

Beata Olas, Barbara Wachowicz

WPLYW IZOMERÓW PLATYNY NA BIAŁKA CYTOSZKIELETU PŁYTEK KRWI ŚWINI

Badano w warunkach *in vitro* wpływ izomerów platyny (cis- i transplatyny) o stężeniach 0,1, 1, 10 μM na rozdział elektroforetyczny białek cytoszkieletu płytek krwi świni. Cisplatyna jak i jej izomer trans- wywołuje zmiany w obrazie elektroforetycznym białek cytoszkieletu niezależnie od stosowanej dawki. Stwierdzono również, że cisplatyna o stężeniu 20 μM powoduje obniżenie poziomu G aktywny w krwinkach płytkowych.

WSTĘP

Metale ciężkie, takie jak platyna, złoto, ruten, rot, pallad, ren, tytan, cyna oraz ich związki pochodne wykazują aktywność biologiczną wykorzystywaną w leczeniu różnorodnych nowotworów [10]. Jednym z powszechnie stosowanych związków nieorganicznych o działaniu cytostatycznym jest cisplatyna (cis-diamminodichloroplatyna II, CDDP). Wykazuje ona właściwości alkilujące oraz hamuje syntezę DNA [2, 17]. Obecnie jest ok. 2000 różnych związków platyny stosowanych w terapii przeciwnowotworowej. Do związków platyny zalicza się także transplatynę (trans-diamminodichloroplatyna II, TDDP), która w przeciwieństwie do izomeru cis- nie wykazuje właściwości antynowotworowych [18].

Mimo dużej skuteczności działania cisplatyny, kliniczne zastosowanie tego leku jest ograniczone m. in. ze względu na działanie uboczne. Przy dłuższym działaniu lek wywołuje leukopenię, anemię, trombocytopenię [14, 16] oraz działa silnie nefrotoksycznie [18]. Cisplatyna hamuje aktywację płytek krwi [20]. Mechanizm działania związków platyny na płytki krwi nie jest wyjaśniony.

Celem obecnych badań było ustalenie wpływu izomerów cis- i transplatyny w warunkach *in vitro* na białka cytoszkieletu płytek krwi świni.

MATERIAŁ I METODY

Izolowanie płytek krwi. Płytki otrzymywano metodą wirowania różnicowego świeżej krwi świni 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 [19].

Otrzymywanie frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie X-100. Do zawiesiny płytek krwi dodawano roztwór cisplatyny lub transplatyny (roztwory w soli fizjologicznej) do końcowego stężenia 0,1 μM , 1 μM oraz 10 μM i inkubowano w czasie 5, 15, 30 min, a następnie działano trombiną (1 j/ml, 3 min, 37°C), po czym reakcję zatrzymywano przez dodanie 10 nmol/l diizopropylodifluorofosforanu (DFP).

Do płytek inkubowanych z izomerami platyny oraz do płytek kontrolnych dodawano równą objętość buforu o składzie: 2% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, pH 7,4 [4]. Mieszaninę pozostawiano na okres 15–20 min, po czym wirowano (20 min, 3200 $\times$ g). Osad frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie przemywano 2-krotnie wyżej wymienionym buforem rozcieńczonym za pomocą 0,9% NaCl w stosunku 1:1, a następnie 0,9% roztworem NaCl. Otrzymaną frakcję białek cytoszkieletu rozpuszczono w buforze zawierającym 2% SDS oraz 8 M mocznik i poddawano analizie w żelu poliakryloamidowym. Elektroforezę przeprowadzano w 8% i 12% żelu z SDS według metody Laemmli'ego [12]. W celu otrzymania preparatów zredukowanych do próbek dodawano β -merkaptotanol do końcowego stężenia 1,4% i ogrzewano przez 5 min w temperaturze 100°C. Żele barwiono za pomocą błękitu Coomassie Brilliant Blue G-250.

