

TOMASZ DĄBROWSKI, BARTŁOMIJ KWIATKOWSKI

WPLYW CISPLATYNY I PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO NA AKTYWNOŚĆ LITYCZNĄ BAKTERIOFAGÓW Vi III

INFLUENCE OF CISPLATIN AND IONIZING RADIATION ON THE LYTIC ACTIVITY OF Vi BACTERIOPHAGE III

Katedra i Zakład Fizyki i Biofizyki AM w Gdańsku
kierownik: prof. dr Bartłomiej Kwiatkowski

Oznaczano efekt inaktywacji fagów Vi III przez natywną cisplatynę, promieniowanie γ oraz cisplatynę poddaną uprzedniemu działaniu promieniowania γ . Wykazano, że stosowanie radiacyjnie zmienionej cisplatyny powoduje wzrost inaktywacji fagów w porównaniu z natywną cisplatyną. Napromieniowanie zawiesiny fagowej z dodatkiem cisplatyny dodatkowo nasila inaktywację fagów w porównaniu do nienapromieniowanej zawiesiny fagowej z cisplatyną oraz napromieniowanej zawiesiny fagowej bez cisplatyny. Obecność cisplatyny w napromieniowanym środowisku wzmacnia efekt inaktywacji bakteriofagów.

Wykorzystanie *cis*-diaminodichloroplatyny (cisplatyny, CDDP) występuje we wzajemnie zachodzących dwóch obszarach zainteresowań: klinicznym i badań podstawowych. Pierwszy obejmuje zagadnienia użyteczności CDDP jako leku o skuteczności przeciwnowotworowej. Efekt terapeutyczny, który występuje tylko w odniesieniu do niektórych nowotworów, rozwój wtórnej lekooporności oraz znaczące, toksyczne skutki uboczne powodują, że poszukuje się pochodnych CDDP oraz związków kompleksowych innych metali, wykazujących aktywność przeciwnowotworową.

Obszerna literatura przedmiotu dotyczy badań podstawowych i obejmuje zagadnienia charakteryzujące efekt działania CDDP na komórki zwierzęce, bakteryjne, roślinne i wirusy.

Molekularny mechanizm działania CDDP, prowadzący do wystąpienia efektu cytotoksycznego wobec komórek, nie został w pełni wyjaśniony, mimo stosowania wyrafinowanych technik badawczych i różnych linii komórek nowotworowych [5].

W badaniach efektu cytotoksycznego wobec *E. coli* i *B. megaterium* wykazano znaczne nasilenie działania cisplatyny po ekspozycji zawiesiny bakteryjnej na promieniowanie jonizujące, określając CDDP jako radiouczulacz, aktywny szczególnie wobec komórek w stanie hipoksji [5]. W kolejności, przeprowadzone oznaczenia laboratoryjne z wykorzystaniem linii komórek nowotworowych oraz badania kliniczne wykazały podwyższoną cytotoksyczność

zmodyfikowanej radiacyjnie cisplatyny [3, 5]. Możliwość wystąpienia reakcji CDDP z produktami radiolizy wody (e_{aq} , rodnik OH \cdot) i pojawienia się wysoce reaktywnej formy tego związku chemicznego uważa się za nie w pełni dowiedzione [5].

W literaturze przedmiotu występują jednostkowe prace traktujące o wrażliwości nukleoproteidów – bakteriofagów na cisplatynę [6, 7, 10, 11]. Jak dotąd nie opracowano modeli eksperymentalnych z użyciem bakteriofagów, służących oznaczeniom efektu łącznego działania CDDP i promieniowania jonizującego.

Uwzględniając przytoczone stwierdzenia, w tej pracy realizowano następujące cele:

- a) oznaczenie wrażliwości bakteriofagów Vi III na CDDP oraz promieniowanie γ (^{60}Co),
- b) oznaczenie wrażliwości fagów Vi III na napromieniowaną cisplatynę,
- c) sprawdzenie możliwości występowania efektu wzmocnienia inaktywacji bakteriofaga Vi III w warunkach łącznego działania cisplatyny i promieniowania γ .

Zmierzano również do zgromadzenia wstępnych danych w celu stworzenia prostego modelu dla ujawnienia molekularnych mechanizmów reakcji z cisplatyną, która warunkuje efekt letalny. Dwuskładnikowa budowa faga Vi III (białko, dwuniciowy DNA) oraz stan statyczny wirusa poza komórką, (co eliminuje bezpośrednie efekty naprawcze) wskazywały na użyteczność oznaczeń infekcyjności fagów w zakresie biologicznego testu systemu. Zaletą przyjętego modelu doświadczalnego jest zatem wykluczenie możliwości naprawy uszkodzeń DNA, charakterystycznych dla modeli komórkowych. Eliminuje to w sposób istotny wpływ dodatkowych czynników na efekt letalny.

Ogromna większość publikacji o tematyce klinicznej, dotyczących równoczesnej chemioradioterapii, przedstawia wyłącznie analizę skutków, a nie przyczyn nasilenia działania przeciwnowotworowego. Mechanizm potencjalizacji działania cisplatyny nadal pozostaje nieokreślony, niemniej dla zwiększenia korzyści klinicznych wynikających ze skojarzonego leczenia, należałoby go dokładnie wyjaśnić.

