

# WPLYW KOENZYMU Q10 NA STRES OKSYDACYJNY KOMÓRKI INDUKOWANY KSENOBIOTYKAMI

## THE INFLUENCE OF COENZYME Q10 ON XENOBIOTIC-INDUCED OXIDATIVE STRESS OF CELL

Kaja Frączkowska<sup>1,2</sup>, Marta Kopaczyńska<sup>1\*</sup>, Ewa Sawicka<sup>2</sup>, Anna Długosz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Politechnika Wrocławska, Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej,  
50-370 Wrocław, Wybrzeże S. Wyspiańskiego 27

<sup>2</sup> Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Zakład Toksykologii,  
50-552 Wrocław, ul. Borowska 211

\* e-mail: marta.kopaczynska@pwr.wroc.pl

### STRESZCZENIE

Cisplatyna jest cytostatykiem o wysokiej skuteczności w leczeniu nowotworów złośliwych, jednak powoduje poważne skutki uboczne, najczęściej w postaci uszkodzenia nerek (nefrotoksyczność), wątroby (hepatotoksyczność) i narządu słuchu (ototoksyczność). Jednym z ubocznych skutków chemioterapii przy zastosowaniu cisplatyny jest wywoływanie przez ten ksenobiotyk stresu oksydacyjnego w komórkach. Wolne rodniki powstające pod wpływem cisplatyny mogą być neutralizowane przez egzogenne i endogenne antyoksydanty (np. koenzym Q10). Koenzym Q10 (CoQ10) jest silnym antyoksydantem nieenzymatycznym, obecnym we wszystkich komórkach organizmu człowieka. W warunkach fizjologicznych, CoQ10 syntetyzowany jest w wystarczających ilościach do prawidłowej ochrony antyoksydacyjnej komórek, jednak w przebiegu chorób nowotworowych, a także podczas chemioterapii jego stężenie może znacznie się obniżyć. Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka wpływu CoQ10 na stres oksydacyjny komórki indukowany cisplatyną. Za pomocą metod spektrofotometrycznych, oznaczano *in vitro* aktywność enzymów antyoksydacyjnych w erytrocytach – dysmutazy nadadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx) oraz w mitochondriach – aktywność enzymu detoksykacyjnego II fazy biotransformacji – S-transferazy glutationowej (GST) po dodaniu cisplatyny oraz oceniano wpływ CoQ10 na aktywność tych enzymów. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że w stresie oksydacyjnym indukowanym cisplatyną, CoQ10 hamował spadek aktywności SOD oraz GPx w krwinkach czerwonych po dodaniu ksenobiotyku. Suplementacja CoQ10 u pacjentów przed rozpoczęciem chemioterapii może uzupełniać niedobory tego związku w organizmie oraz zwiększać odporność komórek na uszkodzenia oksydacyjne indukowane ksenobiotykiem.

### ABSTRACT

Cisplatin is one of the most effective cytotoxic agents in the treatment of cancers. However, cisplatin has number of severe side effects, including such ones as nephrotoxicity, hepatotoxicity and ototoxicity. It is reported that cisplatin-induced oxidative stress in normal cells is one of the side effects of chemotherapy with cisplatin. Free radicals that are generated under the influence of cisplatin, are neutralized by endogenous and exogenous antioxidants (e.g. coenzyme Q10). Coenzyme Q10 (CoQ10) is a strong non-enzymatic antioxidant, presented in all cells of human body. Under physiological conditions, CoQ10 is synthesized in sufficient quantity to ensure proper antioxidant protection of cells. However, the concentration of CoQ10

may be decreased by cancers and chemotherapy. The purpose of this study was to characterize the influence of CoQ10 on the cisplatin-induced oxidative stress. Using spectroscopic methods, the activity of antioxidative enzymes in erythrocytes – superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) and in the mitochondria – activity of II phase biotransformation enzyme – glutathione S-transferase (GST) after exposure to cisplatin was measured *in vitro* and the effect of CoQ10 on antioxidative enzymes activity was studied. CoQ10 inhibited the reduction in SOD and GPx activity after administration of cisplatin. However, the activity of GST, in samples with CoQ10, was reduced after exposure to cisplatin. The supplementation of CoQ10, before starting cisplatin chemotherapy, can minimize the toxicity of cisplatin to normal cells.

Słowa kluczowe: koenzym Q10, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, S-transferaza glutationowa, stres oksydacyjny, cisplatyna

Keywords: coenzyme Q10, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, oxidative stress, cisplatin

