

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ И ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ШЕЙКИ МАТКИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОНИЕВЫХ СОЛЕЙ***А.П. Любина*, А.Д. Волошина, С.К. Амерханова, А.С. Сапунова, Д.А. Татаринов, В.Ф. Миронов*

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»,
420088 Казань, ул. Акад. Арбузова, 8; *e-mail: aplyubina@gmail.com

Выявлена высокая цитотоксическая активность (Z)-(2-(2-Гидрокси-5-хлорфенил)-2-фенилэтинил)алкилдифенилфосфоний хлоридов на уровне препарата сравнения доксорубинина. Протестированные фосфониевые соли в большинстве случаев оказались менее токсичными в отношении условно-нормальных клеточных линий. На примере соединения PP8, содержащего октильный радикал при атоме фосфора, показана частичная остановка клеточного цикла в фазе G1, усиленная генерация активных форм кислорода, а также индукция митохондриального апоптоза опухолевых клеток M-HeLa. Экспериментальные данные подтверждаются повышенным уровнем белков p53, p21, H2A.X и каспазы-9, обнаруженным с помощью мультиплексного анализа, и свидетельствуют о возникновении двухцепочечных разрывов ДНК в результате воздействия исследованного соединения. Таким образом, дальнейшие структурные модификации с целью повышения селективности исследуемых соединений позволят рассматривать их в качестве платформы для создания новых эффективных химиотерапевтических агентов.

Ключевые слова: фосфониевые соли; апоптоз; повреждение ДНК; клеточный цикл

DOI: 10.18097/BMCRM00254

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из самых серьезных проблем медицины как на глобальном, так и на национальном уровнях. Они характеризуются быстрым и неконтролируемым ростом и распространением аномальных клеток, которые могут поражать различные органы и ткани организма [1]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2022 году было зарегистрировано около 20 миллионов новых случаев онкологических заболеваний и приблизительно 10 миллионов случаев смерти от рака по всему миру [2]. В России ситуация также требует серьезного внимания. По данным Федеральной службы государственной статистики, в 2021 году в стране было зарегистрировано более 580 тысяч новых случаев рака. Число умерших от злокачественных новообразований составило около 280 тысяч человек. Таким образом, онкологические заболевания занимают второе место среди всех причин смертности среди взрослого населения страны [3].

Многие современные методы лечения, такие как химиотерапия и лучевая терапия, направлены на уничтожение не только раковых, но и здоровых клеток, что приводит к значительным побочным эффектам и ухудшению качества жизни пациентов [4]. Кроме того, опухолевые клетки могут развивать резистентность к существующим химиотерапевтическим препаратам [5]. Поэтому на сегодняшний день продолжается поиск эффективных противораковых средств.

Фосфониевые соли представляют собой многообещающий класс соединений с

разнообразными биологическими свойствами, например, противоопухолевыми, антимикробными и противовирусными [6-8]. В данной работе рассмотрены ранее синтезированные фосфониевые соли, которые продемонстрировали выраженные антимикробные свойства в отношении грамположительных бактерий [9]. Бактерицидное действие этих соединений обусловлено негативным влиянием на внутриклеточные процессы бактерий и увеличением проницаемости бактериальной мембраны [10]. Кроме того, данные фосфониевые соли обладают свойствами протонофоров, индуцирующих протон-селективные токи через липидный бислой мембраны и вызывающих разобщение митохондрий [11].

Целью данного исследования стали оценка цитотоксических свойств вышеупомянутых производных фосфониевых солей в отношении раковых клеточных линий и изучение их возможного механизма действия.

МЕТОДИКА

Исследован ряд ранее синтезированных производных фосфониевых солей: (Z)-(2-(2-Гидрокси-5-хлорфенил)-2-фенилэтинил)алкилдифенилфосфоний хлориды [9, 10]. Вещества отличались длиной алкильного радикала у атома фосфора.

Клеточные линии

Клеточные линии M-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки, сублиния HeLa, клон M-HeLa 11), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HuTu 80



(аденокарцинома двенадцатиперстной кишки), PANC-1 (карцинома поджелудочной железы), A549 (карцинома легкого), T 98G (глиобластома), HepG2 (карцинома печени), RPMI 1788 (лейкоциты периферической крови здорового донора), HL-60 (периферическая кровь, промиелоцитарная лейкемия) были получены из Института Цитологии РАН (Россия). Клетки Chang liver (гепатоцитоподобные клетки) получены из Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи (Россия). Клеточные линии SK-OV-3 (аденокарцинома яичника), A-375 (злокачественная меланома), DU-145 (карцинома предстательной железы) из клеточного репозитория CSL (Cell line service) (Германия). Клеточные линии M-HeLa, MCF-7, HuTu 80, PANC-1, A549, T 98G, HepG2, Chang liver, Du-145 культивировали в стандартной среде Игла-МЕМ (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% раствора незаменимых аминокислот (“ПанЭко”). Клетки RPMI 1788, HL-60 выращивали на среде RPMI-1640 (“ПанЭко”) с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки. Клетки SK-OV-3 культивировали на среде ДМЕМ F12 (“ПанЭко”) с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки и 2 мМ L-глутамин. Клетки A-375 выращивали на среде ДМЕМ с глутамином (“ПанЭко”), с добавлением 1% незаменимых аминокислот и 10% фетальной бычьей сыворотки. Все клеточные культуры выращивали при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Цитотоксичность соединений *in vitro*

Влияние фосфониевых солей на жизнеспособность клеток оценивали при помощи МТТ-реagenta. Для этого клетки, которые инкубировали в течение 24 ч в присутствии исследуемых соединений, окрашивали раствором МТТ в конечной концентрации 0.5 мг/мл. Через 4 ч образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в ДМСО. В качестве негативного контроля были использованы клетки, не подвергнутые воздействию соединений. В качестве препарата сравнения использовали Доксорубин (“Sigma-Aldrich”, США). Расчет IC₅₀ (концентрации полумаксимального ингибирования) производили с помощью онлайн-калькулятора: MLA - “Калькулятор Quest Graph™ IC50” [12]. Индекс селективности (ИС) соединений определяли, как отношение их IC₅₀ для нормальной клеточной линии к IC₅₀ для опухолевых клеток. Индекс селективности рассчитывали относительно условно-нормальных клеток Chang liver и RPMI 1788.

