

Вплив хелідоніну, хелеритрину та сангвінаріну на клітинний цикл лінії лімфобластної лейкемії людини МТ-4: порівняльний аналіз із їх ДНК-зв'язувальною здатністю

М.П. Завелевич¹, О.О. Фільченков¹, Н.М. Храновська², Ю.Л. Осип^{3,4},
В.О. Камінський^{3,4}, М.Д. Луцик³, Р.С. Стойка^{3,4}

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

²Інститут онкології АМН України, Київ

³Інститут біології клітини НАН України, Львів

⁴Львівський національний університет ім. І. Франка, Львів

Алкалоїди чистотілу та їхні похідні можуть уповільнювати проліферацію та викликати загибель злоякісних клітин, завдяки чому препарати на їхній основі запропоновані як засоби протипухлинної терапії [1, 2]. Механізми дії таких препаратів на клітини-мішені залишаються недостатньо вивченими, зокрема залишається дискусійним питання про безпосередній зв'язок між антипроліферативними та цитотоксичними ефектами алкалоїдів та їхньою здатністю до взаємодії з ДНК клітин.

Мета роботи – дослідити дію індивідуальних алкалоїдів чистотілу хелідоніну, хелеритрину та сангвінаріну щодо індукції апоптозу та розподіл за фазами циклу клітин лімфобластної лейкемії людини МТ-4 в зіставленні з ДНК-інтеркаляторними властивостями цих речовин.

Досліди проводили на перещеплюваній лінії клітин гострої лімфобластної лейкемії людини МТ-4, які культивували за загальноприйнятим методом. Алкалоїди хелідонін, хелеритрин та сангвінарін отримували із кореневищ чистотілу (*Chelidonium majus L.*) на основі методики, описаній у [3]. З цих препаратів готували маточні спиртові

1% розчини, аліквоту вносили у клітинну суспензію для досягнення заданої кінцевої концентрації. Клітини культивували у присутності зазначених алкалоїдів на протязі 24 год. Апоптотичні клітини виявляли цитологічним методом після фарбування за Романським-Гімза, а також використовуючи проточну цитометрію клітин, забарвлених йодистим пропідієм. Розподіл клітин за фазами клітинного циклу аналізували у проточному цитофлуориметрі за допомогою математичної програми "ModFit". Для кількісної оцінки інтеркалюючої здатності визначали динаміку термоденатурації ДНК сперми лосося (Sigma Chem. Co.) у присутності зростаючих концентрацій алкалоїдів. Ступінь спорідненості індивідуальних алкалоїдів до ДНК оцінювали шляхом визначення концентрацій алкалоїду, що викликає половинний ефект приросту температури плавлення ДНК [4].

Усі три досліджувані алкалоїди виявляли токсичну дію щодо лінії МТ-4 клітин гострої лімфоїдної лейкемії приблизно в однаковому діапазоні концентрацій. У концентрації 10 мкг/мл відзначено практично повну загибель клітин через 24 год. Для виявлення апоптозу клітин та їх розподілу за фазами клітинного циклу препарати алкалоїдів застосовували у концентрації 1-2 мкг/мл, при цьому токсичність алкалоїдів на протязі 24 годин була виражена помірно.

Результати визначення відсотка апоптотичних клітин та максимального підвищення температури плавлення ДНК за присутності алкалоїдів чистотілу наведено в таблиці. На рисунку показано розподіл клітин за фазами циклу під впливом зазначених алкалоїдів.

Таблиця. Індукція апоптозу індивідуальними алкалоїдами в клітинах МТ-4 та інтеркалююча здатність цих алкалоїдів щодо стандартного препарату ДНК

Алкалоїди	Відсоток апоптотичних клітин	Приріст температури плавлення ДНК, °С
Контроль (без алкалоїдів)	5,8	—
Хелідонін	33,7	0,5
Хелеритрин	8,7	16,1
Сангвінарин	19,1	15,0