## 1. Wstęp

Wzrastająca zachorowalność na nowotwory złośliwe stała się obecnie jednym z najpoważniejszych problemów zdrowotnych. Zachodzi konieczność stosowania leków przeciwnowotworowych o szerokim spektrum działania i wysokiej toksyczności przeciw komórkom nowotworowym. Ich kliniczne użycie jest niejednokrotnie ograniczone, gdyż z powodu braku selektywności leki te uszkadzają również komórki zdrowe. Wykazano, że u podłoża toksyczności wielu cytostatyków leżą mechanizmy wolnorodnikowe prowadzące do rozwoju stresu oksydacyjnego [1]. Nadmiar wolnych rodników zaburza równowagę oksydacyjną komórki, w tym aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak peroksydaza glutationowa GPx (ang. *Glutathione Peroxidase*), dysmutaza ponadtlenkowa SOD (ang. *Superoxide Dismutase*) czy S-transferaza glutationowa GST (ang. *Glutathione S-transferase*). Enzymy te, neutralizując reaktywne formy tlenu (RFT), stanowią ważną część pierwszej linii obrony przed oksydantami [2]. Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) i cząsteczki tlenu. Anionorodniki ponadtlenkowe generowane są podczas fizjologicznych procesów metabolicznych, ale również w wysokim stężeniu podczas chemioterapii [3]. Peroksydaza glutationowa posiada zdolność do redukcji nadtlenu wodoru, a także nadtlenu organicznych, takich jak nadtlenu fosfolipidów czy kwasów tłuszczowych, powstających w wyniku utleniania przez RFT struktur komórkowych, głównie błon biologicznych [4]. S-transferazy glutationowe to rodzina izoenzymów biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków oraz substancji endogennych. GST posiadają szerokie spektrum substratowe, odpowiadają za detoksykację m.in. kancerogenów, leków przeciwnowotworowych, herbicydów, pestycydów oraz reaktywnych produktów stresu oksydacyjnego, takich jak chinony,  $\alpha$ - $\beta$ -nienasycone karbonyle i wodoronadtlenki. Katalizują reakcję przyłączania tych związków do zredukowanego glutationu [5, 6]. Zaburzenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych mogą więc zwiększać wrażliwość komórek na toksyczne działanie cytostatyków.

Wolne rodniki, które nie zostały usunięte przez enzymy antyoksydacyjne, redukowane są przez przeciwutleniacze niskocząsteczkowe, między innymi przez koenzym Q10 (CoQ10). Związek ten jest lipofilnym antyoksydantem, obecnym we wszystkich tkankach i komórkach człowieka. Działanie antyoksydacyjne CoQ10 może mieć mechanizm bezpośredni lub pośredni. Działanie bezpośrednie wykazuje forma zredukowana – ubichinol (CoQ10H<sub>2</sub>), która redukując wolne rodniki zapobiega peroksydacji lipidów oraz oksydacyjnym modyfikacjom białek i DNA [7]. Pośredni mechanizm antyoksydacyjny polega natomiast na regeneracji przez CoQ10 innych antyoksydantów m.in.  $\alpha$ -tokoferolu, kwasu askorbinowego [8, 9]. Bardzo ważną funkcją CoQ10 jest udział w wytwarzaniu energii w mitochondriach pod postacią cząsteczek adenozynotrójfosforanu (ATP). Rola CoQ10 w tym procesie polega na transporcie elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym z białkowego kompleksu I i II na kompleks III, a także bierze on udział w powstawaniu gradientu protonomotorycznego, dzięki czemu dostarczana jest energia niezbędna do fosforylacji

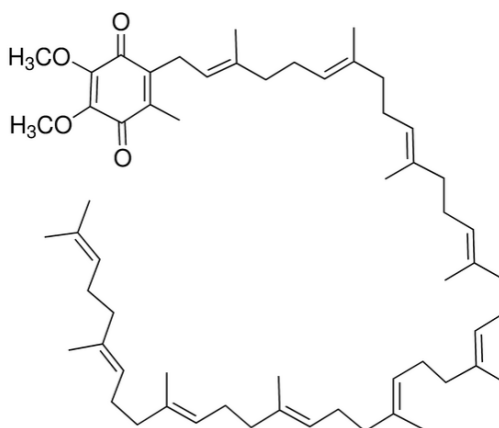
oksydacyjnej i syntezy ATP [10]. Stwierdzono, że w przebiegu wielu schorzeń, w tym chorób nowotworowych, poziom CoQ10 w organizmie ulega obniżeniu, co może skutkować zwiększonym narażeniem komórek na stres oksydacyjny [11, 12].

Cisplatyna jest jednym z najefektywniejszych chemioterapeutyków znajdujących zastosowanie w leczeniu wielu rodzajów nowotworów litych. Obecnie w lecznictwie stosowana jest samodzielnie lub w terapii skojarzonej w przypadku wielu nowotworów, takich jak drobnokomórkowy rak płuc, rak żołądka, jelita grubego, pęcherza moczowego, jajnika oraz nowotwory z komórek zarodkowych [13, 14]. Po iniekcji dożylniej, cisplatyna w ponad 90% występuje w formie kowalentnie związanej z białkami osocza. Frakcja niezwiązana usuwana jest z krwi w przeciągu kilku minut. Całkowite stężenie cisplatyny obniża się po 24 godzinach o około 25%, a po 5 dniach do 43%. Cytostatyk ten wydalany jest głównie z moczem. Eliminacja z żółcią i przez jelita jest minimalna [15]. Mimo wysokiej skuteczności cisplatyny w leczeniu nowotworów, jej kliniczna użyteczność jest często ograniczona ze względu na różnorodne efekty uboczne w stosunku do komórek nienowotworowych. Do głównych działań niepożądanych terapii cisplatyną należą nefrotoksyczność, ototoksyczność oraz hepatotoksyczność [16]. Już po kilku dniach od rozpoczęcia terapii u pacjentów obserwowano obniżenie przesączania kłębuszkowego nerek, co wiąże się ze zmniejszeniem zdolności nerek do oczyszczania osocza krwi z toksycznych produktów przemiany materii oraz wydalania nadmiaru wody z organizmu. Cisplatyna wywołuje uszkodzenia miększu wątroby [17]. Zaobserwowano również różnorodne efekty toksyczności cisplatyny ujawniające się dopiero po kilku latach od zakończenia terapii, w tym choroby układu krążenia, dysfunkcję płuc oraz nowotwory wtórne [18]. Mechanizmy leżące u podłoża toksyczności cisplatyny w stosunku do komórek nienowotworowych pozostają wciąż niewyjaśnione. Stwierdzono, że ważną rolę odgrywa generowanie przez ten ksenobiotyk wolnych rodników tlenowych i azotowych, głównie – anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru, rodnika hydroksylowego, nadtlenoazotynu, tlenku azotu. Aktywność prooksydacyjna cisplatyny prowadzi do wzrostu intensywności peroksydacji lipidów oraz spadku aktywności enzymów antyoksydacyjnych w narządach takich jak nerki czy wątroba, osłabiając ochronę komórek przed szkodliwym działaniem RFT [19].

