

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
AUGALŲ FIZIOLOGIJOS IR MIKROBIOLOGIJOS KATEDRA
IMUNOLOGIJOS INSTITUTAS**

Vaidilutė Dirginčiūtė

CHINONŲ POVEIKIS FLK LĄSTELĖMS

Baigiamasis magistro darbas

**Darbo vadovė
dr. A. Nemeikaitė - Čėnienė**

Vilnius, 2006

Turinys

Įvadas.....	6
Darbo tikslas ir uždaviniai.....	7
1. Literatūros apžvalga.....	8
1.1. Laisvaradikaliniai procesai ir oksidacinis stresas.....	8
1.1.1. Laisvieji radikalai.....	8
1.1.2. Laisvieji radikalai ir fiziologiniai procesai.....	8
1.1.3. Antioksidantinė apsauga.....	10
1.1.4. Žeidžiantis laisvųjų radikalų poveikis.....	12
1.1.5. Oksidacinio streso sukelti patologiniai procesai.....	14
1.1.6. Laisvųjų radikalų ir antioksidantų tyrimas.....	15
1.2. Chinonų toksiškumas.....	15
1.2.1. Chinonai ir jų poveikis ląstelėms.....	15
1.2.2. Benzeno chinonai. Toksiškumas kaulų čiulpams ir chemoprotekcija.....	19
1.2.3. O-chinonai: policiklinių aromatinių angliavandenilių aktyvuoti metabolitai.....	22
1.3. Kiti chinonų toksiškumo mechanizmai.....	23
1.3.1. Redukcinis alkilimas. DT-diaforazės vaidmuo citotoksiškume.....	23
1.3.2. Interkaliacija į DNR ir topoizomerazių inhibicija antraciklinais.....	25
1.4. Gamtiniai hidroksiantrachinonai.....	26
1.5. Apoptozė.....	26
1.5.1. Apoptozė ir jos mechanizmas.....	26
1.5.2. Apoptozės nustatymas.....	29
1.5.3. Citotoksiškumas, apoptozė ir nekrozė.....	29
2. Metodinė darbo dalis.....	31
2.1. Darbo objektas.....	31
2.2. Ląstelių kultivavimas.....	31
2.3. Kultivavimas ant stiklelių ir dažymas.....	32
2.4. Apoptozės tyrimas.....	32
2.4.1. Fluorescencinė mikroskopija.....	32
2.4.2. FLK ląstelių apoptozės tyrimas naudojant akridino oranžo ir Etidžio bromido fluorescuojančius dažus.....	33
2.5. Matematinis rezultatų apdorojimas.....	34
2.6. Tyrimams naudoti junginiai.....	34

3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	36
3.1. FLK ląstelių augimo dinamika.....	36
3.2. Ląstelių morfologija.....	36
3.3. cL_{50} nustatymas ir citotoksiškumo priklausomybė nuo vienelektroninės redukcijos potencialo.....	38
3.4. Citotoksiškumo tyrimai.....	41
3.5. Apoptozės tyrimai.....	45
Išvados.....	49
Summary.....	50
Naudota literatūra.....	52

Tekste vartojamų sutrumpinimų sąrašas

- $^1\text{O}_2$ – singletinis deguonis
- 8-okso-dG – 8-okso-2'-deoksiguanozinas
- AF – aktyvuota forma
- BZQ – 2,5-bis (2'-hidroksietilamino)-3,6-diaziridinil-1,4-benzochinonas
- CCl^\bullet - anglies tetrachlorido radikalas
- cL_{50} – junginio koncentracija, kuriai esant, žūsta 50% ląstelių
- DMSO – dimetilsulfoksidas
- DPPD – N,N'-difenil-1,4-difenilendiaminas
- DQ - durochinonas
- DZQ – 2,5-daiziridinil-1,4-benzochinonas
- E_7^0 – dvielektroninės redukcijos potencialas (chinono/ hidrochinono poros redoks potencialas; standartinis potencialas)
- E_7^1 – vienelektroninės redukcijos potencialas (chinono/ semichinono redoks poros potencialas, esant pH 7)
- EO9 – DT-diaforazės genas
- ERP – elektronų paramagnetinis rezonansas
- FAD – flavin adenin dinukleotidas
- FLK - avies embriono inkstų fibroblastai (foetal lamb kidney fibroblasts)
- GLV – galvijų leukemijos virusas
- GPOD – glutationo peroksidazė
- GRD – glutationo reduktazė
- GSH – redukuotas glutationas
- GSSG – oksiduotas glutationas
- LR – laisvieji radikalai
- MeDZQ – 2,5-dimetil-3,6-diaziridinil-1,4-benzochinonas
- MEM (minimum essential media) – minimali ląstelių auginimo terpė
- NADH – nikotin amid adenin dinukleotidas
- NADPH – fosforilintas nikotin amid adenin dinukleotidas
- NO^\bullet - azoto oksido radikalas
- NOX – NADPH : Oksidazė
- NQO1 =DT-diaforazė – NAD(P)H chinono oksidoreduktazė

Nu – ląstelės nukleofilai

O_2^\bullet - superoksido radikalas

OH^\bullet - hidroksilo radikalas

$ONOO^\bullet$ - peroksinitritas

P450 – citochromas P450

PAA – policikliniai aromatiniai angliavandeniliai

RH1 – 2,5-diaziridinil-3-(hidroksimetil)-6-metil-1,5-benzochinonas

ROS – aktyvuota deguonies forma

SOD – superoksido dismutazė

Ivadas

Prieš du milijardus metų Žemės atmosferoje ėmė kauptis deguonis. Tai lėmė aerobinių organizmų atsiradimą. Aerobai prisitaikė gyventi esant ore apie 21% deguonies. Tačiau deguonis yra „dviašmenis kardas“: būdamas aerobinio gyvenimo pagrindu, jis kartu yra ir toksiškas.

1970 metais biologai nustatė, kad žmogaus organizmas nuolat gamina laisvuosius radikalus ir nukenksmina juos pasitelkęs antioksidantinius mechanizmus. Iš deguonies susidaro aktyvuotos deguonies formos (ROS) (jų susidarymo srautas sudaro apie 2-3% viso deguonies metabolizmo srauto). Evoliucijoje kai kurios ląstelės išmoko tikslingai panaudoti ROS, pavyzdžiui polimorfonukleariniai leukocitai – fagocitozei, tačiau suintensyvėję laisvaradikaliniai procesai yra daugelio susirgimų priežastis arba pasekmė (Moncada et al., 2000).

Prieš keliolika metų atrasta, kad kraujagysles plečianti medžiaga, žinoma kaip endotelį atpalaiduojantis faktorius, yra ne kas kita, kaip azoto oksido laisvasis radikalas NO^\bullet (taškelis reiškia nesuporuotą elektroną).

Laisvieji radikalai organizmui yra naudingi, jei jų stacionari koncentracija neviršija tam tikros ribos. Egzistuoja pusiausvyra tarp prooksidantinių ir antioksidantinių sistemų veiklos. Tačiau ilgalaikė padidėjusi ROS koncentracija yra žalinga ir sukelia „oksidacinį stresą“. Įrodytas šio streso poveikis daugelio žmogaus ligų patogenezėi, pradedant glomerulonefritu, ateroskleroze, vėžiu, autoimuninėmis ligomis, baigiant AIDS (Lunec et al., 1998). Taigi, dėl laisvųjų radikalų sukeltų reakcijų žmogus gali susirgti vėžiu, ar gali būti skatinamas šios ligos vystimasis. Laisvųjų radikalų perteklius rūkantiems žmonėms gali sukelti padidėjusią riziką susirgti plaučių vėžiu (rūkymas sukelia stiprų oksidacinį stresą plaučių audinyje). Laisvųjų radikalų atakos metu susidarę lipidų peroksidai kaupiasi aterosklerozinėse plokštelėse, traumos ar hipoksijos pažeistame smegenų audinyje ir kituose audiniuose (pvz., apsinuodijus anglies tetrachloridu).

Antra vertus, laisvaradikaliniai procesai ir jų sukeltas oksidacinis yra dažnas įvairių antiparazitinių ir priešnavikinių preparatų poveikio mechanizmas. Šis darbas skirtas oksidacinio streso ir kitų oksidacinių-redukcinių procesų, būdingų kai kurių priešnavikinių preparatų poveikiui, svarbos tyrimui.

Darbo tikslas: Atlikti chinoninių junginių citotoksiškumo FLK ląstelėms ir apoptozės indukcijos tyrimus.

Uždaviniai:

1. Sudaryti ląstelių augimo kreivę laike ir nustatyti optimalų pradinio pasėlio tankį;
2. Nustatyti chinoninių junginių cL_{50} ;
3. Įvertinti cL_{50} priklausomybę nuo vienelektroninės redukcijos potencialo;
4. Ištirti chinonų poveikį FLK ląstelėms ir citotoksiškumo mechanizmą;
5. Ištirti apoptozės indukciją chinonais.

1. Literatūros apžvalga

1.1. LAISVARADIKALINIAI PROCESAI IR OKSIDACINIS STRESAS

1.1.1. Laisvieji radikalai

Laisvieji radikalai (LR) – tai junginiai, turintys vieną ar daugiau nesuporuotų elektronų (Halliwell, 1991). Energijos šaltinis (šviesos, radiacinis, terminis, cheminis, fermentinis) gali suardyti elektronų poras stabiliuose junginiuose. Taip susidaro laisvieji radikalai, kurie išnyksta dimerizacijos arba dismutacijos būdu.

Laisvieji radikalai yra aktyvesni, nei jų neradikalinės formos. Jie gali reaguoti su kai kuriomis molekulėmis, susidarant naujiems radikalams, t.y. inicijuoti grandininę reakciją.

Didžiausią biologinę reikšmę turi deguonies, azoto bei anglies LR. Maži jų kiekiai būtini nuolatos vykstantiems įvairiems organizmo procesams, tačiau ilgalaikė padidėjusi jų koncentracija sukelia oksidacinį stresą.

Dažniausiai sutinkami laisvieji radikalai ir jų poveikis:

OH^\bullet (hidroksilo radikalas) - labai aktyvus radikalas, kuris atakuoja visas biologines molekules;

$\text{O}_2^{\bullet-}$ (superoksido radikalas) - aktyvus, dalyvauja signalo perdavime ląstelės viduje, reguliuoja augimą;

NO^\bullet (azoto oksido radikalas) - veikia lygiųjų raumenų ląsteles, esančias kraujagyslių sienelėse, dėl to lygieji raumenys atpalaiduojami, veikia kaip vazodilatoriai.

Vandenilio peroksidas (H_2O_2) yra aktyvuota deguonies forma (ROS), lengvai praeina pro ląstelės membranas ir dalyvauja daugelyje reakcijų, pavyzdžiui, skatina virusinių genų ekspresiją. H_2O_2 atakuoja ne visas ląstelės molekules, tačiau sukelia hidroksilo radikalų susidarymą.

1.1.2. Laisvieji radikalai ir fiziologiniai procesai

Laisvieji radikalai ir aktyvuotos deguonies formos susidaro daugelyje fiziologinių procesų, pavyzdžiui, normalaus metabolizmo metu mitochondrijose vykstančiose oksidacijos-redukcijos reakcijose. Ląstelei normaliai kvėpuojant, molekulinis deguonis redukuojamas

keturiais elektronais ir susidaro vanduo. Šio proceso metu susidaro nedidelis kiekis ROS – superoksido anijono, vandenilio peroksido, hidroksilo radikalų.

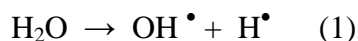
ROS susidaro įvairiose pašalinėse fermentų (flavoproteinų) reakcijose ar elektronų pernešimo grandinių komponentų (ubichinonų, citochromų, geležies-sieros baltymų) autooksidacijos metu. Išimtį čia sudaro fermentai ksantinoksidazė, katalizuojanti H_2O_2 ir $O_2^{\bullet-}$ susidarymą ksantino oksidacijos metu (Buffinton et al., 1992), taip pat neutrofilų, fibroblastų ir hepatocitų plazminės membranos NAD(P)H oksidazės, generuojančios $O_2^{\bullet-}$ į aplinką (Meier et al., 1991). Neutrofilų membranų NADPH oksidazei reikia stimuliacijos, o fibroblastų membranų fermentas generuoja $O_2^{\bullet-}$ ir nestimuluojamas, bet mažu greičiu (Burdon, 1992).

Fagocitozės metu aktyvuoti neutrofilai ir makrofagai dideliais kiekiais laisvuosius radikalus generuoja į aplinką. Oksidacinio pliūpsnio metu neutrofilai generuoja $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , o makrofagai – NO^{\bullet} (Badwey et. al., 1980). Šie radikalai vykdo svarbias signalo perdavimo tarp ląstelių ir ląstelių augimo reguliavimo funkcijas (Maly, 1990; Meier, 1990).

Superoksido radikalai susidaro ir arachidoninės rūgšties metabolizmo metu, kai vyksta prostaglandinų sintezė, veikiant fermentui peroksidazei (Fridovich, 1983). Trombocitų aktyvacijos eigoje, suaktyvėjus tromboksano A_2 funkcijai, iš arachidoninės rūgšties susidaro $O_2^{\bullet-}$, kuris patenka į aplinką. Biologiškai aktyvių medžiagų irimas oksidacijos metu taip pat sąlygoja LR atsiradimą. Pavyzdžiui, katecholaminų katabolizmo metu adrenerginuose neuronuose veikiant monoaminooksidazei, susidaro H_2O_2 , todėl įvairūs stresai sukelia organizme oksidacinio streso būseną (Kazakevicius, 2002). Laisvieji radikalai susidaro veikiant įvairiems fermentams (oksidazėms, oksigenazėms), svarbiems steroidinių hormonų sintezei, aminorūgščių katabolizmui (Fridovich, 1983).

Laisvųjų radikalų susidarymą ląstelėse įtakoja taip pat įvairūs egzogeniniai veiksniai:

- 1) radiacinė energija (ultravioletiniai, rentgeno spinduliai). Jonizuojančioji radiacija gali suskaidyti vandenį į hidroksilo ir vandenilio laisvuosius radikalus:



- 2) cheminės medžiagos, teršalai, vaistai. Pavyzdžiui, anglies tetrachloridas (CCl_4^{\bullet}), veikiamas kepenyse citochromo P-450 virsta labai reaktyviu CCl_3^{\bullet} :



- 3) chinonų ar nitroaromatinių junginių vienelektroninė redukcija;
- 4) polifenolių autooksidacija.

Įvertinus labai platų ROS veikimo spektrą bandoma šį poveikį klasifikuoti pagal ląstelėse vykstančius procesus, kuriuose pastarieji dalyvauja:

- 1) citokinų, augimo faktorių ir hormonų veikla ir sekrecija;
- 2) jonų transportas;
- 3) transkripcija;
- 4) neuromoduliacija;
- 5) apoptozė

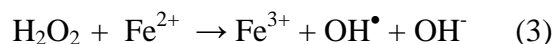
Nustatyta, kad citokinų, augimo faktorių generuoti laisvieji radikalai (LR) arba jų formos dalyvauja baltymo tirozino fosforilinime, mitogeno- aktyvuotų proteinkinazių aktyvacijoje, ir neabejotinai veikia chemotaksį. Šalia to, LR tiesiogiai aktyvuoja svarbias signalines molekules, tokias, kaip p21^{ras} ir tuo būdu inicijuoja tolimesnę įvykių seką ląstelėje (Lander et al., 1997).

Laisvieji radikalai dalyvauja tradiciniame signaliniame kelyje receptorius – ligandas (Sundersan et al., 1995).

1.1.3. Antioksidantinė apsauga

Organizmuose egzistuoja galinga antioksidacinė apsauga, kuri padeda išlaikyti pusiausvyrą su oksidacijos procesais. Antioksidantai skirstomi į pirminius, antrinius ir tretinius (Kazakevičius, 2002).

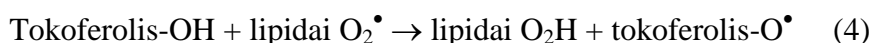
Pirminiai antioksidantai apsaugo organizmą nuo ROS susidarymo. Jiems priskiriami metalų jonus prijungiantys baltymai. Geležies jonus prijungia feritinas, transferinas, laktoferinas, vario – ceruloplazminas, albuminai. Šie antioksidantai apsaugo nuo Fentono reakcijos:



Antriniai antioksidantai inaktyvuoja jau susidariusius ROS. Tai nefermentiniai ir fermentiniai antioksidantai. Nefermentiniams priskiriami kai kurie vitaminai, kurių svarbiausi yra vitaminas E (α -tokoferolis), vitaminas C (askorbo rūgštis) bei karotinai (β -karotenai).

Riebaluose tirpūs antioksidantai, pvz., α -tokoferolis, apsaugo membranas nuo peroksidacijos. α -Tokoferolis yra hidrofobinė molekulė, todėl jis yra biologinių membranų viduje. Funkciškai svarbiausia jame yra –OH grupė, kurios vandenilio atomas lengvai pašalinamas. Lipidų peroksidacijos metu susidarę peroksilo radikalai reaguoja su α -

tokoferoliu greičiau, negu su polinesočiujų riebalų rūgščių grandinėmis ar membranos baltymais (Hornsby, 1983). Dėl to susidaro reaktyvus tokoferolio radikalas:

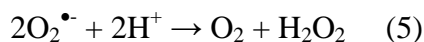


Šį radikalą į α tokoferolį vėl redukuoja vitaminas C (Halliwell, 1995).

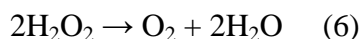
Vitaminas C yra hidrofiliškas, jo antioksidacinis veikimas pasireiškia daugiausia už ląstelės, jis tiesiogiai reaguoja su superoksido, hidroksilo radikalais, lipidų hidroksidais, atiduodamas 2 elektronus ir virsdamas dehidroaskorbo rūgštimi. Tačiau vitaminas C peroksidaciją gali ir stimuliuoti, jei terpėje yra geležies jonų, jis gali redukuoti Fe^{3+} jonus į Fe^{2+} , ir taip skatinti ROS susidarymą.

Antioksidaciniu poveikiu taip pat pasižymi β -karotenas (provitaminas A), kuris taip pat slopina lipidų peroksidaciją. Be vitaminų, nefermentiniams antioksidatoriams taip pat priskiriami bilirubinas, šlapimo rūgštis, kofermentas Q.

Tarp antioksidantinių fermentų reikia paminėti superoksido dismutazę (SOD), kuri O_2^\bullet dismutuoja į H_2O_2 ir O_2 :



Citozolyje esanti SOD turi vario ir cinko, o mitochondrijų – mangano. Dėl SOD poveikio susidariusį H_2O_2 suardo geležies turintis fermentas katalazė, kurios daug yra peroksisomose. Katalazė katalizuoja reakciją:



Svarbūs yra ir gliutationo sistemos fermentai: glutation peroksidazė (GPOD), glutationo reduktazė (GRD) ir su jais susijusi gliukozo-6-fosfato dehidrogenazė (Remacle et al., 1992). Gliutationo reduktazė, į kurios sudėtį įeina selenas, oksiduoja redukuotą glutationą (GSH) H_2O_2 pagalba:



Glutationreduktazė katalizuoja GSH susidarymą, oksiduodama NADPH oksiduotu glutationu (GSSG), o gliukozo-6-fosfato dehidrogenazė tiekia NADPH gliutationreduktazei.