MATERIAŁ I METODY

Szczep bakterii *Citrobacter* Ci 23 Vi+ (wrażliwy na działanie fagów Vi III) pochodził z Instytutu Maxa Plancka we Freiburgu (Niemcy) i został udostępniony przez prof. S. Stirma. Bakteriofagi Vi III otrzymano od dr. Lenka z Instytutu Higieny i Mikrobiologii Medycznej w Berlinie. Miareczkowanie bakteriofagów prowadzono wg metody Adamsa [1], stosując podwójną warstwę agarową z modyfikacjami podanymi przez Kwiatkowskiego i wsp. [8].

Namnażanie i oczyszczanie zawiesin fagowych prowadzono w oparciu o metodę podaną we wcześniejszych opracowaniach [8, 12]. Hodowlę *Citrobacter* Ci 23 Vi+ w środowisku pożywki płynnej mSB, po osiągnięciu (*optical density*) $OD_{660}^1 = 0,5$, zakażano fagiem z (*multiplicity of infection*) m.o.i. = 0,1. Po 30 min rozpoczął się wyraźny efekt lityczny. Najmniejszą wartość OD hodowli uzyskiwano po 2. godzinach od dodania faga. Lizat po wstępnym odwirowaniu „debris” (2000 g, 20 min) miał miano ok. 1×10^{10} (*plaque forming units*) pfu/ml, był przechowywany nad chloroformem w chłodni. Precypitację wirusów z lizatu uzyskiwano po dodaniu chlorku sodu do stężenia 0,5 M i polietylenoglikolu 6000 do stężenia 10%. Po przetrzymaniu przez noc w chłodni lizat ponownie odwirowano (2000 g, 20 min). Osad zawieszano w niewielkiej (0,01 objętości lizatu) objętości (*phosphate-buffered saline*) PBS o pH = 7,4. Końcowe oczyszczanie zawiesiny prowadzono przez wirowanie izopiknotyczne (60000 g, 150 min)

w liniowym gradiencie ($1,13 - 1,64 \text{ g/cm}^3$) chlorku cezu. Pasma zawierające bakteriofagi, po ściągnięciu z probówki koloidowej, dializowano wobec PBS. Otrzymana zawiesina wykazywała miano ok. 10^{12} pfu/ml i charakteryzowała się wartością $OD_{260}/OD_{280} = 1,63$. Była przechowywana nad chloroformem w chłodni.

Do doświadczeń użyto cisplatynę w postaci stosowanego w lecznictwie preparatu – Cisplatin (Ebewe, Austria). Stosowano również cisplatynę w postaci substancji suchej (SIGMA, USA) i jej roztworów w 0,9% chlorku sodu lub PBS. Roztwory cisplatyny chroniono przed światłem. Unikano także bezpośredniego kontaktu związku ze sprzętem laboratoryjnym zawierającym glin [4].

Źródłem promieniowania γ był izotop kobaltu, ^{60}Co , umieszczony w aparacie terapeutycznym „Gammatron 3” firmy Siemens. Napromieniowanie próbek zawierających zawiesinę fagów Vi III w roztworze cisplatyny oraz roztwór cisplatyny o stężeniu w zakresie 0,5; 5; 50 i 500 $\mu\text{g/ml}$ (tzn. odpowiednio: 0,0016 mM, 0,0166 mM, 0,166 mM i 1,66 mM) przeprowadzono w ciemności, w temperaturze ok. 20 °C, w probówkach polietylenowych. Moc dawki promieniowania wynosiła 1 Gy/min. Roztwory napromieniowano w środowisku zawierającym 0,9% chlorku sodu lub PBS dawką 25, 50, 75–80, 100–105 i 150–155 Gy. Dawkę pochłoniętą oznaczano za pomocą dozymetru Fricka [2] wobec każdego z przeprowadzanych doświadczeń.

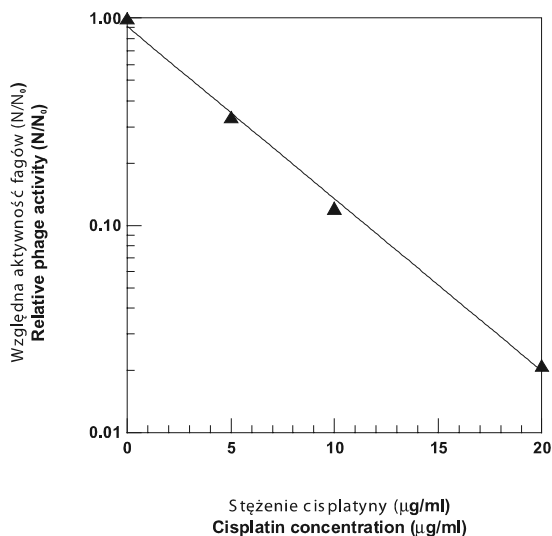
Oznaczenia wartości pH wykonano przy użyciu pehametru, model 350 firmy Orion, Boston, USA, z elektrodą kombinowaną typu ROSS. Różnica wartości pH roztworu cisplatyny między preparatem napromieniowanym i nie poddanym napromieniowaniu nie przekraczała 0,1 jednostki [4].

Zawiesiny fagów w buforze PBS miareczkowano, stosując metodę podwójnej warstwy agarowej [1, 8]. Seria rozcieńczeń z danej próby została przygotowana każdorazowo w taki sposób, by ostatecznie uzyskać na płytce od 100 do 300 „łysinek” (miejscowych przejaśnień na murawie bakteryjnej, spowodowanych lizą bakterii zakażonych fagami). Wynik miareczkowania otrzymano ze zliczeń wykonanych dla co najmniej trzech płytek z tej samej serii rozcieńczeń. Przy uwzględnieniu, że największa wartość wielokrotności zakażenia (*multiplicity of infection*) m.o.i. wynosi w miareczkowaniu 0,01 oraz stosując rozkład Poissona, wyliczono, że 99% łysinek jest następstwem pojedynczych zakażeń komórek bakteryjnych. Popelniany błąd zliczeń był większy od błędu wynikającego z wielokrotnych zakażeń. Dla współczynnika ufności wynoszącego 0,95 błąd względny miareczkowania nie przekraczał jednak 10%. Do aproksymacji funkcji $N = f(D)$ zastosowano metodę najmniejszych kwadratów, określając współczynniki korelacji oraz ich błędy. Wartości LD_{37} podano na poziomie ufności 0,95.

