

Індукція апоптозу в злоякісних лімфоїдних клітинах людини *in vitro* та *ex vivo* під впливом кверцетину

М.П. Завелевич¹, Н.М. Храновська², В.О. Надгорна¹, Л.М. Барановська¹,
О.О. Фільченков¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України

²Інститут онкології АМН України

Серед численних агентів, що здатні індукувати апоптоз лейкозних клітин, особливу увагу останнім часом привертають сполуки природного походження, що належать до біофлавоноїдів. Ці сполуки мають ряд особливостей в плані індукції апоптозу та диференціювання, оскільки володіють вибірковою активністю по відношенню до лейкозних та нормальних клітин [1]. На відміну від цитотоксичних хіміопрепаратів, ці речовини відносно нетоксичні в діапазоні концентрацій, при яких вони індукують апоптоз лейкозних клітин, до того ж вони можуть сенсibilізувати клітини до наступної індукції в них апоптозу [2]. Внутрішньоклітинні мішені дії цих сполук на геномному та протеомному рівні залишаються нез'ясованими. Відомо, зокрема, що флавоноїди специфічно впливають на низку сигнальних систем, що регулюють апоптоз та клітинний цикл [3].

Мета роботи полягала в дослідженні апоптотичної дії кверцетину на клітинних моделях лейкозу *in vitro* та клітинах хворих на різні форми лімфопроліферативних процесів, а також можливості модифікації за допомогою кверцетину чутливості до апоптозу, індукованого інгібітором ДНК-топоізомерази II.

Кверцетин ("Сигма", США) застосовували в спиртовому розчині. Його біологічну дію вивчали на культурах перещеплюваних ліній злоякісних лімфоїдних клітин: Т-клітинної лінії МТ-4 та В-клітинної лінії Namalwa. Апоптотичні клітини виявляли мікроскопічно в пофарбованих

цитопрепаратах та методом проточної цитометрії клітин, забарвлених йодистим пропідієм.

Як видно з рис. 1, кверцетин в застосованих дозах незначною мірою впливає на кінетику росту клітин МТ-4, деяке уповільнення росту спостерігається в разі інкубації з кверцитином в дозі 28 мкг/мл.

