

Beata Olas, Barbara Wachowicz

ZMIANY AKTYWACJI PŁYTEK KRWI WYWOŁANE DZIAŁANIEM LEKU ANTYNOWOTWOROWEGO – CISPLATYNY

Badano w warunkach *in vitro* wpływ cis- i transplatyny na proces aktywacji płytek krwi, obejmujący agregację oraz sekrecję zmagazynowanych związków. Wykazano, że związki platyny powodują zahamowanie procesu agregacji krwinek płytkowych indukowanego ADP ($10\ \mu\text{M}$) oraz procesu sekrecyjnego stymulowanego trombiną. CDDP ma hamujący wpływ zarówno na sekrecję nukleotydów adeninowych, jak i białek zmagazynowanych w ziarnistościach płytkowych. Badane związki platyny zmieniają poziom dialdehydu małonowego – markera przemiany endogennego kwasu arachidonowego i syntezy tromboksanu A_2 w płytkach.

WSTĘP

Inwazyjny wzrost nowotworu, zwłaszcza w fazie tworzenia przerzutów, jest złożonym i wielostopniowym procesem, w którym istotną rolę odgrywają oddziaływania komórek nowotworowych z innymi komórkami, a w tym również z krwinkami płytkowymi [3–6, 22]. W procesie metastazy istotną funkcję spełnia aktywacja płytek krwi polegająca na adhezji, agregacji komórek oraz sekrecji zmagazynowanych związków. Wiele komórek nowotworowych ma zdolność aktywowania krwinek płytkowych. Zjawisko to może zachodzić dzięki syntezie trombiny oraz bezpośredniemu kontaktowi płytek z komórkami nowotworowymi, wydzielaniu przez nie związków pełniących rolę aktywatorów płytkowych (ADP, proteinaz), a także dzięki zmianom metabolizmu kwasu arachidonowego w niektórych liniach komórek nowotworowych [7].

Procesowi metastazy bardzo często oprócz anemii czy leukopenii towarzyszy zjawisko trombocytopenii, które może wynikać z cytotoksycznego wpływu różnych leków antynowotworowych [13, 14]. Cytostatykiem o dużej skuteczności działania wykorzystywanym w leczeniu różnorodnych nowotworów jest cisplatyna (cis-diamminodichloroplatyna II, CDDP). Wstępne

badania prowadzone w naszej Katedrze wykazały, że cisplatyna hamuje aktywację płytek krwi i ma wpływ na metabolizm tych komórek [21].

Celem obecnych doświadczeń było ustalenie w warunkach *in vitro* wpływu cisplatyny i jej izomeru (transplatyny) charakteryzującego się brakiem antynowotworowego efektu na przebieg agregacji płytek i sekrecji zmagazynowanych w nich związków, na poziom MDA, jako markera przemiany endogennego arachidonianu oraz na syntezę tromboksanu A_2 w płytkach pobudzonych trombiną.

MATERIAŁ I METODY

Izolowanie płytek krwi. Płytki krwi otrzymywano metodą wirowania różnicowego świeżej krwi pobranej na roztwór ACD (65 mM kwas cytrynowy/85 mM cytrynian sodu/110 mM glukoza, 5:1 v/v). Komórki przemywano dwukrotnie zmodyfikowanym buforem Tyroda i zawieszano w tym samym buforze do stężenia 10 mg białka płytek/ml. Białko oznaczano zmodyfikowaną metodą Lowry'ego [18].

Pomiar agregacji płytek krwi. Pomiar agregacji płytek krwi przeprowadzono w agregatorze typu Labor APPACT, stosując osocze bogatopłytkowe zawierające 2×10^8 płytek w ml. Po 5-minutowej inkubacji osocza bogatopłytkowego z cisplatyną lub transplatyną (20 μ M) agregację wywoływano ADP (10 μ M).

