

AN INFLUENCE OF CISPLATIN ON TOBACCO CELL CULTURE *NICOTIANA TABACUM* BY-2

VLIV CISPLATINY NA BUNĚČNOU SUSPENZNÍ KULTURU TABÁKU *NICOTIANA TABACUM* BY-2

Babula, P.¹⁾, Adam V.^{2,3)}, Petrlová J.²⁾, Havel L.⁴⁾, Sladký Z.¹⁾, Kizek R.²⁾

¹⁾Department of Natural Drugs, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

²⁾Department of Chemistry and Biochemistry, and ⁴⁾Department of Plant Biology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

³⁾Department of Analytical Chemistry and Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic

E-mail: petr_babula@email.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Derivatives of platinous and platinic complex with strong alkylating effect have important role in treatment of malignant disorders. Cisplatin was introduced to the therapy of these disorders in 1965 followed by carboplatin and oxaliplatin. The spectrum of their cytostatic effects is wide and influences carcinomas of testicles, pulmonary, breast, prostate and of many others. The mechanism of cisplatin effect has been well examined in *in vitro* models of malignant cell lines, but has never been studied on plant cell lines. The main aim of our work was to study cytotoxic effect of cisplatin on plant cell suspension culture of *Nicotiana tabacum* BY-2. We observed changing of their viability with increasing cisplatin concentration in culture medium using fluorescent microscopy. Mitotic index was studied too. We also measured morphological structure of nuclei (nucleolus, heterochromatin and euchromatin) as well as mitosis and single phases of mitosis.

Keywords: Cisplatin, *Nicotiana tabacum* BY-2, Cell viability, nucleus, DNA.

ABSTRAKT

Deriváty platnatých a platičitých komplexů mají jako alkylační látky nezastupitelnou roli v léčbě nádorových onemocnění. Jako první byla do terapie zavedena cisplatina (1965), později karboplatina a oxaliplatina. Spektrum jejich protinádorového účinku je široké a zahrnuje nádory varlat, plic, prsu, prostaty a mnohé další. Protinádorový mechanismus účinku cisplatin je dobře prozkoumán *in vitro* na nádorových buněčných liniích, nikdy však nebyl sledován vliv cisplatin na rostlinné buňky. Cílem naší práce bylo ověření cytotoxického účinku cisplatin na rostlinné buňky suspenzní buněčné kultury *Nicotiana tabacum* BY-2. Bylo zjišťováno ovlivnění životnosti buněk suspenzní kultury tabáku v průběhu kultivace s přídavkem cisplatin v různých koncentracích v kultivačním médiu za použití metod fluorescenční mikroskopie. Dále byl stanoven mitotický index. Hodnocena byla rovněž morfologická stavba jádra (jadérko, heterochromatin a euchromatin) a průběh buněčného dělení se zaměřením na jednotlivé fáze mitózy.

Klíčová slova: Cisplatina, *Nicotiana tabacum* BY-2, životnost buněk, jádro, DNA.

ÚVOD

Cisplatina, *cis*-dichlor-diaminoplatnatý komplex, alkylační látka, jejíž cytostatický efekt byl prokázán Barnettem a Rosenbergem na bakteriích *Escherichia coli*, má dosud i přes své výrazné nežádoucí účinky nezastupitelnou roli v léčbě celé řady maligních nádorových onemocnění [1-5]. Spektrum jejího využití je široké, zahrnuje testikulární karcinomy, karcinomy ovaria, prsu, děložního čípku, plic, močového měchýře a nádory měkkých tkání, kde se uplatňuje především jako součást kombinované terapie. V systémech *in vitro* prokázala výrazný cytostatický efekt založený na kovalentní vazbě cisplatiny na nukleofilní centra DNA, zejména pak guanin [6-8]. Důsledkem této vazby dochází k porušení jak funkce, tak i struktury DNA. Bylo zjištěno, že cisplatina do živočišných buněk vstupuje difúzí, kde se přeměňuje na reaktivní formu, komplex platiny a vody, přičemž komplex s jednou molekulou vody je nejvíce reaktivní [9]. Navíc při tomto procesu hraje velkou roli hodnota pH především v buněčné cytoplasmě [10]. Cisplatina má rovněž schopnost pravděpodobně nespecificky interagovat s celou řadou proteinů nezbytných pro procesy replikace DNA a buněčného dělení [11,12]. Všechny tyto mechanismy se podílí na výrazné cytotoxicitě, ale také mutagenitě a karcinogenitě cisplatiny. Zatímco toxicita cisplatiny byla prokázána na mnoha buněčných i nádorových buněčných živočišných liniích, žádná studie se dosud nezabývala vlivem cisplatiny na rostlinné buněčné modely. V naší práci jsme zkoumali vliv cisplatiny na rostlinnou buněčnou suspenzní kulturu *Nicotiana tabacum* BY-2 se zaměřením na její cytotoxicitu, buněčný cyklus a jadernou morfologii buněk.

