

ORTOCTAN BERSALDEGENINY – CYTOTOKSYCZNY STEROIDOWY METABOLIT ROŚLINNY GATUNKÓW Z RODZAJU *KALANCHOE*

Justyna Stefanowicz-Hajduk¹, Magdalena Gucwa¹, Barbara Moniuszko-Szajwaj², Anna Stochmal², Anna Kawiak³, J. Renata Ochocka¹

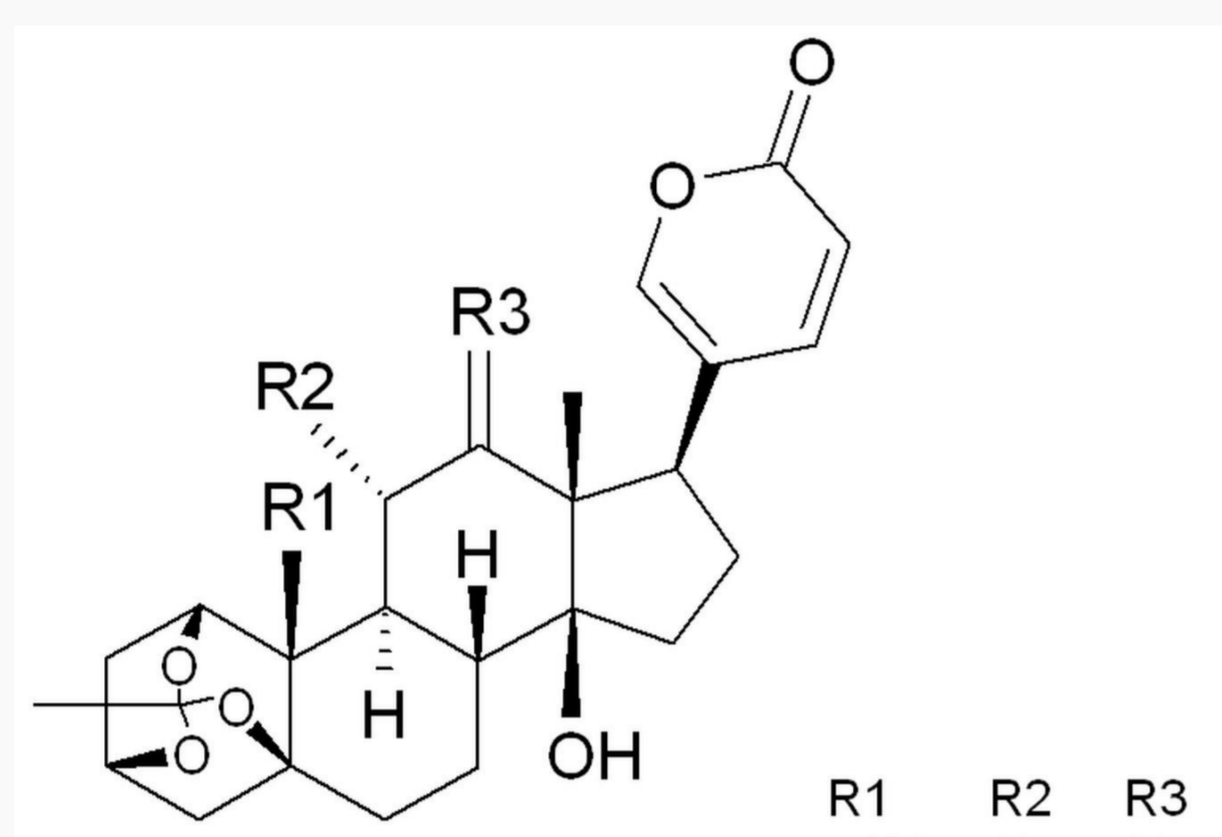
¹Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny, ²Zakład Biochemii i Jakości Plonów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach, ³Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

e-mail: justynastef@gumed.edu.pl

Żyworódka (*Kalanchoe*) należy do rodziny *Crassulaceae* i występuje w obszarach strefy tropikalnej. Obecnie rośliny te stają się coraz bardziej popularne i są hodowane w wielu krajach ze względu na swoje liczne właściwości lecznicze - przeciwzapalne, bakterio- i grzybobójcze, regenerujące, a także **cytotoksyczne**. Aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych wykazują głównie metabolity wtórne żyworódki z grupy **glikozydów bufadienolidowych**. Pochodne bersaldehydogeniny nie zostały jak do tej pory zbadane pod kątem mechanizmów działania *in vitro* w komórkach nowotworowych.