WYNIKI

1. Inaktywacja bakteriofagów Vi III przez cisplatynę

W badaniach wstępnych zmierzano do oznaczenia wrażliwości bakteriofagów Vi III na cisplatynę oraz określenia warunków inkubacji zawiesiny w środowisku PBS zawierającym CDDP. Próbą kontrolną w tych oznaczeniach była zawiesina fagów nie zawierająca CDDP. Wyniki miareczkowania zawiesiny po 30. minutach inkubacji w temperaturze 37 °C z różnymi stężeniami cisplatyny przedstawiono na ryc. 1.

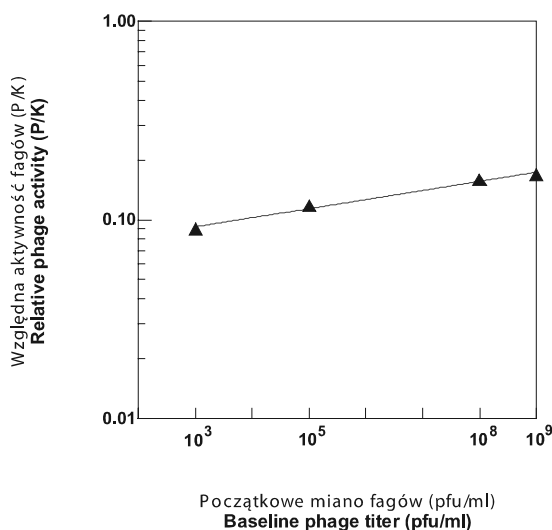


Ryc. 1. Względna aktywność fagów Vi III w funkcji stężenia cisplatyny po 30. minutowej inkubacji w temperaturze 37 °C

Fig. 1. Relative Vi phage III activity as a function of cisplatin concentration after 30 min incubation at 37 °C

W środowisku zawierającym największe stężenie CDDP (20 µg/ml) inaktywacja osiąga wartość 97,9%. Wyliczona wartość LD_{37} odpowiada 4,815 µg/ml. W tych oznaczeniach miano fagów w próbie kontrolnej (N_0) wynosiło $2,8 \times 10^5$ pfu/ml i nie zmieniało się podczas inkubacji zawiesiny w środowisku PBS.

Ograniczając zakres oznaczeń do wskazanych warunków inkubacji, w dalszym postępowaniu zmierzano do określenia wielkości inaktywacji wobec zawiesin o różnym początkowym mianie fagów. Dla zrealizowania tego zamierzenia stosowano zawiesiny, wykazujące miano początkowe od 10^3 do 10^9 pfu/ml, które były inkubowane z cisplatyną o stężeniu 10 µg/ml. Wyniki oznaczeń końcowych przedstawiono na ryc. 2.

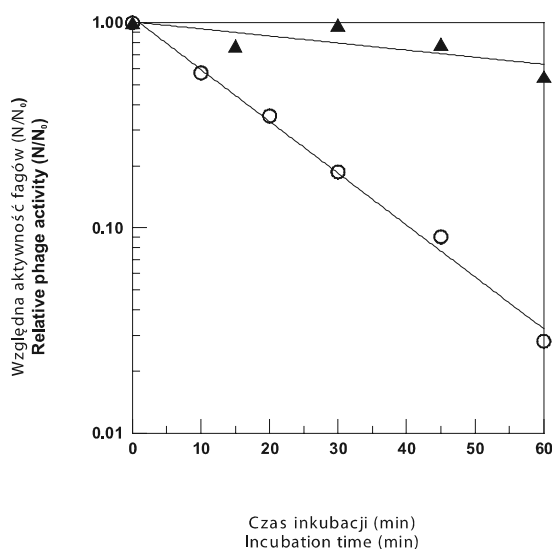


Ryc. 2. Względna aktywność fagów Vi III w funkcji początkowego miana fagów po 30. min inkubacji z CDDP o stężeniu 10 µg/ml w temperaturze 37 °C. Oznaczenia: P – miano fagów w próbie z CDDP; K – miano fagów w próbie kontrolnej. Dla początkowego miana fagów: 10^3 , 10^5 , 10^8 i 10^9 pfu/ml, wartość LD_{37} wynosi odpowiednio: 4,15; 4,68; 5,45 i 5,62 µg/ml

Fig. 2. Relative Vi phage III activity as a function of baseline phage titer after 30 min incubation at 37 °C with 10 µg/ml CDDP. Abbreviations: P – phage titer in CDDP assay; K – phage titer in control assay. For baseline phage titers 10^3 , 10^5 , 10^8 and 10^9 pfu/ml, the respective LD_{37} values are: 4.15, 4.68, 5.45 and 5.62 µg/ml.