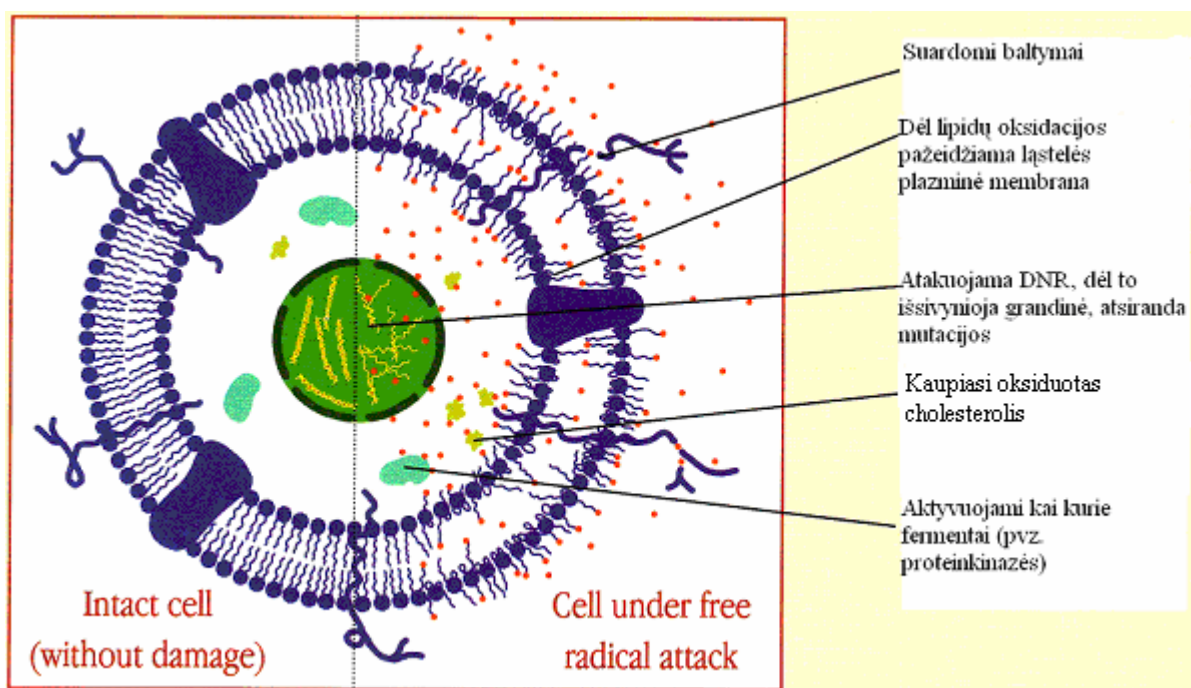
Viduląstelinis GSSG ir GSH santykis rodo ląstelės oksidacinę būklę ir yra ląstelės gebėjimo inaktyvuoti laisvuosius radikalus rodiklis (Cotran, 1999).

Tretiniai antioksidatoriai atstato ląstelėse ROS sukeltas pažaidas. Jiems priskiriami reparaciniai fermentai – DNR ligazė, DNR polimerazė, temperatūrinio streso baltymai (Heat

Shock proteins – hsp), kurie ląstelėje susidaro paveikus ją įvairiais fizikiniais ir cheminiais veiksniais.

1.1.4. Žeidžiantis laisvųjų radikalų poveikis

Organizmą veikiant įvairiems egzogeniniams (jonizuojančiai radiacijai, cheminėms medžiagoms, stresams) ir endogeniniams (įvairiems patologiniams procesams – uždegimui, navikiniam procesui, hipoksijai, aterosklerozei, senėjimui ir kt.) veiksniais, padidėja stacionari ROS koncentracija. Tuomet jie veikia organizmo ląsteles kaip patogenai. (1 pav)



1 pav. Laisvųjų radikalų žeidžiantis poveikis ląstelei (Free Radical Brochure, 1997).

Aktyvuotos deguonies formos sukelia ląstelių membranų lipidų peroksidaciją (1 pav.). OH^\bullet radikalai labiausiai pažeidžia polinesočiųjų riebalų rūgščių dvigubas jungtis (Farber, 1990). Susidarę lipidų peroksidai, patys reaktyvūs, inicijuoja grandininę laisvųjų radikalų susidarymo reakciją. Didelė laisvųjų radikalų koncentracija išsekina antioksidacinius mechanizmus ir pažeidžia ląstelių organelių ir plazminę membranas, sutrikdo ląstelių integralumą. Dėl šių procesų ląstelių membranose atsiranda įvairių pokyčių. Kinta membranų lipidų fizikinės–cheminės savybės – jose mažėja fosfolipidų, riebalų rūgščių, kaupiantis lipidų peroksidams susidaro membranų struktūriniai defektai, vadinami klasteriais, susiformuoja transmembraniniai pralaidumo kanalai, pro kuriuos eina nekontroliuojamas katijonų ir kitų molekulių srautas į ląstelę ir iš jos (Bolotina, 1994). Ląstelėje kaupiasi Na^+ , Ca^{2+} , vanduo, ji brinksta, mitochondrijose sutrinka energijos gamyba, ląstelė gali žūti. Lipidų peroksidacijos

produktas ląstelėje lipofuscinas – endogeninis pigmentas, kurį sudaro lipidai, fosfolipidai ir baltymų polimerai. Pats lipofuscinas nėra žalingas, jo kiekis ląstelėje rodo laisvųjų radikalų susidarymą ir peroksidinės lipidų oksidacijos intensyvumą ląstelėje (Laurindo, 1991).

Tiek laisvosios polinesočios riebalų rūgštys, tiek ir įeinančios į riebalų sudėtį yra atakuojamos laisvųjų radikalų ir oksiduojamos į lipidų peroksidus. Lipidų peroksidacija yra vienas iš geriausiai ištirtų toksinio ROS poveikio pavyzdžių. Lipidų peroksidai yra žalingi ir pažeidžia organizmo ląsteles (Mehta et al., 1993), reaguodami su Fe ar Cu jonais. Skylant peroksidams susidaro malondialdehidai ir 4-hidroksinonenalis, kurie gali atakuoti baltymų tiolines (-SH) ir amino (-NH₂) grupes.

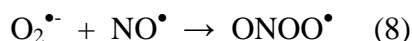
Dar vienas lipidų peroksidacijos mechanizmas yra tiesioginis polinesočiųjų riebalų rūgščių jungimasis su ypač reaktyvia deguonies forma – singletiniu deguonimi ¹O₂. Dėl to pasikeičia elektronų sukinys molekulėje.

Singletinis deguonis pasigamina aerobinėje aplinkoje tam tikrus junginius paveikiant šviesa: jie sugeria šviesą, pereina į aukštesnę elektronų sužadinto būseną, perduoda energijos perteklių deguoniui ir paverčia jį singletiniu deguonimi. Tokie fotosensibilizuojantys agentai yra dažai (pvz., eozinas), vaistai (pvz., tetraciklinas), žmogaus organizmo medžiagos (porfirinai, riboflavinai, tulžies pigmentas bilirubinas). Kai kurios fotosensibilizacijos reakcijos yra naudingos klinikinėje medicinoje ir naudojamos gydant tam tikras vėžio formas .

Padidėjusi ROS koncentracija sukelia ir amino rūgščių šoninių grandinių oksidaciją ir baltymų fragmentaciją, dėl to suyra ląstelei svarbūs fermentai. Kita vertus, fermentai gali būti aktyvuojami, pvz. proteinkinazės, kaspazės (1 pav.) .

Laisvieji radikalai sukelia ląstelės DNR pažeidimus, reaguodami su branduolio ir mitochondrijų DNR timinu, ir sukeldami DNR grandinės trūkius. Tokie DNR pokyčiai atsiranda ląstelėms senstant bei vykstant jų piktybinei transformacijai .

Laisvųjų radikalų poveikis nėra vienodas. Nors superoksido anijonas yra mažiau reaktyvus už OH[•], tačiau kai kurios molekulės yra specifiniai superoksido taikiniai. Taip O₂^{•-} jungiasi su NO[•], susidarant peroksinitritui:

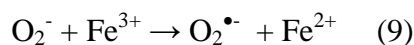


Peroksinitritas (ONOO[•]) oksiduoja baltymų SH grupes (12 Radi, 1990). Be to, NO[•] yra stiprus vazodilatorius (Moncada, 1991), ir O₂^{•-} gebėjimas sujungti NO[•] sukelia vazokonstrikciją (Laurindo, 1991).

Didelės H₂O₂ koncentracijos reaguoja su ląstelės energiją gaminančiomis sistemomis, inaktyvuoja glikolizės fermentą gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenazę (Hyslop, 1988). Be

to, H₂O₂, reaguodamas su geležies ir vario jonais, sudaro hidroksilo radikalą Fentono reakcijoje (3).

Didesnė geležies dalis ląstelėje yra Fe³⁺ formos, ją pirmiausia superoksido anijonas redukuoja į Fe²⁺ formą, kuri ir dalyvauja Fentono reakcijoje:



Taigi, oksidacinis ląstelės pažeidimas sustiprėja, kai joje daugėja superoksido anijono ir Fe³⁺ (Cotran 1999). Normaliose sąlygose geležies ir vario jonų ląstelėje yra nedaug, paprastai jie yra susijungę su baltymais (transferinu, feritinu, laktoferinu, ceruloplazminu), apsaugančiais ląsteles nuo OH[•] radikalų susidarymo. Padaugėjus ląstelėje superoksido, intensyvėja Fe jonų disociacija iš feritino ir hemosiderino, dėl to iš H₂O₂ susidaro OH[•] (Kazakevicius, 2002).

1.1.5. Oksidacinio streso sukelti pataloginiai procesai

Oksidacinio streso būklė, t.y. ilgalaikė padidėjusi ROS koncentracija organizme, gali susidaryti suaktyvėjus jų gamybai (dėl streso, jonizuojančios radiacijos poveikio, išplitusio uždegimo, senėjimo ir kt.), arba išsekus antioksidacinėms medžiagoms, stokojant vitaminų (askorbo rūgšties, E ir A vitaminų) ir mikroelementų (seleno, vario, mangano, cinko) (Halliwell, 1995). Didelė ROS koncentracija ir oksidacinio streso būklė organizme susidaro daugelio pataloginių procesų ir ligų metu. Laisvieji radikalai dažnai yra ne tik pataloginio proceso padarinys, bet tampa ir patogenezės faktoriumi, lemiančiu jos progresavimą (Z. Kučinskienė). Nustatyta, kad ROS ir LR tiesiogiai ar netiesiogiai yra susiję su lėtinėmis uždegiminėmis ligomis, sepsiniu šoku, širdies kraujagyslių ligomis, ateroskleroze, diabetu, plaučių emfizema, suaugusiųjų plaučių išsekimo sindromu, nervų sistemos ligomis – Parkinsono, Alzheimerio, amiotrofinė latentine skleroze ir kt., navikiniais procesais, senėjimu, katarakta, išemijos-reperfuzijos sindromu, kai kuriomis kepenų ir inkstų ligomis (Mc Cance 1998).

Uždegimo metu ROS į tarpląstelinę terpę generuoja leukocitai po jų sąveikos su chemotaksio faktoriais, imuniniais kompleksais ar įvykus mikroorganizmų fagocitozei. Dėl NADPH oksidazių suaktyvėjimo fagocituose susidaro daug O₂^{•-}, H₂O₂ ir OH[•] radikalų, kurie gali reaguoti su NO[•] ir sudaryti aktyvius azoto radikalus. Nedidelis laisvųjų radikalų kiekis tarpląstelinėje terpėje skatina chemokinių (IL-8), endotelio ir leukocitų adhezijos molekulių ekspresiją, lemdamas uždegiminį atsaką. Didelis laisvųjų radikalų kiekis žeidžia aplinkinius audinius: trikdo endotelio funkcijas ir didina kraujagyslių pralaidumą, inaktyvuoja

antiproteazes (α_1 antitripsiną), todėl suaktyvėja proteoliziniai fermentai ir audinio pokyčiai uždegimo metu. Sunkiųjų infekcijų atvejais (pasireiškus sepsiniam šokui), iš monocitų, makrofagų, endotelio ląstelių atsipalaiduoja daug ROS, kraujyje ypač padaugėja NO^\bullet ir kitų laisvųjų radikalų, svarbių šios būklės patogenezei (Kazakevicius, 2002).

Įvairūs imuninės sistemos komponentai (imunoglobulinai, imuniniai kompleksai, komplemento komponentai) gali sukelti „deguonies pliūpsnį“, nesusijusį su fagocitoze (Johnston et al., 1976). Superoksido anijonai slopina T limfocitų aktyvumą (Kraut, 1981). Laisviųjų radikalų žalojantis poveikis pasireiškia sergant reumatoidiniu artritu. Sąnarių sinoviniame audinyje randama imuninių kompleksų, komplemento komponentų, suaktyvintų leukocitų, kurie išskiria ROS ir ardo sąnarių kremzlinį audinį. Sergant reumatoidiniu artritu, sumažėja Mn superoksiddismutazės aktyvumas sinoviocitų citoplazmoje, dėl to padidėja laisvųjų radikalų išskyrimas į tarpląstelinę terpę.

1.1.6. Laisvųjų radikalų ir antioksidantų tyrimas

Laisvuosius radikalus išmatuoti sunku, nes jų gyvavimo pusperiodis yra labai trumpas, o koncentracija – labai maža. Laisvieji radikalai gali būti matuojami tiesioginiu spektroskopiniu elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) metodu. Tačiau šis tyrimo metodas yra sudėtingas. Reakcijoms įvertinti ir jų metu susidariusių produktų kiekiams nustatyti gali būti taikomi šie metodai:

- 1) laisvuosius radikalus generuojančių fermentų aktyvumo matavimas;
- 2) antioksidantų koncentracijos nustatymas;
- 3) laisvaradikalinių reakcijos produktų, pavyzdžiui, peroksidų kiekio nustatymas.

Šie parametrai yra svarbūs laisvųjų radikalų sukeltų ląstelės pažeidimų bei oksidacinio streso indikatoriai ir gali būti nustatyti liuminescenciniu, didelės skiriamosios gebos skysčių chromatografijos, taip pat kolorimeriniu bei imunofermentiniu metodais.

1.2. CHINONŲ TOKSIŠKUMAS

1.2.1. Chinonai ir jų poveikis ląstelėms

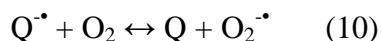
Chinonai – bendras junginių klasės pavadinimas. Tai aromatiniai diketonai, kurių ketoninės grupės yra aromatinės sistemos dalis. Jie sutinkami natūraliuose produktuose arba gaunami hidrochinonų ir/arba katecholių metabolizmo metu. Chinonai – aromatinių junginių metabolizmo produktai. Benzochinonai susidaro iš benzeno, naftochinonai – iš naftaleno,

antrachinonai – iš antraceno ir t.t. Iš policiklinių aromatinių angliavandenilių susidarius fenoliams, hidrochinonams, katecholiams, šie paverčiami į chinonus, veikiant monooksigenazėmis arba peroksidazėmis, metalo jonais ir kai kuriais atvejais molekulinio deguonimi (Monks et al., 1992). Pvz., citochromas P450 verčia benzeną į hidrochinoną ir katecholį. Šie metabolitai oksiduojami (katalizuoja peroksidazė) iki p-benzochinono ir o-benzochinono (3A pav.). Tai toksiškų junginių klasė. *In vivo* jiems būdingas citotoksiškumas, imunotoksiškumas ir kancerogenezė. Tokių jų veikimą nulemia įvairūs mechanizmai: a) chinonai alkilina gyvybiškai svarbius baltymus ir/arba DNR, b) chinonai yra stiprūs oksidatoriai. Jų redukcijos metu susidaro ROS (2 pav.).

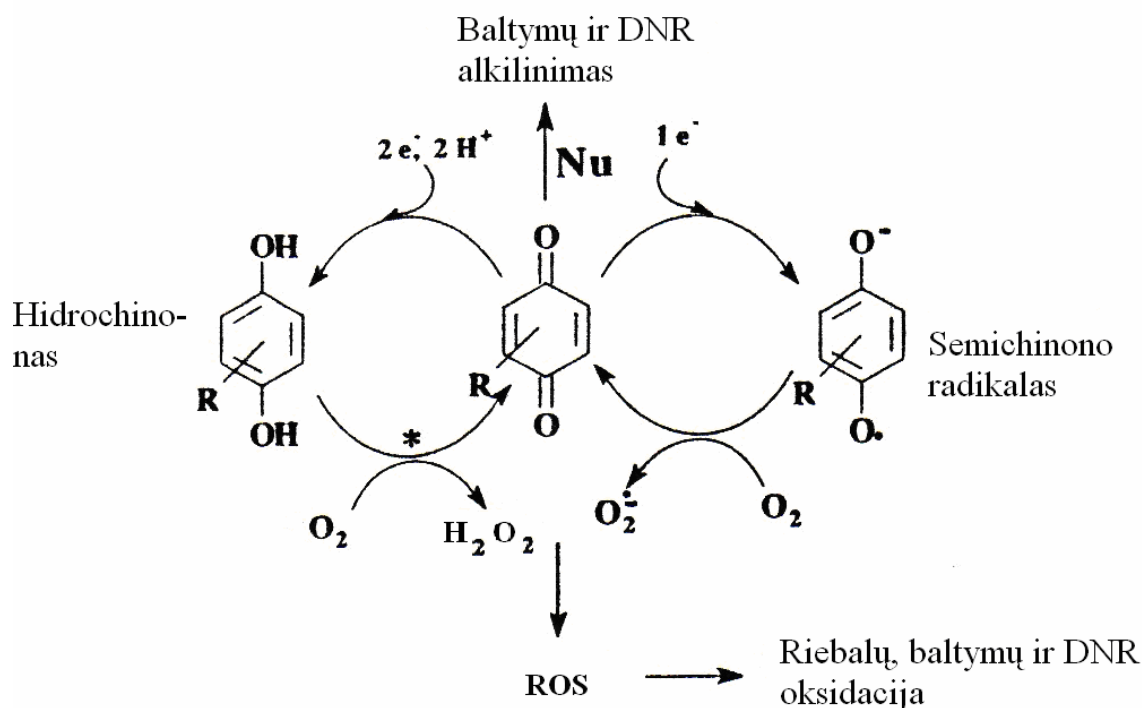
Chinonų vienelektroninės redukcijos metu susiformuoja semichinonai ir $O_2^{\bullet -}$. Chinonų reakingumas šiose reakcijose didėja didėjant jų vienelektroninės redukcijos potencialui (E^1_7 arba chinono/semichinono redoks poros potencialui, esant pH 7). E^1_7 nustatomas impulsinės radiolizės būdu. Dvielektroninės redukcijos potencialas (chinonų/ hidrochinonų poros redoks potencialas, standartinis potencialas arba E^0_7) nustatomas elektrochemiškai.

Chinonų redukcijos potencialai priklauso nuo junginių prigimties, pakaitalų kiekio bei vietos (Anusevičius et al., 2002). Elektronus atiduodantys radikalai (hidroksi-, alkoksi-, amino- grupės) sumažina E^1_7 ir E^0_7 reikšmes. Elektronus priimantys pakaitalai (nitro-, karboksi-, sulfo- grupės) padidina E^1_7 ir E^0_7 reikšmes. Aromatinės sistemos padidėjimas sumažina E^1_7 ir E^0_7 . Pavyzdžiui, 1,4-naftochinonų redokso potencialai mažesni, negu 1,4-benzochinonų.

Semichinonų oksidacija deguonimi vyksta susidarant superoksidui:



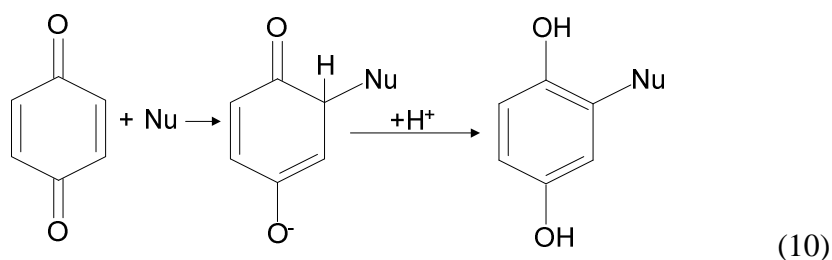
Chinonų, kurių $E^1_7 \leq -0,15$ V atveju, pusiausvyra būna pakreipta į dešinę, o oksidacija vyksta su greičio konstanta: $k=10^7-10^8$ M⁻¹ s⁻¹.