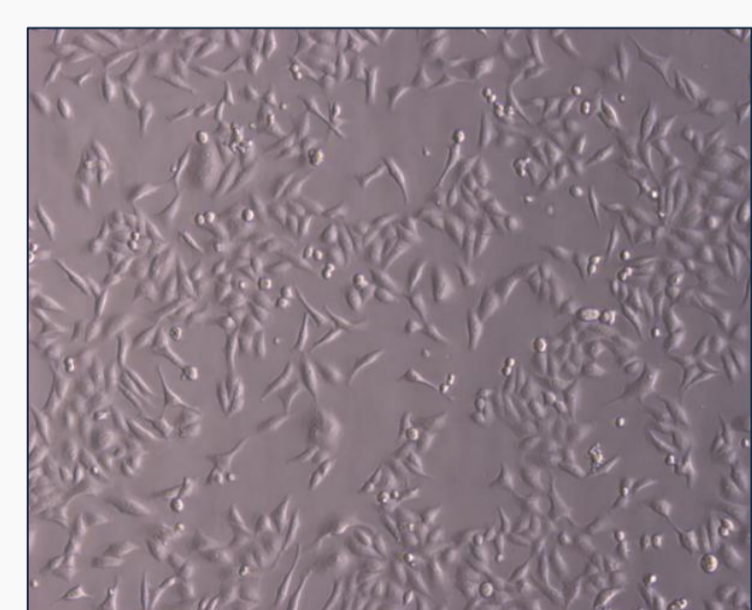
Kalanchoe daigremontiana



1,3,5-orthoocatan bersaldehydogeniny

METODYKA

- Izolacja ortoocatanu bersaldehydogeniny z ekstraktów *K. daigremontiana* i analiza strukturalna związku za pomocą chromatografii HPLC oraz ESI-MS, NMR i spektroskopii IR;
- Określenie aktywności cytotoksycznej związku za pomocą systemu Real-Time xCELLigence na ludzkich liniach komórek nowotworowych: szyjki macicy HeLa, piersi MCF-7, jajnika SKOV-3 oraz czerniaka A375;
- Określenie mechanizmów działania związku w komórkach HeLa.



