

Aktywność chemoprewencyjna flufenazyny i jej analogów w hodowlach ludzkich limfocytów preinkubowanych z inhibitorem syntezy ceramidowej

Agata Jaszczyszyn¹, Kazimierz Gąsiorowski¹, Piotr Świątek²,
Wiesław Malinka², Urszula Kaziród³

Wstęp. Ceramid (cer) jest zazwyczaj produkowany na drodze hydrolizy sfingomieliny przez sfingomielinazy (SMase). Zbadano, że aktywność chemoprewencyjna — propoptotyczna i chemouwrażliwiająca — piperazynowej pochodnej fenotiazyny (Pht), flufenazyny (FPh) i jej nowo syntezowanych analogów — związków 1b i 3f — zależy od stymulacji lizosomalnej, kwaśnej sfingomielinazy (aSMase), niezależnej od Zn^{2+} , jednego z enzymów uczestniczących w powstawaniu endogennego cer. Innym ważnym szlakiem tworzenia cer w komórce jest synteza *de novo* z udziałem syntetazy ceramidowej (CerS). Celem pracy była ocena aktywności chemoprewencyjnej FPh i jej analogów: związków 1b i 3f po nieodwracalnym zablokowaniu CerS.

Materiał i metody. Aktywność chemoprewencyjną badanych związków (10 μ M, 2 godz.) oceniano w hodowlach limfocytów ludzkich uszkodzonych genotoksycznie przez inkubację z benzo[a]pirenem (+B[a]P; 7,5 μ M, 48 godz.) i po preinkubacji z selektywnym inhibitorem CerS — funonizyną B₁ (+FB₁; 20 μ M, 1,5 godz.). W ocenie efektów badanych związków zastosowano metody: mikroskopii fluorescencyjnej, spektrofotometrii i spektrofotometrii. Istotność statystyczną uzyskanych rezultatów sprawdzono za pomocą testu *t*-Studenta.

Wyniki. W hodowlach limfocytów w obecności inhibitora CerS (+B[a]P; +FB₁) inkubacja hodowli z analogami 1b i 3f prowadziła do istotnie niższego ($p < 0,05$) odsetka komórek w apoptozie i akumulacji rodaminy 123 (Rod-123) w porównaniu z hodowlą bez inhibitora CerS (+B[a]P; -FB₁). W przypadku macierzystego związku FPh wpływ na hodowle limfocytów nie zależał od obecności inhibitora CerS.

Wnioski. Efekty proapoptotyczny i chemouwrażliwiający analogów 1b i 3f są uwarunkowane aktywacją CerS. Natomiast dla macierzystej FPh wykazano, że jej aktywność chemoprewencyjna nie zależy od stymulacji szlaku syntezy *de novo* cer z udziałem CerS.

Chemopreventive activity of fluphenazine and its analogues in human lymphocyte cultures preincubated with ceramide synthase inhibitor

Introduction. The ceramide (cer) is generated mainly via hydrolysis of sphingomyelin by sphingomyelinase (SMase). It was previously documented that chemopreventive activity — proapoptotic and chemosensitizing of piperazine phenothiazine derivative, fluphenazine (FPh) and its newly synthesized analogues, 1b and 3f compounds, depends on the activity of lysosomal acidic sphingomyelinase (aSMase), Zn^{2+} -independent, one of the enzymes participating in intracellular ceramide generation. Another important pathway of intracellular formation of ceramide is *de novo* synthesis with participation of ceramide synthase (CerS). The aim of this research is to assess the chemopreventive activity of FPh and 1b and 3f compounds after irreversible CerS blockade.

¹Katedra Podstaw Nauk Medycznych

²Katedra Chemii Leków

³SKN przy Katedrze Podstaw Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Material and methods. Chemopreventive activity of the tested compounds (10 μ M, 2 h) was evaluated in human lymphocyte cultures, genotoxically damaged by benzo[a]pyrene (+B[a]P; 7,5 μ M, 48 h) and preincubated with a selective inhibitor CerS — fumonisin B₁ (+FB₁; 20 μ M, 1,5 h) and inspected with fluorescence microscopy, as well as with spectrophotometric and spectrofluorimetric methods. Student's *t*-test was used for testing the statistical significance of the results.

Results. It was established that in the presence of the CerS inhibitor (+B[a]P; +FB₁) the effects of 1b and 3f analogues on apoptotic cell frequency in lymphocyte cultures and on accumulation of rhodamine 123 (Rod-123), were significantly ($p < 0.05$) decreased when compared to the cultures carried out in the absence of the CerS inhibitor (+B[a]P; -FB₁). Whereas in the case of the parent compound: the FPh, the presence of the inhibitor did not influence on FPh chemopreventive activity.

Conclusions. The proapoptotic and chemosensitizing effects of 1b and 3f compounds were determined in major part by CerS activation. Also the chemopreventive activity of the parent compound: the FPh, was independent of the *cer de novo* synthesis pathway conducted by CerS.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2014; 64, 1: 7–15

Słowa kluczowe: apoptoza, ceramid, flufenazylna i jej analogi, glikoproteina P, syntetaza ceramidowa

Key words: apoptosis, ceramide, fluphenazine and its analogues, P-glycoprotein, synthase ceramide

Wstęp

W związku z systematycznie rosnącą liczbą przypadków nowotworów u ludzi pilną potrzebą jest opracowanie strategii obniżenia współczynnika zapadalności na chorobę nowotworową i opracowania zasad poprawy efektywności leczenia farmakologicznego różnego typu nowotworów [1–4].