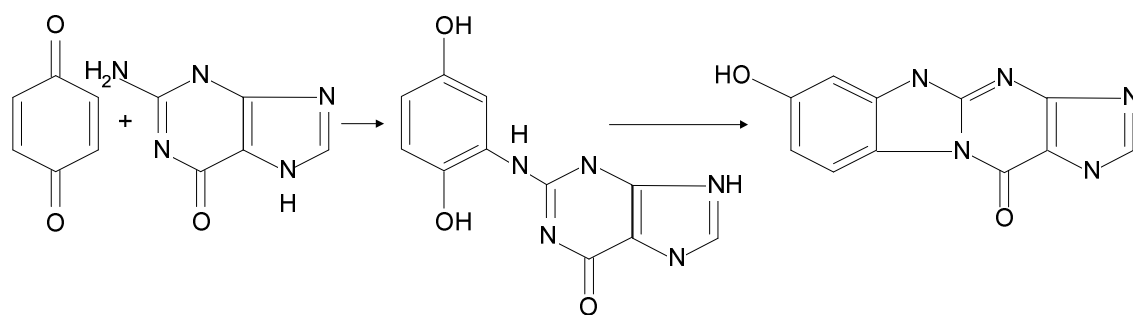
2 pav. Alkilinimas ir redukcija chinonais, produkuojančiais ROS (Bolton et al., 2000)
Žvaigždute pažymėta reakcija vyksta tik autooksiduotis gebančių chinonų atvejais.

Žemo dvielektroninės redukcijos potencialo junginių (pavyzdžiui redukuotų chinonų, naftochinonų) autooksidacija vyksta lėtai: puslaikis – kelios minutės esant pH 7.0 (Giulivi et al., 1994). Chinonai lengvai reaguoja su sieros turinčiais nukleofilais, tokiais, kaip cisteino liekanos baltymuose arba GSH. Dėl to ląstelėje sumažėja GSH. Be to, kai kurie chinonai reaguoja su nukleofilinėmis amino grupėmis, esančiomis baltymuose arba DNR. Prie chinono žiedo prisijungus sieros atomui, po to šiam junginiui susioksidavus, gaunamas chinono tioeteris (3C pav.). Chinono tioeteriai – Parkinsono ligos ir kitų neurologinių susirgimų priežastis (Monks et al., 1997).

Ląstelės nukleofilai (Nu^-) - tai redukuoto glutationo (GSH) -SH arba $-NH_2$ grupės, amino rūgštys, baltymai ir nukleino rūgštys. Daugeliu atvejų chinonų sąveikos su šiais junginiais metu vyksta 1,4- Michaelio prijungimo reakcijos (10 reakcija) .



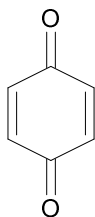
Chinonams besijungiant prie DNR, susiformuoja DNR, turinti benzochinonų pakaitus. Šie pakaitai dalyvauja deoksiguanozino grupės nukleofilinėje atakoje :



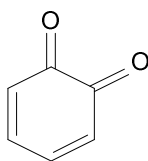
(11)

Tokiu būdu benzapireno-3,6-chinonas žmogaus fibroblastuose nesukeldamas oksidacinio streso pažeidžia DNR grandinę .

A. Benzochinonai

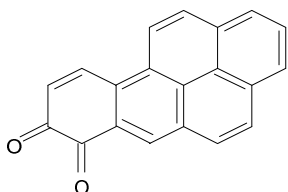


p-benzochinonas



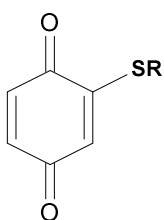
o-benzochinonas

B. Estrogeninis chinonas

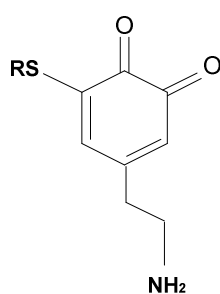


Benz[a]pireno o-chinonas

C. Chinonų tioeteriai



p-benzochinono
tioeteris



dopamino-o-chinono tioeteris

3 pav. Chinonų ir jų darinių struktūros (Bolton et al., 2000).

1.2.2. Benzeno chinonai. Toksiškumas kaulų čiulpams ir chemoprotekcija

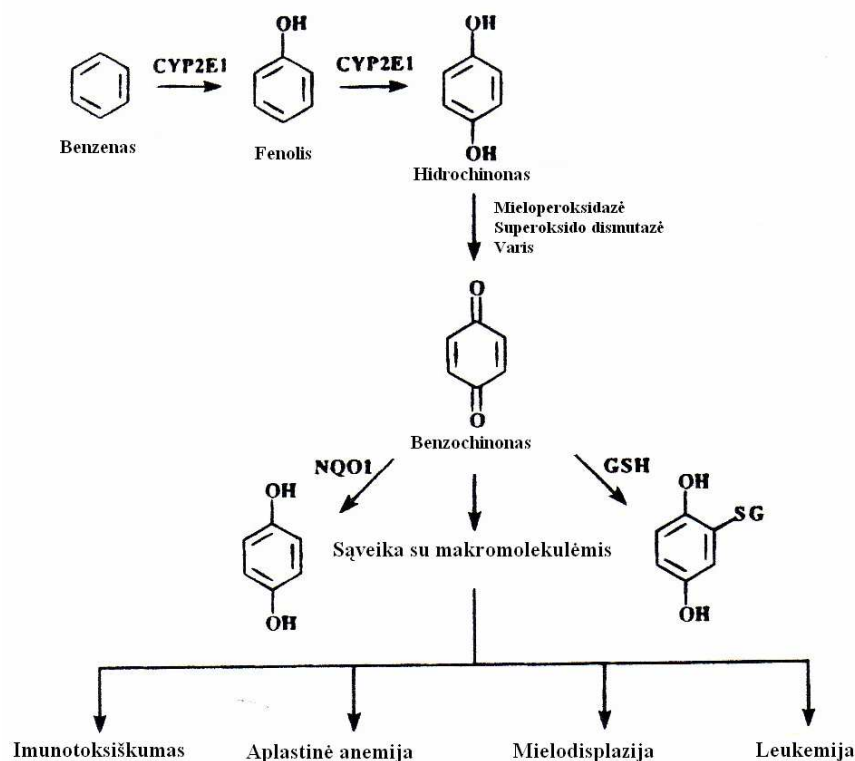
Epidemiologiniai tyrimai parodė, kad pastovus poveikis dideliu benzeno kiekiu sukelia aplastinę anemiją ir stiprią mielogeninę leukemiją (Infante et al., 1977).

Benzenas – selektyviai organus ir ląsteles veikiantis toksinas. Pirmiausia benzenas patenka į kvėpavimo takus. Jis absorbuojasi plaučiuose, pereina I ir II biotransformacijos fazes kepenyse (Synder et al., 1996). I biotransformacijos fazėje benzenas verčiamas į fenolį, šis į hidrochinoną ir katecholį. Reakciją katalizuoja citochromo P450 izoforma P450 2E1 (Seaton et al., 1994). Jei kepenų P450 2E1 aktyvumas didesnis, daugiau fenolio paverčiama į hidrochinoną. Taigi, kepenys – organas, lemiantis benzeno toksinį veikimą.

Tačiau benzenas toksiškiausias kaulų čiulpams. Kodėl taip yra, biochemiškai ir biologiškai neparodyta. Lyginant kepenis ir kaulų čiulpus, kaulų čiulpuose yra mažiau fermentų, dalyvaujančių apsaugoje ir benzeno skaidyme (Twerdok et al., 1992). Paveikus benzeno, DNR ir baltymų pažeidimų daugiau susidaro kaulų čiulpuose, negu kepenyse. Baltymų pažeidimų daugiau, negu DNR pažeidimų. Lyginant su kitomis kancerogeninėmis medžiagomis, benzeno metabolitai nestipriai paveikia DNR, tačiau pažeidimų padaro, jos aptiktos ir iširtos *in vitro* (Creek et al., 1997).

Nėra aišku, kokie faktoriai sąlygoja biologiškai veikiančio benzochinono koncentraciją, kaip ląstelėse hidrochinonas verčiamas benzochinonu ir kas sąlygoja benzochinono sąveiką su molekulėmis – taikiniai. Manoma, kad ląstelėse hidrochinonas verčiamas benzochinonu keliais būdais (4pav.). Hidrochinoną benzochinonu verčia mieloperoksidazė (Smith, 1996), kurios didelė koncentracija yra skirtingose mieloidinėse ląstelėse (leukocituose, monocituose ir jų pirmtakėse – CD34⁺ mieloblastuose) (Li et al., 1994; Ross et al., 1996). Kad šis fermentas veiktų, reikalingas vandenilio peroksidas. Diferencijuoti leukocitai ir monocitai turi NADPH oksidazės. Tai superoksido šaltinis. Superoksidas verčiamas vandenilio peroksidu. Minėtoms ląstelėms nebūdingas mitochondrinis kvėpavimas, kuris diferencijuotuose makrofaguose yra superoksido ir vandenilio peroksido šaltinis (He et al., 1999; Li et al., 1999). Kitas vandenilio peroksido šaltinis – hidrochinono autooksidacija. Tai procesas, kurį katalizuoja superoksiddismutazė (SOD) arba vario jonai. Kai SOD katalizuojama hidrochinono autooksidacija būna intensyvesnė, gaunamas benzochinonas ir vandenilio peroksidas, kurį utilizuoja mieloperoksidazė. Taip gaunama daugiau benzochinono (Li et al., 1996). SOD ir varis – potencialios hidrochinono aktyvavimo sistemos. Jos randamos ląstelėse, kuriose nėra mieloperoksidazės (eritrocituose, limfocituose, stromos makrofaguose ir fibroblastuose). Mieloperoksidazė lokalizuota azurofilinėse granulėse; Cu/Zn ir SOD – citoplazmoje; varis randamas sujungtas su DNR.

Įdomu tai, kad daugelis molekulių – taikinių, kurios sukelia benzeno sąlygotą patogenezę, randamos ir citoplazmoje, ir branduolyje. Tai tubulinas, topoizomerazė II, histonai ir DNR (Smith et al., 1996).



4 pav. Hidrochinono, susiformavusio iš benzeno kaulų čiulpų ląstelių populiacijoje, toksiškumas (Bolton et al., 2000).

Benzochinono redukcijoje svarbūs du ląstelės faktoriai: GSH ir NAD(P)H:chinono oksidoreduktazė (NQO1; DT-diaforazė) (4 pav). GSH reaguoja su benzochinonu, o NQO1 redukuoja benzochinoną iki hidrochinono, kuris gali būti gliukuroniduotas, po to ekskretuotas iš ląstelės. Epidemiologiniai ir eksperimentiniai tyrimai parodė, kad NQO1 mutacija padidina apsinuodijimo benzenu riziką (Rothman et al., 1997; Morgan et al., 1999). GSH ir NQO1 pavaduoja vienas kitą, ir tokiu būdu saugo nuo hidrochinono toksiškumo, priklausomai nuo ląstelės diferenciacijos, ląstelės tipo ir organizmo rūšies (Trush et al., 1996). Pavyzdžiui, nediferencijuotose mieloidinėse ląstelėse GSH yra pagrindinis apsaugos faktorius (Li Y et al., 1994). Diferencijuotose makrofaguose apsaugai svarbūs ir GSH, ir NQO1. GSH ir NQO1 kiekiai didėja, kai diferencijuojasi makrofagai, bet nekinta, kai diferencijuojasi polimorfonuklearinės ląstelės. Galbūt, diferenciacijos metu NQO1 tampa katalitiškai aktyviu.

1.2.3. O-chinonai: policiklinių aromatinių angliavandenilių aktyvuoti metabolitai

Policikliniai aromatiniai angliavandeniliai (PAA) yra svarbūs aplinkos teršalai ir prokancerogenai, t.y. turi būti metaboliškai aktyvuojami, kad veiktų kaip kancerogenai. Šie junginiai metaboliškai aktyvuojami tam tikrais būdais: 1) sudaromi dioliai, veikiant P450 ir epoksido hidrolazei (Penning, 1993), 2) susidaro radikalų katijonai, dalyvaujant P450 ir/arba peroksidazėms (Cavalieri, 1995), 3) susidaro o-chinonai, veikiant dihidrodiolių dehidrogenazėms (Penning et al., 1999). Susidarę diolių epoksidai veikia kaip mutagenai ir kancerogenai (Slaga et al., 1977). Pavyzdžiui, benzapiren-[α]p-diolis oksiduojamas į ketolį. Ketolis paverčiamas į katecholį (7,8-dihidroksibenzeno [α] pireną). Šis vėliau autooksiduojasi iki o-chinono (benzo[α] piren-7,8-diono, BPD) (Smithgall et al., 1988).

Parodyta, kad benz-[α]p-diolio fermentinės oksidacijos metu susidaro vandenilio peroksidas. Superoksido radikalas inicijuoja ir palaiko autooksidaciją. Galutinėse reakcijose superoksido anijonas prisijungia katecholio protoną. Gautą katecholato anijoną oksiduoja hidroperoksilo radikalas. Gaunamas o-semichinono anijono radikalas. Jis iš superoksido anijono redukuoja molekulinį deguonį. Tada superoksido anijonas gali dalyvauti kitame autooksidacijos cikle (Penning et al., 1996).

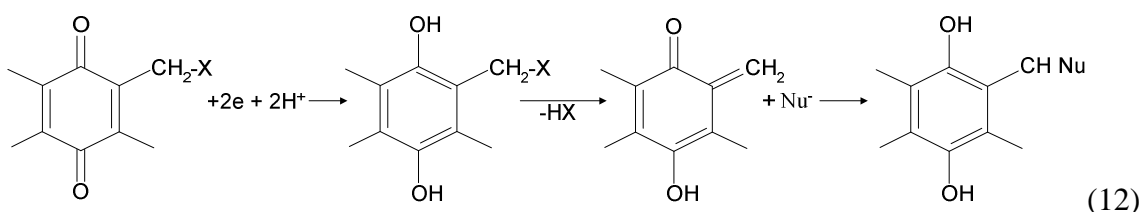
Susidarę PAA o-chinonai iškart gali alkilinti ląstelės nukleofilus, tarp jų DNR, RNR, baltymus. Juos gali redukuoti NAD(P)H arba ląstelės mikrosomų ir mitochondrijų fermentai. Tokiu būdu intensyviau formuojami ROS. ROS sukelia oksidacines DNR pažaidas (8-okso-dG timino glikolį ir grandinės trūkį). Taigi, iš PAA gaunami ROS, o ROS veikia kaip radiacijos karcinogenezės agentai. Tokia PAA metabolinė aktyvacija būdinga visoms ląstelėms.

PAA o-chinonai dažniausiai sukelia rėmelio poslinkio arba taškines mutacijas. Jie gali sukelti įvairias mutacijas – pastovias DNR pakaitas, N7-depurinines pakaitas, pažeistas heterociklines bazes (pvz., 8-okso-dG) ir DNR grandinės trūkius. Kai kuriais atvejais daromos G→T transversijos, gaunami apurininiai saitai.

1.3. KITI CHINONŲ TOKSIŠKUMO MECHANIZMAI

1.3.1. Redukcinis alkilimas. DT-diaforazės vaidmuo citotoksiškume

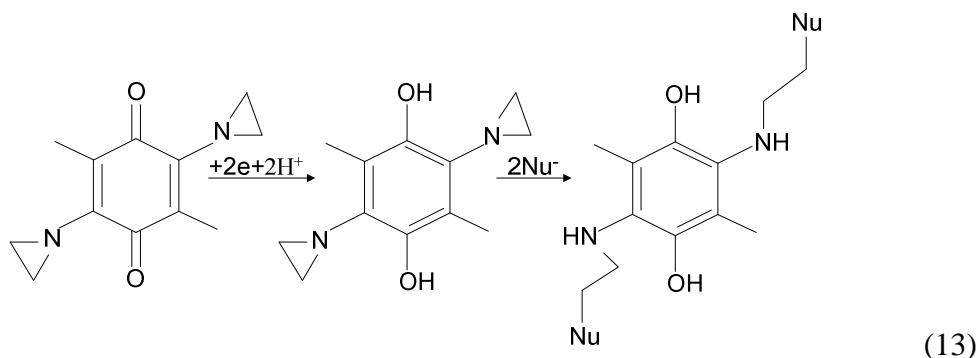
Piktybiniuose augliuose, esant deguonies trūkumui, chinonai nėra efektyviai reoksiduojami, tada jie lengvai skyla arba redukuojami iki hidrochinonų. Chinonų su $-\text{CH}_2\text{-X}$ pakaitais (X -Cl, -Br arba $-\text{OCONHCH}_3$) fermentinės redukcijos metu susidaro $-\text{XH}$ ir chinometidai (12 reakcija). Chinometidai pasižymi nukleofilinėmis savybėmis, alkilina nukleofilus (Giulivi, 1994).



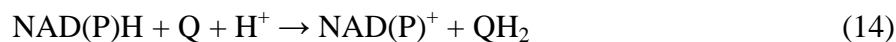
Chinonų metidai susiformuoja veikiant mitomicinams – chinoninės struktūros priešvėžiniams vaistams (Thompson, 1992).

Moore'so chinonų metidų hipotezė (Moore et al., 1986) teigia, kad mitomicinui *c* virstant hidrochinonu, jis praranda metoksi grupę. Tokiu būdu susidaro tarpinis junginys – indolas. Tada atidaromas aziridinilo žiedas ir susiformuoja chinono metidas (Thompson, 1992). Antraciklinų (pvz., andriamicino) redukcijos metu gali susidaryti chinometidai, kai pašalinama glikozido liekana (Thompson., 1992). Tačiau, nepaisant mažos deguonies koncentracijos, antraciklino redukcija nėra intensyvi ir chinometidai iš antraciklinų susidaro sunkiai.

Kitokiu būdu alkilina junginiai, turintys aziridinilo arba $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$ grupes (pvz., diazichinonas) (William, 2004). Aziridinilo grupės žiedo atidarymą palengvina tai, kad hidrochinono grupės po redukcijos lengviau atiduoda elektronus aziridiniliu. Reakcijos mechanizmas gali būti vaizduojamas taip:



Hydrochinonai iš chinonų gali susidaryti esant deguonies trūkumui, t.y., neintensyvios radikalų reoksidacijos naudojant deguonį būdu. Kita vertus, hydrochinonai gali susiformuoti fermentinės dvielektroninės redukcijos metu. Chinonų ir jų darinių dvielektroninę redukciją katalizuoja DT-diaforazė:



Šio fermento substratų spektras labai platus. Į jį patenka ubichinonai, chinonų epoksidai, vitaminai K_1 ir K_3 , nitroaromatiniai junginiai. DT-diaforazė aktyvuoja aziridinilbenzochinonus, diazichinoną ir mitomiciną *c* (Boland et al., 1991). Ši aktyvacija vyksta redukuojant minėtus junginius dvielektroninės redukcijos būdu. Ji palengvina aziridino žiedo protonaciją ir atidarymą (4 reakcija) (Gutierrez, 1989). Dvielektroninės redukcijos produktai yra labai toksiški. Jie indukuoja DNR grandinės trūkius. Kita vertus, DT-diaforazė apsaugo nuo 2-metil-1,4-naftochinono ir jo darinių toksinio poveikio, nukreipdama šiuos junginius nuo jų redukcijos. Tada DT-diaforazės poveikyje susidarę hydrochinonai jungiami su gliukuronine rūgštimi ir sulfatu (Giulivi et al., 1994). Gauti hidrofiliniai junginiai nesunkiai pašalinami iš organizmo.

DT-diaforazė daugeliu atvejų (>90%) yra citozolinis fermentas. Jis paplitęs įvairiuose organuose, ypač didelis kiekis kepenyse, inkstuose ir virškinamajame trakte. Šis fermentas – dimeras iš dviejų identiškų subvienetų, dimero molekulinė masė 64 kDa. Vieną subvienetą sudaro 274 amino rūgščių liekanos. Į subvieneto sudėtį įeina FAD molekulė (Riley & Workman, 1992).

Įdomu tai, kad DT-diaforazė neredukuoja antraciklino chinoidinių vaistų, tačiau aktyviai redukuoja mitomicinus ir streptonigriną. Remdamiesi aktyviojo centro modifikacijos tyrimais, kai kurie autoriai teigia, kad chinonų prisijungimo centras ir NAD(P)H prisijungimo centras yra skirtingose fermento vietose (Cui, 1995). Vis dėlto, naujausi žiurkių fermento rentgenostruktūrinės analizės metodai parodė, kad chinono ir nikotinamido žiedo, esančio NAD(P)H sudėtyje, prisijungimo centrai yra toje pačioje vietoje (Chen et al., 1997). Dikumarolas – konkurencinis inhibitorius. Jis užima NAD(P)H nikotinamido grupės prisijungimo centrą.