## 2. Materiały i metody

### 2.1 Koenzym Q10

Koenzym Q10 pod względem budowy chemicznej jest 2,3-dimetoksy-5-metylo-6-poliprenylo-1,4-benzochinonem. Składa się z pierścienia benzochinonowego i dziesięciu jednostek izoprenoidowych w bocznym łańcuchu poliprenylowym (p. rys. 1) [20].

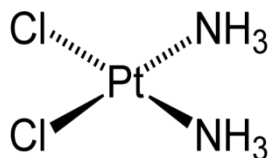


Rys. 1. Struktura chemiczna koenzymu Q10

W badaniach wykorzystano koenzym Q10 (Sigma-Aldrich, Coenzyme Q10;  $\geq 98\%$ ). Związek w postaci lipofilnego, żółtego proszku rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO), otrzymując następujące stężenia CoQ10: 8  $\mu\text{g/ml}$ ; 20  $\mu\text{g/ml}$ ; 60  $\mu\text{g/ml}$  i 120  $\mu\text{g/ml}$ .

## 2.2 Cisplatyna

Cisplatyna (cis-diaminodichloroplatyna) należy do cytostatyków alkilujących. Jest rozpuszczalnym w wodzie kompleksem, składającym się z centralnie ulokowanego atomu platyny otoczonego dwiema grupami amoniowymi i dwoma atomami chloru (p. rys. 2) [21, 22].



Rys. 2. Struktura chemiczna cisplatyny

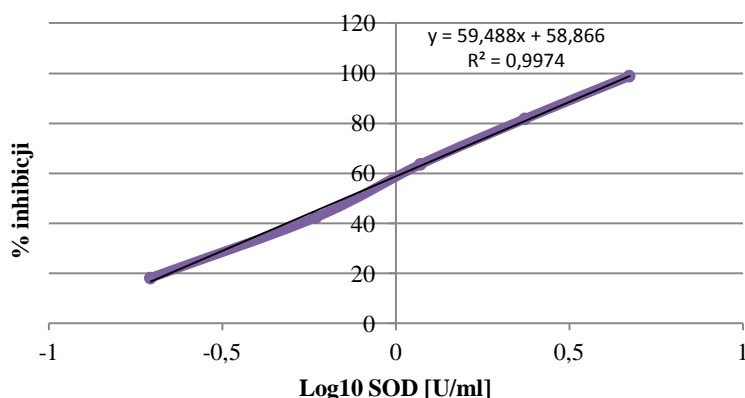
W badaniach wykorzystano preparat „*Cisplatin*” (Ebewe, 0,5 mg/ml). Jest on koncentratem leku w soli fizjologicznej, służącym do wlewu dożylnego. Próbki przygotowano poprzez rozcieńczenie preparatu w soli fizjologicznej (*Natrium chloratum* 0,9%) otrzymując stężenia 10 µg/ml; 30 µg/ml i 50 µg/ml

## 2.3 Badanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej została oznaczona w 10% zawiesinie erytrocytów w buforowanym roztworze PBS o pH = 7,4, sporządzonej z krwi żyłnej pełnej pobranej do próbek z antykoagulantem EDTA. Do badań aktywności peroksydazy glutationowej wykorzystano krew pełną pobraną do próbek z heparyną. Próbki uzyskano od zdrowych pacjentów Laboratorium Diagnostycznego przy Akademickim Szpitalu Klinicznym im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu. Materiał do oznaczania aktywności S-transferazy glutationowej stanowiły mitochondria izolowane na drodze homogenizacji oraz serii wirowań komórek ludzkiego łożyska, pochodzącego z porodu fizjologicznego w Klinice Ginekologii i Położnictwa ASK we Wrocławiu (zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Chemiczna kancerogeneza, procesy wolnorodnikowe, rola antyoksydantów, interakcje, nr KB-158/2010).

W celu sprawdzenia wpływu CoQ10 na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w obecności cisplatyny badany materiał został poddany wstępnej preinkubacji przez 15 minut w temperaturze 37 °C w obecności CoQ10 o określonym stężeniu, następnie zostały dodane wcześniej przygotowane roztwory cisplatyny. Mieszaniny reakcyjne zostały umieszczone w łaźni wodnej z wytrząsarką JULABO SW22 w temperaturze 37 °C oraz inkubowane przez 30 minut. Po inkubacji wykonano oznaczenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Dla każdego badanego stężenia cisplatyny i CoQ10 wykonano 6 powtórzeń oznaczenia.