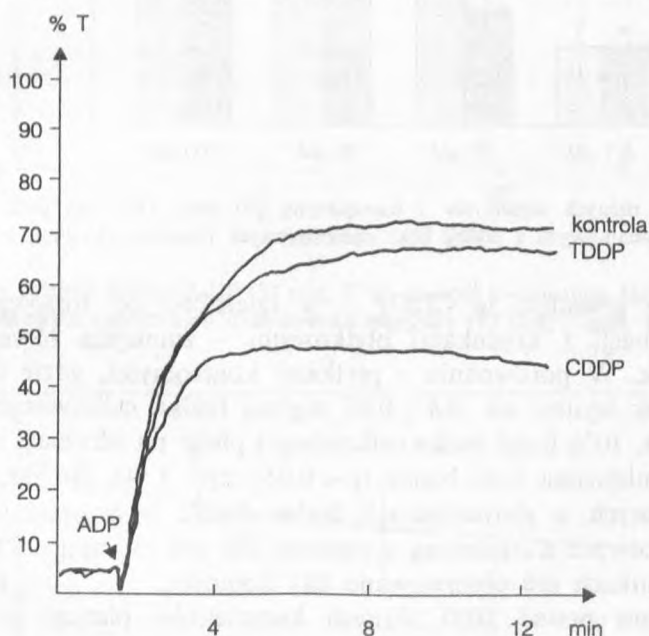
Badanie płytkowej reakcji uwalniania. Nukleotydy adeninowe uwolnione z płytek kontrolnych i preinkubowanych ze związkami platyny po aktywacji trombiną oznaczono metodą spektrofotometryczną w supernatancie (odbiałczenie 1,2 M $HClO_4$). Ilość uwolnionych nukleotydów wyrażono w procentach całkowitej zawartości tych związków w płytkach krwi [20], natomiast ilość uwolnionych białek poprzez pomiar absorbancji przy 280 nm.

Oznaczanie poziomu dialdehydu malonowego (MDA). Po preinkubacji krwinek płytkowych z izomerami platyny (20 μ M, 100 μ M, 0–120 min, 37°C) dodawano trombinę do końcowego stężenia 10 j/ml i inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 min. Reakcję hamowano przez dodanie równej objętości 20% kwasu trichlorooctowego (TCA) w 0,6 M HCl i w supernatancie oznaczano poziom wytworzonego MDA według zmodyfikowanej metody tiobarbiturowej [15, 19].

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

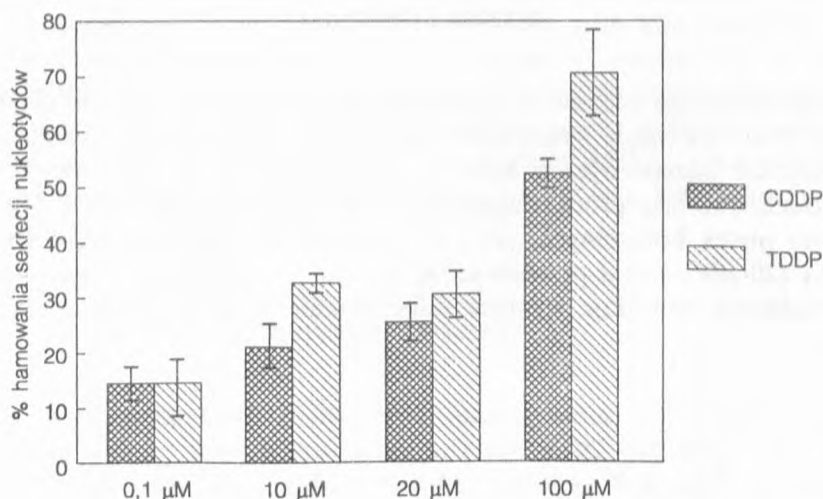
WYNIKI I DISKUSJA

Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że cisplatyna hamuje aktywację płytek krwi mierzoną tworzeniem agregatów płytkowych i uwalnianiem nukleotydów adeninowych i białek zmagazynowanych w płytkowych ziarnistościach. Przebieg procesu agregacji płytek krwi wywołany ADP ($10\ \mu\text{M}$) zarówno płytek kontrolnych, jak i po 5-minutowej inkubacji z cis- i transplatyną ($20\ \mu\text{M}$) został przedstawiony na rys. 1. Cisplatyna w porównaniu z transplatyną powoduje wyraźne zahamowanie procesu agregacji (rys. 1).