Wzrost stężenia fagów w zawieszynie inkubacyjnej w zakresie 6. rzędów wielkości (10^3 do 10^9 pfu/ml) zmniejsza efekt inaktywacji z 91% do 83,1% oraz zwiększa wartość LD_{37} z 4,15 $\mu\text{g/ml}$ do 5,62 $\mu\text{g/ml}$. Może to wskazywać na zmniejszenie dostępności biologicznej cisplatyny. Uwzględniając wskazane wyniki doświadczeń wstępnych w dalszym postępowaniu ograniczono oznaczanie efektu inaktywacji fagów wobec stężeń CDDP w zakresie 1–10 $\mu\text{g/ml}$ oraz stosowano zawiesiny fagowe o określonym, początkowym mianie rzędu 10^4 lub 10^8 pfu/ml.

W kolejnym etapie pracy wykonano oznaczenia zmiany aktywności fagów w funkcji czasu inkubacji. Zrealizowano je wobec zawiesin inkubowanych ze stężeniem CDDP odpowiadającym 10 $\mu\text{g/ml}$, przetrzymywanych w temperaturze 37 °C oraz 0 °C (ryc. 3).



Ryc. 3. Względna aktywność fagów Vi III w funkcji czasu inkubacji z CDDP o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ w temperaturze 0 °C (▲) i 37 °C (○) w środowisku PBS

Fig. 3. Relative Vi phage III activity as a function of incubation time with 10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP at 0 °C (▲) and 37 °C (○) in PBS medium

W zawieszynie o temp. 0 °C po 60 min inkubacji odnotowano 60% aktywności, natomiast w temp. 37 °C zmniejszyła się prawie o dwa rzędy wielkości. Wyliczone wartości LD_{37} po 60 min inkubacji w temperaturze 37 °C i 0 °C wynoszą odpowiednio 2,8 oraz 16,54 $\mu\text{g/ml}$.

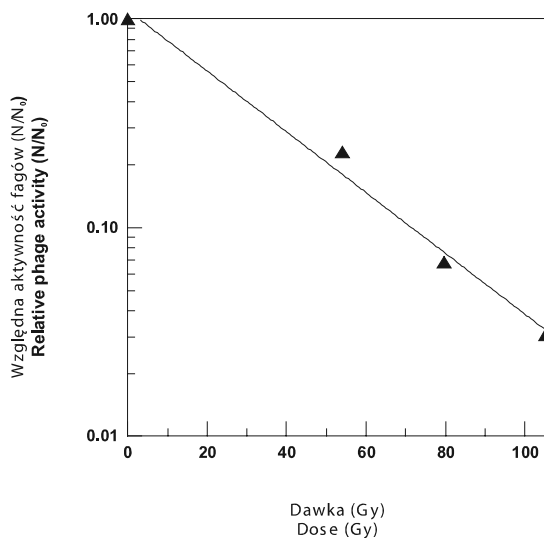
2. Inaktywacja zawiesiny bakteriofagów Vi III po inkubacji z napromieniowanym roztworem cisplatyny

Ustalone wcześniej warunki oznaczeń użyte dla określenia efektu inaktywacji przez CDDP były zachowane w doświadczeniach z wykorzystaniem napromieniowanego roztworu cisplatyny. W każdym doświadczeniu przeprowadzano oznaczenia serii kontrolnej wobec roztworu nienapromieniowanego ($D = 0$) oraz roztworów po napromieniowaniu wzrastającymi dawkami do ok. 150 Gy. Eliminację trwałego produktu radiolizy wody, nadtlenu wodoru, który powoduje postradiacyjną inaktywację fagów, uzyskiwano przez wstępną inkubację napromieniowanego roztworu cisplatyny z katalazą [15] lub jego 100-krotne rozcieńczenie. W tabeli I zestawiono dane z tych oznaczeń.

Tab. I

Inaktywacja fagów przez napromienioną cisplatynę
Inactivation of phages by irradiated cisplatin

Dawka [Gy] Dose	0	54,04	79,65	105,25	Napromieniowanie roztworu Medium irradiation
Stężenie cisplatyny [mg/ml] Cisplatin concentration	5,25	5,25	5,25	5,25	
Inkubacja z katalazą / Incubation with catalase					
$N_0 \times 10^8$ [pfu/ml]	33,75	33,75	33,75	33,75	Inkubacja (1 godz., 37 °C) Incubation (1 h, 37 °C)
$N_D \times 10^7$ [pfu/ml]	46,5	10,7	3,16	1,44	
Stężenie cisplatyny [μg/ml] Cisplatin concentration	5	5	5	5	
Aktywność względna fagów Relative phage activity [$N_D/N_{D=0}$]	1	0,23	0,068	0,031	Wyliczenie wskaźników inaktywacji Calculation of inactivation rates
LD ₃₇ [μg/ml]	2,52	1,45	1,07	0,92	



Ryc. 4. Względna aktywność fagów po inkubacji (1 godz., 37 °C) z cisplatyną o stężeniu 5 μg/ml napromienioną określoną dawką i cisplatyną nie poddaną napromienianiu. Oznaczenia: N – miano fagów w próbie z napromienioną cisplatyną; N_0 – miano fagów w próbie z natywną cisplatyną

Fig. 4. Relative Vi phage III activity after incubation (1 h, 37 °C) with 5 μg/ml cisplatin irradiated with a given dose. Abbreviations: N – phage titer in irradiated assay; N_0 – phage titer in non-irradiated assay

W warunkach wykorzystania napromieniowanej dawką 105,25 Gy cisplatyny wartość LD_{37} zmniejsza się do 0,92 mg/ml wobec LD_{37} cisplatyny nienapromieniowanej 2,52 $\mu\text{g/ml}$. Oznacza to, w zrozumieniu efektu inaktywacji fagów, ponad 2,5-krotny wzrost ich wrażliwości.