Analiza stosunku G/F aktywny. Do oznaczenia zawartości filamentów aktynowych zastosowano metodę opisaną przez Fox i wsp. [5], polegającą na pomiarze stopnia hamowania DNazy I. Po inkubacji z cisplatyną (20 μM , 30 min, 37°C) płytki krwi aktywowano trombiną (0,1 j/ml, 2 min, 37°C), a następnie przeprowadzano lizę komórek buforem pH 7,4 zawierającym 2% Triton X-100, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 100 mM benzamidynę, 2 mM PMSF (stosunek 1:1).

W kolejnym etapie lizat płytek krwi mieszano w stosunku (v/v) 1:1 z buforem pH 7,4 zawierającym 10 $\mu\text{g/ml}$ DNazy I, 0,1 mM CaCl_2 , 10 μM PMSF, 50 mM Tris-HCl. Natychmiast po zmieszaniu 20 μl mieszaniny dodawano do 3 ml buforu o składzie 40 $\mu\text{g/ml}$ DNA typu I, 1,8 mM CaCl_2 , 4 mM MgSO_4 , 100 mM Tris-HCl (pH 7,4). Reakcję rejestrowano w czasie poprzez pomiar absorbancji przy 260 nm.

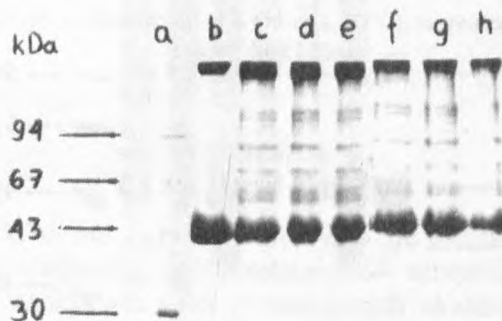
W celu określenia całkowitej ilości aktyny w płytkach lizat inkubowano z podobną ilością buforu depolimeryzującego o pH 8,4 (1,5 mM chlorowodorek guanidyny, 1 M octan sodu, 1 mM ATP, 6 mM CaCl_2 , 20 mM Tris-HCl przez 15 minut w łaźni lodowej, a następnie postępowano jak wyżej.

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

WYNIKI

Rozdział elektroforetyczny białek cytoszkieletu uzyskanych zarówno z kontrolnych płytek krwi świni, jak i z płytek po określonym czasie inkubacji z różnymi dawkami cis- i transplatyny przedstawiono na rys. 1, 2, 3.

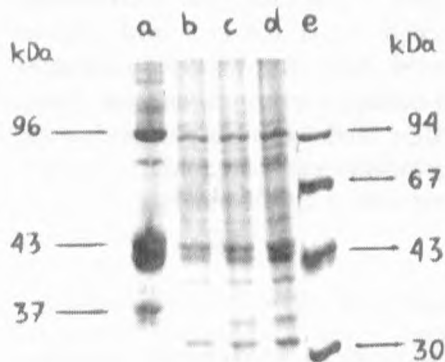
Stwierdzono, że cisplatyna niezależnie od stosowanej dawki 0,1, 1 i 10 μM (czas inkubacji 15 min, 37°C) powoduje zmiany w obrazie elektroforetycznym białek cytoszkieletu (rys. 1, 2). Zmiany te polegały przede wszystkim na zmniejszaniu się frakcji odpowiadającej aktynie (43 kDa). Po 15 min inkubacji płytek krwi z CDDP zaobserwowano pojawienie się nowych frakcji o masie cząsteczkowej 32 kDa, 60 kDa, 68 kDa, 85 kDa i ok. 110 kDa (rys. 1, 2). Podobne zmiany wystąpiły w przypadku inkubacji krwinek płytkowych z TDDP (rys. 1, 3).



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny w 12% żelu poliakryloamidowym frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie X-100

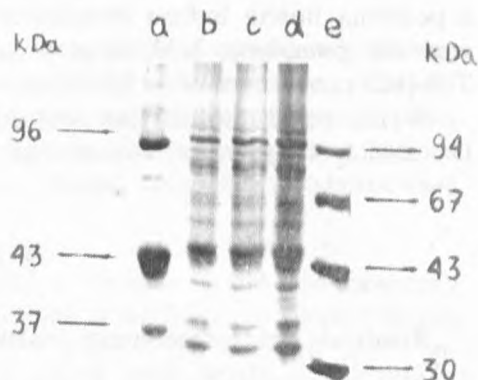
a – wzorce białkowe, b – płytki kontrolne, c – płytki inkubowane z cisplatyną (0,1 μM), d – płytki inkubowane z cisplatyną (1 μM), e – płytki inkubowane z cisplatyną (10 μM), f – płytki inkubowane z transplatyną (0,1 μM), g – płytki inkubowane z transplatyną (1 μM), h – płytki inkubowane z transplatyną (10 μM)

