

**VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA**

MAGISTRO DARBAS

FLAVONOIDŲ POVEIKIS HEP 22A LINIJOS LĄSTELĖMS

Magistrantė ALINA STRAŽNICKIENĖ

(parašas)

Darbo vadovai: dr. A. Nemeikaitė – Čėnienė

(parašas)

dr. A. Dringelienė

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir

Laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab. dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Vilnius – 2006

Turinys

TEKSTE VARTOJAMI LIETUVIŠKI IR TARPTAUTINIAI SUTRUMPINIMAI.....	4
1. ĮVADAS	6
1. Darbo tikslas ir uždaviniai	7
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1. Laisvųjų radikalų dalyvavimas kancerogenezeje	7
2.1.1. Laisvieji radikalai ir fiziologiniai procesai	8
2.1.2. Aktyviosios deguonies formos.....	9
2.1.3. Žeidžiantis laisvųjų radikalų poveikis	9
2. Antioksidantinės sistemos	10
2.2.1. Flavonoidai	15
2.2.1.1. Flavonoidų savybės.....	16
2.2.1.2. Vitamino C (askorbo rūgšties) ir flavonoidų sąveika	17
2.2.1.3. Kvercetino biologinis aktyvumas	17
2.2.2. Flavonoidų citotoksiškumas	19
3. Apoptozė.....	20
2.3.1. Apoptozės fiziologinės funkcijos.....	20
2.3.2. Baltymai, reguliuojantys apoptozės eigą	21
2.3.3. Pagrindiniai apoptozės mechanizmai.....	23
2.3.4. Apoptozinių ląstelių šalinimas iš organizmo	25
2.3.5. Apoptozės sutrikimų lemiamos ligos.....	24
2.3.6. Apoptozės nustatymas	24
3. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	25
1. Tyrimo medžiaga	25
2. Tyrimo metodai.....	25
3.2.1. Ląstelių kultivavimas ir proliferacijos tyrimas	26
3.2.2. Ląstelių gyvybingumo ir citotoksiškumo tyrimas	27
3.2.3. Apoptozės tyrimas fluorescencinės mikroskopijos principu	27
3.2.4. Statistinis duomenų įvertinimas.....	30
4. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
1. Hep 22a ląstelių linijos morfologija.....	30
2. Hep 22a ląstelių linijos augimo dinamika.....	34
3. Kvercetino, miricetino ir morino citotoksiškumas Hep 22a ląstelių linijai ..36	
4. Apoptozės indukcijos tyrimas flavonoidų poveikyje.....	39

5. APIBENDRINIMAS	43
6. IŠVADOS	44
7. ABSTRACT.....	45
8. LITERATŪROS SARAŠAS	47

TEKSTE VARTOJAMI LIETUVIŠKI IR TARPTAUTINIAI SUTRUMPINIMAI

$^1\text{O}_2$	singletinis deguonis
AIF	apoptozę aktyvinantis veiksnys (apoptosis-inducing factor)
AO	akridino oranžas
Apaf-1	proapoptozinis baltymas, apoptozės proteazės aktyvinantis veiksnys
ATP	adenozintrifosfatas
Bcl-2	antiapoptozinis baltymas
Bid	proapoptozinis baltymas tarpininkas
cL₅₀	koncentracija, sukianti 50 % ląstelių žūtį
COMT	o-metilkatecholamintransferazės
DMEM	terpė ląstelių auginimui (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	dimetilsulfoksidas
DNR	dezoksiribonukleino rūgštis
DPPD	N,N' – difenil-p-fenilendiaminas
EB	etidžio bromidas
FLK	avies embriono inkstų fibroblastinių ląstelių linija (fetal lamb kidney fibroblast)
GR	gliutationo reduktazė (glutathione reductase)
GSH	redukuotas gliutatonas (glutathione)
GSHPX	gliutationo peroksidazė (glutathione peroxidase)
GSSG	oksiduotasis gliutatonas
H₂O₂	vandenilio peroksidas
HCIO	hipochlorito rūgštis
Hep 22a	pelių hepatomos ląstelių linija (Mouse Hepatoma, 22-asis navikas, A-subkultūra)
HL-60	žmogaus promielocitinės leukemijos ląstelių linija (human promyelocytic leukemia cells)
HNO₂	nitrito rūgštis
HO₂•	hidroperoksilo radikalas
IAP	apoptozę slopinantys baltymai (inhibitors of apoptosis proteins)
ISEL	reakcija apoptozei nustatyti (In situ end labeling)
NADH	redukuotas nikotinamidadenindinukleotidas
NADPH	redukuotas nikotinamidadenindinukleotido fosfatas
NO⁻	nitroksilo anijonas

