

ANTİBİYOTİKLERİN İN VİTRO AKTİVİTELƏRİ
(I. Bleomycin A2'nin antibakteriyel etkisi)*

IN VITRO ACTIVITIES OF ANTIBIOTICS
(I. The antibacterial effects of the bleomycin A2)

Yusuf Özbal**

Özet : Radyasyona hassas E. coli suşları ve HeLa hücreleri üzerinde bleomycin A2'nin etkisi incelendi. DNA sentezi 3H -timidin ile işaretlenerek gösterildi ve bleomycin bulunan bakteri ve hücrelerde DNA sentezlerinin inhibe olduğu saptandı. Bleomycin ilâve edilerek ve edilmeyerek bakterisel ve hücresel DNA'lar izole edildi ve in vitro olarak DNA'lardaki kırımlar sükroz gradient sedimentasyon analiziyle kanitlandı.

Summary : The effect of bleomycin A2 was studied on radiation sensitive strains of E. coli and HeLa cells. The synthesis of DNA was shown by the incorporation of 3H -thymidine and indicated that the synthesis of DNA was inhibited by bleomycin. Bacterial and cellular DNAs were determined in the presence or absence of bleomycin and in the reactions in vitro strand scission in DNA has been confirmed by sucrose density gradient centrifugation analysis.

Giriş

Kemoterapötik maddeler bakterilerin üremelerini durdurucu ve insan vücutu için zararsız oluşları nedeniyle kullanılabilirler ve bunların en önemlileri antibiyotiklerdir. Antibiyotiklerin bulunmuşundan itibaren bu konuda pek çok çalışılmış olduğu halde, etki mekanizmaları

(Dergiye verildiği tarih : 28/10/1979)

* Bu çalışma, Natl. Inst. Radiol. Sci., Japonya'da yapılmıştır.

** Kayseri Üniv. Gevher Nesibe Tıp Fak. Mikrobiyoloji Bilim Dalı Öğr. Görevlisi,
Kayseri, Türkiye.

hakkındaki bilgilerimiz henüz kısıtlıdır. Bakteri metabolizmasını durdurma etkisi olanlar özellikle önem kazanmıştır. Son zamanlarda, direkt hücre deoksiribonükleik asid (DNA) inin bileşimine girerek DNA sentezini etkileyen bleomycin (BLO) üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır (1, 3). Bu, Umezawa ve arkadaşlarının (4) *Streptomyces verticillus*'dan izole ettikleri anti-neoplastik ve anti-mikrobiik etkili bir antibiyotiktir (5, 7).

BLO hidroklorid'in, suda eriyen bir peptid bazı bulunan kromatografi ile A (A₁ - A₆) ve B (B₁ - B₆) fraksiyonlarına ayrılabilen kompleks bir bileşik olduğu anlaşılmıştır (8). Bu çalışmada, BLO'nin bakteri ve İnsan hücresi doku kültürleri üzerindeki etkileri incelemiştir.

Gereç ve Yöntem

1. Bakteri suşları ve HeLa hücresi : *E. coli* K12 JC 1569 recA ve bunun wild tipi JC 1557, Dr. K. Suziki'den (Nat'l. Inst. Radiol. Sci., Chiba, Japan) temin edildi. Bunlar, lösin, histidin, arginin ve metionin kullanmaktadır (9). *E. coli* K12 AB 1886 uvrA ve K12 AB 2470 recB mutanları ise, tronin, lösin, prolin, arginin ve vitamin B1 kullanmaktadır (10). Bu 4 tip *E. coli* suşları, radyasyona (gamma ve ultraviyole) duyarlıdırlar (11). Bakteriler, 10 ml M9 vasatına 30 ug/ml L-amino asitler ve % 0.2 casamino asid ilâve edilerek üretildi. Spektrofotometrede (OD : 650 nm) 6 saat süre içinde 15 dak. aralıklarla M9 vasatına göre değerler okundu ve üreme hızları hesaplandı. BLO (Dr. E. Yugeta, Pharmaceutical Dept., Nippon Kayaku, Co., Tokyo, tarafından hediye edilmişdir) ilâve edildikten sonra, koloni sayımları; wild tipi, recA ve recB mutanları için antibiyotikli vasat-3 (Bacto-Penasay broth)- agar üzerinde, uvrA ise, Yeast Extract Tryptone agar üzerinde yapıldı.

