

## ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ДІЇ РІЗНИХ ФЛАВОНОЇДІВ НА ПРОХОДЖЕННЯ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ТА ІНДУКЦІЇ АПОПТОЗУ У КЛІТИНАХ ЛІНІЇ МТ-4 ГОСТРОЇ ЛІМФОБЛАСТНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ ЛЮДИНИ

О. О. ФІЛЬЧЕНКОВ, М. П. ЗАВЕЛЕВИЧ

*Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології  
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;  
e-mail: a\_philch@onconet.kiev.ua*

У клітинах лінії МТ-4 гострої лімфобластної лейкемії людини проведено порівняльний аналіз цитотоксичності та апоптогенних ефектів *in vitro* восьми різних за структурою флавоноїдів трьох головних підкласів: флавонів, флавонолів та флаванонів. Для ідентифікації апоптотичних клітин аналізували розподіл ДНК методом проточної цитометрії. Вивчали вплив флавоноїдів на проходження клітинами циклу та активацію каспази-3. Серед флавоноїдів, які досліджували, 7,8-бензофлавонон, флавонон, кверцетин, хризин та галангін виявились ефективними індукторами апоптозу. В концентраціях, які відповідають ЕД<sub>50</sub>, ці флавоноїди активують каспазу-3. Вплив флавоноїдів на проходження клітинами МТ-4 циклу був різним. Так, флавонон та морин спричинюють накопичення клітин у фазі G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, а 7,8-бензофлавонон, нарингенін, кверцетин, апігенін – у фазі G<sub>2</sub>/М. Не виявлено кореляції між здатністю до індукції апоптозу та фазоспецифічними ефектами флавоноїдів, які досліджували. Обговорюється зв'язок між хімічною структурою та апоптогенною активністю флавоноїдів.

*Ключові слова:* гостра лімфобластна лейкемія, флавоноїди, апоптоз, каспаза-3, проточна цитометрія.

До класу флавоноїдів належать близько 5000 природних біологічно активних поліфенолів із двома ароматичними кільцями, що мають в основі ароматичне потрійне гетероциклічне кільце. Більшість з них є похідними 2-фенілбензопірану (флавану) або 2-фенілбензо-γ-пірану (флавонону). Різноманітність флавоноїдів досягається за рахунок комбінацій заміників (-ОН, -ОСН<sub>3</sub>, -СН<sub>3</sub> та ін. груп) в ароматичних кільцях, глікозилювання та димеризації. Деякі флавоноїди виявляють протипухлинну активність [1, 2]. Механізми протипухлинної дії флавоноїдів включають модуляцію сигнальних шляхів, залучених до регуляції проліферації пухлинних клітин, індукцію апоптозу або диференціювання клітин, а також інгібування ангіогенезу та подолання лікарської резистентності. Слід зазначити, що реалізація цитотоксичних ефектів флавоноїдів може відбуватися за рахунок різних процесів загибелі клітин. Наприклад, інкубація клітин HL60 промієлоцитарної лейкемії людини з нарингеніном призводить (в залежності від концентрації препарату) до активації каспазо-залежного апоптозу або некрозу, пов'язаного з виснаженням АТР та руйнацією мітохондрій [3]. З іншого боку, існує вибірковість цитотоксичної дії флавоноїдів по відношенню

до клітин певного генезу: морин є індуктором апоптозу клітин LNCaP раку передміхурової залози [4], але не раку ротової порожнини людини [5]. Вплив індивідуальних флавоноїдів на проходження пухлинними клітинами мітотичного циклу також може бути різним. Наприклад, у клітинах OE33 аденокарциноми стравоходу кверцетин викликає зупинку клітинного циклу в S-фазі, тоді як у клітинах гепатоми (лінія HepG<sub>2</sub>) або лімфоми (лінія Namalwa) у відповідь на дію цього флавоноїду визначають відповідно блокування проходження фаз G<sub>1</sub> або G<sub>2</sub>/М [6–8].