Po 15 min inkubacji płytek krwi z izomerami platyny przeprowadzono aktywację komórek trombiną (1 j/ml, 3 min, 37°C)



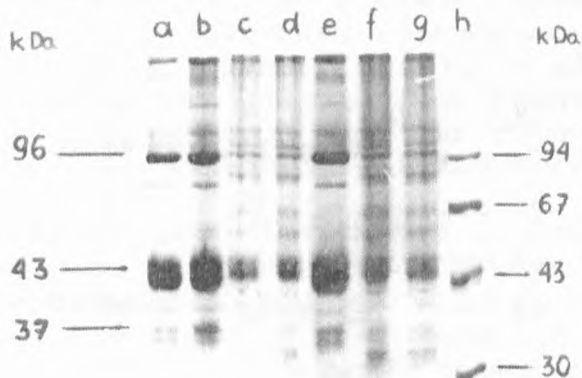
Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny w 8% żelu poliakrylamidowym frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie X-100

a – płytki kontrolne, b – płytki inkubowane z cisplatyną (0,1 μ M), c – płytki inkubowane z cisplatyną (1 μ M), d – płytki inkubowane z cisplatyną (10 μ M), e – wzorce białkowe. Po 15 min inkubacji płytek krwi z cisplatyną przeprowadzono aktywację komórek trombiną (1 j/ml, 3 min, 37°C)



Rys. 3. Rozdział elektroforetyczny w 8% żelu poliakrylamidowym frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie X-100

a – płytki kontrolne, b – płytki inkubowane z transplatyną (0,1 μ M), c – płytki inkubowane z transplatyną (1 μ M), d – płytki inkubowane z transplatyną (10 μ M), e – wzorce białkowe. Po 15 min inkubacji płytek krwi z transplatyną przeprowadzono aktywację komórek trombiną (1 j/ml, 3 min, 37°C)

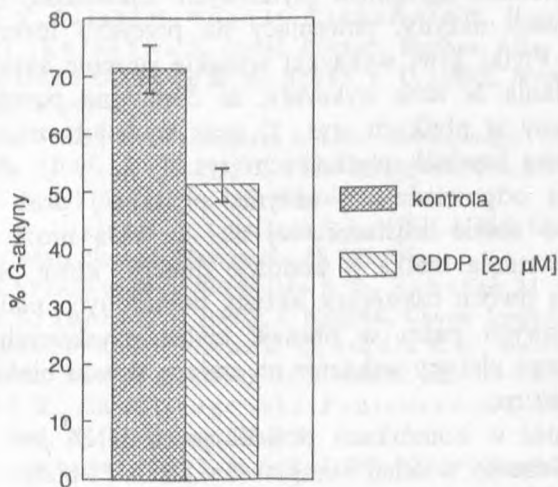


Rys. 4. Rozdział elektroforetyczny w 12% żelu poliakrylamidowym płytek krwi preinkubowanych z cis- czy transplatyną o stężeniu 10 μ M (37°C) oraz aktywowanych trombiną (1 j/ml, 3 min, 37°C)

a – płytki kontrolne, b – płytki inkubowane z cisplatyną (5 min), c – płytki inkubowane z cisplatyną (15 min), d – płytki inkubowane z cisplatyną (30 min), e – płytki inkubowane z transplatyną (5 min), f – płytki inkubowane z transplatyną (15 min), g – płytki inkubowane z transplatyną (30 min), h – wzorce białkowe

Wykazano ponadto, że zmiany w obrazie elektroforetycznym spowodowane działaniem izomerów platyny zależą od czasu inkubacji (5, 15, 30 min). Zmiany w rozdzielanych elektroforetycznie białkach cytoszkieletu można już zaobserwować po 15 min działania związków platyny na krwinki płytkowe (rys. 4).