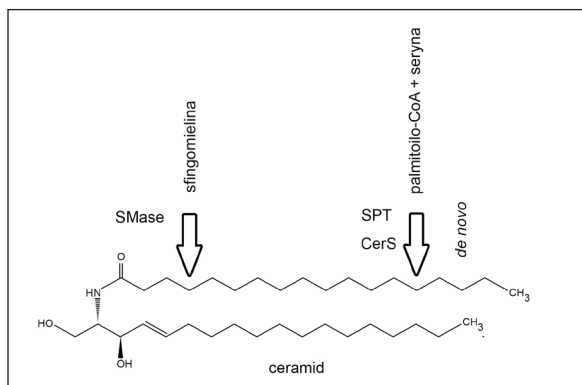
Od lat 40. ubiegłego wieku chemioterapia stanowi podstawową metodę leczenia większości nowotworów [1]. Farmakoterapia cytostatyczna zazwyczaj wiąże się z ryzykiem wystąpienia u pacjentów wielu działań ubocznych, m.in.: efektu kardio-, mielo- i neurotoksycznego, zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego, płuc, wątroby, nerek itp., które za względu na czas ich pojawienia się podzielono na powikłania natychmiastowe, wczesne, opóźnione i późne [4–7]. Ponadto każda terapia lekami cytostatycznymi może być potencjalnie wtórnie karcenogenna [7, 8]. Istotnym ograniczeniem skuteczności chemioterapii jest także wielolekowa oporność (MDR — *multidrug resistance*) komórek nowotworowych na cytostatyki [9]. Wykazano, że zasadniczą rolę w indukowaniu zjawiska MDR odgrywa glikoproteina P (P-gp — *P-glycoprotein*) — błonowe białko transportujące z nadrodziny ABC (*ATP-binding cassette*). Obecnie wiadomo, że P-gp, posiadająca aktywność ATP-azową, obniża wewnątrzkomórkowe gromadzenie leków cytostatycznych, będących substratami dla tego białka-transportera w komórkach nieprawidłowych — nowotworowych i/lub uszkodzonych genotoksycznie [1, 9–11].

W celu przeciwdziałania rozwojowi nowotworów, zmniejszenia skutków niepożądanych związanych z podawaniem cytostatyków i poprawy ostatecznych efektów chemioterapii stworzono strategię postępowania chemoprewencyjnego [12]. Aktualnie chemoprewencja nowo-

tworów stała się elementem modelu terapii polecanego w onkologii, złożonego z wielu podstawowych zasad współczesnego leczenia nowotworów, zwanego całkowitą opieką (*total care*) [4].

Według kluczowych założeń sformułowanych przez Michaela Sporną w 1976 r., w chemoprewencji nowotworów, tzw. chemoprewencji wczesnej (pierwotnej), powinny znaleźć zastosowanie naturalne lub syntetyczne substancje chemiczne zapobiegające, spowalniające, a nawet odwracające progresję zmian nowotworowych w każdym stadium ich zaawansowania [13, 14]. Późniejsze modyfikacje definicji rozszerzyły pojęcie chemoprewencji o koncepcję chemoprewencji późnej (wtórnej), która ma polegać na zwiększeniu wrażliwości komórek nowotworowych i/lub uszkodzonych genotoksycznie na cytostatyki [14]. Naturalne lub syntetyczne związki chemiczne o potencjalnym wykorzystaniu w chemoprewencji późnej charakteryzują się zdolnością do nasilania odpowiedzi komórek nieprawidłowych na leki cytostatyczne, i nazwano je związkami chemouwrażliwiającymi (chemosensytyzującymi) [15]. Zasugerowano, że optymalne leki chemoprewencyjne/przeciwnowotworowe, stosowane razem z cytostatykami w terapii adiuwantowej nowotworów, powinny być inhibitorami funkcji transportowej P-gp, selektywnie wzbudzać apoptozę oraz zwiększać endogenną pulę proapoptotycznego ceramidu (cer) w komórkach nowotworowych i/lub uszkodzonych genotoksycznie [16–18].

Z danych z piśmiennictwa wynika, że kryteria dobrych preparatów chemoprewencyjnych spełniają pochodne fenotiazyny, dotąd stosowane w farmakologii jako leki neuroleptyczne; w tej grupie są piperazynowe, typowe fenotiazyny — flufenazylna (FPh) i jej nowo syntezowane analogi, związki 1b i 3f [19–21]. Wyniki wcześniejszych badań



Rycina 1. Podstawowe szlaki tworzenia endogennego ceramidu. SMase — sfigomielinaza; CerS — syntetaza ceramidowa; SPT — transferaza seryna — palmitoilo-CoA

własnych w hodowlach limfocytów ludzkich uszkodzonych genotoksycznie przez wzorcowy premutagen — benzo[*a*]piren (B[*a*]P) — pokazały, że FPh i jej analogi: 1b i 3f są inhibitorami funkcji transportowej P-gp, a ich efekty: proapoptotyczny i chemouwrażliwiający w większym stopniu zależą od aktywacji lizosomalnej sfigomielinazy kwaśnej (aSMase), niezależnej od Zn^{2+} , niż błonowej sfigomielinazy obojętnej (nSMase), zależnej od Mg^{2+} — głównych enzymów uczestniczących w powstawaniu wewnątrzkomórkowego cer [22–25].

Stwierdzono, że większość proapoptotycznego ceramidu (cer) jest generowana w komórce w następstwie hydrolizy sfigomielininy przez nSMase, zależną od Mg^{+2} , i aSMase, niezależną od Zn^{+2} . Innym ważnym szlakiem tworzenia endogennego cer uznano także syntezę *de novo* z udziałem transferazy seryna — palmitoilo-CoA (SPT) i syntetazy ceramidowej (CerS) [25–27].

Główne szlaki powstawania cer w komórce pokazano na rycinie 1.

Cel pracy

Celem pracy była ocena aktywności chemoprewencyjnej — proapoptotycznej i chemouwrażliwiającej — FPh i jej analogów: związków 1b i 3f po nieodwracalnym zablokowaniu CerS.

Materiał i metody

Odczynniki chemiczne

SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA): Apo AF/PI Apoptosis Detection Kit, Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric, fumonizyna B₁ (FB₁), rodamina 123 (Rod-123); GIBCO (Gaithersburg, MD, USA): Fitohemaglutynina typu M (PHA-M), Płyn Eagle’a (MEM), Surowica cielęca płodowa (FCS); Bio-Red Medical Diagnostics (Dreieich, Germany): Lymphoflot; SERVA (Heidelberg, Niemcy): Błękit trypanu; PAM „AQUA-MEDICA” (Łódź, Polska): Odczynnik Türka; Fluka (Buchs, Szwajcaria):

Benzo[*a*]piren (B[*a*]P); IliTD (Wrocław, Polska); PBS zbuforowany roztwór soli fizjologicznej; Polfa (Jelenia Góra, Polska): Dichlorowodorek flufenazyny (FPh).

Budowę chemiczną FPh i jej analogów 1b i 3f, jak również ich podstawowe parametry fizykochemiczne — masę cząsteczkową (M. cz.) i współczynnik podziału olej: woda (współczynnik lipofilności, LogP) zawarto w tabeli 1.

Informacje o syntezie chemicznej analogów FPh można uzyskać na życzenie (wieslaw.malinka@umed.wroc.pl).

