

CITOTOKSIČNOST POLIFENOLNIH/FLAVONOIDNIH SPOJEVA U KULTURI LEUKEMIJSKIH STANICA

Pavle JOSIPOVIĆ i Nada ORŠOLIĆ

Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Primljeno u srpnju 2008.

Prihvaćeno u rujnu 2008.

Flavonoidne sastavnice propolisa biološki su aktivne tvari koje posjeduju antioksidativna, protutumorska, imunomodulacijska i protuupalna svojstva. Istražili smo citotoksično djelovanje polifenolnih spojeva (kvercetin, kavena kiselina, krizin, naringenina i naringina) na različite linije leukemijskih stanica (MOLT, JURKAT, HL-60, RAJI, U937). Stanice su inkubirane u mediju RPMI-1640 obogaćenom 10 %-nim fetalnim telećim serumom, pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5 % CO₂, uz dodatak polifenolnih/flavonoidnih spojeva različitih koncentracija (100 μg mL⁻¹, 50 μg mL⁻¹, 25 μg mL⁻¹ i/ili 12,5 μg mL⁻¹). Utvrđeno je da citotoksičnost flavonoida ovisi o vrsti i koncentraciji; najjači citotoksični učinak imaju kvercetin te krizin i kavena kiselina. Krizin i/ili naringenin primijenjeni na U937 i HL-60-stanice stimuliraju proliferaciju stanica, što upućuje na bifazni učinak istraživanih spojeva na monocitne leukemijske stanice. Dobiveni rezultati upućuju na potrebu daljnjih istraživanja učinkovitosti flavonoida na molekularnoj razini.

KLJUČNE RIJEČI: *HL-60, JURKAT, kavena kiselina, krizin, kvercetin, MOLT, naringenin, propolis, RAJI, U937-stanice*

Hematopoieza je proces nastanka i kontrole održavanja broja krvnih stanica. Ona objedinjuje mijelopoiezu, koja stvara eritrocite, granulocite, monocite i trombocite u koštanoj srži te limfopoiezu koja stvara T i B-limfocite, prvobitno u koštanoj srži, ali daljnja diferencijacija, sazrijevanje i proliferacija odvijaju se u timusu, limfnim čvorovima i slezeni. Odjeljak nezrelih stanica iz kojih nastaju hematopoietske stanice naziva se odjeljak matičnih stanica. Leukemija je maligna bolest s obilježjem proliferacije nezrelih i funkcionalno oštećenih matičnih stanica. Posljedice zloćudne preobrazbe matičnih stanica različito su istaknute u obje loze krvnih stanica. Leukemija je izrazito heterogena bolest s mnogo različitih tipova i podtipova. S obzirom na tijek nastanka, leukemija može biti akutna i/ili kronična, dok s obzirom na tip matičnih stanica u kojima je došlo do maligne promjene razlikujemo limfocitnu i/ili mijeloidnu

(mijelogenu) leukemiju. Daljnja podjela na podtipove ovisi o razini diferenciranosti i zrelosti matičnih stanica na kojima se zbila zloćudna preobrazba.

U svojim pokusima istražili smo citotoksični učinak polifenolnih/flavonoidnih spojeva na različite kulture leukemijskih stanica. Rabili smo: leukemijske stanice T (JURKAT, MOLT), stanica Burkittova limfoma (RAJI), leukemijske monocitne stanice difuznoga histiocitnog limfoma (U937) i stanice akutne promijelocitne leukemije (HL-60).