Aktywność SOD została zmierzona testem RANSOD firmy Randox. Metoda wykorzystuje ksantynę i oksydazę ksantynową do uzyskania rodników  $O_2^{\cdot -}$ , które reagują z 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-chlorkiem fenyntetrazoliny, tworząc czerwony barwnik formazanowy. SOD katalizuje reakcję dysmutacji  $O_2^{\cdot -}$ , w związku z czym hamuje proces tworzenia formazanu. Przed rozpoczęciem oznaczeń, zostały przygotowane roztwory standardów o znanej aktywności SOD dostarczonych przez producenta testu RANSOD. W kolejnym kroku zmierzona została absorbancja roztworów standardowych przy długości fali  $\lambda = 492$  nm. Wyznaczona została krzywa wzorcowa zależności procentu inhibicji od logarytmu dziesiętnego aktywności SOD (p. rys. 3). Wartość aktywności SOD dla każdej próby badanej została odczytana z krzywej wzorcowej. Jedna jednostka aktywności SOD [U/ml] to taka ilość enzymu, która powoduje hamowanie reakcji tworzenia formazanu o 50%. Aktywność SOD została przeliczona na gram hemoglobiny, której stężenie we krwi zostało oznaczone metodą Drabkina. Polega ona na utlenieniu hemoglobiny przez żelazicyjanek do methemoglobiny, która następnie reaguje z jonami cyjankowymi, tworząc stabilny barwnik – cyjanomethemoglobinę. Stężenie hemoglobiny w próbkach zostało obliczone na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali  $\lambda = 540$  nm.



Rys. 3. Krzywa wzorcową zależności wartości % inhibicji względem Log10 stężenia SOD [U/ml] w roztworach standardowych

Aktywność GPx została określona za pomocą metody RANSEL firmy Randox. Metoda polega na utlenianiu glutationu w obecności peroksydazy glutationowej przez wodorotlenek kumenu. Następnie pod wpływem reduktazy glutationowej i NADPH utleniony glutation ulega natychmiastowej redukcji, natomiast NADPH utlenia się do  $\text{NADP}^+$ . Reakcji tej towarzyszy spadek intensywności zabarwienia roztworu. Aktywność GPx [U/ml] w próbkach obliczona została na podstawie pomiaru spadku absorbancji przy długości fali  $\lambda = 340 \text{ nm}$ . Aktywność GPx została przeliczona na gram hemoglobiny, której stężenie we krwi zostało oznaczone za pomocą metody Drabkina.

S-transferazy glutationowe chronią komórki przed związkami toksycznymi poprzez wiązanie grupy tiolowej glutationu z częścią elektrofilową ksenobiotyku. Do oznaczenia aktywności GST został wykorzystany 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) jako substrat do reakcji sprzęgania z glutationem. Związek ten jest swoisty dla najszerszego zakresu izoenzymów GST. W wyniku sprzęgnięcia grupy tiolowej glutationu z CDNB powstaje barwny tioeter dinitrofenylowy. Barwnik ten powoduje wzrost absorbancji roztworu przy długości fali  $\lambda = 340 \text{ nm}$ , która jest wprost proporcjonalna do aktywności GST w próbce. Absorbancja prób została zmierzona bezpośrednio po dodaniu mieszaniny glutationu i CDNB oraz po 6 minutach od pierwszego pomiaru. Aktywność GST [U/ml] w próbach została obliczona na podstawie zmiany absorbancji roztworu w czasie. Wartość aktywności GST przeliczono na gram białka mitochondrialnego, którego stężenie zostało oznaczone za pomocą metody Lowry'ego.

Badanie metodą Lowry'ego przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie jony miedzi przyłączają się do wiązań peptydowych białek (reakcja biuretowa). Skutkiem tego jest redukcja jonów miedzi  $\text{Cu}^{+2}$  do jonów  $\text{Cu}^+$ . W drugim etapie, po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej fenolowego odczynnika Folina-Ciocalteu (kompleksu kwasów fosfomolibdenowego i fosfowolframowego) pod wpływem związanej przez białko miedzi oraz przez obecne w białku reszty tryptofanu, tyrozyny i cysteiny, następuje redukcja kompleksu kwasów. Reakcji tej towarzyszy zmiana zabarwienia roztworu, która jest proporcjonalna do stężenia białka w badanej próbce. Na wstępie zostały przygotowane roztwory standardowe o wzrastającym stężeniu białka. Następnie została zmierzona absorbancja roztworów standardowych przy długości fali  $\lambda = 750 \text{ nm}$  i wykonana została krzywa wzorcową zależności stężenia białka od absorbancji roztworu. Stężenie białka w każdej próbce badanej zostało odczytane z krzywej wzorcowej.

W celu określenia wpływu CoQ10 na aktywność SOD, GPx oraz GST po dodaniu cisplatyny, wyniki porównywano z próbą kontrolną zawierającą odpowiednio erytrocyty lub mitochondria z badanym ksenobiotykiem (cisplatyną) o określonym stężeniu.

## 2.4 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana za pomocą programu Statistica 10.0. Normalność rozkładu analizowano testem Lillieforsa. Istotność statystyczna różnic pomiędzy zmiennymi była sprawdzana przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Analizowano wyniki tylko istotne statystycznie o  $p < 0,05$ .