komórki HeLa

System Real-Time xCELLigence

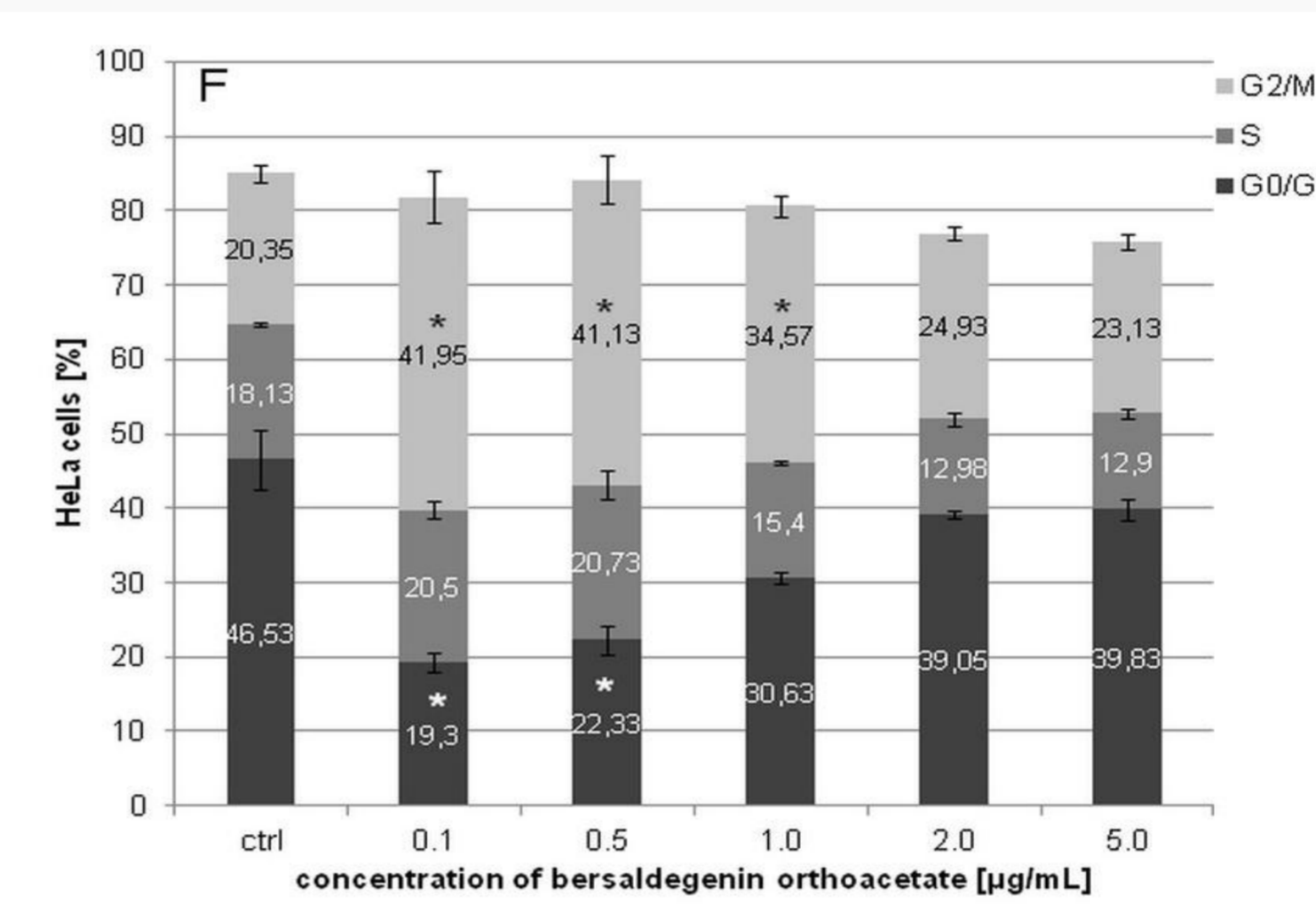
Komórki do badania wysiano w płytkach (E-plates) w ilości 20 000 kom./dołek. Tempo ich proliferacji mierzono przez 24 h. Następnie dodano związek w różnych stężeniach (0,1-20 µg/ml) i po upływie 24 h wyznaczono wartość IC₅₀.