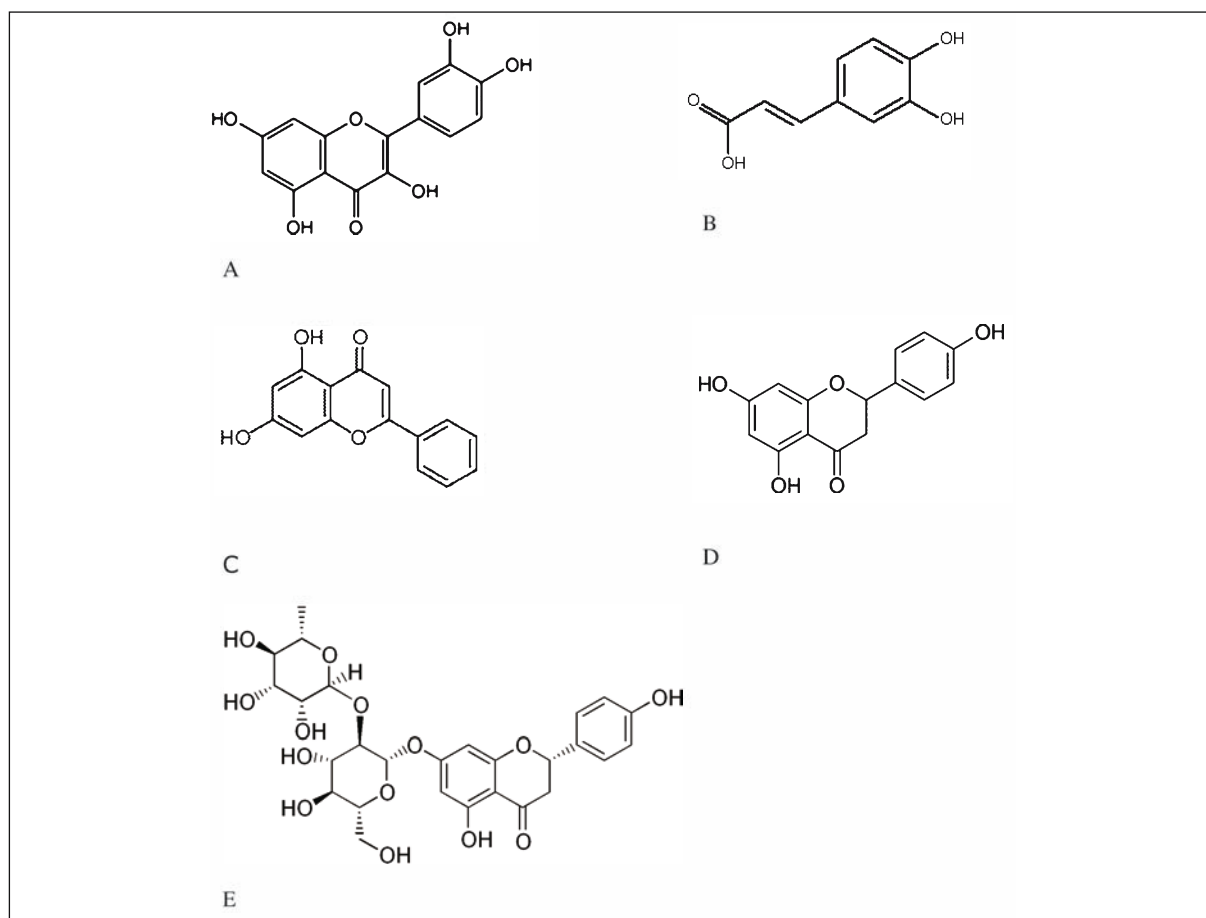
Flavonoidi su polifenolni spojevi koje nalazimo u hrani biljnog podrijetla te medu i propolisu. Imaju različite biološke aktivnosti, od protualergijskih, protuoksidativnih, protuupalnih do neutralizacije slobodnih radikala, a mogu djelovati i protutumorski (1, 2). Jaki su inhibitori ključnih enzima važnih u prijenosu signala (1); inhibiraju protein kinazu C (PKC), tirozin kinaze ili lipidne kinaze, a djeluju i na različite

metaboličke putove poput aktivacije glikolitičkih enzima ili sinteze proteina, blokiraju stanični ciklus u G_0/G_1 ili G_1/M -fazi ovisno o njihovoj strukturi te modelu stanice na koju djeluju. Dokazani su vezanje flavonoida na estrogenske receptore tipa II, regulacija i modulacija staničnog rasta te poticanje apoptoze različitih staničnih linija (3). Flavonoidi iskazuju selektivni učinak prema stanicama tumora te smanjuju popratne štetne učinke zračenja i kemoterapeutika (1, 4). Potvrđeno je da flavonoidi svojim djelovanjem mogu pojačati protuproliferativni učinak nekih kemoterapeutika, međutim nema dovoljno podataka o njihovoj međusobnoj međureakciji te molekularnim mehanizmima djelovanja (4).

S obzirom na to da ljudi normalnom dnevnom prehranom (voće, povrće) unose 1 g do 2 g flavonoida (5, 6), logično je i razmišljanje o primjeni i mogućim biološkim učincima temeljenima na njihovoj jedinstvenoj strukturi. U istraživanju smo rabili pet u prirodi (voće, povrće) najzastupljenijih flavonoida, radi usporedbe njihova citotoksičnog djelovanja na pet različitih kultura leukemijskih stanica (T i B-limfocita te monocita).

Kvercetin je u biljnom svijetu široko rasprostranjen flavonoidni aglikon iz skupine flavonola, prisutan u hrani (voće, povrće, začini), čaju (*Camellia sinensis* L), vinu, a brojni istraživači upozoravaju da je i najučinkovitiji flavonoid. Kvercetin je jak protuoksidans te pozitivno djeluje na ljudsko zdravlje s obzirom na to da ima protualergijsko, protuupalno, protureumatsko, protuvirusno i protukancerogeno djelovanje (1, 2, 4).

Kavena kiselina i njezini derivati široko su rasprostranjeni fenol-karboksilni spojevi u biljnim vrstama te se posljedično u organizam unose kao i flavonoidi hranom. Količina kavene kiseline u nekoj biljci ovisi o vrsti. Kavena kiselina je protuoksidans, te smanjuje proizvodnju aflatoksina vrste *Aspergillus flavus* za više od 95 %, što joj otvara mogućnost primjene kao prirodnog protufungicida (7). Oralna primjena visokih koncentracija kavene kiseline (CA) u štakora uzrokuje intestinalne papilome, što upućuje na kancerogena svojstva kavene kiseline (8). Združena primjena visokih doza različitih protuoksidanata, uključujući i kavenu kiselinu, uzrokuje smanjen rast tumora kod pokusnih životinja. Potkožna i oralna primjena CA i njezinih derivata, primjerice CAPE



Slika 1 Strukturne formule kvercetina (A), kavene kiseline (B), krizina (C), naringenina (D), naringina (E)

(fenetil ester kavene kiseline) smanjuje metastaze pluća i rast tumora (9). Rezultati Orbana i sur. (10) potvrđuju terapijski potencijal CA i CAPE, a njihovi učinci posredovani su selektivnom supresijom enzimske aktivnosti metaloproteinaza 9 (MMP-9) i regulacijom transkripcije nuklearnog čimbenika kapa B (NF-kB), kao i katalitičke aktivnosti MMP-9 (10). Rezultati drugih istraživanja također pokazuju da CA i CAPE suprimiraju akutnu upalnu reakciju, što pruža veliku mogućnost primjene u praksi (10). Ova protuupalna i protutumorska svojstva također dolaze do izražaja kod zaštite stanica kože izloženih UV zračenju (11).

