

AFFECTING OF VARIOUS PLANT MODELS BY CISPLATIN

VLIV CISPLATINY NA RŮZNÉ ROSTLINNÉ MODELOVÉ SYSTÉMY

Stejskal K.^{1,2)}, Šupálková V.^{2,3)}, Zítka O.^{1,2)}, Húska D.²⁾, Sures B.⁴⁾, Beklová M.⁵⁾,
Píkula J.⁵⁾, Horna A.⁶⁾, Havel L.³⁾, Kizek R.²⁾

¹Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno; ²Ústav chemie a biochemie a ³Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ⁴Univerzita Duisburg-Essen, Aplikovaná Zoologie/Hydrobiologie, D-45117 Essen, Německo; ⁵Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno; ⁶Radanal s.r.o., Okružní 613, 530 03 Pardubice

E-mail: stejskalkarel@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Within the context of application of platinum derivatives based effective cytostatics, we can suppose that these risk metals can get into aquatic ecosystems where they can show biologic availability for food chain. Thus the aim of this work was to assess influence of platinum derivate (0, 5, 10, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of cisplatin) on aquatic plant *Lemna minor*. The toxic influence of cisplatin was evaluated on the basis of growth inhibition expressed as number of leaves, growth rate, and total amount of biomass. Moreover we aimed on determination of cisplatin content using differential pulse voltammetry. The highest content of cisplatin (320 ng/g of fresh weight) was determined in plants treated by 80 μM . Thiols determination in the treated plants by means of Brdicka reaction followed. Thiols concentration increased with increasing content of cisplatin in plants.

Keywords: duckweed, cisplatin, thiols, differential pulse voltammetry, Brdicka reaction.

ABSTRAKT

V důsledku využívání platinových derivátů jako efektivních cytostatik, můžeme předpokládat, že jsou tyto sloučeniny transportovány do vodního ekosystému a mohou tak vstoupit do potravního řetězce živých organismů. Proto bylo cílem předkládané práce zkoumat vliv cisplatin (0, 5, 10, 20, 40, 80 a 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na okřehek. Toxický vliv byl hodnocen na základě růstové inhibiční exprese počtu lístků, růstových křivek a celkové sumy biomasy. Množství cisplatin v jednotlivých vzorcích bylo stanoveno pomocí diferenční pulsní voltametrie. Nejvyšší množství cisplatin (320 ng/g svěží hmotnosti) bylo detekováno u rostlin vystavených koncentraci 80 μM cisplatin. Thiolové látky obsažené exponovaných rostlinách byly stanoveny Brdičkovou reakcí. Koncentrace thiolů se zvyšovala s rostoucí koncentrací kovu v rostlinách.

Klíčová slova: okřehek, cisplatin, thioly, diferenční pulsní voltametrie, Brdičková reakce.

ÚVOD

Pro získání informací o míře poškození složek životního prostředí je nezbytná vedle chemické i ekotoxikologická analýza. Taková analýza je založena na sledování efektů, jako je např. inhibice růstu, mortalita apod. Při posuzování akutní zátěže životního prostředí se v poslední době pozornost stále více soustřeďuje také na platinové kovy, zvláště pak na platínu (Pt), palladium (Pd) a rhodium (Rh), které vstupují do životního prostředí z katalyzátorů používaných v automobilovém průmyslu [1-4]. Navíc je platina využívána v léčbě zhoubných nádorů v podobně stále velmi hojně používaného cytostatika – cisplatiny, která se používá v léčbě širokého spektra maligních onemocnění. Hlavním mechanismem odpovědným za protinádorovou aktivitu cisplatiny je nejspíše inhibice syntézy DNA. Mezi bioindikátory ekotoxických změn patří i cévnaté rostliny z různých čeledí [5-7].