MATERÁL A METODY

Chemikálie a přístroje

Pro práci byla použita cisplatina Cisplatin „Ebewe“ (Ebewe Pharma, Unterach, Rakousko), pro fluorescenční mikroskopii fluoresceindiacetát (Sigma Aldrich Chem. Corp., USA) ve formě zásobního roztoku v bezvodém acetonu, propidium jodid (Sigma Aldrich Chem. Corp., USA) a Hoechst 33342 (Sigma Aldrich Chem. Corp., USA) jako vodný zásobní roztok.

Biologický materiál

Jako modelový systém byla zvolena buněčná suspenzní kultura tabáku (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae), linie BY-2. Tabáková kultura byla pěstována v tekutém kultivačním médiu podle Murashiga a Skooga [13], modifikovaném podle Nagaty [14]. Ke kultuře v exponenciální fázi růstu byla přidána cisplatina do výsledné koncentrace 5, 10, 15, 20 a 25 mg/l. Každá koncentrace byla kultivována v pěti sériích. Kultivace dále probíhala na třepačce (Kühner Shaker LT-W, Adolf Kühner AG, Švýcarsko) při $27 \pm 1^\circ\text{C}$ a 130 ot min^{-1} ve tmě ve 250 ml Erlenmeyerových baňkách. Vzorky kultury byly odebírány sterilně v časových intervalech 1, 24, 48, 72, 96 a 120 hodin.

Test viability

Vzorek buněčné suspenzní kultury doplněný na objem 50 μl byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě s fluorescein-diacetátem ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a propidium-jodidem ($20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Zastoupení živých a mrtvých buněk bylo vyhodnoceno fluorescenčním mikroskopem (Olympus AX 70) vybaveným pro širokopásmovou UV excitací početně, z každé série bylo vyhodnoceno 5 náhodných polí v mikroskopu a životnost byla stanovena početně [15,16].

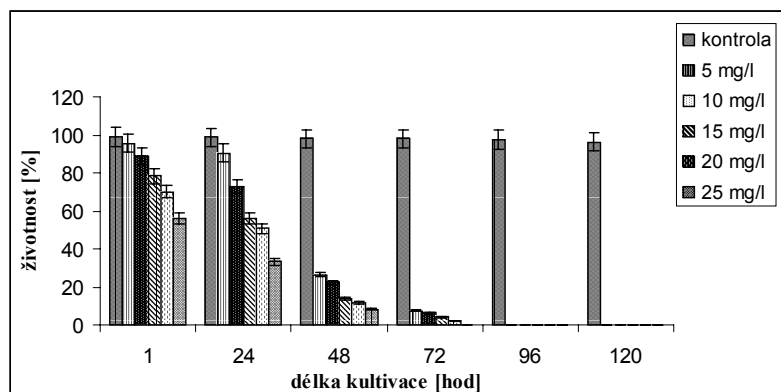
Stanovení jaderné morfologie a mitotického indexu

Vzorek buněčné suspenzní kultury doplněný na objem 50 μl byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě s fluorescenčním barvivem Hoechst 33342 ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Jaderná morfologie a mitotický index byly vyhodnoceny fluorescenčním mikroskopem (Olympus AX 70), mitotický index pak početně. Vždy bylo vyhodnoceno deset náhodných polí pro každou sérii.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro stanovení životnosti jsme v naší práci jako substrát zvolili fluorescein-diacetát (FDA) [17], ze kterého po působení rostlinných esteráz, typických svou aktivitou pro živé buňky, vzniká fluorescein (zelená fluorescence), a propidium-jodid (PI), vstupující do mrtvých buněk na základě porušení permeability buněčných membrán (červená fluorescence) [16]. Zatímco v průběhu kultivace byla viabilita buněk BY-2 tabáku v kontrolních sériích velmi vyrovnaná (nad 96 %), se vzrůstající koncentrací cisplatiny v kultivačním médiu životnost postupně klesala (Obr 1.). Toto bylo patrné zejména po 72 a více hodinách kultivace, kdy podíl živých buněk byl již velmi nízký kolem 5 % a po 96 h nebyly pozorovány již žádné živé buňky. Relativní směrodatná odchylka (dále R.S.D) byla do 5 %.