1.3.2. Interkaliacija į DNR ir topoizomerazių inhibicija antraciklinais

Antrachinonai, tokie, kaip doksorubicinas ar andriamicinas yra plačiausio spektro priešvėžiniai junginiai, todėl naudojami daugeliu vėžinių susirgimų atvejų.

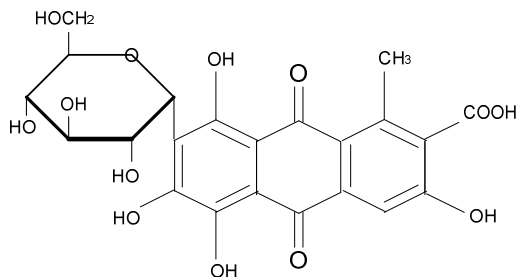
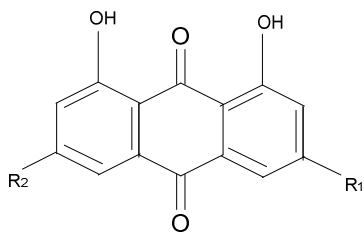
Chinoidinės struktūros antraciklinai dalyvauja redukcijos procesuose ir, galbūt, chinometidų susidaryme. Tačiau tai ne vienintelis chinoidinių antraciklinų citotoksiškumo mechanizmas. Jų yra daugiau:

1. Antraciklinai gali įsiterpti į DNR. Interkaliacija – tai specifinis prisijungimas prie DNR, agento įsiterpimas aukštu giminingumu tarp DNR arba RNR heterociklinių bazių (Manifait et al., 2005). Interkaliacija pakeičia DNR grandinės UV absorbciją, fluorescenciją, hidrodinamines savybes ir rentgeno spindulių sklaidą; padidina DNR lydymosi temperatūrą, stabilizuodama DNR dvigubą grandinę. Tokiu būdu inhibuojama DNR replikacija ir RNR transkripcija, vartojant andriamiciną (Baldev, 1979).

2. Kai kurie priešvėžiniai preparatai inhibuoja DNR topoizomerases. Topoizomerasės – tai fermentai, kurie keičia DNR konformaciją taip, kad galėtų vykti replikacija ir transkripcija. Šie fermentai skirstomi pagal tai, keliose DNR grandinėse padaro laikinus trūkius: vienoje (žinduolių topoizomerasė I) ar dvejose (žinduolių topoizomerasė II). Kai kurie klinikiniai priešvėžiniai preparatai yra topoizomerasės II inhibitoriai. Tai etopsidas (VP-16), teniposidas (VM-26), mitoksantranas, andriamicinas (doksorubicinas) ir daunorubicinas (Chen et al., 1994). Manoma, kad andriamicino indukuotus dvigrandžius DNR trūkius suformuoja topoizomerasė II (Pflugfelder, 1988). Citotoksiniai preparatai ir/arba didelė Ca^{2+} koncentracija pakeičia topoizomerasę taip, kad ji kerpa DNR grandinę, bet jos vėliau nesuliguoja (Zechiedrich & Osheroff, 1990). Kai kuriais atvejais ląstelės atsparumą doksorubicinui lemia tai, kad susidaro mažiau DNR – topoizomerasės kompleksų, tačiau doksorubicinas pasižymi ir prooksidantinėmis savybėmis (Liengswangwong & Osheroff, 1994). Vis dėlto minėtų mechanizmų kiekybinio santykio reikšmę antraciklino citotoksiškumui ir jo redukcijai reikėtų geriau iširti.

1.4. GAMTINIAI HIDROKSIANTRACHINONAI

Natūralūs 1,8- dihidroksiantrachinonai reinas, dantronas ir emodinas (5 pav.) farmacijoje naudojami kaip vidurius laisvinantys vaistai. Kiti hidroksilinti antrachinonai pramonėje naudojami kaip maistiniai ir tekstilės dažai (pavyzdžiui, karmininė rūgštis, 5 pav).



Dantronas: R₁= -H, R₂= -H
 Reinas: R₁= -COOH, R₂= -H
 Chrizofanolis: R₁= -CH₃, R₂= -H
 Emodinas: R₁= -CH₃, R₂= -OH

Karmidinė rūgštis

5 pav. Gamtinių hidroksiantrachinonų struktūra

Literatūroje yra duomenų apie tai, kad hidroksilinti antrachinonai pasižymi priešvėžinėmis savybėmis (Koyama et al., 2001). Kita vertus, parodyta, kad jų vartojimas padidina riziką susirgti gaubtinės žarnos vėžiu ir adenoma (Schörkhuber et al., 1998). Šie junginiai taip pat pasižymi imunosupresinėmis (Huang et al., 1992), fotosensibilizuojančiomis (Rahimipour et al., 2001), mutageninėmis ir citotoksinėmis savybėmis (Main et al., 1991; Müller et al., 1996).

1.5. APOPTOZĖ

1.5.1. Apoptozė ir jos mechanizmas

Ontogenezės ir audinių regeneracijos morfologinių ir molekulinų mechanizmų tyrimai sudarė prielaidas suformuluoti hipotezę, kad ląstelių genome yra tam tikra „mirties programa“. Ji būtina tam, kad organizmas taisyklingai formuotųsi, kai žūva nereikalingos ląstelės, o vietoj žuvusių ląstelių atsiranda naujos. Programuota ląstelių mirtis buvo pavadinta apoptoze. Šį terminą pasiūlė Dž. Keras dar 1972 m (Kerr et al., 1972). Jis apoptozę apibūdino kaip pavienių ląstelių „mirties“ būdą, kurios metu ląstelė įgyja būdingų morfologinių požymių ir išnyksta be pasekmių, t.y. nesukeldama vietinio uždegimo. Terminas „apoptozė“ buvo paimtas iš graikų kalbos, kur *apoptosis* reiškia lapų kritimą nuo medžių. Biologiniu požiūriu apoptozė yra fiziologinis genetiškai reguliuojamas ląstelių pašalinimo procesas, reikalingas audinių homeostazei palaikyti. Sutrikus apoptozei gali pasireikšti įvairios ligos. Daugelio jų gydymas galėtų būti grindžiamas apoptozės aktyvinimu arba slopinimu, todėl racionalių gydymo metodų paieškos skatina toliau tyrinėti molekulinį apoptozės mechanizmą.

Tiriant audinius šviesiniu ir elektroniniu mikroskopais, nustatyti tam tikri apoptotinių ląstelių, t.y. ląstelių, žūstančių apoptozės būdu, morfologiniai pokyčiai: ląstelė susitraukia, jos

branduolio chromatinas sutankėja, vėliau ląstelė suskyla į membrana dengtus fragmentus, vadinamus apoptotiniais kūnais. Apoptotinių kūnų membrana nepažeista, todėl vidinis turinys, t.y. citoplazma su joje esančiomis organelėmis, neišsilieja ir nesukelia uždegimo, būdingo ląstelei mirštant nekrozės būdu (Majno et al., 1995). Apoptotinius kūnus fagocituoja gretimos ląstelės bei makrofagai, taigi, jie išnyksta be pėdsako. Tačiau dar iki atsirandant ląstelės apoptozės pokyčiams, joje pradeda vykti biocheminiai pokyčiai, lemiantys apoptozės proceso pradžią. Šiuo metu apoptozės eiga skirstoma į tris fazes:

1. Inicijacijos fazė. Jos metu ląstelėje kaupiasi efektorių molekulės. Kokie efektoriai kaupiasi, priklauso nuo apoptozę sukeliančių signalų. Šie signalai gali būti labai įvairūs. Tai hormonai ir į juos panašūs augimo faktoriai (Kajstura et al., 1997), ADF (Gotlieb et al., 1994), neuromediatoriai (Communal et al., 1998), hipoksija (Long et al., 1997) ir kt. Dėl apoptozę sukeliančių signalų įvairovės, apoptozės efektoriai gana skirtingi. Manoma, kad inicijacijos fazė yra grįžtamoji, nes nutraukus signalą apoptozė neprasideda.

2. „Apsisprendimo“ fazė. Jos metu apoptozės efektoriai aktyvuoja procesus, dėl kurių citoplazmoje atsiranda baltymų, galinčių pažeisti branduolį. Ši fazė yra negrįžtama. Biocheminiai pokyčiai, nulemiantys negrįžtamumą, prasideda keletą valandų anksčiau, negu atsiranda morfologiniai pokyčiai (Messam et al., 1998).

3. Ląstelės sunaikinimo fazė. Jos metu išryškėja morfologiniai apoptozės sukelti pokyčiai: chromatinas sutankėja, DNR sutrūksta, branduolys suskyla, ląstelė suskyla į dalis, vadinamas apoptotiniais kūnais, kuriuos fagocituoja kitos ląstelės. Pagal morfologinius branduolio pokyčius nustatyta, kad *in vivo* ląstelės apoptozė trunka nuo 6 iki 24 val. Šis laikas priklauso nuo ląstelės tipo (Gavrieli et al., 1992).

Skiriami du pagrindiniai apoptozę sukeliančios keliai: 1) išorinė indukcija, kai ligandas prisijungia prie citoplazmos membranos receptoriaus ir 2) vidinė, priklausoma nuo mitochondrijų. Išaiškinti šie apoptozės mechanizmai:

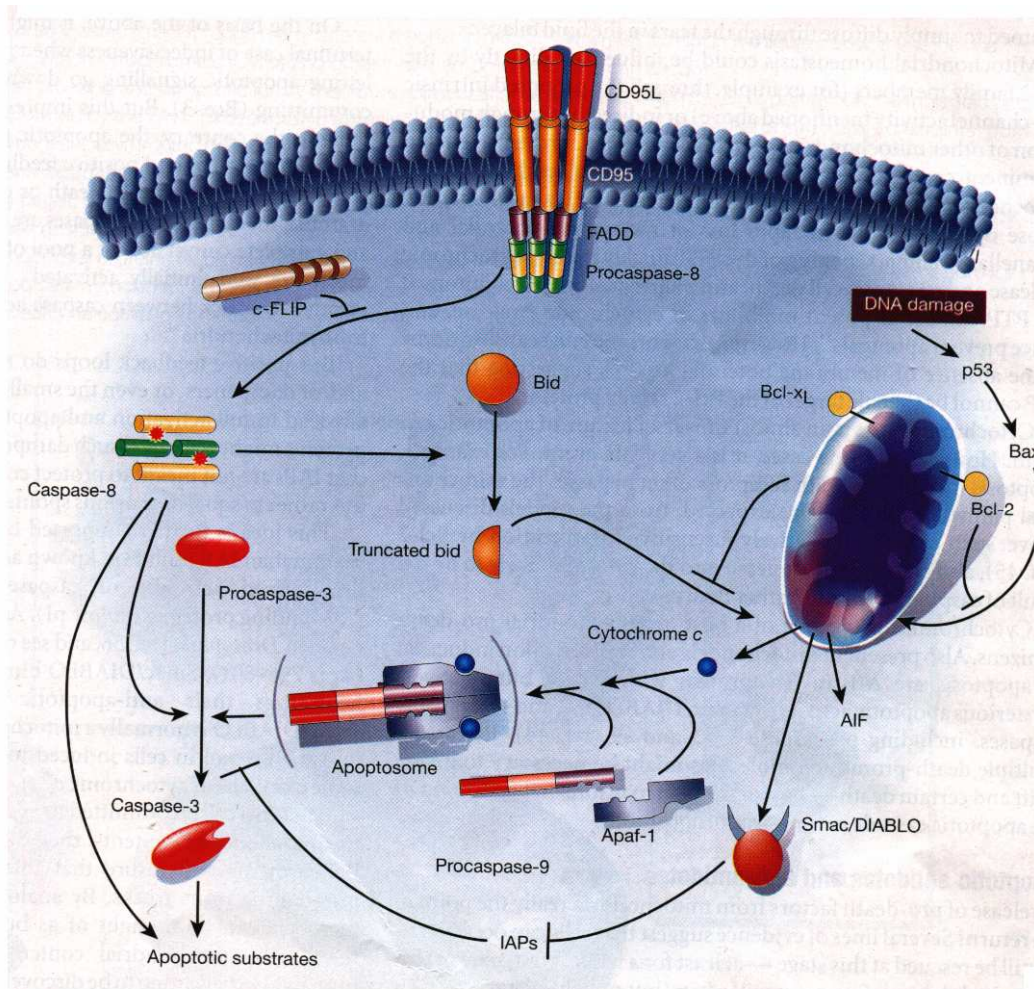
- Mirties receptoriai (Fas, FasL). Tai 80 amino rūgščių seka, vadinama „mirties domenu“. Tai dažniausias apoptozės kelias.

- Molekulės – adaptoriai. Jos perduoda signalus iš receptorių į domeną.

Kaspazių sistema. Kaspazės – tai proteolitiniai fermentai, suardantys ląsteles-taikinius. Šie baltymai aktyvuojasi dalyvaujant mitochondrijoms arba mirties receptorių keliu (6 pav.).

- Nespecifiniai veiksniai, tokie, kaip citotoksiniai vaistai ar radiacija, irgi gali „įjungti“ kaspazių sistemą.

- Bcl-2 baltymai.



6 pav. Apoptotinio signalo perdavimo keliai – receptorinis (kairėje) ir mitochondrinis (dešinėje) (Bredesen et al., 2000). Homotrimeras CD95L jungiasi su CD95, sukeldamas pastarojo “mirties” domeno asociaciją. Po to prie jo jungiasi adapterinis baltymas FADD (Fas-associated death domain). Jis turi efektorinį mirties domeną (DED – death effector domain), prie kurio jungiasi DED turinti prokaspazė-8. Oligomerizuota prokaspazė-8 yra proteolitiškai skaldoma ir atpalaiduojama į citozolį heterotetramero pavidalu (du maži ir du dideli subvienetai). Kaspazė-8 toliau aktyvuoja kitas kaspazes (pvz. kaspazę-3) ir taip indukuoja ląstelės apoptozę. Alternatyva yra mitochondrinis kelias.

1.5.2. Apoptozės nustatymas

Apoptozė iš pradžių buvo nustatoma remiantis morfologiniais kriterijais. Tačiau klaidos ir galima subjektyvi interpretacija paskatino ieškoti biocheminių metodų. Kai kurie metodai

nustato ankstyvus pokyčius, tokius kaip fosfatidilserino išsivertimą iš vidinės į išorinę plazminės membranos pusę: prie šio neigiamą krūvį turinčio fosfolipido yra prijungiamas žymėtas baltymas aneksinas V. Kitais metodais nustatomas vėlyvas apoptozės požymis – DNR skilimas (apoptozės metu veikiant endonukleazėms, DNR yra suskaldoma į fragmentus po 180 nukleotidų). Apoptozė gali būti nustatyta atliekant DNR elektroforezę. Šiuo metu plačiausiai naudojamas metodas apoptozei nustatyti yra TUNEL (angl. TdT mediated X-dUTP nick end labeling). Šiuo metodu yra pažymimos DNR dvigubos grandinės nutrūkimo vietos, prijungiant žymėtus nukleotidus. Toks ženklavimas išryškina plačius DNR grandžių trūkius ir laisvus 3'-OH galus. Jis gali būti pritaikomas ir atskiroms ląstelėms, ir audiniams. TUNEL yra jautrus metodas, tačiau neseniai buvo suabejota jo specifiškumu. TUNEL privalumas yra tai, kad tuo pačiu metu gali būti įvertinta branduolio ir ląstelės morfologija. Siekiant kiekybiškai įvertinti izoliuotų ląstelių ar viso audinio apoptozę, yra nustatomas apoptotinis indeksas – tai TUNEL teigiamų branduolių ir visų tiriamo audinio branduolių skaičiaus santykis, išreikštas procentais. Kad būtų gauti tikslesni rezultatai, reikia derinti tris - keturis metodus. Visi šie metodai pritaikyti audiniams ir ląstelių kultūroms. Dabar siekiama sukurti tokius metodus, kurie leistų nustatyti apoptozės lygį neatliekant biopsijos, tik tiriant kraują (jau dabar galima nustatyti Fas ligando ir Fas receptorių koncentraciją kraujyje).

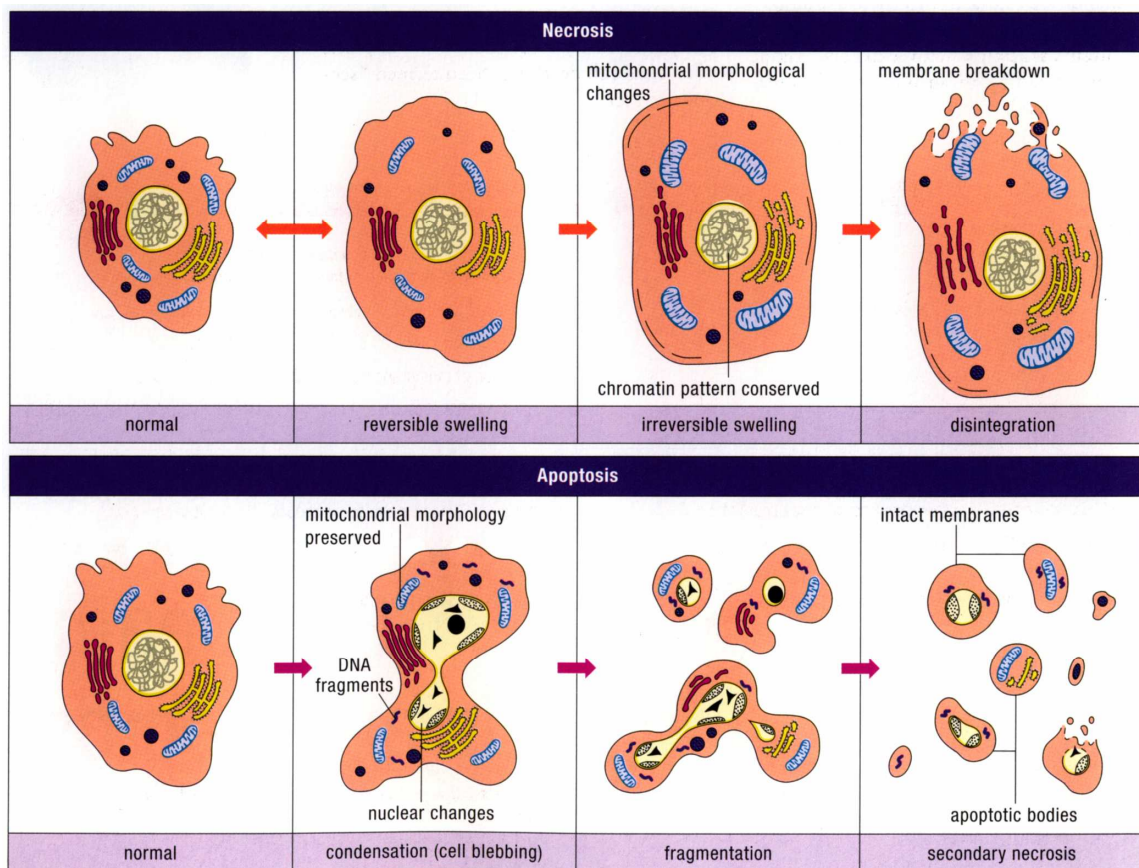
1.5.3. Citotoksiškumas, apoptozė ir nekrozė

Citotoksiškumas – tai cheminės medžiagos arba ląstelės (citotoksinės T ląstelės) gebėjimas žudyti ląsteles. Kitaip negu apoptozė ir nekrozė, šis terminas nenusako ląstelės žūties mechanizmo.

Apoptozė – programuota ląstelės žūtis nepakitusiomis fiziologinėmis sąlygomis. Šiam procesui būdingi morfologiniai požymiai yra chromatino agregacija, branduolio bei citoplazmos kondensacija ir branduolio bei citoplazmos susiskirstymas į apoptotinius kūnus (7 pav. apačia).

Nekrozė – ląstelės žūtis stipriai pakitus fiziologinėms sąlygoms (pvz., hipotermija, hipoksija). Nekrozė gali įvykti komplemento sistemai paveikus ląstelės membraną, taip pat esant toksiniams metabolitams, lizuojantiems virusams bei neigiamam aplinkos poveikiui.