Rys. 1. Porównanie działania cis- i transplatyny ($20\ \mu\text{M}$, 5 min, 37°C) na agregację płytek krwi zawieszonych w osoczu, aktywowanych ADP ($10\ \mu\text{M}$)

Przed przystąpieniem do badania wpływu związków platyny na sekrecję nukleotydów adeninowych określono całkowitą pulę nukleotydów adeninowych obecnych w płytkach krwi świni. Wynosiła ona ok. $70\ \text{nmoli/mg}$ białka płytkowego. W wyniku działania trombiny dochodziło do uwolnienia z ziarnistości ok. $41\ \text{nmoli}$ nukleotydów/mg białka, co stanowi 59% ich całkowitej zawartości. Wartość ta została przyjęta jako punkt odniesienia do dalszych badań (0% hamowania). Stwierdzono, że w płytkach krwi preinkubowanych z cis- lub transplatyną (30 min, 37°C) dochodzi do obniżenia ilości uwalnianych nukleotydów adeninowych jako wzrost procesu hamowania sekrecji, co przedstawiono na rys. 2 ($p < 0,01$).

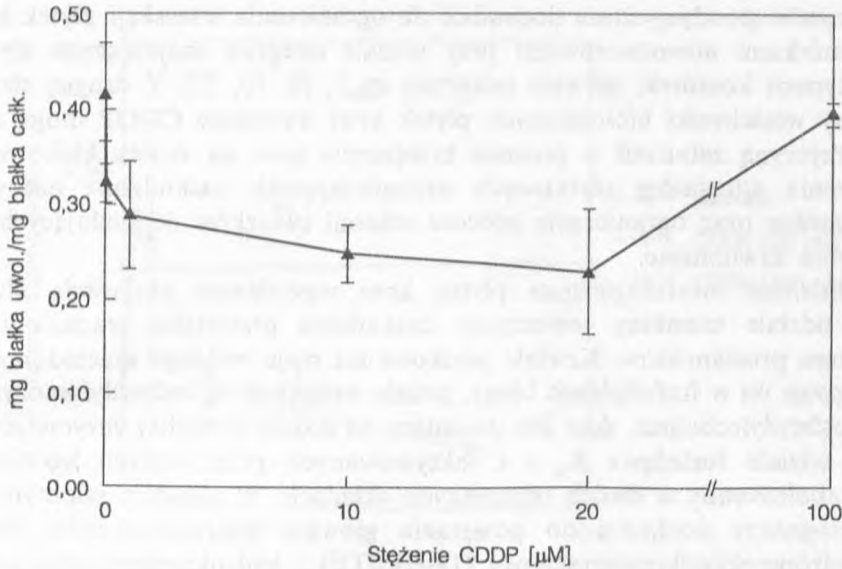


Rys. 2. Wpływ różnych stężeń cis- i transplatyny (30 min, 37°C) na ilość uwalnianych nukleotydów adeninowych z płytek krwi stymulowanych trombiną (10 j/ml, 2 min, 37°C)

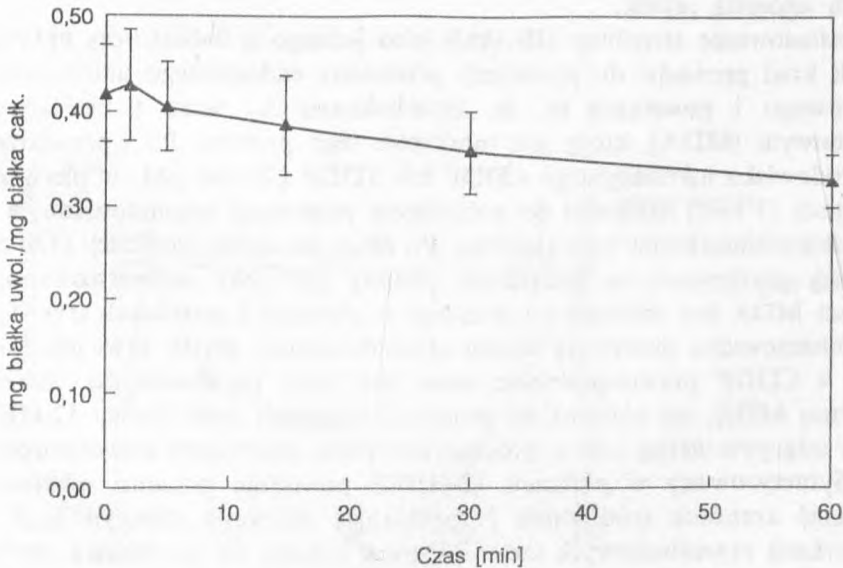
Wykazano ponadto, że CDDP – w zależności od stosowanej dawki i czasu inkubacji z krwinkami płytkowymi – zmniejsza również proces sekrecji białek. W porównaniu z płytkami kontrolnymi, gdzie ilość uwolnionych białek wynosi ok. $0,4 \pm 0,05$ mg/mg białka całkowitego komórek (stanowi to ok. 10% ilości białka całkowitego) płytki po inkubacji z cisplatyną uwalniają zmniejszoną ilość białek ($p < 0,05$) (rys. 3, 4). Do pełnej sekrecji zmagazynowanych w ziarnistościach białek doszło w przypadku inkubacji krwinek płytkowych z cisplatyną o stężeniu 100 μM (30 min, 37°C) (rys. 3). W tych warunkach nie obserwowano lizy komórek.