### 3. Wyniki badań

W tabeli 1 zostały przedstawione różnice pomiędzy aktywnością analizowanych enzymów antyoksydacyjnych w próbach z dodatkiem badanych substancji (pojedynczo i łącznie), a aktywnością tych enzymów w próbach kontrolnych. Przedstawione zostały stężenia CoQ10 i cisplatyny wywierające najsilniejszy wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych.

$$\Delta = A_x - A_0 \quad (1)$$

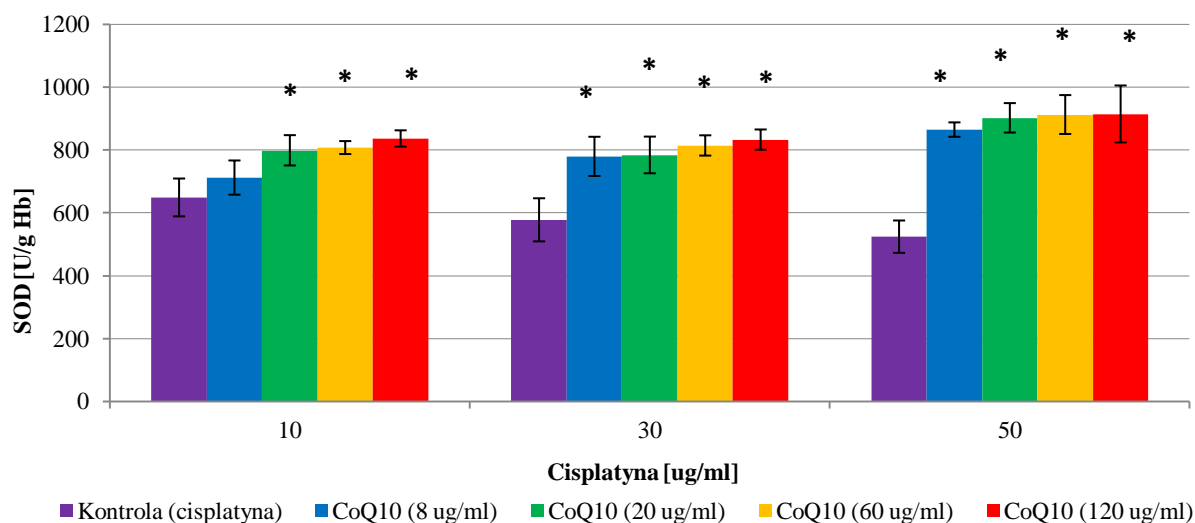
gdzie  $A_x$  – aktywność enzymu po działaniu substancją badaną  $A_0$  – aktywność enzymu w próbce kontrolnej bez badanej substancji

Tabela 1. Różnice aktywności enzymów antyoksydacyjnych po dodaniu CoQ10 i/lub cisplatyny w stosunku do kontroli

| enzym | Działanie pojedynczej substancji |                          |                     |                      | CoQ10 (60 µg/ml)<br>+ cisplatyna |                          | CoQ10 (120 µg/ml)<br>+ cisplatyna |                          |
|-------|----------------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
|       | cisplatyna<br>(30 µg/ml)         | cisplatyna<br>(50 µg/ml) | CoQ10<br>(60 µg/ml) | CoQ10<br>(120 µg/ml) | cisplatyna<br>(30 µg/ml)         | cisplatyna<br>(50 µg/ml) | cisplatyna<br>(30 µg/ml)          | cisplatyna<br>(50 µg/ml) |
| SOD   | Δ 81,62                          | Δ 92,34                  | Δ 194,04            | Δ 199,96             | Δ 236,68                         | Δ 388,75                 | Δ 255,30                          | Δ 390,58                 |
| GPx   | Δ 6,10                           | Δ 8,38                   | Δ 6,73              | Δ 9,14               | Δ 12,31                          | Δ 3,96                   | Δ 13,86                           | Δ 6,31                   |
| GST   | Δ 0,51                           | Δ 0,57                   | Δ 0,61              | Δ 0,69               | Δ 0,50                           | Δ 0,68                   | Δ 0,50                            | Δ 0,70                   |

Obserwuje się sprzężone działanie obu substancji na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. W przypadku SOD i GPx silniejszy wzrost aktywności tych enzymów wywierało łączne zastosowanie cisplatyny i CoQ10.

Na rysunku 4 zostały przedstawione wyniki wpływu CoQ10 na aktywność SOD w krwinkach czerwonych, poddanych działaniu cisplatyny.

