

## АЛЬФА-ТОКОФЕРИЛСУКЦИНАТ СЕЛЕКТИВНО ВЛИЯЕТ НА МОРФОЛОГИЮ И ПОДВИЖНОСТЬ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© М. А. Савицкая,<sup>1</sup> Г. Е. Онищенко

*Биологический факультет Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова, Москва, 119192;*

<sup>1</sup> *электронный адрес: nakomis@mail.ru*

Альфа-токоферилсукцинат (СВЕ) — производное витамина Е, обладающее потенциальной противоопухолевой активностью. В данной работе исследовано влияние СВЕ на морфологию и подвижность клеток эпидермоидной карциномы человека линии А431 и иммортализованных нетуморогенных кератиноцитов человека линии НасАТ. Были использованы методы фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии, модели экспериментальной раны *in vitro* (скрэтч-тест), сканирующей электронной микроскопии. В обеих клеточных культурах показаны изменение формы клеток, реорганизация актинового цитоскелета, сглаживание клеточной поверхности и исчезновение микроворсинок, а также подавление клеточной подвижности. Данные эффекты сходны в обеих линиях клеток, но в культуре НасАТ они имеют место при более высоких концентрациях СВЕ, чем требуются для А431. Таким образом, показана селективность действия данного соединения по отношению к опухолевым клеткам, происходящим из многослойных эпителиев кожи человека. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на разработку противоопухолевых препаратов с избирательным действием.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -токоферилсукцинат, актиновые филаменты, цитоскелет, скрэтч-тест, клеточная подвижность.

**Принятые сокращения:** СВЕ — сукцинат витамина Е.

Важными особенностями злокачественно трансформированных клеток являются их повышенная подвижность и способность распространяться по всему организму, образуя вторичные очаги опухолевого роста — метастазы. Именно метастазы являются причиной смерти 90 % больных онкологическими заболеваниями (Sporn, 1996; Entschladen et al., 2004). Распространение злокачественных клеток за пределы первичного очага опухолевого роста играет ключевую роль в прогрессии опухолей.

Большинство современных противоопухолевых препаратов направлено на подавление пролиферации и индукцию гибели трансформированных клеток. При этом ряд опухолей оказывается нечувствительным к такой терапии. Кроме того, известно, что мигрирующие клетки обладают пониженной пролиферативной активностью и в связи с этим достаточно устойчивы к стандартным химиотерапевтическим методам воздействия (Giese et al., 2003; Naga et al., 2003; Douma et al., 2004; Lefranc et al., 2006). Таким образом, лекарственные препараты, ингибирующие подвижность опухолевых клеток и уменьшающие инвазию, играют не менее важную роль при борьбе с онкологическими заболеваниями, чем агенты, вызывающие клеточную гибель и подавляющие пролиферацию.

Сукцинат витамина Е (СВЕ) представляет собой соединение с потенциальными противоопухолевыми свойствами из группы так называемых митоканов — малых мо-

лекул, основными мишенями воздействия которых служат митохондрии опухолевых клеток. Известно, что в различных линиях трансформированных клеток СВЕ способен индуцировать апоптотическую гибель по митохондриальному механизму (Yu et al., 1997; Neuzil et al., 1999; Yamamoto et al., 2000; Shiau et al., 2006; Gogvadze et al., 2010; Prochazka et al., 2010). В том числе, как нами было показано ранее, СВЕ индуцирует апоптоз по митохондриальному механизму в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека А431 (Savitskaya et al., 2012). Помимо этого, СВЕ проявляет и другие разнообразные типы биологической активности, такие как влияние на прохождение клеток по клеточному циклу (Yu et al., 2002; Ni et al., 2003; Alleva et al., 2005), индукция дифференцировки (Turley et al., 1992; You et al., 2001, 2002), подавление способности опухолевых клеток к адгезии (Wang et al., 2009), усиление эффектов других противоопухолевых агентов при их комбинированном использовании с СВЕ (Kanai et al., 2010; Tomasetti et al., 2010; Kruspig et al., 2013) и радиопротекторное действие по отношению к нормальным клеткам и тканям (Singh et al., 2002, 2012). Еще в 1982 г. (Prasad, Edwards-Prasad, 1982) было обнаружено, что в культуре меланомы мыши В16 СВЕ вызывает изменение формы клеток. Также есть ряд работ, в которых показано снижение клеточной подвижности в линиях нормальных клеток при действии СВЕ

(Pinilla et al., 2000; Dong et al., 2007; Neuzil et al., 2007b; Rohlena et al., 2011). В дальнейшем, однако, исследований, посвященных влиянию СВЕ на морфологию и подвижность клеток, в том числе злокачественно трансформированных, а также на актиновый цитоскелет, отвечающий за поддержание и изменение формы клеток, практически не встречается.

Цель данной работы — оценка влияния СВЕ на клеточную подвижность клеток эпидермоидной карциномы человека А431 и иммортализованных нетуморогенных кератиноцитов НаСаТ, исследование формы клеток и занимаемой ими площади, а также системы актиновых филаментов.

## Материал и методика

Культура клеток и постановка эксперимента. Работу проводили на культурах клеток линии А431 (эпидермоидная карцинома человека; получены из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) и НаСаТ (перевиваемая линия нормальных кератиноцитов человека, любезно предоставлены Е. А. Воротеляк, Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва).

Клетки выращивали во флаконах объемом 5 мл в среде DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium; ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка (ПанЭко, Россия), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия). Клетки культивировали при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Пассирование производили раствором Версен-трипсина (7 : 3; ПанЭко, Россия).

При постановке эксперимента клетки рассаживали на стекла в чашки Петри в концентрации 200—300 тыс./мл. Растворы α-токоферилсукцината (Sigma, США) готовили из стокового спиртового (96%-ный этанол) раствора концентрацией 100 мМ и хранили при –20 °С. Агент вносили в среду культивирования через 24 или 48 ч после посадки в концентрациях 40, 60 и 100 мкМ. Так как в качестве растворителя для СВЕ применяли этанол, в каждом эксперименте использовали два контроля: контроль без добавления каких-либо растворов и контроль с добавлением спирта в объеме, соответствующем максимальному вносимому объему СВЕ. Далее клетки фиксировали или окрашивали прижизненно через 24, 48 или 72 ч после добавления СВЕ в соответствии с поставленной задачей.

Цитохимическое окрашивание. Клетки фиксировали 4%-ным формалином (MP Biochemicals, Франция) на PBS (ПанЭко, Россия) в течение 20 мин и трижды промывали буфером. Для нарушения целостности мембран фиксированные клетки на 3—5 мин помещали в 1%-ный раствор Triton X-100 при комнатной температуре. Для выявления полимеризованного актина был использован меченный TRITC фаллоидин (Sigma-Aldrich, США): стоковый раствор 1 мг/мл, разведенный на метаноле, рабочий раствор 0.005 мг/мл, разведенный на PBS. Время инкубации с красителем 45 мин при 37 °С во влажной камере. Препараты заключали в PBS-глицерин (1 : 1) и анализировали на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия) с использованием объектива Plan-NEOFLUAR 100×/1.30. Снимки обрабатывали с помощью программ Adobe Photoshop и ImageJ.

Оценка площади клеток. Площадь клеток А431 и НаСаТ измеряли на фотографиях, полученных ме-

тодом фазово-контрастной микроскопии на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc.), в программе ImageJ.

Сканирующая электронная микроскопия. Клетки фиксировали 2.5%-ным глутаровым альдегидом с 2%-ным формалином на 0.1 М PBS в течение 1 ч и обезвоживали в растворах этилового спирта 30, 50, 70, 82 и 96 %. Далее образцы последовательно помещали в смесь ацетона и 96%-ного этилового спирта в соотношениях 1 : 3, 1 : 1 и 3 : 1, а затем в ацетон. После обработки образец высушивали в критической точке (для CO<sub>2</sub> t = 31 °С, p = 73.8 бар). Далее производили напыление на образец золота и палладия. Полученные препараты анализировали на сканирующем электронном микроскопе SCAN JSM (JEOL).