Nekrozės metu padidėja ląstelės organelės, ypač mitochondrijos, vėliau pratrūksta plazminė membrana (ląstelės lizė). (7 pav. viršus). Ląstelė išskiria citoplazmos komponentus į tarpląstelinę ertmę, todėl pakankiam aplinkiniams ląstelėms sukeldama uždegiminę reakciją. Specifinis nekrozės signalinis kelias neaptiktas. Nekrozės atveju DNR degraduojama nespecifiškai.



7 pav. Nekrozės ir apoptozės morfologiniai požymiai (Boehringer, 1998)

2. Metodinė darbo dalis

2.1. Darbo objektas

Tyrimuose mes naudojome FLK (foetal lamb kidney) ląstelių liniją, kuri buvo gauta transfekavus avies embriono inkstų fibroblastus galvijų leukemijos virusu (GLV).

GLV yra egzogeninis C tipo retrovirusas, kuris kartu su žmonių T-limfotropiniais 1 ir 2 tipo virusais priklauso transaktyvuojančių onkovirusų grupei, *Retroviridae* šeimai, *Oncovirinae* pošeimiui ir onkornavirusų genčiai (Merza et al., 1991). FLK genome rasti 1-4 integruoti provirusai, tačiau ne visi pasižymėjo ekspresija (Altaner et al., 1985). Imunofluorescencijos būdu nustatyta, kad 70-80 % virusinių antigenų lokalizuoti ląstelių citoplazmoje. GLV dalelės rastos citoplazmos vakuolėse ir tarpląsteliniam skystyje. GLV atvirkštinės transkriptazės aktyvumas FLK ląstelių supernatante po 5-6 parų kultivavimo atitinka $1,0-2,2 \times 10^9$ virusinių dalelių/ml. Dalelių diametras – 90-120 nm, jų centre – didelio elektroninio tankio nukleoidas (diametras 60-90 nm). Pumpuravimasis stebimas retai.

FLK linijos ląstelės gausiai ekspresuoja GLV ir jo antigenus. Ši linija demonstruoja tam tikrus piktybinei transformacijai būdingus bruožus: padidėjusį ląstelių populiacijos tankį, pagreitėjusią proliferaciją (ląstelių kiekio padvigubėjimo laikas sumažėja 1,5-2 kartus), sugeba sudaryti kolonijas skystame agare, sukelia auglius plikoms pelėms, stipriau akumuliuoja 2-dezoksi-D-gliukozę – neaktyvų gliukozės analogą (Onuma et al., 1981). Šalia to, FLK linijos ląstelės pasižymėjo aneuploidija, heteroploidija ir kariotipiškai skyrėsi nuo normalių avies ląstelių, nes turėjo 16 metacentrinių ir 58 akrocentrines chromosomas, tuo tarpu normoje yra 54 chromosomos, atitinkančios diploidinį rinkinį (Nemeikaitė, 1995).

2.2. Ląstelių kultivavimas

FLK kultūra gauta iš Latvijos Mikrobiologijos instituto (Ryga) ir yra pastoviai palaikoma bei tyrinėjama VU Imunologijos institute. Šis darbas buvo atliktas VU Imunologijos instituto biomodelių laboratorijoje. FLK ląstelės buvo auginamos minimalioje ląstelių auginimo terpėje MEM (minimum essential media) (Biological industries, Israel) su 0,3 µg/ml glutamino, pridendant 10 % inaktyvuoto (30 min 56 °C temperatūroje) fetalinio veršelių serumo (Biological industries, Israel), 100vien/ml penicilino ir 50-100 µg/ml streptomicino. Pradinė ląstelių pasėlio koncentracija naudojama ląstelių palaikymui buvo $2-5 \times 10^4$ ląst/ml. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje 4-7 paras iki pilno monosluoksnio susidarymo. Tada ląstelių monosluoksnis suardomas veikiant jį 3-5 minutes 0,25 % tripsino (Biological

industries, Israel) ir 0,02 % Verseno (VU Imunologijos institutas) mišiniu (1:1). Po to ląstelės persėjamos arba naudojamos citotoksiniam tyrimui. Persėjimo koeficientas – 1:3 – 1:5.

FLK ląstelių augimas buvo įvertintas kelių parų laikotarpiu. Pradinė pasėlio koncentracija – 25000 ± 1000 ląstelių/ml. Ląstelės sėjamos į stiklinius 10 ml flakonus. Po paros ląstelių monosluoksnis veikiamas 3 minutes 0,25 % tripsino ir 0,02 % Verseno (1:1) mišiniu. Mišinys nupilamas, užpilama 10 ml Henkso tirpalo, ląstelės resuspenduojamos. Toliau ląstelių skaičius įvertinamas šviesiniu mikroskopu Gorjajevo kameroje atitinkamai pridodant 0,4 % tripano mėlio tirpalo. Gyvos ląstelės šviesios, negyvos – dažosi mėlynai. Tą patį atlikus kiekvieną parą sudaryta ląstelių augimo kreivė. Eksperimentai kartoti 3-6 kartus. Tokiu pačiu būdu, į terpę įvedus tiriamuosius junginius, atlikti citotoksiškumo tyrimai.

2.3. Kultivavimas ant stiklelių ir dažymas

FLK ląstelės sėjamos ($2,5 \times 10^4$ ląst/ml) į 5 ml flakonus su dengiamaisiais stikleliais aukščiau aprašytoje mitybinėje terpėje ir kultivuojamos 24 val 37 °C temperatūroje. Tada dengiamieji stikleliai išimami, plaunami fiziologiniu tirpalu, džiovinami, 2 min fiksuojami metanoliu, vėl džiovinami. Fiksuoti preparatai 35 min dažomi 5% azur-eozino dažais pagal klasikinį Romanovskio-Gimzos metodą. Paruoštuose preparatuose stebima FLK ląstelių morfologija, naudojant šviesinį mikroskopą „Leica“ su skaitmenine fotokamera (Nemeikaitė-Čėnienė, 2005).

2.4. Apoptozės tyrimas

2.4.1. Fluorescencinė mikroskopija

Fluorescencinė mikroskopija – vienas populiariausių ląstelės tyrimo metodų. Fluorescuojančių molekulių pagalba galima tirti visus ląstelės organoidus. Daugeliu atvejų dirbama su fiksuotomis ląstelėmis, tačiau pagrindinis fluorescencinės mikroskopijos privalumas yra galimybė tirti įvairius procesus, vykstančius gyvoje ląstelėje.

Ląstelės biologijos tyrimuose skiriamos kelios fluorescuojančios mikroskopijos rūšys:

- Skirtingi hidrofobiniai žymekliai, naudojami membranų ir lipidinių darinių tyrimui. Tokių žymeklių pagalba galima ne tik nustatyti lipidų lokalizaciją, bet ir tirti lipidinio dvisluoksnio dinamines savybes.
- Žymekliai, padedantys nustatyti DNR kiekį gyvoje ląstelėje (pvz., žymeklis Hoechst-33342).

- Specifiniai mitochondrijų žymekliai, naudojami tik gyvose ląstelėse (pvz., rodaminas 123. Jei jis nekaupiamas mitochondrijose, galima daryti išvadą, kad ląstelė žuvusi).
- Sintetiniai žymekliai, jautrūs ląstelės pH (pvz., fluoresceinas), Ca^{2+} koncentracijai (pvz., kvinas-2) arba membraniniam potencialui.

Visi šie metodai dažniausiai naudojami ląstelių populiacijų tyrimams, tačiau žinomi ir tokie darbai, kur tiriama Ca^{2+} ir H^+ koncentracija atskiroje ląstelėje. Labai populiarius metodus – ląstelėje vykstančių procesų tyrimas išvirkštus specifinius viduląsteliniais baltymams (pvz., citoskeleto baltymams) antigenus su fluorescuojančia žyme.

Visų minėtų metodų eksperimentų etapai yra bendri: 1) fluorescencinės žymės sintezė ir gryninimas; 2) fluorescencinio konjugato poveikio ląstelei nustatymas; 3) žymens spektrinių savybių nustatymas *in vitro*; 4) fluorescencinių molekulių įvedimas į ląstelę ir spalvos intensyvumo bei dažymo laiko parinkimas; 5) interpretuojant fluorescencinio mikroskopavimo rezultatus būtina atsižvelgti į savaiminę ląstelių fluorescenciją, kuri yra skirtinga, priklausomai nuo ląstelių rūšies ir vietos ląstelėje.

2.4.2. FLK ląstelių apoptozės tyrimas naudojant akridino oranžo ir Etidžio bromido fluorescuojančius dažus

Po 24 valandų eksperimentinių medžiagų poveikio buvo vertinamas ląstelių pasiskirstymas kultūroje: gyvos, apoptotinės ir nekrotinės pagal dažymąsi akridino oranžiniu ir Etidžio bromidu (AO/EB). Naudojamas dažų mišinys: 100 $\mu\text{g/ml}$ akridino oranžinio ir 100 $\mu\text{g/ml}$ Etidžio bromido. 15 μl dažų mišinio dedama ant objektyvinio stiklelio, uždengiama dengiamuoju stikleliu. Analizuojama fluorescentiniu mikroskopu (bangos ilgis 500 nm). AO įjungia gyvos ir negyvos ląstelės. Šis dažas interkalijuojasi į dvigrandę DNR ir nudažo branduolį žaliai. AO taip pat jungiasi su RNR ar viengrande DNR ir nudažo rausvai oranžine spalva. EB jungia tik negyvos ląstelės, nes gyvų ląstelių membrana nepraleidžia šio dažo. EB sąveikauja su DNR ir nudažo branduolį oranžine, RNR – silpnai oranžine spalva. Tokiu būdu, negyvos ląstelės turi ryškiai oranžinį chromatiną, o citoplazmos likučiai atrodo tamsiai rusvi. Šiuo būdu išskyrėme kelių tipų ląsteles:

- 1) gyvas neapoptotines (G – ryškiai žalias chromatinas);
- 2) apoptotines:
 - gyvas apoptotines (GA – kondensuotas ar fragmentuotas ryškiai žalias chromatinas);
 - negyvas apoptotines (NA – kondensuotas ar fragmentuotas ryškiai oranžinis branduolys);
- 3) kitas:

- nekrotines (N – oranžinis chromatinas);
 - be chromatino (Š – ląstelės, netekusios DNR dažosi silpnai oranžine spalva), tačiau šių ląstelių skaičius nesiekė 1 %, todėl statistiniam įvertinimui įtakos neturėjo.
- Kiekviename pavyzdyje skaičiavome po 100-200 ląstelių.
- Kartojome 3-5 kartus statistiniam įvertinimui.

2.5. Matematinis rezultatų apdorojimas

Gauti rezultatai įvertinami naudojant išraišką $M \pm m$, kur M- bendras vidurkis, m- vidurkio standartinė paklaida ($m = [(\sum a^2)/n(n-1)]^{1/2}$, kur a- nukrypimas nuo vidurkio, n- pakartojimų skaičius). Skaičiuotas ir stjudento patikimumo koeficientas (p). Gauti duomenys laikomi patikimais, kai $p < 0,05$. Skaičiavimai atlikti naudojant kompiuterinę programą Sigmaplot (versija 1.02.).

2.6. Tyrimams naudoti junginiai

Daunorubicinas („Minmedprom“, Rusija) (8 pav. A);

Durochinonas – Tetrametil-1,4-benzochinonas („Sigma“, Vokietija) (8 pav. B);

MeDZQ – 2,5-dimetil-2,6-diaziridinil-1,4-benzochinonas (dr. Jonas Šarlauskas, Biochemijos institutas, Vilnius) (8 pav. D);

RH1 – 2,5-diaziridinil-3-(hidroksimetil)-6-metil-1,5-benzochinonas (dr. Jonas Šarlauskas, Biochemijos institutas, Vilnius) (8 pav. C);

H₂O₂ – vandenilio peroksidas („Sigma“, Vokietija);

DPPD – N,N'-difenil-1,4-difenilendiaminas. („Sigma“, Vokietija) Saugo nuo lipidų oksidacijos, apsaugo dvisluoksnę membraną;

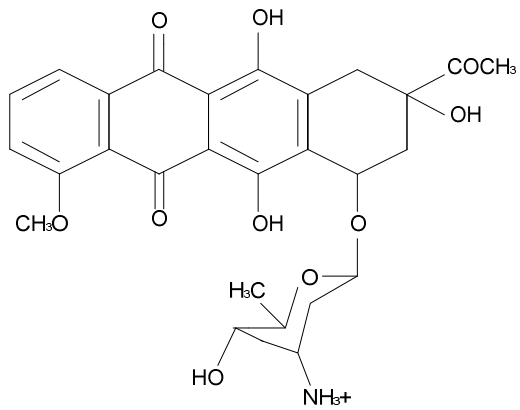
Desferioksiaminas („Sigma“, Vokietija). Geležies jonų (Fe²⁺) chelatorius;

Dikumarolas – 3,3'-dimetilen-4-hidroksikumarinas („Sigma“, Vokietija). Slopina NQO1, kuri katalizuoja aziridinilhidrochinonų susidarymo reakcijas ir lemia DNR alkilinimą;

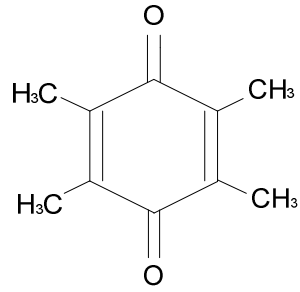
Alopurinolis („Sigma“, Vokietija). Struktūrinis hipoksantino analogas. Blokuoja ląstelės ksantinoksidazę, kuri padeda skaidyti purino bazines;

Katalazė („Sigma“, Vokietija). Skaido vandenilio peroksidadą.

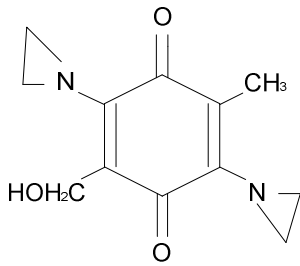
Junginiai tirpinti dimetilsulfokside (DMSO) („Sigma“, Vokietija), kad jų praskiedimas ląstelių auginimo terpėje būtų 1:1000. Nustatyta, kad šis tirpiklis neįtakojo FLK ląstelių gyvybingumo.



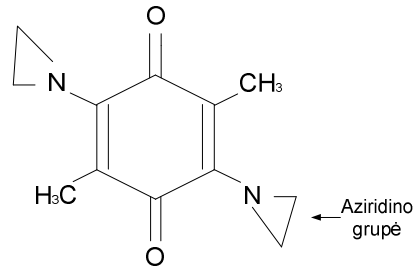
A



B



C



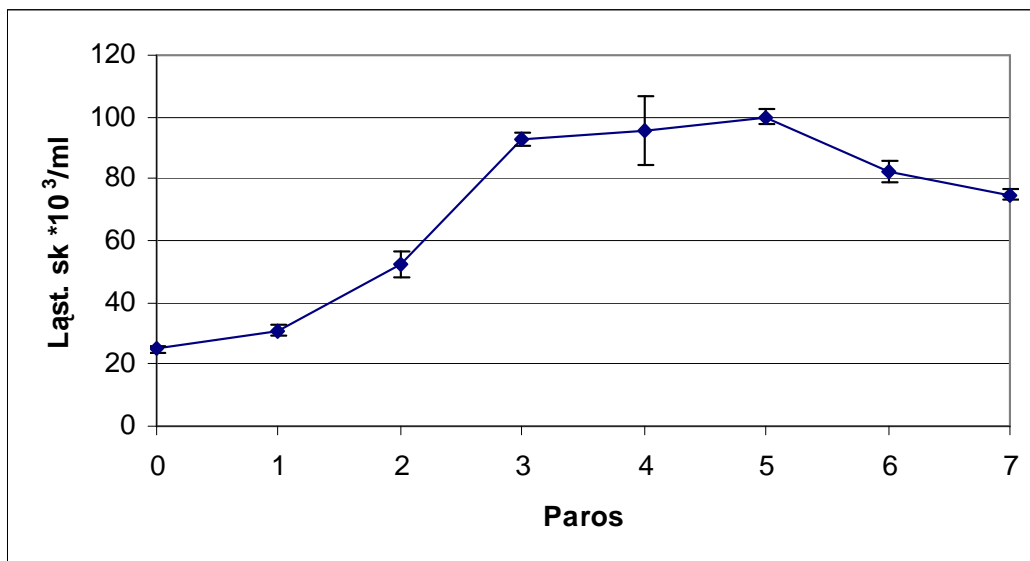
D

8 pav. Tyrimams naudotų chinoninių junginių struktūra: A – Daunorubicinas, B – Durochinonas, C – RH1, D – MeDZQ.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. FLK ląstelių augimo dinamika

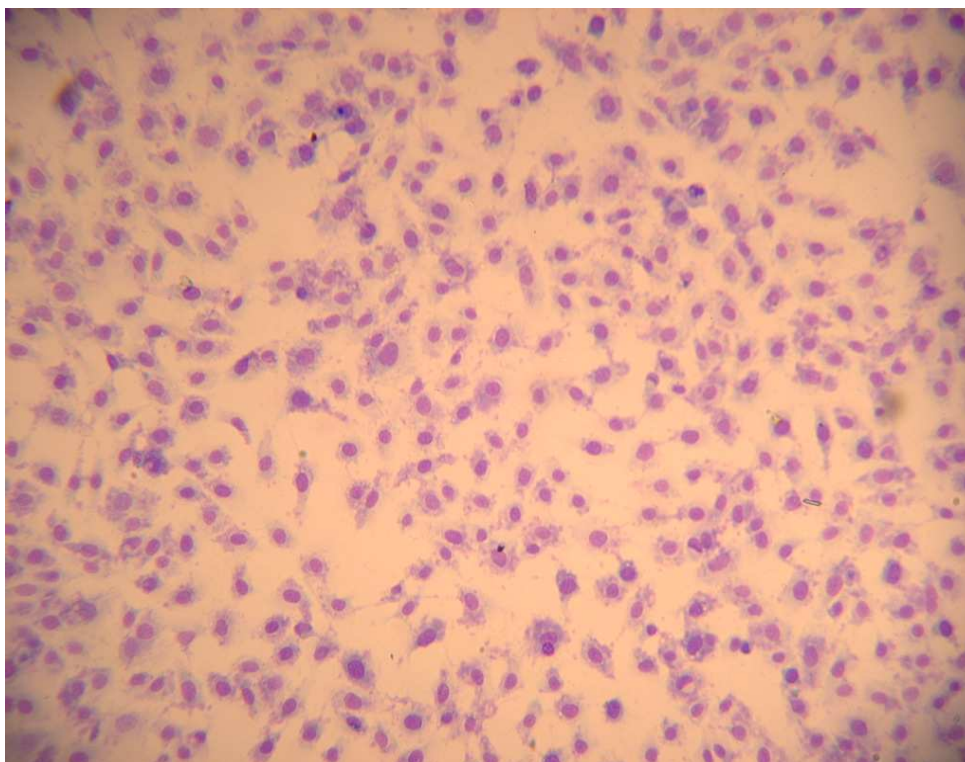
Pradiniame darbo etape mes sudarėme ląstelių augimo kreivę (9 pav.). Pirmą parą ląstelių skaičius žymiai nekito ir tai atitiko lag fazę. Antrąją ir trečiąją parą ląstelių skaičius padidėjo daugiau negu tris kartus, pasiekdamas 92500 ± 2080 ląstelių/ml. Neabejotinai tai logaritminio augimo fazė. Negyvos ląstelės šioje fazėje sudarė apie 1 %. Ketvirtą, penktą ir šeštą parą ląstelių skaičius ženkliai nebekinta, susiformuoja pilnas monosluoksnis ir tai yra stacionaraus augimo fazė. Paskutinę, septintąją parą, ląstelių skaičius vėl mažėja. Tai paaiškinama tuo, kad susiformavęs monosluoksnis pradeda irti ir tolimesnį ląstelių augimą riboja ploto trūkumas. Be to, augimo metu uždaroje sistemoje išsikvojama mitybinė terpė. Negyvų ląstelių yra 4-15 %.