Cílem předkládané studie je poskytnout prvotní informace o toxicitě cisplatiny pro vodní rostlinu *Lemna* a klíčnicí rostlinu *Inu*. Byl sledován vliv cisplatiny na vegetativní růst posouzením počtu listů a hmotnosti biomasy. Dále byl sledován obsah thiolových látek pomocí elektrochemických a spektrofotometrických technik.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Všechny chemikálie v čistotě ACS byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich. Zásobní roztoky standardů analyzovaných látek za využití ACS metanolu (Sigma-Aldrich, USA) a uložen ve tmě při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pracovní standardní roztoky byly vždy připravovány denně a to naředěním ze zásobního roztoku.

Rostlinný materiál

K testu na okřehku byla použita modifikovaná metodika OECD 221 *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. Oproti této metodice, kde je doba trvání testu 7 dní (168 hodin), byla celková doba testu zkrácena na 4 dny (96 hodin). Kádinky s rostlinami byly překryty potravinářskou fólií a ponechány pod zářivkovým roštem při nepřetržitém osvětlení 6 500-10 000 luxů a při teplotě $24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Byl zvolen statický postup bez výměny media. Jako kontrolní a ředící voda byl použit synteticky připravený živný roztok SIS (Swedish Standards Institute).

Rostliny *Inu* setého byly naklíčeny ve tmě při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po třech dnech byly umístěny do zkumavek na dobu 5 dní. Po té byly aplikovány různé koncentrace cisplatiny a CdCl_2 .

Elektrochemická analýza thiolů

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém třielektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky $0,4\text{ mm}^2$; referenční elektrodou byla $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$ a pomocnou grafitová elektroda. Základní

elektrolyt ($1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ a $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ amonný pufr; $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ (Sigma Aldrich, ACS), $\text{pH} = 9,6$) byl po každých 5 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál $-0,6 \text{ V}$, konečný potenciál $-1,6 \text{ V}$, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, $E_{\text{ads}} = 0 \text{ V}$, teplota $4 \text{ }^\circ\text{C}$ [8-11].

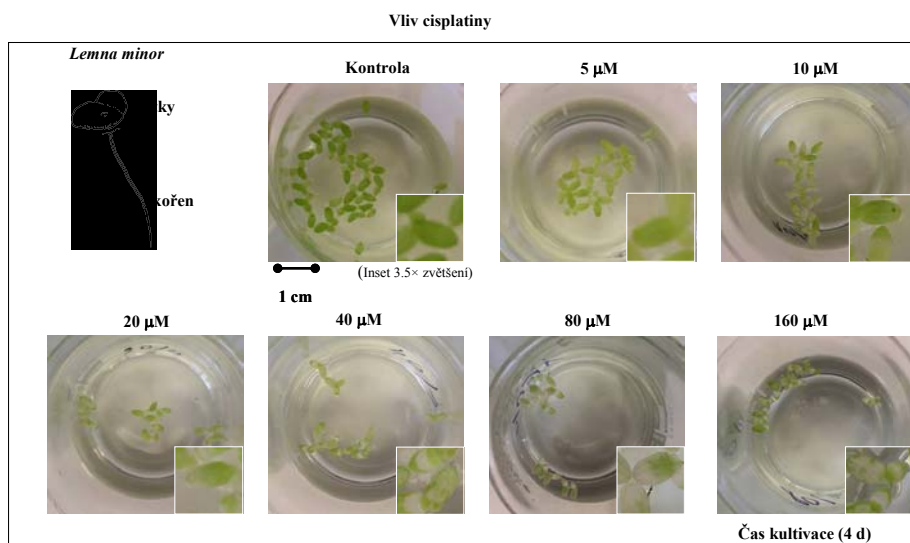
Diferenční pulzní voltametrie pro stanovení cisplatiny

Pro stanovení cisplatiny bylo využito diferenční pulzní voltametrie se základním elektrolytem (0,5 M NaCl, $\text{pH} 6,4$). DPV parametry byly následující: počáteční potenciál $-1,2 \text{ V}$, konečný potenciál $-0,3 \text{ V}$, modulační čas 0,057 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 25 mV.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Rostliny byly kultivovány v prostředí s 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ cisplatiny po dobu čtyř dní. V průběhu experimentu byly sledovány základní fyziologické ukazatele jako růstová křivka, délka kořínků, počet lístků a pozorovatelné makroskopické změny. Všechny aplikované koncentrace cisplatiny způsobily zřetelnou růstovou depresi od 50% (5 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ cisplatiny) do více jako 80% (160 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ cisplatiny) v porovnání s kontrolou (Obr. 1).

