

Sledování interakce protinádorových léčiv s látkami obsahujícími thiolovou skupinu.

Adam V.¹, Zítka O.^{1,2}, Húska D.¹, Křížková S.¹, Horna A.³, Beklová M.⁴, Trnková L.⁵, Kizek R.^{1,*}

1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

2) Katedra biochemie a 5Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

3) Radanal s.r.o., Pardubice

4) Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně

*) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz

Klíčová slova: Thioly – glutathion – cisplatina – interakce – elektrochemické techniky – protinádorová léčba

Úvod

Lékařská anorganická chemie existuje jako vědní disciplína více než 40 let, přičemž základním kamenem bylo objevení protinádorových vlastností cisplatiny (komplex *cis*-diaminodichloroplatnatý – *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]) [1,2]. Jeho biologická aktivita byla objevena v roce 1965 Rosenborgem během jeho studií vlivu elektrického proudu na růst bakterií. I přesto, že od jeho objevu uplynulo více než čtyřicet let, je cisplatina stále nejčastěji používaným cytotoxickým prostředkem při léčbě různých druhů nádorových onemocnění. Ovšem vývoj pokračoval dál a během těch čtyřiceti let byly objeveny stovky platnatých a platičitých kom-

plexů, které byly s většími či menšími úspěchy testovány při léčbě nádorových onemocnění [4,5]. V osmdesátých letech minulého století byla vyvinuta platinová léčiva „druhé generace“, jejichž zástupcem je karboplatina [*cis*-diamino(1,1-cyklobutan-dikarboxyláto)platnatý komplex], jako méně toxická alternativa k cisplatině vykazující méně vedlejších efektů [6,7]. Zatímco oxaliplatinová [oxaláto-1,2-diaminocyklohexan platnatý komplex] byla navržena v letech devadesátých jako další, již „třetí generace“ platinových léčiv [1,8,9]. Její hlavní předností je schopnost překonání resistance nádorových buněk vůči cisplatině a karboplatině. Kromě těchto obecně používaných léčiv je stále vyvíjena řada dalších jako například LA-12 [(OC-6-43)-bis-(acetáto)(1-adamantylamin)amminodichloro platičitý komplex] [10,11].

Ačkoliv jsou platinová cytostatika úspěšně aplikována při chemoterapii různých typů zhoubných onemocnění po více než třicet let, jejich biochemický účinek není ještě dosud zcela jasný. Dnes obecně akceptovaným názorem je, že toto léčivo indukují své cytotoxické vlastnosti prostřednictvím vazby na buněčnou DNA a následně tak narušuje transkripci a DNA replikační mechanismy [2]. Chaney et al. [12,13,14] objevili, že cisplatinová, karboplatinová a oxaliplatinová tvoří stejné typy aduktů na stejných místech v molekule DNA. Konkrétně, platinová cytostatika se dokáže vázat na N7 dvou sousedících guaninů nebo adeninů, přičemž daný dusík už není schopen vytvářet vazbu pomocí vodíkových můstků s dalšími bázemi, které leží ve stejném nebo protějším vlákně DNA.

Samotný účinek platinových cytostatik je velmi negativně ovlivňován mnoha různými reparačními a obrannými buněčnými mechanismy, mezi které patří exprese různých thiolových látek včetně všudypřítomného peptidu glutathionu. Velmi reaktivní -SH skupina toho tripeptidu je schopna vázat mnoho různých látek, a proto není překvapením, že ovlivňuje léčbu různých onemocnění včetně zmíněných nádorových [15,17], avšak přesný mechanismus je neznámý. Proto jsme se rozhodli studovat interakce glutathionu s cisplatinou. Nejprve jsme charakterizovali základní elektrochemické chování třech různých glutathionů (redukovaného, oxidovaného a S-nitroso). Za optimálních podmínek jsme provedli *in vitro* interakční studii.