Модель раны *in vitro* (скрэтч-тест). Клетки сажали в чашки Петри на стекла в концентрации 350—450 тыс./мл. Через 24 ч после посадки с помощью скребка для клеток наносили экспериментальную рану, а также вносили растворы СВЕ и этанола. Изображения ран получали сразу после нанесения и спустя 24 ч инкубации в присутствии СВЕ с помощью микроскопа с дифференциально-интерференционным контрастом (DIC) Leica (об. HI Plan10×/0.22) с цифровой камерой Video-Zavr Standart 3.533 и программным обеспечением Video-Zavr 1.4. В каждом эксперименте проанализировали не менее трех ран на каждую точку, в каждой ране производили 10—15 измерений (по 5 измерений для каждого снимка).

Обработка и анализ результатов. Обработку фотографий и измерение ширины экспериментальной раны проводили в программах Adobe Photoshop CS3 и ImageJ. Построение гистограмм и вычисление величин стандартного отклонения проводили в программе Microsoft Office Excel 2007. Каждый эксперимент был повторен не менее 3 раз. Наличие статистически достоверных различий между выборками оценивали по U-критерию Манна—Уитни.

## Результаты

СВЕ вызывает изменение формы клеток и реорганизацию системы актиновых филаментов. При действии СВЕ было обнаружено изменение формы клеток как в линии эпидермоидной карциномы А431, так и в нормальных кератиноцитах НаСаТ. Так, в контроле клетки обеих линий распластаны, формируют островки. По краю островков клетки образуют, как правило, хорошо выраженные ламеллы (рис. 1, а). При действии СВЕ в концентрации 40 мкМ в течение 48 ч в клетках А431 происходят значительные изменения морфологии по сравнению с клетками в контроле: цитоплазма сжимается, ламеллы становятся менее выраженными, клетки формируют многочисленные выросты и филоподии (рис. 1, б).

В культуре клеток НаСаТ при воздействии 40 мкМ СВЕ изменений формы клеток не выявляется. После инкубации клеток НаСаТ в присутствии более высоких концентраций СВЕ (60 и 100 мкМ) форма клеток изменяется подобно тому, как это происходит в линии А431 при действии 40 мкМ СВЕ: выраженность ламелл снижается, цитоплазма клеток сжимается, формируются многочисленные филоподии и цитоплазматические отростки различной длины (рис. 1, в, д).

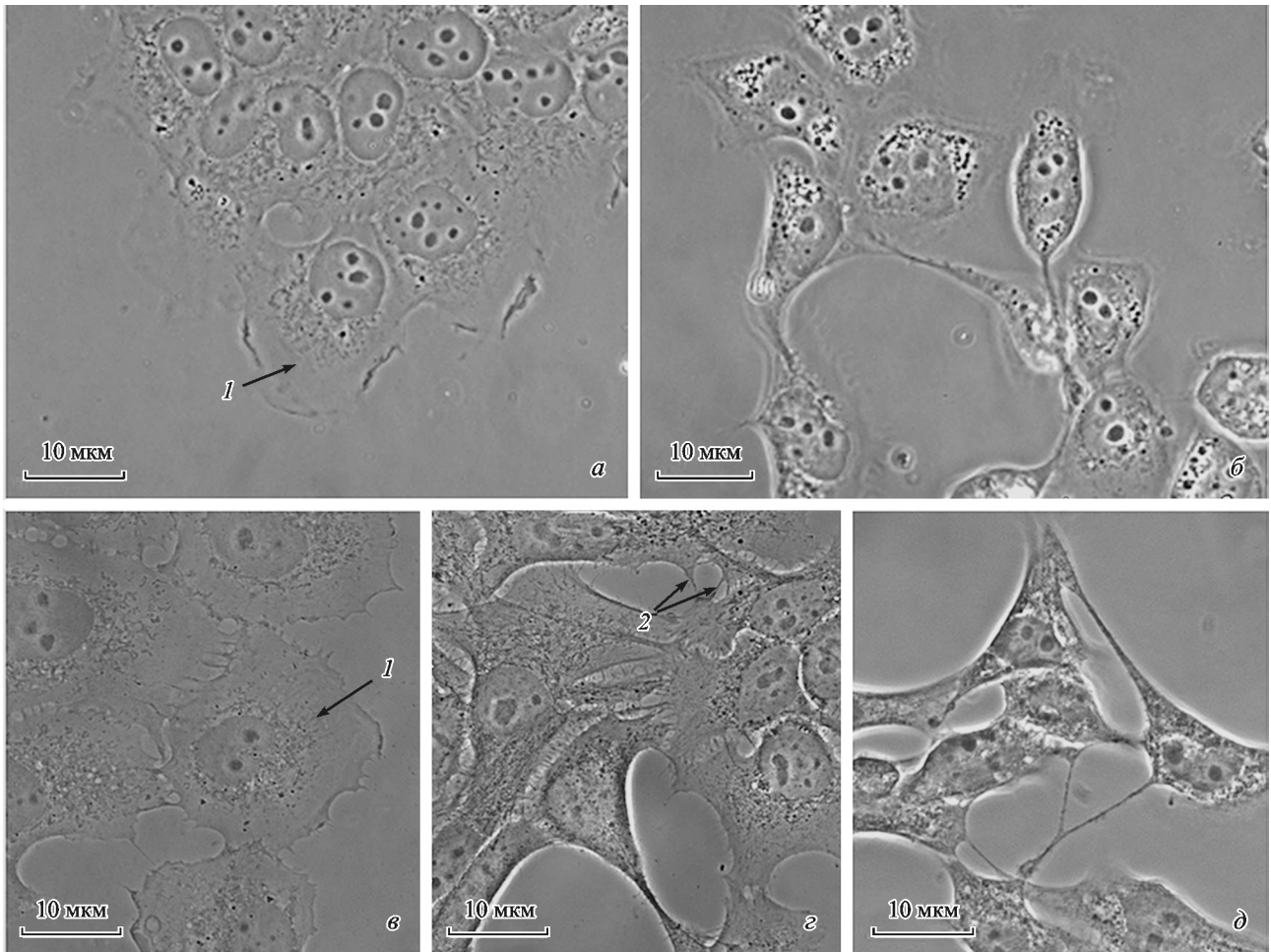


Рис. 1. Морфология клеток A431 и HaCaT в контроле и при действии СВЕ. Фазово-контрастная микроскопия. *a* — A431, контроль; *б* — A431, 40 мкМ СВЕ, 48 ч; *в* — HaCaT, контроль; *г* — HaCaT, 60 мкМ СВЕ; *д* — HaCaT, 100 мкМ СВЕ, 48 ч. Стрелками и цифрами указаны ламеллы (1) и филоподии (2).