WYNIKI

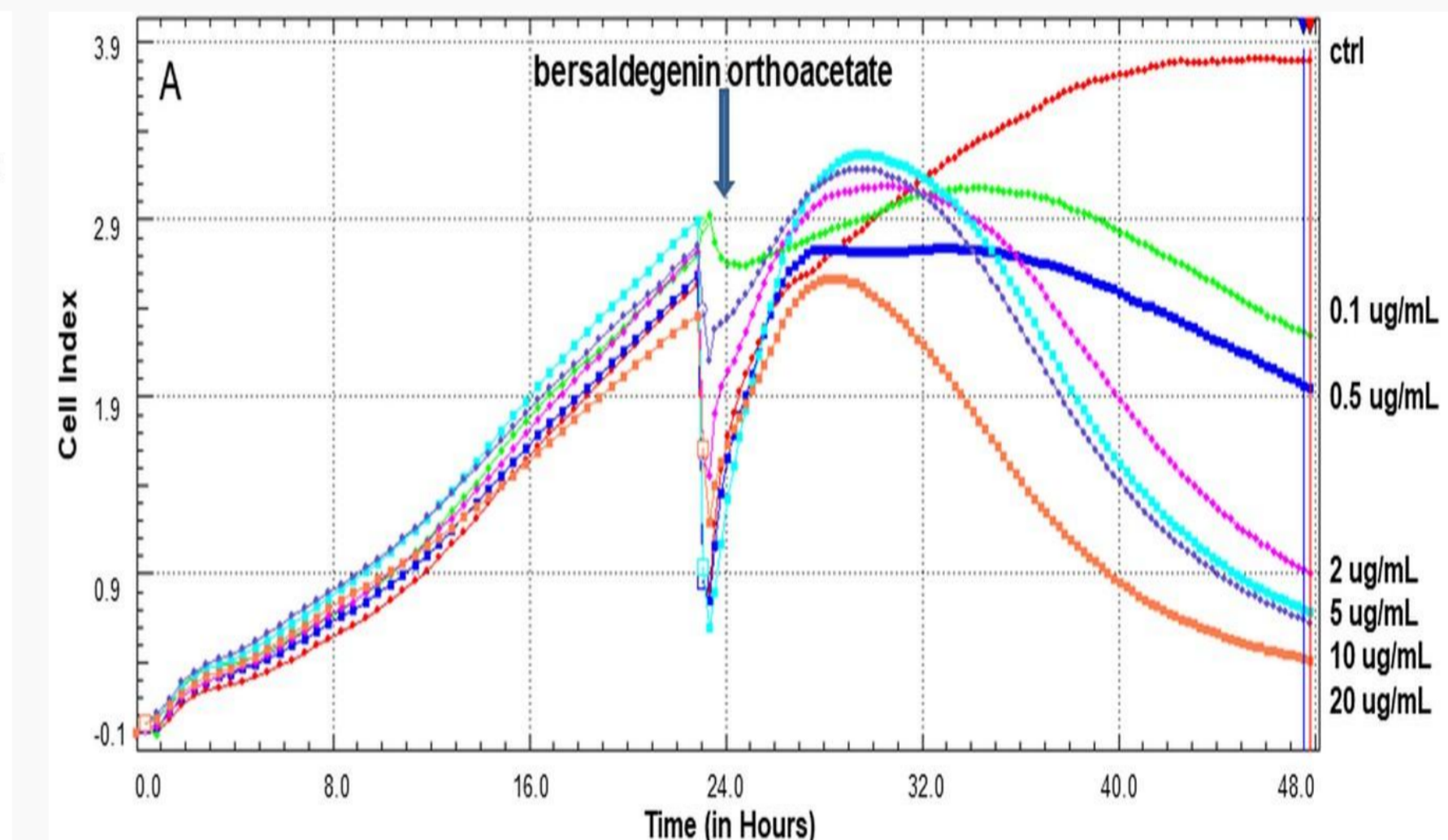
Tabela 1. Wartości IC₅₀ (µg/ml) ortoocatanu bersaldehydogeniny na różnych liniach komórek nowotworowych.

Linia komórkowa	1,3,5-orthoocatan bersaldehydogeniny		Winblastyna	
	RTCA		RTCA	
HeLa	0,50 (0,44-0,56); R ² =0,85		4,55 ⁻⁰³ (4,29-4,81 ⁻⁰³); R ² =0,94	
SKOV-3	0,77 (0,72-0,82); R ² =0,96		7,64 ⁻⁰³ (7,62-7,66 ⁻⁰³); R ² =0,93	
MCF-7	1,38 (1,24-1,52); R ² =0,98		7,49 ⁻⁰³ (7,43-7,55 ⁻⁰³); R ² =0,95	
A-375	0,99 (0,97-1,01); R ² =0,83		7,72 ⁻⁰³ (7,64-7,80 ⁻⁰³); R ² =0,92	