Зважаючи на широкий спектр фізіологічної та фармакологічної активності флавоноїдів (антиоксидантна, протизапальна, антитоксична, протиінфекційна, протипухлинна), визначення кореляцій між структурними особливостями окремих флавоноїдів та їхніми ефектами становить значний інтерес. Показана залежність між хімічною структурою флавоноїдів та їхньою антиоксидантною активністю [9], а також здатністю до інгібування експресії молекул адгезії (ICAM-1, VCAM-1 та E-селектин) [10] або пригніченням активності цитохрому P-450 [11]. Водночас дані щодо кореляції між апоптогенною активністю у відношенні пухлинних клітин і фазоспецифічними ефектами

флавоноїдів та їхньою хімічною структурою досить фрагментарні та суперечливі.

Мета дослідження полягала у порівняльному аналізі впливу восьми флавоноїдів різних підкласів на проходження клітинами гострої лімфобластної лейкемії мітотичного циклу та індукцію їхньої загибелі шляхом апоптозу.

### Матеріали і методи

У роботі використовували перещеплювану лінію МТ-4 гострої лімфобластної лейкемії людини, яку було отримано із банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Клітини культивували у поживному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% сироватки ембріонів великої рогатої худоби (Сангва, Україна) та 2 ммоль/л L-глутаміну при +37 °С. Клітини розводили свіжим поживним середовищем при досягненні щільності 800–900 тис. на 1 мл.

Стокові розчини препаратів флавонону, хризину (5,7-дигідроксифлавоно), апігеніну (4',5,7-тригідроксифлавоно), галангіну (3,5,7-тригідроксифлавоно), нарингеніну (5,7,4'-тригідроксифлаванон), кверцетину (3,3',4',5,7-флавоно), морину (3,5,7,2',4'-пентагідроксифлавоно) та 7,8-бензофлавоно (препарати фірми Sigma-Aldrich Chemical Co., США) у концентрації 10 ммоль/л готували на диметилсульфоксиді. Препарати додавали до клітин у логарифмічній фазі їх росту у зазначених концентраціях; у контрольні клітини вносили диметилсульфоксид у дозах, аналогічних кінцевим концентраціям розчинника у дослідних культурах. Як стандартний індуктор апоптозу використовували протипухлинний препарат етопозид (Brystol-Myers Squibb SpA, Італія).

Життєздатність клітин визначали за забарвленням досліджуваних препаратів трипановим синім. По закінченні інкубування з відповідними флавоноїдами цитоцентрифужні препарати клітин фарбували за Папенгеймом. Зразки клітин, оброблених флавоноїдами, також аналізували за допомогою проточного цитофлуориметра FACScan фірми Becton Dickinson (США). Для проведення цитометричного аналізу клітини інкубували у розчині пропідію йодиду (50 мкг/мл) з 0,1% цитрату натрію та 0,1% тритону X-100. Для виявлення активної форми каспази-3 у клітинах використовували набір mAb Apoptosis Kit FITC (BD Bioscience Pharmingen, США) згідно з інструкцією фірми-виробника. Флуоресценцію клітин оцінювали, використовуючи комп'ютерні

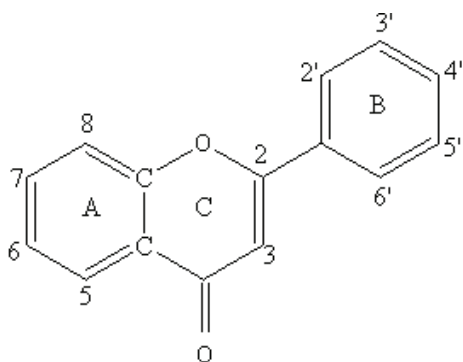
програми ModFit LT 2.0 (Verity Software House, США) та CELLQuest (BD Bioscience).

Одержані результати обробляли статистично із застосуванням *t*-критерію Стьюдента.