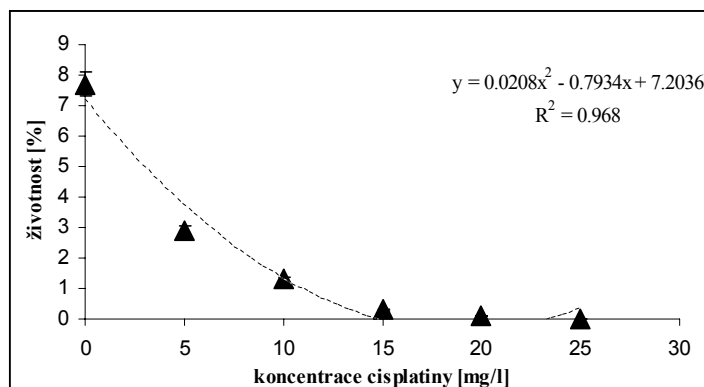
Obr. 1.: Vývoj životnosti (% vyjadřující podíl živých buněk) v závislosti na koncentraci cisplatiny v kultivačním médiu (0-kontrola, 5, 10, 15, 20 a 25 mg/l) a čase.



Životnost tabákových buněk BY-2 se snížila již po jedné hodině kultivace. Pozorovaný efekt není možné přičíst pravděpodobně na vrub interakcím cisplatiny s DNA, ale

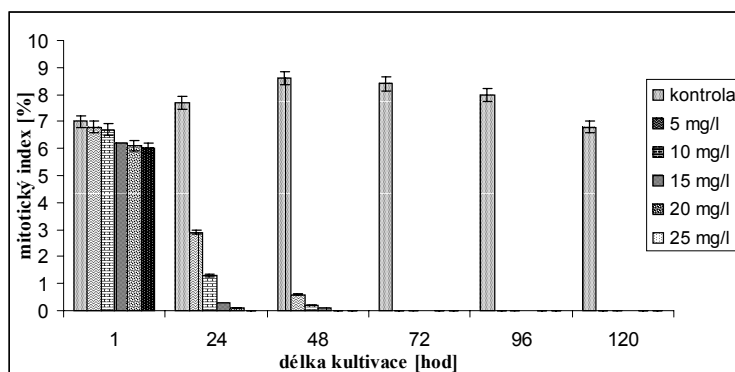
jejím interakcím s četnými funkčními, zejména hydroxylovými, skupinami buněčné stěny a rovněž se složkami biomembrán, kdy dochází k porušení propustnosti a rozvrácení osmotického i iontového systému buňky, což vede ke „smrti“ buněk. Díky sérii různých koncentrací cisplatiny bylo možné sestavit regresní přímku, vyjadřující závislost viability na koncentraci cisplatiny. Jak je z Obr. 2 patrné, koncentrace 15 mg/l po 24 h vede k usmrcení prakticky všech BY-2 buněk.

Obr. 2.: Vývoj životnosti po 24 hodinách kultivace. Spojnice vyjadřuje polynomičnou regresi druhého stupně s koeficientem spolehlivosti $R^2=0,968$.



Díky barvení fluorescenčním barvivem Hoechst 33342 jsme mohli stanovit rovněž mitotický index populací buněk suspenze tabáku a jadernou morfologii jednotlivých sérií a variant experimentu s R.S.D. do 3 %. Pokles mitotického indexu byl velmi nízký po jedné hodině kultivace, což v kombinaci s poklesem viability potvrzuje teorii poškození permeability, propustnosti, buněčných biomembrán tabákových BY-2 buněk.

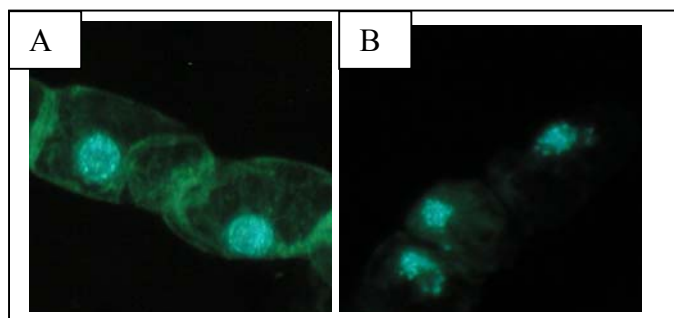
Obr 3.: Mitotické indexy v průběhu kultivace pro jednotlivé varianty.