Krizin je flavonoid-aglikon iz skupine izoflavona i široko je rasprostranjen u biljnim vrstama. U komercijalne svrhe rabi se kao inhibitor aromatizacije androsterona i testosterona u estrogen (12), a potvrđen je njegov protutumorski učinak (13).

Naringenin ima protuoksidativna, protuupalna i imunomodulacijska svojstva, veže slobodne radikale te je pokretač metabolizma ugljikohidrata (14). Temeljem rezultata brojnih pokusa naringenin značajno smanjuje oksidativni stres u stanici te sprječava oštećenja molekule DNA u uvjetima *in vitro* (14). Naringenin je sadržan u grejpu (*Citrus paradisi*) kao i naringin.

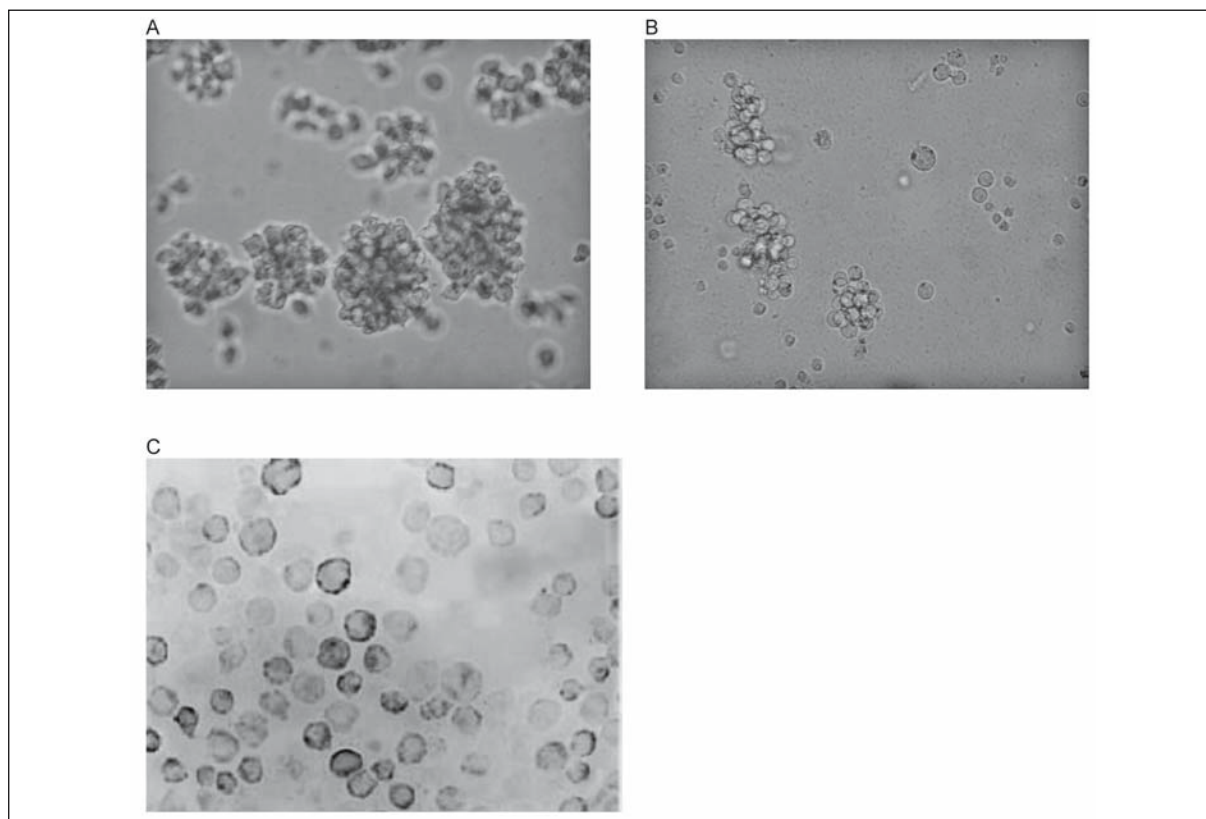
Naringin je flavonoid-glikozid, odnosno konjugat naringenina s molekulom šećera ramnoglukozi. Poznata su njegova protuoksidativna i protukancerogena svojstva, a dokazano je i da smanjuje razinu kolesterola u krvi i pomaže pri mršavljenju (13, 15). Naringin se metabolizira hidrolizom u metabolit naringenin koji pojačava farmakokinetiku mnogih lijekova (16).

Cilj je ovog istraživanja utvrditi te usporediti citotoksični učinak polifenola na nekoliko linija ljudskih leukemijskih stanica u uvjetima *in vitro*.

MATERIJALI I METODE

Flavonoidi

U istraživanju su upotrijebljeni polifenoli: kvercetin-dihidrat (QU) (Fluka, BioChemica, Švicarska), kavena kiselina, krizin, naringenin i naringin (Sigma, Njemačka), a njihove strukturne formule prikazane su na slici 1. Flavonoidi su pripremljeni neposredno prije obrade stanica u koncentracijama od $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Flavonoidi su otopljeni u DMSO-u; koncentracija DMSO-a bila je $\leq 0,1 \%$.