Preparatyka limfocytów z krwi żyłnej

Krew żylną (20 ml) pobierano od zdrowych, niepalących ochotników płci męskiej w wieku 20–26 lat na antykoagulant — 10% r-r EDTA. Limfocyty izolowano techniką wirowania w gradiencie gęstości — Lymphoflot (Bio-Red Medical Diagnostics; Dreieich, Germany) przez 20 min [28]. Uzyskane limfocyty, po oddzieleniu osocza, erytrocytów i innych komórek jednojądrzastych, płukano czterokrotnie w MEM, a następnie zawieszano w kompletnym środowisku hodowlanym — MEM_{komp.} o składzie: MEM, 10% FCS, gentamycyna (25 µg/ml) i PHA-M (2% v/v). Liczebność wyizolowanych komórek modelowych oceniano na siatce hematologicznej Bürkera za pomocą odczynnika Türka, użytego w stosunku 1:10. Natomiast żywotność limfocytów określano po ich wybarwieniu 0,4% roztworem błękitu trypanu w PBS w stosunku 1:1. Na wykonanie badań własnych otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (Nr KB–461/2008).

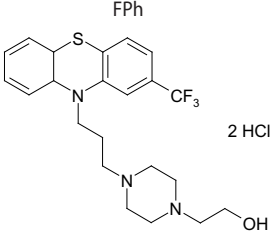
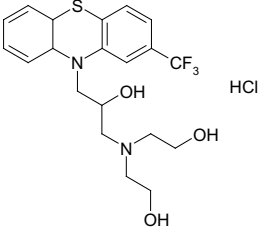
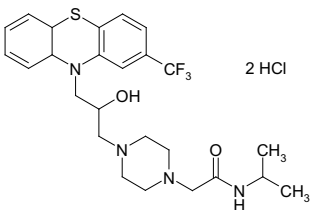
Hodowle limfocytów

Wyizolowane limfocyty, umieszczone w MEM_{komp.} i podzielone na próby, inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂ o 100% wilgotności przez 2 dni (48 godz.) z B[*a*]P (+B[*a*]P; 7,5 µM). Pod koniec hodowli do komórek modelowych dodawano selektywny, nieodwracalny inhibitor CerS — FB1 (+FB1; 20 µM, 1,5 godz. 37°C), a następnie, po wymianie supernatantu, wodne roztwory badanych związków (10 µM, 2 godz., 37°C). Stężenia i czasy inkubacji limfocytów ze związkami chemicznymi użytymi w obserwacjach *in vitro* ustalono eksperymentalnie. W wykonanych badaniach kontrole stanowiły hodowle limfocytów uszkodzone przez B[*a*]P, prowadzone w obecności FB1 (+B[*a*]P; +FB1) lub bez FB1 (+B[*a*]P; -FB1) i zawsze bez testowanych Pht. Wszystkie doświadczenia *in vitro* powtórzono pięciokrotnie (n = 5).

Test identyfikacji apoptozy — mikroskopia fluorescencyjna

Do oceny wizualnej limfocytów z cechami apoptozy w badanych hodowlach komórkowych zastosowano technikę z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego i zestawu Apo AF/PI Apoptosis Detection Kit (SIGMA-ALDRICH; St. Louis, MO, USA), szczegółowo opisaną w piśmiennictwie [19]. Po analizie przygotowanych preparatów naszkiefko-

Tabela I. Charakterystyka chemiczna FPh i jej analogów

Badane związki	M. cz.	LogP
<p>FPh</p>  <p>2 HCl</p>	510,4	3,42
<p>Analog 1b</p>  <p>HCl</p>	368,93	2,78
<p>Analog 3f</p>  <p>2 HCl</p>	581,56	3,63

wych (komórki żywe — bezbarwne; komórki w apoptozie — zielone lub zielone z pomarańczową obwódką; komórki martwe — pomarańczowe) i oszacowaniu odsetka komórek apoptotycznych w poszczególnych próbach obliczono współczynniki apoptozy (W_{apo}) wg wzoru:

$$W_{apo} = \frac{\% \text{ komórek w apoptozie w hodowlach } +B[\alpha]P; +FB_1 \text{ z badanymi związkami} / \% \text{ komórek w apoptozie w kontroli } +B[\alpha]P; +FB_1}{\% \text{ komórek w apoptozie w hodowlach } +B[\alpha]P; -FB_1 \text{ z badanymi związkami} / \% \text{ komórek w apoptozie w kontroli } +B[\alpha]P; -FB_1}$$

Test oceny aktywności kaspazy-3 — metoda kolorymetryczna

Aktywność wykonawczej kaspazy-3 (Casp-3) zmierzono techniką kolorymetryczną z użyciem zestawu Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric (SIGMA-ALDRICH; St. Louis, MO, USA), za pomocą aparatu Victor² [19]. Casp-3 hydrolitycznie rozkłada syntetyczny substrat — Ac-DEVD-pNa (acetylo-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina), prowadząc do uwolnienia żółto zabarwionej p-nitroaniliny (p-NA), cechującej się wysoką absorpcją przy długości fali $\lambda = 405$ nm. Ustalono eksperymentalnie, że ilość uwolnionej p-NA jest

wprost proporcjonalna do aktywności Casp-3 w badanych hodowlach.

Wyniki otrzymano w umownych jednostkach absorpcji (AAU; *absorbance arbitrary unit*) enzymatycznie uwolnionej p-NA, na podstawie których obliczono współczynniki absorpcji (W_{AAU}) wg wzoru:

$$W_{AAU} = \frac{\text{absorbancja p-NA w hodowlach } +B[\alpha]P; +FB_1 \text{ z badanymi związkami [AAU]} / \text{absorbancja p-NA w kontroli } +B[\alpha]P; +FB_1 \text{ [AAU]}}{\text{absorbancja p-NA w hodowlach } +B[\alpha]P; -FB_1 \text{ z badanymi związkami [AAU]} / \text{absorbancja p-NA w kontroli } +B[\alpha]P; -FB_1 \text{ [AAU]}}$$

Test akumulacji Rod-123 — metoda spektrofluorymetryczna

Pomiary spektrofluorymetryczne przeprowadzono za pomocą aparatu Victor², mierząc gromadzenie Rod-123 (5 μ M, 1 godz., 37°C) w badanych hodowlach limfocytów. Rod-123 jest nietoksycznym dla komórek fluorochromem o $\lambda_{wzbudzenia} = 485$ nm i $\lambda_{emisji} = 530$ nm. Stwierdzono, że w testach *in vitro* wykorzystywanych do oceny aktywności P-gp, Rod-123 może zastąpić wszystkie substraty tego białka transportującego [19].