NO⁺	nitrozilo katijonas
NO•	azoto monoksidas
NO₂•	azoto dioksidas
NQO1	NADPH: chinonreduktazė
O₂⁻•	superoksido radikalas
O₃	ozonas
OH•	hidroksilo radikalas
ONOO⁻	peroksinitritas
ONOOH	peroksinitrito rūgštis
p53	53 kDa baltymas, transkripcijos veiksnys
PBS	fosfatinis buferinis tirpalas (phosphate buffered saline)
RO•	alkoksilo radikalas
RO₂•	peroksilo radikalas
ROONO	alkilperoksonitritas
SH	citozolio baltymų seka
Smac	proapoptozinis mitochondrijų baltymas
SOD	superoksido dismutazė (superoxide dismutase)
TGF	transformuojančiojo augimo veiksnys (tumour growth factor)
TNF	navikų nekrozės veiksnys (tumour necrosis factor)
TUNEL	reakcija apoptozei nustatyti (TdT mediated dUTP- biotin nick end labeling)

1. ĮVADAS

Pastaraisiais metais navikinių susirgimų tyrimų kryptys dažniausiai įvertina įvairių veiksnių poveikį patogeniniam procesui. Būtina prisiminti autorius [17,18], jau seniai skelbusius, kad laisvieji radikalai vaidina svarbų vaidmenį piktybinėje ląstelių transformacijoje. Tuo metu didesnis tyrinėtojų dėmesys buvo skiriamas išoriniams poveikiams, sukeliantiems kancerogenezei. Tačiau pastarąjį dešimtmetį daugiausiai tyrinėjamas laisvųjų radikalų genotoksinis ar epigenetinis poveikis, sukeliantis ląstelės transformaciją ir antioksidacinės sistemos gebėjimą šiuos procesus koreguoti.

Duomenų apie laisvųjų radikalų ir antioksidantų sukeltus procesus ir jų sąsają su piktybiniais navikais yra labai daug, bet jie neretai prieštaringi.

Flavonoidai – tai augalinės kilmės junginiai, kurie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Mūsų darbo tikslas buvo ištirti flavonoidinių ir kitų polifenolinių antioksidantų citotoksiškumo aspektą – galimą jų prooksidantinio tipo citotoksiškumą, nes didelės flavonoidų koncentracijos yra citotoksiškos, o citotoksiškumo mechanizmai, nors ir labai plačiai tyrinėjami visame pasaulyje, lieka neaiškūs.

Kad antioksidantų panaudojimas būtų veiksmingesnis, būtina geriau suprasti jų veikimo mechanizmus, o įvertinus antioksidacinės sistemos veiklos mechanizmus, galima bus rasti būdų juos koreguoti palankia organizmui linkme vykdant piktybinių navikų profilaktiką ir gydant susirgusiuosius vėžiu.

Kompleksiniame navikinių procesų sukeltų patologijų tyrime nemažą reikšmę turi ląstelių modelinių sistemų panaudojimas *in vitro*. Yra keli esminiai požymiai leidžiantys priskirti hepatomos 22a (Hep 22a) linijos ląsteles piktybinėms ląstelėms. Visų pirma, tai suaktyvėjusi proliferacija arba beribis dauginimasis; antra – tai ląstelių migracija ir trečia - suaktyvėję ląstelės prooksidaciniai procesai. Šiuo metu nustatyta, kad aktyviosios deguonies formos ne tik dalyvauja organizmo imuniniame atsake bei fagocitozėje, bet ir veikia ląstelės proliferacijos intensyvumą, o piktybinės ląstelės pasižymi pagreitetąsia proliferacija. Be to, daugelio priešvėžinių preparatų biologinis aktyvumas yra iš dalies susijęs su jų generuojamų laisvųjų radikalų citotoksinio poveikiu. Todėl hepatomos ląstelių kultūra, kaip modelinė sistema, yra tinkamas objektas ir šiems tikslams.