Slika 2 Fotomikrografije prikazuju izgled neobrađenih stanica HL60 (A), RAJI (B) i U937 (C) pod inverznim sujetlosnim mikroskopom pri povećanju od 160 puta.

Stanične kulture i uvjeti kultiviranja stanica

U istraživanju smo rabili sljedeće stanične linije: MOLT, JURKAT, U937, HL-60 i RAJI stanice (slika 2).

Stanice u koncentraciji 2×10^4 mL⁻¹ kultivirali smo 72 sata u mikrotitarskim pločicama s 96 bunarčića (Falcon, Engleska) u RPMI-1640-mediju (Imunološki zavod, Zagreb) obogaćenom 10 %-tnim fetalnim telećim serumom (FCS) na temperaturi od 37 °C u inkubatoru, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂. Stanice su rasle u suspenziji i/ili grozdastim nakupinama, ovisno o staničnoj liniji. U uvjetima *in vitro* izlagane su flavonoidima različitih koncentracija: 100 μg mL⁻¹, 50 μg mL⁻¹, 25 μg mL⁻¹, 12,5 μg mL⁻¹. Kontrolne stanične linije držane su u RPMI-1640-mediju uz dodatak DMSO-a jednake koncentracije kao u otopini pripremljenih flavonoida (<0,1 %).

Svaki je pokus napravljen u triplicatu.

TEST CITOTOKSIČNOSTI *IN VITRO* (MTS-TEST)

U određivanju citotoksičnosti rabili smo MTS-test (CellTiter 96[®] AQ_{UEOUS} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, SAD) u kojem je citotoksični učinak flavonoida na različite leukemijske stanice utvrđen s pomoću tetrazolij soli MTS-a [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] i reagensa za hvatanje elektrona PMS-a (fenazin metosulfat) prema metodi po Mosmannu (17). Nakon obrade i inkubacije tijekom 72 sata, na stanice smo dodali boju MTS (20 μL po bunarčiću) te ih dodatno inkubirali na 37 °C tijekom tri sata. Vijabilne stanice uz pomoć enzima dehidrogenaze pretvaraju boju MTS u ljubičasti formazan. Formazan smo mjerili s pomoću ELISA (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assays) čitača (Bio-Rad, Model 550, Japan). Apsorbanciju smo mjerili na 490 nm. Postotak citotoksičnosti izračunali smo prema formuli:

$$\text{Citotoksičnost (\%)} = 1 - \frac{(\text{OD eksp. uzorka st.} - \text{SP})}{(\text{OD kontr. uzorka st.} - \text{SP})} \times 100$$

OD - optička gustoća

SP - slijepa proba

STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost triplikata ± standardna pogreška (SP) od tri neovisna pokusa. Rezultate smo obradili Studentovim *t*-testom

korištenjem računalnog programa za statističku obradu podataka STATISTICA 6.0 (Stats Soft Inc., SAD.). Razlika je smatrana statistički značajnom ako je $p < 0,05$.

REZULTATI

Rezultati citoksičnosti različitih koncentracija flavonoida na stanične kulture prikazani su na slici 3.

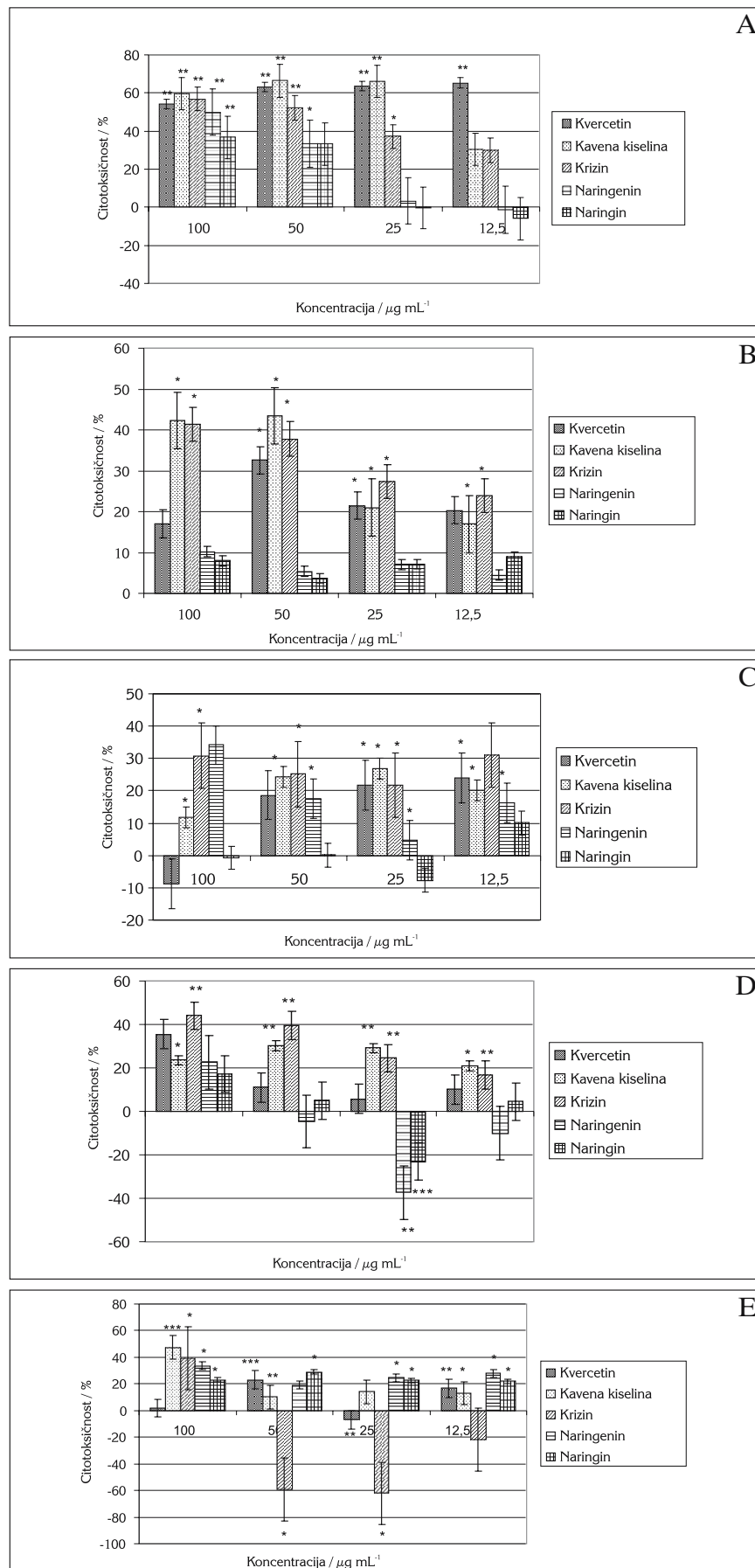
Najveći citotoksični učinak na stanice RAJI, neovisno o koncentraciji izazvao je kvercetin. Kavena kiselina pri najnižoj koncentraciji iskazuje smanjen citotoksični učinak (slika 3A). Citotoksični učinak krizina ovisan je o dozi; visoke doze uzrokuju veću citotoksičnost. Naringenin i naringin pokazuju slabiji citotoksični učinak na stanice RAJI u odnosu na druge istraživane flavonoide kod viših koncentracija (100 μg mL⁻¹ i 50 μg mL⁻¹), a kod nižih koncentracija nemaju nikakav utjecaj ili čak djeluju blago stimulativno na rast stanica.