Проточная цитометрия

Оценку уровня активных форм кислорода (АФК), апоптоз-индуцирующего действия соединений, влияние веществ на мембранный потенциал митохондрий и анализ клеточного цикла проводили методом проточной цитометрии. Для этого клетки, которые в течение 24 ч подвергались воздействию тестируемых соединений, открепляли от дна планшетов и осаждали при 300 g в течение 5 мин, затем дважды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (“ЭКОсервис”, Россия).

Для проведения анализа клеточного цикла к осадку клеток добавляли 0.05 М фосфатно-цитратный буфер (рН 4.0; 7.7 мл 0.2 М Na₂HPO₄; 12.3 мл 0.1 М лимонной

кислоты), перемешивали, затем центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, ресуспендировали и снова осаждали при тех же условиях. Осадок смешивали с 0.125 мкл 0.1% Тритона X100, 2.5 мкл красителя йодида пропидия (PI) (“Sigma-Aldrich”) и 147.5 мкл ФСБ и выдерживали 60 мин в темноте при температуре 37°C.

Изучение индукции апоптоза (с использованием набора Annexin V-Alexa Fluor 647™ Apoptosis Detection Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), изменение митохондриального трансмембранного потенциала (с использованием Mitochondria Membrane Potential Kit (“Sigma-Aldrich”) и оценку уровня активных форм кислорода (АФК) (с использованием красителя CellROX® Deep Red, “Invitrogen”, США) проводили согласно стандартным протоколам, предоставленным производителями. Детекцию результатов проводили с использованием проточного цитометра Guava EasyCyte (“Merck”, США).

Исследование адгезивных свойств клеток M-HeLa и Chang liver в режиме реального времени

Влияние исследуемых фосфониевых солей на клетки M-HeLa в режиме реального времени изучали при помощи клеточного анализатора xCELLigence S16 Real-time Analysis System RTCA (“Acea Biosciences”, США). В оригинальные 16-луночные планшеты (E-Plate, “Acea Biosciences”) была добавлена питательная среда для определения базового уровня клеточного индекса (CI). CI представляет собой безразмерный параметр, основанный на изменениях электрического импеданса, и используется для характеристики биологического состояния клеток, таких как их количество, жизнеспособность, морфологические особенности и степень адгезии [13]. Затем в каждую лунку вносили суспензию, содержащую 5×10⁵ клеток M-HeLa или Chang liver, и проводили измерения каждые 15 мин на протяжении 24 ч. После этого в лунки добавляли равные объемы растворов исследуемых соединений в разных концентрациях. В контрольные лунки был добавлен такой же объем питательной среды. На протяжении первых 6 ч измерения проводили каждые 30 с, а в последующие часы – каждые 15 мин. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение RTCA Software 2.0.

Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза и генотоксичности

Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза и маркеров повреждения ДНК/генотоксичности проводили с использованием соответствующих наборов MILLIPLEX® 7-plex Early Apoptosis Magnetic Bead Kit и MILLIPLEX® MAP 7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit (“Merck”) согласно стандартным протоколам производителя. Панель MILLIPLEX® 7-plex Early Apoptosis Magnetic Bead Kit позволяет определить такие маркеры как Akt (pS473), BAD (Ser112), Bcl-2 (Ser70), p53 (Ser46), JNK (Thr183/Tyr185), активные каспаза-8 (Asp384) и каспаза-9 (Asp315). Набор MILLIPLEX® MAP 7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit позволяет определить фосфорилированные Chk1 (Ser345), Chk2 (Thr68), H2A.X (Ser139), p53 (Ser15) а также общий уровень ATR, MDM2 and p21.

Для подготовки образцов клетки инкубировали в присутствии тестируемых соединений в течение

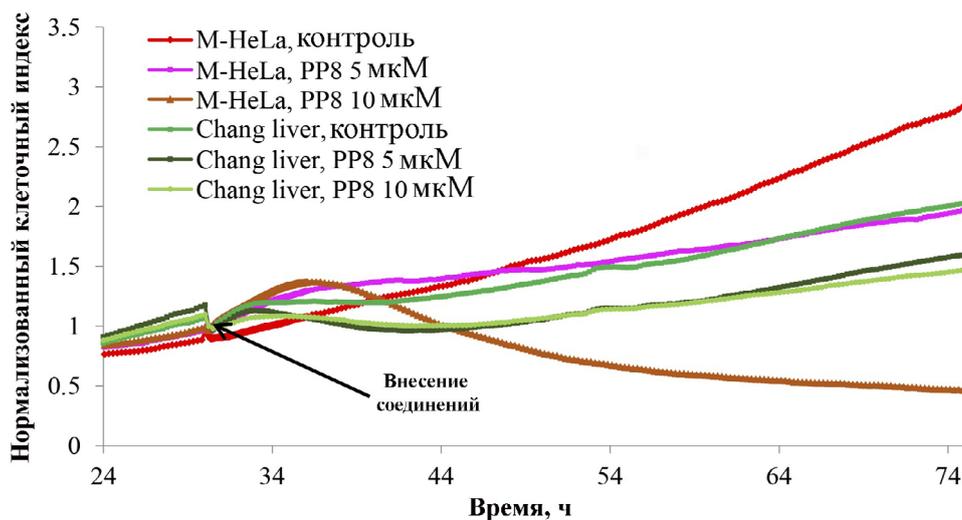


Рисунок 1. Изменение адгезивных свойств клеток M-HeLa и Chang liver в режиме реального времени при воздействии разных концентраций соединения PP8.

24 ч, затем открепляли, промывали ФСБ и разрушали с использованием лизирующего буфера MILLIPLEX MAP (“Merck”), содержащего смесь ингибиторов протеаз P8340 (“Sigma”, США). Полученные лизаты клеток M-HeLa стандартизировали в соответствии с общим содержанием белка, которое измеряли с использованием реагента Бредфорда (“Bio-Rad”, США). Значения интенсивности флуоресценции детектировали с использованием системы Luminex® MAGPIX® (“Merck”).