HeLa hücreleri (Flow) Eagle (12) minimum essential vasatına % 10 fötal dana serumu, % 1 non-essential amino asid, 0.02 mM glutamin, % 0.176 NaHCO₃ ve antibiyotik ilâve edilerek 25 cm² doku kültürü şişelerinde üretildi. Haftada bir pasajları yapıldı.

2. Bakterilerin ve hücrelerin radyoizotopla işaretlenmesi : Logaritmik üreme dönemindeki bakteri kültürü santrifüje edilerek M9 vasatı ile yıkandı. Takriben 10⁹ bakteri/ml bulunan sediment 10 ml M9 vasatı içinde süspansiyone edildi ve üzerine 1 uci/ml ³H-timidin (spezifik aktivitesi 19 C/mmol, Radiochemical Centre, Amersham, UK), amino asitler ve değişik dozda BLO konularak 37°C'de inkübasyona bırakıldı. BLO ilâve edilmeyen kontrol bakterilerde de aynı işlemler yapıldı. İnkübasyondan 4 saat sonra her birinden 0.1 ml alınarak agar

vasatına ve ayrıca 0.1 ml filtre diskleri (2 cm çapında, Watmann) üzerine konuldu.

Doku kültürleri, pasajlarından 20 saat sonra tripsinize edildi ve hücreler Hanks solüsyonu içinde yıkandı. Hücreler % 0.9 tripan blue solüsyonunda sayılı ve vasat içinde 2×10^5 hücre/ml konsantrasyonuna ayarlandı. Değişik dozda BLO ve 1 uci/ml ^3H -timidin ilâve edilerek etüve kaldırıldı. Kültürler 4 saat sonra Hanks ile yıkandı ve tripsinize edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 0.1 ml alınarak filtre diskleri üzerine konuldu.

3. Bakterisel ve hücresel DNA izolasyonu ve sedimentasyonu : Radyoizotop ilâve edilmiş bakteri kültürlerinin üremeleri Log-faz'da durduruldu ve yıkandı. Bakteri DNA'larının izolasyonunda Marmur'un (13) metodu uygulandı. Soğukta (-70°C) dondurulup 37°C'de çözündürülen bakteriler üzerine 250 ug/ml pronase (proteaze, Sigma) ve 25 ug/ml RNase (DNase free, pancreatic ribonuclease, Sigma) ilâve edilerek 37°C'de 30 dak. bekletildi. Sodyum dodesil sulfat (% 0.6 SDS) ile muamele edildikten sonra % 90 fenol içinde çalkalandı ve proteinlerinden arındırıldı. Bakteri DNA'ları % 20 triklorikasetik asid (TCA) ile soğukta presipite edildi. Presipitat 100 uM hidrojen peroksit (H_2O_2) içeren 1 ml 50 mM tris-HCl (pH=7.6) tampon solüsyonu içine alındı.

Hücresel DNA eldesinde, Hirt (14) yöntemi kullanıldı. Pasajları yapılan hücre kültürü (2×10^5 hücre/ml) vasatlarına 1 uci/ml ^3H -timidin ilâve edildi. İnkübasyondan 4 saat sonra Hanks ile yıkandı ve 0.2M EDTA bulunan 1 ml % 1 SDS, pH = 7.6 ve 25 ug/ml RNase ilâve edilerek 20 dk. oda ısısında bekletildi. Santrifüj tüpüne alınan lizat üzerine 5N NaCl konuldu ve 4°C'de bir gece bekletilerek hücre DNA'ları presipite edildi. Presipitat 20.000 rpm de 30 dk. ve 4°C'de santrifüje edilerek SDS ile proteinleri çöktürüldü. Üstte kalan hücre DNA'ları 1 ml tris-HCl tamponu içine alındı. İzole edilen bakterisel ve hücresel DNA'ların üzerine tris-HCl içinde hazırllanmış BLO'nun değişik dozları ilâve edildi. Etüvde 2 saat inkübasyondan sonra tris-HCl solüsyonu içinde dializleri yapıldı.

DNA solüsyonundan 0.2 ml alınarak 5 ml sükroz gradient (% 5-20 W/V, 0.1M NaCl ve 0.01M tris-HCl, pH=7.6) üzerine ilâve edildi ve ultrasantrifüjle (RSP-40 swing-out rotor, Hitachi 55P) 15 saat 25.000 rpm'de çöktürüldü. Tüplerin diplerinden iğne ile delinerek her 5 damlası bir filtre disk üzerine alındı ve kurutuldu. TCA (% 5) ile soğukta 30 dk., etanol ve eterle oda ısısında muamele edildi. Diskler % 0.3 PPO (2,5-diphenyloxazole), % 0.03 POPOP (1-4-bis-2-(4-methyl-5-pheny-

loxazolyl)-benzene içeren toluen içine alındı ve Packard liquid scintillation counter ile radyoaktiviteleri sayıldı.