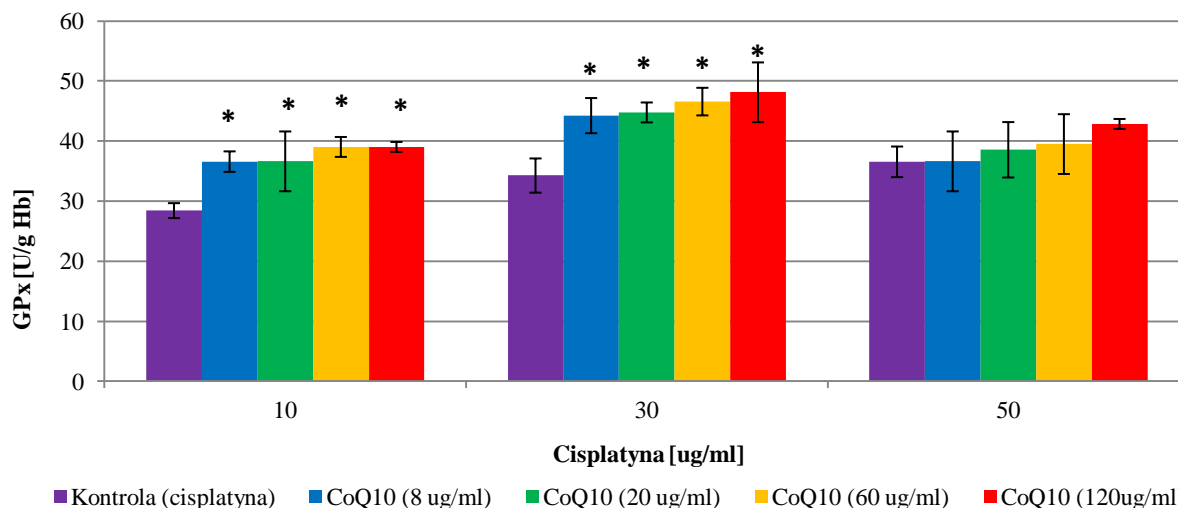


Rys. 4. Wpływ CoQ10 na aktywność SOD w erytrocytach stymulowanych cisplatyną (\* różnice istotne statystycznie dla  $p < 0,05$  (wobec kontroli))

We wszystkich roztworach preinkubowanych z CoQ10 obserwuje się wyższą aktywność SOD po dodaniu roztworu cisplatyny do zawiesiny krwinek czerwonych w porównaniu z kontrolą, zawierającą samą cisplatynę. Efekt ten jest proporcjonalny do stężenia CoQ10. Najefektywniejsze działanie obserwuje się w próbach o najwyższym stężeniu cisplatyny (50 µg/ml), gdzie stwierdza się największe różnice między aktywnością SOD w próbach z CoQ10, a aktywnością tego enzymu w próbach kontrolnych ( $\Delta = 390,58$  U/g Hb dla CoQ10 120 µg/ml) (p. rys. 4). Efekt działania CoQ10

w przypadku stężeń cisplatyny 10  $\mu\text{g/ml}$  i 30  $\mu\text{g/ml}$  był porównywalny, SOD osiągała podobne poziomy aktywności przy obu stężeniach leku. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że CoQ10 działa ochronnie na aktywność SOD w stresie oksydacyjnym komórek indukowanym cisplatyną.

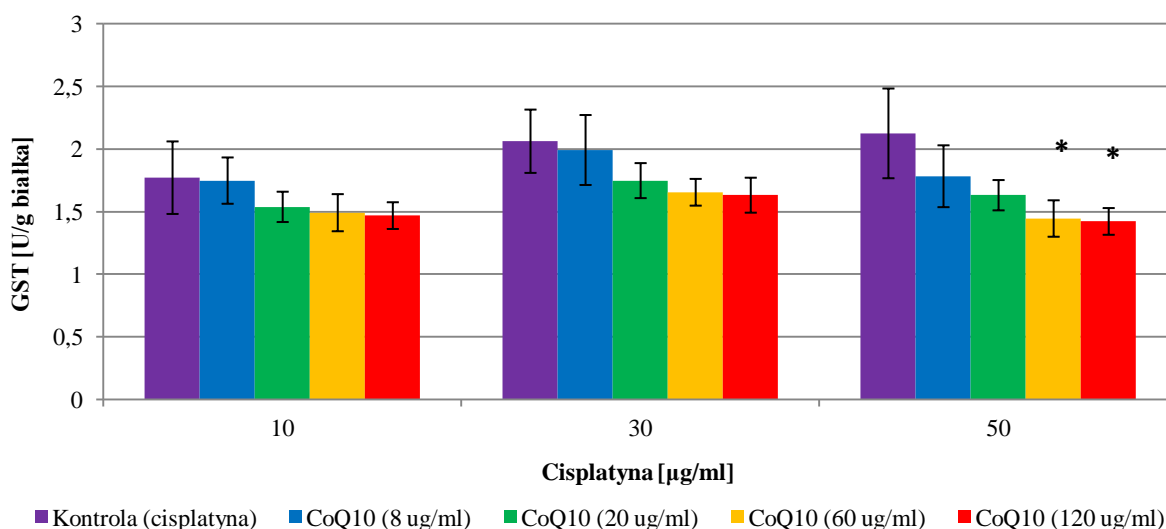
Wyniki badania wpływu CoQ10 na aktywność GPx w krwinkach czerwonych po działaniu cisplatyny przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Wpływ CoQ10 na aktywność GPx w erytrocytach stymulowanych cisplatyną (\* różnice istotne statystycznie dla  $p < 0,05$  (wobec kontroli))

Aktywność GPx w próbach z CoQ10 po dodaniu cisplatyny pozostała wyższa niż w próbach kontrolnych z samą cisplatyną. Efekt ten jest wprost proporcjonalny do stężenia CoQ10. Najsilniejsze działanie CoQ10 obserwuje się w przypadku dawki cisplatyny 30  $\mu\text{g/ml}$  (p. rys. 5). Najwyższą różnicę aktywności GPx w stosunku do próby kontrolnej stwierdza się dla próbki z CoQ10 120  $\mu\text{g/ml}$  z cisplatyną 30  $\mu\text{g/ml}$  ( $\Delta = 13,86$  U/g Hb). Analizując otrzymane wyniki, można stwierdzić, że CoQ10 wykazuje działanie ochronne na aktywność GPx w stresie oksydacyjnym indukowanym niskimi dawkami cisplatyny.