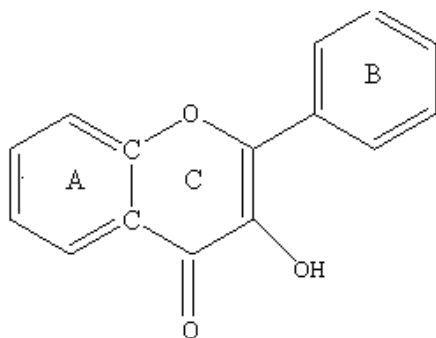
### Результати та обговорення

Досліджували ефекти речовин трьох підкласів флавоноїдів: флавононів (флавоно, 7,8-бензофлавоно, хризин, апігенін), флавонолів (галангін, кверцетин, морин) та флаванонів (нарингенін). Як видно з рис. 1, зазначені флавоноїди різняться за наявністю, кількістю та розташуванням гідроксильних груп та наявністю або відсутністю подвійного зв'язку між 2-м та 3-м атомами вуглецю С-кільця. Крім того, у 7,8-бензофлавоно є додаткове бензолне кільце, сполучене з А-кільцем. Досліджувані флавоноїди суттєво розрізняються за токсичністю. Найбільш токсичними для клітин МТ-4 виявились бензофлавоно, хризин та галангін (ЕД<sub>50</sub> < 25 мкмоль/л), помірно токсичними є флавоно, кверцетин та апігенін (ЕД<sub>50</sub> 50–100 мкмоль/л), морин та нарингенін не виявляють ознак токсичності у концентраціях до 100 мкмоль/л (подаліше підвищення дози було лімітовано концентрацією розчинника). Для досліджень всі флавоноїди застосовували у концентраціях, близьких до відповідних значень ЕД<sub>50</sub>, а морин та нарингенін – у дозі 100 мкмоль/л.

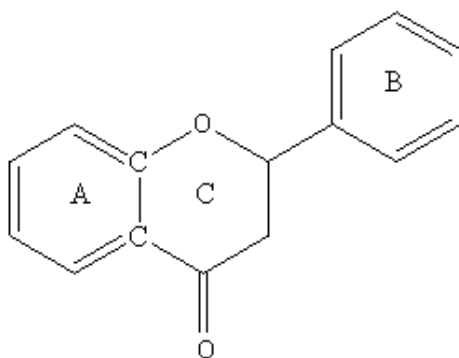
На рис. 2 представлено дані фазозалежності ефектів флавоноїдів на клітинах лінії МТ-4. При дії кверцетину, апігеніну, нарингеніну і 7,8-бензофлавоно спостерігається збільшення кількості клітин у G<sub>2</sub>/М-фазі мітотичного циклу, тоді як оброблення клітин флавононом або морином призводить до накопичення клітин у фазі G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. При цьому галангін та хризин суттєво не впливають на розподіл за фазами клітинного циклу. Слід зазначити, що наявність додаткового бензолного кільця в молекулі бензофлавоно призводить до збільшення токсичності у порівнянні з такою флавоно та зміни фазоспецифічності щодо блокування проходження мітотичного циклу з G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> на фазу G<sub>2</sub>/М. Дія етопозиду (у дозі ЕД<sub>50</sub>), який було обрано як типовий індуктор апоптозу, що належить до подофілінів, призводить до чіткої зупинки клітинного циклу у фазі G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (рис. 2). Зазначимо, що за даними літератури ефекти тих самих флавоноїдів в інших клітинних системах відрізнялись від даних, наведених вище у випадку клітин МТ-4. Так, апігенін призводив до накопичення пухлинних клітин передміхурової залози у



Флавоны	Положення гідроксильних груп					
	3	5	7	2'	3'	4'
Флавоны	–	–	–	–	–	–
7,8-Бензофлавоны	–	–	–	–	–	–
Хризин	–	ОН	ОН	–	–	–
Апігенін	–	ОН	ОН	–	–	ОН



Флавонолы	Положення гідроксильних груп					
	3	5	7	2'	3'	4'
Галангін	ОН	ОН	ОН	–	–	–
Морин	ОН	ОН	ОН	ОН	–	ОН
Кверцетин	ОН	ОН	ОН	–	ОН	ОН