Bulgular

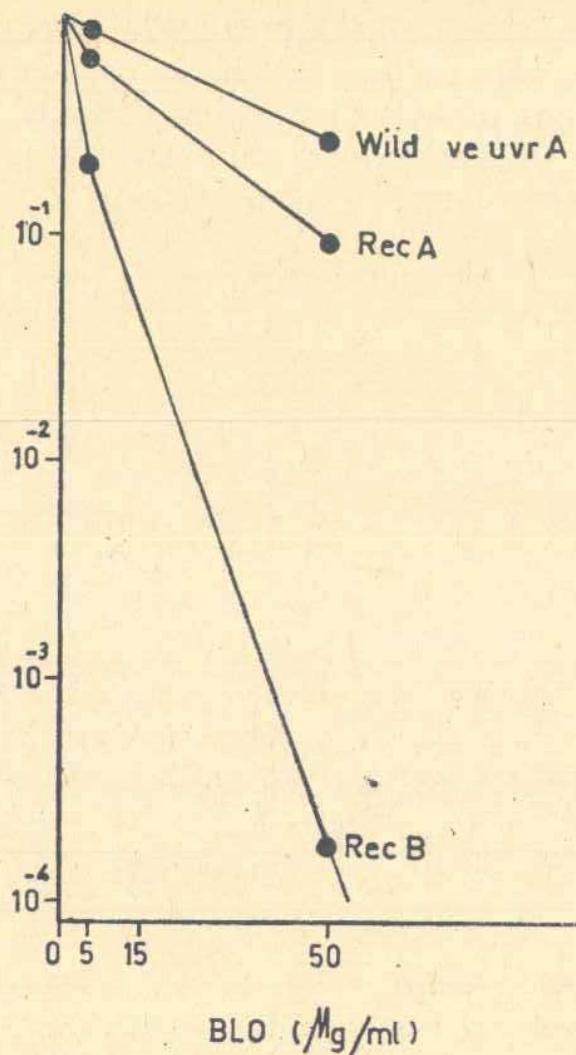
1 — Bakteri ve hücrelerin normal üreme hızları : M9 vasatı içinde üreyen bakterilerin üreme eğrileri, OD : 650 nm'de okunarak belirlendi ve bölünme zamanı aşağı yukarı 20-25 dk olarak tespit edildi. İnkübasyondan 3.5 saat sonra oluşan log-fazda; E. coli K12 'C 1569 recA 5×10^8 bakteri/ml, JC 1557 wild tipi 1.5×10^8 bakteri/ml, AB 2470 recB 4×10^8 bakteri/ml, AB 1886 uvrA ise 2.2×10^8 bakteri/ml olarak hesaplandı (Tablo I). HeLa hücrelerinin ikilenme zamanı 20 saat ve 24 saatlik kültürlerinde 10^6 hücre/ml olarak bulundu.

TABLO I — ^{3}H -TIMİDİN İLE İŞARETLENMİŞ HÜCRE VE BAKTERİLERİN LOG FAZ'DA ÜREME HIZI VE DNA SENTEZİNDE BLO'NIN ETKİSİ

	LOG - FAZ BAKTERİ/ml	VE HÜCRE/ml	^{3}H - TIMİDİN CPM / ug DNA*		
			KONTROL	5 mg BLO	50 mg BLO
E. COLİ K12 JC 1569 recA	5×10^8		24.2	17.0	6.9
E. COLİ K12 JC 1557 wild	1.5×10^8		43.0	24.0	16.0
E. COLİ K12 AB 2470 recB	4×10^8		87.1	27.0	3.2
E. COLİ K12 AB 1886 uvrA	2.2×10^8		176.0	42.0	11.6
HeLa hücresi (2×10^5)		1×10^6	3342.0	1224.0	411.2

* Her diskte ortalama 100 ug DNA bulunmaktadır.