Při porovnání struktur jádra a jaderného chromatinu kontrolních buněk (struktura s výrazným jadérkem a pravidelným rozložením chromatinu) a jader buněk kultivovaných v přítomnosti cisplatiny jsme při nízkých koncentracích, tj. do 10 mg/l zjistili po 48 hodinách

kultivace vznik mikrojader, dále řadu atypických mitóz s nepárovými chromozomy a rovněž vznik apoptických tělísek, *apoptotic bodies* (Obr. 4). Zjištěné skutečnosti svědčí o schopnosti cisplatiny pronikat do buněk tabáku i přes bariéru, jakou představuje buněčná stěna, a to při zachování životaschopnosti buněk a zde interferovat s DNA, pro což svědčí formování mikrojader.

Obr. 4.: Mikrofotografie tabákových buněk BY-2 (A) kontrola, (B) *Apoptotic bodies* při koncentraci cisplatiny 5 mg/l v kultivačním médiu po 48 hodinové expozici..



Nalezení apoptických tělísek svědčí o schopnosti cisplatiny vyvolat apoptózu ve sledovaných rostlinných buňkách, stejně jako v buňkách živočišných, kde to dokázaly některé práce. Při vysokých koncentracích cisplatiny v kultivačním médiu byly patrné výrazné strukturální změny jádra i jadérka, zejména pak vakuolizace jader a změny v typickém rozložení chromatinu.

ZÁVĚR

Práce prokázala cytotoxický efekt cisplatiny na rostlinné buňky buněčné suspenze tabáku, linie BY-2, při současném výrazném poklesu mitotického indexu. Mechanismus tohoto efektu cisplatiny je pravděpodobně dvojitý, spočívá jednak v porušení integrity buněčných povrchů (buněčná stěna, cytoplazmatická membrána), kde se nabízí možnost interakce s reaktivními funkčními skupinami a následným porušením permeability biomembrán; při delší době kultivace cisplatina pravděpodobně interaguje s DNA a indukuje jednak apoptózu, jednak má za následek atypické mitózy, jejichž výsledkem je formování mikrojader.

Poděkování

Práce na tomto projektu byla podporována granty: IGA VFU 1/2005, GAČR 525/04/P132 a FRVŠ 2348/F4a.

LITERATURA

- [1] M.A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso and J.M. Perez Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways, Curr. Med. Chem. 10 (2003) 257-266.

- [2] T. Boulikas and M. Vougiouka Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (review), *Oncology reports* 10 (2003) 1663-1682.
- [3] M. Kartalou and J.M. Essigmann Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins, *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* 478 (2001) 1-21.
- [4] Z.H. Siddik Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene* 22 (2003) 7265-7279.
- [5] D. Wang and S.J. Lippard Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 307-320.
- [6] W.B. Pratt and R.W. Ruddon *The anticancer drugs*, Oxford, 1979.
- [7] N. Farah, H.S. Dresner, K.J. Searles, R. Winiarsky, M. Moosikasuwan, A. Cajigas, S. Hahm and J.J. Steinberg Cisplatin DNA adduct detection and depurination measured by P-32 DNA radiolabeling and two-dimensional thin-layer chromatography: A time and concentration study, *Cancer Invest.* 18 (2000) 314-326.
- [8] S.G. Chaney, S.L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y.B. Wu and M. Faldu Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1551-1559.
- [9] N. Goswami, L.L. Bennet-Slavin and R. Bose New insights into the mechanism of the cis-Platin-Guanosine 5'-Monophosphate reaction., *Journal of the Chemical Society* 7 (1989) 432-433.
- [10] P.A. Chaloner *Coordination Chemistry Reviews* 72 (1986) 281-287.
- [11] F.R. Hartley *Coordination Chemistry Reviews* 67 (1985) 35-38.
- [12] N. Farrel *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*, 1989.
- [13] T. Murashige and F. Skoog *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473.
- [14] T. Nagata, Y. Nemoto and S. Hasezawa *Int. Rev. Cytol.* (1992) 132.
- [15] J. Vitecek, V. Adam, J. Petrek, P. Babula, P. Novotna, R. Kizek and L. Havel Application of fluorimetric determination of esterases in plant material, *Chemicke Listy* 99 (2005) 496-501.
- [16] J. Vitecek, V. Adam, J. Petrek, J. Vacek, R. Kizek and L. Havel Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 79 (2004) 195-201.
- [17] G.G. Guilbault and D.N. Kramer *Anal. Chem.* 36 (1964).