Apoptozė arba programuota ląstelių mirtis yra fiziologinis genetiškai reguliuojamas ląstelių pašalinimo procesas, reikalingas audinių homeostazei palaikyti. Sumažėjus ląstelių apoptozei atsiranda autoimuninių ligų, navikų, o apoptozei didėjant, pradeda ryškėti neurodegeneracinės, širdies, kraujagyslių sistemos ir kitos ligos. Apoptozės proceso valdymas

(jos slopinimas normaliuose audiniuose ir skatinimas vėžio pažeistuose) leistų efektyviai pagerinti priešvėžinį gydymą.

Navikų ir apoptozės problema ypač aktuali, kadangi agentai, indukuojantys apoptozę navikinėse ląstelėse arba navikinio proceso produktai blokuojantys apoptozės supresiją, gali padėti atskleisti apoptotinių procesų mechanizmus bei būti pritaikyti navikų gydymui.

1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas - ištirti flavonoidų poveikį Hep 22a linijos ląstelėms.

Uždaviniai:

1. Nustatyti flavonoidų kvercetino, morino ir miricetino citotoksinį poveikį Hep 22a linijos ląstelėms.
2. Nustatyti apsauginį antioksidanto DPPD, desferoksamino ir katalazės poveikį Hep 22a linijos ląstelėms.
3. Nustatyti flavonoidus metabolizuojančių fermentų inhibitorių dikumarolo, α -naftoflavono, izoniazido, bei 3,5-dinitropirokatechino poveikį Hep 22a linijos ląstelėms.
4. Įvertinti flavonoidų įtaką ląstelių apoptozei.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Laisvųjų radikalų dalyvavimas kancerogenezėje

Per pastaruosius 20 metų kancerogenezės tyrimai labai pažengė į priekį. Kancerogenezė – daugiapakopis procesas, kuris skirstomas į inicijacijos ir promocijos stadijas. Kiekviena iš tų stadijų yra sąlygota ir genetinių ir epigenetinių pokyčių, kuriuos sukelia egzogeniniai - cheminiai (pvz. cheminiai kancerogenai), fiziniai (pvz. jonizuojančioji spinduliuotė), biologiniai (pvz. virusai) – bei endogeniniai (pvz. laisvieji radikalai) veiksniai. Šie veiksniai gali pažeisti DNR, modifikuoti genų raišką, sukelti genomo nestabilumą ir sutrukdyti normalių ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją [57], bei susilpninti antioksidacinės sistemos pajėgumą [9].

Hipotezė, kad laisvieji radikalai vaidina svarbų vaidmenį kancerogenezėje, atsirado XX amžiaus viduryje. Šiai hipotezei susiformuoti įtakos turėjo *in vitro* atliktų tyrimų rezultatai, kurie liudijo apie DNR pažeidimų galimybes, apie baltymų funkcines ir struktūrines modifikacijas. Daugelio autorių darbai aiškiai parodė sąsają tarp laisvųjų radikalų ir DNR pažeidimų [42]. Nustatyta, kad daug DNR pažeidimų atsiranda aktyviosioms deguonies formoms

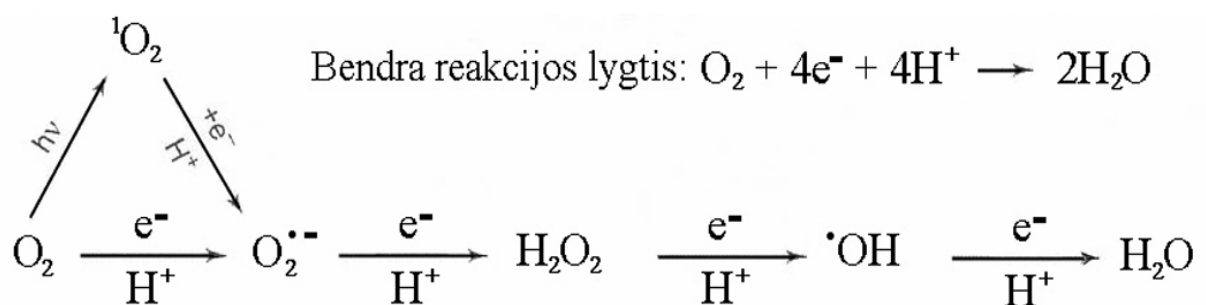
atakuojant DNR bazines [67]. Paaiškėjo, kad laisvieji radikalai, priklausomai nuo jų koncentracijos, atakuojamų ląstelių tipo, genetinio fono bei aplinkos, kurioje jie veikia savo taikinius, gali ir slopinti, ir stimuliuoti kancerogenezę. Ląstelinio streso atsakas pasireiškia ne tik DNR pažeidimais, bet ir DNR ištaisymu, priešingai, nepakankamas DNR ištaisymas sukelia prokancerogeninį atsaką [42].