2. Bleomycin A2 ihtiva eden kültürlerde DNA sentezi : Değişik dozda BLO ilâve edilmiş ^{3}H -timidin ile işaretli bakteri süspansiyonlarından 0.1 ml alınarak agar üzerine ekildi. Bir gece inkübasyondan sonra incelendi. BLO ilâve edilmeyen kültürlerde koloni sayıları normal düzeyde bulundu. Şekil 1'de görüldüğü gibi, BLO ilâve edilmiş plaklarda, BLO'nin artış dozuna karşılık ters orantılı olarak koloni sayısının azalduğu tespit edildi. Radyasyona daha duyarlı olan recB mutantında, üremedeki inhibisyonun diğerlerine oranla daha fazla olduğu görüldü. Wild tipi ile uvrA mutantları ise daha az etkilendi.



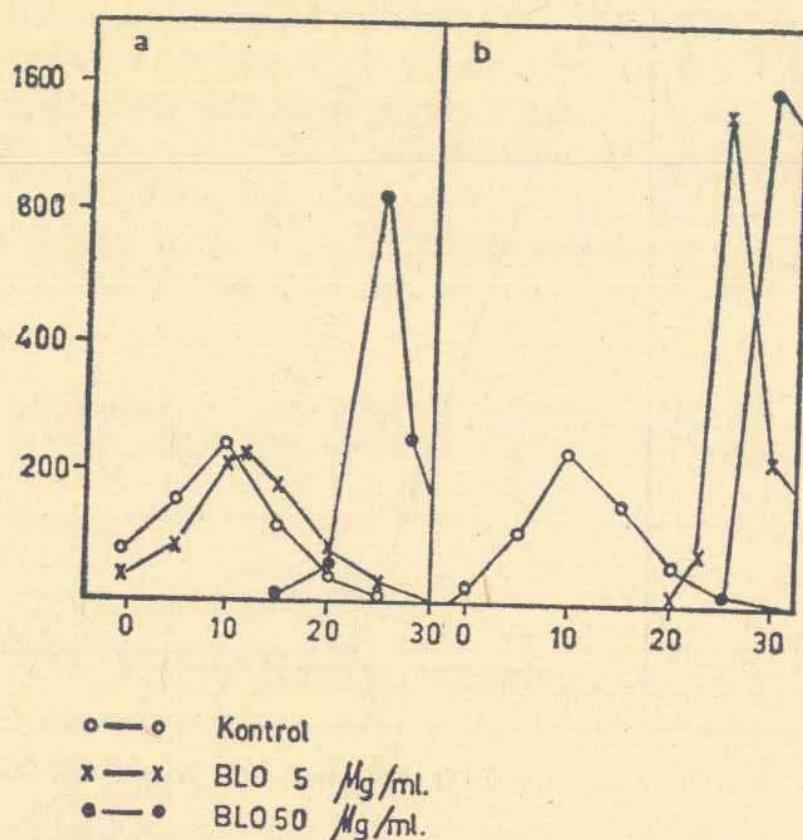
Şekil 1. *E. coli* suşlarının kültürlerinde BLO'nin etkileri.

Değişik dozlarda BLO ile muamele edilmiş 3H -timidinle işaretli bakteri ve hücre süspansiyonlarının 0.1 ml'si disklere damlatılarak radyoaktiviteleri sayıldı. Değerler Tablo I'de özetlendi. BLO'nun dozu arttıkça, *E. coli* suşlarının ve HeLa hücrelerinin DNA sentezlerinde azalma tespit edildi. BLO, bakteri ve hücre DNA'larının sentezlerini ve kültürlerinin üremelerini etkileyen bir inhibitör olarak bulundu.