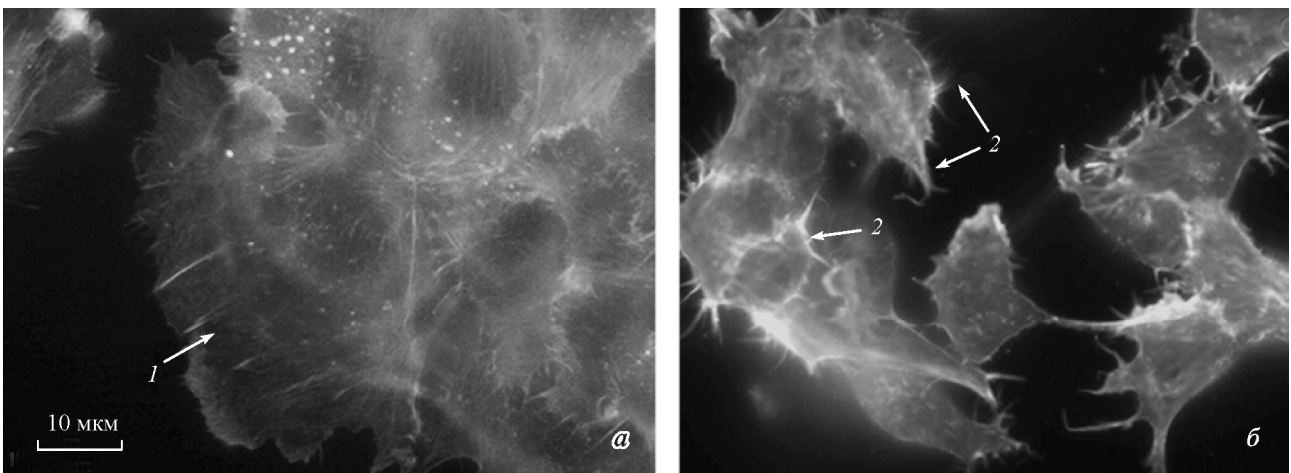


Рис. 2. Локализация актиновых филаментов в клетках A431. Цитохимическое окрашивание фаллоидином, конъюгированным с TRITC. *a* — контроль; *б* — 40 мкМ СВЕ, 48 ч. Стрелками и цифрами указаны ламеллы (1) и филоподии (2).

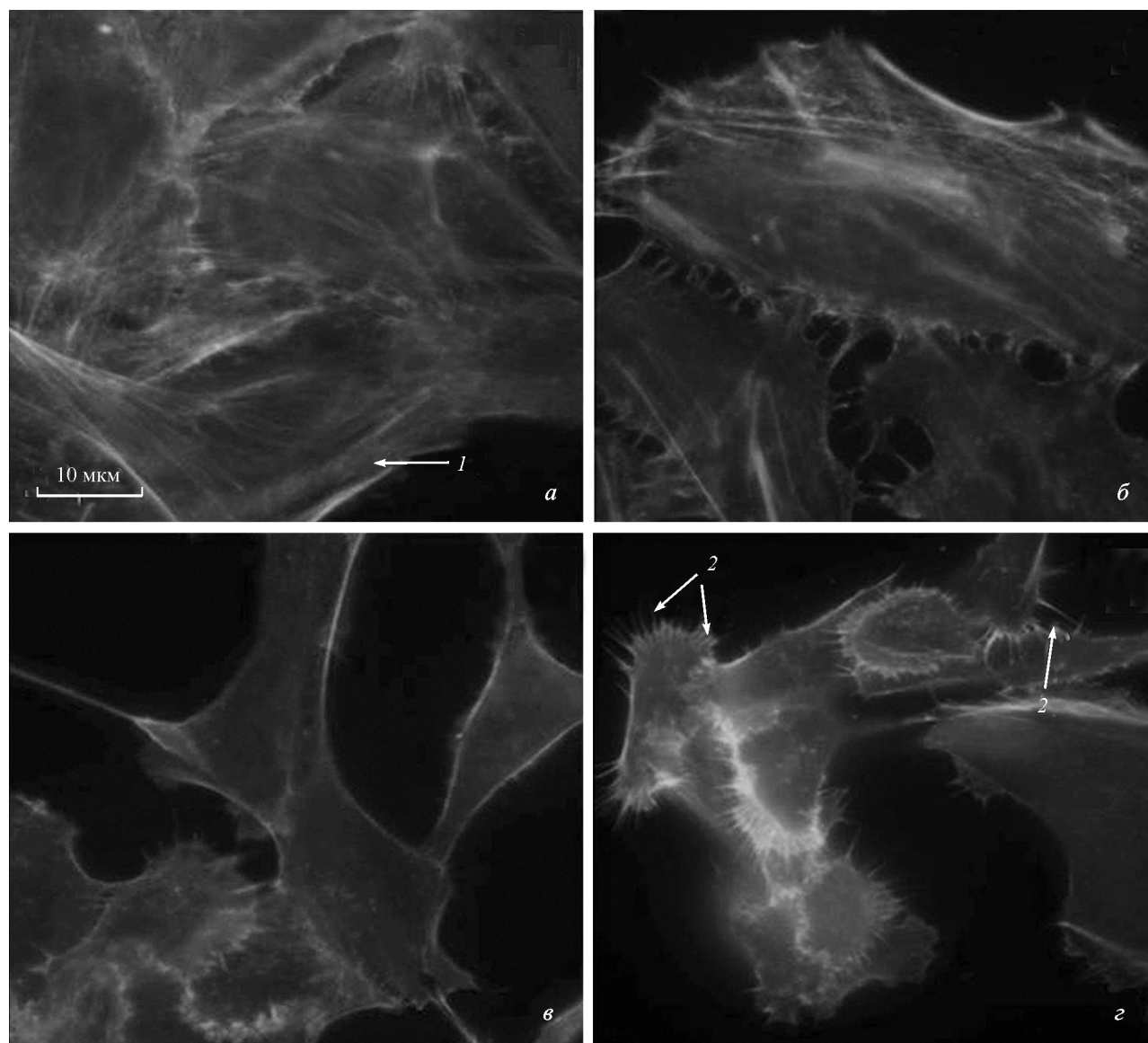


Рис. 3. Локализация актиновых филаментов в клетках NaCaT.

Цитохимическое окрашивание фаллоидином, конъюгированным с TRITC. *a* — контроль; *б* — 40 мкМ СВЕ, 48 ч; *в* — 60 мкМ СВЕ, 48 ч; *г* — 100 мкМ СВЕ, 48 ч. Стрелками и цифрами указаны ламеллы (1) и филоподии (2).

Цитохимическое выявление F-актина демонстрирует, что в клетках линии A431 в контроле актиновые филаменты отчетливо выражены по краю ламелл клеток, также присутствуют небольшие точечные скопления F-актина в глубине цитоплазмы (рис. 2, *a*). Иногда встречаются отдельные пучки параллельно расположенных микрофиламентов. Нередко клетки образуют небольшие филоподии, в которых также обнаруживается F-актин (рис. 2, *a*).

При действии СВЕ клетки формируют, как правило, более многочисленные филоподии по сравнению с контролем. Кроме того, у многих клеток, расположенных на краю островков, а также в одиночных клетках формируются длинные выросты цитоплазмы, заполненные актиновыми филаментами. Точечные скопления F-актина в глубине цитоплазмы исчезают. Таким образом, при действии СВЕ значительные изменения формы клеток сопровождаются образованием многочисленных цитоплазматических выростов, содержащих микрофиламенты (рис. 2, *б*).

При выявлении актиновых филаментов в клетках линии NaCaT, инкубированных в течение 48 ч в присутствии 40 мкМ СВЕ (рис. 3, *б*), не обнаружено существенных различий по сравнению с контролем (рис. 3, *a*). Как в контроле, так и в клетках, подвергавшихся воздействию СВЕ в концентрации 40 мкМ, актиновые филаменты формируют хорошо выраженный слой, располагающийся по периметру клетки, а также крупные параллельные пучки в цитоплазме, которые нередко окружают ядро и содержатся в составе филоподий. При действии СВЕ в концентрации 60 и 100 мкМ в течение 48 ч клетки образуют многочисленные филоподии и более крупные выросты цитоплазмы, в которых присутствует F-актин; кроме того, кольцо микрофиламентов вокруг ядра становится практически незаметным (рис. 3, *в*, *г*).