Wyniki otrzymano w umownych jednostkach fluorescencji (FAU — *fluorescence arbitrary unit*) wewnątrzko-

mórkowo zgromadzonej Rod-123, na podstawie których obliczono współczynniki fluorescencji (W_{FAU}) wg wzoru:

$$W_{FAU} = \frac{\text{fluorescencja Rod-123 w hodowlach +B[a]P; +FB}_1 \text{ z badanymi związkami [FAU]/fluorescencja Rod-123 w kontroli +B[a]P; +FB}_1 \text{ [FAU]}}{\text{fluorescencja Rod-123 w hodowlach +B[a]P; -FB}_1 \text{ z badanymi związkami [FAU]/fluorescencja Rod-123 w kontroli +B[a]P; -FB}_1 \text{ [FAU]}}$$

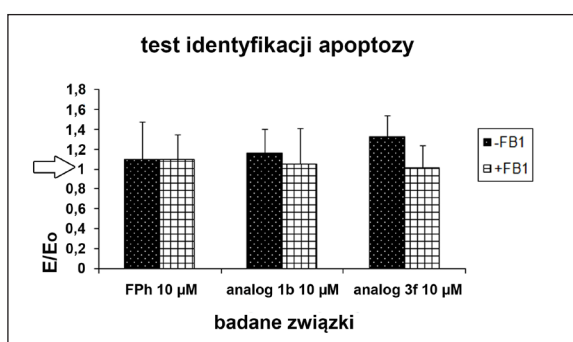
Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programów komputerowych: StatSoft, Inc.(2012 r.) Statistica v. 10.1 oraz Microsoft® Excel 2003. Do oceny danych uzyskanych w przeprowadzonych testach *in vitro* zastosowano podstawowe statystyki opisowe: średnią arytmetyczną z uwzględnieniem odchylenia standardowego ($\bar{x} \pm s.d.$), medianę (*Med.*), rozstęp (R = wartość maksymalna — wartość minimalna) i współczynnik zmienności ($Y = s.d./\bar{x}$). Istotność statystyczną różnic między średnimi arytmetycznymi oceniono testem t-Studenta. Za istotne statystycznie przyjęto $p < 0,05$. Wyniki analizy statystycznej zaprezentowano w tabelach oraz w treści opracowania.

Wyniki i ich omówienie

Chemoprewencyjny: proapoptotyczny i chemouwrażliwiający efekt FPh oraz jej analogów — 1b i 3f — oceniono w hodowlach limfocytów ludzkich w układzie modelowym, rekomendowanym w piśmiennictwie do badań aktywności chemoprewencyjnej [19]. Limfocyty inkubowano ze standardowym premutagenem — B[a]P (7,5 μ M, 48 godz., 37°C), w celu ich upodobnienia do komórek nowotworowych (wywołania uszkodzeń genotoksycznych) oraz zwiększenia ekspresji P-gp [19]. Do oceny działania chemoprewencyjnego badanych związków użyto trzy testy biologiczne *in vitro*: 1° test identyfikacji apoptozy w mikroskopie fluorescencyjnym, 2° test oceny aktywności Casp-3 metodą kolorymetryczną i 3° test oceny akumulacji Rod-123 metodą spektrofлуorymetryczną [19].

W obserwacjach własnych zastosowano mykotoksynę — FB₁. Wykazano, że FB₁ jest selektywnym, nieodwracalnym inhibitorem CerS i w zależności od stężenia zmniejsza wewnątrzkomórkową pulę cer [29, 30]. Do badań *in vitro* w hodowlach limfocytów (+B[a]P) wybrano FB₁ w stężeniu 20 μ M i, często polecany w piśmiennictwie, czas inkubacji komórek z inhibitorem — 1,5 godz. [dane niepokazane]. Natomiast FPh oraz analogi 1b i 3f zastosowano w stężeniu 10 μ M (2 godz., 37°C), maksymalnym, które nie wpływało cytotoksycznie w przygotowanym układzie doświadczalnym i dawało powtarzalne rezultaty w kolejnych eksperymentach [19].



Rycina 2. Wpływ FPh oraz analogów 1b i 3f w stężeniu 10 μ M (2 godz., 37°C) na odsetek komórek apoptotycznych w hodowlach limfocytów uszkodzonych genotoksycznie (+B[a]P; 7,5 μ M, 48 godz., 37°C), niepreinkubowanych z FB₁ (-FB₁) i preinkubowanych z FB₁ (+FB₁; 20 μ M, 1,5 godz., 37°C). Odsetek komórek apoptotycznych w każdej badanej próbie (E) porównano z odsetkiem komórek apoptotycznych w odpowiednich hodowlach kontrolnych (E₀) i wyrażono jako E/E₀; n = 5. Na rycinie poziom kontroli wskazano strzałką. Test identyfikacji apoptozy — metoda fluorescencyjna

Ocena mikroskopowa częstotliwości apoptozy w hodowlach limfocytów uszkodzonych genotoksycznie po zablokowaniu CerS

Test identyfikacji apoptozy w mikroskopie fluorescencyjnym polega na wizualnej ocenie morfologii komórek po ich wybarwieniu mieszaniną fluorochromów — aneksyną V-FITC i jodkiem propydydy. Na preparatach naszkiełkowych, przygotowanych z poszczególnych prób, zliczano limfocyty z cechami apoptozy (zabarwione na zielono lub zielono-pomarańczowo). Odsetek limfocytów apoptotycznych w hodowlach prowadzonych bez FB₁ (-FB₁) lub z FB₁ (+FB₁) oraz inkubowanych z badanymi związkami (E) odniesiono do odsetka limfocytów apoptotycznych w odpowiednich kontrolach (E₀) i przedstawiono jako E/E₀ w histogramach na rycinie 2.

Podstawowe statystyki opisowe wyników otrzymanych w teście identyfikacji apoptozy metodą fluorescencyjną zamieszczono w tabeli IIA.

Istotność statystyczną danych otrzymanych w teście identyfikacji apoptozy metodą fluorescencyjną wyliczono w teście-t, a wyniki analizy statystycznej zamieszczono w tabeli IIB.