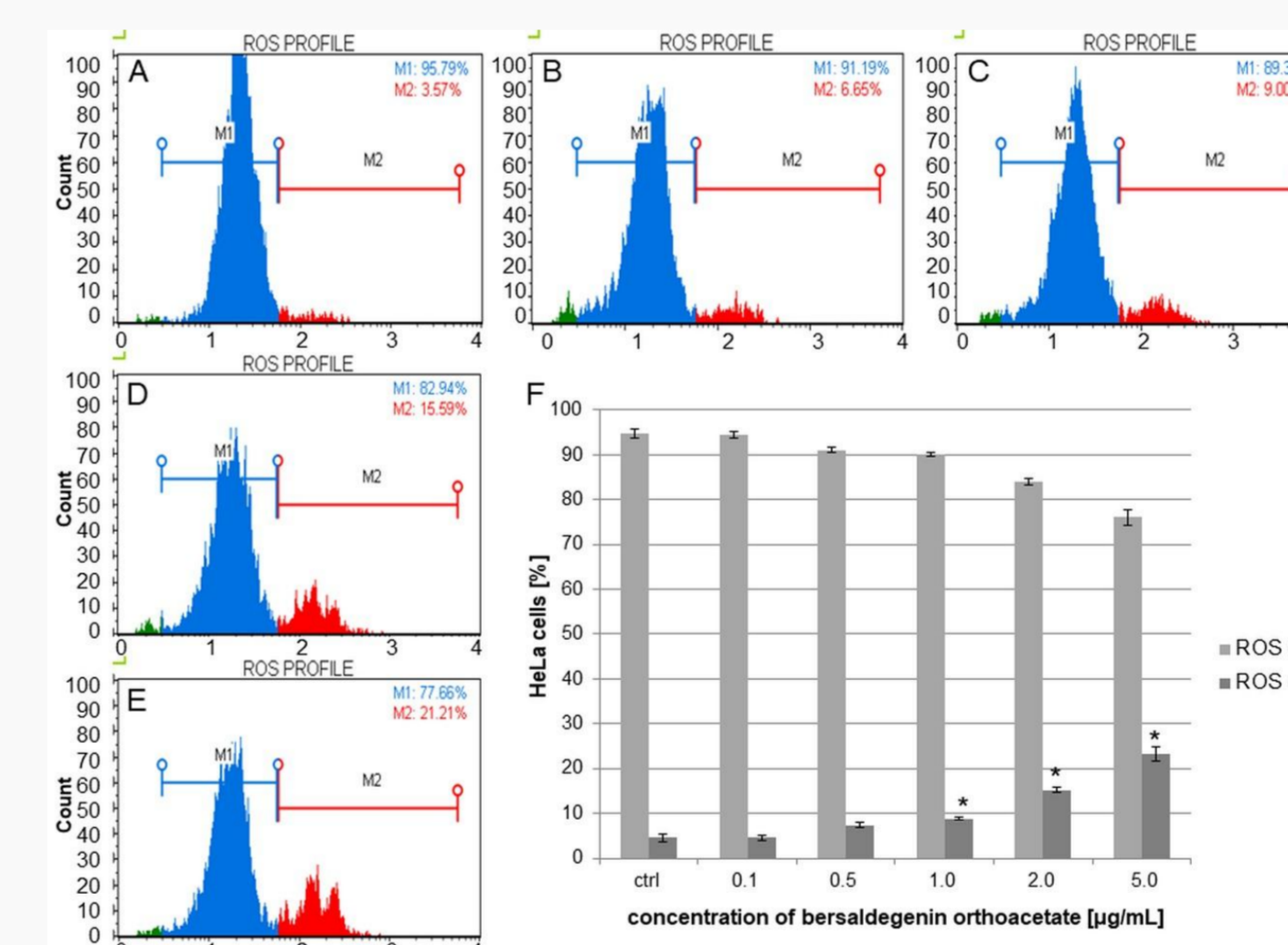
Winblastyna – kontrola pozytywna; R²-współczynnik determinacji