СВЕ вызывает изменение площади клеток и состояния клеточной поверхности. Поскольку было обнаружено изменение формы клеток и изменение распределения актинового цитоскелета, возни-

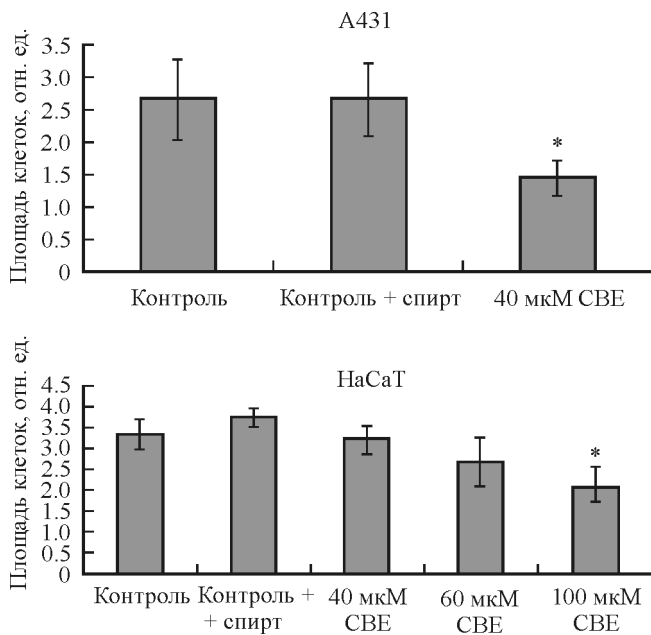


Рис. 4. Изменение площади клеток A431 и HaCaT при действии СВЕ.

Вертикальные отрезки — стандартное отклонение, звездочками обозначены группы, статистически достоверно различающиеся по анализируемому показателю ( $p \leq 0.05$ ).

кает вопрос о том, изменяется ли при этом площадь клеток. Площадь клеток оценивали по фотографиям, полученным при фазово-контрастной микроскопии. Результаты количественной оценки площади клеток линий A431 и HaCaT показаны на рис. 4. Видно, что при действии СВЕ в концентрации 40 мкМ площадь клеток A431 значительно (в 2 раза) снижается по сравнению с контролем и контролем со спиртом. Очевидно, что это происходит из-за реорганизации элементов цитоскелета и сжатия цитоплазмы.

В культуре HaCaT СВЕ в концентрации 40 и даже 60 мкМ не вызывает значительного изменения площади клеток. Заметное уменьшение этого показателя происходит только при воздействии СВЕ в концентрации 100 мкМ.

Поскольку величина площади клеток снижается, возникает вопрос о том, происходит это вследствие изменения формы или (и) размеров клеток. Форму клеток анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Как показано на рис. 5, а, б, в контроле клетки A431 хорошо распластаны, их поверхность покрыта многочисленными микроворсинками. После воздействия СВЕ в концентрации 40 мкМ клетки приобретают веретеновидную форму (рис. 5, в), а их поверхность значительно сглаживается и часто бывает практически лишена микроворсинок (рис. 5, д). Отметим, что описанные выше выросты цитоплазмы клеток, образующиеся после инкубации в присутствии СВЕ, также заметны при использовании метода СЭМ (рис. 5, в—д).

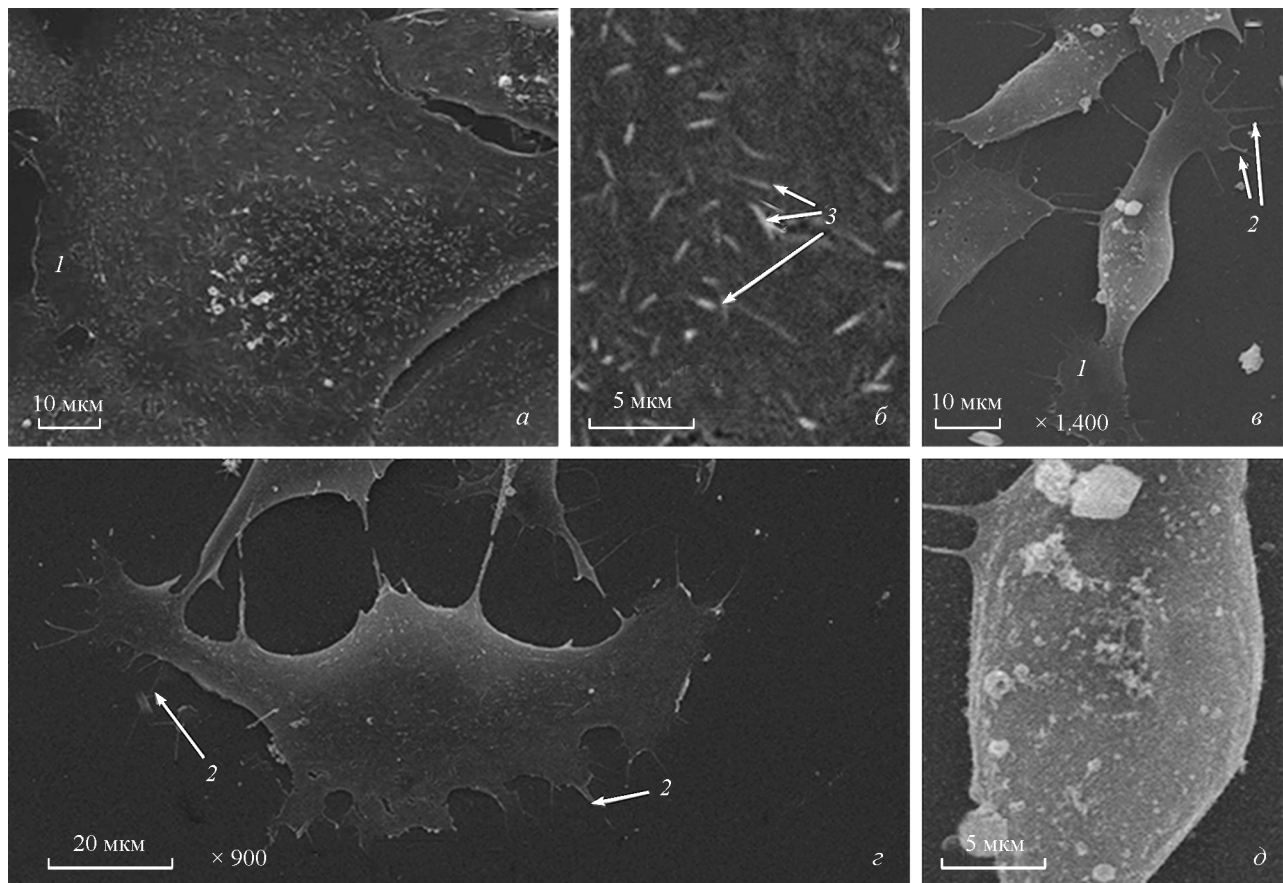


Рис. 5. Морфология клеток A431 в контроле (а, б) и при действии 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч (в—д). Сканирующая электронная микроскопия.

Стрелками и цифрами указаны ламеллы (1), филоподии (2) и микроворсинки (3).