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ данных выполнен с использованием программ Past4.17 и Microsoft Office Excel 2016. Значимость различий средних значений определяли с применением U-критерия Манна-Уитни ($p \leq 0.01$) с учетом поправки Бонферрони. Табличные и графические данные содержат средние значения и стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитотоксичность соединений *in vitro*

Ранее нами была продемонстрирована высокая антимикробная активность исследуемых фосфониевых солей [9, 10]; соединения близкой им структуры продемонстрировали также селективность в отношении некоторых опухолевых клеточных линий [14]. В связи с этим в данной работе также были исследованы цитотоксические свойства (Z)-(2-(2-Гидрокси-5-хлорфенил)-2-фенилэтил) алкилдифенилфосфоний хлоридов с шифрами PPR. Результаты цитотоксичности данных соединений в отношении клеточных линий человека приведены в таблице 1. Рассчитанные относительно условно-нормальных клеток Chang liver и RPMI 1788 ИС веществ представлены в таблице 2.

По результатам эксперимента можно заключить, что исследованные фосфониевые соли обладают цитотоксической активностью на уровне препарата

сравнения доксорубина в отношении некоторых клеточных линий, таких как M-HeLa, HepG2, MCF-7, SK-OV-3, NuTu 80. Значения IC_{50} наиболее активных соединений (PP5, PP6, PP7, PP8) на этих линиях варьировали от 3.9 мкМ до 13.1 мкМ. При этом в большинстве случаев ИС протестированных фосфониевых солей оказался выше ИС Доксорубина. Анализ результатов продемонстрировал зависимость цитотоксических свойств соединений от длины алифатического заместителя у атома фосфора, что согласуется с ранее полученными данными по антимикробной активности этих соединений, а также подтверждает данные литературы [15]. Для дальнейших исследований по изучению механизма действия было выбрано соединение PP8, как наиболее селективное в отношении модельной культуры клеток M-HeLa и большинства других протестированных клеточных линий. В последующих экспериментах фосфониевую соль PP8 использовали в двух концентрациях: 5 мкМ (концентрация, близкая к значению IC_{50}) и 10 мкМ (заведомо высокая концентрация для модельных клеток M-HeLa).

Исследование адгезивных свойств клеток M-HeLa и Chang liver в режиме реального времени

Определение IC_{50} с помощью МТТ реагента дает информацию по цитотоксичности веществ через определенный промежуток времени (в данном случае через 24 часа). Мониторинг состояния клеточной популяции в режиме реального времени расширил понимание характера воздействия тест-соединения на эукариотические клетки. На рисунке 1 представлено изменение клеточного индекса от времени в присутствии разных концентраций PP8. По результатам видно, что его цитотоксический эффект в отношении клеток M-HeLa в концентрации 10 мкМ проявлялся уже после 6 ч воздействия. В концентрации 5 мкМ соединение проявляло преимущественно цитостатический эффект: замедляло скорость роста и деления клеток. В первые 6 ч после добавления вещества, кривая клеточного индекса поднималась выше контрольного уровня, а затем снижалась.

Таблица 1. Цитотоксичность исследуемых соединений в отношении клеточных линий человека различного генеза.

Соединение*	IC ₅₀ , мкМ												
	M-HeLa	A-375	Du-145	HepG2	MCF-7	SK-OV-3	PANC-1	HuTu 80	A549	T 98G	HL-60	Chang liver**	RPMI 1788
PP1 R = CH ₃	70 ± 6.3	16.1 ± 1.5	24.6 ± 1.9	20.7 ± 1.5	30.6 ± 3.2	16.7 ± 1.9	22.4 ± 2.1	24.9 ± 2.1	>100	20.7 ± 2.1	26.8 ± 3.6	28.5 ± 2.1	27.7 ± 5.1
PP2 R = C ₂ H ₅	80 ± 6.9	23.7 ± 2.2	23.3 ± 2.1	13.1 ± 2.1	28.2 ± 2.7	53.5 ± 12.1	19.7 ± 1.9	23.9 ± 2.1	>100	28.1 ± 2.3	57.8 ± 6.9	28.1 ± 1.9	15.8 ± 1.3
PP3 R = C ₃ H ₇	40 ± 3.5	47.5 ± 5.5	33 ± 2.8	11.7 ± 1.6	24.9 ± 2.5	10.3 ± 2.5	25.0 ± 2.1	22.3 ± 2.0	>100	20.2 ± 1.8	27.5 ± 2.1	14.1 ± 1.3	31.4 ± 2.5
PP4 R = C ₄ H ₉	40 ± 3.9	12.8 ± 1.1	23 ± 2.2	12.8 ± 0.3	15.3 ± 1.6	6.0 ± 1.1	19.4 ± 1.5	6.3 ± 0.5	43.5 ± 4.1	11.7 ± 1.0	21.4 ± 1.5	21.9 ± 2.0	22.2 ± 1.2
PP5 R = C ₅ H ₁₁	6.5 ± 0.6	6.8 ± 0.7	14 ± 1.9	9.3 ± 3.6	6.3 ± 0.5	5.2 ± 1.3	19.3 ± 1.6	6.7 ± 0.6	42.0 ± 4.1	19.2 ± 1.7	20.7 ± 3.3	14.1 ± 1.3	7.7 ± 0.5
PP6 R = C ₆ H ₁₃	6.1 ± 0.6	9.2 ± 0.8	11.8 ± 1.5	11 ± 2.5	5.6 ± 0.7	5.4 ± 0.8	19.3 ± 1.9	6.5 ± 0.6	34.2 ± 3.0	28.6 ± 2.5	16.8 ± 6.5	14.8 ± 1.4	12.6 ± 2.1
PP7 R = C ₇ H ₁₅	4.6 ± 0.4	7.7 ± 0.8	10.6 ± 2.1	13.1 ± 5.5	4.9 ± 0.5	5.4 ± 0.9	16.6 ± 1.5	4.5 ± 0.3	17.6 ± 1.5	21.2 ± 1.9	13.8 ± 0.9	20.2 ± 1.7	12.1 ± 0.9
PP8 R = C ₈ H ₁₇	6.4 ± 0.5	6.7 ± 1.7	12.3 ± 1.1	3.9 ± 3.3	3.8 ± 0.5	5.8 ± 0.5	15.7 ± 1.3	10.8 ± 0.9	36.8 ± 3.5	26.5 ± 2.3	14.9 ± 1.3	31.8 ± 3.0	25.1 ± 10.6
Доксорубицин	3.0 ± 0.3	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	3.3 ± 0.2	3.1 ± 1.6	0.5 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	5.7 ± 0.5	1.7 ± 1.89	3.0 ± 0.3	3.3 ± 0.37

Примечание. * - Сокращенные цифры для соединений (PPR) следует понимать следующим образом: первая P означает фенильный заместитель при двойной связи, вторая P – фенильные заместители при атоме фосфора, R – длина алкильного заместителя у атома фосфора [10]. ** - данные опубликованы [10]

Таблица 2. Индекс селективности (ИС) исследуемых соединений, рассчитанный относительно IC₅₀ в отношении условно-нормальных клеточек Chang liver и RPMI 1788.