Przyjmując za wartość odniesienia efekt inaktywacji wywołany przez nienapromieniowaną cisplatynę, użycie napromieniowanej zmniejsza względną przeżywalność fagów (ryc. 4). Roztwór cisplatyny po napromieniowaniu dawką 105,25 Gy zwiększa ponad 30-krotnie inaktywację bakteriofagów Vi III.

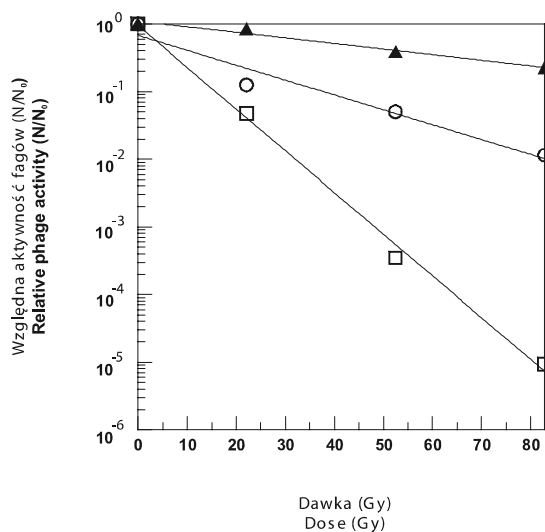
3. Inaktywacja bakteriofagów Vi III w zawieszynie poddanej napromieniowaniu

W zakresie oznaczeń efektu radiobiologicznego stosowanych zawiesin faga Vi III, postępowanie metodyczne uwzględniało występowanie ich inaktywacji przez nienapromieniowaną cisplatynę oraz efekt postradiacyjny. Ograniczenie inaktywacji przez nienapromieniowaną CDDP uzyskiwano przez dodanie fagów Vi III do roztworów bezpośrednio przed ich napromieniowaniem. Eliminację efektu postradiacyjnego, będącego następstwem działania trwałego produktu radiolizy wody – nadtlenu wodoru, uzyskiwano rozcieńczając 100-krotnie buforem napromieniowaną zawieszynę. Takie postępowanie, w odniesieniu do środowiska zawierającego cisplatynę, ograniczało efekt jej działania tylko do czasu napromieniowania próby.

Istotnym problemem metodycznym przeprowadzanych oznaczeń radiobiologicznych było również użycie właściwych stężeń cisplatyny w środowisku PBS. W wyniku wielokrotnych doświadczeń wstępnych, których wyniki nie będą tu przedstawione, każda seria oznaczeń została wykonana równocześnie wobec zawieszyny fagów w trzech różnych środowiskach: PBS, PBS zawierającym cisplatynę o stężeniu 1 mg/ml i PBS z dodatkiem cisplatyny o stężeniu 5 mg/ml. Efekt radiobiologiczny w środowisku PBS traktowano każdorazowo jako odniesienie i sprawdzian postępowania metodycznego (oznaczenie kontrolne). Posługiwanie się roztworami cisplatyny o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ stanowi odniesienie do oznaczeń inaktywacji fagów wobec

Ryc. 5. Wpływ wielkości dawki promieniowania γ na względną aktywność fagów Vi III zawieszonych w buforze PBS z dodatkiem cisplatyny o stężeniach 1 i 5 $\mu\text{g/ml}$. CDDP dodawano bezpośrednio przed napromieniowaniem. Oznaczenia: \blacktriangle – napromieniowana zawieszyna fagowa; \circ – napromieniowana zawieszyna fagowa z dodatkiem CDDP o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$; \square – napromieniowana zawieszyna fagowa z dodatkiem CDDP o stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 5. Effect of absorbed γ radiation dose on the relative activity of Vi phages III suspended in PBS with 1 or 5 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin. CDDP was added immediately before irradiation. Assay symbols: \blacktriangle – phage suspension; \circ – phage suspension with 1 $\mu\text{g/ml}$ CDDP; \square – phage suspension with 5 $\mu\text{g/ml}$ CDDP



napromieniowanej CDDP ($LD_{37} = 0,92 \mu\text{g/ml}$), natomiast stężenie $5 \mu\text{g/ml}$ odpowiednio do CDDP nie poddanej napromieniowaniu ($LD_{37} = 5,45 \mu\text{g/ml}$).

Wyniki jednego z kompleksowych oznaczeń zostały przedstawione na ryc. 5.

Wyliczone na podstawie danych szczegółowych (N/N_0 ; D) wartości LD_{37} wobec poszczególnych prób wynoszą:

środowisko PBS (CDDP, $c = 0 \mu\text{g/ml}$) – $55,54 \text{ Gy}$,

środowisko PBS (CDDP, $c = 1 \mu\text{g/ml}$) – $18,03 \text{ Gy}$,

środowisko PBS (CDDP, $c = 5 \mu\text{g/ml}$) – $7,07 \text{ Gy}$.

DYSKUSJA

Istotnym celem realizacji tej pracy było określenie i prześledzenie efektu inaktywacji fagów Vi III przez natywną i zmodyfikowaną promieniowaniem jonizującym cisplatynę. Obok innych, przedstawionych we wstępie, dodatkowym uzasadnieniem realizacji celu pracy jest skąpa ilość doniesień dotyczących inaktywacji bakteriofagów przez cisplatynę [6, 7, 10]. W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących inaktywacji fagów w warunkach łącznego działania promieniowania jonizującego i cisplatyny oraz toksycznego efektu modyfikowanej radiacyjnie cisplatyny. Wskazane uwarunkowania utrudniają porównanie i omówienie własnych danych w kontekście danych literaturowych.