Najveći citotoksični učinak na stanice JURKAT iskazuju kavena kiselina i krizin; citotoksični učinci utvrđeni nakon primjene svih navedenih koncentracija statistički značajno odstupaju u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Kvercetin pokazuje ujednačenu citotoksičnost (15 % do 30 %) neovisnu o koncentraciji, dok naringenin i naringin imaju slab citotoksični učinak neovisan o koncentraciji (slika 3B).

Nadalje, svi istraživani flavonoidi osim flavonoid-glikozida naringina imaju citotoksični učinak na stanice linije MOLT (slika 3C). Naringin djeluje stimulacijski na rast stanica MOLT neovisno o koncentraciji. Kvercetin i kavena kiselina iskazuju višu citotoksičnost pri manjim koncentracijama, a krizin i naringenin iskazuju učinak ovisan o dozi. Kvercetin u višim koncentracijama djeluje stimulacijski na rast stanica MOLT, a u nižim koncentracijama potiče citotoksičnost.

Flavonoidi primijenjeni u koncentraciji od 100 μg mL⁻¹ djeluju citotoksično na mijeloidne leukemijske stanice HL-60 (slika 3D). Kvercetin, kavena kiselina i krizin kod nižih koncentracija zadržavaju citotoksični učinak, dok naringenin pri koncentracijama od 50 μg mL⁻¹, 25 μg mL⁻¹ i 12,5 μg mL⁻¹ djeluje stimulacijski. Naringin u ovom pokusu pokazuje stimulacijsko djelovanje samo pri koncentraciji od 25 μg mL⁻¹.

Najveću toksičnost na stanice U937 ima kavena kiselina (47,36 %) pri koncentraciji od 100 μg mL⁻¹.



Slika 3 Citotoksični učinak polifenolnih/flavonoidnih spojeva na stanične linije RAJI (A); JURKAT (B), MOLT (C), HL-60 (D), i U937 (E). Svaka točka na histogramu predstavlja srednju vrijednost \pm SP od tri nezavisna pokusa napravljena u triplikatu. Postotak citotoksičnosti izračunali smo prema formuli: $\text{Citotoksičnost (\%)} = 1 - (\text{OD eksp. uzorka st.} - \text{SP} / \text{OD kontr. uzorka st.} - \text{SP}) \times 100$ OD - optička gustoća; SP - slijepa proba. Statistički značajno (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) različito u odnosu na kontrolnu skupinu.

Krizin je relativno citotoksičan pri najvišoj koncentraciji, dok u ostalim koncentracijama pokazuje jak stimulativni učinak (slika 3E).

RASPRAVA

Rezultati provedenog istraživanja pokazuju da citotoksičnost polifenola u uvjetima *in vitro* ovisi o njihovoj strukturi, koncentraciji i o vrsti (tipu) leukemijskih stanica. Usporedbom rezultata prethodnih radova (13) jasno je da flavonoidi kao sastavnice propolisa (etanolna otopina propolisa; EEP) imaju jači sinergistički učinak nego što ga imaju pojedinačno.