Соединение	Индекс селективности цитотоксического действия исследуемых соединений, рассчитанный относительно IC ₅₀ для клеточек Chang liver / RPMI-1788												
	M-HeLa	A-375	Du-145	HepG2	MCF-7	SK-OV-3	PANC-1	HuTu 80	A549	T 98G	HL-60		
PP1	0.4 / 0.4	1.8 / 1.7	1.2 / 1.1	1.4 / 1.3	0.9 / 0.9	1.7 / 1.7	1.3 / 1.2	1.1 / 1.1	- / -	1.4 / 1.3	1.1 / 1.0		
PP2	0.4 / 0.2	1.2 / 0.7	1.2 / 0.7	2.1 / 1.2	1.0 / 0.6	0.5 / 0.3	1.4 / 0.8	1.2 / 0.7	- / -	1.0 / 0.6	0.5 / 0.3		
PP3	0.4 / 0.8	0.3 / 0.7	0.4 / 1.0	1.2 / 2.7	0.6 / 1.3	1.4 / 3.0	0.6 / 1.3	0.6 / 1.4	- / -	0.7 / 1.6	0.5 / 1.1		
PP4	0.6 / 0.6	1.7 / 1.7	1.0 / 1.0	1.7 / 1.7	1.4 / 1.5	3.7 / 3.7	1.1 / 1.1	3.5 / 3.5	0.5 / 0.5	1.9 / 1.9	1.0 / 1.0		
PP5	2.2 / 1.2	2.1 / 1.1	1.0 / 0.5	1.5 / 0.8	2.2 / 1.2	2.7 / 1.5	0.7 / 0.4	2.1 / 1.1	0.3 / 0.2	0.7 / 0.4	0.7 / 0.4		
PP6	2.4 / 2.1	1.6 / 1.4	1.3 / 1.1	1.3 / 1.1	2.6 / 2.2	2.7 / 2.3	0.8 / 0.7	2.3 / 1.9	0.4 / 0.4	0.5 / 0.4	0.9 / 0.7		
PP7	4.4 / 2.6	2.6 / 1.6	1.9 / 1.1	1.5 / 0.9	4.1 / 2.5	3.7 / 2.2	1.2 / 0.7	4.5 / 2.7	1.1 / 0.7	0.9 / 0.6	1.5 / 0.9		
PP8	5.0 / 3.9	4.6 / 3.6	2.6 / 2.0	8.1 / 6.4	8.4 / 6.6	5.5 / 4.3	2.0 / 1.6	2.9 / 2.3	0.9 / 0.7	1.2 / 0.9	2.1 / 1.7		
Доксорубицин	1.0 / 1.1	2.3 / 2.1	3.4 / 2.5	0.9 / 3.7	1.0 / 1.0	6.0 / 1.0	0.9 / 6.5	1.0 / 1.0	1.0 / 1.1	0.5 / 1.1	1.8 / 0.6		

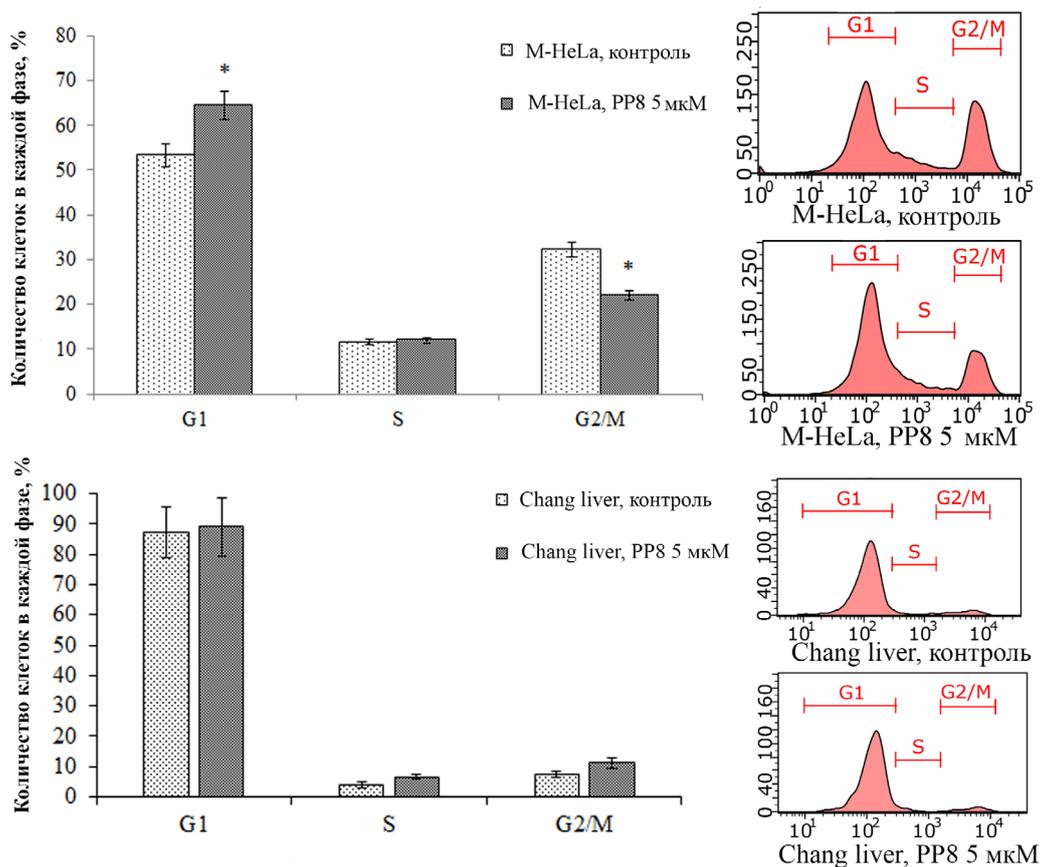


Рисунок 2. Влияние соединения PP8 на клеточный цикл клеток M-HeLa и Chang liver. * - $p < 0.01$ при сравнении с контрольным образцом.