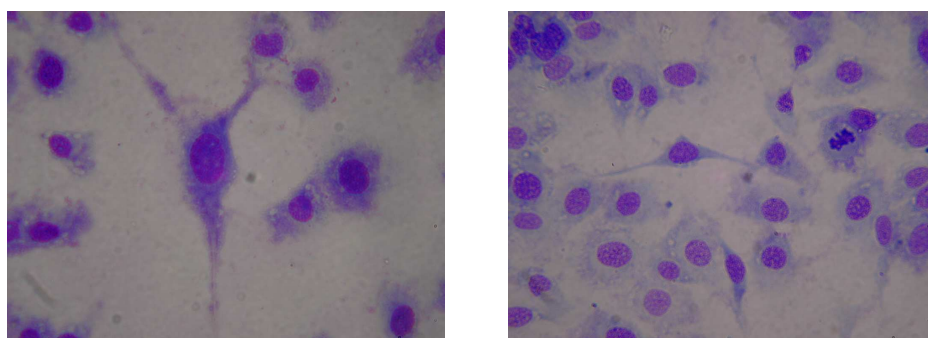
9 pav. FLK ląstelių augimo dinamika

3.2. Ląstelių morfologija

Kad nustatyti FLK ląstelių morfologiją, ląstelių monosluoksnis, augintas ant dengiamųjų stiklelių, buvo dažomas klasikiniu Romanovskio-Gimzos metodu, tada stikleliai mikroskopuojami ir fotografuojami. Nuotraukos pateiktos 10 ir 11 pav.



10 pav. FLK ląstelių monosluoksnis po 24 val (padidėjimas 100×). Dažyta klasikiniu Romanovskio-Gimzos metodu.

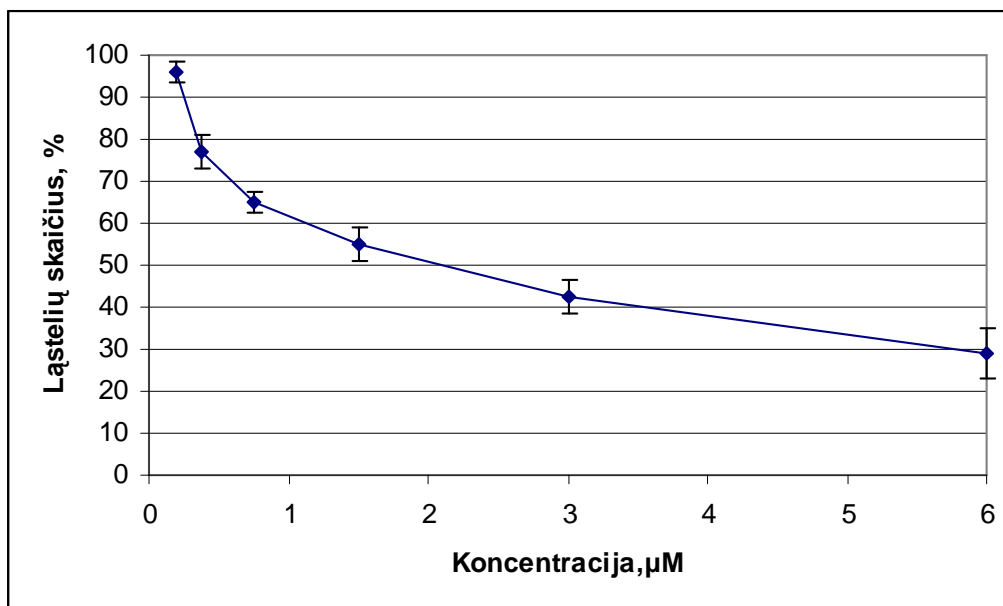


11 pav. FLK ląstelės (padidėjimas 400×). Dažyta klasikiniu Romanovskio-Gimzos metodu.

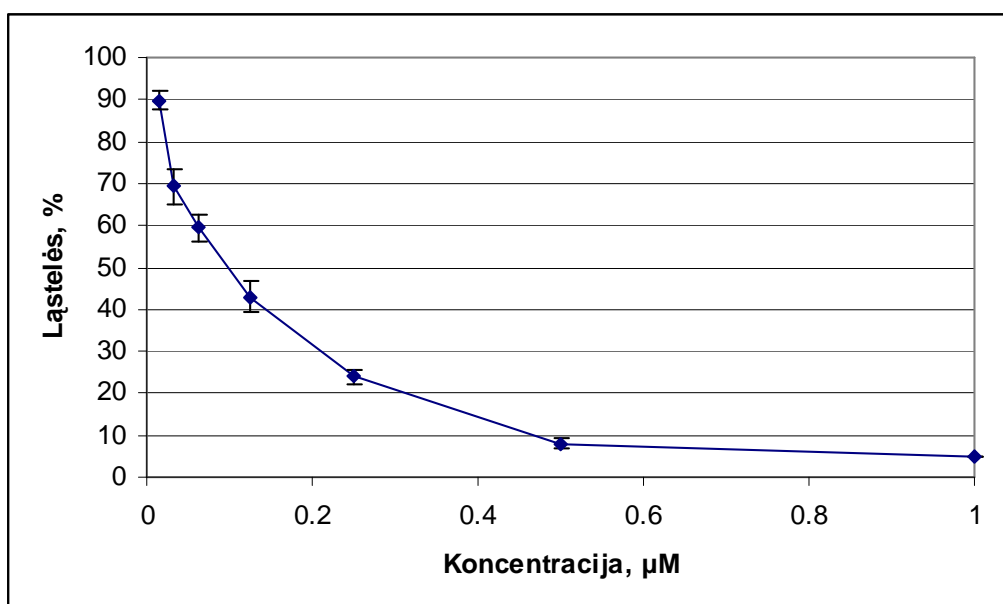
FLK ląstelės auga monosluoksniu. Tai fibroblastų kilmės ląstelės dažnai turinčios verpstinę formą. Tačiau FLK ląstelių linija morfologiniu požiūriu nėra vienalytė ląstelių populiacija, sutinkama tiek dydžio, tiek formos įvairovė (11 pav).

3.3. cL_{50} nustatymas ir citotoksiškumo priklausomybė nuo vienelektroninės redukcijos potencialo

Citotoksiškumas išreiškiamas kaip cL_{50} , t.y., junginio koncentracija, kuriai esant žūsta 50% ląstelių. Ji nustatyta auginant FLK ląsteles ir įvedant skirtingas tiriamo junginio koncentracijas. Tada sudaromas ląstelių skaičiaus priklausomybės nuo junginio koncentracijos grafikas. Daunorubicino (8 pav. A) atveju iš grafiko (12 pav.) nustatyta, kad jo cL_{50} yra $2 \pm 0,2 \mu\text{M}$, o RH1(8 pav. C) – $0,08 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (13 pav.). Analogiškai nustatytos ir kitų tirtų junginių cL_{50} vertės: MeDZQ (8 pav. D) - $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$, Durochinono (8 pav. B) - $40 \pm 6 \mu\text{M}$, H_2O_2 - $50 \pm 7 \mu\text{M}$. Iš šių koncentracijų matyti, kad aziridino grupes turintys chinonai yra citotoksiškesni. Šios koncentracijos naudotos tolimesniems tyrimams.



12 pav. Gyvų ląstelių skaičius esant skirtingoms daunorubicino koncentracijoms



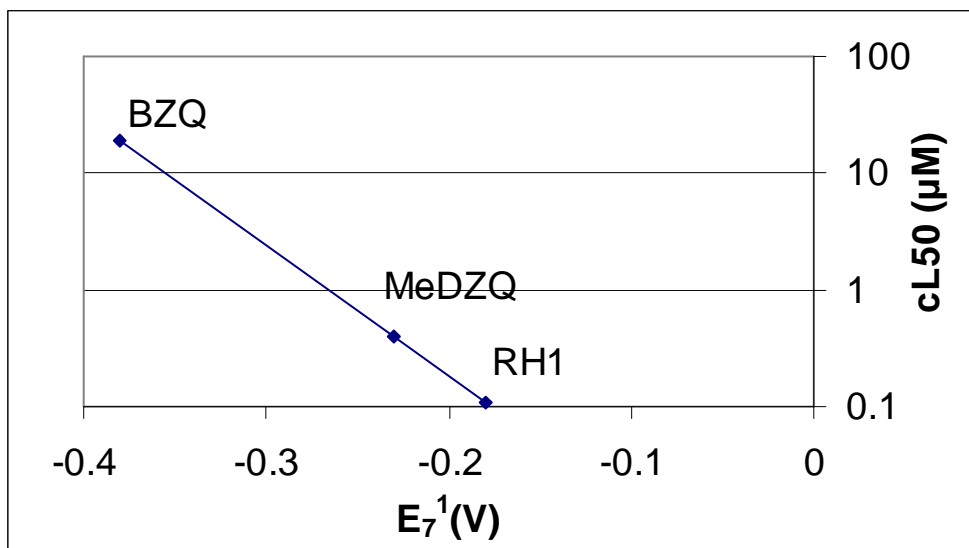
13 pav. Gyvų ląstelių skaičius esant skirtingoms RH1 koncentracijoms

Nustčius chinoninių junginių cL_{50} , parodyta jų cL_{50} priklausomybė nuo E^1_7 (viennelektroninės redukcijos potencialo) (1 lentelė, 14 pav.). Viennelektroninės redukcijos potencialas skaičiuotas remiantis aziridino ir metilo grupių panašia įtaka E^1_7 skaitinei vertei ir tuo, kad metilo grupę pakeitus hidroksimetilu, E^1_7 padidėja 0.05V (Wardman, 1989).

Iš 14 pav. matyti, kad nuo viennelektroninės redukcijos potencialo (E^1_7) tiesiogiai priklauso chinoninių junginių citotoksinis poveikis FLK ląstelėms (cL_{50}). Šiuo atveju RH1 didžiausias E^1_7 , o BZQ – mažiausias. Atitinkamai kinta ir šių junginių citotoksinis poveikis.

1 lentelė. cL_{50} priklausomybė nuo viennelektroninės redukcijos potencialo (E^1_7)

Junginys	E^1_7 (V)	cL_{50} (μM)
BZQ	-0,38 (Wardman, 1989)	$19,0 \pm 1,5$ (Nemeikaitė-Čėnienė et al., 2003)
MeDZQ	-0,23 (Wardman, 1989)	$0,4 \pm 0,03$
RH1	-0,18 (Nemeikaitė-Čėnienė et al., 2003)	$0,11 \pm 0,01$

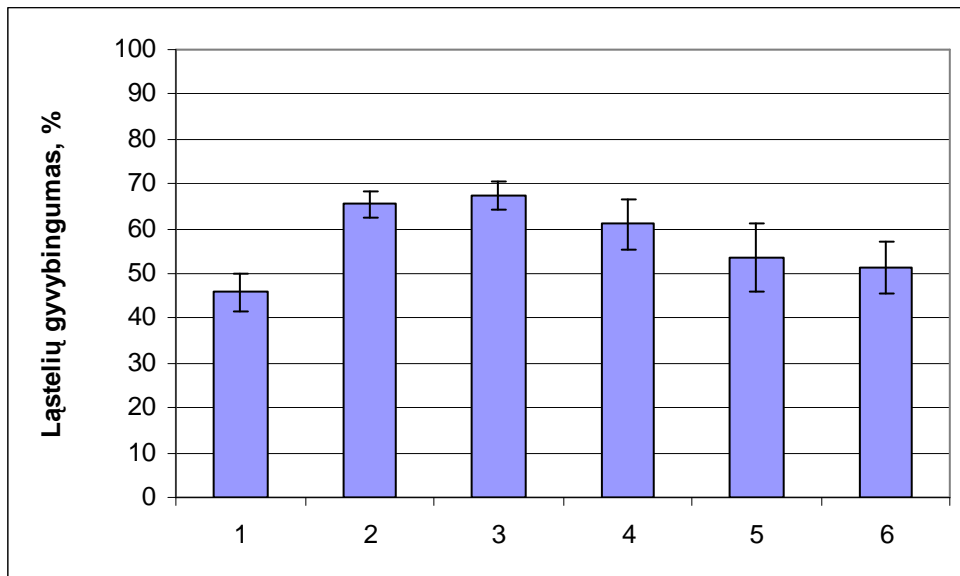


14 pav. Chinonų citotoksiškumo FLK ląstelėms priklausomybė nuo vienelektroninės redukcijos potencialo (E_7^1).

Didėjant chinonų E_7^1 reikšmėms, didėja ir jų aerobinis toksiškumas (proporcingumo koeficientas $\Delta \log cL_{50}/E_7^1$ artimas -10 V^{-1}). Tokio tipo priklausomybė rodo tai, kad pagrindinis citotoksiškumo mechanizmas yra oksidacinis stresas. Toksiškumo priklausomybė nuo redokso potencialo atspindi fermentinės vienelektroninės redukcijos įtaką citotoksiškumui, kadangi chinonų vienelektroninė redukcija flavindehidrogenazėmis – elektrontransferazėmis (pavyzdžiui NAD(P)H citochromo c reduktaze, feredoksino NADP⁺ reduktaze) didėja, kai didėja jų E_7^1 su koeficientu $\Delta \log k/\Delta E_7^1 \sim 10 \text{ V}^{-1}$. Aziridino arba $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$ grupių įvedimas į šių junginių struktūrą dažnai padidina jų citotoksiškumą. Be to, į DNR interkaliojančių antraciklino chinonų (andriamicino ar daunorubicino) citotoksiškumas didesnis, negu nesiinterkaliojančių chinonų su tokiu pačiu E_7^1 citotoksiškumas.

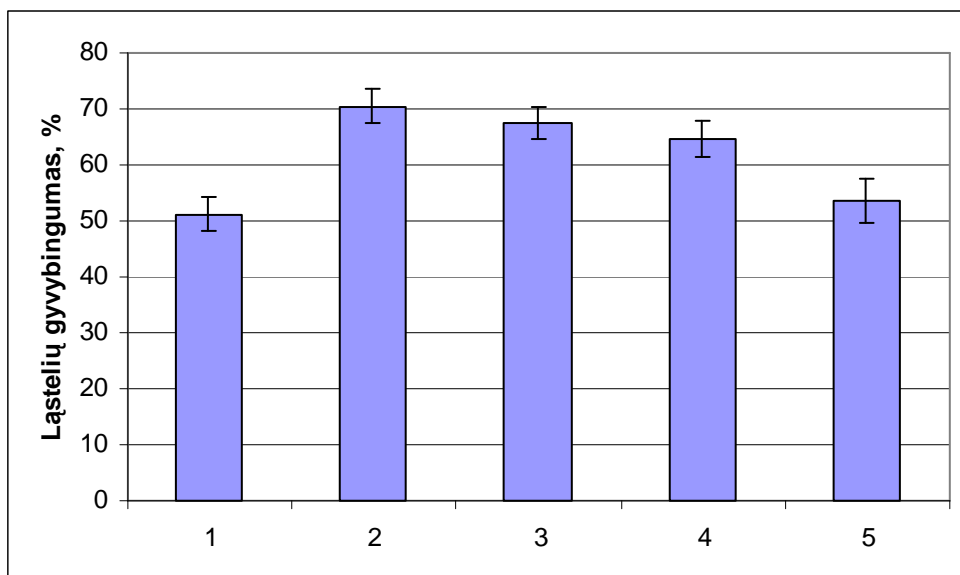
3.4. Citotoksiškumo tyrimai

Kitame etape ištirta DPPD, desferioksiamino, alopurinolio ir dikumarolo įtaka priešnavikinių chinonų ir H₂O₂ citotoksiškumui (15, 16, 17, 18, 19 pav.). Duomenų standartizacijai naudotos junginių koncentracijos, sukeliančios 50 % ląstelių žūtį.

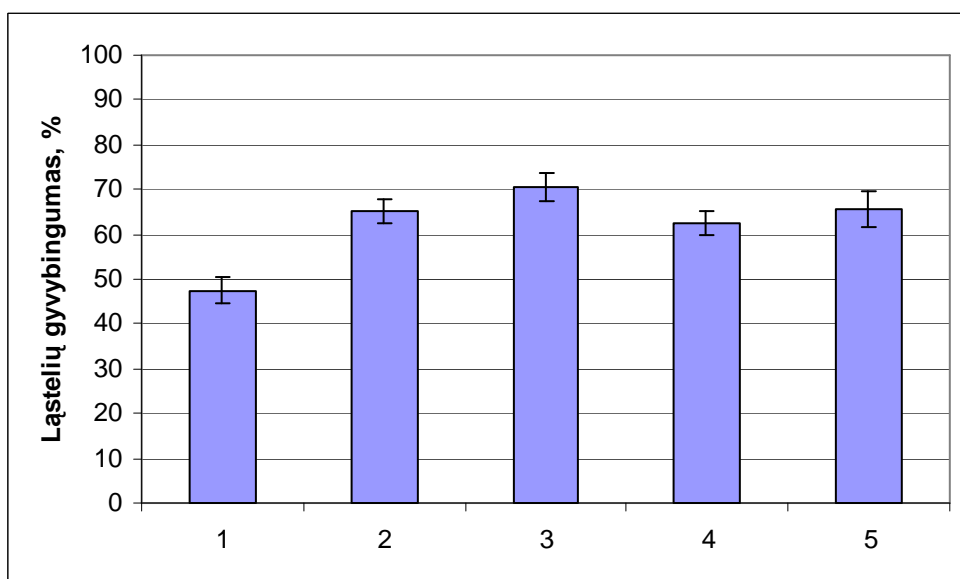


15 pav. DPPD(2 μ M), desferioksiamino (300 μ M), alopurinolio (100 μ M), dikumarolo (20 μ M) ir katalazės (1 μ M) įtaka 2,0 μ M daunorubicino citotoksiškumui. Priedai: daunorubicinas (1), daunorubicinas + DPPD (2), daunorubicinas + desferioksiaminas (3), daunorubicinas + alopurinolis (4), daunorubicinas + dikumarolas (5), daunorubicinas + katalazė (6), n=3-4; 2,3 ir 4 atvejais $p < 0,05$, 5 atveju $p = 0,5$, 6 – $p = 0,4$. (1 vs 2,3,4,5,6).

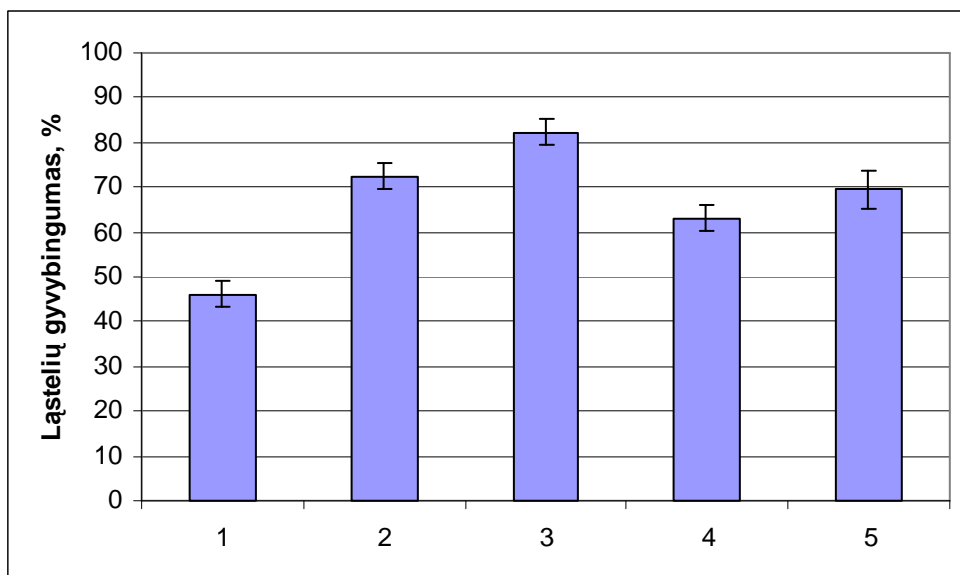
Daunorubicinas (8 pav. A) ir kiti antraciklininiai chinonai yra naudojami vėžiui gydyti. Jų citotoksiškumą lemia interkaliacija į DNR ir topoizomerazės inhibicija. Kita vertus, yra ir kitas citotoksiškumo mechanizmas – oksidacinis stresas, kurio metu susidaro LR ir redukuojami antraciklinai. Tai patvirtina dalinė apsauga antioksidantais nuo daunorubicino citotoksiškumo (15 pav. 2 ir 3).