2.1.1. Laisvieji radikalai ir fiziologiniai procesai

Laisvuojų radikalų vadinama bet kuri atomų ar molekulių rūšis, kurios valentiniame sluoksnyje yra vienas ar daugiau nesuporuotų elektronų. Tokiems dariniams būdingas ypatingai didelis cheminis aktyvumas. Jie labai nestabilūs, nes linkę prisijungti arba atiduoti elektronus, įgaudami stabilesnę būseną, kurioje elektronai suporuoti [66].

Laisvieji radikalai organizme susidaro ir dalyvauja daugelyje fiziologinių procesų, kurių svarbiausi šie:

1. **Redukcijos – oksidacijos reakcijos.** Normalaus metabolizmo metu mitochondrijose vykstančios redukcijos – oksidacijos reakcijos. Pavyzdžiui, ląstelei normaliai kvėpuojant, molekulinis deguonis laipsniškai redukuojamas prisijungiant keturiems elektronams ir susidaro vanduo. Šio proceso metu susidaro ir nedidelis kiekis laisvųjų deguonies radikalų – superoksido anijono, vandenilio peroksido bei hidroksilo radikalų (1 pav.) [32].



1 pav. Deguonies aktyvinimas ir redukuotos formos [58]

2. **Fagocitozė.** Fagocitozės metu neutrofiluose, vykstant „kvėpavimo sproгимui“, susidaro superoksido anijonas, vandenilio peroksidas, makrofaguose – azoto monooksidas, kurie mikrobus veikia baktericidiškai. Nustatyta, jog užląstelinį superoksida, be fagocitų, sintetina ir limfocitai [40], fibroblastai [46], bei endotelio ląstelės [35].
3. **Arachidono rūgšties metabolizmas,** vykstant prostoglandinų sintezei, veikiant fermentui peroksidazei [21].

4. **Biologiškai aktyvių medžiagų irimas** autooksidacijos būdu [32].
5. Laisvieji radikalai susidaro veikiant įvairiems fermentams (oksidazėms, oksigenazėms), svarbiems steroidinių hormonų sintezei, aminorūgščių katabolizmui [32].
6. Laisvieji radikalai dalyvauja sintetinant tiroidinius hormonus. Vandenilio peroksidas, veikiamas fermento peroksidazės, įtraukiamas į skydliaukės hormonų sintezę [16].

2.1.2. Aktyviosios deguonies formos

Tarp junginių, dalyvaujančių kancerogenezeje, ypač svarbios aktyviosios deguonies formos.

Terminas aktyviosios deguonies formos yra vartojamas apibūdinti ne tik deguonies radikalus – **superoksido ($O_2^{\bullet-}$)**, **hidroksilo (HO^{\bullet})**, **peroksilo (RO_2^{\bullet})**, **alkoksilo (RO^{\bullet})**, **hidroperoksilo (HO_2^{\bullet})**, bet ir neradikalinius deguonies darinius – **vandenilio peroksidą (H_2O_2)**, **singuletinį deguonį (1O_2)**, **ozoną (O_3)**, **hipochlorito rūgštį ($HClO$)**. Šiuo metu pradamas plačiai vartoti terminas aktyviosios azoto formos, kuriuo apibūdinami ne tik azoto radikalai – **azoto oksidas (NO^{\bullet})**, **azoto dioksidas (NO_2^{\bullet})**, bet ir neradikaliniai azoto junginiai – **nitrito rūgštis (HNO_2)**, **nitrozilo katijonas (NO^+)**, **nitroksilo anijonas (NO^-)**, **peroksinitritas ($ONOO^-$)**, **peroksinitrito rūgštis ($ONOOH$)**, **alkilperoksonitritai ($ROONO$)** [5].