Rezultaty badań oddziaływania CoQ10 na aktywność GST w mitochondriach poddanych działaniu cisplatyny przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 6. Wpływ CoQ10 na aktywność GST w mitochondriach po zadziałaniu cisplatyny (\* różnice istotne statystycznie dla  $p < 0,05$  (wobec kontroli))

We wszystkich próbach z CoQ10 stwierdza się spadek aktywności GST w mitochondriach po dodaniu roztworu cisplatyny w porównaniu do prób kontrolnych. Im wyższe zastosowane stężenie cisplatyny oraz CoQ10 tym różnica aktywności GST w stosunku do próby kontrolnej była większa, osiągając wartość 0,7 U/g białka dla połączenia CoQ10 120 µg/ml z cisplatyną 50 µg/ml. W przypadku GST nie obserwuje się ochronnego działania CoQ10 na aktywność tego enzymu.

Przeprowadzony eksperyment miał na celu ustalenie czy CoQ10 podawany pacjentowi przed rozpoczęciem chemioterapii cisplatyną może zmniejszać skutki uboczne spowodowane indukowaniem przez ten lek stresu oksydacyjnego w komórkach zdrowych. Wyniki badań potwierdziły, że CoQ10 hamuje spadek aktywności SOD i GPx w krwinkach czerwonych spowodowany działaniem cisplatyny, zmniejszając tym samym stres oksydacyjny w komórkach. Jako antyoksydant CoQ10 eliminuje wolne rodniki powstające pod wpływem cisplatyny, chroniąc tym samym zasoby enzymatyczne bariery antyoksydacyjnej komórki i zapobiega powstawaniu uszkodzeń struktur komórkowych przez RFT. Należy dodać, że w stanach chorobowych oraz przy długotrwałej chemioterapii poziom CoQ10 może ulegać obniżeniu, co przekłada się na upośledzenie sprawności komórek, tkanek oraz całych narządów i zwiększoną wrażliwość na szkodliwe działanie leków przeciwnowotworowych. Suplementacja egzogennym CoQ10 może więc uzupełnić niedobory tego związku w organizmie i zwiększać odporność komórek na uszkodzenia oksydacyjne.

Naukowcy pod kierownictwem da Silva Machado [23], podczas badań *in vitro* na linii komórkowej PC12 guza chromochłonnego szczura odnotowali, że CoQ10 zmniejsza toksyczne działanie cisplatyny na komórki nerwowe. Pozytywne rezultaty uzyskał również zespół badaczy prowadzony przez Fouada [24]. Zaobserwowali działanie nefroprotektoryjne CoQ10 wobec uszkodzeń nerek indukowanych podaniem pojedynczej dawki cisplatyny. Badacze podawali CoQ10 myszom dootrzewnowo przez 6 dni, rozpoczynając dzień przed podaniem dawki cisplatyny. Po tym czasie poziom markerów uszkodzenia nerek (kreatyniny, azotu mocznikowego) uległ znacznemu obniżeniu, w porównaniu z grupą kontrolną otrzymującą tylko cisplatynę. Doszło również do znacznej stymulacji bariery antyoksydacyjnej organizmu przejawiającej się wzrostem aktywności enzymatycznej SOD i GPx oraz spadkiem peroksydacji lipidów. W dostępnej literaturze nie znaleziono natomiast danych dotyczących badań wpływu CoQ10 na aktywność GST w obecności cisplatyny. Przeprowadzony eksperyment ujawnił, że CoQ10 w wyższych stężeniach w połączeniu z cisplatyną może obniżać aktywność GST. Ważne jest również przeprowadzenie badań farmakokinetycznych przed rozpoczęciem suplementacji tym antyoksydantem u pacjentów poddawanych chemioterapii.

#### 4. Wnioski

W wyniku przeprowadzonych badań *in vitro* stwierdzono, że CoQ10 wykazuje właściwości ochronne na barierę antyoksydacyjną komórek, zmniejszając stres oksydacyjny wywołany podaniem cisplatyny. CoQ10 hamuje spadek aktywności SOD i GPx w krwinkach czerwonych, nie wykazuje natomiast ochronnego działania w stosunku do aktywności mitochondrialnego GST. Podstawowymi enzymami zaangażowanymi w usuwanie RFT są SOD oraz GPx. GST ma nieco mniejsze znaczenie w stresie oksydacyjnym. Nie wykazano znaczącego wpływu CoQ10 na właściwości detoksykacyjne, mierzone aktywnością GST, w komórkach traktowanych cisplatyną. Zatem, brak ochronnego wpływu CoQ10 na aktywność GST nie ma większego znaczenia dla rozwoju stresu oksydacyjnego po podaniu cisplatyny. Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych zależą od dawki CoQ10. Wyższe dawki przeciwutleniacza powodują wyższe różnice w aktywności enzymów obrony antyoksydacyjnej w krwinkach czerwonych i mitochondriach. Dawką CoQ10 o najwyższej skuteczności, która jednocześnie nie spowodowała istotnego statystycznie spadku aktywności GST, okazało się stężenie 60 µg/ml. Ze względu na ochronne właściwości CoQ10, antyoksydant ten może znaleźć kliniczne zastosowanie w łagodzeniu toksyczności cisplatyny podczas chemioterapii. Jednocześnie, CoQ10 jest obiecującym kandydatem do dalszych badań klinicznych oraz farmakokinetycznych, mających na celu łagodzenie skutków ubocznych u pacjentów poddawanych chemioterapii.