Obecnie jest ponad 2000 różnych kompleksów platyny stosowanych w terapii przeciwnowotworowej. Obok cisplatyny należą do nich także karboplatyna, lobaplatyna czy ormaplatyna [17]. Oprócz platyny niektóre metale ciężkie (złoto, ruten, rot, pallad, tytan, cyna) oraz ich związki pochodne wykazują aktywność biologiczną wykorzystywaną w leczeniu różnorodnych nowotworów [9]. Chociaż CDDP jest bardzo skutecznym i silnym lekiem cytostatycznym podawanym od wielu lat przy leczeniu różnych nowotworów, to kliniczne zastosowanie tego leku jest ograniczone, m. in. ze względu na jej hematologiczną toksyczność [1, 2, 13, 14]. Hematologiczna toksyczność spowodowana podawaniem cisplatyny obejmuje spadek poziomu granulocytów, jak i obniżenie ilości płytek krwi ($< 50\,000/\text{mm}^3$) [2].

Zahamowanie aktywacji płytek krwi spowodowane działaniem cisplatyny prowadzić może do ograniczenia udziału krwinek płytkowych w procesie metastazy. Na skutek zmniejszania ilości uwolnionych z ziarnistości płytkowych



Rys. 3. Wpływ różnych stężeń CDDP (30 min, 37°C) na ilość uwalnianych białek z ziarnistości płytkowych (płytki krwi stymulowano trombiną (10 j/ml, 2 min, 37°C))



Rys. 4. Wpływ czasu inkubacji płytek z CDDP (0,1 μ M, 37°C) na ilość uwalnianych białek z ziarnistości płytkowych (płytki krwi stymulowano trombiną (10 j/ml, 2 min, 37°C))

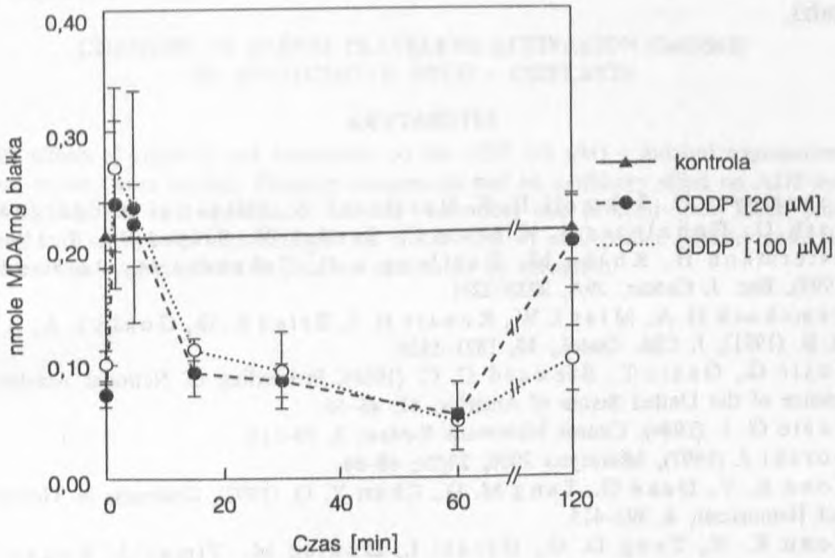
białek adhezywnych: fibrynogenu, fibronektyny, czynnika von Willebranda czy trombospondyny może dochodzić do ograniczenia interakcji płytek krwi z komórkami nowotworowymi przy udziale integrzyn znajdujących się na obu typach komórek, głównie integrzyn $\alpha_{IIb}\beta_3$ [8, 10, 22]. Z drugiej strony zmiany właściwości biologicznych płytek krwi wywołane CDDP mogą stać się przyczyną zaburzeń w procesie krzepnięcia krwi na skutek blokowania tworzenia agregatów płytkowych uszczelniających uszkodzone naczynia krwionośne oraz ograniczenia procesu sekrecji związków oddziałujących na naczynia krwionośne.