Jak widać na rycinie 2 i w tabeli IIA, w hodowlach limfocytów uszkodzonych genotoksycznie (+B[a]P) niepreinkubowanych z FB₁ (-FB₁) wykazano, że zarówno macierzysta FPh, jak i analogi 1b i 3f prowadziły do wzrostu odsetka komórek z cechami apoptozy w porównaniu z kontrolą (+B[a]P; -FB₁). Natomiast po dodaniu do medium hodowlanego FB₁ (+FB₁) odsetek komórek z cechami apoptozy w obecności badanych analogów okazał się niższy, a w przypadku FPh — podobny jak w hodowlach bez FB₁ (+B[a]P; -FB₁). Obniżenie częstotliwości apoptozy pod wpływem analogów 1b

Tabela IIA. Odsetek komórek modelowych z cechami apoptozy w badanych hodowlach

	Test identyfikacji apoptozy							
	-FB ₁				+FB ₁			
	$\bar{x} \pm s.d. n = 5$ [%]	Med.	R	Y	$\bar{x} \pm s.d. n = 5$ [%]	Med.	R	Y
FPh 10 μ M	47,64 \pm 9,49	47,64	21,2	0,199	50,02 \pm 8,44	53	19,9	0,169
Analog 1b 10 μ M	51,43 \pm 4,14	51,43	9,2	0,081	42,26 \pm 7,33	43,1	17	0,173
Analog 3f 10 μ M	59,3 \pm 7,61	57,9	18	0,128	42,74 \pm 9,65	39	25	0,226
Kontrola +B[a]P	45,58 \pm 10,74	45,58	20,7	0,236	43,48 \pm 13,13	40,9	33	0,302

\bar{x} s.d. — średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe; Med. — mediana; R — rozstęp; Y — współczynnik zmienności

Tabela IIB. Test-t w ocenie istotności statystycznej wyników otrzymanych w teście identyfikacji apoptozy

1. Ocena istotności różnic odsetka komórek modelowych z cechami apoptozy w hodowlach z badanymi związkami, niepreinkubowanych z FB₁ (-FB₁) lub preinkubowanych z FB₁ (+FB₁) i w odpowiednich kontrolach

Test-t (p)	-FB ₁				+FB ₁			
	Kontrola +B[a]P	FPh 10 μ M	Analog 1b 10 μ M	Analog 3f 10 μ M	Kontrola +B[a]P	FPh 10 μ M	Analog 1b 10 μ M	Analog 3f 10 μ M
	-	0,77; NS*	0,2; NS*	0,009	-	0,262; NS	0,893; NS	0,865; NS

2. Ocena istotności różnic odsetka komórek modelowych z cechami apoptozy w hodowlach bez FB₁ (-FB₁) lub z FB₁ (+FB₁) i z poszczególnymi badanymi związkami

	Test-t (p)		
	FPh 10 μ M	Analog 1b 10 μ M	Analog 3f 10 μ M
-FB ₁			
+FB ₁	0,677; NS	0,044	0,045

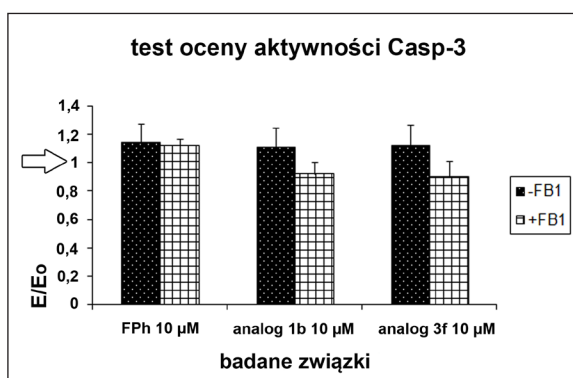
*NS — nieistotne statystycznie

i 3f w hodowlach limfocytów (+B[a]P) preinkubowanych z inhibitorem CerS (+FB₁) w odniesieniu do hodowli limfocytów (+B[a]P) niepreinkubowanych z inhibitorem CerS (-FB₁) było istotne statystycznie ($p < 0,05$), co może sugerować udział szlaku syntezy cer *de novo* z aktywacją CerS w działaniu proapoptycznym badanych analogów (tab. IIB).

Ocena kolorymetryczna aktywności Casp-3 w hodowlach limfocytów uszkodzonych genotoksycznie po zablokowaniu CerS

Udowodniono, że Casp-3 jest główną kaspazą wykonawczą większości szlaków apoptozy, również apoptozy indukowanej cer, a wzrost jej aktywności uznano za znaczny postępu śmiertelności apoptotycznej [31–33]. Dlatego w badaniach własnych zmierzono aktywność Casp-3, równoległe do mikroskopowej oceny częstości apoptozy w hodowlach limfocytów (+B[a]P).

Aktywność wykonawczej Casp-3/absorbancję uwolnionej p-NA [AAU] w hodowlach limfocytów prowadzonych bez FB₁ (-FB₁) lub z FB₁ (+FB₁) oraz inkubowanych z badanymi związkami (E) odniesiono do aktywności wykonawczej Casp-3/absorbancji uwolnionej p-NA [AAU] w odpowiednich kontrolach (E₀) i przedstawiono jako E/E₀ w histogramach na rycinie 3.



Rycina 3. Wpływ FPh oraz analogów 1b i 3f w stężeniu 10 μ M (2 godz., 37°C) na aktywność wykonawczej Casp-3 w hodowlach limfocytów uszkodzonych genotoksycznie (+B[a]P; 7,5 μ M, 48 godz., 37°C), niepreinkubowanych z FB₁ (-FB₁) i preinkubowanych z FB₁ (+FB₁; 20 μ M, 1,5 godz., 37°C). Aktywność Casp-3/absorbancję uwolnionej p-Na [AAU] w każdej badanej próbce (E) porównano z aktywnością Casp-3/absorbancją uwolnionej p-Na [AAU] w odpowiednich hodowlach kontrolnych (E₀) i wyrażono jako E/E₀; n = 5. Na rycinie poziom kontroli wskazano strzałką. Test oceny aktywności Casp-3 — metoda kolorymetryczna

Podstawowe statystyki opisowe wyników otrzymanych w teście oceny aktywności Casp-3 metodą kolorymetryczną zamieszczono w tabeli IIIA.