Флаваноны	Положення гідроксильних груп					
	3	5	7	2'	3'	4'
Нарингенін	–	ОН	ОН	–	–	ОН

Рис. 1. Хімічна структура і розташування гідроксильних груп у молекулах флавоноїдів, які досліджували

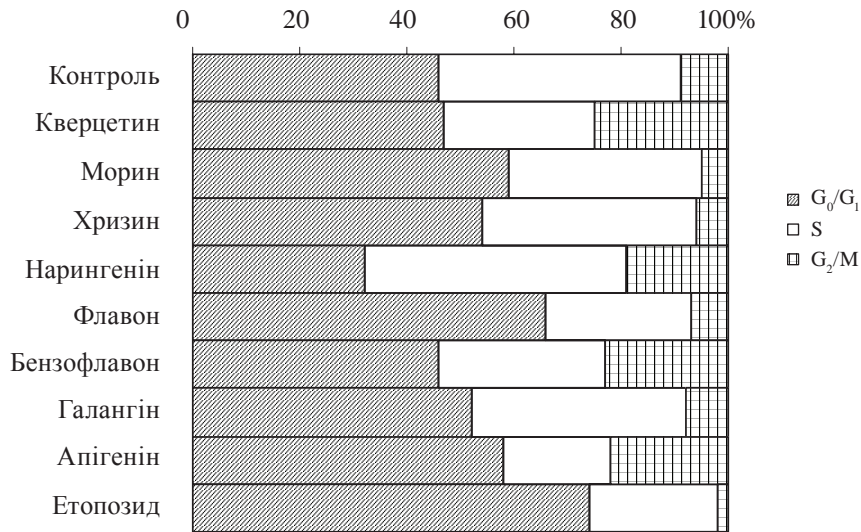


Рис. 2. Розподіл клітин лінії МТ-4 за фазами мітотичного циклу у разі дії (24 год) флавоноїдів, які досліджували

фазі G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> [12], морин викликав зупинку циклу в G<sub>2</sub>/M у лейкемічних клітинах [13], а галангін блокував цикл у клітинах K562 у фазі G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> [14]. Ми вважаємо, що такі розбіжності між нашими даними та результатами інших дослідників можуть бути обумовлені різницею між використаними клітинними моделями або ж концентраціями препаратів флавоноїдів.

Аналіз апоптотичної активності препаратів флавоноїдів показав, що за дії 7,8-бен-

зофлавіону, хризину, галангін, флавіону та кверцетину вміст гіподиплоїдних клітин збільшується, тоді як морин, нарингенін та апігенін фактично не індують апоптоз у клітинах лінії МТ-4 (рис. 3). Слід зазначити, що препарати (галангін та хризин), які не впливають на розподіл за фазами клітинного циклу, тим не менш виявилися індукторами апоптозу. Таким чином, здатність флавоноїдів до ініціації апоптотичної загибелі не пов'язана (або ж пов'язана