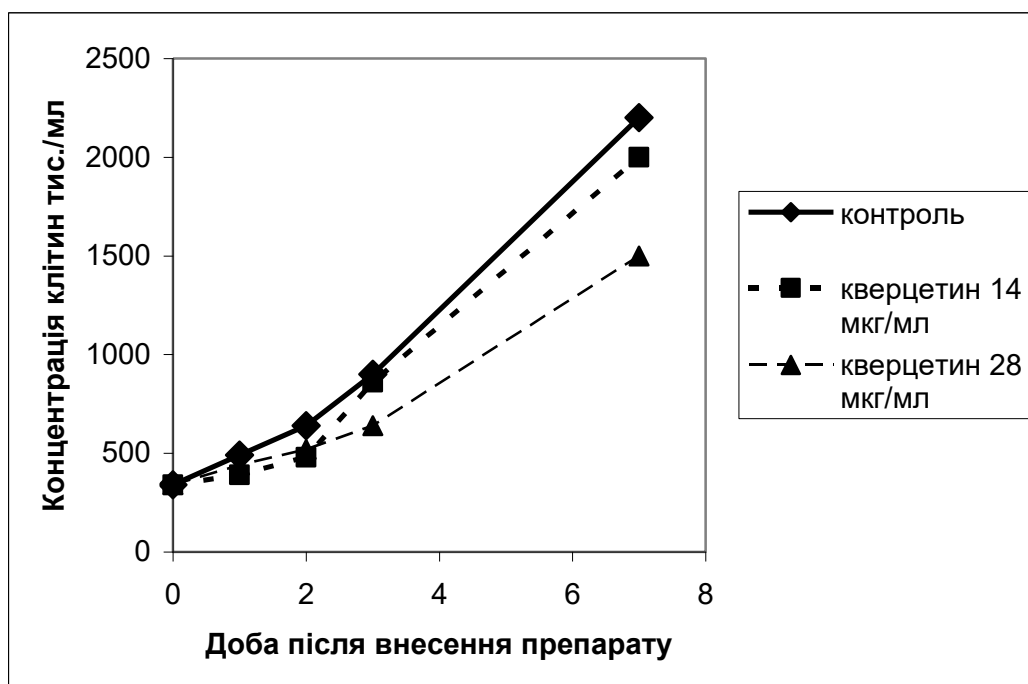


Рис. 1. Кінетика росту клітин МТ-4 при дії кверцетину

Модулювання апоптотичних ефектів за допомогою кверцетину вивчали на клітинах Namalwa і МТ-4, які попередньо інкубували з кверцитином у концентрації 28 мкг/мл, а потім обробляли вепезидом у дозах (20–40 мкМ), достатніх для індукції апоптозу. Результати обрахунку апоптотичного індексу (AI) наведені в табл. 1. Як бачимо, попередня інкубація клітин з кверцитином призводить у подальшому до збільшення цитотоксичності інгібітору ДНК-топоізомерази II, використаного як індуктор апоптозу в цих клітинах. При цьому таке збільшення цитотоксичності, спостерігалось у випадку клітин Namalwa, які є відносно резистентними до індукції апоптозу інгібіторами цієї групи. Водночас сам по собі кверцетин в діапазоні застосованих нетоксичних концентрацій не має явної апоптогенної активності на клітинах досліджуваних ліній.

Табл. 1. Вплив кверцетину на індукцію апоптозу вепезидом в культурах злоякісних лімфоїдних клітин людини

Лінія клітин	Термін попередньої інкубації з кверцетином, год.	AI при індукції апоптозу вепезидом в пробах, попередньо інкубованих з кверцетином, %	AI при індукції апоптозу вепезидом без попередньої інкубації з кверцетином, %
Namalwa	24	47	39
Namalwa	96	51	40
MT-4	24	52	42

Для проведення експериментів *ex vivo* клітини периферійної крові хворих на лімфопроліферативні захворювання фракціонували в градієнті фіколу-верографіну та культивували в живильному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10–15% ембріональної сироватки корів. Реакцію клітин на дію індукторів апоптозу визначали кілька разів на протязі першого тижня культивування. Дані представлені в табл. 2. Результати дослідження пофарбованих йодистим пропідієм клітин двох хворих за допомогою проточної цитометрії, наведено на рис. 2.

Табл. 2. Індукція апоптозу в первинних культурах лімфоїдних клітин з периферійної крові хворих на різні форми лімфопроліферативних процесів

№	Заклучення за результатами імунофенотипування та/або клінічний діагноз	Імунофенотип	Індукція апоптозу (AI, %)		Примітка
			кверцетином 14 мкг/мл	вепезидом 20 мкг/мл	
1	Поліклональний лімфоцитоз		42	90	
2	НЗЛ маргінальної зони в фазі лейкомізації	HLA-DR+, CD10–, CD19+, CD22+, CD20+, CD23–, κ–, λ+	Немає індукції	18	
3	В-клітинна ХЛЛ / НЗЛ з малих лімфоцитів в фазі лейкомізації	HLA-DR+, CD10–, CD19+, CD22–, CD23+, κ+, λ–	62	н/в	Ефект зберігається при концентрації кверцетину 1,4 мкг/мл