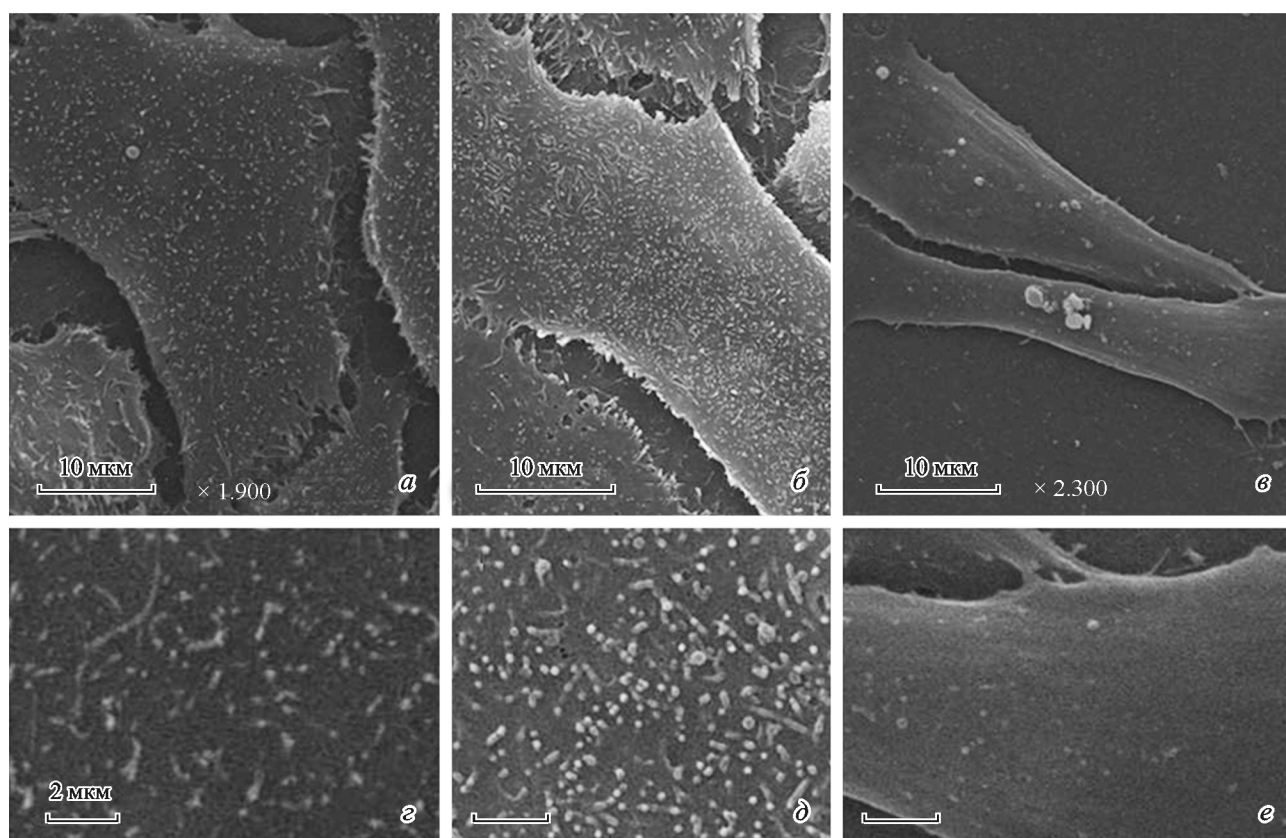


Рис. 6. Морфология клеток NaCaT в контроле и при действии СВЕ. Сканирующая электронная микроскопия.

*a, z* — контроль; *б, д* — 40 мкМ СВЕ, 48 ч; *в, е* — 60 мкМ СВЕ, 48 ч.

При анализе клеток NaCaT было обнаружено, что как в контроле (рис. 6, *a, z*), так и после инкубации в присутствии 40 мкМ СВЕ (рис. 6, *б, д*) клетки покрыты многочисленными микроворсинками. Таким образом, на морфологическом уровне в клетках линии NaCaT в отличие от A431 при воздействии 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч изменений по сравнению с клетками в контроле не выявляется. При воздействии СВЕ в концентрации 60 мкМ на протяжении 48 ч поверхность клеток сглаживается, микроворсинки исчезают (рис. 6, *в, е*). При этом также заметно описанное выше изменение формы клеток.

СВЕ подавляет заживление экспериментальной раны *in vitro*. В связи с обнаруженными изменениями формы клеток и перестройкой актинового цитоскелета была также проанализирована подвижность клеток с помощью метода моделирования экспериментального заживления ран *in vitro*. На рис. 7 представлены микрофотографии фрагментов монослоя клеток непосредственно после нанесения раны, а также спустя 24 ч. Видно, что в контроле рана затянулась и стала малозаметной, в то время как при действии СВЕ в концентрации 40 мкМ процесс заживления раны был в значительной степени подавлен: в то время как в контроле ширина раны уменьшалась в 4 раза, в присутствии СВЕ — только в 1.5. Результаты количественной оценки изменения ширины раны в течение 24 ч инкубации представлены на гистограмме (рис. 7).

При моделировании раны *in vitro* в монослойной культуре клеток NaCaT показано, что в течение 24 ч стягивание краев раны происходит практически в равной степени и в контроле, и при действии СВЕ в концент-

рации 40 мкМ. Уменьшение эффективности заживления раны наблюдается только при действии СВЕ в концентрации 60 мкМ. Результаты количественной оценки эффективности заживления раны *in vitro*, полученные путем измерения расстояния между ее краями, представлены на гистограмме (рис. 7).

Таким образом, СВЕ индуцирует изменения формы клеток A431 и NaCaT, сопровождающиеся уменьшением площади клеток, исчезновением микроворсинок с поверхности клеток, а также перестройкой системы актиновых филаментов. При этом наблюдается подавление эффективности заживления экспериментальной раны в монослое по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении подвижности клеток. В культуре клеток NaCaT изменения сходны с таковыми, описанными для клеток линии A431, но происходят при более высоких концентрациях СВЕ.

## Обсуждение

Воздействие СВЕ на культуры клеток A431 и NaCaT сопровождалось изменением их морфологии. Было обнаружено уменьшение площади, занимаемой клетками; такое изменение размеров может быть связано с изменением формы клеток. При исследовании с помощью сканирующей электронной микроскопии обнаружено, что в результате воздействия СВЕ также происходят сглаживание клеточной поверхности и исчезновение микроворсинок. Известно, что форма клеток, а также состояние их поверхности прежде всего определяются системой акти-

