

Barbara Wachowicz, Beata Olas

PEROKSYDACJA LIPIDÓW PŁYTEK KRWI ŚWINI STYMULOWANA DZIAŁANIEM CIS- I TRANSPLATYNY

Badano w warunkach *in vitro* wpływ cisplatyny (CDDP) o stężeniu 20 μM i transplatyny (TDDP) o stężeniach 20 i 200 μM na peroksydację lipidów błony płytkowej. Cisplatyna (20 μM), jak i jej izomer – trans- (200 μM) – powoduje wzrost poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), a hipertermia potęguje ten proces. Stwierdzono również, że glutation ma ochronne właściwości i redukuje proces peroksydacji lipidów płytkowych wywołany działaniem CDDP.

1. WSTĘP

Cisplatyna (cis-diaminodichloroplatyna II, CDDP) jest ważnym, powszechnie stosowanym czynnikiem chemoterapeutycznym. Uważana jest za najbardziej efektywnie działający lek antynowotworowy, a za jej aktywność antynowotworową jest odpowiedzialna przede wszystkim reakcja z DNA [16]. Znaczenie decydujące o aktywności biologicznej kompleksów platyny mają ich addukty z zasadami azotowymi DNA [11]. Cisplatyna reaguje ze związkami zawierającymi wolne grupy sulfhydrylowe, w tym aminokwasy zawierające siarkę, a także wchodzi w połączenie z białkami [4, 9, 14].

Chociaż CDDP jest bardzo skutecznym i silnym lekiem cytostatycznym stosowanym od wielu lat przy leczeniu różnych nowotworów, to kliniczne zastosowanie tego leku jest ograniczone, m. in. ze względu na działanie uboczne. Cisplatyna jest silnie nefrotoksyczna [16] i poza tym może wywoływać anemię, leukopenię i trombocytopenię [5, 7, 8, 10].

CDDP powoduje powstawanie wolnych rodników, które wchodzi w reakcję z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi i inicjują peroksydację lipidów [15, 20]. Proces ten może powodować zakłócenie w funkcjonowaniu wielu komórek.

Jak wykazały wcześniejsze badania prowadzone w naszym laboratorium cisplatyna w warunkach *in vitro* stymuluje powstawanie wolnych rodników i wywołuje peroksydację lipidów płytek krwi [18, 19]. Mechanizm działania związków platyny na płytki krwi nie jest wyjaśniony. Płytki krwi człowieka są beźjądrzastymi komórkami, które pełnią istotną rolę w hemostazie. Ich

aktywacja przejawiająca się adhezją do ściany naczynia krwionośnego, agregacją i sekrecją zmagazynowanych związków może być pobudzona przez niektóre komórki nowotworowe [3]. Płytki krwi uczestniczą również w tworzeniu przerzutów nowotworowych, a inhibitory aktywacji płytek krwi wpływają na zahamowanie procesu metastazy.

Przeprowadzone badania *in vitro* miały na celu porównanie działania izomerów cis- i transplatyny na proces peroksydacji lipidów płytek krwi świni i osocza, zachodzący w różnej temperaturze, a także ustalenie roli glutationu w tym procesie.

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) (1 objętość ACD : 5 objętości krwi). Zawiesinę przemytych dwukrotnie komórek w zmodyfikowanym buforze Tyroda (0,15 M NaCl w 0,014 M Tris – HCl, 5 mM glukoza, pH 7,4) oraz płytek krwi zawieszonych w osoczu ubogopłytkowym inkubowano z cis- i transplatyną o stężeniu 0,1 do 200 μM oraz seleninem sodu (20 μM) (czas inkubacji od 0–24 h, temperatura 25°C, 37°C i 41,5°C), a następnie oznaczano poziom związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) [17]. Badano również wpływ izomerów platyny na poziom TBARS w osoczu. Białko oznaczano zmodyfikowaną metodą Lowry'ego [6].