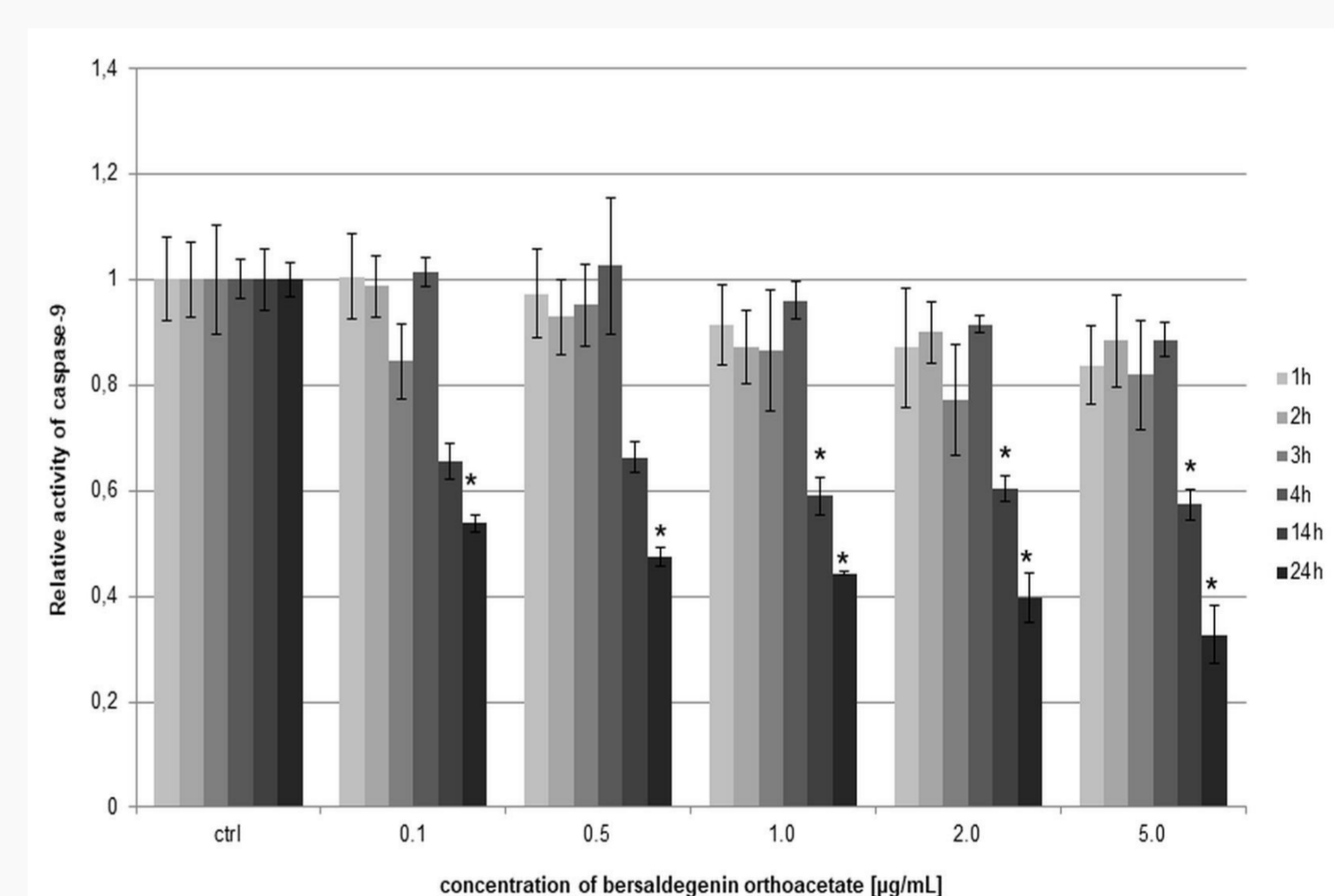
Wykres 1. Zahamowanie cyklu komórkowego po 48 godzinnej inkubacji komórek HeLa z ortoocatanem bersaldehydogeniny (DMSO kontrola).



Wykres 2. Krzywe proliferacji komórek HeLa po 24 godzinnej inkubacji z ortoocatanem bersaldehydogeniny w stężeniach 0,1-20 µg/mL.



Wykres 3. Poziom ROS w komórkach HeLa po 24 godzinnej inkubacji z ortoocatanem bersaldehydogeniny (A-DMSO kontrola, 0.5 (B), 1 (C), 2 (D) i 5 µg/mL (E)).



Wykres 4. Aktywność kaspazy-9 w komórkach HeLa po 1-24 godzinnej inkubacji z ortoocatanem bersaldehydogeniny.

Cytometria przepływowa

Poziom reaktywnych form tlenu ROS (ang. reactive oxygen species) oraz zahamowanie cyklu komórkowego wyznaczono za pomocą analizatora Muse Cell Analyzer (Merck Millipore).