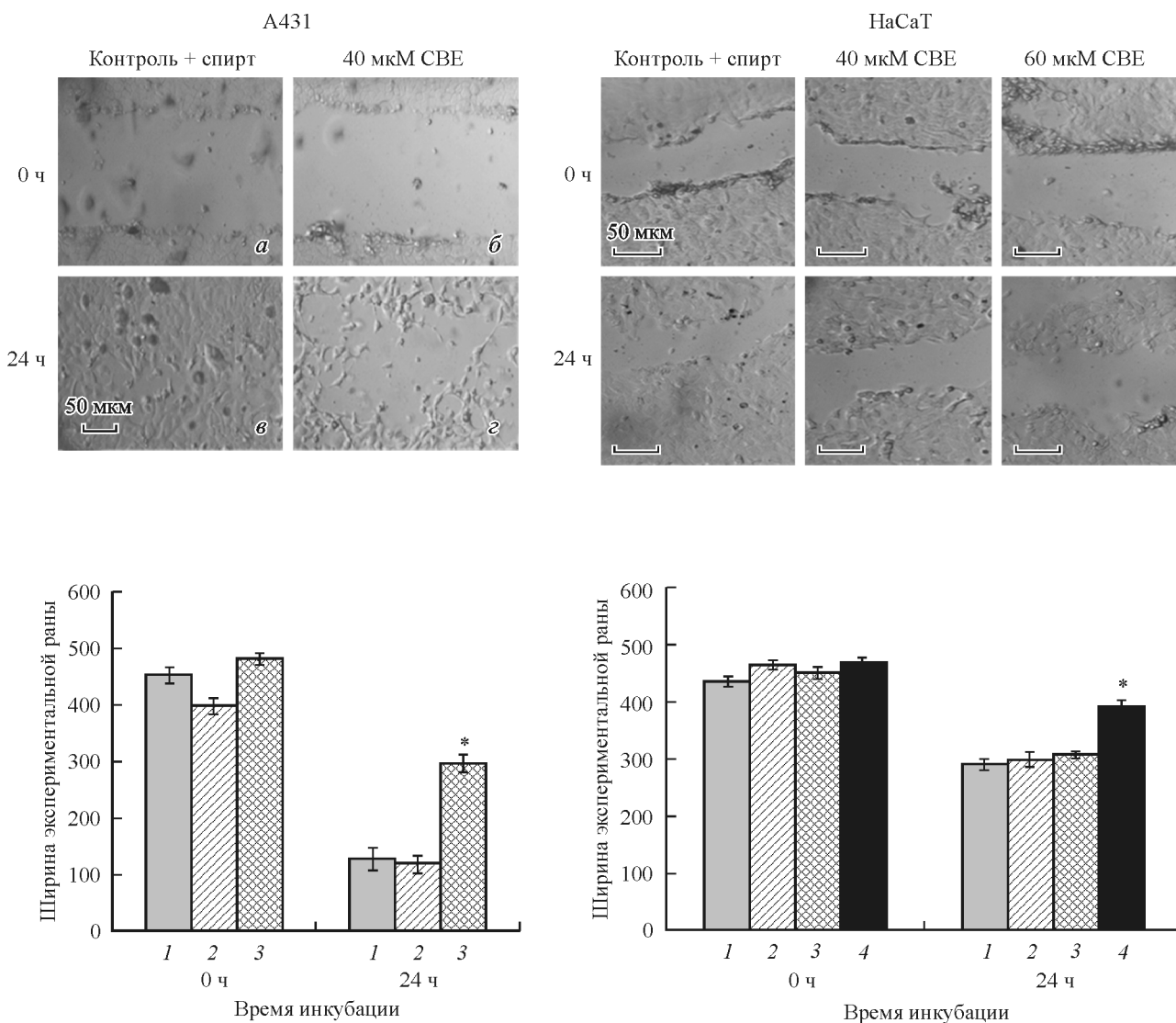


Рис. 7. Модель раны *in vitro* в культуре клеток А431 и HaCaT.

Вверху — фазово-контрастная микроскопия, внизу — результаты количественной оценки изменения ширины экспериментальной раны. Объяснения см. в тексте. Вертикальные отрезки — стандартное отклонение, звездочкой обозначены группы, статистически достоверно различающиеся по анализируемому показателю ( $p \leq 0.05$ ).

новых филаментов. Для того чтобы оценить роль микрофиламентов в реакции клеток на воздействие СВЕ, было проведено цитохимическое выявление фибриллярного актина с помощью фаллоидина, конъюгированного с TRITC. Визуализация системы актиновых филаментов показала, что изменение формы клеток сопровождается снижением выраженности ламелл и увеличением длины и количества филоподий. Как известно, к формированию филоподий, ламеллоподий и стресс-фибрилл приводит активация белков Cdc42, Rac и Rho соответственно. Главная функция малых GTPаз семейства Rho — регуляция организации актинового цитоскелета, они также оказывают влияние на адгезию, подвижность и пролиферацию клеток (Kurokawa et al., 2004). В литературе практически отсутствуют данные, касающиеся эффектов воздействия СВЕ на компоненты цитоскелета, хотя способность СВЕ вызывать изменение формы клеток меланомы мыши в культуре была показана еще в 1982 г. (Prasad, Edwards-Prasad, 1982). Высказано предположение (Kline, Sanders, 2001) о том, что СВЕ может действовать на ре-

цепторы TGF $\beta$ RI и II, передавая через них сигнал на Rac и Cdc42. Наличие TGF $\beta$ -сигнального пути показано для клеток А431 и HaCaT (Goldkorn, Mendelsohn, 1992; Goldkorn, Ding, 1997; Han et al., 2015). Известно, что с активностью членов семейства Rho-GTPаз может быть связано формирование эндогенных АФК (Alexandrova et al., 2006; Kaneyuki et al., 2007; Kim et al., 2008). Повышение образования в клетках перекисных соединений было показано нами ранее для культуры А431 (Savitskaya et al., 2012). Активация малой GTPазы Rac может приводить к реорганизации актинового цитоскелета, выражающейся в полимеризации актина на ведущем крае клетки и формировании ламеллоподий. В нашем случае, однако, при действии СВЕ выраженных ламелл, как правило, не наблюдали, но происходило активное образование филоподий. Формирование филоподий связано с активностью Cdc42 и сопряженного с ним сигнального пути (Qadir et al., 2015). Таким образом, возможно, реорганизация актинового цитоскелета в клетках при воздействии СВЕ имеет отношение именно к изменению активности Cdc42.

Интересно, что изменение формы клеток, сходное с наблюдаемым в данном исследовании, описано в линии HeLa при воздействии церамидом в течение 12 ч (Hu et al., 2005). У таких клеток обнаруживаются образование длинных отростков, сжатие цитоплазмы и приобретение клетками веретеновидной формы. При этом признаков апоптоза, таких как конденсация хроматина, деградация ДНК и фрагментация ядер, в клетках не выявляется; однако имеет место слабо выраженное расщепление PARP — Poly-(ADP-ribose) polymerase. Авторы отмечают, что на данном этапе изменения формы клеток, по-видимому, не связаны с процессом апоптоза. Уровень апоптотической гибели значительно повышается при длительности инкубации более 36 ч. На основании сходства эффектов воздействия церамида и СВЕ в данной работе можно сделать предположение о том, что наблюдаемое изменение морфологии клеток может быть опосредовано действием церамида, способного синтезироваться при действии СВЕ (Hu et al., 2005; Gu et al., 2008; Neuzil et al., 2007b). Так, показано (Gu et al., 2008), что СВЕ вызывает раннюю активацию сфингомелиназы — фермента, расщепляющего сфингомиелин с образованием фосфохолина и апоптогенного С16-церамида. В клетках карциномы головы и шеи человека, представляющих собой опухолевые клетки из многослойного эпителия, СВЕ взаимодействует с фосфолипидами и сфинголипидами плазматической мембраны. В результате сфинголипиды становятся более доступными для гидролаз, под воздействием которых из них формируется церамид.

Клеточная подвижность играет ключевую роль в процессе метастазирования злокачественных опухолей, вследствие чего ее ингибирование может служить дополнительной мишенью при противоопухолевой терапии. Модель раны *in vitro* широко применяется при исследовании подвижности клеток. При заживлении экспериментальной раны различные типы клеток реагируют сходным образом: клетки поляризуются, формируют протрузии в сторону раны и мигрируют (Yarrow et al., 2004). Ряд авторов исследовали влияние СВЕ на заживление раны *in vitro* в культурах нормальных эндотелиоцитоподобных клеток (Dong et al., 2007; Neuzil et al., 2007a; Rohlena et al., 2011) и нормальных фибробластов (Pinilla et al., 2000). Во всех этих работах показано, что СВЕ подавляет заживление экспериментальных ран, что регистрируется как снижение скорости стягивания краев раны или большая ширина раны по сравнению с контролем в пределах одной временной точки. Аналогичные исследования эффектов СВЕ, оказываемых им на опухолевые клетки, отсутствуют. В данной работе оценивали действие СВЕ на рану в монослое клеток линии A431. При сравнении ширины раны после 24 ч воздействия было выявлено значительное ингибирование процесса заживления при действии СВЕ, что согласуется с результатами, полученными на линиях нормальных, нетрансформированных клеток. Таким образом, в данном случае действие агента на нормальные и опухолевые клетки оказывается сходным. Такой эффект можно рассматривать как противоопухолевый по двум параметрам: во-первых, ингибирование подвижности опухолевых клеток потенциально может препятствовать распространению метастазов; во-вторых, подавление подвижности эндотелиоцитов может играть важную роль при ингибировании ангиогенеза, необходимого для роста опухоли.

Так же как и в культуре клеток A431, воздействие СВЕ сопровождалось изменением формы клеток HaCaT и

сглаживанием клеточной поверхности, которое наблюдалось при использовании концентраций 60 и 100, но не 40 мкМ. Визуализация системы микрофиламентов продемонстрировала, что актиновый цитоскелет изменяется сходно с таковым в линии A431: увеличивается выраженность филоподий, а ламеллы уменьшаются. По-видимому, похожим должен был быть и механизм данного процесса.