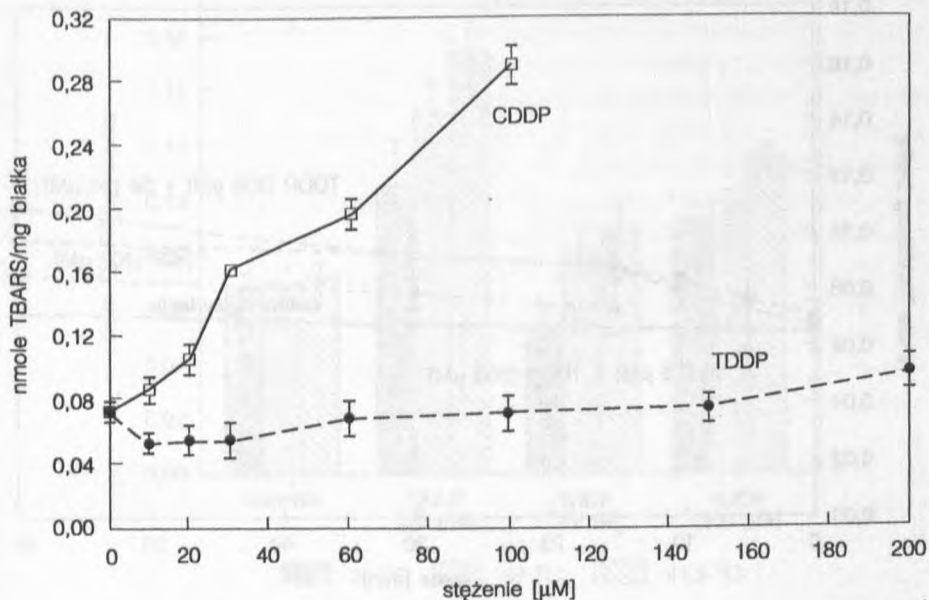
Odczynniki chemiczne stosowane w pracy, takie jak: cisplatyna, transplatyna i selenin sodu pochodziły z firmy „Sigma”.

Do analizy statystycznej zastosowano sparowany test t–Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym (SD).

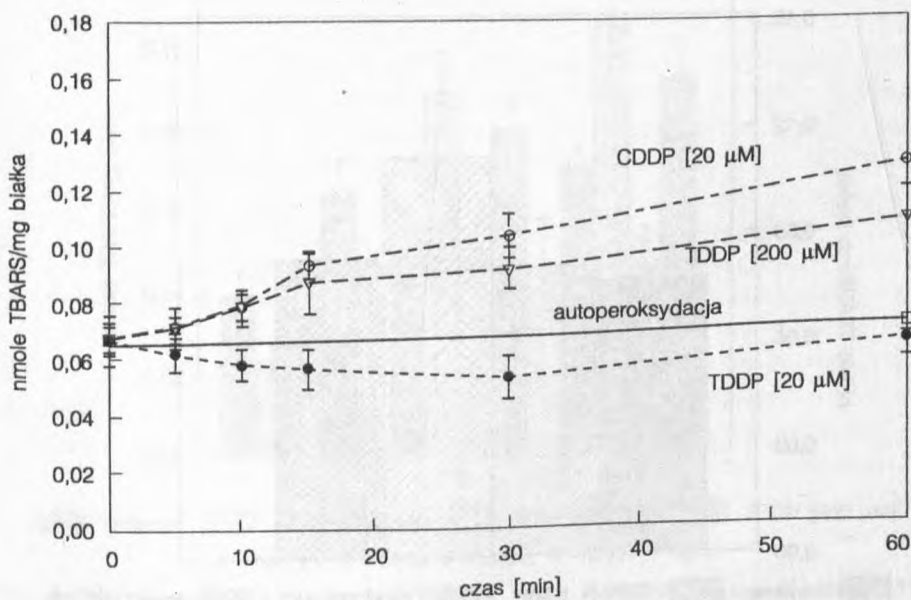
3. WYNIKI

Wykazano, że cisplatyna stosowana w stężeniu 10–100 μM stymuluje proces peroksydacji lipidów płytek krwi świni w sposób zależny od stężenia i czasu działania ($p < 0,001$), natomiast transplatyna stosowana w tych samych dawkach tylko w nieznacznym stopniu wpływa na ten proces (rys. 1 i 2).

