

## Регуляція апоптозу модифікованими солями трифеніл-фосфоніум-броміду в культурах пухлинних клітин

Д.І.Білько

Національний університет «Києво-Могилянська академія»  
Київ, Україна

У роботі визначено і досліджено особливості дії принципово нової катіонної сполуки — гексадецилтрифеніл-фосфоніум-броміду, яка в достатньо низькій концентрації здатна викликати апоптоз у більшості культивованих клітин шляхом спрямованого впливу на мітохондрії. Виявлений ефект блокування глюкокортикоїдом дексаметазоном процесу передислокації цитохрому С з мітохондрій до цитоплазми, викликаного проапоптотичними агентами, розширює уявлення про процес індукції апоптозу і є підґрунтям для розробки протоколів лікування злоякісних пухлин із застосуванням кортикостероїдних гормонів.

**Ключові слова:** апоптоз, злоякісні клітини, мітохондріально-націльні сполуки.

### ВСТУП

Останнім часом все більше уваги приділяють розробці препаратів, дія яких спрямована на сигнальні шляхи та фізіологічні особливості, що порушені лише в пухлинних клітинах і необхідні для їх росту. Незважаючи на прогрес у цій галузі, таргетна терапія поки що досить обмежена, оскільки вищеназвані високоселективні препарати не володіють суттєвою цитотоксичною активністю, а лише пригнічують проліферацію пухлинних клітин [1]. Альтернативною мішенню є мітохондрії, оскільки вони відіграють основну роль у регуляції апоптозу. Тому стратегія, спрямована на дію протипухлинних препаратів безпосередньо на мітохондрії, є доцільною.

Метою роботи було дослідити регуляцію клітинної загибелі катіонними мітохондріально-націльними сполуками.

Такі ліпофільні катіони, як метилтрифеніл-фосфоніум і тетрафеніл-фосфоніум, здатні проникати через внутрішню мітохондріальну мембрану без допомоги іонофорів та накопичуватися в мітохондріальному матриксі. Інкубація клітин з переліченими катіонними флюорохромами індукує апоптоз через осмотичне руйнування мітохондрій протягом 24-48 год. Здатність катіонних флюорохромів індукувати апоптоз була взята за основу для пошуку та тестування серії мітохондріально-токсичних катіонних препаратів, якими виявились солі трифеніл-фосфоніум-броміду.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вивчали вплив трьох модифікацій солей трифеніл-фосфоніум-броміду (ТФФБ), а саме гекса- (ГТФФБ), дека- (ДТФФБ) та гексадецил-ТФФБ (ГДТФФБ), на морфофункціональні характеристики клітин лінії раку молочної залози людини MCF-7.

Клітинну лінію раку молочної залози людини MCF-7 підтримували в середовищі RPMI з додаванням 10% FCS (Gibco-BRL), 100 мМ L-глутаміну та антибіотиків — пеніциліну та стрептоміцину (100 Од/мл та 100 мкг/мл відповідно). Культури підтримували в 75 см<sup>2</sup> матрацах. Для дослідження дозозалежної відповіді клітини висівали в середні 24 комірки 48-коміркового планшета в концентрації  $1 \times 10^5$  на комірку й інкубували при 37°C та 5% CO<sub>2</sub>. Комірки, що залишились по периметру планшета, були заповнені стерильним PBS. При досягненні суцільного моношару клітини пересівали, використовуючи трипсин-ЕДТА.

Вимірювання мітохондріального метаболізму було здійснене за допомогою додавання діазобарвника 3-(4,5 диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразол броміду (МТТ) [2]. МТТ бар-

вник в концентрації 1 мг/мл був розведений у PBS і доданий до клітин у 48-коміркових планшетах під час експоненційної фази росту. Розчин МТТ додавали до клітин на 4 год. для того, щоб досягти остаточної концентрації 0,1 мг/мл. Після інкубації супернатант видаляли та проводили лізис клітин за допомогою SDS/HCl (10% w/v і 10 мМ відповідно). Детергент і кислота розчиняли сині кристали формазану, звільняючи синій колір у розчин PBS. Значення поглинання вимірювали при 550 нм у планшетному сканері Biorad. Аналогічний метод застосовувався для оцінки змін редукційного потенціалу всіх досліджених клітинних ліній під впливом трьох модифікацій солей ТФФБ.