## LITERATURA

- [1] D.G. Deavall, E.A. Martin, J.M. Horner, R. Roberts: *Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity*, J Toxicol., vol. 10, 2012, s. 165–177.
- [2] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser: *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*, IJBCB, vol. 39, 2007, s. 44–84.
- [3] M. Woźniak, M. Czyż: *Mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej – potencjalne zastosowania kliniczne*, Postepy Hig Med Dosw., vol. 62, 2008, s. 613–624.
- [4] E. Gałęcka, R. Jacewicz, M. Mrowicka, A. Florkowski, P. Gałęcki: *Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości, funkcje*, Pol. Merk. Lek., vol. 25, 2008, s. 266–268.
- [5] J. Sirivarasai, W. Wananukul, S. Kaojareern, S. Chanprasertyothin, N. Thongmung, W. Ratanachaiwong, T. Sura, P. Sritara: *Association between inflammatory marker, environmental lead exposure, and glutathione s-transferase gene*, Biomed Res. Int., 2013, 474963.
- [6] V. Krajka-Kuźniak: *Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych*, Postepy Hig Med Dosw, vol. 61, 2007, s. 627–638.
- [7] E. Semieniuk, E. Skrzydlewska: *Koenzym Q10 – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka*, Postepy Hig Med Dosw, vol. 59, 2005, s. 150–159.
- [8] F.L. Crane: *Biochemical functions of coenzyme*, J Am Coll Nutr, vol. 20, 2001, s. 591–598.
- [9] A. Lass, R. Sohal: *Electron Transport-Linked Ubiquinone-Dependent Recycling of  $\alpha$ -Tocopherol Inhibits Autooxidation of Mitochondrial Membranes*, Arch. Biochem. Biophys., vol. 352, 1998, s. 229–236.
- [10] A. Czernic, M. Bartosz, J. Błaszczuk, A. Andysz, J. Błaszczuk-Suszyńska: *Wpływ suplementacji koenzymem Q10 na enzymatyczną obronę antyoksydacyjną krwinek czerwonych ludzi zdrowych*, Probl Hig Epidemiol, vol. 92, 2011, s. 632–635.
- [11] M. Miktus: *Rola koenzymu q10 we współczesnej medycynie*, Nutrition & Health, vol. 5, 2006, s. 1–12.
- [12] U. Cobanoglu, H. Demir, A. Cebi, F. Sayir, H.H. Alp, Z. Akan, T. Gur, E. Bakan: *Lipid Peroxidation, DNA Damage and Coenzyme Q10 in Lung Cancer Patients - Markers for Risk Assessment?*, APJCP, vol. 12, 2011, s. 1399–1403.
- [13] J. Schacht, A.E. Talaska, L.P. Rybak: *Cisplatin and Aminoglycoside Antibiotics: Hearing Loss and Its Prevention*, Anat Rec, vol. 295, 2012, s. 1837–1850.
- [14] V.V. Prabhu, N. Kannan, C. Guruvayoorappan: *1,2-Diazole prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in experimental rats*, Pharmacol. Rep., vol. 65, 2013, s. 980–990.
- [15] L. Brunton, K. Parker, D. Blumenthal, I. Buxton: *Podręcznik farmakologii i terapii Goodmana i Gilmana*, Wydawnictwo Czelej, Lublin 2010.
- [16] E. Sawicka, A. Długosz, J. Jędrzejczyk: *Antioxidative Enzyme Activities After Exposure to KP972 and Cisplatin*, Adv Clin Exp Med, vol. 20, 2011, s. 591–597.
- [17] S. Palipoch, C. Punsawad: *Biochemical and Histological Study of Rat Liver and Kidney Injury Induced by Cisplatin*, J Toxicol. Pathol., vol. 26, 2013, s. 293–299.
- [18] M. Sprauten, T.H. Darrah, D.R. Peterson, M.E. Campbell, R.E. Hannigan, M. Cvancarova, C. Beard, H.S. Haugnes., S.D. Fosså, J. Oldenburg, L.B. Travis: *Impact of Long-Term Serum Platinum Concentrations on Neuro- and Ototoxicity in Cisplatin-Treated Survivors of Testicular Cancer*, J Clin Oncol, vol. 30, 2012, s. 300–307.
- [19] Y. Chirino, J. Pedraza-Chaverri: *Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity*, Exp Toxicol Pathol, vol. 61, 2009, s. 223–242.
- [20] G. Lenaz: *Quinone specificity of Complex I*, BBA-Bioenergetics, vol. 1364, 1998, s. 207–221.
- [21] H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter: *Farmakologia kliniczna*, Wydawnictwo Czelej, Lublin 2001, s. 665–668.
- [22] A. Danysz, Z. Kleinrok: *Podstawy Farmakologii*, Wydawnictwo Volumed, Wrocław 1996, s. 632–640.
- [23] C. da Silva Machado, L.M. Mendonça, V. de Paula Venancio, M.L. Pires Bianchi, L.M.G. Antunes: *Coenzyme Q10 protects Pc12 cells from cisplatin-induced DNA damage and neurotoxicity*, NeuroToxicology, vol. 36, 2013, s. 10–16.
- [24] A.A. Fouad, A.I. Al-Sultan, S.M. Refaie, M.T. Yacoubi: *Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice*, Toxicol, vol. 274, 2010, s. 49–56.

otrzymano / submitted: 03.10.2013r.

wersja poprawiona / revised version: 12.11.2013r.

zaakceptowano / accepted: 17.12.2013r.