W chemii związków koordynacyjnych uważa się związki typu cisplatyny (II) jako słabe kwasy o wysokim powinowactwie do siarki i azotu [13]. Uzasadnia to tworzenie wiązań Pt(II) z białkami, jak również z DNA oraz z częścią polarną lipidów. Wobec białek reakcja zachodzi z natywną cisplatyną, natomiast inne elementy strukturalne komórki reagują z produktami hydrolizy cisplatyny [13], głównie z $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$. Produkty hydrolizy pojawiają się spontanicznie w cytoplazmie komórki wskutek zmniejszonego stężenia jonów chlorkowych [5]. Yachnin i wsp. [14] uzyskali dowód doświadczalny potwierdzający tą hipotezę w odniesieniu do nowotworowej linii komórkowej U-1285. Wykazali oni, że użycie formy jednohydroksy zwiększa efekt toksyczny w porównaniu do występującego wobec natywnej cisplatyny. Uważa się, że zwiększenie cytotoksyczności należy odnosić bardziej do zmian w błonie komórek niż do formowania adduktów w DNA [13, 14]. Podtrzymywana jest jednak hipoteza, że wewnątrzkomórkowo przy $\text{pH} \approx 7,4$ i temperaturze 37°C natywna cisplatyna podlega szybkiej hydrolizie. Produkty hydrolizy CDDP oddziałują z makromolekułami cytoplazmy, ale procesem bezpośrednio warunkującym cytotoksyczność związku jest uszkodzenie chromosomalnego DNA [5]. Zwiększenie reaktywnych form CDDP w środowisku nie eliminuje reakcji z elementami cytoplazmy, nasila jedynie reakcje ze składnikami błony komórkowej.

Identyfikacja trwałego produktu radiacyjnej modyfikacji cisplatyny była celem oznaczeń analitycznych [4]. Posługując się metodami spektrometrii optycznej wskazano na możliwość powstawania w napromieniowanym roztworze trwałych pochodnych hydroksylowych cisplatyny, pojawiających się pomimo nadmiaru jonów chlorkowych hamujących hydrolizę związku. Może to być przyczyną wzrostu cytotoksyczności napromieniowanej cisplatyny

Nieco inne aspekty reakcji podnoszone są w odniesieniu do nukleoprotein – bakteriofagów. Drobnik i wsp. [6] w oparciu o oznaczenia przeżywalności fagów (T2, T4, T4 BO1, T3, λ) w środowiskach zawierających cisplatynę i jej produkty hydrolizy ujawniają w warunkach inkubacji inaktywację dwuetapową: etap powolny w zakresie 40–90 min i następujący o cha-

rakterze zależności wykładniczej. Przedłużony zakres wolniejszej inaktywacji występuje dla osmotycznie wrażliwych bakteriofagów (T2, T4), co odnoszone jest do małej przepuszczalności kapsydu. Inaktywacja fagów przez produkt hydrolizy jest 40–80 razy większa niż związku natywnego. Autorzy dochodzą do wniosku, że inaktywacja jest spowodowana produktem hydrolizy cisplatyny powstającym w kapsydzie bakteriofaga.

Dane doświadczalne przedstawione w tej pracy wskazują na dużą wrażliwość i szybką inaktywację bakteriofagów Vi III, która zależy wykładniczo od stężenia oraz czasu inkubacji z cisplatyną w różnych warunkach temperaturowych (0 °C, 37 °C). Dane te są zbliżone do danych literaturowych [6], odnoszących się do układów komórkowych i definiujących kwasy nukleinowe jako docelowy punkt działania cisplatyny [5]. Inkubacja w temp. 37°C przez 30 min wymaga stężenia 4,815 µg/ml cisplatyny dla spadku przeżywalności fagów Vi III do 37%, a po godzinnej inkubacji taki sam efekt jest uzyskiwany wobec stężenia 2,8 µg/ml. Inaktywacja Vi III, wyrażona przez względną aktywność (N/N_0), zależy od początkowego ich miana N_0 (ryc. 2). Może to wskazywać na zmniejszenie dostępności biologicznej reagentu. Wobec względnie dużego stężenia cisplatyny $[(NH_3)_2PtCl_2]^0$ to zmniejszenie dostępności można odnosić do jej postaci jonowych, takich jak $[(NH_3)_2Pt(H_2O)]^+$, $[(NH_3)_2Pt(H_2O)_2]^{2+}$. Byłoby to zgodne z hipotezą Wanga i wsp. [13], że nawet w obecności dużego stężenia jonów Cl^- , frakcja cisplatyny, chociaż bardzo mała, ulega hydrolizie. Wydaje się, że formy hydratowane cisplatyny są przede wszystkim odpowiedzialne za efekt inaktywacji bakteriofagów Vi III w warunkach inkubacji z natywną cisplatyną.

Wartości pH dla poszczególnych napromieniowanych roztworów ($\Delta pH < 0,1$) były oznaczane szczególnie dokładnie, uwzględniając doniesienie Laurencot i wsp. [9] oraz Yachnin i wsp. [14], że mogą one być ważnym czynnikiem środowiska, ważniejszym od stężenia chlorków dla reakcji z cisplatyną.