Dzięki zastosowaniu metody opierającej się na hamowaniu aktywności DNazy I stwierdzono, że ilość G aktywny w płytkach kontrolnych stymulowanych 2 min trombiną wynosi $71,3 \pm 4,1\%$, natomiast po preinkubacji 30 min z CDDP (20 μM) ilość G aktywny spada do $50,9 \pm 2,8\%$ (rys. 5).



Rys. 5. Wpływ cisplatyny o stężeniu 20 μM (30 min, 37°C) na poziom G-aktywny w płytkach krwi ($p < 0,05$)

DYSKUSJA

Rola płytek krwi nie ogranicza się tylko do uczestnictwa w procesie hemostazy, która obejmuje zespół mechanizmów utrzymujących stan płynny krwi krążącej w naczyniach oraz powodujących zahamowanie krwawienia po uszkodzeniu ściany naczynia. Płytki biorą udział w tworzeniu zakrzepów, powstawaniu zmian miażdżycowych w ścianie naczynia, w procesach zapalnych, uczestniczą także w procesie metastazy.

Aktywację płytek krwi mogą stymulować komórki nowotworowe. Adhezja, agregacja oraz sekrecja zmagazynowanych związków odgrywa kluczową rolę w procesie metastazy [9, 22].

Aktywacji krwinek płytkowych towarzyszy stymulacja przemiany polifosfoinozytydów. Dzięki temu dochodzi do aktywacji fosfolipazy A_2 , C i D [3].

Aktywacja fosfolipazy C prowadzi do powstania dwóch wtórnych przekazników diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-trifosforanu (IP3). DAG poprzez kolejne etapy prowadzi do procesu sekrecji, natomiast IP3 wpływa na mobilizację wapnia w cytozolu, a współdziałając z kinazą lekkiego łańcucha miozyny prowadzi do jej fosforylacji [6, 8]. Dzięki temu procesowi miozyna wykazuje zdolność wchodzenia w interakcje z aktyną, powodując w ten sposób reorganizację cytoszkieletu i zmiany kształtu płytek krwi [1, 7].

Silnym aktywatorem płytek krwi jest m. in. trombina, która wpływa na serię morfologicznych i biochemicznych zmian, gdzie w końcowym efekcie dochodzi do powstania agregatów płytkowych. Zjawiskom tym towarzyszy proces polimeryzacji aktyny, polegający na przejściu formy G w formę F-aktyny [1, 5]. Płytki krwi wykazują wysokie stężenie aktyny [5].

Wstępne badania *in vitro* wykazały, że cisplatyna powoduje obniżenie poziomu G aktyny w płytkach (rys. 5) oraz wywołuje zmiany w składzie białek cytoszkieletu krwinek płytkowych (rys. 1, 2, 3, 4). Zmniejszanie się frakcji białkowej odpowiadającej aktynie płytkowej oraz pojawienie się nowego pasma o masie cząsteczkowej ok. 85 kDa może sugerować, że dochodzi do powstania białka o budowie dimeru, które prawdopodobnie zbudowane jest z dwóch cząsteczek aktyny połączonych platyną. Obecność licznych dodatkowych pasm w obrazie białek uzyskanych po inkubacji płytek ze związkami platyny wskazuje na zmianę składu białek cytoszkieletu wywołaną tym lekiem.

Aktyna również w komórkach posiadających DNA jest podstawowym białkiem, które wchodzi w skład kompleksów DNA-Pt-białko indukowanych działaniem związków metali, a w tym izomerów platyny [11, 15, 23].

Cisplatyna reaguje nie tylko z DNA, ale dzięki obecności grup NH_2 ma zdolność reagowania ze związkami zawierającymi grupy tiolowe [13, 21]. Cisplatyna, podobnie jak jej izomer trans-, reaguje z grupami SH białek cytoszkieletu. Nie stwierdzono istotnych różnic między działaniem izomeru trans- a cis-. Wskazuje to na rolę grup NH_2 niezależnie od izomerii w reakcji z grupami SH.