Materiál a metody

Chemikálie

Redukovaný glutathion (GSH), oxidovaný glutathion (GSSG) a S-nitrosoglutathion (GSNO) byly získány od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) byl zakoupen od laboratoře Molecular Probes (Eugen, Oregon, USA). Chlorid sodný, dusičnan kademnatý, dusičnan zinečnatý a ostatní použité chemikálie byly získány od firmy Sigma Aldrich. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byly připraveny v ACS vodě (Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při teplotě -20°C . Pracovní roztok byl připravován denně ředěním zásobních roztoků. Hodnoty pH byly měřeny s použitím WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), spojeným s osobním počítačem (Weilheim). pH-electroda (SenTix-H) byla pravidelně kalibrována souborem WTW pufrů. Všechny roztoky byly před analýzou filtrovány přes teflonový filtr 0.45 μm (MetaChem, Torrance, CA, USA).

Příprava komplexu GS-Pt

GS-Pt komplex byl připraven podle práce autorů Ishikawa a Ali-Osman [18]. Ve zkratce, inkubovali jsme GSH (60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) s cisplatinou (30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v 500 μl 100 mM fosfátového pufru pH 7.8 ve tmě při teplotě 37°C (thermostat BTV Brno) [19].

Stacionární elektrochemický systém

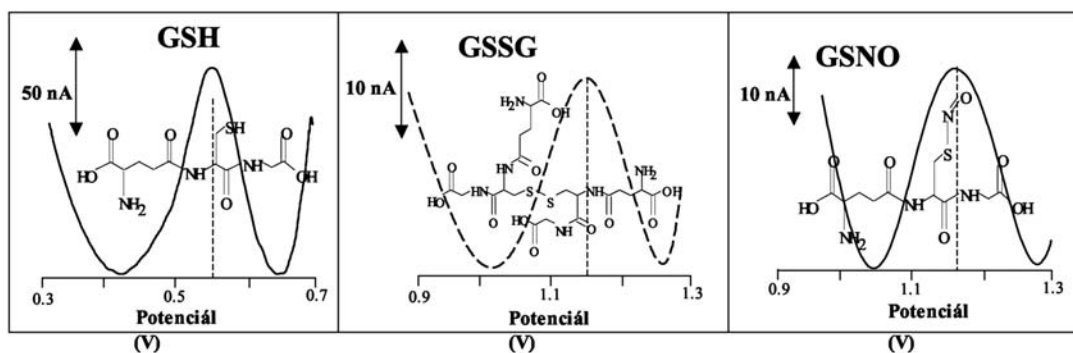
Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém skládající se z uhlíkové pastové elektrody, argentochloridové elektrody ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$) jako referentní elektrody a uhlíkové tyčky jako pomocné elektrody. Analyzované vzorky byly před měřením deoxygenovány probubláním argonem (99.999%), saturovaném ve vodě po 120 s. Všechny experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Software GPES (EcoChemie) byl použit pro zpracování hrubých dat (vyhlazování, korekce na základní hladinu). Pro analýzy thiolů byla použita square wave voltametrie s následujícími parametry: Jako základní elektrolyt byl použit borátový pufr (pH 9.2). SWV parametry: počáteční potenciál -0.2 V , koncový potenciál 1.5 V, frekvence 200 Hz a potenciálový krok 5 mV.

Průtokový elektrochemický systém

Průtokový systém byl složen z chromatografické pumpy (Model 583 ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), Guard cely (Model 5020 ESA, USA), reakční smyčky (1 m) pro průtokovou injekční analýzu (FIA) a elektrochemického detektoru. Detektor je složen z průtočné amperometrické analytické cely (Model 5040, ESA, USA) obsahující referentní (hydrogen-paládiová), pomocnou uhlíkovou a pracovní elektrodu ze skelného uhlíku a kontrolního modulu Coulochem III, který slouží také k ovládní detektoru. Vzorek (5 μl) byl injektován manuálně. Data z detektoru byla zpracována pomocí software CSW 32.

Výsledky a diskuse

V našich experimentech jsme se primárně zaměřili na sledování oxidačních signálů redukovaného (GSH), oxidovaného (GSSG) a S-nitroso (GSNO) glutathionu na pevné uhlíkové pastové elektrodě (CPE) v přítomnosti borátového pufru jako základního elektrolytu. Zjistili jsme, že všechny námi studované glutathiony je možné pomocí CPE detekovat v koncentracích pod 1 μM . Redukovaný glutathion poskytoval oxidační signály kolem 0.56 V, oxidovaný glutathion kolem 1.16 V a nitrosoglutathion kolem 1.19 V. Pozorovaný posun potenciálů glutathionů pravděpodobně souvisí s výrazně obtížnější oxidací S-S a S-NO vazby ve srovnání s volnými -SH skupinami GSH (Obr. 1).