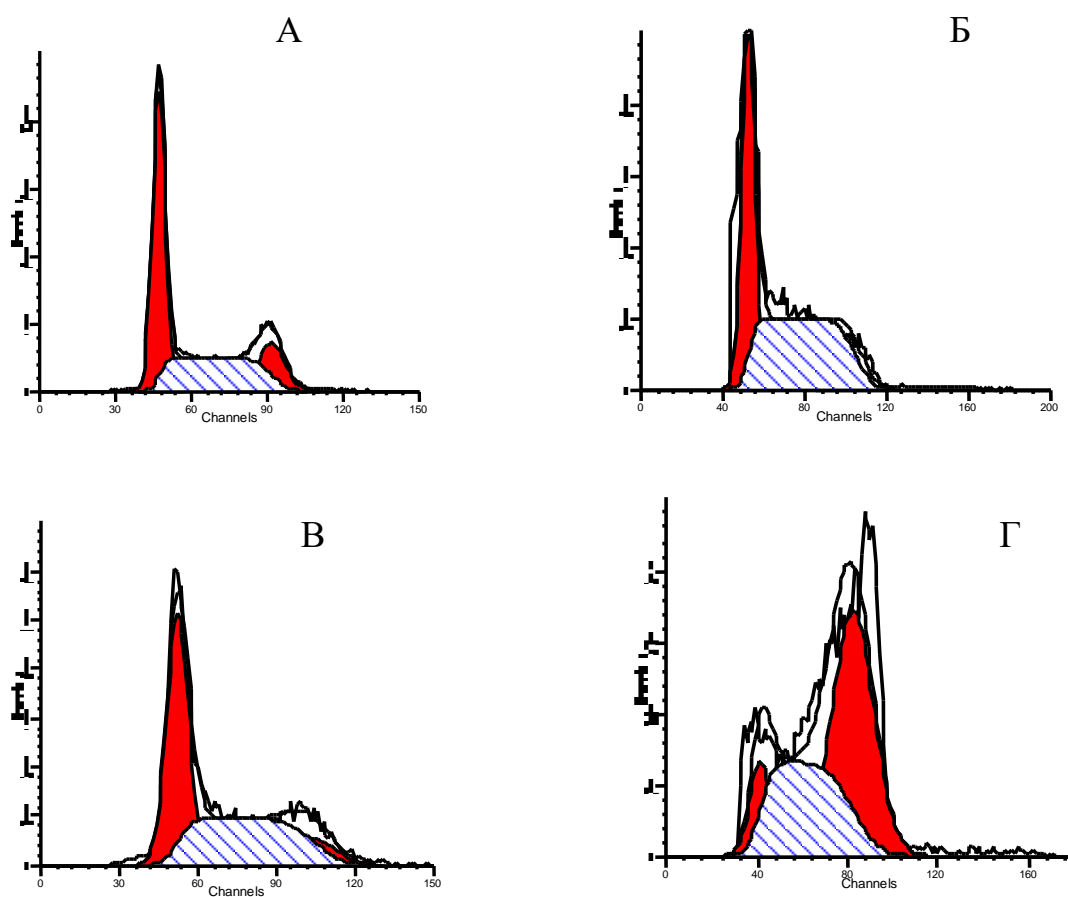


Рисунок. Розподіл клітин МТ-4 за фазами клітинного циклу при дії алкалоїдів чистотілу: А – інтактні клітини; Б – хелеритрин; В – сангвінарин; Г – хелідонін.

Як видно із наведених даних, найвища апоптоз-індукуюча здатність серед досліджуваних алкалоїдів виявлена у хелідоніну. При цьому, на відміну від хелеритрину та сангвінаріну, цей алкалоїд призводить до суттєвого збільшення частки клітин у фазі G_2/M до $53 \pm 3\%$ у порівнянні з $15 \pm 4\%$ у контролі. Це відбувається за рахунок значного зменшення клітин у фазі G_0/G_1 ($10 \pm 4\%$ у порівнянні з $48 \pm 2\%$ у контролі). Такий ефект подібний до дії препарату амітозин та сумарного екстракту алкалоїдів чистотілу [5]. Хелеритрин та сангвінарін у випробуваному діапазоні концентрацій спричинюють деяке зменшення частки клітин у G_2/M фазі із відповідним збільшенням її, в основному, частки клітин у фазі S ($46 \pm 4\%$ у порівнянні з $33 \pm 3\%$ у контролі). Ці алкалоїди мають подібну структуру, є сильними інтеркаляторами і зв'язуються з ДНК з високою спорідненістю, що зумовлено копланарною конформацією їх молекул та їх енергетично вигідним розміщенням між парами азотистих основ у спіралі ДНК. Це приводить до стабілізації спіралі (підвищення температури плавлення) і, відповідно, до гальмування процесу реплікації. Цим можна пояснити накопичення клітин у S фазі в присутності сангвінаріну і хелеритрину. Низький вміст апоптотичних клітин у популяції в присутності цих алкалоїдів може бути зумовлений їх високою токсичністю і швидкою загибеллю і руйнуванням клітин без їх накопичення.

Хелідонін відрізняється від інших алкалоїдів більшою гідрогенізацією циклів і відхиленням площини циклів від копланарності, що перешкоджає входженню молекули хелідоніну між пари основ ДНК і призводить до втрати алкалоїдом ДНК-інтеркаляторної здатності. Із даних літератури відомо, що хелідонін має властивість зв'язуватись із тубуліном і є антимітотичним чинником [6]. Він є також відносно менш цитотоксичним чинником в порівнянні з іншими алкалоїдами. Цими властивостями можна пояснити накопичення значної кількості клітин у G_2/M фазі із ознаками апоптозу.

Література

1. **Потопальский А.И.** Препараты чистотела в биологии и медицине. Киев, Наукова думка, 1992. 200 сс.
2. **Taborska E., Vochorakova H., Dostal J., Paulova H.** The greater celandine (*Chelidonium majus L.*) – review of present knowledge. Ceska Slov. Farm. 1995; **44**: 71-75.
3. **Slavik J., Slavikova L.** Minor alkaloids from *Chelidonium majus L.* Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 1977; **42**: 2686-2693.
4. **Schmeller T., Latz-Bruning B., Wink M.** Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defense against microorganisms and herbivores. Phytochem. 1997; **44**: 257-266.
5. **Завелевич М.П., Храновская Н.Н., Заика Л.А., Потопальская Ю.А., Гриневич Ю.А., Фильченков А.А.** Остановка клеточного цикла в точке G₂/M и индукция апоптоза в злокачественных лимфоидных клетках человека при действии амитозина *in vitro*. У: Матеріали I Всеукраїнської науково-практичної конференції "Вітчизняні протипухлинні препарати: аналіз сьогодення та погляд в майбутнє". Київ, 14-15 жовтня 2004 р. Додаток до журналу "Онкологія" 2004; **6**: 10.
6. **Colombo M.L., Bosisio E.** Pharmacological activities of *Chelidonium majus L.* Pharmacol. Res. 1996; **33**: 127-134.