Zmianom morfologicznym płytek krwi wywołanym aktywacją płytek przy udziale trombiny towarzyszy kaskadowa przemiana arachidonianu i synteza prostanoidów. Krwinki płytkowe nie mają wolnego arachidonianu. Występuje on w fosfolipidach błony, przede wszystkim w fosfatydyloinozytolu czy fosfatydylocholinie, skąd jest uwalniany na drodze hydrolizy enzymatycznej przy udziale fosfolipaz A_2 i C aktywowanych przez silnych agonistów i metabolizowany w dwóch odmiennych układach. W układzie zależnym od lipoksygenazy dochodzi do powstania głównie hydroksykwasów (kwas 12-hydroperoksyeikozatetraenowy (12-HPETE) i hydroksyeikozotetraenowy (12-HETE) oraz hepoksyliny A_3 – związku, który hamuje agregację płytek krwi [11, 12]. W przemianie zależnej od cyklooksygenazy powstaje oprócz nadtlenków prostaglandyn przede wszystkim tromboksan A_2 , który jest silnym agonistą płytek.

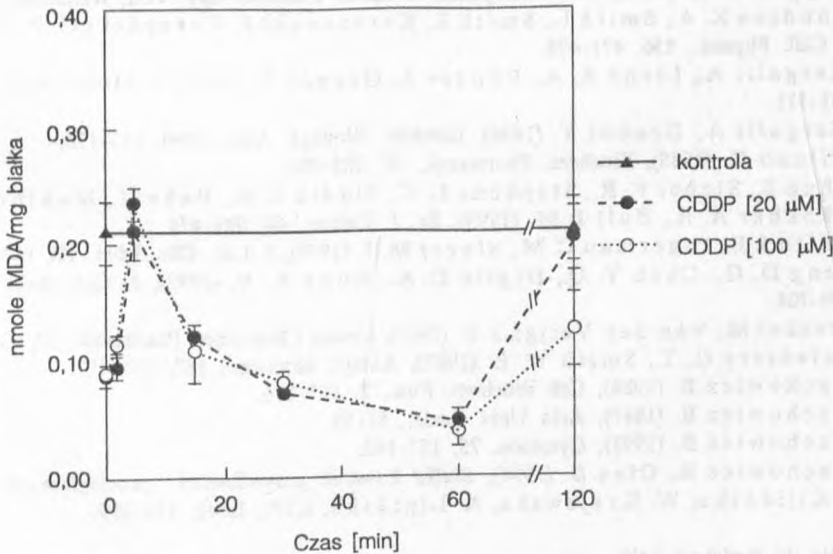
Zastosowanie trombiny (10 j/ml) jako jednego z induktorów aktywacji płytek krwi prowadzi do stymulacji przemiany endogennego arachidonianu płytkowego i powstania m. in. tromboksanu A_2 wraz z dialdehydem malonowym (MDA), który jest markerem tego procesu. Po wprowadzeniu do środowiska inkubacyjnego CDDP lub TDDP (20–100 μM) w pierwszych minutach (5 min) dochodzi do pobudzenia przemiany arachidonianu, a następnie do hamowania tego zjawiska. Po dłuższym czasie inkubacji (120 min) krwinek płytkowych ze związkami platyny (20 μM) zaobserwowano, że poziom MDA jest zbliżony do poziomu w płytkach kontrolnych (rys. 5, 6).

Zahamowanie przemiany kwasu arachidonowego płytek krwi inkubowanych z CDDP prawdopodobnie może nie tylko prowadzić do obniżenia poziomu MDA, ale również do produkcji mniejszej ilości kwasu 12-HETE, który odgrywa ważną rolę w procesie tworzenia przerzutów nowotworowych [6]. Syntetyzowany w płytkach 12-HETE powoduje ponadto odwracalną retrakcję komórek śródbłonna i zwiększając ekspresję integrzyn $\alpha_{IIb}\beta_3$ na komórkach nowotworowych może inicjować adhezję do śródbłonna zarówno leukocytów, jak i komórek nowotworowych [6, 16].

Poznanie mechanizmów działania CDDP na krwinki płytkowe i reakcji odpowiedzialnych za właściwości antynowotworowe cisplatyny umożliwi stosowanie właściwej terapii.