U literaturi se navodi da citoksičnost različitih flavonoida ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Plochman i sur. (18) pokazali su na stanicama JURKAT da već i male strukturne razlike u molekuli flavonoida značajno utječu na njihovu citoksičnost. Čimbenik citotoksičnosti vezan za strukturne razlike flavonoida zasigurno je prisutnost 4-karbonilne skupine uključene u inhibiciju sinteze masnih kiselina. Druga značajna osobitost pojačane citotoksične aktivnosti flavonoida je postojanje dvaju do triju dvostrukih veza koje formiraju planarnu strukturu A i C-prstena kostura flavonoida. Postojanje dvostrukih veza usko je povezano s učinkovitim vezanjem i inhibicijom P-glikoproteina (P-gp), membranskog prijenosnika odgovornog za izbacivanje kemoterapijskih tvari. Inhibicija ovoga važnog detoksifikacijskog sustava može pridonijeti pojačanoj citotoksičnosti. Rezultati naših istraživanja (slika 3) pokazuju da većina flavonoida ima citotoksični učinak na različite leukemijske stanice ovisan o dozi, ali neki od flavonoida pokazuju stimulacijski učinak (primjerice krizin u U937, naringenin i naringin u HL60). Ovi rezultati pokazuju da je potrebno istražiti molekularne mehanizme, kao i optimalne doze za njihovu moguću primjenu u kliničkoj praksi. Neki od mogućih molekularnih mehanizama prikazani su kako slijedi. Chen i sur. (19) dokazali su da kvercetin inhibira aktivnost pročišćenog proteasoma 20S i proteasoma 26S kod netaknutih JURKAT T-stanica, a osim toga potiče aktivaciju kaspaze-3 i cijepanje poli(ADP-riboza)polimeraze. Yoshida i sur. (20) u opsežnu istraživanju nekih flavonoida na različite linije tumorskih stanica zaključuju da kvercetin zaustavlja rast leukemijskih T-stanica ljudi u kasnoj G₁-fazi staničnog ciklusa, dok su Liesveld i sur. (21) pokazali smanjenu proliferaciju i vijabilnost AML-staničnih linija (U937) i primarnih blasta pacijenata s AML-om.

Kim i sur. (22) pokazuju da je broj –OH-skupina na B-prstenu flavonola slične kemijske strukture važan za njihovu citotoksičnost te protuoksidativnu aktivnost na stanice U937, a utječu i na proces angiogeneze endotelnih stanica, ekspresiju adhezijskih molekula i međustaničnu adheziju.

Park (23) upozorava da su flavonoidi (kvercetin, naringenin i naringin) potencijalni inhibitori procesa unosa glukoze u stanice U937 te tako inhibiraju rast leukemijskih stanica.

Temeljem ovih saznanja, a i na osnovi naših rezultata, flavonoidi imaju velik potencijal u kemoprevenciji tumora, posebice zbog toga što mogu potaknuti apoptozu te pokazuju selektivni učinak na tumorske stanice (9). Programirana stanična smrt može biti pokrenuta modulacijom različitih signalnih putova koji pridonose staničnoj smrti. Primjerice, kvercetin potiče apoptozu otpuštanjem citokroma c iz mitohondrija, aktivacijom kaspaza i regulacijom porodice Bcl-2 (24). Isti autor pokazuje da niske koncentracije kvercetina mogu aktivirati MAPK (mitogen-aktivirajuća protein kinaza) put, što uzrokuje ekspresiju gena opstanka (*c-fos* i *c-jun*) te obrambenih gena (glutathion-S-transferaza) koji pokreću mehanizme opstanka i obrane, dok visoke koncentracije kvercetina aktiviraju put kaspaze što izravno vodi u apoptozu. Kanno i sur. (25) pokazali su da je apoptoza potaknuta naringeninom u HL-60-stanicama posredovana kaspazom 3 i kaspazom 9, ali ne i kaspazom 8. Jedan od mehanizama kojim naringenin pokreće apoptozu povezan je s aktivacijom NF- κ B. Visoke koncentracije naringenina uzrokuju nekrotičnu staničnu smrt ispražnjenjem zaliha unutarstaničnog ATP-a.

Ti podaci, jednako kao i rezultati našeg istraživanja pokazuju da je koncentracija flavonoida odlučujući čimbenik koji potiče proliferaciju i/ili staničnu smrt apoptozom i/ili nekrozom. Iz rezultata je razvidno da flavonoidi primijenjeni u visokim koncentracijama kod nekih staničnih linija mogu međudjelovati sa staničnim procesima te prouzročiti proliferaciju. Nadalje, količina slobodnih radikala odlučujuća je u aktivaciji proliferacijskog i/ili apoptotskog puta.

Oršolić i sur. (13) utvrdili su da flavonoidi djeluju selektivno na tumorske stanice u odnosu na normalne, što je sukladno s drugim autorima koji također pokazuju da flavonoidi izazivaju apoptozu u transformiranih stanica glodavaca i ljudskih stanica u kulturi (26). Smatra se da je pojačana osjetljivost transformiranih stanica na flavonoide kao protutumorske tvari povezana s nesposobnošću transformiranih stanica da sintetiziraju glutathion kao odgovor na oksidativni stres

(27, 28). Smanjenje oksidativnog stresa s pomoću reducirajućih tvari sprječava proces apoptoze u nekim stanicama (29), dok u drugima redukcija oksidativnog stresa uzrokuje proces apoptoze (30). Slično potvrđuju i naši rezultati. Zanimljivo je da na stanice JURKAT svi flavonoidi djeluju citotoksično, a sličan je slučaj i sa stanicama RAJI gdje blagi stimulativni učinak na razmnožavanje stanica imaju niske koncentracije naringenina i naringina. Kod stanica MOLT zabilježeno je stimulativno djelovanje kvercetina u najvišoj koncentraciji te naringina pri višim koncentracijama. Stanice U937 kao stanice monocitnih osobitosti pokazuju najveću otpornost na citotoksičnost flavonoida neovisno o vrsti i koncentraciji, što sugerira da bi te stanice mogle imati veću količinu glutathiona i popratnih mu enzima.