2.1.3. Žeidžiantis laisvųjų radikalų poveikis

Žmogaus organizme nuolat susidaro nedidelis kiekis laisvųjų radikalų. Tuo tarpu veikiant įvairiems egzogeniniams (jonizuojančiai radiacijai, cheminėms medžiagoms, stresams) ir endogeniniams (įvairiems patologiniams procesams – uždegimui, navikiniam procesui, hipoksijai, aterosklerozei, senėjimui) veiksniams ir sutrikus pusiausvyrai tarp laisvųjų radikalų formavimosi ir antioksidacinės sistemos gebėjimo neutralizuoti tuos radikalus, organizmas patiria oksidacinį stresą ir laisvieji radikalai veikia organizmo ląsteles patogeniškai [32].

1. Laisvieji radikalai sukelia ląstelių membranų peroksidinę lipidų oksidaciją.

Laisvieji radikalai labiausiai pažeidžia polinesočiųjų riebalų rūgščių dvigubas jungtis, susidaro lipidų peroksidai, kurie patys yra reaktyvūs, ir tuomet prasideda grandininė laisvųjų radikalų susidarymo reakcija. Gausus laisvųjų radikalų kiekis išsekina antioksidacinius mechanizmus ir žeidžia ląstelių organelų ir citoplazmos membranas, trikdo ląstelių funkcijas. Dėl šių procesų ląstelių membranose atsiranda įvairių pokyčių. Kinta membranų lipidų fizinės

– cheminės savybės – jose mažėja fosfolipidų, riebalų rūgščių, kaupiantis lipidų peroksidams susidaro membranų struktūriniai defektai, vadinamieji klasteriai, susiformuoja transmembraniniai pralaidumo kanalai, pro kuriuos eina nekontroliuojamas katijonų ir kitų molekulių srautas į ląstelę ir iš jos. Ląstelėje kaupiasi natrij, kalcis, vanduo, ji brinksta, mitochondrijose sutrinka energijos gamyba, ląstelė gali žūti. Peroksidinės lipidų oksidacijos galutinė medžiaga ląstelėje yra 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 [41].

U. N. Dasas, tyrinėdamas laisvųjų radikalų reakcijų intensyvumą sveikose ir navikinėse ląstelėse, pastebėjo, kad, inkubuojant ląsteles su polinesočiosiomis rūgštimis, navikinėse ląstelėse, palyginti su normaliomis, formuojasi santykinai daugiau laisvųjų radikalų bei lipidų peroksidacijos produktų [14].

Dar 1966 metais nustatyta [63], kad polinesočiosios riebalų rūgštys turi citotoksinį poveikį navikinėms ląstelėms. Tęsiant šiuos tyrimus konstatuota, kad laisvieji radikalai ir lipidų peroksidacijos produktai yra polinesočiąjų riebalų rūgščių citotoksinio efekto mediatoriai, o endogeniniai antioksidantai (vitaminai A, E ir kt.) gali slopinti minėtų rūgščių citotoksinį aktyvumą [14].

2. Laisvieji radikalai sukelia ląstelės baltymų oksidacinius pokyčius.

Laisvieji radikalai lemia aminorūgščių šoninių grandinių oksidaciją ir baltymų fragmentaciją, dėl to suyra svarbūs ląstelės fermentai.

3. Laisvieji radikalai sukelia DNR pažeidimus.

Laisvieji radikalai reaguoja su branduolio ir mitochondrijų DNR timinu ir sukelia jos vijos įtrūkius [53]. Dėl laisvųjų radikalų poveikio žinduolių chromatine susidaro kovalentinis ryšys tarp timino ir tirozino. Tokie DNR pokyčiai atsiranda ląstelėms senstant bei vykstant jų piktybinei transformacijai [52].

Laisvieji radikalai yra svarbūs ne tik onkologinių, bet ir širdies ir kraujagyslių [35], plaučių ligų [31], diabeto [62] ir kitų ligų patogenezėje.