Дослідження з барвником WST-1 (Roche Molecular Biochemicals) було використано для визначення впливу досліджуваних складників на редукційний потенціал пухлинних клітин. Дослідження базується на розщепленні водорозчинних тетразолієвих кристалів, WST-1(4-[3-(4-йодофеніл)-2-(4-нітрофеніл)-2Н-5-тетразоліо]-1,3-бензен дисульфонат), на жовто-оранжеві кристали формазану за допомогою мітохондріальних дегідрогеназ життєздатних клітин [3].

Для WST-1 тесту клітини висівали в кількості  $10^4$ /мл і інкубували при 37°C та 5% CO<sub>2</sub> до досягнення 30% щільності. Реагент WST-1 додавали з розрахунку 10 мкл на кожні 100 мкл середовища в досліджуваних комірках. Подальші дослідження здійснювали в один і той же час кожного дня для стандартизації результатів. Тривалість інкубації з WST-1 кожного разу була ідентичною, зчитування повторювали на 1 та 2 години після додавання реагенту. Багатокоміркові планшети утримували в умовах темряви чи зменшеного доступу світла для мінімізації деградації WST-1 реагенту. З кожної комірки вилучали 50 мкл прореагованого середовища та переносили в оптично чисті 96-коміркові планшети, які аналізували планшетним сканером на довжині хвилі 450 нм з референтним фільтром 630 нм. Результати були виражені у відносних одиницях поглинання (relative absorbance units, ABS).

Тест для визначення клітинної загибелі ELISA (enzyme linked immunosorbent assay, Roche Diagnostics) може ідентифікувати як некроз, так і апоптоз, залежно від характеру фрагментації ДНК. Для визначення клітинної загибелі було використано ELISA, що вимірює фрагментацію ДНК (Roche Molecular Biochemicals) [4].

Після індукції клітинної загибелі досліджуваними агентами з 48-коміркового планшета обережно забирали живильне середовище. У комірки додавали 200 мкл лізисного буфе-

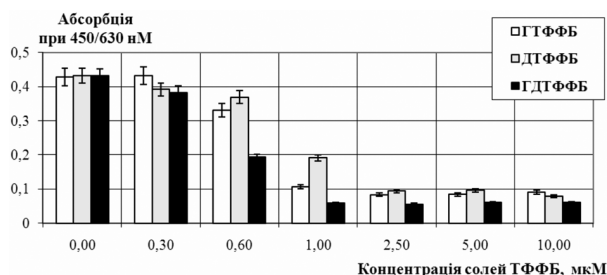


Рис. 1. Редукційний потенціал клітин лінії MCF-7 під впливом різних модифікацій і різних концентрацій ТФФБ, визначений методом МТТ.

ра та інкубували планшет протягом 30 хв. при 37°C. Клітини з кожної комірки були відокремлені від поверхні пластику, перенесені в 1,5 мл мікроцентрифужні пробірки та процентрифуговані при 10000g протягом 5 хв. Супернатант (20 мкл) поміщали в комірки МТР. Комірочки МТР були заповнені робочим розчином (імунореагентами). Робочий розчин для 10 реакцій був приготований з 40 мкл анти-гістону, 40 мкл анти-ДНК-POD та 720 мкл інкубаційного буфера та перемішаний в одній пробірці за допомогою Вортекса.

Планшет для МТР покривали непрозорою плівкою та інкубували у планшетному змішувачі (500 об./хв.) при кімнатній температурі протягом 2 год. Вміст планшета відкидали, комірки промивали 280 мкл інкубаційного буфера. До кожної комірки додавали субстратний розчин АВТС (100 мкл). Планшет повторно інкубували в планшетному змішувачі при 250 об./хв. протягом 10-20 хв. до проходження кольорової якісної реакції. Спектрофотометрію здійснювали при 450/540 нм.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було досліджено вплив трьох модифікацій солей ТФФБ, а саме гекса-, дека- та гексадецил-ТФФБ, на морфофункціональні характеристики клітин лінії раку молочної залози людини MCF-7. За допомогою барвника МТТ визначали редукційний потенціал клітин. Результати дослідження представлені на рис. 1.

Аналіз результатів експерименту показав, що в культурі клітин MCF-7 під впливом дії зростаючих концентрацій солей від 1 мкМ спостерігається достатньо суттєве пригнічення редукційного потенціалу клітин — до  $0,191 \pm 0,010$  (ДТФФБ),  $0,106 \pm 0,005$  (ГТФФБ) та  $0,059 \pm 0,002$  ABS (ГДТФФБ) у порівнянні з контролем ( $0,432 \pm 0,018$  ABS). При збільшенні концентрації солей до 10 мкМ редукційний потенціал залишався на тому ж рівні.