Oznaczenia luminometryczne

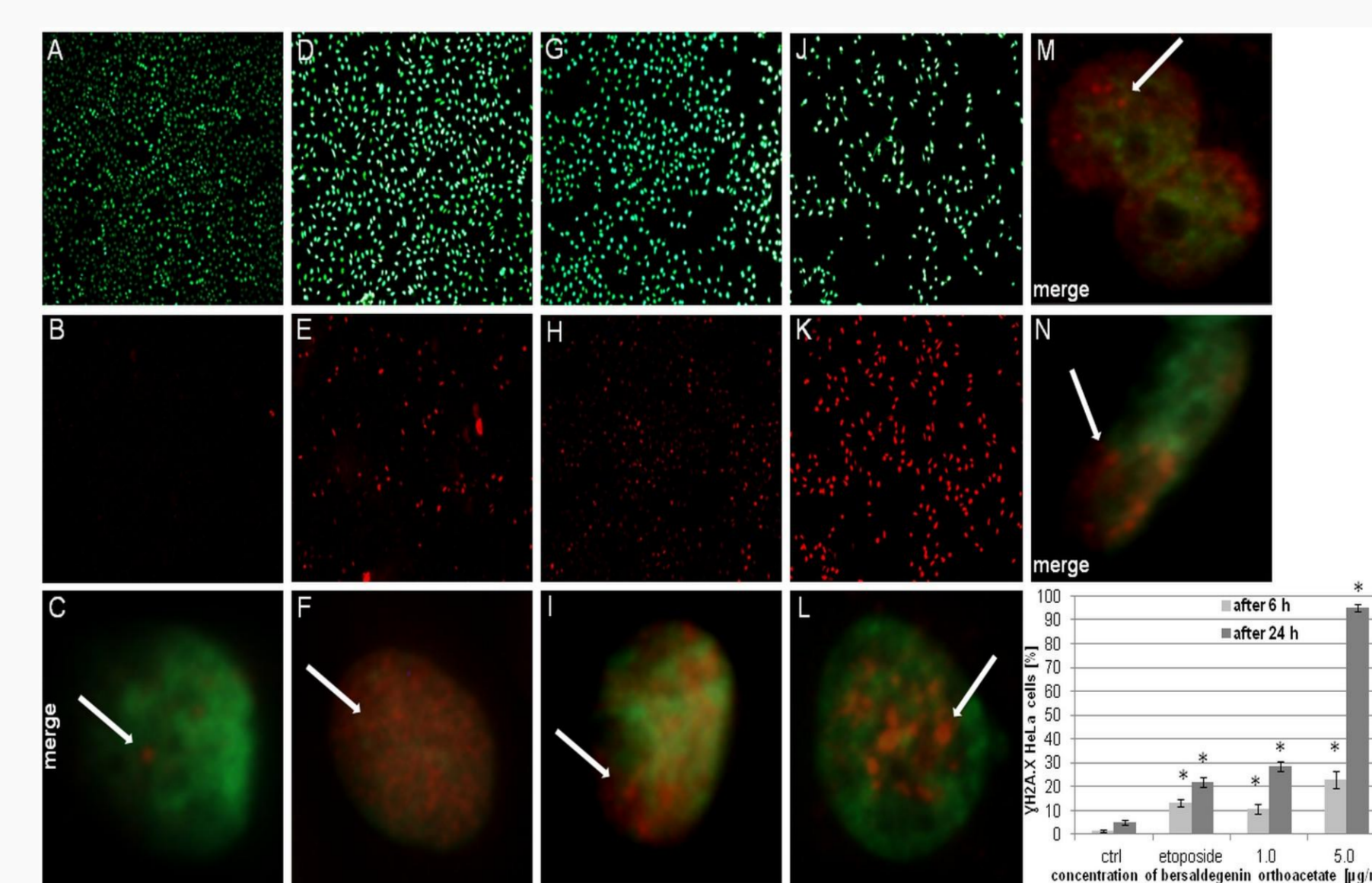
Poziom aktywności kaspazy-9 wyznaczono za pomocą luminometru Glomax Multi+ Detection System (Promega).