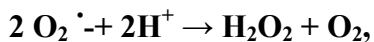
2.2. Antioksidacinės sistemos

Evoliucijos metu gyvos ląstelės įgavo gebėjimą apsisaugoti nuo laisvųjų radikalų pažeidimo. Medžiagos, mažinančios biologinių molekulių oksidacinį pažeidimą, vadinamos antioksidantai, o medžiagos sukeliančios oksidacinius pažeidimus – prooksidantai. Vieni antioksidantai trukdo laisviesiems radikalams formotis, kiti blokuoja tolesnes laisvųjų

radikalų reakcijas. Antioksidacinė apsauga yra trijų rūšių – 1) fermentai; 2) mažos molekulinės masės gaudyklės; 3) pereinamųjų metalų jonus jungiantys baltymai [52, 7].

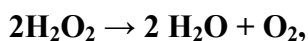
I. Fermentai, saugantys ląstelę nuo išaugusios laisvųjų radikalų koncentracijos:

1. Superoksido dismutazės (SOD). Pagreitina superoksido dismutaciją:



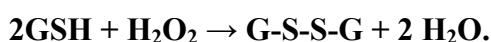
Žmogaus ląstelėse SOD yra mitochondrijose ir citozolyje. Mitochondrijų SOD aktyviame centre yra mangano, ji vadinama mangano superoksido dismutaze. Citozolio SOD aktyviame centre yra vario ir cinko. Ji vadinama vario, cinko-SOD (dimeras). Bakterijose yra geležies- SOD ir mangano-SOD (abi dimerai). Žinoma ir tarpląstelinė SOD forma. Augalų chloroplastuose yra geležies-SOD ir vario, cinko -SOD. SOD formos atskiriamos pagal jautrumą inhibitoriams [51].

2. Katalazės, esančios peroksisomose, skaido vandenilio peroksida:



Šių fermentų aktyviame centre yra heminė geležis. Katalazės labai efektyvūs katalizatoriai. Tai labai paplitę ir gausūs fermentai, jų biologinis vaidmuo - sunaudoti įvairių peroksisominių oksidazių katalizuojamose reakcijose susidarantį vandenilio peroksida, kad jis negalėtų pereiti į citoplazmą [51].

3. Glutationo peroksidazė (GSHPX) yra svarbiausias vandenilio peroksida šalinantis fermentas žmogaus ir kitų žinduolių ląstelėse. GSHPX yra žmogaus fermentas, kurio veikimui būtinas selenas. Žinomos net kelios seleno glutationo peroksidazės formos. GPX-1 ir GPX-2 yra citozolyje, GPX-3- kraujo plazmoje. Šios formos svarbios neutralizuojant laisvuosius radikalus, ypač metabolizuojant fosfolipidinius hidroperoksidus [2]. GSHPX katalizuoja reakciją:



GSHPX veikimą papildo kitas fermentas – glutationo reduktazė. Tai yra flavofermentas (jo molekulėje yra FAD), regeneruojantis glutationą (L-γ-glutamil-L-cisteinil-gliciną, GSH) iš jo oksiduotos formos G-S-S-G, panaudodamas reduktoriumi NADPH [7]:



Kepenų ląstelės citoplazmoje GSH koncentracija siekia 8 mM. Audinio GSH/GSSG santykis atspindi antioksidantų/prooksidantų pusiausvyrą ląstelėse. Suprantama, šiai pusiausvyrai svarbus ir NADPH/NADP⁺ santykis. GSH kiekis ląstelėse labai jautrus mitybos ir aplinkos veiksniams.

Katalazė, veikdama kartu su glutationo peroksidaze, užtikrina, kad citoplazmoje stacionari H₂O₂ koncentracija liktų 10⁻⁹ - 10⁻⁷ M ribose (superoksido koncentracija ląstelėje 10⁻¹¹ M). Šių fermentų aerobinėse ląstelėse yra daug, jų koncentracija viršija jų substratų