При изучении влияния СВЕ на заживление экспериментальной раны в монослое клеток HaCaT в течение 24 ч было показано, что СВЕ в концентрации 60 мкМ значительно ингибирует подвижность клеток, в то время как 40 мкМ данного соединения не оказывают подобного эффекта. Полученные данные согласуются с имеющимися результатами аналогичных исследований, в которых показано ингибирующее влияние СВЕ на заживление ран *in vitro* в культурах нормальных клеток других типов, таких как эндотелиоциты и фибробласты (Pinilla et al., 2000; Dong et al., 2007; Neuzil et al., 2007a; Rohlena et al., 2011). В то время как ингибирование подвижности опухолевых клеток, несомненно, является благоприятным для терапии опухолей, ингибирование ранозаживления в нормальных тканях нежелательно (Rohlena et al., 2011). Поэтому большая чувствительность опухолевых клеток эпидермального происхождения к такому воздействию со стороны СВЕ в перспективе могла бы способствовать предотвращению образования метастазов на фоне минимальных побочных эффектов.

Таким образом, результаты нашей работы продемонстрировали неопределенное ранее влияние СВЕ на морфологию клеток, происходящих из многослойных эпителиев. В целом обнаружены изменение формы клеток, уменьшение их площади, сглаживание клеточной поверхности, а также изменение распределения компонентов актинового цитоскелета. Кроме того, на модели раны *in vitro* показано, что СВЕ подавляет подвижность клеток. Ранее влияние СВЕ на подвижность клеток было показано только для культуры нормальных эндотелиоцитов и фибробластов (Pinilla et al., 2000; Dong et al., 2007; Neuzil et al., 2007a; Rohlena et al., 2011). Нами впервые была исследована подвижность не только нормальных, но и опухолевых клеток при действии СВЕ, что имеет большое значение в терапии опухолей, поскольку подавление подвижности злокачественно трансформированных клеток может препятствовать их распространению по организму и образованию метастазов. Полученные данные указывают на то, что СВЕ помимо прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки (Yu et al., 1997; Neuzil et al., 1999; Yamamoto et al., 2000; Shiao et al., 2006; Gogvadze et al., 2010; Prochazka et al., 2010) имеет дополнительные мишени, воздействие на которые может препятствовать опухолевому росту.

Интересно также отметить, что морфологические изменения, которые претерпевают клетки, напоминают таковые для эпителиально-мезенхимного перехода, поэтому немалый интерес могло бы представлять выявление каких-либо молекулярных маркеров, характерных для этого процесса. Однако известно, что при эпителиально-мезенхимном переходе происходит усиление подвижности клеток (Scanlon et al., 2013), в нашем же случае имеет место обратный эффект. При этом следует отметить, что мы обнаружили эффект подавления клеточной подвижности при воздействии СВЕ на модели движения в двумерном пространстве. В дальнейшем было бы целесообразно исследовать влияние СВЕ на клеточную по-



движность в условиях трехмерного пространства, например матригеля. Это позволит дать однозначный ответ о характере влияния СВЕ на способность опухолевых клеток эпидермального происхождения к метастазированию и нормальных кератиноцитов к выдвигению в область раны.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00029).

### Список литературы

- Alexandrova A. Y., Kopnin P. B., Vasiliev J. M., Kopnin B. P. 2006. ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Exp. Cell Res.* 312 : 2066—2073.
- Alleva R., Benassi M. S., Tomasetti M., Gellert N., Ponticelli F., Borghi B., Picci P., Neuzil J. 2005. Alpha-tocopheryl succinate induces cytostasis and apoptosis in osteosarcoma cells: the role of E2F1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 : 1515—1521.
- Dong L. F., Swettenham E., Eliasson J., Wang X. F., Gold M., Medunic Y., Stantic M., Low P., Prochazka L., Witting P. K., Turanek J., Akporiaye E. T., Ralph S. J., Neuzil J. 2007. Vitamin E analogues inhibit angiogenesis by selective induction of apoptosis in proliferating endothelial cells: the role of oxidative stress. *Cancer Res.* 67 : 11 906—11 913.
- Douma S., Van Laar T., Zevenhoven J., Meuwissen R., Van Garderen E., Peepers D. S. 2004. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature.* 430 : 1034—1039.
- Entschladen F., Drell T. IV., Lang K., Joseph J., Zaenker K. 2004. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol.* 5 : 254—258.
- Giese A., Bjerkvig R., Berens M. E., Westphal M. 2003. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J. Clin. Oncol.* 21 : 1624—1636.
- Gogvadze V., Norberg E., Orrenius S., Zhivotovsky B. 2010. Involvement of Ca<sup>2+</sup> and ROS in alpha-tocopheryl succinate-induced mitochondrial permeabilization. *Int. J. Cancer.* 127 : 1823—1832.
- Goldkorn T., Ding T. 1997. The rise and fall of ceramide and 1,2-diacylglycerol (DAG): modulation by transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1) and by epidermal growth factor (EGF). *Adv. Exp. Med. Biol.* 400A : 461—472.
- Goldkorn T., Mendelsohn J. 1992. Transforming growth factor beta modulates phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and proliferation of A431 cells. *Cell Growth Differ.* 3 : 101—109.
- Gu X., Song X., Dong Y., Cai H., Walters E., Zhang R., Pang X., Xie T., Guo Y., Sridhar R., Califano J. A. 2008. Vitamin E succinate induces ceramide-mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 14 : 1840—1848.
- Haga A., Funasaka T., Niinaka Y., Raz A., Nagase H. 2003. Autocrine motility factor signaling induces tumor apoptotic resistance by regulations Apaf-1 and Caspase-9 apoptosome expression. *Int. J. Cancer.* 107 : 707—714.
- Han Y., Jiang Q., Gao H., Fan J., Wang Z., Zhong F., Zheng Y., Gong Z., Wang C. 2015. The anti-apoptotic effect of polypeptide from *Chlamys farreri* (PCF) in UVB-exposed HaCaT cells involves inhibition of iNOS and TGF- $\beta$ 1. *Cell Biochem. Biophys.* 71 : 1105—1115.
- Hu W., Xu R., Zhang G., Jin J., Szulc Z. M., Bielawski J., Han Y. A., Obeid L. M., Mao C. 2005. Golgi fragmentation is associated with ceramide-induced cellular effects. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 1555—1567.
- Kanai K., Kikuchi E., Mikami S., Suzuki E., Uchida Y., Kodaira K., Miyajima A., Ohigashi T., Nakashima J., Oya M. 2010. Vitamin E succinate induced apoptosis and enhanced chemosensitivity to paclitaxel in human bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci.* 101 : 216—223.
- Kaneyuki U., Ueda S., Yamagishi S., Kato S., Fujimura T., Shibata R., Hayashida A., Yoshimura J., Kojiro M., Oshima K., Okuda S. 2007. Pitavastatin inhibits lysophosphatidic acid-induced proliferation and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic smooth muscle cells by suppressing Rac-1-mediated reactive oxygen species generation. *Vascul. Pharmacol.* 46 : 286—292.
- Kim H., Hwang J. S., Woo C. H., Kim E. Y., Kim T. H., Cho K. J., Kim J. H., Seo J. M., Lee S. S. 2008. TNF-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. *Exp. Mol. Med.* 40 : 167—175.
- Kline K., Yu W., Sanders B. G. 2001. Vitamin E: mechanisms of action as tumor cell growth inhibitors. *J. Nutr.* 131 : 161S—163S.
- Kruspig B., Zhivotovsky B., Gogvadze V. 2013. Contrasting effects of  $\alpha$ -tocopheryl succinate on cisplatin- and etoposide-induced apoptosis. *Mitochondrion.* 13 : 533—538.
- Kurokawa K., Itoh R. E., Yoshizaki H., Nakamura Y. O., Matsuda M. 2004. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 1003—1010.
- Lefranc F., Brotchi J., Kiss R. 2005. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J. Clin. Oncol.* 23 : 2411—2422.
- Neuzil J., Svensson I., Weber T., Weber C., Brunk U. T. 1999. alpha-Tocopheryl succinate-induced apoptosis in Jurkat T cells involves caspase-3 activation, and both lysosomal and mitochondrial destabilisation. *FEBS Lett.* 445 : 295—300.
- Neuzil J., Swettenham E., Wang X. F., Dong L. F., Stapelberg M. 2007a. alpha-Tocopheryl succinate inhibits angiogenesis by disrupting paracrine FGF2 signalling. *FEBS Lett.* 581 : 4611—4615.
- Neuzil J., Tomasetti M., Zhao Y., Dong L. F., Birringer M., Wang X. F., Low P., Wu K., Salvatore B. A., Ralph S. J. 2007b. Vitamin E analogs, a novel group of «mitocans», as anticancer agents: the importance of being redox-silent. *Mol. Pharmacol.* 71 : 1185—1199.
- Ni J., Chen M., Zhang Y., Li R., Huang J., Yeh S. 2003. Vitamin E succinate inhibits human prostate cancer cell growth via modulating cell cycle regulatory machinery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 : 357—363.
- Pinilla I., Piazzuelo E., Jiménez P., Polo V., Larrosa J. M., Abecia E., Honrubia F. M. 2000. Inhibitory effect of alpha tocopherol succinate on fibroblast wound healing. *Arch. Soc. Esp. Otol. Mol.* 75 : 383—388.
- Prasad K. N., Edwards-Prasad J. 1982. Effects of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. *Cancer Res.* 42 : 550—555.
- Prasad K. N., Edwards-Prasad J. 1992. Vitamin E and cancer prevention: recent advances and future potentials. *J. Amer. Coll. Nutr.* 11 : 487—500.
- Prochazka L., Dong L. F., Valis K., Freeman R., Ralph S. J., Turanek J., Neuzil J. 2010. alpha-Tocopheryl succinate causes mitochondrial permeabilization by preferential formation of Bak channels. *Apoptosis.* 15 : 782—794.
- Qadir M. I., Parveen A., Ali M. 2015. Cdc42 : role in cancer management. *Chem. Biol. Drug Des.* 86 : 432—439.
- Rohlena J., Dong L. F., Kluckova K., Zabalova R., Goodwin J., Tilly D., Stursa J., Pecinova A., Philimonenko A., Hozak P., Banerjee J., Ledvina M., Sen C. K., Houstek J., Coster M. J., Neuzil J. 2011. Mitochondrially targeted  $\alpha$ -tocopheryl succinate is anti-angiogenic: potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing. *Antioxid. Redox Signal.* 15 : 2923—2935.
- Savitskaya M. A., Vildanova M. S., Kisurina-Evgenieva O. P., Smirnova E. A., Onischenko G. E. 2012. Mitochondrial pathway of  $\alpha$ -tocopheryl succinate-induced apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Acta Naturae.* 4 : 88—94.
- Scanlon C. S., Van Tubergen E. A., Inglehart R. C., D'Silva N. J. 2013. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J. Dent. Res.* 92 : 14—21.