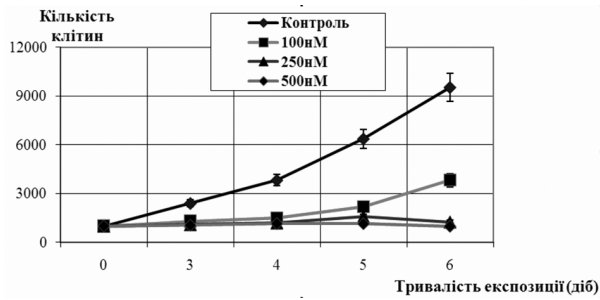


Рис. 2. Проліферативна активність клітинної лінії MCF-7 під впливом низьких концентрацій ГДТФФБ.

Результати цих експериментів свідчать про те, що найефективнішою модифікацією базової молекули виявився п-гексадецил-ТФФБ, тобто базова молекула, модифікована полінасиченим полікарбонівим ланцюгом з 16 атомами вуглецю.

Проліферативна активність клітин визначалася за допомогою приладу Z3 Coulter Counter (Beckman, USA). Результати підрахунку клітин представлені на рис. 2. (середнє значення трьох експериментів).

Кількість культивованих клітин становила  $1 \cdot 10^3$  на лунку. Інгібуючий вплив солей ТФФБ визначався, починаючи з концентрації 100 нМ, і відображався в зменшенні загальної кількості клітин. Так, на 3 добу в контролі кількість клітин збільшувалася вдвічі, а внаслідок дії 100 нМ ГДТФФБ кількість клітин становила  $(1,3 \pm 0,02) \cdot 10^3$  і продовжувала зменшуватися при подальшому збільшенні концентрацій. Цей показник відповідно дорівнював  $1,1 \pm 0,01 \cdot 10^3$  для концентрації 250 нМ ГДТФФБ та  $1,05 \pm 0,01 \cdot 10^3$  для концентрації 500 нМ.

На 5 добу в контролі кількість клітин дорівнювала  $6,63 \pm 0,05 \cdot 10^3$ , а внаслідок дії 100 нМ солі ГДТФФБ досягала тільки  $2,2 \pm 0,03 \cdot 10^3$  клітин на лунку, при дії 250 нМ —  $1,57 \pm 0,02 \cdot 10^3$ , при дії 500 нМ — відповідно  $1,14 \pm 0,03 \cdot 10^3$  клітин на лунку. Особливо переконливі результати отримані на 6-ту добу, коли в контролі налі-

чували  $9,52 \pm 0,07 \cdot 10^3$  клітин на лунку, а при дії ГДТФФБ кількість клітин виявилася втричі меншою і дорівнювала  $3,82 \pm 0,05 \cdot 10^3$  при концентрації 100 нМ.

Збільшення концентрації до 250 нМ призвело до падіння числа клітин до  $1,25 \pm 0,02 \cdot 10^3$ , а при концентрації 500 нМ кількість клітин становила  $0,98 \pm 0,01 \cdot 10^3$  клітин на лунку. Результати використання солі ГДТФФБ у концентраціях менше 100 нМ, а саме 50 нМ та 75 нМ, не відрізнялися від контрольних кількостей клітин, тому на рисунку не представлені.

Таким чином, починаючи з концентрації 100 нМ ГДТФФБ у культурі спостерігався інгібуючий ефект сполуки на проліферацію клітин. Встановлено дозозалежний і структурно-залежний ефект інгібування редукційного потенціалу досліджуваних клітин у широкому діапазоні концентрацій, а саме від 100 нМ до 500 нМ. Дані статистично достовірні ( $p < 0,05$ ).

У межах концентрацій від 100 нМ до 500 нМ сполука викликає повне інгібування проліферації та росту клітин, а в діапазоні від 1 мкМ до 10 мкМ призводить до апоптозу переважної більшості культивованих клітин.

Згідно з наведеними вище даними, солі ТФФБ індукують апоптоз шляхом руйнування мітохондрій. При обробці клітин ТФФБ у сукупності з глюкокортикоїдом дексаметазоном спостерігався ефект часткового чи повного блокування клітинної загибелі.