По данным Abassi и соавт. [16] такая кривая клеточного индекса характерна для веществ, затрудняющих репликацию ДНК. Подобные соединения останавливали клеточный цикл в фазе G0/G1 [16]. В отношении гепатоцитоподобных клеток Chang liver выраженных цитотоксических свойств и значительного влияния на рост и адгезию клеток не выявлено.

Влияние фосфониевых солей на клеточный цикл клеток M-HeLa и Chang liver

По результатам проточной цитометрии клеток, окрашенных красителем PI (рис. 2) видно, что в присутствии соединений в клетках M-HeLa происходит увеличение доли клеток в фазе G1 и снижение в фазе G2/M, что подтверждает данные, полученные с помощью клеточного анализатора xCELLigence. Не было продемонстрировано влияния исследуемых фосфониевых солей на клеточный цикл Chang liver.

Мультиплексный анализ повреждения ДНК/генотоксичности

Литературные данные свидетельствуют о возможном взаимодействии фосфониевых солей с ДНК [17]. Для оценки влияния веществ на ДНК нами был проведен мультиплексный анализ маркеров повреждения ДНК и генотоксичности. Повреждения ДНК могут происходить в результате влияния внешних факторов (ионизирующее, ультрафиолетовое излучение, воздействие химических соединений) или эндогенного воздействия (ошибки репликации ДНК или

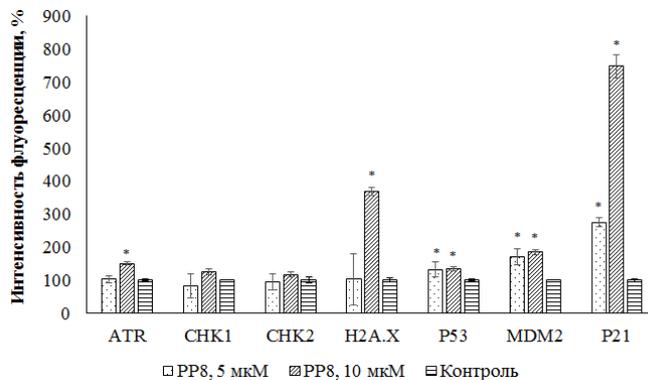


Рисунок 3. Мультиплексный анализ маркеров повреждения ДНК/генотоксичности в клетках M-HeLa после воздействия соединения PP8. * - $p < 0.01$ при сравнении с контрольным образцом.

накопления АФК) [18]. В ответ на повреждения ДНК активируются ATR и ATM-киназы, относящиеся к семейству PIKK-киназ [19]. ATR активируется в присутствии однонитевой ДНК (например, при ошибках репликации), ATM играет ключевую роль в ответе на двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) [20]. Такие повреждения являются наиболее опасными для клетки. Активированный ATM фосфорилирует множество субстратов, в число которых входит и гистон H2A.X, который считается маркером двухцепочечных разрывов ДНК, так как накапливается в местах повреждений и участвует в их репарации [21, 22]. Субстратом ATM и ATR могут являться киназы контрольных точек CHK2 и CHK1, а также опухолевый супрессор p53 [23, 24].

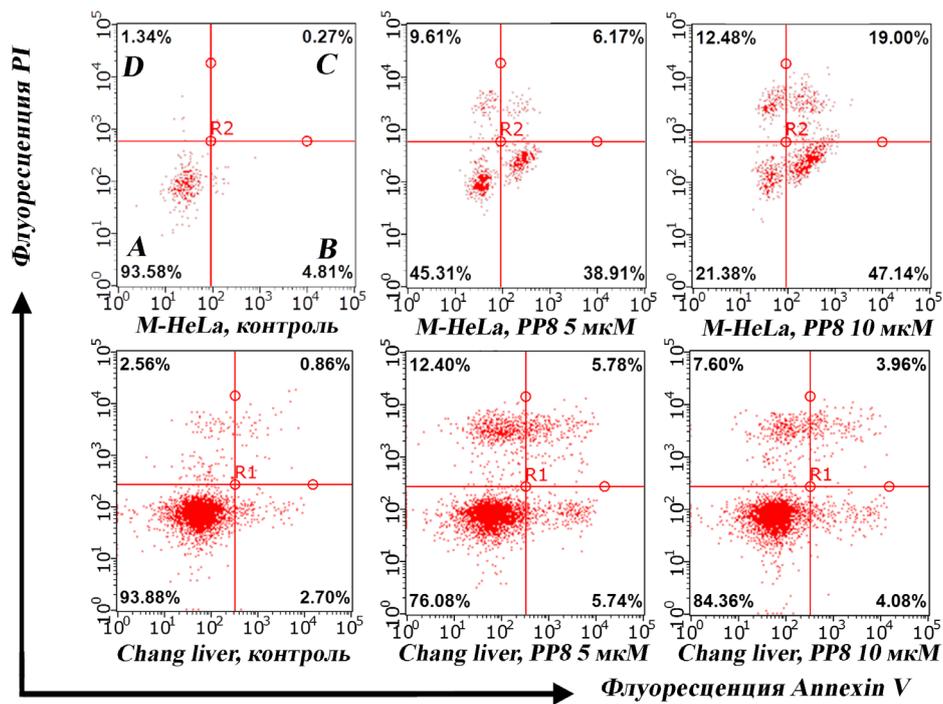


Рисунок 4. Индукция апоптоза в клетках M-HeLa и Chang liver в присутствии соединения PP8. А – живые клетки, В- клетки на стадии раннего апоптоза, С – клетки на стадии позднего апоптоза, Д – мертвые клетки.