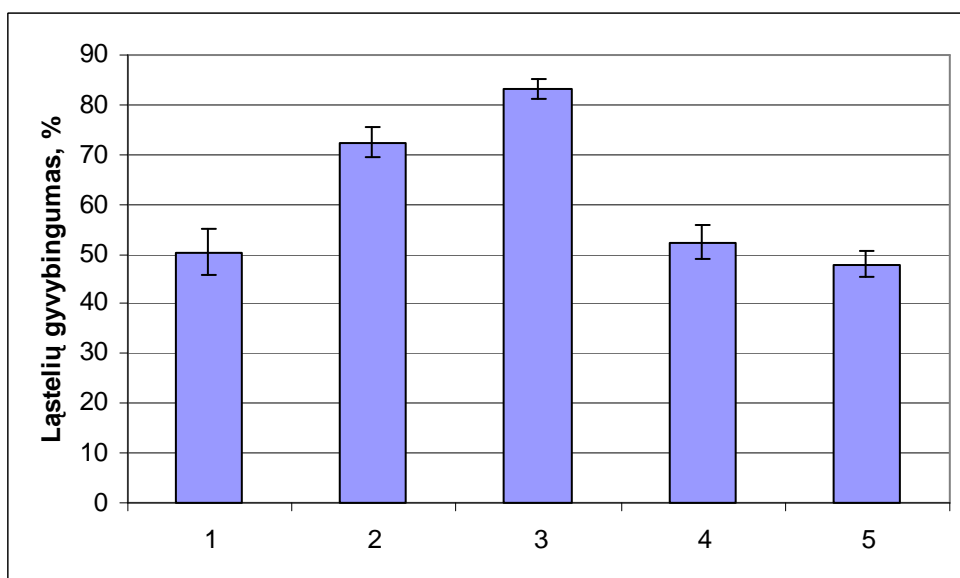
16 pav. DPPD(2 μ M), desferioksiamino (300 μ M), alopurinolio (100 μ M) ir dikumarolo (20 μ M) įtaka 40 μ M DQ citotoksiškumui. Priedai: DQ (1), DQ + DPPD (2), DQ + desferioksiaminas (3), DQ + alopurinolis (4), DQ + dikumarolas (5), n=3-4; 2, 3 ir 4 atvejais $p < 0,05$, 5 atveju $p = 0,5$ (1 vs 2,3,4,5).



17 pav. DPPD(2 μ M), desferioksiamino (300 μ M), alopurinolio (100 μ M), dikumarolo (20 μ M) įtaka 0,08 μ M RH1 citotoksiškumui. Priedai: RH1 (1), RH1 + DPPD (2), RH1 + desferioksiaminas (3), RH1 + alopurinolis (4), RH1 + dikumarolas (5), n=3-4; visais atvejais $p < 0,05$ (1 vs 2,3,4,5).



18 pav. DPPD(2 μM), desferioksiamino (300 μM), alopurinolio (100 μM), dikumarolo (20 μM) įtaka 0,4 μM MeDZQ citotoksiškumui. Priedai: MeDZQ (1), MeDZQ + DPPD (2), MeDZQ + desferioksiaminas (3), MeDZQ + alopurinolis (4), MeDZQ + dikumarolas (5), n=3-4; visais atvejais $p < 0,05$ (1 vs 2,3,4,5).

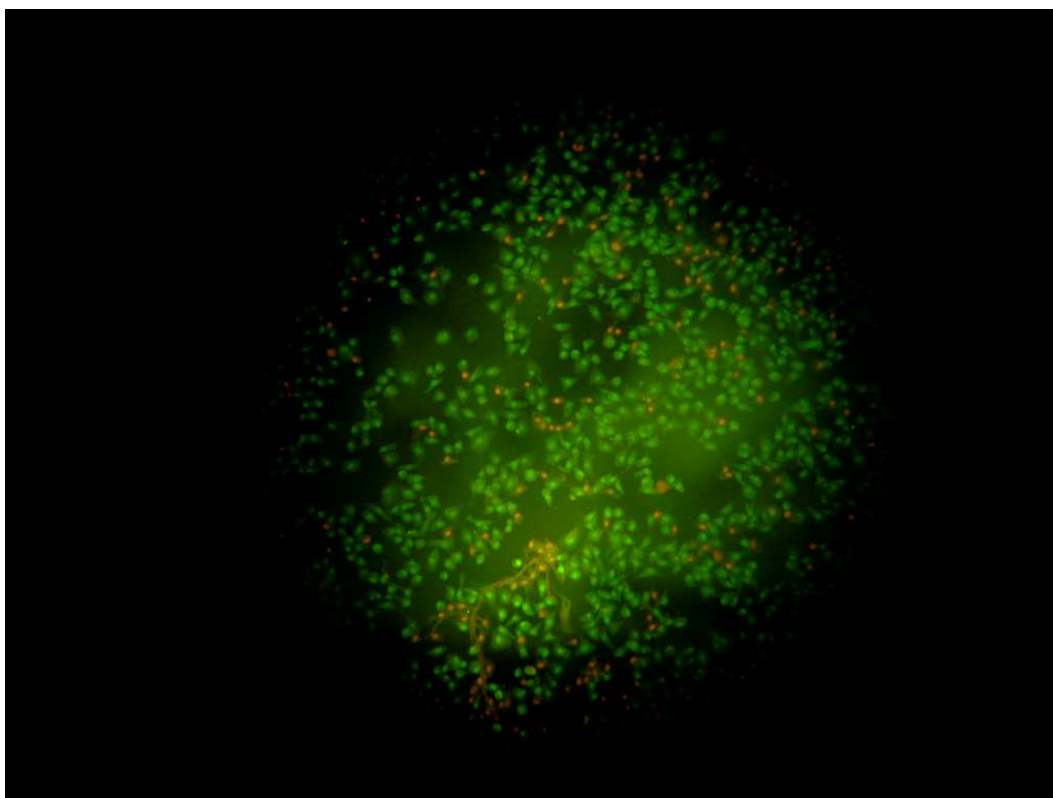


19 pav. DPPD(2 μM), desferioksiamino (300 μM), alopurinolio (100 μM), dikumarolo (20 μM) įtaka 50 μM H_2O_2 citotoksiškumui. Priedai: H_2O_2 (1), H_2O_2 + DPPD (2), H_2O_2 + desferioksiaminas (3), H_2O_2 + alopurinolis (4), H_2O_2 + dikumarolas (5), n=3-4; 2 ir 3 atvejais $p < 0,05$, 4 ir 5 skirtumas nepatikimas (1 vs 2,3,4,5).

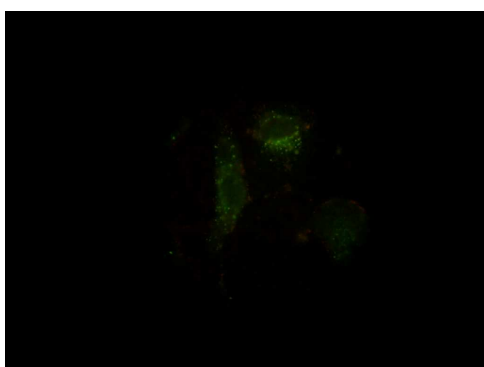
Nustatyta, kad DPPD ir desferioksiaminas apsaugo nuo daunorubicino, durochinono, MeDZQ, RH1 ir H₂O₂ sukeltos ląstelių žūties, taigi, oksidacinis stresas yra svarbus visų tirtų junginių citotoksiškumo mechanizmas. Tuo tarpu dikumarolas apsaugo tik nuo RH1 ir MeDZQ poveikio. Dikumarolo apsauginis poveikis rodo, kad RH1 ir MeDZQ papildomas citotoksiškumo faktorius yra jų redukcinė bioaktyvacija DT-diaforaze. Ši citotoksiškumą sukelia DNR alkilinimas susidariusiais aziridinilhidrochinonais (23 pav. kelias (a)), bet ne hidrochinonų autooksidacija (23 pav. kelias (c)). Alopurinolis apsaugo nuo DQ, RH1 ir MeDZQ poveikio. Tai rodo, kad šių chinonų citotoksiškumą tam tikru laipsniu lemia jų redukcija ksantinoksidaze.

3.5. Apoptozės tyrimai

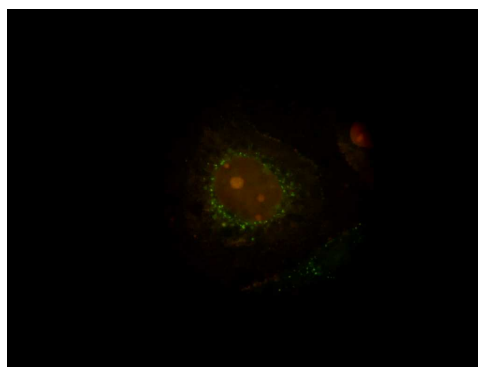
Kitame darbo etape naudojant akridino oranžinio ir Etidžio bromido (AO/EB) fluorescuojančių dažų mišinį buvo vertinamas gyvų ir apoptotinių ląstelių pasiskirstymas ląstelių kultūroje (20 pav. A).



A

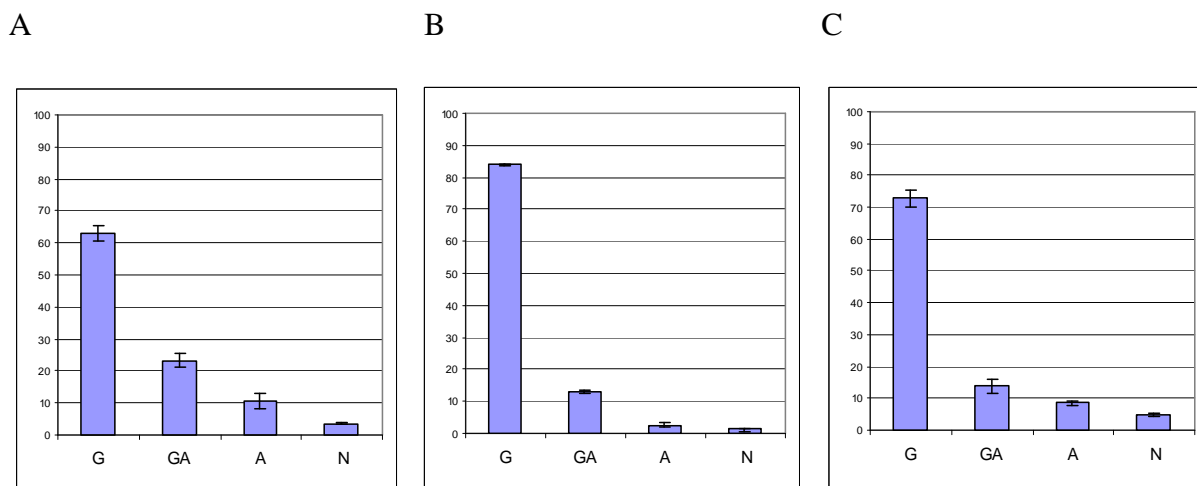


B



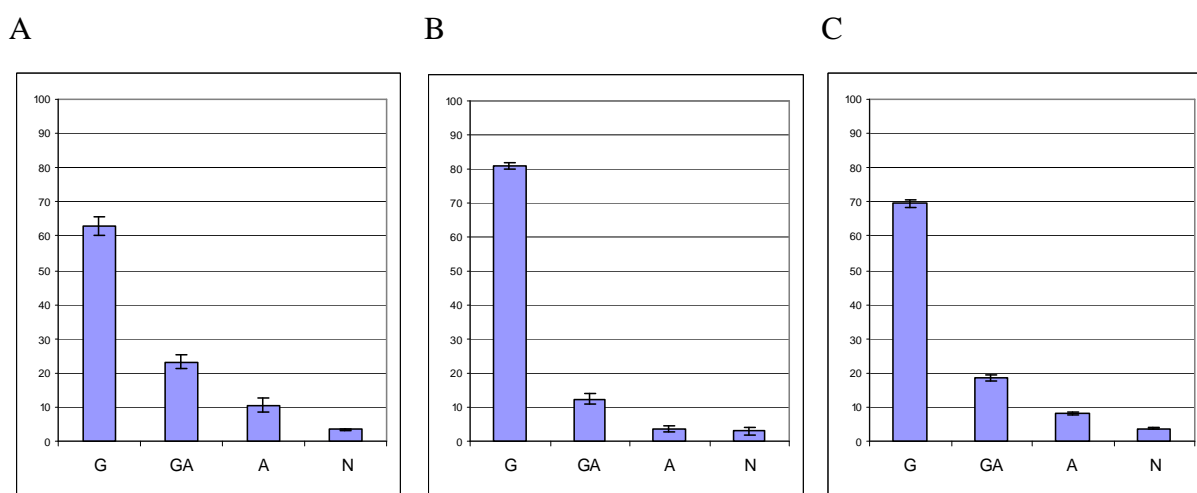
C

20 pav. FLK ląstelės, dažytos fluorescuojančiais akridino oranžinio ir etidžio bromido dažais. A – FLK ląstelių monoslauksnis (padidinimas 100×): gyvos ląstelės nusidažiusios žalia, apoptotinės oranžine spalva, B – gyvos ląstelės (padidinimas 400×), D – apoptotinė ląstelė (padidinimas 400×).



21 pav. Antioksidantų DPPD ($2\mu\text{M}$) (B) ir desferioksiamino ($300\ \mu\text{M}$) (C) įtaka $2,0\ \mu\text{M}$ daunorubicino sukeltai apoptozei. A – daunorubicino sukelta apoptozė. Priedai: G – gyvos ląstelės, GA – gyvos apoptotinės, A – apoptotinės, N – negyvos.

Antioksidantas DPPD labai gerai apsaugo FLK ląsteles nuo daunorubicino indukuotos apoptozės. Desferioksiamino atveju, patikimai skyrėsi gyvų ir gyvų apoptotinių ląstelių skaičius (lyginant su daunorubicino poveikiu). DPPD ir desferioksiaminas yra antioksidantai ir remiantis jų poveikiu, galima teigti, kad FLK ląstelėse daunorubicinas sukelia apoptozę pagal „oksidacinio streso“ mechanizmą.



22 pav. Alopurinolio ($100\mu\text{M}$) (B) ir dikumarolo ($20\ \mu\text{M}$) (C) įtaka $2,0\ \mu\text{M}$ daunorubicino sukeltai apoptozei. A – daunorubicino sukelta apoptozė. Priedai: G – gyvos ląstelės, GA – gyvos apoptotinės, A – apoptotinės, N – negyvos.

Dikumarolo atveju, patikimai skyrėsi tik gyvų ir gyvų apoptotinių ląstelių skaičių suma. Jis nežymiai įtakojo apoptozę. Tai rodo, kad apoptozėje dalyvauja NQO1, tačiau ji nėra pagrindinis apoptozės veiksnys.

Auginant ląsteles be tiriamųjų junginių apoptotinių ląstelių buvo 1-2%.

Visi gauti rezultatai buvo įvertinti pagal apoptozės indeksą (2 lentelė) (palyginimui pateikti RH1, MeDZQ ir H₂O₂ apoptotiniai indeksai iš Nemeikaitė-Čėnienė et al., 2005).

2 lentelė. Apototinis indeksas (A/(A+N)100%) FLK ląstelėse, veikiant jas įvairių junginių koncentracijomis, sukeliančiomis ~50% ląstelių žūtį, ir jo moduliacija DPPD, desferioksiaminu, alopurinoliu ir dikumarolu. Kontroliniuose eksperimentuose (24 val ląstelių auginimas be junginių) apototinis indeksas buvo 2-3%. Priedas: A – apoptotinės ląstelės, N – neapoptotinės ląstelės.

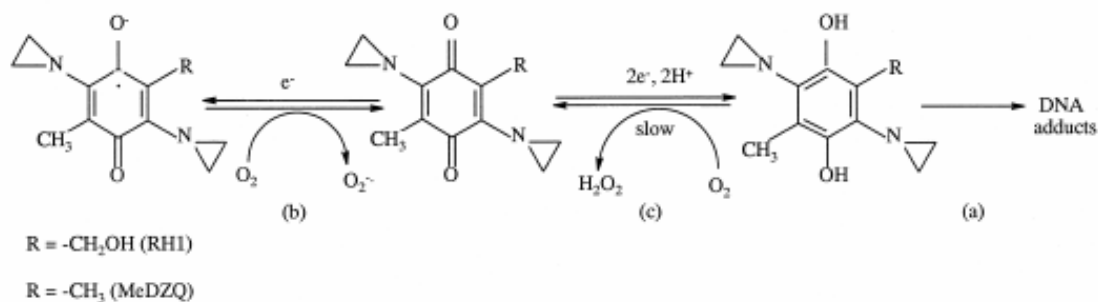
Nr.	Junginys	A/(A+N)100%				
		a) Be priedų	b) +2μM DPPD	c) +300 μM desferioksi-amino	d) + 100μM alopurinolio	e) +20 μM dikumarolo
1	RH1 (0,08 μM)	65,8±2,8	13,6±1,0	44,4±4,5	40,2±4,0	19,1±2,7
2	MeDZQ (0,4 μM)	50,9±1,0	11,5±3,5	13,2±0,6	37,5±2,0	22,4±4,7
3	Durochinonas (40 μM)	23,1±3,6	7,0±2,0	10,0±2,5	7,1±2,6	12,0±3,6
4	Daunorubicinas (2,0 μM)	33,6±3,1	15,6±0,1	23,5±2,4	16,5±0,8	27,8±1,2
5	H ₂ O ₂ (50 μM)	13,9±2,2	4,2±1,0	3,6±1,0	4,5±1,5	7,8±1,6

Apoptozės tyrimų duomenys (2 lentelė) rodo, kad esant junginių koncentracijoms, sukeliančioms 50% ląstelių žūtį, apoptotinių ląstelių kiekis gyvų ląstelių populiacijoje (apoptotinis indeksas) mažėja šia tvarka:

RH1~MeDZQ>daunorubicinas>durochinonas>H₂O₂.

Įvertinus apoptozės indeksą, aziridinilbenzochinonai yra efektyvesni apoptozę indukuojantys agentai nei vienas iš klasikinių priešnavikinių chinonų daunorubicinas. Galima teigti, kad FLK ląstelėse visi tirti junginiai sukelia tiek apoptozę, tiek nekrozę pagal „oksidacinio streso“ mechanizmą, nes DPPD ir desferioksiaminas mažina visų tirtų junginių apoptozės indukciją (apoptotinį indeksą) (2 lentelė). Chinonų atveju, paprasčiausias šio reiškinio mechanizmas būtų jų vienelektroninė redukcija (23 pav., kelias (b)).

Dikumarolas sumažino RH1 ir MeDZQ proapoptotinį poveikį, kuris yra stipresnis negu kitų junginių (2 lentelė), todėl galima manyti, kad RH1 ir MeDZQ proapoptotinis poveikis susietas ir su NQO1 katalizuojamu DNR alkiliniu susidariusiais aziridinilhidrochinonais (23 pav., kelias (a)). Tačiau netikėtai dikumarolas mažino ir durochinono proapoptotinį poveikį (2 lentelė). Taigi, negalima atmesti galimybės, kad apoptozę sukelia ir RH1, MeDZQ ir durochinono hidrochinonų, susidarančių NQO1 katalizuojamose reakcijose, autooksidacija (23 pav., kelias (c)). Antra vertus, dikumarolas apsaugo ir nuo H₂O₂ sukeltos apoptozės (2 lentelė). Tai rodo, kad dikumarolo antiapoptotinio poveikio negalima priskirti vien tik NQO1 katalizuojamos chinonų redukcijos inhibicijai. Įmanoma, kad dikumarolas inhibuoja ir c-Jun N-terminalinę kinazę, kuri yra svarbus H₂O₂ indukuotos apoptozės mediatorius (McGee et al., 2002; Pantano et al., 2003). Kadangi FLK ląstelės ekspresuoja navikinį supresorių p53, kuris yra svarbus oksidacinio streso indukuojamos apoptozės mediatorius (Dees et al., 1994), yra taip pat įmanoma, kad dikumarolas inhibuoja p53 stabilizuojančią sąveiką su NQO1 (Asher et al., 2004), o tuo pačiu ir p53 priklausomą apoptozę. Ksantinoksidazės (XOD) inhibitorius alopurinolis mažino visų tirtų chinonų apoptotinį indeksą. Tai leistų teigti, kad XOD katalizuojama chinonų redukcija yra atsakinga už chinonų sukeliama apoptozę. Tačiau alopurinolis mažino taip pat ir H₂O₂ apoptotinį indeksą iki 4,5±1,5 %. Tai leidžia manyti, kad alopurinolis ne vien inhibuoja XOD, bet turi ir kitokią, galbūt tiesioginį antioksidacinį poveikį.