Для вивчення цього ефекту було проведено дослідження дії ГДТФФБ на первинні культури менингіом за відсутності та в присутності дексаметазону. Поряд із дослідженням редукційного потенціалу за допомогою барвника WST-1 було проведено експерименти з використанням методу ELISA, що визначає ступінь і форму клітинної загибелі за фрагментацією ДНК, пов'язаною із проходженням клітинами апоптозу.

Під дією ГДТФФБ у концентрації 1 мкМ відповідь клітин спостерігалася вже через 5-8 год.

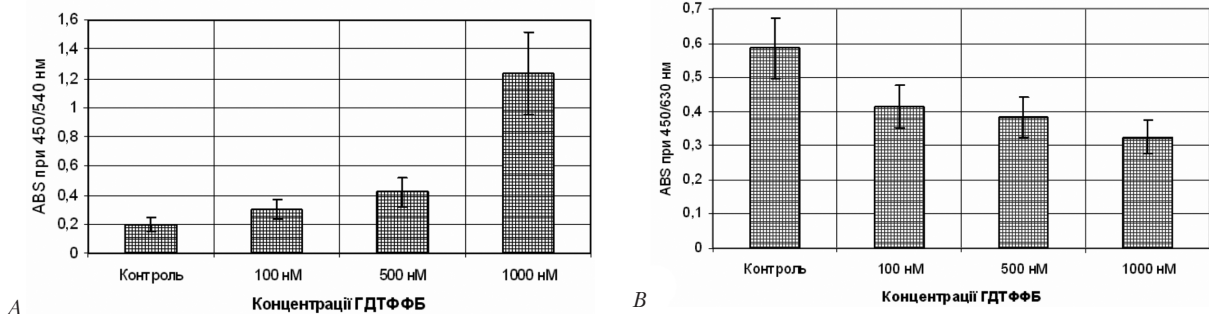
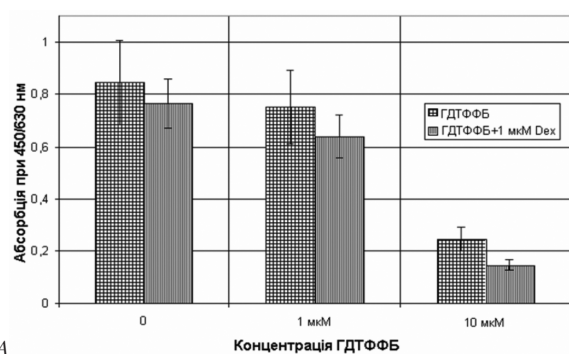
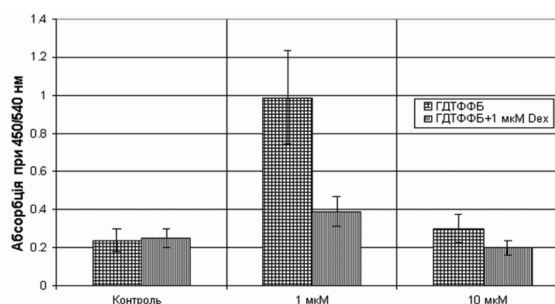


Рис. 3. Кількісне визначення апоптотичної фрагментації ДНК методом ELISA (A) і зміни в метаболічній активності в клітинах первинної менингіоми (B), на які подіяли ГДТФФБ у різних концентраціях.



А

Концентрація ГДТФФБ



В

Концентрація ГДТФФБ

Рис. 4. Метаболічна відповідь первинних культур менінгіоми на дію ГДТФФБ протягом 24 год. безпосередньо та із додаванням декса-метазону; дослідження методом WST-1 (А) та методом ELISA (В).

і характеризувалася усіма ознаками класичної апоптотичної загибелі. У клітинах, на які не подіяв ГДТФФБ, знаходилося велике інтактне ядро, що забарвлювалося Ноеchst 33342 у блідий блакитно-білий колір. Апоптотичні клітини містили фрагменти інтенсивного синього забарвлення, які свідчили про високий ступінь конденсації хроматину.

У подальших експериментах вплив ГДТФФБ визначався в додатковій присутності дексаметазону в концентрації 1 мкМ. Результати, представлені на рис. 3, є кінцевим експериментом із клітинами, на які діяв 1 мкМ ГДТФФБ протягом 5 год.

Результати досліджень із використанням кількісного методу ELISA (рис. 3, А), що специфічно визначає пов'язану з апоптозом фрагментацію ДНК, вказує на те, що ГДТФФБ поступово індукує фрагментацію ДНК при зростанні концентрації, а зростання фрагментації ДНК паралельне спаду метаболічної активності, що виявлено за допомогою WST-1 методу (рис. 3, В). Отже, катіонна сполука ГДТФФБ є потужним індуктором апоптозу [5].