Oksidativni stres mijenja signalni prijenos i genomske procese (31) i može prouzročiti neodgovarajuću stimulaciju ili apoptozu izloženih stanica. Kontrola stanične proliferacije u odnosu na apoptozu u različitim tipovima životinjskih stanica posredovana je receptorima i događajima vezanim za njih, što vodi proizvodnji O_2^- i H_2O_2 . Nadalje, stanična proliferacija i apoptoza dva su alternativna odgovora koja ovise o specifičnoj staničnoj redoks-ravnoteži (32, 33).

Brojna istraživanja pokazuju da se flavonoidi ovisno o dozi mogu ponašati kao protuoksidansi i/ili prooksidansi. Naime, različita razina prooksidanata može imati suprotan učinak u istom sustavu. Primjerice, nasuprot citotoksičnom učinku prevelikih oksidativnih oštećenja, slaba razina oksidativnog stresa može voditi aktivaciji nekih enzima; tako je aktivacija protein kinaze C značajno povećana redoks-ciklusom kinona preko tiol/disulfidnog puta (34), što može biti mehanizam kojim prooksidansi mogu modelirati stanični rast i diferencijaciju (35). Isti autori pokazali su i selektivno uključivanje različitih mehanizama za proliferaciju ovisno o dozi te staničnu smrt uzrokovanu protuoksidansima ili prooksidansima. Također, može se zaključiti da su odvojeni putovi prijenosa signala za proliferaciju i apoptozu (36). Naši rezultati također potvrđuju ova ranija opažanja. Sposobnost nekih flavonoida u redoks-ciklusu i proizvodnji toksičnih radikala kisika može pridonijeti pojačanoj citotoksičnoj aktivnosti, kao i apoptozi u leukemijskim stanicama, s obzirom na to da su tumorske stanice u cijelosti deficijentne u mehanizmu detoksifikacije kisikovih radikala i na taj način osjetljivije na prooksidativne protutumorske tvari (37); u drugim stanicama niske doze djeluju

stimulacijski i sprječavaju proces apoptoze. Očito je da postoji izravan odnos između količine glutathiona u stanicama, citotoksičnosti i apoptoze. Dobiveni podaci potvrđuju istraživanja Zimmermana (38), koji sugerira da nisu samo reaktivni radikali kisika posrednici oštećenja stanica, nego se prije radi o oksidativnoj izmjeni redoks-stanja u stanicama, što vjerojatno modificira prirodne stimulatorne signale i vodi staničnoj smrti.

ZAKLJUČAK

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da flavonoidi imaju citotoksičan učinak na različite kulture leukemijskih stanica te da su vijabilnost i proliferacija leukemijskih stanica ovisne o koncentraciji flavonoida. Flavonoidi različitih koncentracija mogu stimulirati proliferaciju monocitnih staničnih kultura. Nasuprot tomu, najveći stupanj toksičnosti pokazuju kvercetin, kavena kiselina i krizin, dok su naringenin i naringin manje toksični. S obzirom na to da flavonoidi mogu djelovati na leukemijske stanice brojnim mehanizmima, daljnje podatke o njihovoj učinkovitosti trebalo bi temeljiti na nekim od navedenih mehanizama, primjerice razini glutathiona i popratnih enzima, apoptozi/nekrozi, aktivaciji signalnih molekula, modulaciji gena, što će zasigurno biti cilj naših daljnjih istraživanja.

LITERATURA

1. Oršolić N, Bašić I. Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. In: Singh VK, Govil JN, Arunachalam C, editors. Recent Progress in Medicinal Plants. Phytochemistry and Pharmacology III. Vol. 17. Raleigh (NC): Sci Tech Publ Inc.; 2007. p. 55-114.
2. Kosalec I, Sanković K, Zovko M, Oršolić N, Bakmaz M, Kalodera Z, Pepeljnjak S. Antimicrobial and antioxidant activity of propolis from Croatia and Brazil: a comparative study. Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine. In: Oršolić N, Bašić I, editors. Ethnopharmacology. Trivandrum: Research Signpost; (in press).
3. Virgili F, Acconcia F, Ambra R, Rinna A, Totta P, Marino M. Nutritional flavonoids modulate estrogen receptor α signaling. *ICBMB Life* 2004;56:145-51.
4. Oršolić N, Horvat-Knežević A, Benković V, Bašić I. Benefits of use of propolis and related flavonoids against the toxicity of chemotherapeutic agents. *Scientific*