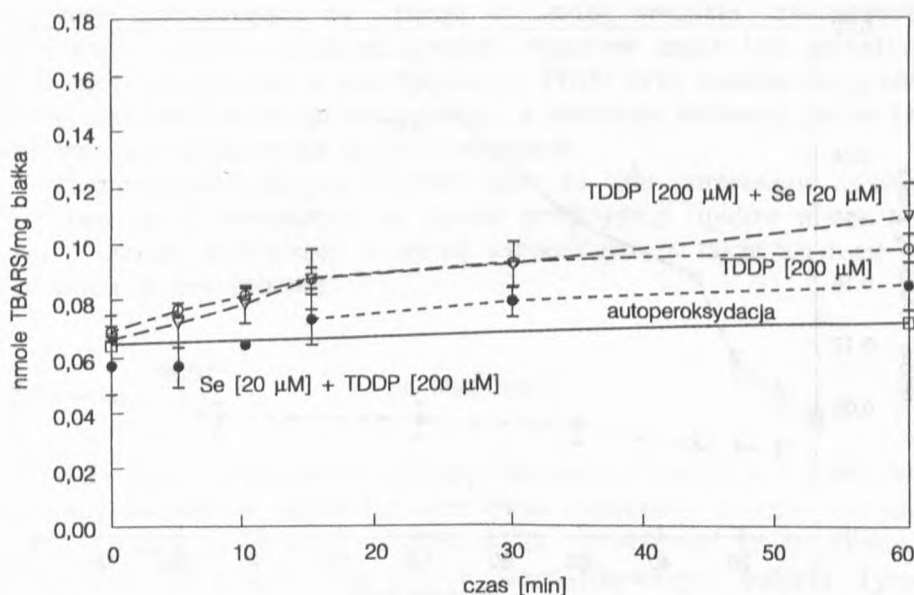
Przy niskim stężeniu (20 μM) wykazuje działanie antyoksydacyjne i obniża TBARS ($p < 0,001$) (rys. 2). Przy wysokim stężeniu (200 μM) TDDP wyraźnie utlenia lipidy płytkowe ($p < 0,001$) (rys. 2). Proces jest zahamowany w obecności seleninu sodu o stężeniu 20 μM (rys. 3).



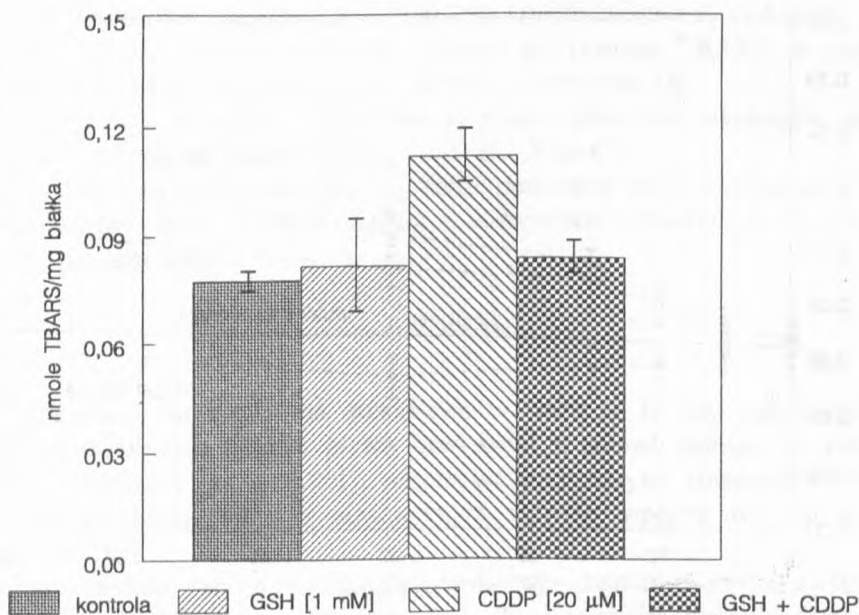
Rys. 1. Wpływ różnych stężeń CDDP i TDDP na peroksydację lipidów błony płytkowej (30 min, 25°C)



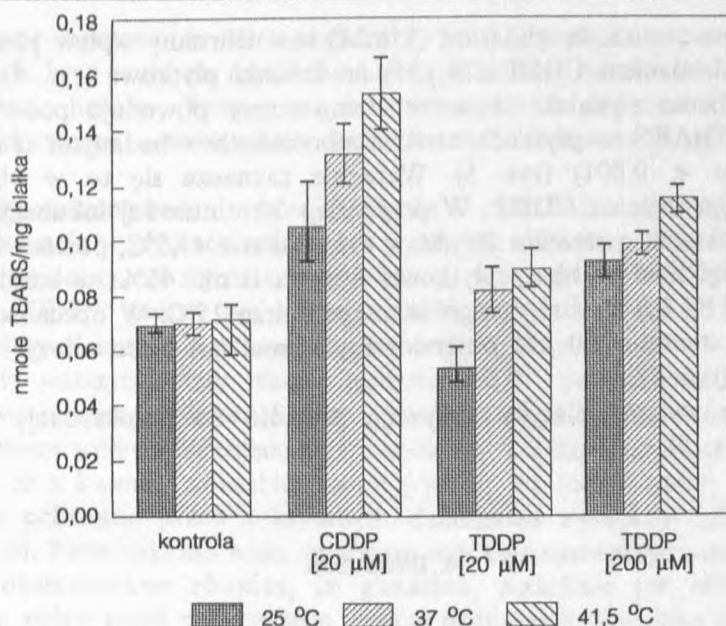
Rys. 2. Wytwarzanie TBARS w płytkach krwi kontrolnych (autoperoksydacja) oraz po inkubacji z CDDP (20 μM), TDDP (20 i 200 μM) (25°C)