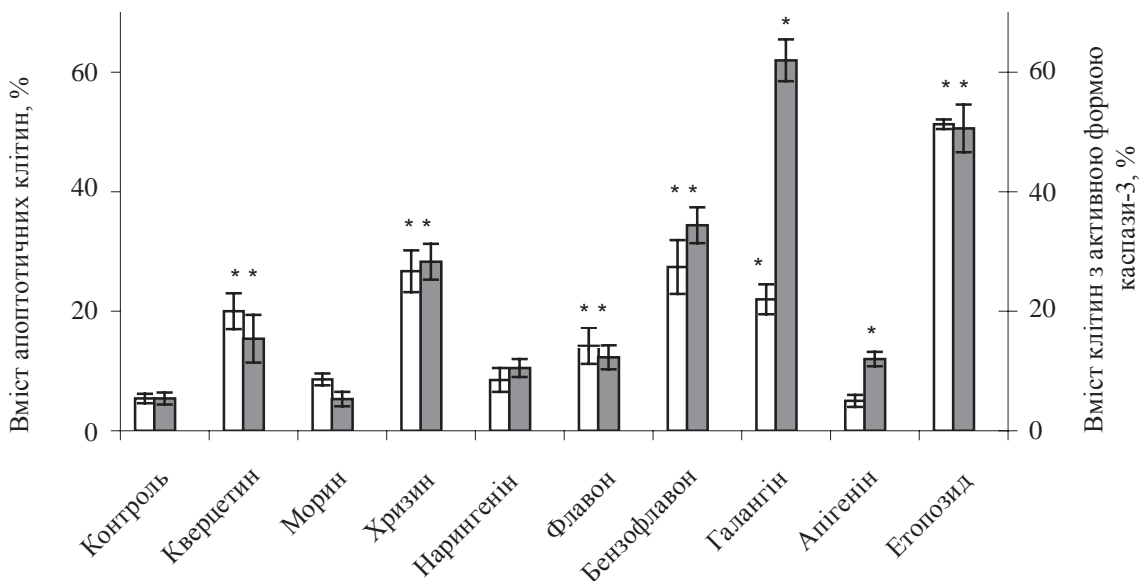


Рис. 3. Індуція апоптозу (світлі стовпчики) та активація каспази-3 (темні стовпчики) у клітинах лінії МТ-4 за дії (24 год) флавоноїдів, які досліджували. \* Різниця у порівнянні з контролем вірогідна, P < 0,05

тільки частково) з їхньою спроможністю зупинити у клітинах мітотичний цикл.

Для того аби встановити каспазозалежний характер дії досліджуваних флавоноїдів, проводили цитометричний аналіз клітин лінії МТ-4 із застосуванням FITC-кон'югованих моноклональних антитіл С92-605 проти активної форми каспази-3. Відомо, що активація цієї ефекторної ендopeптидази відбувається у процесі ініціації апоптозу, який запускається за різними механізмами (активація «рецепторів смерті», пошкодження мітохондрій або ендоплазматичного ретикулула) [15]. Виявилось, що активація каспази-3 у досліджуваних клітинах МТ-4 флавоноїдами у цілому співвідноситься із рівнем апоптозу (рис. 3).

Багатьма дослідниками цитотоксична активність флавоноїдів щодо пухлинних клітин зводиться виключно до антиоксидантних властивостей цих сполук. Однак останнім часом показано, що цитотоксична активність флавоноїдів в експерименті не корелює з антиоксидантною активністю [16]. Про це саме свідчить і проведене нами порівняння структурних особливостей молекул флавоноїдів та їхньої апоптогенної та антиоксидантної активності. Слід нагадати, що найбільш значущими особливостями структури флавоноїдів у реалізації їхнього антиоксидантного потенціалу вважають наявність двох гідроксильних груп (у положеннях 3' і 4') у В-кільці, подвійного зв'язку між 2 та 3-м атомами вуглецю С-кільця (у сполученні з 4-оксогрупою), а також гідроксильних груп у положеннях С-3, С-5 та/або С-7 (два останніх в А-кільці) [9, 17]. Серед досліджених флавоноїдів апоптоз не викликають нарингенін, в молекулі якого подвійний зв'язок між 2 та 3-м атомами вуглецю С-кільця відсутній, і апігенін і морин, в молекулі яких такий зв'язок присутній. Серед флавоноїдів, що індукують апоптоз, є речовини, які містять гідроксильні групи, так і речовини, у молекулах яких жодної гідроксильної групи немає (флавіон і 7,8-бензофлавіон). При цьому наявність додаткового бензольного кільця в молекулі бензофлавіону призводить до збільшення токсичності та апоптогенної активності у порівнянні з такими у флавіону. Однак залежності між індукцією апоптозу у клітинах МТ-4 та кількістю гідроксильних груп у молекулах досліджуваних флавоноїдів не простежується (рис. 3). Нещодавно Q. Zhang зі співавторами [18] також показали, що цитотоксичні ефекти

флавіонів та флавонолів не залежать від загальної кількості гідроксильних груп у молекулах цих речовин.