Obr. 1 Voltametrické signály glutathionů (10 μM).

Elektrochemická analýza glutathionů v průtokovém systému

Jak bylo popsáno výše glutathion je velmi významná biologická molekula, která ovlivňuje redoxní stav všech živých organismů. Jeho snadná, senzitivní a selektivní detekce je právě pro tyto účely velmi potřebná. Proto jsme se zaměřili na analýzu glutathionů pomocí elektrochemické detekce v průtokovém systému s pracovní elektrodou ze skelného grafitu. Ze získaných experimentálních dat bylo možné určit jako nejvhodnější průtok elektrolytu FIA kolem $1.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, kdy pozorované signály byly velmi dobře vyvinuté a symetrické.

Vliv aplikovaného potenciálu

Pro získání co nejlepší elektrochemické odpovědi bylo nezbytné navrhnout závislost výšky signálu glutathionů ($30 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na aplikovaném potenciálu. V případě GSH byl pozorován nejprve velmi rychlý vzestup signálu, až do aplikovaného potenciálu 900 mV a pak signál GSH rychle snižuje. V případě GSSG a GSNO dochází k výraznějším vzestupu elektrochemické odpovědi od aplikovaného potenciálu 800 mV. Oxidační signál GSSG a GSNO vzrůstal až do aplikovaného potenciálu 1 300 mV. Pro další detekci jsme vybrali následující detekční potenciály: GSH 850 mV; GSSG a GSNO 1100 mV. U vyšších aplikovaných potenciálů bylo pozorováno delší ustalování základní linie, což bylo nevýhodné pro další studium glutathionů.

Vliv koncentrace glutathionů

Při takto vybraných a charakterizovaných podmínkách jsme sledovali vliv koncentrace glutathionů na získanou proudovou odpověď. Všechny závislosti vykazují nelineární závislost podobnou Langmuirovské isoterme, avšak je možné při nižších koncentracích nalézt lineární úseky závislosti. Pozorovaná nelinearita, pravděpodobně souvisí s nahromaděním zkoumaného analytu u povrchu pracovní elektrody, což mění vlastnosti elektrodové dvojvrstvy. Získané elektrochemické signály byly velmi dobře reprodukovatelné s chybou analýzy 2-5%. Nejnižší proudové odpovědi poskytoval GSSG. V koncentračním rozsahu 0.1 až $2.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla závislost lineární ($y = 5.4816x + 0.4914$; $R^2 = 0.9939$), kdy se limit stanovení pohyboval kolem $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. GSNO vykazoval lineární závislost na koncentraci v rozsahu 1 až $500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($y = 0.0052x + 0.2099$; $R^2 = 0.9957$) a limit stanovení se pohyboval kolem $300 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. GSH poskytoval lineární závislost v intervalu koncentrací 0.5 až $4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($y = 11.315x - 0.5146$; $R^2 = 0.9969$) a limit stanovení se pohyboval kolem $100 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Studium interakce GSH s cisplatinou