Inkubacja fagów Vi III (1 godz., 37 °C) z napromieniowanym roztworem cisplatyny wykazuje występowanie nasilającej się inaktywacji. LD_{37} próby kontrolnej ($D = 0$) wynosiło w tych oznaczeniach 2,52 µg/ml, a dla roztworu napromieniowanego granicznie dużą dawką ($D = 105,25$ Gy) zaledwie 0,92 µg/ml. Ten roztwór zwiększa ponad 30-krotnie inaktywację fagów Vi III. Wydaje się to potwierdzać przypuszczenie, że inaktywacja fagów Vi III jest spowodowana przede wszystkim produktami hydrolizy cisplatyny. Na podkreślenie zasługuje fakt, że zwiększona inaktywacja występuje w środowisku zawierającym duże stężenia Cl^- . Małą wartość LD_{37} (poniżej 1 µg/ml) uzyskali również Shooter i wsp. [10] testując wobec cisplatyny przeżywalność bakteriofaga T7, który można uznać za strukturalny odpowiednik faga Vi III. Oznaczenia przeprowadzono w środowisku 0,02 M buforu fosforanowego ($pH = 7$), który generuje zmiany składu natywnej cisplatyny w postaci podstawienia Cl^- przez H_2O . Według wyliczeń podanych w cytowanej pracy średnia dawka letalna wobec faga odpowiada związaniu 5 molekuł Pt, ale 76% Pt jest wiązana z DNA. Analizując uzyskane wyniki, dane z badań własnych [5] i zaczerpnięte z piśmiennictwa wydaje się być zasadne stwierdzenie, że inaktywacja fagów Vi III jest spowodowana przede wszystkim obecnością form jonowych cisplatyny w środowisku. Przepuszczalność kapsydu, reakcja z białkami oraz pojawianie się form hydratowanych wewnątrz główki faga może dodatkowo modyfikować efekt inaktywacji.

Zmiany względnej aktywności fagów Vi III w warunkach łącznego działania cisplatyny i promieniowania jonizującego wykazują, w funkcji dawki, zależność wykładniczą (ryc. 5). Uzyskano je dla wybranych stężeń cisplatyny w PBS, a mianowicie: 1 i 5 µg/ml. Jako próbę odniesienia traktowano efekt radiobiologiczny występujący w buforze (bez dodatku cisplatyny),

po napromieniowaniu zawiesiny fagów Vi III. Względna aktywność fagów (N/N_0) wykazuje, dla wszystkich prób, wykładniczą zależność od dawki promieniowania. Obecność cisplatyny w środowisku nasila efekt inaktywacji. W warunkach napromieniowania zawiesiny największą dawką (82,81 Gy) w środowisku zawierającym CDDP o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$, inaktywacja zwiększa się prawie 100-krotnie, a wobec stężenia 5 $\mu\text{g/ml}$ – prawie 10^5 -krotnie w stosunku do efektu występującego w PBS. W odniesieniu do oznaczenia kontrolnego (N_0), w tym ostatnim zachodzi inaktywacja zmniejszająca przeżywalność jedynie 7-krotnie.

Względniając pracę Zaremby [15] należy przyjąć, że inaktywacja fagów Vi III w przeprowadzonych oznaczeniach jest następstwem inaktywacji pośredniej, tzn. wywołanej przez produkty radiolizy wody (próba kontrolna) oraz/lub produkty ich reakcji z cisplatyną. Duży element niepewności we wnioskowaniu jest związany z reaktywnością form pośrednich reakcji wolnych rodników z cisplatyną [5]. Z przeprowadzonych wyliczeń wynika, że dawki promieniowania odpowiadające LD_{37} są zdecydowanie mniejsze wobec zawiesiny występującej w środowisku zawierającym cisplatynę. Niewielkie stężenie cisplatyny w środowisku (1 $\mu\text{g/ml}$) zmniejsza LD_{37} ponad trzykrotnie w stosunku do efektu uzyskanego dla próby kontrolnej (odpowiednio 18,03 Gy oraz 55,54 Gy). Pięciokrotny wzrost stężenia cisplatyny (5 $\mu\text{g/ml}$) wywołuje dalsze zmniejszenie tej wartości, ale jedynie 2,5-krotnie ($LD_{37} = 7,07$ Gy). To względne zmniejszenie efektu inaktywacji może być następstwem możliwości wystąpienia reakcji: wolne rodniki – cisplatyna w warunkach określonej wartości wydajności radiacyjnej promieniowania.

Podsumowując, w warunkach łącznego działania promieniowania jonizującego i cisplatyny występuje zwiększony stopień inaktywacji bakteriofagów Vi III wobec sumy oddziaływań dwóch czynników niezależnie od siebie. W warunkach opisanych doświadczeń i przy uwzględnieniu uzyskanych danych cisplatyna jest czynnikiem potencjalizującym działanie promieniowania jonizującego.

Przedstawione wyniki i wnioski można traktować jedynie jako etap wstępnych badań zmierzających do poznania mechanizmu reakcji molekularnej z cisplatyną. W tym zakresie wiele problemów oczekuje na wyjaśnienie.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki umożliwiają przedstawienie następujących wniosków.