Певні закономірності відзначаються щодо зв'язку між активністю флавоноїдів та положенням гідроксильних груп. Так, хризин та галангін, на відміну від кверцетину, морину і нарингеніну, не мають гідроксильних груп у В-кільці. Саме хризин та галангін є найбільш потужними індукторами апоптозу у клітинах МТ-4 серед усіх досліджуваних нами флавоноїдів. У той самий час, морин і нарингенін є практично нетоксичними флавоноїдами. Виняток у цьому відношенні складає лише кверцетин. Порівняно з хризином апігенін має додаткову гідроксильну групу в положенні 4' В-кільця. При цьому хризин є більш токсичним ніж апігенін. Морин відрізняється від кверцетину лише наявністю гідроксильних груп в ортоположенні В-кільця (2',4' замість 4',5'), що також є важливим для властивості цих сполук індукувати апоптоз (8,6 в порівнянні з 21,1%).

Таким чином, на відміну від антиоксидантної активності, наявність подвійного зв'язку між 2-м і 3-м атомами вуглецю С-кільця, присутність гідроксильних груп та їхня кількість не є визначальними факторами апоптозіндукувальної активності досліджуваних флавоноїдів. Водночас виявляється залежність між положенням окремих гідроксильних груп у В-кільці та апоптогенною активністю флавоноїдів. Отже, навіть незначні зміни у структурі флавоноїдів можуть посилювати або послаблювати ефективність індукції апоптозу у даній клітинній системі. Наведені дані свідчать про перспективність подальшого вивчення залежності між структурою флавоноїдів та їхніми функціональними властивостями, зокрема здатністю до індукції апоптозу у пухлинних клітинах з метою відбору або створення нових протипухлинних речовин.

Робота виконана при частковому фінансуванні теми «Фундаментальні основи геноміки і протеоміки» (№ 107U002244), яка виконується у рамках цільової програми НАН України. Автори висловлюють подяку канд. біол. наук В. М. Михайленку за надання препаратів флавоноїдів і канд. біол. наук Н. М. Храновській за допомогу в аналізі даних цитометричних досліджень.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
ВЛИЯНИЯ РАЗНЫХ ФЛАВОНОИДОВ  
НА ПРОХОЖДЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО  
ЦИКЛА И ИНДУКЦИЮ АПОПТОЗА  
В КЛЕТКАХ ЛИНИИ МТ-4 ОСТРОГО  
ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА  
ЧЕЛОВЕКА**

*А. А. Фильченков, М. П. Завелевич*

Институт экспериментальной  
патологии, онкологии и радиобиологии  
им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев;  
e-mail: a\_philch@onconet.kiev.ua

Проведен сравнительный анализ цитотоксичности и апоптогенных эффектов *in vitro* восьми разных по структуре флавоноидов, относящихся к трем основным подклассам: флавонам, флавонолам и флаванонам, на клетках линии МТ-4 острого лимфобластного лейкоза человека. Для идентификации апоптотических клеток анализировали распределение ДНК методом проточной цитометрии. Изучали влияние флавоноидов на прохождение клетками цикла и активацию каспазы-3. Среди исследованных флавоноидов 7,8-бензофлаван, флаван, кверцетин, хризин и галангин оказались эффективными индукторами апоптоза. В концентрациях, соответствующих ЭД50, эти флавоноиды активировали каспазу-3. Влияние флавоноидов на прохождение клеточного цикла было различным. Флаван и морин вызывали накопление клеток в фазе  $G_0/G_1$ , а 7,8-бензофлаван, нарингенин, кверцетин, апигенин – в фазе  $G_2/M$ . Не было обнаружено корреляции между способностью к индукции апоптоза и фазоспецифическими эффектами исследуемых флавоноидов. Обсуждается связь между химической структурой и апоптогенной активностью флавоноидов.

**Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, флавоноиды, апоптоз, каспаза-3, проточная цитометрия.

**COMPARATIVE EFFECTS  
OF FLAVONOIDS ON CELL CYCLE  
DISTRIBUTION AND APOPTOSIS  
IN HUMAN ACUTE LYMPHOBLASTIC  
LEUKEMIA MT-4 CELLS**

*A. A. Philchenkov, M. P. Zavelevych*

R. E. Kavetsky Institute of Experimental  
Pathology, Oncology and Radiobiology, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: a\_philch@onconet.kiev.ua

**S u m m a r y**

In the present study, 8 flavonoids of three major flavonoid subgroups, namely flavones, flavonols and flavanones were tested for their cytotoxic and apoptogenic effects in human acute lymphoblastic leukemia MT-4 cells *in vitro*. Apoptotic cells were identified by DNA flow cytometric analysis. The effects of the flavonoids on the cell cycle patterns and activation of caspase-3 were also examined. Among the flavonoids tested, 7,8-benzoflavone, flavone, quercetin, chrysin, and galangine were shown to be effective apoptosis inducers. At concentrations corresponding to ED50, the flavonoids mentioned above exerted varying degrees of caspase-3 activation in MT-4 cells. The flavonoid-treated cells demonstrated different cell cycle profiles with accumulation in either  $G_0/G_1$  (flavone, morin) or  $G_2/M$  (7,8-benzoflavone, naringenin, quercetin, apigenin) phase. The induction of apoptosis did not correlate with phase-specific effects of flavonoid assayed. The relationship between chemical structure and apoptogenic activity of flavonoids tested is discussed.

**Key words:** acute lymphoblastic leukemia, flavonoids, apoptosis, caspase-3, flow cytometry.

1. Aggarwal B. B., Shishodia S. // *Biochem. Pharmacol.* – 2006. – **71**, N 10. – P. 1397–1421.
2. Kale A., Gawande S., Kotwal S. // *Phytother. Res.* – 2008. – **22**, N 5. – P. 567–577.

3. *Kanno S., Tomizawa A., Ohtake T. et al.* // *Toxicol. Lett.* – 2006. – **166**, N 2. – P. 131–139.
4. *Romero I., Paez A., Ferruelo A. et al.* // *BJU Int.* – 2002. – **89**, N 9. – P. 950–954.
5. *Brown J., O'Prey J., Harrison P. R.* // *Carcinogenesis.* – 2003. – **24**, N 2. – P. 171–177.
6. *Cheong E., Ivory K., Doleman J. et al.* // *Ibid.* – 2004. – **25**, N 10. – P. 1945–1952.
7. *Mu C., Jia P., Yan Z. et al.* // *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* – 2007. – **29**, N 3. – P. 179–183.
8. *Фильченков А. А., Завелевич М. П., Храновская Н. Н., Михайленко В. М.* // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 4. – С. 112–119.
9. *Heijnen C. G., Haenen G. R. M. M., Oostveen R. M. et al.* // *Free Radic. Res.* – 2002. – **36**, N 5. – P. 575–581.
10. *Lotito S. B., Frei B.* // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, N 48. – P. 37102–37110.
11. *Tsujimoto M., Horie M., Honda H. et al.* // *Biol. Pharm. Bull.* – 2009. – **32**, N 4. – P. 671–676.
12. *Shukla S., Gupta S.* // *Cell Cycle.* – 2007. – **6**, N 9. – P. 1102–1114.
13. *Kuo H. M., Chang L. S., Lin Y. L. et al.* // *Anticancer Res.* – 2007. – **27**, N 1A. – P. 395–405.
14. *Tolomeo M., Grimaudo S., Di Cristina A. et al.* // *Cancer Lett.* – 2008. – **265**, N 2. – P. 289–297.
15. *Philchenkov A.* // *J. Cell. Mol. Med.* – 2004. – **8**, N 4. – P. 432–444.
16. *Nadova S., Miadokova E., Cipak L.* // *Neoplasma.* – 2007. – **54**, N 3. – P. 202–206.
17. *Middleton E., Jr., Kandaswami C., Theoharides T. C.* // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – **52**, N 4. – P. 673–751.
18. *Zhang Q., Zhao X.-H., Wang Z.-J.* // *Toxicol. in Vitro.* – 2009. – **23**, N 5. – P. 797–807.

Отримано 30.06.2009