На рис. 4, А представлені результати вимірювання редукційного потенціалу як показника метаболічної активності клітин за допомогою WST-1. Було виявлено, що 15-годинна дія ГДТФФБ проявляється в зниженому формуванні барвника формазану та що в подальшому кількість барвника знижується в присутності дексаметазону. Паралельно визначався обсяг фрагментації ДНК із використанням методу оцінки клітинної загибелі ELISA.

Було виявлено, що зниження формування барвника формазану при дії 1 мкМ ГДТФФБ паралельне суттєвому пригніченню апоптотичної загибелі в присутності 1 мкМ дексаметазону, що представлено на рис. 4 (В). Спостереження, що обсяг апоптотичної фрагментації ДНК знижується при дії 10 мкМ ГДТФФБ, вказує на те, що клітинна загибель або пригнічується, або, що більш імовірно, некроз стає переважаючим спо-

собом клітинної загибелі, оскільки метод оцінки клітинної загибелі ELISA не визначає фрагментації ДНК, яка виникає при некрозі. Хоча дексаметазон ефективно блокує апоптоз, клітини характеризуються мультивакуолізованою цитоплазмою і повною відсутністю проліферації.

## ВИСНОВКИ

Отже, у результаті проведених досліджень було виявлено, що катіонна сполука гексадецилтрифеніл-фосфоніум-бромід індукує апоптоз у всіх первинних культурах менінгіоми і пухлинних клітинних лініях різного походження, у той час як глюкокортикоїд дексаметазон блокує цей процес, запобігаючи проникненню цитохрому С в цитоплазму клітин та активації каспазного каскаду. Отримані результати є підґрунтям для розробки нового класу цільових протипухлинних хімотерапевтичних препаратів, уражувальна дія яких спрямована безпосередньо на мітохондрії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Airley R. Cancer chemotherapy: basic science to the clinic. / R. Airley // Wiley-Blackwell, 2009. — 342 p.
2. Berridge M.V. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction / P.M.Herst, A.S.Tan // Biotechnol Annu Rev. — 2005. — Vol. 11. — P. 127-152.
3. Cory A.H. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. (July 1991). " ". Cancer communications 3 (7): 207-12.
4. Engvall E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G / E. Engvall, P. Perlman // Immunochemistry. — 1971. — Vol. 8 (9). — P. 871-874.
5. Newton C. J. Statin-induced apoptosis of vascular endothelial cells is blocked by dexamethasone / C.J.Newton, G.Ran, Y.X.Xie, D.Bilko, C.H.Burgoynne, I.Adams, A.Abidia, P.T.McCollum, S.L.Atkin // The Journal of Endocrinology, 2002. — Vol. 174 (1). — P. 7-16.

**Д.И.Билько, М.Ф.Стародуб.** Регуляция апоптоза модифицированными солями трифенил-фосфонииум-бромида в культурах опухолевых клеток. Киев, Украина.

**Ключевые слова:** апоптоз, злокачественные клетки, митохондриально-нацеленные соединения.

В работе исследованы особенности действия принципиально нового катионного соединения — гексадецилтрифенил-фосфонииум-бромида, которое в малых концентрациях способно вызвать апоптоз у большинства культивируемых клеток путем нацеленного воздействия на митохондрии. Обнаруженный эффект блокирования глюкокортикоидом дексаметазоном процесса передислокации цитохрома С из митохондрий в цитоплазму, вызванного проапоптотическими агентами, расширяет представление о процессе индукции апоптоза и является основой для разработки протоколов лечения злокачественных опухолей с применением кортикостероидных гормонов.

**D.I.Bilko, M.F.Starodub.** Regulation of apoptosis by modified triphenyl-phosphonium-bromide salts in tumor cell cultures. Kyiv, Ukraine.

**Key words:** apoptosis, tumor cells, mitochondria-targeted compounds

Novel cationic compound — hexadecyl-triphenyl-phosphonium-bromide — was assessed and characterized in this investigation. It can induce apoptosis in most cultured cells in low doses acting directly on mitochondria. The effect of dexamethasone blockage of cytochrome C translocation from mitochondria to cytoplasm, induced by proapoptotic agents, can be the basis for protocols of tumor treatment by corticosteroid hormones.

Надійшла до редакції 04.10.2010 р.