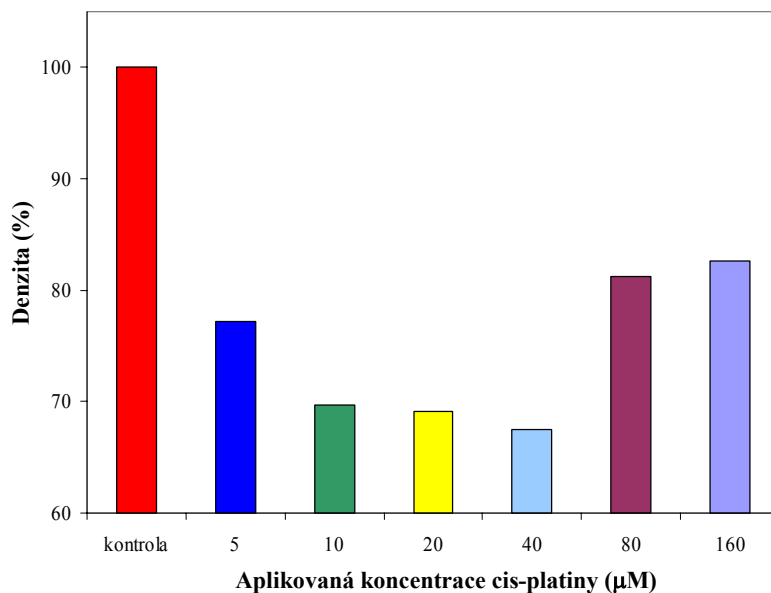
Obr. 1 Vliv cisplatiny na okřehek.



Navíc v průběhu prvního dne experimentu jsme pozorovali mírný nárůst svěží hmotnosti především u nižší aplikované dávky (5 až 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ cisplatiny), který pravděpodobně souvisí s vzestupem metabolické aktivity rostlin. Podobný průběh bylo možné pozorovat i v případě počtu lístků okřehek. U kontroly v poslední den experimentu jich bylo více jako 60, ale u rostlin vystavených působení cisplatiny se jejich počet pohyboval mezi 30 – 20. Dále bylo možné pozorovat výrazný vliv cisplatin na růst kořínků, které se zvyšující koncentrací zmenšovaly. Podobně bylo možné pozorovat vznik chlorotických míst na jednotlivých lístcích okřehek. Se zvyšující se koncentrací byla chloróza výraznější, a u

aplikované dávky větší než $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ již rostlinky nepříliš prospívaly a ztratily více jako 40% obsahu chlorofylu (Obr. 2). Pro další studium vlivu cisplatinu na okřehky bylo využito elektrochemické analýzy thiolů na rtuťové pracovní elektrodě (HMDE).

Obr. 2 Změny obsahu chlorofylu u okřehku vystaveného působení cisplatinu.



Elektrochemická analýza cisplatinu

Pro analýzu cisplatinu hrají významnou roli také elektroanalytické metody a postupy, které stále patří pro detekci platinových kovů k nejsenzitivnějším analytickým technikám [12,13]. Navíc, tyto metody představují stále velmi rychlé a levné nástroje pro stanovení cisplatinu v biologickém vzorku. V naší předešlé práci jsme zabývali senzitivním stanovením cisplatinu. Zjistili jsme, že nejvhodnějším základním elektrolytem je $0,75 \text{ mol.l}^{-1}$ NaCl, pH 5,0. Signál odpovídající cisplatině jsme pozorovali při průměrném potenciálu $-1,45 \text{ V}$. Pro naše další účely jsme sestrojili závislost výšky signálu cisplatinu na její koncentraci v rozmezí $0 - 125 \text{ nmol.l}^{-1}$. Výška signálu se vzrůstající koncentrací cisplatinu rostla a byla pozorovaná závislost striktně lineární závislost ($y = 0,9037x + 0,5068$, $R^2 = 0,9985$). Ze získaných experimentálních výsledků byl vypočten detekční limit pro cisplatinu jako 3 S/N a byl stanoven jako 95 pmol.l^{-1} při experimentální chybě mezi 1,5–2,5 %. Navíc, uvedený analytický postup byl aplikován pro stanovení cisplatinu v extraktech okřehku.