Jak je dobře známo protinádorová léčiva interagují s řadou biologicky aktivních látek, obzvláště takových, které ve své molekule obsahují $-\text{SH}$ skupinu. V našem experimentu jsme navrhli velmi jednoduchou možnost rozlišení vazby GSH na cisplatinu. Byly vybrány koncentrace cisplatinu, které jsou běžně terapeuticky využívány (3 , 15 a $30 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Zjistili jsme, že vytvořený GS-Pt komplex poskytuje asi o 40-60% nižší proudovou odezvu v porovnání s volným GSH. Průběh hydrodynamických voltamogramů byl také mírně odlišný. U hydrodynamického voltamogramu GS-Pt komplexu se proudová odpověď do aplikovaného potenciálu asi 750 mV zvyšovala velmi pozvolna, po té však dochází k rychlému nárůstu s maximem při potenciálu 900-950 mV. Signál GS-Pt komplexu byl asi o 50-100 mV posunutý směrem do pozitivních potenciálů. Proto bylo výhodné monitorovat vzniklý GS-Pt komplex při potenciálu 950 mV. Ze získaných výsledků je zřejmé, že během 20 h interakce při 37°C došlo k poklesu signálu o více jako 40% a po více jako 60 h lze předpokládat, že při daných experimentálních podmínkách došlo k vytvoření maxima GS-Pt komplexu. Tvorba komplexu byla navíc monitorována spektrofotometricky jako změna absorbance při 280 nm. Získané spektrofotometrické výsledky vykazovaly obdobný průběh závislosti, jako v případě elektrochemické detekce.

Závěr

Elektrochemická detekce představuje alternativní možnost pro stanovení biologicky významných látek. Navíc, jak je ukázáno, je velmi vhodná pro studium interakce mezi takovými látkami a léčivem.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory grantů LPR 2006, RASO 2007, GAAV IAA401990701, MSM 6215712402 a INCHEMBIOL 0021622412.

Literatura

1. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(3):227-35.
2. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Perez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem.* 2003;10(3):257-66.
3. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 1965;205:698-9.
4. Wong E, Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev.* 1999 Sep;99(9):2451-66.
5. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med.* 1996 Jan 4;334(1):1-6.
6. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol.* 1999;17(1):409-22.
7. See HT, Freedman RS, Kudelka AP, Burke TW, Gershenson DM, Tangjitgamol S, et al. Retrospective review: re-treatment of patients with ovarian cancer with carboplatin after platinum resistance. *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15(2):209-16.
8. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Aranes MJ, Nicholas C, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Brit J Cancer.* 2004;91(11):1931-46.
9. Grothey A, Goldberg RM. A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacol.* 2004;5(10):2159-70.
10. Kozubik A, Horvath V, Svihalkova-Sindlerova L, Soucek K, Hofmanova J, Sova P, et al. High effectiveness of platinum(IV) complex with adamantylamine in overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(3):373-83.
11. Zak F, Turanek J, Kroutil A, Sova P, Mistr A, Poulova A, et al. Platinum(IV) complex with adamantylamine as nonleaving amine group: Synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity against a panel of cisplatin-resistant cancer cell lines. *J Med Chem.* 2004;47(3):761-3.
12. Page JD, Husain I, Sancar A, Chaney SG. Effect of the diamminocyclohexane carrier ligand on platinum adduct formation, repair, and lethality. *Biochemistry.* 1990;29(4):1016-24.
13. Chaney SG, Campbell SL, Temple B, Bassett E, Wu YB, Faldu M. Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. *J Inorg Biochem.* 2004;98(10):1551-9.
14. Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2001;478(1-2):1-21.
15. Kasparikova J, Novakova O, Vrana O, Intini F, Natile G, Brabec V. Molecular aspects of antitumor effects of a new platinum(IV) drug. *Mol Pharmacol.* 2006 Nov;70(5):1708-19.
16. Ramos-Lima FJ, Vrana O, Quiroga AG, Navarro-Ranninger CN, Halamikova A, Rybnickova H, et al. Structural characterization, DNA interactions, and cytotoxicity of new transplatin analogues containing one aliphatic and one planar heterocyclic amine ligand. *J Med Chem.* 2006 Apr;49(8):2640-51.
17. Brabec V, Kasparikova J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist Update.* 2002 Jun-Aug;5(3-4):147-61.
18. Ishikawa T, Aliosman F. Glutathione-Associated Cis-Diamminedichloroplatinum(II) Metabolism and Atp-Dependent Efflux from Leukemia-Cells - Molecular Characterization of Glutathione-Platinum Complex and Its Biological Significance. *J Biol Chem.* 1993 Sep 25;268(27):20116-25.
19. Arner ESJ, Nakamura H, Sasada T, Yodoi J, Holmgren A, Spyrou G. Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. *Free Radic Biol Med.* 2001 Nov 15;31(10):1170-8.