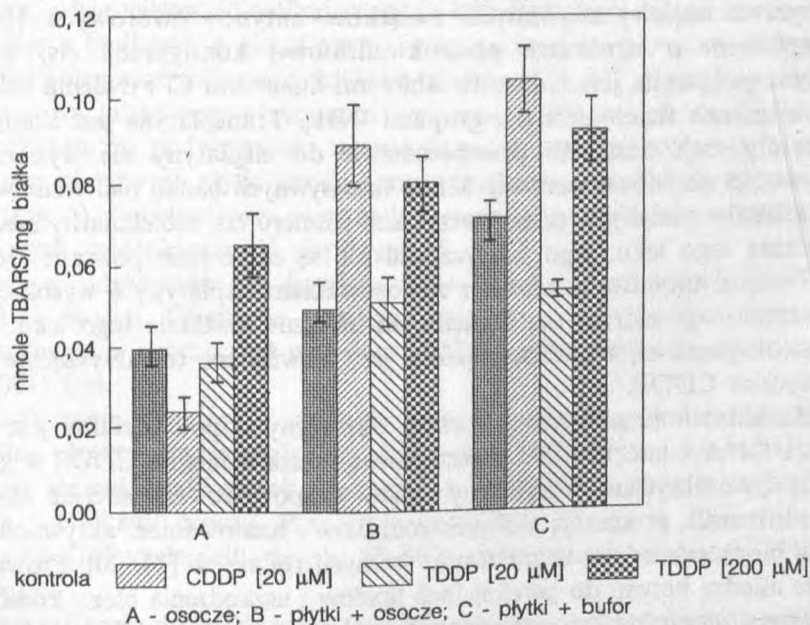
Rys. 3. Poziom TBARS w płytkach krwi: 1) kontrolnych (□) oraz 2) inkubowanych z TDDP (200 μM) (○) 3) TDDP (200 μM) i seleninem sodu (20 μM) dodawanymi równocześnie (∇) i 4) w płytkach preinkubowanych 10 min z seleninem (20 μM) i inkubowanych z TDDP (200 μM) (●)



Rys. 4. Poziom TBARS w płytkach krwi kontrolnych i inkubowanych 30 min z GSH (1 mM), z CDDP (20 μM) oraz inkubowanych równocześnie z CDDP (20 μM) i GSH (1 mM) (25°C)



Rys. 5. Wpływ temperatury na poziom TBARS w płytkach kontrolnych oraz w płytkach krwi inkubowanych z CDDP (20 μM) i TDDP (20 i 200 μM) (30 min)



Rys. 6. Wpływ osocza na peroksydację lipidów płytek krwi indukowaną (30 min, 25°C) działaniem kompleksów platyny (CDDP - 20 μM) i TDDP (20 i 200 μM). Tworzenie TBARS: w osoczu (A), w płytkach krwi zawieszonych w osoczu (B) i płytkach zawieszonych w zmodyfikowanym buforze Tyroda (C)

Zaobserwowano, że glutation (1 mM) ma ochronny wpływ przed utleniającym działaniem CDDP (20 μM) na krwinki płytkowe (rys. 4).

Stwierdzono również, że wzrost temperatury powoduje podwyższenie poziomu TBARS w płytkach krwi inkubowanych z badanymi izomerami platyny ($p < 0,001$) (rys. 5). Wyraźnie zaznacza się to w obecności stosowanego stężenia CDDP. W przypadku 30-minutowej inkubacji płytek krwi z cisplatyną o stężeniu 20 μM w temperaturze 41,5°C, poziom markera peroksydacji lipidów błony płytkowej wzrasta o ok. 45%, w stosunku do poziomu TBARS rejestrowanego w temperaturze 25°C. W obecności transplatyny o stężeniu 200 μM obserwowany wzrost jest nieco niższy i wynosi ok. 25% (rys. 5).