Biologicky významná je koncentrace těžkého kovu, který není vázán do žádných biologických struktur a zde je velmi výhodné pro takové stanovení využít elektrochemických technik. Velmi malé množství homogenátu ($5 - 20 \mu\text{l}$) bylo umístěno do elektrochemické nádoby se základním elektrolytem $0,75 \text{ mol.l}^{-1}$ NaCl (pH 5,0) a byla získána velmi dobrá, reprodukovatelná odezva cisplatinu. Navíc k takto získanému vzorku byly přidány rozdílné koncentrace standardu cisplatinu a sestrojena kalibrační přímka přímo v biologické matici. Získaná závislost byla také striktně lineární a chyba stanovení byla stále velmi dobrá mezi 5 – 7 %. Vliv biologické matrice na signál cisplatinu byl také studován. Zjistili jsme, že

návratnost se pohybovala v rozmezí 70 – 90 %, což zcela jistě souvisí s interakcí látek obsažených ve vzorku, ale také se změnou elektrochemických procesů na povrchu HMDE.

Množství zjištěné cisplatiny se pohybovalo v rozmezí (50 – 100 ng na gram svěží hmotnosti). S rostoucí aplikovanou koncentrací docházelo k nárůstu obsahu cisplatiny ve všech sledovaných dnech. Maxima bylo dosaženo při aplikované koncentraci 80 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Při koncentraci 160 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ byl pozorován pokles obsah cisplatiny v extraktech z okřehků. Dále jsme pozorovali výrazný pokles obsahu cisplatiny v extraktech získaných ve třetím a čtvrtém dni experimentu. Zde lze očekávat jednak vliv cisplatiny na replikaci DNA a také lze očekávat zvýšenou syntézu thiolových sloučenin [14].

Obsah thiolů stanovený pomocí Brdičkovy reakce

Glutathion při koncentracích 1, 4, 5 a 7 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ poskytl typické katalytické signály (RS₂Co, Cat1, Cat2 a Cat3). Pro určení koncentrace glutathionu byl vybrán katalytický signál Cat2. Získaná kalibrační závislost byla lineární ($y = 11,566x + 0,4242$, $R^2 = 0,9944$) a limit detekce se pohyboval kolem 100 nmol.l^{-1} . Vzorky získané z extraktů okřehků byly před vlastní elektrochemickou analýzou 10 × naředěny. Na získaných voltamogramech bylo možné sledovat katalytický signál Cat2 (kolem potenciálu -1,35 V. Celkové množství thiolových sloučenin se měnilo s délkou expozice a aplikovaným množstvím cisplatiny. Na počátku experimentu (do druhého dne) množství thiolů bylo nízké a s rostoucí aplikovanou koncentrací cisplatiny se snižovalo. Lze předpokládat, že právě v tomto čase dochází k vazbě cisplatiny do DNA a výrazným způsobem ovlivňuje proteosyntetický aparát buňky. Zde je také pozorována vysoká koncentrace volné cisplatiny. Od třetího dne dochází k výrazné metabolické změně, která je charakteristická prudkým poklesem obsahu volné cisplatiny a výrazným vzestupem obsahu thiolových látek (1 500 – 2 500 $\mu\text{g/g FW}$). Výrazný vzestup thiolů je obrannou reakcí rostliny na velmi silný stres způsobený metabolicky vysoce aktivní sloučeninou. Získaný experimentální výsledek ukazuje na schopnost rostliny zapnout alternativní ochrannou dráhu.