- Shiau C. W., Huang J. W., Wang D. S., Weng J. R., Yang C. C., Lin C. H., Li C., Chen C. S. 2006. alpha-Tocopheryl succinate induces apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 function. *J. Biol. Chem.* 281 : 11 819—11 825.
- Singh P. K., Wise S. Y., Ducey E. J., Fatanmi O. O., Elliott T. B., Singh V. K. 2012.  $\alpha$ -Tocopherol succinate protects mice against radiation-induced gastrointestinal injury. *Radiat. Res.* 177 : 133—145.
- Singh V. K., Brown S. D., Kao T.-C. 2010. Alpha-tocopherol succinate protects mice from gamma-radiation by induction of granulocyte-colony stimulating factor. *Int. J. Rad. Biol.* 86 : 12—21.
- Sporn M. B. 1996. The war on cancer. *Lancet.* 347 : 1377—1381.
- Tomasetti M., Strafella E., Staffolani S., Santarelli L., Neuzil J., Guerrieri R. 2010. alpha-Tocopheryl succinate promotes selective cell death induced by vitamin K3 in combination with ascorbate. *Br. J. Cancer.* 102 : 1224—1234.
- Turley J. M., Sanders B. G., Kline K. 1992. RRR-alpha-tocopheryl succinate modulation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cell proliferation and differentiation. *Nutr. Cancer.* 18 : 201—213.
- Wang D., Chuang H. C., Weng S. C., Huang P. H., Hsieh H. Y., Kulp S. K., Chen C. S. 2009. alpha-Tocopheryl succinate as a scaffold to develop potent inhibitors of breast cancer cell adhesion. *J. Med. Chem.* 52 : 5642—5648.
- Yamamoto S., Tamai H., Ishisaka R., Kanno T., Arita K., Kobuchi H., Utsumi K. 2000. Mechanism of alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of promyelocytic leukemia cells. *Free Radic.* 33 : 407—418.
- Yarrow J. C., Perlman Z. E., Westwood N. J., Mitchison T. J. 2004. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol.* 4 : 21.
- You H., Yu W., Munoz-Medellin D., Brown P. H., Sanders B. G., Kline K. 2002. Role of extracellular signal-regulated kinase pathway in RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced differentiation of human MDA-MB-435 breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 33 : 228—236.
- You H., Yu W., Sanders B. G., Kline K. 2001. RRR-alpha-tocopheryl succinate induces MDA-MB-435 and MCF-7 human breast cancer cells to undergo differentiation. *Cell Growth Differ.* 12 : 471—480.
- Yu W., Heim K., Qian M., Simmons-Menchaca M., Sanders B. G., Kline K. 1997. Evidence for role of transforming growth factor-beta in RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human MDA-MB-435 breast cancer cells. *Nutr. Cancer.* 27 : 267—278.
- Yu W., Sanders B. G., Kline K. 2002. RRR-alpha-tocopheryl succinate induction of DNA synthesis arrest of human MDA-MB-435 cells involves TGF-beta-independent activation of p21Waf1/Cip1. *Nutr. Cancer.* 43 : 227—236.

Поступила 7 VIII 2017

#### ALPHA-TOCOPHERYL SUCCINATE SELECTIVELY AFFECTS MORPHOLOGY AND MOTILITY OF NORMAL AND TUMOR EPITHELIAL CELLS

M. A. Savitskaya,<sup>1</sup> G. E. Onischchenko

Biological Faculty, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192;

<sup>1</sup> e-mail: nakomis@mail.ru

Alpha-tocopheryl succinate ( $\alpha$ -TS) is vitamin E derivate with potential antitumor properties. In this effect of  $\alpha$ -TS on morphology and motility of epidermoid human carcinoma cells of A431 line and immortalized non-homogenous human keratinocytes of the NaCaT line was studied. Phase contrast and fluorescent microscopy, *in vitro* wound healing assay (scratch test) and scanning electron microscopy were used. Both cell lines showed a change in cell shape, reorganization of the actin cytoskeleton, smoothing of the cell surface, disappearance of microvillae and suppression of cell motility. These effects are similar in both cell lines, but in HaCaT cell line they occur after of treatment with higher doses than these for A431. Thus, we have demonstrated the selectivity of  $\alpha$ -TS action on tumor cells derived from human skin stratified epithelia. The results of this work can be useful for further investigations focused on developing of antitumor agents with selective action toward tumor cells.

Key words: alpha-tocopheryl succinate, actin filaments, cytoskeleton, scratch test, cell motility.