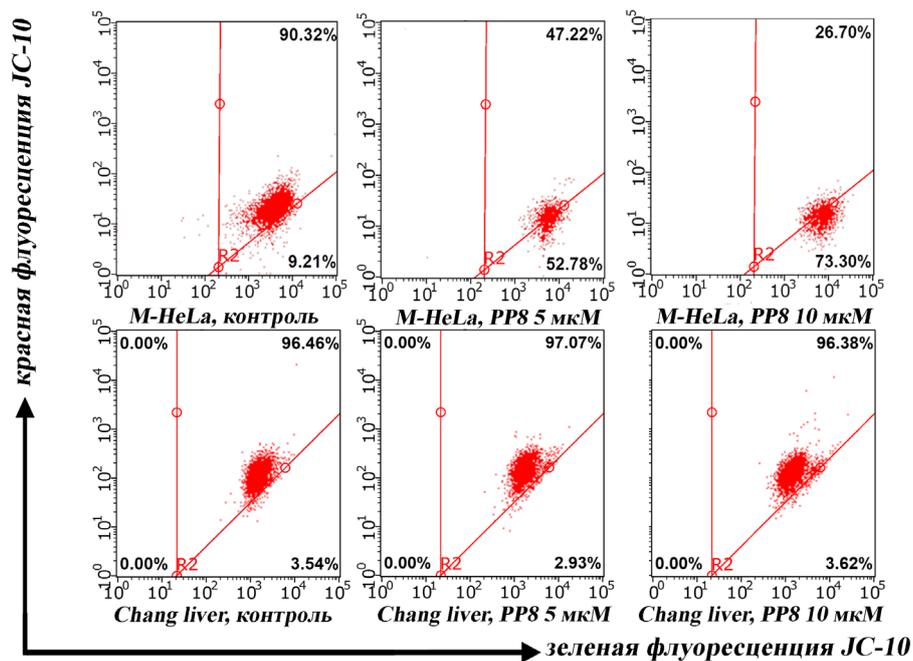


Рисунок 5. Изменение митохондриального мембранного потенциала в клетках M-HeLa и Chang liver в присутствии соединения PP8.

В результате фосфорилирования p53 белками ATR или ATM по сайту Ser15 происходит разрыв связи p53 с его отрицательным регулятором убиквитинлигазой MDM2 [25]. После чего p53 способен фосфорилировать p21, ингибитор циклин-зависимой киназы 1A, который в дальнейшем приводит к остановке клеточного цикла преимущественно при переходе из G1 фазы в S фазу [26]. В случае невозможности репарации повреждений ДНК из-за тяжелого генотоксического стресса происходит фосфорилирование p53 (Ser46) и подается сигнал для уничтожения клетки посредством программируемой клеточной гибели (апоптоза) [27].

Результаты, представленные на рисунке 3, демонстрируют увеличение уровня H2A.X в клетках M-HeLa под действием 10 мкМ PP8. При этом наблюдается рост уровня p21 и MDM2 в клетках в присутствии всех протестированных концентраций. Стоит отметить также небольшое, но достоверное увеличение уровня фосфорилированного p53 (Ser15). Данные, полученные с помощью мультиплексного анализа, свидетельствуют о затрудненной репликации ДНК и вероятном возникновении двухцепочечных разрывов ДНК в клетках, что в результате сигнальных каскадов приводит к остановке клеточного цикла.

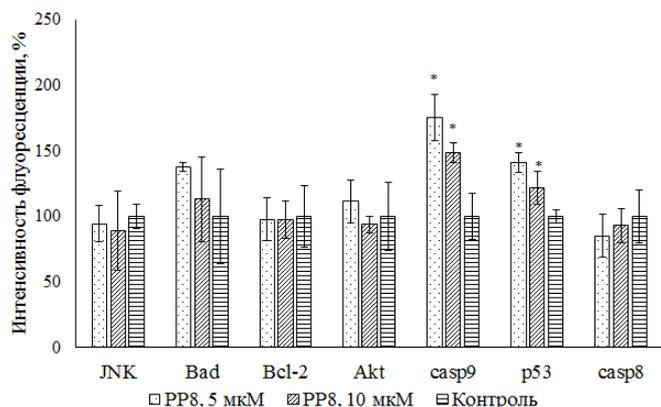


Рисунок 6. Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза в клетках M-HeLa после воздействия соединения PP8. * – $p < 0.01$ при сравнении с контрольным образцом.

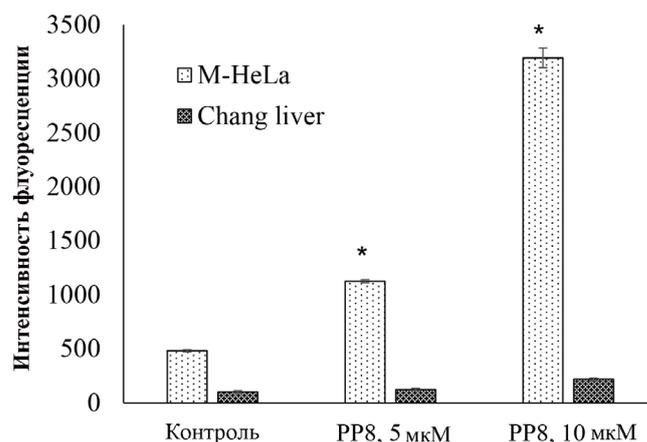


Рисунок 7. Уровень АФК в клетках M-HeLa и Chang liver в присутствии соединения PP8; * – $p < 0.01$ при сравнении с контрольным образцом

Изучение апоптоза в клетках M-HeLa и Chang liver

Так как ранее нами было продемонстрировано увеличение уровня p53 в клетках в присутствии PP8, необходимо было также изучить апоптозиндуцирующее действие соединений. По результатам проведения проточной цитометрии клеток M-HeLa с использованием красителей PI и Annexin V-Alexa Fluor отмечено дозозависимое увеличение доли клеток на стадии раннего и позднего апоптоза (рис. 4). Снижение митохондриального мембранного потенциала в клетках M-HeLa под воздействием PP8 (рис. 5) не только продемонстрировало митохондриальное нацеливание веществ, но и позволило предположить возможный внутренний путь программируемой клеточной гибели. Причиной деполяризации мембраны митохондрий, вероятно, являются протонофорные свойства соединений, продемонстрированные ранее [11]. На условно-нормальных гепатоцитоподобных клетках Chang liver не было показано выраженного снижения митохондриального мембранного потенциала и индукции апоптоза.

Мультиплексный анализ семи маркеров раннего апоптоза

Анализ семи маркеров раннего апоптоза позволил углубиться в понимание причин и пути апоптоза, индуцированного PP8. Результаты эксперимента (рис. 6) продемонстрировали увеличение количества каспазы-9 в клетках после воздействия соединения, что свидетельствует о протекании апоптоза по митохондриальному пути. Также отмечено увеличение уровня белка p53, фосфорилированного по сайту Ser46. Такие результаты подтверждают и дополняют полученные ранее данные.