Zmiany w organizacji białek cytoszkieletu, głównie poziomu aktyny, spowodowane działaniem związków platyny mogą być przyczyną zaburzeń aktywacji płytek krwi towarzyszącej terapii. Wydaje się, że cisplatyna stosowana jako lek antynowotworowy może być również lekiem antypłytkowym o istotnej roli w metastazie.

Badania prowadzone w naszym laboratorium wykazały, że cisplatyna powoduje zahamowanie aktywacji krwinek płytkowych wywołanej trombiną [20].

Wyjaśnienie mechanizmów działania kompleksów platyny na komórkę, w tym na płytkę krwi oraz poznanie reakcji odpowiedzialnych za aktywność biologiczną tych związków wymaga dalszych badań i być może umożliwi w przyszłości stosowanie właściwej terapii.

LITERATURA

- [1] Clark E. A., Shattil S. J., Brugge J. S. (1994), *TIBS*, **19**, 464-469.
- [2] Comis R. L. (1994), *Seminars in Oncology*, **5**, 109-113.
- [3] Fan X. T., Sherwood J. L., Haslam R. J. (1994), *Biochem J.*, **299**, 701-709.
- [4] Fujimura K., Fujimoto T., Takemoto M., Oda K., Shimomura T., Machama S., Koramoto S. (1990), *Thromb. Haemost.*, **63**, 103-111.
- [5] Fox J. B., Dockter M. E., Philips D. R. (1981), *Analyt. Biochem.*, **117**, 170-177.
- [6] Furman M. I., Gardner T. M., Goldschmidt-Clermont P. J. (1993), *Tromb. Haemost.*, **70**, 229-232.
- [7] Haslam R. J. (1987), *Tromb. Haemost.*, **8**, 147-174.
- [8] Hashimoto Y., Sasaki H., Togo M., Tsukamoto K., Horie Y., Fukata H., Watanabe T., Kurokawa K. (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, **1223**, 163-169.
- [9] Honn K. V., Dean G., Tang M. D., Chen Y. Q. (1992), *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **4**, 392-415.
- [10] Keppler B. K. (1993), *Metal complexes in cancer chemotherapy*, VCH, Weinheim, 9-23.
- [11] Kulamowicz I., Walter Z. (1989), *Studia Biophysica*, **134**, 215-222.
- [12] Laemmli U. K. (1979), *Nature*, **227**, 680-685.
- [13] Marshall L. B., Figler N. L., Goniast S. L. (1992), *J. Biol. Chem.*, **267**, 6347-6352.
- [14] Milano G. (1988), *Biochem Pharmacol.*, **37**, 981-982.
- [15] 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**, 99-103.
- [16] 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**, 469-474.
- [17] Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A. (1993), *Leki współczesnej terapii*, PWN, wyd. XI, Warszawa, 210-212.
- [18] Treskas M., Van der Vijgh W. J. F. (1993), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **33**, 93-103.
- [19] Vatassary G. T., Smith W. E. (1987), *Analyt. Biochem.*, **167**, 411-417.
- [20] Wachowicz B. (1993), *Cytobios*, **75**, 157-162.
- [21] Wachowicz B., Krajewski T., Olas B., Żbikowska M. (1995), *J. Physiol. Pharmacol.*, **46**, 97-103.
- [22] Wachowicz B., Olas B. (1994), [w:] *Białka komórek prawidłowych i patologicznych*, red. Z. Kiliańska, W. Krajewska, A. Lipińska, ŁTN, 199-209.
- [23] Walter Z., Spychała M. (1992), *Acta Biochim. Polon.*, **39**, 45-48.

Wpłynęło do Redakcji Folia
28.06.1995 r.

Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Beata Olas, Barbara Wachowicz

THE EFFECTS OF PLATINUM IZOMERS ON CYTOSKELETON PROTEINS IN PIG BLOOD PLATELETS

The effects of cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II, CDDP) and transplatin (trans-diamminedichloroplatinum, TDDP) at concentrations of 0.1, 1 and 10 μM on platelet cytoskeleton protein composition were studied *in vitro*. Cisplatin and transplatin were found to cause the changes of cytoskeleton proteins. On the other hand in the presence of CDDP (20 μM) the percent of G-actin was reduced.