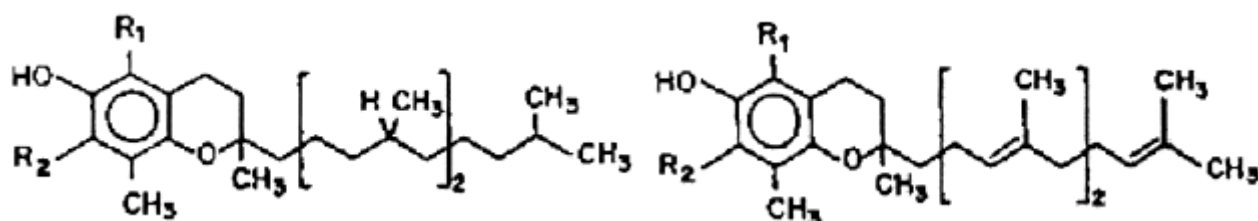
koncentraciją 3-6 eilėmis, todėl jos veikia kaip efektyvios radikalų gaudyklės. Katalazė ypač efektyvi, kai peroksisomų viduje susidaro aukštos H₂O₂ koncentracijos. GSHPX sunaikina organinius hidroperoksidus, metabolizuoja H₂O₂ citozolyje ir mitochondrijose. Katalazė ir GSHPX gaudo H₂O₂ skirtinguose ląstelės erdvės skyriuose. Visų antioksidantinių fermentų aktyvumui būtini metalai - Cu, Zn, Fe, Se, Mn, kurie įeina į aktyvaus centro struktūrą. Dieta, kurioje trūksta šių metalų, sukelia oksidacinius sutrikimus. Pavyzdžiui, Naujosios Zelandijos dirvoje yra mažai seleno. Tuo paaiškinami gyventojų populiacijos GSHPX aktyvumo sutrikimai, lengvai pašalinami dieta su seleno ir kitų metalų jonų priedais [7].

II. Mažos molekulinės masės laisvųjų radikalų gaudyklės.

Tai dažniausiai yra fenoliniai junginiai. Laisvųjų radikalų gaudyklės skirstomos į tirpias lipiduose ir tirpias vandenyje.

➤ Tirpios lipiduose (lipofilinės) laisvųjų radikalų gaudyklės:

Tokoferoliai (vitaminas E ir jo dariniai) yra labai svarbios membraninės laisvųjų radikalų gaudyklės, kurios neutralizuoja ¹O₂ ir peroksido radikalus, susidarancius skylant organiniams peroksidams. Vitaminas E efektyviai sustabdo grandines lipidų peroksidacijos reakcijas. Padidinus vitamino E kiekį dietoje, pašalinami Se trūkumo simptomai. Tokoferolius sudaro dvi junginių grupės (2 pav.): keturi tokoferoliai ir keturi tokotrienoliai [12].



2 pav. Tokoferoliams (a) būdinga fitilo šoninė grandinė, o tokotrienoliams (b) – geraldgeranilo [58]

Aromatiniam žiedui tokoferolių molekulėse būdingos polinės savybės, jis išsidėsto membranos išorėje, o izopreninės grandinės – membranos vidinėje dalyje, tarp riebiųjų rūgščių acilgrandinių. Pagrindinė tokoferolių funkcija yra apsaugoti nesočiųjų riebiųjų rūgščių grandines nuo peroksidacijos. Apsauginių reakcijų metu oksiduotą tokoferolį redukuoja (atstato) askorbo rūgštis, o askorbo rūgštį – GSH. Efektyviausias iš visų tokoferolių yra α-tokoferolis, o kitos formos yra jo biosintezės tarpininkai. Be to, α-tokoferolis stabilizuoja membranas, veikdamas lipidų išsidėstymą jose, ir suriša laisvas riebiąsias rūgštis. Tačiau sintetinis vitaminas E blogai įsisavinamas (tik 5 proc).

Svarbūs membraniniai antioksidantai *in vivo* yra **karotenoidai** – pvz., β-karotinas (vitamino A darinys). Augaluose jie veikia ne tik kaip papildomi fotosintezės pigmentai, bet ir

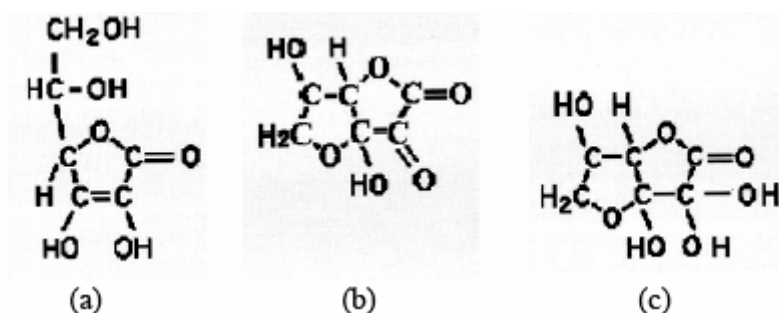
kaip laisvųjų radikalų gaudyklės. Nustatyta, kad jie papildo tokoferolių poveikį peroksidikalų gaudyme (dalyvauja lipidų peroksidacijos terminavime). Tačiau jų reciklinimo (atstatymo) mechanizmas nežinomas [6].