Rys. 5. Wpływ CDDP (20 μ M, 100 μ M, 37°C) na enzymatyczne wytwarzanie MDA w płytkach krwi aktywowanych trombiną (10 j/ml, 2 min, 37°C)



Rys. 6. Wpływ TDDP (20 μ M, 100 μ M, 37°C) na enzymatyczne wytwarzanie MDA w płytkach krwi aktywowanych trombiną (10 j/ml, 2 min, 37°C)

Autorzy dziękują Profesorowi Czesławowi Cierniewskiemu za możliwość przeprowadzenia pomiaru agregacji płytek krwi w Zakładzie Biofizyki AM w Łodzi.

LITERATURA

- [1] Bokemeyer C., Schmoll H. J., Harstnick A., Illiger H. J., Metzner B., Rath U., Hohnlosen J., Clerum C., Berdel W., Sieget W., Ruther U., Ostermann H., Kneba M., Hartlapp J. H., Schroder M., Poliwoda H. (1993), *Eur. J. Cancer*, **29A**, 2225–2231.
- [2] Demchack D. A., Mier J. W., Robert N. J., Brien K. O., Gould J. A., Atkin M. B. (1991), *J. Clin. Oncol.*, **10**, 1821–1830.
- [3] Gasic G., Gasic T., Steward C. C. (1968), *Proceeding of National Academy of Science of the United States of America*, **61**, 46–56.
- [4] Gasic G. J. (1984), *Cancer Metastasis Review*, **3**, 99–116.
- [5] Górski J. (1992), *Medycyna* 2000, **23/24**, 60–64.
- [6] Honn K. V., Dean G., Tang M. D., Chen Y. Q. (1992), *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **4**, 392–415.
- [7] Honn K. V., Tang D. G., Grossi I., Duniec M., Timar J., Renaud C., Leithauser M., Blair I., Jahnson C. R., Diglio C. A., Kimler V. A., Taylor J. D., Marnett L. J. (1994), *Cancer Res.*, **54**, 565–574.
- [8] Incordona F., Calvo F., Fravel-Lafeve F., Legrand Y., Legrant C. (1993), *Inter. J. Cancer*, **55**, 471–477.
- [9] Keppler B. K. (1993), *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCh, Weinheim, 9–23.
- [10] Knudsen K. A., Smith L., Smith S., Karczewski J., Tuszyński G. P. (1988), *J. Cell. Physiol.*, **136**, 471–478.
- [11] Margalit A., Livne A. A., Funder J., Granot Y. (1993), *J. Memb. Biol.*, **136**, 303–311.
- [12] Margalit A., Granot Y. (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, **1190**, 173–176.
- [13] Milano G. (1988), *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 981–982.
- [14] Ohno S., Stebel F. R., Stephens L. C., Siddik Z. H., Baba H., Makino M., Khokhar A. R., Bull J. M. (1993), *Br. J. Cancer*, **68**, 981–474.
- [15] Smith J. B., Ingeman C. M., Sleever M. J. (1976), *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 167–172.
- [16] Tang D. G., Chen Y. Q., Diglio C. A., Honn K. V. (1993), *J. Cell. Biol.*, **121**, 689–704.
- [17] Treskes M., Van der Veijgh J. F. (1993), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **33**, 93–106.
- [18] Vatassary G. T., Smith W. E. (1987), *Analyt. Biochem.*, **167**, 411–417.
- [19] Wachowicz B. (1984), *Cell Biochem. Fun.*, **2**, 167–170.
- [20] Wachowicz B. (1987), *Acta Univ. Lodz.*, 51–59.
- [21] Wachowicz B. (1993), *Cytobios*, **75**, 157–162.
- [22] Wachowicz B., Olas B. (1994), *Białka komórek prawidłowych i patologicznych*, red. Z. Kiliańska, W. Krajewska, A. Lipińska, ŁTN, Łódź, 199–209.

Wpłynęło do Redakcji Folia
28.11.1995 r.

Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

CHANGES OF BLOOD PLATELETS ACTIVATION CAUSED BY ANTITUMOUR DRUG - CISPLATIN

The effects of cisplatin and transplatin on the ADP ($10 \mu\text{M}$) - induced aggregation and secretion *in vitro* were studied. Platinum compounds had an inhibitory effect on ADP-induced platelet aggregation and secretion of adenine nucleotides and proteins from blood platelets. Cisplatin and transplatin also changed the metabolism of endogenous platelet arachidonate and thromboxane A_2 synthesis in platelets stimulated by thrombin.