Tabela IIIA. Aktywność Casp-3/absorbancja p-NA w badanych hodowlach

	Test oceny aktywności Casp-3							
	-FB ₁				+FB ₁			
	$\bar{x} \pm s.d. n = 5$ [AAU]	Med.	R	Y	$\bar{x} \pm s.d. n = 5$ [AAU]	Med.	R	Y
FPh 10 μ M	0,059 \pm 0,002	0,059	0,006	0,0404	0,069 \pm 0,011	0,069	0,028	0,163
Analog 1b 10 μ M	0,057 \pm 0,003	0,057	0,008	0,0541	0,057 \pm 0,01	0,056	0,026	0,18
Analog 3f 10 μ M	0,058 \pm 0,005	0,058	0,012	0,0814	0,056 \pm 0,014	0,05	0,034	0,2563
Kontrola +B[a]P	0,052 \pm 0,006	0,05	0,014	0,1121	0,062 \pm 0,009	0,059	0,022	0,1441

AAU — umowne jednostki absorbancji p-NA; $\bar{x} \pm s.d.$ — średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe; Med. — mediana; R — rozstęp; Y — współczynnik zmienności

Tabela IIIB. Test-t w ocenie istotności statystycznej wyników otrzymanych w teście oceny aktywności Casp-3

1. Ocena istotności różnic absorbancji p-NA w hodowlach z badanymi związkami, niepreinkubowanych z FB₁ (-FB₁) lub preinkubowanych z FB₁ (+FB₁) i w odpowiednich kontrolach

Test-t (p)	-FB ₁				+FB ₁			
	Kontrola +B[a]P	FPh 10 μ M	Analog 1b 10 μ M	Analog 3f 10 μ M	Kontrola +B[a]P	FPh 10 μ M	Analog 1b 10 μ M	Analog 3f 10 μ M
	–	0,087; NS*	0,184; NS*	0,17; NS*	–	0,008	0,095; NS	0,152; NS

2. Ocena istotności różnic absorbancji p-NA w hodowlach bez FB₁ (-FB₁) lub z FB₁ (+FB₁) i z poszczególnymi badanymi związkami

	Test-t (p)		
	FPh 10 μ M	Analog 1b 10 μ M	Analog 3f 10 μ M
-FB ₁ +FB ₁	0,141; NS	0,968; NS	0,828; NS

*NS — nieistotne statystycznie

Istotność statystyczną danych otrzymanych w teście oceny aktywności Casp-3 metodą kolorymetryczną wyliczono w teście-t, a wyniki analizy statystycznej zamieszczono w tabeli IIIB.

Jak widać na rycinie 3 oraz z tabeli IIIA i z tabeli IIIB, po nieodwracalnym zablokowaniu CerS inkubacja hodowli limfocytów (+B[a]P; +FB₁) z analogami 1b i 3f prowadziła do nieistotnego statystycznie ($p > 0,05$) spadku aktywności Casp-3 w porównaniu z kontrolą (+B[a]P; +FB₁); była także nieistotnie ($p > 0,05$) niższa niż w hodowlach (+B[a]P; -FB₁). Otrzymane wyniki wskazują zatem, że efekt proapoptotyczny analogów 1b i 3f, uwarunkowany aktywacją szlaku syntezy cer *de novo* i pobudzeniem CerS, prawdopodobnie nie zależy od stymulacji Casp-3. Natomiast w hodowlach limfocytów (+B[a]P), po nieodwracalnym zablokowaniu CerS, w obecności FPh stwierdzono znamienne ($p < 0,05$) wzrost aktywności Casp-3 w stosunku do kontroli (+B[a]P; +FB₁). Rezultaty te potwierdzają dane uzyskane w teście identyfikacji apoptozy w mikroskopie fluorescencyjnym o niezależności efektu proapoptotycznego FPh od szlaku syntezy cer *de novo* z udziałem CerS.

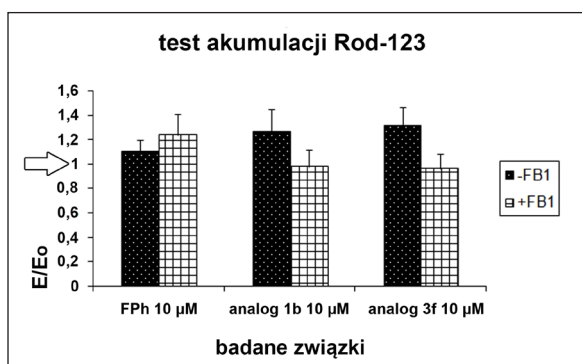
Ocena spektrofluorymetryczna akumulacji Rod-123 w hodowlach limfocytów uszkodzonych genotoksycznie po zablokowaniu CerS

Spektrofluorymetryczny test akumulacji Rod-123 służy do oceny czynności P-gp i zarazem właściwości chemouwalniających związków o charakterze inhibitorów tego białka transportującego [19]. Akumulację Rod-123 [FAU] w hodowlach limfocytów prowadzonych bez FB₁ (-FB₁) lub z FB₁ (+FB₁) oraz inkubowanych z badanymi związkami (E) odniesiono do akumulacji Rod-123 [FAU] w odpowiednich kontrolach (E₀) i przedstawiono jako E/E₀ w histogramach na rycinie 4.

Podstawowe statystyki opisowe wyników otrzymanych w teście akumulacji Rod-123 metodą spektrofluorymetryczną zamieszczono w tabeli IVA.

Istotność statystyczną danych otrzymanych w teście akumulacji Rod-123 metodą spektrofluorymetryczną wyliczono w teście-t, a wyniki analizy statystycznej zamieszczono w tabeli IVB.

Jak widać na rycinie 4 oraz z tabeli IVA i z tabeli IVB, inkubacja limfocytów (+B[a]P) z FB₁, w przypadku analogów 1b i 3f, prowadziła do istotnego statystycznie ($p < 0,05$)



Rycina 4. Wpływ FPh oraz analogów 1b i 3f w stężeniu 10 μM (2 godz., 37°C) na intensywność akumulacji Rod-123 w hodowlach limfocytów uszkodzonych genotoksycznie (+B[a]P; 7,5 μM, 48 godz., 37°C), niepreinkubowanych z FB₁ (-FB₁) i preinkubowanych z FB₁ (+FB₁; 20 μM, 1,5 godz., 37°C). Intensywność akumulacji Rod-123 [FAU] w każdej badanej próbie (E) porównano z intensywnością akumulacji Rod-123 [FAU] w odpowiednich hodowlach kontrolnych (E₀) i wyrażono jako E/E₀; n = 5. Na rycinie poziom kontroli wskazano strzałką. Test oceny akumulacji Rod-123 — metoda spektrofлуorymetryczna

spadku gromadzenia Rod-123 w porównaniu z hodowlami prowadzonymi bez FB₁ i zarazem gromadzenia Rod-123 na poziomie kontroli (+B[a]P; +FB₁). Otrzymane rezultaty pokazują, że obecność FB₁ w hodowlach (+B[a]P) z analogami 1b i 3f znacząco zmniejsza akumulację Rod-123. Sugeruje to, że

zdolność badanych analogów do blokowania funkcji transportowej P-gp może być uwarunkowana stymulacją CerS.