Badane związki platyny wpływają ponadto na peroksydację lipidów osocza (rys. 6).

4. DYSKUSJA

Liczne kompleksy platyny odgrywają istotną rolę w terapii nowotworowej. Najpowszechniej stosowanym lekiem jest cisplatyna, która od 1984 r. jest jednym z częściej używanych związków antynowotworowych [16]. Jest kompleksem o strukturze płaskokwadratowej konfiguracji cis, w której platyna połączona jest z dwoma labilnymi ligandami Cl i dwiema stabilnymi w warunkach fizjologicznych grupami $-\text{NH}_3$. Transplatyna jest kompleksem o konfiguracji trans. W przeciwieństwie do cisplatyny nie wykazuje ona aktywności antynowotworowej. Mimo intensywnych badań nad właściwościami kompleksów platyny, a przede wszystkim izomeru cis, molekularny mechanizm działania tego leku, jego toksyczność nie są całkowicie poznane [16, 20].

Terapia antynowotworowa z zastosowaniem cisplatyny o wysokiej dawce jest często ograniczona ze względu na uboczne działanie tego leku. Oprócz nefrotoksyczności, trombocytopenia jest zjawiskiem towarzyszącym terapii z użyciem CDDP.

Za aktywność antynowotworową cisplatyny odpowiedzialna jest reakcja leku z DNA komórki i DNA jest główną tarczą działania CDDP w komórce [1, 2]. Cytotoksyczność cisplatyny może być spowodowana stresem oksydacyjnym komórki, produkcją wolnych rodników i hamowaniem aktywności enzymów biorących udział w zmiataniu wolnych rodników [14, 20]. Prowadzić to może między innymi do peroksydacji lipidów i uszkodzenia błony komórkowej.

Hematologiczną cytotoksyczność cisplatyny zwiększa hipertermia [5, 10]. Zjawisko wzrostu cytotoksyczności wywołanej tym procesem częściowo zależne jest od zwiększonego włączania CDDP do tkanek oraz wzrostu wiązań krzyżowych z DNA.

Wstępne badania *in vitro* wykazały, że lek stymuluje powstawanie w płytkach krwi wolnych rodników i inicjuje zależną od stosowanej dawki peroksydację lipidów. Towarzyszy temu hamowanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych – peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej [18, 19].

Przeprowadzone badania potwierdziły, że w obecności cisplatyny dochodzi do powstawania w płytkach związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w sposób zależny od stężenia tego leku, co wskazuje na zachodzący pod wpływem CDDP proces peroksydacji lipidów (rys. 1). Izomer cisplatyny – transplatyna indukuje proces peroksydacji lipidów płytek w stężeniach 10-krotnie wyższych. Przy niskim stężeniu TDDP zaobserwowano nawet zahamowanie autoperoksydacji (rys. 1). Obecność seleninu w środowisku inkubacyjnym wpływa hamująco na inkubowaną platyną produkcję związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (rys. 3). Ta forma selenu wykazuje działanie ochronne przed toksycznym działaniem związków platyny na płytki krwi. Potwierdzono więc, że selenin redukuje cytotoksyczność platyny [13]. Zaobserwowano również, że glutation, podobnie jak selenin, ma ochronny wpływ przed peroksydacją lipidów płytkowych wywołaną działaniem CDDP (rys. 4). CDDP wnikając do komórek na drodze aktywnego transportu, bądź dyfuzji biernej, akumuluje się przede wszystkim w cytozolu i w mitochondriach, gdzie większość wnikającego do komórek tego związku wchodzi w interakcję z białkami, z glutationem tworzy kompleks glutation–platyna, który może potęgować toksyczne działanie cisplatyny [4, 12]. Cytotoksyczność CDDP wzrasta także przy obniżonym poziomie GSH w komórce [11].

Stwierdzono, że podwyższenie temperatury wzmagą toksyczne działanie kompleksów platyny na płytki krwi poprzez zwiększoną produkcję związków TBARS (rys. 5). Potwierdzono więc, że hipertermia jest jednym z czynników wzmagających cytotoksyczność cisplatyny [5, 10].

CDDP, w odróżnieniu do izomeru trans hamuje peroksydację lipidów obecnych w osoczu. Obniżenie poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym w osoczu pod wpływem CDDP jest statystycznie znamienne ($p < 0,001$) (rys. 6).