4	НЗЛ маргінальної зони	CD10-, CD19+, CD22+, CD20+, CD23-	35	12	Ефект зберігається при концентрації кверцетину 1,4 мкг/мл
5	В-ХЛЛ	HLA-DR+, CD5+, CD10-, CD19+, CD22-, CD20+, CD23+, κ+, λ-	54	50	Ефект зберігається при концентрації кверцетину 1,4 мкг/мл
6	Поліклональний лімфоцитоз ПК-клітин	CD2+, CD8+, CD16+, CD57+	Немає індукції	Немає індукції	
7	ХЛЛ з ВГЛ, Т-клітинний варіант	HLA-DR-, CD2+, CD8+, CD10-, CD16+, CD20-, CD25-, CD43+, CD56-, CD57+	22	15	Парадоксальна відповідь на меншу концентрацію кверцетину 1,4 мкг/мл: AI=76%
8	Анемія (невстановленої природи) з відсутністю моноклонової проліферації Т або В-лімфоцитів		17	54	
9	ХЛЛ з ВГЛ, Т-клітинний варіант	CD2+, CD3+, CD7+, CD8+, CD19-, CD20-, NK+	90	85	
10	НЗЛ маргінальної зони в фазі лейкомізації	HLA-DR+, CD10-, CD19+, CD20+, CD22-, CD23-, CD43+, κ-, λ+	34	68	
11	В-ХЛЛ	HLA-DR+, CD5+, CD10-, CD19+, CD22-, CD20+, CD23+, CD25-, κ-, λ+	33	53	