Накопление АФК в клетках M-HeLa и Chang liver

АФК постоянно образуются в живой клетке, например, как продукты побочных реакций в процессе окислительного фосфорилирования. Однако накопление АФК может привести к негативным для клетки последствиям: окислению липидов, белков, нарушению структуры ДНК [28]. Ранее нами было выявлены признаки повреждения ДНК и апоптоза. Кроме того, исследуемые фосфониевые соли в своей структуре содержат фенольный фрагмент. Известно, что фенолы могут приводить к формированию АФК [29]. Методом проточной

цитометрии было выявлен более высокий уровень АФК в клетках M-HeLa после воздействия соединения PP8 (рис. 7). При этом в отношении гепатоцитоподобных клеток Chang liver даже после воздействия 10 мкМ PP8 уровень АФК вырос не более чем в два раза по сравнению с интактными клетками.

Раковые клетки могут быть более уязвимы к окислительному стрессу из-за того, что их уровень АФК выше, чем в нормальных клетках [30]. Полученные нами данные позволяют предположить, что избирательная токсичность в отношении некоторых раковых клеток может быть связана именно с индукцией окислительного стресса. Повышенный уровень АФК также может быть причиной повреждений ДНК и впоследствии апоптоза. Тем не менее не стоит исключать возможность и прямого взаимодействия фосфониевых солей с ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы была выявлена высокая цитотоксическая активность (Z)-(2-(2-гидрокси-5-хлорфенил)-2-фенилэтил)алкилдифенилфосфоний хлоридов на уровне препарата сравнения доксорубина в отношении клеточных линий M-HeLa, HepG2, MCF-7, SK-OV-3 и HuTu 80. Более низкая цитотоксичность была продемонстрирована на условно-нормальных клетках Chang liver и RPMI 1788. В качестве наиболее перспективного было выбрано производное PP8, имеющее октильный радикал у атома фосфора. На его примере было продемонстрировано цитостатическое действие в отношении клеток M-HeLa в концентрациях, близких к IC_{50} (5 мкМ). Методом проточной цитометрии были выявлены остановка клеточного цикла в фазе G1, повышенный уровень АФК, дозозависимая индукция апоптоза и снижение митохондриального мембранного потенциала. Мультиплексный анализ маркеров повреждения ДНК/генотоксичности и маркеров раннего апоптоза обнаружил достоверные увеличения уровней белков ATR, H2A.X, p53, MDM2, p21 и каспазы-9. Увеличение некоторых маркеров повреждения ДНК, обнаруженное в результате мультиплексного анализа, может быть как результатом прямого воздействия производных фосфониевых солей на молекулу ДНК, так и её вторичного

повреждения в том числе в результате накопления АФК. Таким образом, протестированные фосфониевые соли могут представлять интерес в качестве основы для создания новых противоопухолевых агентов. А понимание механизма действия данных веществ позволит обозначить стратегию их возможной дальнейшей модификации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза и маркеров повреждения ДНК/Генотоксичности выполнен с использованием оборудования лаборатории химико-биологических исследований Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Makimbetov, E.K., Salikhar, R.I., Tumanbaev, A.M., Toktanalieva, A.N., Kerimov, A.D. (2020) Cancer epidemiology in the world. Modern problems of science and education, **2**, 168-168. DOI: 10.17513/spno.29718
- Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. Retrieved September 30, 2024, from: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing-amidst-mounting-need-for-services>
- Caprin, A.D., Starinsky, V.V., Shakhzadova, A.O. (2022). Malignant neoplasms in Russia in 2021 (incidence and mortality). Moscow: PA Hertsen Moscow Oncology Research Institute—Branch of the National Medical Research Radiological Center. 252 p. ISBN 978-5-85502-280-3
- Peyraga, G., Ducassou, A., Arnaud, F.X., Lizée, T., Pouédras, J., Moyal, É. (2021). Radiothérapie et toxicité médullaire: actualités et perspectives. *Cancer/Radiothérapie*, **25**(1), 55-61. DOI: 10.1016/j.canrad.2020.05.017
- Zhu, S., Wang, X., Jiang, H. (2024). Systematic Reversal of Drug Resistance in Cancer. *Targets*, **2**(3), 250-286. DOI: 10.3390/targets2030015
- Pawar, A., Korake, S., Pawar, A., Kamble, R. (2023). Delocalized lipophilic cation triphenyl phosphonium: promising molecule for mitochondria targeting. *Current Drug Delivery*, **20**(9), 1217-1223. DOI: 10.2174/1567201819666220525092527
- Ibrahim, M.K., Haria, A., Mehta, N.V., Degani, M.S. (2023). Antimicrobial potential of quaternary phosphonium salt compounds: A review. *Future Medicinal Chemistry*, **15**(22), 2113-2141. DOI: 10.4155/fmc-2023-0188
- Nissim, M., Lline-Vil, T., Shoshani, S., Jacobi, G., Malka, E., Dombrovsky, A., Banin, E., Margel, S. (2023). Synthesis and Characterization of Durable Antibiofilm and Antiviral Silane-Phosphonium Thin Coatings for Medical and Agricultural Applications. *ACS omega*, **8**(42), 39354-39365. DOI: 10.1021/acsomega.3c04908
- Tatarinov, D.A., Kuznetsov, D.M., Voloshina, A.D., Lyubina, A.P., Strobkykina, A.S., Mukhitova, F.K., Polyancev, F.M., Mironov, V.F. (2016). Synthesis of 2-(2-hydroxyaryl) alkenylphosphonium salts from phosphine oxides via ring-closing ring-opening approach and their antimicrobial evaluation. *Tetrahedron*, **72**(51), 8493-8501. DOI: 10.1016/j.tet.2016.11.023
- Terekhova, N.V., Lyubina, A.P., Voloshina, A.D., Sapunova, A.S., Khayarov, K.R., Islamov, D.R., Usachev, K.S., Evtugyn, V.G., Tatarinov, D.A., Mironov, V.F. (2022). Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship of 2-(2-hydroxyaryl) alkenylphosphonium salts with potency as anti-MRSA agents. *Bioorganic Chemistry*, **127**, 106030. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.106030

