976.
- [8] Spitz D., Philips J. W., Adams D. T., Sherman C. M., Deen D. F., Li G.C. (1993), *J. Cell. Physiol.*, **156**, 72-79.
- [9] Sugihara K., Nakano S., Gemba M. (1987), *J. Pharmacol.*, **33**, 93-106.
- [10] Wachowicz B., Kustroń J. (1992), „*Cytobios*”, **70**, 41-47.
- [11] Wachowicz B., Szwarocka A. (1994), „*Biomedical Letters*”, **49**, 147-152.
- [12] Walter Z., Spychała M. (1991), *Acta Biochim. Pol.*, **38**, 95-99.
- [13] Ward P. A., Cunningham T. W., McCulloch K. K., Phan S. H., Powell J., Johnson K. J. (1988), „*Laboratory Investigation*”, **58**, 37-47.

Wpłynęło do Redakcji  
„*Folia biochimica et biophysica*”  
4.07.1994

Katedra Biochemii Ogólnej  
Uniwersytet Łódzki

*Beata Olas, Barbara Wachowicz*

#### EFFECTS OF PLATINUM COMPOUND ON THE OXYGEN RADICAL GENERATION IN PIG BLOOD PLATELETS

The effect of isomers cis and transdiamminedichloroplatinum II on the generation of  $O_2^+$  on washed pig platelets were studied. The generation of oxygen radicals was demonstrated in blood platelets activated by thrombin and in blood platelets incubated with cisplatin (20  $\mu$ M, maximum after 2 min.) and with transplatin (200  $\mu$ M, maximum after 5 min.). The generation of  $O_2^+$  seems to be dependent on the reaction of GSH with platin.