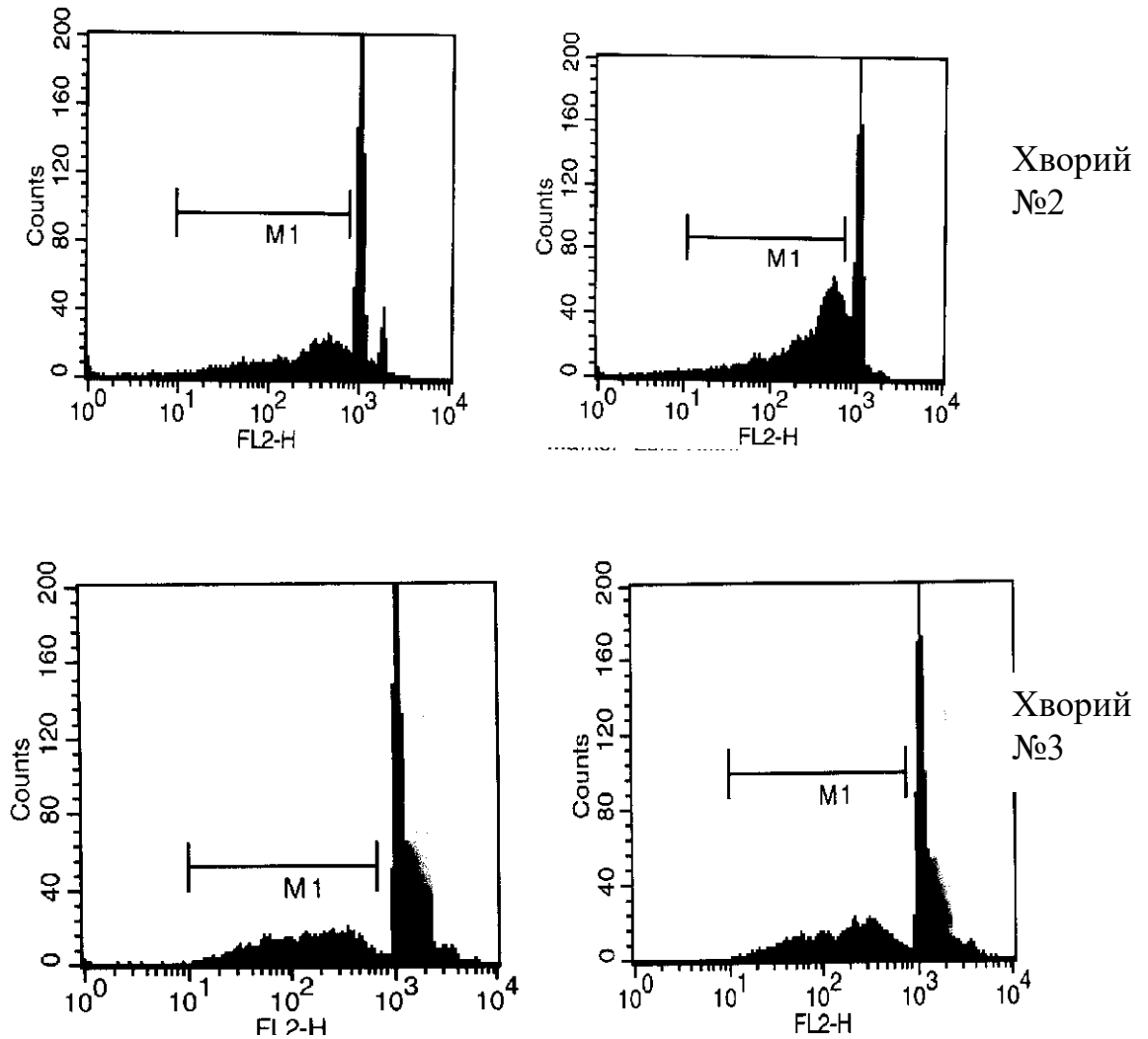


Рис. 2. Типові профілі розподілу ДНК оброблених кверцетином первинних культур злякисних лімфоїдних клітин з периферійної крові двох хворих (зліва – без кверцетину, справа – після додавання кверцетину)

Аналіз рівня індукції апоптозу досліджуваних клітин дозволив виявити істотні відмінності в їхній чутливості до дії кверцетину. Так, в двох випадках (негоджкінська злякисна лімфома з малих лімфоцитів і ХЛЛ з Т-ВГЛ) апоптотична загибель клітин була значною ($> 60\%$). У разі негоджкінської злякисної лімфоми маргінальної зони і поліклонального лімфоцитозу із збільшеним вмістом ПК-клітин кверцетин практично не діяв. У всіх інших випадках чутливість до цього індуктора апоптозу виявилася помірно вираженою. Причому, у двох випадках (негоджкінська злякисна лімфома з

малих лімфоцитів і ХЛЛ з Т-ВГЛ) висока чутливість до кверцетину виявлялася навіть при його концентрації 1,4 мкг/мл, тобто на порядок меншої тієї, яка використовувалася в переважній більшості експериментів, як в первинних культурах, так і в перещеплюваних лініях злоякісних лімфоїдних клітин. Зазначимо, що в одному випадку ХЛЛ з Т-ВГЛ відзначали парадоксальне збільшення апоптоз-індукуючої здатності при зменшенні дози кверцетину.

Таким чином, виявлено, що перещеплювані лінії лімфоїдних злоякісних клітин менш чутливі до кверцетину в порівнянні з первинними культурами клітин хворих на злоякісні лімфопроліферативні захворювання. Разом з тим, кверцетин виявляє проапоптотичну активність в перещеплюваних лініях лімфоїдних злоякісних клітин МТ-4 та Namalwa. Продемонстровано також розбіжності у чутливості між індукцією апоптозу кверцетином і цитотоксичним препаратом вепезидом, в одних і тих же первинних культурах лімфоїдних злоякісних клітин. Залишається нез'ясованим, чи пов'язані істотні відмінності в чутливості до кверцетину з властивостями стовбурних лейкозних клітин, що притаманні конкретній формі лейкозу, або ж з індивідуальними особливостями цих клітин в кожному з випадків.

Література

1. **Liesveld JL, Abboud CN, Lu C, McNair C, Menon A, Smith A, Rosell K, Rapoport AP.** Flavonoid effects on normal and leukemic cells. *Leuk Res.* 2003; 27 (6): 517-527.
2. **Russo M, Palumbo R, Mupo A, Tosto M, Iacomino G, Scognamiglio A, Tedesco I, Galano G, Russo GL.** Flavonoid quercetin sensitizes a CD95-resistant cell line to apoptosis by activating protein kinase C alpha. *Oncogene* 2003; 22 (21): 3330-3342.
3. **Faderl S, Estrov Z.** Commentary: effect of flavonoids on normal and leukemic cells. *Leuk Res.* 2003; 27 (6): 471-473.