- evidence of the use of propolis in ethnomedicine In: Oršolić N, Bašić I, editors. *Ethnopharmacology*. Trivandrum: Research Signpost; (in press).
5. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:67-202.
 6. de Vries JH, Janssen PL, Hollman PC, van Staveren WA, Katan MB. Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. *Cancer Lett* 1997;114:141-4.
 7. Kim JH, Yu J, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ, Varga J, Bhatnagar D, Cleveland TE, Nierman WC, Campbell BC. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Int J Food Microbiol* 2008;122:49-60.
 8. Hirose M, Takesada Y, Tanaka H, Tamano S, Kato T, Shirai T. Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 1998;19:207-12.
 9. Oršolić N, Šver L, Terzić S, Tadić Z, Bašić I. Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasing ability: A possible mode of antitumor action. *Nutr Cancer* 2003;47:156-63.
 10. Orban Z, Mitsiades N, Burke TR, Tsokos M, Chrousos GP. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor - kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2000;7:99-105.
 11. Staniforth V, Chiu LT, Yang NS. Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. *Carcinogenesis* 2006;27:1803-11.
 12. Kellis JT Jr, Vickery LE. Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science* 1984;225:1032-4.
 13. Oršolić N, Štajcar D, Bašić I. Cytotoxicity of propolis and its polyphenolic compounds on primary culture of human urinary bladder transitional cell carcinoma. *Pharmacologyonline* 2006;3: 408-15.
 14. Edwards DJ, Bernier SM. Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. *Life Sci* 1996;59:1025-30.
 15. Hsiao YC, Kuo WH, Chen PN, Chang HR, Lin TH, Yang WE, Hsieh YS, Chu SC. Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway. *Chem Biol Interact* 2007;167:193-206.
 16. Ho PC, Saville DJ, Coville PF, Wanwimorluk S. Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products. *Pharm Acta Helv* 2000;74:379-85.
 17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
 18. Plochmann K, Korte G, Koutsilieri E, Richling E, Riederer P, Rethwilm A, Schreier P, Scheller C. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* 2007;460:1-9.
 19. Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piwowar KR, Dou QP. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1421-32.
 20. Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 1992;52:6676-81.
 21. Liesveld J, Harbol A, Rosell K, Smith A, Abboud C. Effects of anti-oxidants on normal and leukemic hematopoiesis. *Exp Hematol* 2000;28:126.
 22. Kim OH, Lee TJ, Kim YH, Lim JH, Kim S, Park JW, Kwon TK. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Lett* 2006;240:234-42.
 23. Park JB. Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:568-74.
 24. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 2007;18:427-42.
 25. Kanno S, Tomizawa A, Ohtake T, Koiwai K, Ujibe M, Ishikawa M. Naringenin-induced apoptosis via activation of NF-kB and necrosis involving the loss of ATP in human promyeloleukemia HL-60 cells. *Toxicol Lett* 2006;166:131-9.
 26. Chiao C, Carothers AM, Grunberger D, Solomon G, Preston AG, Barrett CJ. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Res* 1995;55:3576-83.
 27. Lee FYF, Siemann DW, Sutherland RM. Changes in cellular glutathione content during adriamycin treatment in human ovarian cancer-possible indicator of chemosensitivity. *Br J Cancer* 1989;60:291-8.
 28. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 1994;54:1969-75.
 29. Mayer M, Noble M. N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trohic factor - mediated cell survival in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7496-500.
 30. Burdon R, Gill V. Cellular generated active oxygen species and HeLa cell proliferation. *Free Radical Res Commun* 1993;19: 203-213.
 31. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6465-7.
 32. Burton RH. Superoxide and hydrogen peroxide in

- relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biol Med* 1995;18:775-94.
33. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7-10.
 34. Kass GEN, Duddy SK, Orrenius S. Activation of hepatocyte protein kinase C by redox - cycling quinones. *Biochem J* 1989;260:499-507.
 35. Cerutti PA, Trump BF. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* 1991;3:1-7.
 36. McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium - activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J* 1989;3:1843-9.
 37. Powis G. Signaling targets for anticancer drug development. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:188-94.
 38. Zimmerman RJ, Marafino BJ, Chan A, Landre P, Winkelhake JL. The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor in vivo. Implications for mechanisms of action. *J Immunol* 1989;142:1405-9.

Summary

CYTOTOXICITY OF POLYPHENOLIC/FLAVONOID COMPOUNDS IN A LEUKAEMIA CELL CULTURE

Flavonoid components of propolis are biologically active substances with antioxidative, immunostimulative, immunomodulative, and anti-inflammatory properties. The aim of the study was to investigate their cytotoxic effect on different leukaemia cell lines. For this purpose we used five different flavonoids (quercetin, caffeic acid, chrysin, naringenin, and naringin) and five types of leukemia cell lines (MOLT, JURKAT, HL-60, RAJI and U937). Cells were cultured at 37 °C in the RPMI-1640 medium supplemented with 10 % FCS in humidified atmosphere with 5 % of CO₂. Flavonoids were added in the following concentrations: 100 µg mL⁻¹, 50 µg mL⁻¹, 25 µg mL⁻¹, or 12.5 µg mL⁻¹. The results show different dose- and cell-type-dependent cytotoxicity. Among the flavonoids, quercetin showed the strongest cytotoxic effect in all cell lines. Caffeic acid and chrysin also expressed a high level of cytotoxicity. Treatment of U937 and HL-60 cell lines with low concentrations of chrysin or naringenin stimulated cell proliferation. These results suggest a biphasic effect of the tested compounds on monocyte cell lines. Cytotoxicity and growth stimulation mechanisms caused directly by flavonoids should further be investigated on the molecular level.

KEY WORDS: *caffeic acid, cell proliferation, chrysin, HL-60, JURKAT, MOLT, naringenin, propolis, quercetin, RAJI, U937 cells*

CORRESPONDING AUTHOR:

Nada Oršolić
Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska
E-mail: norsolic@yahoo.com