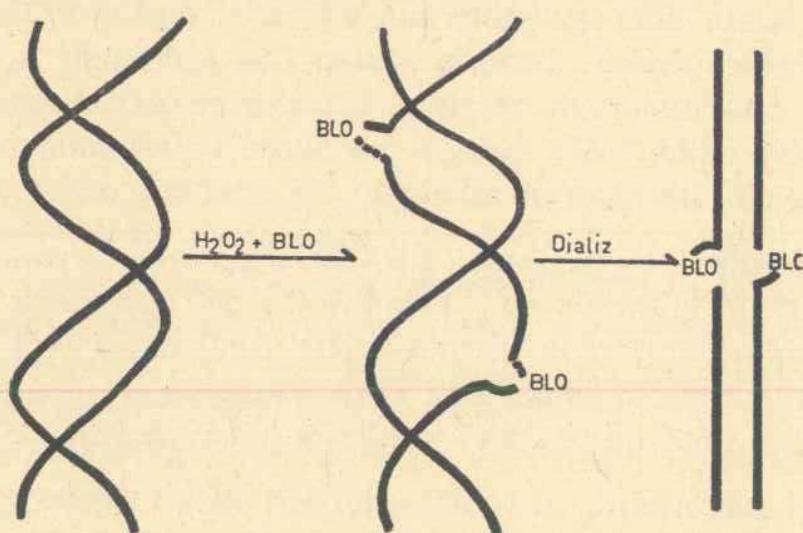
3. Bakterisel ve hücresel DNA'ların sedimentasyonla analizi : 3H -timidinle işaretlenmiş bakterilerin ve hücrelerin DNA'ları BLO'nun değişik dozlarıyla karşılaştırıldı. Dializleri yapıldıktan sonra sükroz gradient sedimentasyonla DNA fraksiyonları incelendi. Kullanılan H_2O_2 'nin DNA ile reaksiyona girdiği bilinmektedir (15).

Kontrol bakterilerin ve hücrelerin DNA piklerinin, sedimentasyonda onuncu fraksiyonlara rastladığı izlendi. Düşük dozda BLO (5 $\mu g/ml$) kullanıldığı zaman DNA sentez miktarında azalma görüldü. Aynı za-

manda HeLa hücre DNA'larının molekül ağırlıkları da küçüldü. Yüksek doz BLO (50 ug/ml) ile işlem yapıldığı zaman her iki tip (bakterisel ve hücresel) DNA'nın piklerinin, sedimentasyonda 20. ci fraksiyonlara kaydığını ve moleküler ağırlıklarının küçüldüğü görülmektedir (Şekil 2). DNA sentezinin inhibisyonunda ve DNA'ların parçalara ayrıll-



Şekil 2. BLO içeren bakterisel ve hücresel kültürlerden izole edilen DNA'ların sedimentasyonu.
a. *E. coli* K12 JC 1569 recA; b. HeLa hüresi



Şekil 3. DNA ile BLO'nun reaksiyonu.

masında BLO'nın büyük rolü olduğu tesbit edildi. DNA bileşimine giren BLO'nun, hücresel DNA'ları tek band haline ve bakteri DNA'larını ise küçük parçalara ayırdığı, şekil 3'de görülmektedir.

Tartışma

Phleomycin'in (16) izolasyonundan sonra, Umezawa ve arkadaşları (4) streptomyces'lerden bleomycin adını verdikleri yeni bir preparat elde etmişlerdir. Bu antibiyotik ile hücresel DNA'nın reaksiyonu ve DNA sentezinin etkilendiği bildirilmiştir (2, 7, 17, 18). Hücrelerin üremelerini durdurulan bleomycin'ler antineoplastik bir antibiyotik olarak bilinmektedir. Etiyolojik olarak bakterisel identifikasiyonda önemli olabilirler. Fakat BLO'nun antibakteriyel bir kemoterapötik olarak kullanılması hakkındaki bilgilerimiz yetersizdir. Baş ve boyun, deri ve genital organların kanserlerinde, malign lenfoma (Hodgkin hastlığı, lenfoid sarkoma) ve testiküler kanserlerde antineoplastik olarak uygulanmıştır (19 - 21). Ayrıca, *S. aureus*, *E. coli* B, *B. subtilis*, *S. typhi*, *Sh. flexneri*, *M. phlei* gibi bakterilerin üremelerini engellediği gösterilmiştir (5, 22).