1. Przeżywalność (aktywność lityczna wobec bakterii *Citrobacter* Ci 23 Vi+) fagów Vi III zależy wykładniczo od stężenia cisplatyny w mieszaninie inkubacyjnej oraz od czasu inkubacji fagów w środowisku zawierającym cisplatynę. Wzrost temperatury inkubacji dodatkowo zmniejsza przeżywalność fagów.
2. Stosowanie radiacyjnie zmienionej cisplatyny powoduje zmniejszenie przeżywalności fagów w porównaniu do zawiesiny w środowisku z nienapromieniowaną cisplatyną.
3. Napromieniowanie zawiesiny fagowej z dodatkiem cisplatyny powoduje znaczny wzrost inaktywacji fagów w porównaniu do nienapromieniowanej zawiesiny fagowej z cisplatyną oraz napromieniowanej zawiesiny fagowej bez cisplatyny. Obecność cisplatyny w napromieniowanym środowisku wzmacnia efekt radiobiologiczny w odniesieniu do bakteriofagów Vi III.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams M. H.: Bacteriophages. New York: Interscience Publ., 1959. – 2. Broszkiewicz R.: Chemiczne metody dozymetrii promieniowania jonizującego. Warszawa: Wydaw. Nauk.-Techn., 1971. – 3. Coughlin C. T., Richmond R. C.: Biologic and clinical developments of cisplatin combined with radiation: concepts, utility, projections for new trials, and the emergence of carboplatin. *Semin. Oncol.* 1989, 16, 4 suppl. 6, 31. – 4. Dąbrowski T., Kwiatkowski B.: Oznaczanie zmienności strukturalnej cisplatyny w następstwie ekspozycji jej roztworów na promieniowanie jonizujące. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 2004, 34, 71. – 5. Dewit L.: Combined treatment of radiation and cis-diamminedichloroplatinum (II): a review of experimental and clinical data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1987, 13, 3, 403. – 6. Drobnik J., Błahuskova A., Vasilukova S., Krekulova A.: Inactivation of bacteriophages with cis-platinum(II) diamminedichloride. *Chem. Biol. Interact.* 1975, 11, 5, 365. – 7. Filipski J., Kohn K. W., Bonner W. M.: The nature of inactivating lesions produced by platinum(II) complexes in phage lambda DNA. *Chem. Biol. Interact.* 1980, 32, 3, 321. – 8. Kwiatkowski B., Beilharz H., Stirm S.: Disruption of Vi bacteriophage III and localization of its deacetylase activity. *J. Gen. Virol.* 1975, 29, 3, 267. – 9. Laurencot C. M., Kennedy K. A.: Influence of pH on the cytotoxicity of cisplatin in EMT6 mouse mammary tumor cells. *Oncol. Res.* 1995, 7, 7/8, 371. – 10. Shooter K. V., Howse R., Merrifield R. K., Robins A. B.: The interaction of platinum II compounds with bacteriophages T7 and R17. *Chem. Biol. Interact.* 1972, 5, 5, 289.
11. Tanaka N., Saito H., Kimoto H., Taketo A.: Effects of cis-diamminedichloroplatinum(II) on *Escherichia coli* and bacteriophage systems. *J. Biochem. (Tokyo)* 1998, 123, 5, 821. – 12. Tucholski J., Dąbrowski T., Zaremba E., Gazda D., Kwiatkowski B.: Izolacja i charakterystyka adsorpcji bakteriofaga \emptyset 1.2/92. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 1999, 29, 17. – 13. Wang K., Lu J. F., Li R.: The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coord. Chem. Rev.* 1996, 151, 53. – 14. Yachnin J. R., Wallin I., Lewensohn R., Sirzen F., Ehrsson H.: The kinetics and cytotoxicity of cisplatin and its monohydrated complex. *Cancer Lett.* 1998, 132, 1, 175. – 15. Zaremba E., Kwiatkowski B., Ciesielski B.: Radiosensitivity of Vi bacteriophage III. *Nukleonika* 1989, 34, 1/3, 37.

T. Dąbrowski, B. Kwiatkowski

INFLUENCE OF CISPLATIN AND IONIZING RADIATION
ON THE LYTIC ACTIVITY OF Vi BACTERIOPHAGE III

Summary

In this study we determined Vi bacteriophage III sensitivity to native cisplatin, γ radiation (^{60}Co) or to irradiated cisplatin. We checked the possibility of enhanced Vi bacteriophage III inactivation under combined exposure to cisplatin and γ radiation. We used highly purified phage suspensions in 0.9% NaCl solution or PBS. Our study implies that survival of Vi bacteriophage III shows an exponential inverse correlation with cisplatin concentration in the incubation medium and the time of phage incubation in the presence of cisplatin. Incubation at 37 °C for 30 min corresponds to the value of $\text{LD}_{37} = 4.815 \mu\text{g/ml}$, whereas incubation for 60 min – to $\text{LD}_{37} = 2.8 \mu\text{g/ml}$. Incubation of Vi phage III (1 h, 37 °C) with irradiated cisplatin solutions demonstrated enhanced inactivation. Cisplatin solution irradiated with a 105.25 Gy dose demonstrated an inactivation effect corresponding to $\text{LD}_{37} = 0.92 \mu\text{g/ml}$. Such conditions increase Vi phage III inactivation over 30-fold in comparison with non-irradiated solution. Relative Vi phage III activity changes under combined exposure to cisplatin and ionizing radiation, demonstrate also exponential relationship in the dose function. Low cisplatin concentration in the medium (1 $\mu\text{g/ml}$) reduces the LD_{37} over 3-fold in comparison with the radiobiologic effect of the control assay. These data show that the use of irradiated cisplatin reduces phage survival in comparison with suspensions containing

non-irradiated cisplatin. The irradiation of phage suspension with cisplatin causes a significant increase of phage inactivation in comparison with either treatment alone. Our results suggest that presence of cisplatin in irradiated medium enhances the radiobiological effect on Vi bacteriophages III.

Adres: dr T. Dąbrowski
Katedra i Zakład Fizyki i Biofizyki AMG
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail: tomdabro@amg.gda.pl