Jak wykazano, osocze nie ma ochronnego działania przed peroksydacją lipidów płytkowych wywołanych działaniem cisplatyny i transplatyny o wysokim stężeniu, jakkolwiek wiadomo, że kompleksy platyny wchodzi w reakcję z białkami osocza. Przy stężeniu CDDP 20 $\mu\text{g/ml}$, P e n d y a l a i C r e a v e n [12] stwierdzili, że ok. 85–88% całej platyny wiąże się z białkami osocza.

Przeprowadzone doświadczenia *in vitro* wykazały, że platyna zmienia metabolizm płytek krwi.

Poznanie działania związków platyny na metabolizm i funkcje płytek krwi pozwoli na stosowanie odpowiedniej terapii uwzględniającej efekt

uboczny leku i umożliwi wyjaśnienie mechanizmu działania tego leku na inne komórki krwi.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Akaboshi M., Kawai K., Maki H., Akuta K., Ujeno Y., Ono K., Miyahara T. (1993), *Nucl. Med. Biol.*, **20**, 389-393.
- [2] Akaboshi M., Kawai K., Ujeno, Y., Takada S., Mijahara T. (1994), *J. Cancer Res.*, **85**, 106-111.
- [3] Górski J. (1992), „*Medycyna 2000*”, **23/24**, 60-64.
- [4] Ishikawa T., Ali-Osman F. (1993), *J. Biol. Chem.*, **268**, 20116-20125.
- [5] Los G., Van Vugt M. J. H., Pinedo H. M. (1994), *Br. J. Cancer*, **69**, 235-241.
- [6] Markwell M. A. K., Hass S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. (1978), *Anal. Biochem.*, **87**, 206-210.
- [7] Milano G. (1988), *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 981-982.
- [8] Miller C. B., Platanius L. C., Mills S. R., Zahurak M. L., Ratain M. J., Ettinger D. S., Jones R. J. (1992), *J. National. Cancer Institute*, **2**, 98-103.
- [9] Odenhaimer B., Wolf W. (1992), „*Inorganica Chimica Acta*”, **65**, 41-43.
- [10] Ohno S., Strebel F. R., Stephens L. C., Siddik Z. H., Baba H., Makino M., Khokhar A. R., Bull J. M. C. (1993), *Br. J. Cancer*, **68**, 469-4747.
- [11] Oliński R., Zastawny T. H. (1991), *Postępy Biochemii*, **1**, 40-47.
- [12] Pendyala L., Creaven P. J. (1993), *Cancer Res.*, **53**, 5970-5976.
- [13] Satoh M., Naganuma A., Imura N. (1992), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **30**, 439-443.
- [14] Spitz D., Philips J. W., Adams D. T., Sherman C. M., Deen D. F., Li G. C. (1993), *J. Cell. Physiol.*, **156**, 72-79.
- [15] Sugihara K., Nakano S., Gemba M. (1987), *J. Pharmacol.*, **44**, 71-76.
- [16] Treskes M., Van der Vijghw J. F. (1993), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **33**, 93-106.
- [17] Wachowicz B. (1984), *Cell Biochem. Function.*, **2**, 167-170.
- [18] Wachowicz B. (1991), *Acta Biochim. Pol.*, **2**, 87-90.
- [19] Wachowicz B., Kustroń J. (1992), „*Cytobios*”, **70**, 41-47.
- [20] Zhanh J. -G., Lindput E. (1993), „*Biochemical Pharmacology*”, **11**, 2215-2222.

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

Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Barbara Wachowicz, Beata Olas

STIMULATORY EFFECTS OF CIS- AND TRANSPLATIN ON THE LIPID PEROXIDATION IN PIG BLOOD PLATELETS

The effects of cisplatin (cisdiamminedichloroplatinum II) at the concentration of 20 μM and transplatin (transdiamminedichloroplatinum II) at the concentrations of 20 μM and 200

μM on the lipid peroxidation in pig blood platelets were studied in vitro. Cisplatin ($20 \mu\text{M}$) and transplatin at the concentration of $200 \mu\text{M}$ were found to cause a significant increase of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

We have demonstrated, that cisplatin - induced platelet lipid peroxidation was enhanced by hypertermia and the presence of plasma had no protective effect on cisplatin or transplatin - stimulated TBARS generation in pig blood platelets. The extracellular GSH (1 mM) protects against cisplatin - induced lipid peroxidation in blood platelets measured as TBARS.