- Rokitskaya, T.I., Terekhova, N.V., Khailova, L.S., Kotova, E.A., Plotnikov, E.Y., Zorov, D.B., Tatarinov, D.A., Antonenko, Y.N. (2019). Zwitterionic protonophore derived from 2-(2-hydroxyaryl)alkenylphosphonium as an uncoupler of oxidative phosphorylation. *Bioconjugate Chemistry*, **30**(9), 2435-2443. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00516
- IC50 Calculator. Retrieved June 11, 2024, from: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>
- Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C.P., O'Carroll, S.J., Du Mez, E., Angel, C.E., Graham, E.S. (2015). Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors*, **5**(2), 199-222. DOI: 10.3390/bios5020199
- Terekhova, N.V., Tatarinov, D.A., Shaihtudinova, Z.M., Pashirova, T.N., Lyubina, A.P., Voloshina, A.D., Sapunova, A.S., Zakharova, L.Ya., Mironov, V.F. (2020). Design and synthesis of amphiphilic 2-hydroxybenzylphosphonium salts with antimicrobial and antitumor dual action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **30**(13), 127234. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127234
- Chen, Z., Luo, R., Xu, T., Wang, L., Deng, S., Wu, J., Wang, H., Lin, Y., Bu, M. (2024). Design, synthesis and antitumor effects of lupeol quaternary phosphonium salt derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **113**, 117934. DOI: 10.1016/j.bmc.2024.117934
- Abassi, Y.A., Xi, B., Zhang, W., Ye, P., Kirstein, S.L., Gaylord, M.R., Feinstein, S.C., Wang, X., Xu, X. (2009). Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chemistry & biology*, **16**(7), 712-723. DOI: 10.1016/j.chembiol.2009.05.011
- Xie, W., Ye, Y., Shen, A., Zhou, L., Lou, Z., Wang, X., & Hu, J. (2008). Evaluation of DNA-targeted anti-cancer drugs by Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, **47**(2), 119-123. DOI: 10.1016/j.vibspec.2008.03.003
- Bohgaki, T., Bohgaki, M., Hakem, R. (2010). DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome integrity*, **1**, 1-14. DOI: 10.1186/2041-9414-1-15
- Ramazanov, B.R., Khusnutdinov, R.R., Galembikova, A.R., Dunaev, P.D., Boichuk S.V. Role of p53 protein in activation of ATM- and PARP-mediated DNA damage repair (DDR) pathways induced by topoisomerase type II inhibitors. *Kazan medical journal*, **97**(2), 245-249. DOI: 10.17750/KMJ2016-245
- Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research*, **108**, 73-112. DOI: 10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0
- Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumie, M., Guidice, J.M.L., Courcot, D., Garçon, G. (2019). In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM2.5 using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environmental research*, **171**, 510-522. DOI: 10.1016/j.envres.2019.01.052
- Ismail, I.H., Hendzel, M.J. (2008). The γ -H2A. X: Is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more?. *Environmental and molecular mutagenesis*, **49**(1), 73-82. DOI: 10.1002/em.20358
- Craig, A., Scott, M., Burch, L., Smith, G., Ball, K., Hupp, T. (2003). Allosteric effects mediate CHK2 phosphorylation of the p53 transactivation domain. *EMBO reports*, **4**(8), 787-792. DOI: 10.1038/sj.embor.embor901
- Loughery, J., Cox, M., Smith, L.M., Meek, D.W. (2014). Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic acids research*, **42**(12), 7666-7680. DOI: 10.1093/nar/gku501
- Liebl, M.C., Hofmann, T.G. (2019). Cell fate regulation upon DNA damage: p53 serine 46 kinases pave the cell death road. *Bioessays*, **41**(12), 1900127. DOI: 10.1002/bies.201900127
- Karimian, A., Ahmadi, Y., Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA repair*, **42**, 63-71. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008
- Liebl, M.C., Hofmann, T.G. (2019). Cell fate regulation upon DNA damage: p53 serine 46 kinases pave the cell death road. *Bioessays*, **41**(12), 1900127. DOI: 10.1002/bies.201900127
- Reczek, C.R., Chandel, N.S. (2017). The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annual review of cancer biology*, **1**(1), 79-98. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808
- Sui, X., Wang, J., Zhao, Z., Liu, B., Liu, M., Shi, C., Feng X., Fu Y., Shi D., Li S., Qi Q., Xian Mo., Zhao, G. (2024). Phenolic compounds induce ferroptosis-like death by promoting hydroxyl radical generation in the Fenton reaction. *Communications Biology*, **7**(1), 199. DOI: 10.1038/s42003-024-05903-5
- Wang, Q.Y., Xu, Y.S., Zhang, N.X., Dong, Z.P., Zhao, B.N., Liu, L.C., Lu T., Wang, Y. (2020). Phenylboronic ester-modified anionic micelles for ROS-stimuli response in HeLa cell. *Drug Delivery*, **27**(1), 681-690. DOI: 10.1080/10717544.2020.1748761

Поступила: 08.11.2024

После доработки: 28.01.2025

Принята к публикации: 03.02.2025

NOVEL PHOSPHONIUM SALT DERIVATIVES INDUCE DNA DAMAGE AND APOPTOSIS IN CERVICAL CANCER CELLS

*A.P. Lyubina**, *A.D. Voloshina*, *S.K. Amerkhanova*, *A.S. Sapunova*, *D.A. Tatarinov*, *V.F. Mironov*

Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
8 Arbuzov str., Kazan, 420088 Russia; *e-mail: aplyubina@gmail.com

This study demonstrates that (Z)-(2-(2-hydroxy-5-chlorophenyl)-2-phenylethenyl)alkyldiphenylphosphonium chlorides exhibit high antitumour activity, comparable to that of the reference drug doxorubicin. The phosphonium salts exhibited reduced toxicity towards conditionally normal cell lines in the majority of cases. The mechanism of action of compound PP8, which contains an octyl radical at the phosphorus atom, on the model cell line M-HeLa included partial cell cycle arrest in the G1 phase, an increased generation of reactive oxygen species, and an induction of mitochondrial apoptosis. These experimental data are supported by the elevated levels of p53, p21, H2A.X and caspase-9 proteins detected by multiplex analysis. The results indicated the occurrence of double-strand DNA breaks under the influence of the studied compound. Therefore, additional structural modifications to enhance the selectivity of the studied compounds will provide a basis for the development of novel effective antitumour agents.

Key words: phosphonium salts; apoptosis; DNA damage; cell cycle

FUNDING

The work was carried out within the framework of the state assignment of the FRC Kazan Scientific Center of RAS.

Received: 08.11.2024, revised: 28.01.2025, accepted: 03.02.2025