23 pav. Aziridinilbenzochinonų RH1 ir MeDZQ bioredukcinė aktyvacija (Nemeikaitė-Čėnienė et al., 2005).

Išvados

1. Nustatyta, kad tirti chinonai yra toksiški FLK ląstelėms, tačiau jų citotoksiškumas nevienodas ir priklauso nuo chinonų struktūros: aziridinilbenzochinonai (RH1 ir MeDZQ) pasižymi didesniu citotoksiškumu, negu chinonai, neturintys aziridino grupių (daunorubicinas ir durochinonas).
2. Didėjant chinonų vienelektroninės redukcijos potencialui, didėja ir jų citotoksiškumas.
3. Aziridino grupes turinčių chinonų citotoksinį poveikį FLK ląstelėms lemia kombinuotas mechanizmas: oksidacinis stresas, DT-diaforazės ir ksantinoksidazės veikla.
4. Prie ekvitoksiškų (sukeliančių 50% ląstelių žūtį) junginių koncentracijų, apoptotinis indeksas mažėjo šia tvarka: RH1 ~ MeDZQ > daunorubicinas > durochinonas > H₂O₂. Taigi, aziridinilbenzochinonai RH1 ir MeDZQ yra žymiai efektyvesni apoptozę sukiantys agentai, negu klasikinis priešnavikinis agentas daunorubicinas.
5. Antioksidantai DPPD ir desferioksiaminas apsaugojo nuo apoptozės indukavimo su visais tirtais junginiais. Tai rodo, kad apoptozę žymia dalimi sukelia oksidacinis stresas. DT-diaforazės (NQO1) inhibitoriaus dikumarolo ir ksantinoksidazės inhibitoriaus alopurinolio apsauginio poveikio negalima vertinti vienareikšmiškai, nes jie apsaugo ir nuo H₂O₂ proapoptotinio poveikio, kuris nėra susietas su redukcine aktyvacija minėtais flavininiais fermentais.

Summary

Many of recently used chemotherapeutic agents have a quinoidal structure. It is supposed that the main mechanism of antitumour aziridinylyl substituted benzoquinones is their two-electron reduction to alkylating products.

However, other possible cytotoxicity mechanisms, e.g., oxidative stress, are studied insufficiently. The goal of our investigation was to analyse quinones influence to apoptosis in FLK (foetal lamb kidney fibroblasts) line, which posses increased prooxidant activities.

The results show that quinones, which have aziridinylyl substituents (RH1 and MeDZQ) are more cytotoxic than quinones without these substituents (daunorubicin and duroquinone). Cytotoxic effect of those quinones to cells is conditioned by combinative mechanism of oxidative stress, DT-diaforase and xantinoxidase action.

It is supposed that aziridinylyl substituted benzoquinones may be very perspective in antitumour treatment.

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei dr. A. Nemeikaitei-Čėnienei už konsultacijas, rūpestį ir vertingus patarimus ruošiant šį darbą. Taip pat dėkoju dr. J. Šarlauskui už medžiagas, kurios buvo naudojamos darbo eigoje.

Naudota literatūra

1. Altaner C., Rossler H., Burthardt H., Rosenthal S., Scholz D., Rosenthal H.A. Influence of different culture conditions on BLV expression in permanently infected FLK cell lines. *J. Biol.*, 1985, 31(4), 273-283.
2. Anusevičius Z., Šarlauskas J., Čėnas N. Two – electron reduction of quinones by rat liver NAD(P)H: quinone oxidoreductase: quantitative structure – activity relationships. *Arch Biochem Biophys*, Elsevier, 2002, 404(2), p. 254-262.
3. Asher G., Lotem J., Sachs L., Shaul Y. p53 – Dependent apoptosis and NAD(P)H: quinone oxidoreductase. *Methods Enzymol.*, 2004, 282B, p. 278-293.
4. Badwey J.A., Karnovsky M.L. Active oxygen species and the functions of the phagocytic leukocytes. *Ann. Rev. Biochem.*, 1980, 49, p. 695-726.
5. Baldev K.V. Mutagenic effects on some anticancer antibiotics. Springer Berlin, Heidelberg, 1979, 3(3), p. 143-160.
6. Bohninger M. Apoptosis and cell proliferation, 2nd edition, 1998
7. Boland M.P., Knox R.J., Roberts J.J. The differences in kinetics of rat and human DT-diaphorase result in a differential sensitivity of derived cell lines to CB 1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide). *Biochem. Pharmacol*, 1991, 41, p. 867-875.
8. Bolotina V.M. Nitric oxide directly activates calcium – dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 1994, 6474, p. 850-853.
9. Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G., Monks T.J. Role of quinones in toxicology, 2000, 13(3), p. 135-160.
10. Bredesen D.E. CD47 and dead signalling in the immune system. *Apoptosis*, 2000, 299, p. 299-306.
11. Buffinton G.D., Christen S., Peterhans E., Stocker R. Oxidative stress in lungs of mice with influenza A virus. *Free Rad. Res. Comm*, 1992, 16, p. 99-110.
12. Burdon L. Cell proliferation and oxidative stress: basis for anticancer drugs. *Proc. Royal Soc. Edinburgh*, 1992, 99B, p. 169-176.
13. Cavalieri E.L., Rogan E.G. Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, 1995, 25, p. 677-688.
14. Chen A.Y., Liu L.F. Mechanisms of resistance to topoisomerase inhibitors. *Cancer Treatment and Research*, 1994, 73, p. 263-281.
15. Chen S., Knox R., Wu K., Deng P., Zhou D., Bianchet M.A., Amzel L.M. Molecular basis of the catalytic differences among DT-diaphorase of human, rat, and mouse. *Am. Soc. Biochem. Molec. Biol.*, 1997, 272(3), p. 1437-1439.

16. Communal C., Singh K., Pimetel D.R., Colucci W.S. Norepinephrine stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of β -adrenergic pathway. *Circulation*, 1998, 98, p. 1329-1334.
17. Cotran R.S., Kumar V., Collins T. Cellular pathology, In: Cell injury and cell death. Robbins Pathologic basis of Disease. 6th ed. W.B. Saunders Company, 1999, p. 1-31.
18. Creek M.R., Mani C., Vogel J.S., Tuttle K.W. Tissue distribution and macromolecular binding of extremely low doses of [¹⁴C]-benzene in B₆C₃F₁ mice. *Carcinogenesis*, 1997, 18, p. 2421-2427.
19. Cui S.M., Isotropic – nematic interface of liquid – crystalline polymers. *Phys. Rev.*, 1995, 51, p. 4548-4557.
20. Dees C., Godfrey V.L., Foster J.S., Schulz R.D., Travis C.C. Stabilization of p53 gene product in two bovine leukaemia virus infected cell lines. *Cancer Lett.*, 1994, 86, p. 33-40.
21. Farber J.L. The mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.*, 1990, 62, p. 670-681.
22. Free Radical Brochure. Radox Laboratories Ltd., United Kingdom, 1997.
23. Fridovich T. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 1983, 23, p. 239-257.
24. Gavrieli I., Sherman I., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of heart nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, 119, p. 49501.
25. Giulivi C., Cadenas E. One- and two-electron reduction of 2-methyl-1,4-naphthoquinone bio-reducing alkylating agents: kinetic studies, free – radical production, thiol oxidation and DNA – strand – break formation. *Biochem. J.*, 1994, 301(1), p. 21-30.
26. Gotlieb R.A., Burleson K.O., Kloner R.A. et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 1994, 71, p. 219-225.
27. Gutierrez P.L., Mechanism(s) of bio-reductive activation. The example of dieziquone (AZQ). *Free Radic. Biol. Med.*, 1989, 64(4), p. 405-455.
28. Halliwell B., Murcia A., Chirico S. et al. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev.*, In: Food Science and Nutrition, 1995, 35, p. 7-20.
29. Hanks T.J., Hanzlik R.P., Cohen G.M., Ross D., Graham D.G. Contemporary issues in toxicology: quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992, 112, p. 2-16.

30. He H., Wang X., Gorospe H., Holbrook N.J., Trush M.A. Phorbol-ester – induced mononuclear cell differentiation is blocked by mitogen – activated Protein kinase (MEK) inhibitor PD98059. *Cell Growth Differ.*, 1999, 10, p. 307-315.
31. Hornsby P.J., Crivello J.F. The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 1: a background review. *Molec. Cell Endocrinol.*, 1983, 30, p. 1-20.
32. Huang H.C., Chang J.H., Tung S.F., Wu R.T., Foegh M.L., Chu S.H. Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator. *Eur. J. Pharmacol.*, 1992, 211, p. 259-264.
33. Hyslop P.A., Hinshaw D., Halsey W.J., et al. Mechanisms of oxidant mediated injury. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, p. 1665-1674.
34. Infante P.F., Rinsky R.A., Wagoner J.K. Leukaemia in benzene workers. *Lancet*, 1977, 2, p. 76-78.
35. Johnston R.B., Lehmyer J.E. Elaboration of toxic oxygen by-products by neutrophils in a model of immune complex disease. *J. Clin. Invest.*, 1976, 57, p. 836-841.
36. Kajstura J., Cigola E., Malathara A et al. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29, p. 859-870.
37. Kazakevičius R.V., Janulevičiūtė N.M., Ročka V.S. Oksidacinis stresas ir patologiniai procesai. *Laboratorinė medicina*, 2002, 1(13), p. 37-42.
38. Kerr F.F.R., Wullic A.H., Curric A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide – ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, 26, p. 239-257.
39. Koyama J., Morita I., Ogata M., Mukainaka T., Tokuda H., Nishino H. Inhibitory effects of anthraquinones and bianthraquinones on Epstein-Barr virus activation. *Cancer Lett.*, 2001, 170, p. 15-18.
40. Krammer P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 2000, 407(6805), p. 789-795.
41. Lander H.M., Majar D.P., Hempestead B.L., Mirza U.A., Chait B.T., Campbell S., Quilliam L.A. A molecular redox switch on p21(ras): structural basis for the nitric oxide – p21(ras) interaction. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, p. 4323-4326.
42. Laurindo F.R.M., da Luz P.L., Unit L. et al. Evidence for superoxide radical dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation*, 1991, 83, p. 1705-1712.

43. Li Y., Kuppasamy P., Zweier J.L., Trush M.A. Role of Cu/Zn-superoxide dismutase in xenobiotic activation, In: Chemical reactions involved in the Cu/Zn-superoxide dismutase – accelerated oxidation of the benzene metabolite 1,4-hydroquinone. *Mol. Pharmacol.*, 1996, 49, p. 401-411.
44. Li Y., Lafuente A., Trush M.A. Characterization of quinone reductase, glutathione and glutathione S-transferase in human myeloid cell lines: Induction by 1,2-dithiole-3-thione and effects on hydroquinone – induced cytotoxicity. *Life Sci.*, 1994, 54, p. 901-916.
45. Li Y., Trush M.A. Diphenyliodonium and NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 253, p. 295-299.
46. Liengswangwong V., Bonner J.A., Shaw E.G., Foote R.L., Frytak S., Eagan R.T., Jett J.R., Richardson R.L., Creagan E.T., Su J.Q. Limited – stage small – cell lung cancer: patterns of intrathoracic recurrence and the implications for thoracic radiotherapy. *JCO*, 1994, p. 496-502.
47. Long X., Boluyt M.O., De Lourdes Hipolito M et al. p53 and hypoxia induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 1997, 99, p. 3635-3643.
48. Lunec J., Winyard P. Reactive oxygen species: associated pathology. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and laboratory Medicine*. 1998, 10(2), p. 42-44.
49. Main M., Fratta D., Rainaldi G., Simi S., Miriani T., Benetti D., Gervasi P.G. Superoxide anion production and toxicity in V79 cells of six hydroxanthraquinones. *Anticancer Res.*, 1991, 11, p. 1071-1076.
50. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 1995, 146, p. 3-15.
51. Maly F.E. The B lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Rad. Res. Commun.*, 1990, 8, p. 143-148.
52. Manifait M., Bernard L., Theophanides T. Resonance and pre-resonance Raman spectra of the antitumour drugs andriamycin and daunomycin. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005, 11(2), p. 68-74.
53. McCance K.L. Altered cellular and tissue biology. *Pathophysiology. The biologic basis of disease in adults and children*. 3rd ed. Mosby, 1998, p. 44-81.
54. McGee M.M., Campiani G., Ramunno A., Naci V., Lawler M., Williams D.C. Activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signalling pathway is essential

- during PBOX-6 – induced apoptosis in chronic nielogenous leukaemia. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, p. 18383-18389.
55. Mehta J.L., Yang B.C., Nicols W.W. Free radicals, antioxidants and coronary disease. *J. Myocard. Isch.*, 1993, 5, p. 1-8.
 56. Meier B., Coss A.R., Hancock J.T., Kaup F.J., Jones O.T.G. Identification of a superoxide – generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem. J.*, 1991, 275, p. 241-245.
 57. Meier B., Radeke H., Selle S. et al. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to treatment with synovial fluid from patients suffering from arthritis. *Free Rad. Res. Commun.*, 1990, 8, p. 149-155.
 58. Merza M., Sandquist B., Sober J., Morein B. Immunoaffinity purification of two major proteins of BLV (gp51 and gp24) and their use for discrimination between vaccinated and infected animals. *J. Virol. Methods*, 1991, 33(3), 345-353.
 59. Messam C.A., Pittman R.N. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 1998, 238, p. 389-398.
 60. Moncada S., Higgs E.A. Nitric oxide in cardiovascular function and disease. *Atherosclerosis XII*. ed. Stemme S., Olsson A.G. Amsterdam, London, New York, Oxford, Paris, Shannon, Tokyo. Elsevier, 2000, p. 81-89.
 61. Monks T.J., Lau S.S. Biological reactivity of polyphenolic glutathione conjugates. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, 10, p. 1296-1313.
 62. Moore H.W., Czerniak R., Hamdan A. Natural quinones as quinonmethide precursors – ideas in rational drug design. *Drugs. Exp. Clin. Res.*, 1988, 12(6-7), p. 475.
 63. Morgan J.L., Siegel D., Ross D. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96, p. 8150-8155.
 64. Müller S.O., Eckert I., Lutz W.K., Stopper H. Genotoxicity of the laxative drug components amodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: topoisomerase II mediated?. *Mutat. Res.*, 1996, 371, p. 165-173.
 65. Nemeikaitė – Čėsniėnė A., Šarlauskas J., Anusevičius Ž., Nivinskas H., Čėnas N. Cytotoxicity of RH1 and related aziridinylbenzoquinones: involvement of activation by NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*, Elsevier, 2003, 416, p. 110-118.

66. Nemeikaitė-Čėnienė A., Dringelienė A., Šarlauskas J., Čėnas N. Role of NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) in apoptosis induction by aziridinybenzoquinones RH1 and MeDZQ. *Acta Biochemica Polonica*, 2005, 52(4), p. 937-941.
67. Onuma M., Matsumoto K., Moriguchi R., Fujimoto Y., Miyake Y., Mikami T. Transformed phenotypes in long – term cultures persistently infected with bovine leukaemia virus. *Comf. Comp. Med.*, 1981, 45(2), 154-158.
68. Pantano C., Shrivastava P., McElhinney B., Janssen-Heininger Y. Hydrogen peroxide signalling through tumour necrosis factor receptor 1 leads to selective activation of c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, p. 44091-44096.
69. Penning T.M., Burczynski M.E., Hung C.F., McCoull K.D., Palackal N.T., Tsuruda L.S. Dihydrodiol dehydrogenase and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: Generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem. Res. Toxicol.*, 1999, 12, p. 1-18.
70. Penning T.M., Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chem. Biol. Interact.*, 1993, 89, p. 1-34.
71. Penning T.M., Ohnishi S.T., Ohnishi T., Harvey R.G. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.*, 1996, 9, p. 84-92.
72. Pflugfelder M.T., Liu L.F., Liu A.A., Tewey K.M., Whang-Peng J., Knusten T., Huebner K., Croce C.M., Wang J.C. Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome 17q 21-22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, p. 7177-7181.
73. Remacle J., Lambert D., Raes M., Pigeolet E., Michiels C., Toussaint O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. *Biochem. J.*, 1992, 286, p. 41-46.
74. Rhamipour S., Ben-Aroya N., Fridkin M., Koch Y. Design, synthesis and evaluation of a long – acting, potent analogue of gonadotropin – releasing hormone. *J. Med. Chem.*, 2001, 44(22), p. 3645-3652.
75. Riley R.J., Workman P. DT-diaphorase and cancer chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.*, 1992, 43, p. 1657-1669.
76. Ross D., Siegel D., Schattenberg D.G., Sun X.M., Moran J.L. Cell – specific activation and detoxification of benzene metabolites in mouse and human bone marrow: identification of target cells and a potential role for modulation of apoptosis in benzene toxicity. *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104(6), p. 1177-1182.

77. Rothman N., Smith M.T., Hayes R.B., Traver R.D., Hoener B., Camplemen S., Li G.L., Dosemeci M., Linet M., Zhang L., Xi L., Wacholder S., Lu W., Meyer K.B., Titenko – Holland N., Stewart J.T., Yin S., Ross D. Benzene poisoning, a risk factor for haematological malignancy, is associated with the NQO1 609 C→T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxanone. *Cancer Res.*, 1997, 57, p. 2839-2842.
78. Schörkhuber M., Richter M., Dutter A., Sontag G., Marisan B. Effect of anthraquinone – laxatives on the proliferation and urokinase secretion of normal, premalignant and malignant colonic epithelial cells. *Eur. J. Cancer*, 1998, 34, p. 1091-1098.
79. Seaton M.J., Schlosser P.M., Bond J.A., Medinsky M.A. Benzene metabolism by human liver microsomes in relation to cytochrome P450 2E1 activity. *Carcinogenesis*, 1994, 15, p. 1799-1806.
80. Slaga T.J., Bracken W.M., Viaje A., Levin W., Yagi H., Jerina D.M., Conney A.H. Comparison of the tumour – initiating activities of benzo[α]pyrene arene oxides and diolepoxides. *Cancer Res.*, 1977, 37, p. 4130-4133.
81. Smith M.T. Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer. *Prpc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96, p. 7624-7626.
82. Smithgall T.E., Harvey R.G., Penning T.M. Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalysed by dihydrodiol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, p. 1814-1820.
83. Snyder R., Hedli C.C. An overview of benzene metabolism. *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104(6), p. 1165-1171.
84. Sundersan M., Yu Z.X., Ferrans V.J., Irani K., Finkel T. Requirements for generation of H₂O₂ for platelet – derived growth factor signal transduction. *Science*, 1995, 270, p. 296-299.
85. Thompson D.W. *On growth and form*. Dover, New York, 1992.
86. Trush M.A., Twerdok L.E., Remblish S.J., Zhu H., Li Y. Analysis of target cell susceptibility as a basis for the development of a chemoprotective strategy against benzene – induced hematotoxicities. *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104(6), p. 1227-1234.
87. Twerdok L.E., Rembish S.J., Trush M.A. Introduction to quinone reductase and glutathione in bone marrow stromal cells by 1,2-dithiole-3-thione: effect on hydroquinone – induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992, 112, p. 273-281.

88. William A.D. The design of drugs that target tumour hypoxia. *Australian Journal of Chemistry*, 2004, 57(9), p. 821-828.
89. Zechiedrich E.L., Osheroff N. Eucaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J.*, 1990, 9(13), p. 4555-4562.