Test kometowy

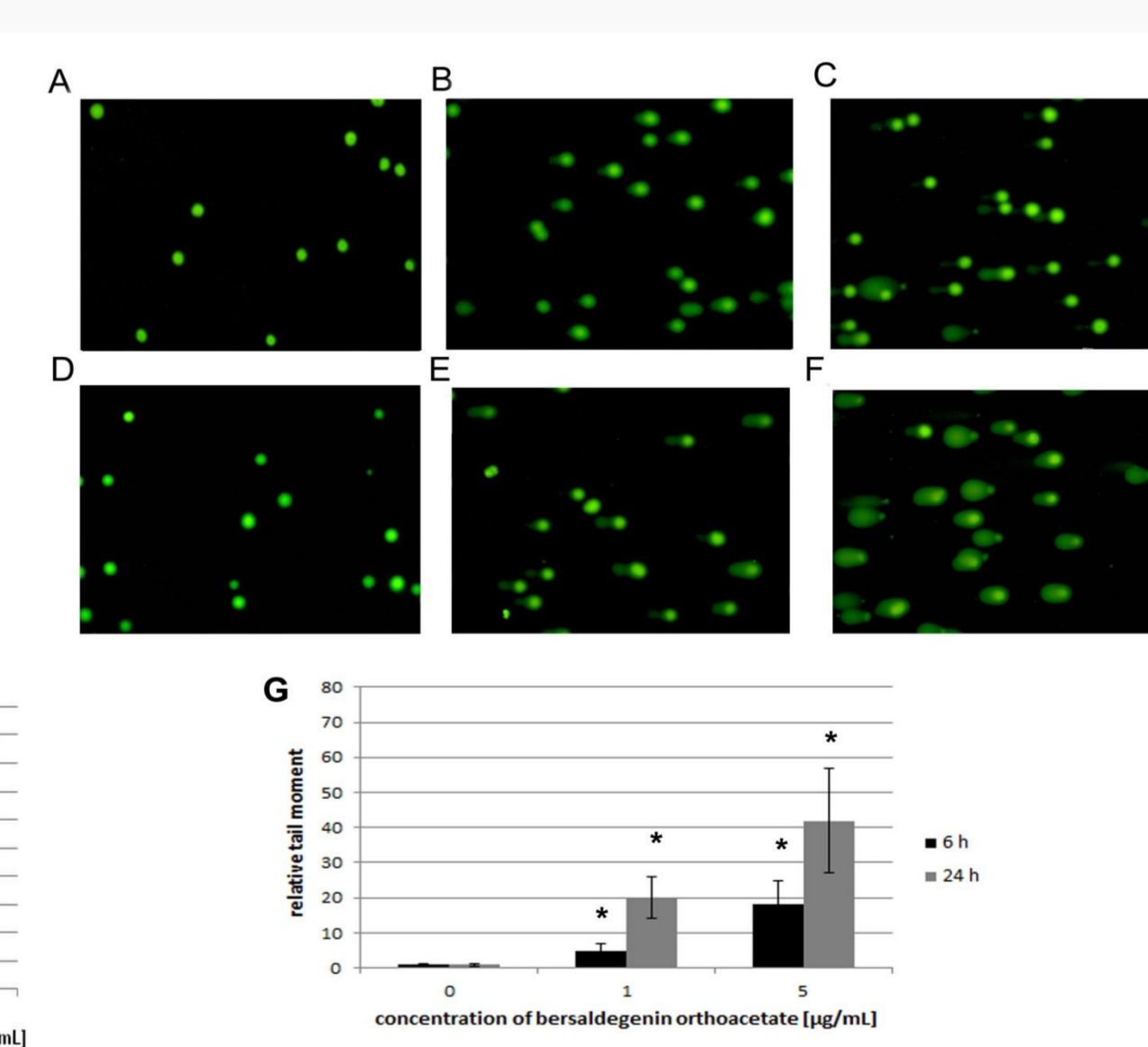
Uszkodzenia DNA zostały zanalizowane z zastosowaniem rozdziału DNA pojedynczych komórek w żelu agarozowym, wybarwione barwnikiem Sybr Gold (Invitrogen) i zobrazowane w mikroskopie fluorescencyjnym (Nikon PCM-2000).

Barwienie fluorescencyjne

Uszkodzenia DNA zostały dodatkowo zobrazowane z zastosowaniem barwienia fluorescencyjnego z przeciwciałem anti-phospho-H2A.X (Ser139), Alexa Fluor 555 (1:100, mysie monoklonalne, Merck Millipore), które pozwala na identyfikację *foci* γH2A.X w jądrach komórkowych wskazujących na uszkodzenie podwójnej nici DNA (dsDNA).



Fot. 1. Obecność fosfo-H2A.X (γH2A.X) po 6 oraz 24 godzinnej inkubacji komórek HeLa z ortoocatanem bersaldehydogeniny. Jądra wybarwione barwnikiem Hoechst 33342 (A, D, G, J, M, N) i przeciwciałem anti-fosfo-H2A.X (Ser139) Alexa Fluor (B, E, H, K, M, N).



Fot. 2. Test kometowy komórek HeLa po 6 (A-C) i 24 godzinnej (D-F) inkubacji z ortoocatanem bersaldehydogeniny.

WNIOSKI

- Ortoocatan bersaldehydogeniny jest związkiem działającym silnie cytotoksycznie;
- Badany związek powoduje zahamowanie wzrostu komórek HeLa w fazie G2/M i ich śmierć poprzez wzrost poziomu ROS w komórkach oraz uszkodzenie podwójnej nici DNA (double-stranded DNA);
- Śmierć komórek HeLa jest niezależna od kaspazy-9.