Bu çalışmada, BLO'nun, *E. coli* suşlarının ve HeLa hücrelerinin DNA sentezlerini azaltan ve kültürlerinin üremelerini durdurulan bir etken olduğu kanıtlanmaktadır. Hücre DNA'larının sentezleri inhibe edildiği zaman, messenger RNA'ların ve proteinlerin sentezi duracak ve hücre yaşamını kaybedecektir. *E. coli* suşlarından radyasyona daha duyarlı olan recB mutantının DNA sentezinde, diğerlerine göre daha fazla azalma ve üremesinin durduğu gösterilmektedir. *In vitro* olarak, insan kökenli HeLa hücrelerinde de DNA sentezlerinin inhibisyonu izlenmektedir. BLO'nun, H_2O_2 ile birlikte reaksiyona girerek, bakterisel ve hücresel DNA molekül ağırlıklarının küçülmesine sebep olduğu, sükroz gradient sedimentasyon analiziyle belirlenmektedir. Benzer yöntemler uygulanarak, BLO ile DNA'nın değişik komponentlere ayrıldığı, 1971 yılında Haidle (18) tarafından saptanmıştır. Bütün bu bulgular, Suziki ve arkadaşlarının (17), *E. coli* 15T üzerindeki çalışmalarını desteklemekte ve Takeuchi ve Yamamoto'nun (23) fare transplante tümörleriyle yaptıkları araştırmayı da doğrulamaktadır. Deneyler, bakterilerin üremelerini önleyen BLO'nun, DNA'nın bileşimine girdiğini göstermektedir. Bu nedenle, BLO'nun antibakteriyel bir preparat olarak büyük önem kazanacağı kanısı uyenmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Nagai, K., Yamaki, H., et al.: The combined effects of bleomycin and sulfhydryl compounds on the thermal denaturation of DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **179** : 165, 1969.
2. Terasima, T., Yasukawa, M., et al.: Breaks and rejoining of DNA in cultured mammalian cells treated with bleomycin, *Gann*, **61** : 513, 1970.
3. Nagatsu, M., Okasaki, T., et al.: Effects of bleomycin on nuclear DNA in transplantable VX-2 carcinoma of rabbit, *Cancer Res.*, **31** : 992, 1972.
4. Umezawa, H., Maeda, K., et al.: New antibiotics, bleomycin A and B, *J. Antibiotics*, **19A** : 200, 1966.
5. Ishizuka, M., Takayama, H., et al.: Activity and toxicity of bleomycin, *J. Antibiotics*, **20A** : 15, 1967.
6. Suzuki, H., Nagai, K., et al.: Mechanism of action of bleomycin. Studies with the growing culture of bacterial and tumor cells, *J. Antibiotics*, **21** : 379, 1968.
7. Terasima, T. and Umezawa, H.: Lethal effect of bleomycin on cultured mammalian cell, *J. Antibiotics*, **23** : 301, 1970.
8. Umezawa, H., Suhara, Y., et al.: Purification of bleomycins, *J. Antibiotics*, **19A** : 210, 1966.
9. Morimyo, M., Horii, Z., et al.: Appearance of low molecular weight DNA in a rec-mutant of Escherichia coli K12 irradiated with X-rays, *J. Radiat. Res.*, **9** : 19, 1968.
10. Taylor, A.L., and Trotter, C.D.: Revised linkage map of Escherichia coli, *Bacteriol. Reviews*, **31** : 332, 1967.
11. Özbal, Y.: RNA synthesis in Escherichia coli after irradiation with (Co-60) -gamma rays, *Ist. Med. Bull.*, **11** : 109, 1978.
12. Eagle, N.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures, *Science*, **130** : 423, 1959.
13. Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J. Mol. Biol.*, **3** : 208, 1961.
14. Hirt, B.: Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture, *J. Mol. Biol.*, **26** : 365, 1967.
15. Yamafuji, K. and Uchiada, Y.: Liberation of adenine from deoxyribonucleic acid by hydrogen peroxide, *Nature*, **209** : 301, 1966.
16. Maeda, K., Kosaka, H., et al.: A new antibiotic, phleomycin, *J. Antibiotics*, **9A** : 82, 1956.
17. Suzuki, H., Nagai, K., et al.: On the mechanism of action of bleomycin. Strand scission of DNA caused by bleomycin and its binding to DNA in vitro, *J. Antibiotics*, **23** : 473, 1970.
18. Haidle, C.W.: Fragmentation of deoxynucleic acid by bleomycin, *Molec. Pharmac.*, **7** : 645, 1971.
19. Yamaki, H., Tanaka, N., et al.: Effects of several tumor-inhibitory antibiotics on immunological response, *J. Antibiotics*, **22** : 315, 1969.
20. Mathé, G.: Recherche d'efficacité clinique de la bleomycin sur les cancers humains, *Thérapeutique*, **46** : 755, 1970.
21. Umezawa, H., Takauchi, T., et al.: Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma, *J. Antibiotics*, **25** : 409, 1972.
22. Ichikawa, T., Matsuda, A., et al.: Biological studies on bleomycin A, *J. Antibiotics*, **20A** : 149, 1967.
23. Taceuchi, M. and Yamamoto, T.: Effects of bleomycin on mouse transplantable tumors, *J. Antibiotics*, **21** : 631, 1968.