Natomiast dla macierzystej FPh w hodowlach (+B[a]P) — po zablokowaniu CerS — stwierdzono znamienne (p < 0,05) wzrost gromadzenia Rod-123 w porównaniu z kontrolą (+B[a]P; +FB₁) i zarazem nieistotny statystycznie (p > 0,05) wzrost gromadzenia Rod-123 w odniesieniu do wyników otrzymanych w hodowlach komórkowych (+B[a]P) bez FB₁ (-FB₁) (tab. IVB). Uzyskane dane wskazują, że zablokowanie CerS nasila aktywność FPh jako inhibitora P-gp. Niewykluczone zatem jest, że dezaktywacja szlaku *de novo* tworzenia cer w komórce pośrednio zwiększa efekt chemouwrażliwiający FPh z udziałem innych ścieżek powstawania i/lub metabolizmu cer lub na szlakach niezależnych od cer.

Porównanie aktywności chemoprewencyjnej badanych związków

W celu porównania działania chemoprewencyjnego — proapoptotycznego i chemouwrażliwiającego — FPh oraz jej analogów, 1b i 3f, jak również zestawienia danych dotyczących wpływu aktywnej CerS na ich efekt biologiczny, dla każdego badanego związku obliczono współczynniki: W_{apo} , W_{AAU} i W_{FAU} . Współczynniki W_{apo} , W_{AAU} i W_{FAU} dla FPh oraz analogów 1b i 3f zamieszczono w tabeli V.

Tabela IVA. Akumulacja Rod-123 w badanych hodowlach

	Test oceny intensywności akumulacji Rod-123							
	-FB ₁				+FB ₁			
	$\bar{\chi} \pm s.d. n = 5$ [FAU]	Med.	R	Y	$\bar{\chi} \pm s.d. n = 5$ [FAU]	Med.	R	Y
FPh 10 μM	85 ± 6,26	86	16	0,074	92 ± 12,10	94	29	0,132
Analog 1b 10 μM	98 ± 13,58	96	29	0,139	73 ± 4,98	69	10	0,068
Analog 3f 10 μM	101 ± 6,83	98	15	0,068	71 ± 7,77	69	21	0,109
Kontrola +B[a]P	77 ± 4,66	77	13	0,061	75 ± 7,73	76	19	0,103

FAU — umowne jednostki fluorescencji Rod-123; $\bar{\chi} \pm s.d.$ — średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe; Med. — mediana; R — rozstęp; Y — współczynnik zmienności

Tabela IVB. Test-t w ocenie istotności statystycznej wyników otrzymanych w teście akumulacji Rod-123

1. Ocena istotności różnic akumulacji Rod-123 w hodowlach z badanymi związkami, niepreinkubowanych z FB₁ (-FB₁) lub preinkubowanych z FB₁ (+FB₁) i w odpowiednich kontrolach

Test-t (p)	-FB ₁				+FB ₁			
	Kontrola +B[a]P	FPh 10 μM	Analog 1b 10 μM	Analog 3f 10 μM	Kontrola +B[a]P	FPh 10 μM	Analog 1b 10 μM	Analog 3f 10 μM
	–	0,081; NS*	0,032	0,006	–	0,028	0,663; NS	0,471; NS

2. Ocena istotności różnic akumulacji Rod-123 w hodowlach bez FB₁ (-FB₁) lub z FB₁ (+FB₁) i z poszczególnymi badanymi związkami

	Test-t (p)		
	FPh 10 μM	Analog 1b 10 μM	Analog 3f 10 μM
-FB ₁			
+FB ₁	0,103; NS	0,029	0,005

*NS — nieistotne statystycznie

Tabela V. Współczynniki W_{apo} , W_{AAU} i W_{FAU} dla badanych związków

	Badane związki		
	FPh 10 μ M	Analog 1b 10 μ M	Analog 3f 10 μ M
W_{apo}	1; NS	0,9041	0,7625
W_{AAU}	0,9737; NS	0,8323; NS	0,8063; NS
W_{FAU}	1,1217; NS	0,7737	0,7299

*NS — nieistotne statystycznie

Z tabeli V widać, że aktywność chemoprewencyjna analogów 1b i 3f wymaga aktywnej CerS. Natomiast dla FPh nie wykazano zależności jej efektu chemoprewencyjnego od obecności CerS. Ponadto tabela V pokazuje, że w przypadku wszystkich badanych związków aktywność wykonawczej Casp-3 w hodowlach limfocytów (+B[a]P) z zablokowaną CerS (+FB₁) była porównywalna do aktywności Casp-3 w hodowlach limfocytów (+B[a]P) bez FB₁ (-FB₁).

Podsumowanie

Na podstawie wyników badań własnych oceniono udział CerS, jednego z głównych enzymów szlaku syntezy cer *de novo*, w efektach proapoptotycznym i chemouwrażliwiającym FPh oraz jej analogów: związków 1b i 3f w hodowlach limfocytów uszkodzonych przez B[a]P. Należy kontynuować badania *in vitro* z wykorzystaniem inhibitorów także innych enzymów uczestniczących w syntezie cer *de novo*, np. myriocyny (inhibitor SPT), aby dokładnie poznać mechanizm działania chemoprewencyjnego/przeciwnowotworowego badanych analogów FPh oraz określić ich wpływ na gospodarkę sfingolipidową komórek uszkodzonych genotoksycznie [34, 35].

Wnioski

1. Efekty: proapoptotyczny i chemouwrażliwiający nowo syntezowanych analogów flufenazyny — związków 1b i 3f są uwarunkowane aktywacją CerS.
2. Działanie proapoptotyczne analogów 1b i 3f zależne od CerS nie wymaga aktywacji wykonawczej Casp-3.
3. Dla macierzystej FPh wykazano, że jej aktywność chemoprewencyjna nie zależy od stymulacji szlaku syntezy *de novo* cer z udziałem CerS.

Konflikt interesu: nie zgłoszono

Dr Agata Jaszczyszyn

Katedra Podstaw Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śl.
ul. Borowska 211, 50–556 Wrocław
e-mail: agata.jaszczyszyn@umed.wroc.pl

Otrzymano: 3 stycznia 2013 r.