ZÁVĚR

V našich experimentech jsme se zaměřili na sledování vlivu cisplatiny a kadmia na vybrané modelové rostlinné organismy. Byly pozorovány změny v obsahu ochranných thiolových sloučenin, které pravděpodobně souvisí s udržením životně důležité homeostasy.

LITERATURA

- [1] S. Zimmermann, J. Messerschmidt, A. von Bohlen and B. Sures Uptake and bioaccumulation of platinum group metals (Pd, Pt, Rh) from automobile catalytic converter materials by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), *Environ. Res.* 98 (2005) 203-209.
- [2] S. Zimmermann, A. von Bohlen, J. Messerschmidt and B. Sures Accumulation of the precious metals platinum, palladium and rhodium from automobile catalytic converters in

Paratenuisentis ambiguus as compared with its fish host, *Anguilla anguilla*, J. Helminthol. 79 (2005) 85-89.

[3] B. Sures, S. Zimmermann, J. Messerschmidt, A. von Bohlen and F. Alt First report on the uptake of automobile catalyst emitted palladium by European eels (*Anguilla anguilla*) following experimental exposure to road dust, Environ. Pollut. 113 (2001) 341-345.

[4] B. Sures, S. Zimmermann, J. Messerschmidt and A. Von Bohlen Relevance and analysis of traffic related platinum group metals (Pt, Pd, Rh) in the aquatic biosphere, with emphasis on palladium, Ecotoxicology 11 (2002) 385-392.

[5] J. Zehnalek, J. Vacek and R. Kizek Application of higher plants in phytoremediation of heavy metals, Lis. Cukrov. Reparske 120 (2004) 220-221.

[6] R. Yaowakhan, M. Kruatrachue, P. Pokethitiyook and V. Soonthornsarathool Removal of lead using some aquatic macrophytes, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 75 (2005) 723-730.

[7] W.C. Wang and K. Freemark The Use of Plants for Environmental Monitoring and Assessment, Ecotox. Environ. Safe. 30 (1995) 289-301.

[8] J. Vitecek, J. Petrlova, J. Petrek, V. Adam, D. Potesil, L. Havel, R. Mikelova, L. Trnkova and R. Kizek Electrochemical study of S-nitrosoglutathione and nitric oxide by carbon fibre NO sensor and cyclic voltammetry - possible way of monitoring of nitric oxide, Electrochim. Acta 51 (2006) 5087-5094.

[9] J. Petrlova, D. Potesil, R. Mikelova, O. Blastik, V. Adam, L. Trnkova, F. Jelen, R. Prusa, J. Kukacka and R. Kizek Attomole voltammetric determination of metallothionein, Electrochim. Acta 51 (2006) 5112-5119.

[10] J. Petrlova, D. Potesil, J. Zehnalek, B. Sures, V. Adam, L. Trnkova and R. Kizek Cisplatin electrochemical biosensor, Electrochim. Acta 51 (2006) 5169-5173.

[11] R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova, B. Klejdus and L. Havel Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins, Chem. Listy 98 (2004) 166-173.

[12] Z. Stefanka, S. Hann, G. Koellensperger and G. Stingeder Investigation of the reaction of cisplatin with methionine in aqueous media using HPLC-ICP-DRCMS, J. Anal. Atom. Spectrom. 19 (2004) 894-898.

[13] G. Weber, J. Messerschmidt, A.C. Pieck, A.M. Junker, A. Wehmeier and U. Jaehde Ultratrace voltammetric determination of DNA-bound platinum in patients after administration of oxaliplatin, Anal. Bioanal. Chem. 380 (2004) 54-58.

[14] E. Torricelli, G. Gorbi, B. Pawlik-Skowronska, L.S. di Toppi and M.G. Corradi Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium-tolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae), Aquat. Toxicol. 68 (2004) 315-323.

Poděkování: Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132, Radanal 1/2006 a 1M06030.