Przyjęto do druku: 4 kwietnia 2013 r.

Piśmiennictwo

1. Mo W, Hang JT. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol* 2012; 3: 1–27.

2. Śliwińska-Hill U, Trocha J. Najnowsze terapie przeciwnowotworowe. *Post Farm* 2011; 1: 14–19.
3. Malinowska K, Modranka R, Kędziara J. Leki przeciwnowotworowe stosowane w leczeniu oraz będące w fazie badań klinicznych. *Pol Merk Lek* 2007; 23: 165–169.
4. Łyskawa W. Chemioterapia w leczeniu choroby nowotworowej i jej neurotoksyczność. *Anest Ratow* 2009; 3: 80–87.
5. Singh P, Singh A. Ocular adverse effects of anti-cancer chemotherapy and targeted therapy. *J Canc Ther Res* 2012; 1. (www.hoajonline.com/journals/jctr/content/pdf/5.pdf).
6. Monsuez JJ, Charniot JCh, Vignat N i wsp. Cardiac side-effect of cancer chemotherapy. *Int J Cardiol* 2010; 144: 3–15.
7. Sarosiek T, Zołnieriek J, Langiewicz P i wsp. Chemioterapia wysokodawkowa guzów zarodkowych — koniec czy początek drogi? *Współcz Onkol* 2002; 6: 434–450.
8. Boffetta P, Kaldor JM. Secondary malignancies following cancer chemotherapy. *Acta Oncol* 1994; 33: 591–598.
9. Shen F, Chu S, Bence AK i wsp. Quantitation of doxorubicine uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. *JPET* 2008; 324: 95–102.
10. Huang C, Xu D, Xia Q i wsp. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of human hepatic cancer cells by Astragaloside II. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64: 1741–1750.
11. Huszno J, Nowara E, Suwiński R. Znaczenie polimorfizmów genowych w chemioterapii nowotworów. *Nowotwory J Onkol* 2011; 61: 141–149.
12. Karikas GA. Chemoprevention molecular and biochemical mechanism involved in cancer control and management. *Health Sci J* 2011; 5: 149–156.
13. Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J* 2006; 8: E443–449.
14. Jaszczyszyn A, Gąsiorowski K, Świątek P i wsp. Wpływ nowo syntezowanych analogów flufenazyny na apoptozę i nekrozę w hodowlach limfocytów. *Onkol Pol* 2009; 14: 143–149.
15. Jaszczyszyn A, Gąsiorowski K, Świątek P i wsp. Analog in chemoprevention of late cancer. W: Krzyżanowski D, Krakowiak P, Binnebesel J, Fal AM, Steciwko A, (red.). *Live with dignity to the end. Clinical and social aspects of palliative and hospice care*. T. 3. Opole: Publishing Mouse WCM; 2011, s. 152–165.
16. Wang XW, Wang XK, Zhang X i wsp. FG020326 sensitized multidrug resistance cancer cells to docetaxel-mediated apoptosis via enhancement of caspases activation. *Molecules* 2012; 17: 5442–5458.
17. Patwardhan GA, Liu YY. Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 104–114.
18. Chapman JV, Gouazé-Andersson V, Karimi R i wsp. P-glycoprotein antagonists confer synergistic sensitivity to short-chain ceramide in human multidrug-resistant cancer cells. *Exp Cell Res* 2011; 317: 1736–1745.
19. Jaszczyszyn A, Gąsiorowski K. *Mechanizmy chemoprewencyjnego działania nowo syntezowanych analogów flufenazyny*. Warszawa: Wydawnictwo Medyczne Borgis; 2006.
20. Gąsiorowski K, Jaszczyszyn A. Fenotiazyny w paliatywnej terapii nowotworów. *Onkol Pol* 2008; 11: 171–175.
21. Jaszczyszyn A, Gąsiorowski K, Świątek P i wsp. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacol Rep* 2012; 64: 16–23.
22. Jaszczyszyn A, Gąsiorowski K, Świątek P i wsp. New fluphenazine analogues as inhibitor of P-glycoprotein in human lymphocyte cultures. *Współcz Onkol* 2012; 16: 332–337.
23. Petrus J, Czarnik-Matusiewicz B, Jaszczyszyn A i wsp. Influence of fluphenazine dihydrochloride on model dipalmitoylphosphatidylcholine membranes and human genotoxically damaged lymphocyte cultures. *Curr Issues Pharm Med Sci* 2012; 25: 270–273.
24. Jaszczyszyn A, Gąsiorowski K, Świątek P i wsp. The chemosensitive activity of new fluphenazine analogues in human lymphocyte cultures after acid sphingomyelinase blockade. W: *J Physiol Pharmacol* 2011; 62 (suppl.1): 45. Okrasa S, Kotwica G, Wojciechowicz B, (red.). Book of programme and abstracts. *25th Congress of the Polish Physiological Society; 15-17 Sept. 2011; Olsztyn, Poland*.
25. Jaszczyszyn A, Gąsiorowski K, Świątek P i wsp. Aktywność proapoptotyczna analogów flufenazyny po zablokowaniu sfingomielinaz w hodowlach limfocytów ludzkich. *Onkol Pol* 2011; 14: 54–63.
26. Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. Targeting ceramide metabolism — a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 347–357.
27. Modrak DE, Gold DV, Goldenberg DM. Sphingolipid targets in cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 200–208.
28. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77–89.
29. Zitomer NC, Mitchell T, Voss KA i wsp. Ceramide synthase inhibition by fumonisins B₁ causes accumulation of 1-deoxysphinganine. *J Biol Chem* 2009; 284: 4786–4795.
30. Schroeder JJ, Crane HM, Jianhui X i wsp. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisins B₁. *J Biol Chem* 1994; 269: 3475–3481.
31. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008; 27: 6194–6206.
32. Portt L, Norman G, Clapp C i wsp. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1813: 238–259.
33. Korzeniewska-Dyl I. Kaspazy — struktura i funkcja. *Pol Merkurys Lek* 2007; 23: 403–407.
34. Lee YS, Choi KM, Lee S i wsp. Myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, suppresses tumor growth in a murine melanoma model by inhibiting *de novo* sphingolipid synthesis. *Cancer Biol Ther* 2012; 13: 92–100.
35. Schmitz A. Metabolizmy sfingomielin w przekazywaniu sygnałów komórkowych i w miażdżycy. *Czyn Ryz* 2004; 1–2: 38–51.