Ubichinonas - kofermentas Q.

Kofermento Q randama visose ląstelėse bei jų membranose. Šis kofermentas yra pagrindinis elektronų „nešiklis“ ir svarbus mitochondrijų vidinės membranos antioksidantas. Kita vertus, kofermentas Q veikia kaip prooksidantas dalyvaudamas formuojantis superoksido anijonui [64].

➤ **Tirpios vandenyje laisvųjų radikalų gaudyklės:**

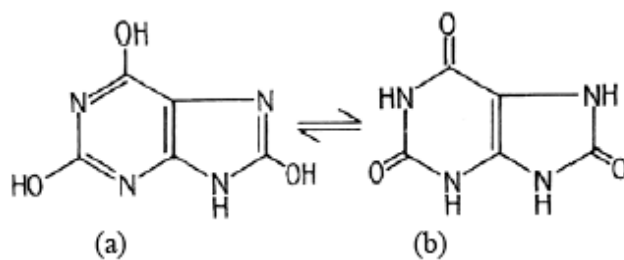
L-Askorbo rūgštis (vitaminas C) yra pagrindinis vandeninėje terpėje veikiantis antioksidantas; jis greitai oksiduojasi iki monodehidroaskorbo (vienielektroninė oksidacija) arba dehidroaskorbo (dvielektroninė oksidacija) rūgšties (3 pav.). Tarpląsteliniuose skysčiuose askorbo rūgšties koncentracija yra didesnė nei GSH, greičiausiai tai pagrindinis tarpląstelinis antioksidantas [20].



3 pav. Askorbo (a), monodehidroaskorbo (b) ir dehidroaskorbo (c) rūgštys [58]

Augalų ląstelėse askorbo rūgšties kiekis yra toks pats, kaip chlorofilo. Askorbo rūgštis sintetinama augalų citoplazmoje iš D-gliukozės ir veikiant specifiniam nešikliui patenka į chloroplastų vidų. Jos funkcijos nėra iki galo iširtos, tačiau viena iš svarbiausių yra antioksidantinė. Šiuo požiūriu askorbo rūgšties veikime svarbu tai, kad ji reaguoja su laisvaisiais radikalais greičiau nei kitos biomolekulės (tiesiogiai jas apsaugo) ir redukuoja oksiduotą tokoferolį (netiesiogiai apsaugo biomolekules). Dehidroaskorbo rūgštis greitai redukuojama iki askorbo rūgšties, katalizuojant dehidroaskorbo reduktazei, kuri panaudoja GSH.

Kitas vandenyje tirpus antioksidantas - **šlapimo rūgštis** (4 pav.). Tai galutinis purinų metabolizmo žmogaus organizme produktas.



4 pav. Laktiminė (a) ir laktaminė (b) šlapimo rūgšties formos [58]

Šlapimo rūgštis veikia kaip antioksidantas ir kaip pereinamųjų metalų chelatorius - surišdama Fe ir Cu, ji stabdo metalų katalizuojamas laisvųjų radikalų susidarymo reakcijas. Svarbiausia antioksidantinė šlapimo rūgšties savybė yra jos sugebėjimas surišti peroksinitritą.

Redukuotas **glutathionas (GSH)** pats tiesiogiai “gaudo” laisvuosius radikalus, jis reaguoja su $^1\text{O}_2$, superoksido ir hidroksilo radikalais, dalyvauja acilperoksidų pašalinime iš membranų, taip stabilizuoja membranų struktūrą. Svarbi antioksidantinė jo savybė yra ta, kad jis redukuoja oksiduotą askorbatą [44].

III. Jungiantys pereinamųjų metalų jonus baltymai.

Baltymas feritinas veikia kaip oksidantas, tam tikru aspektu – antioksidantas, surišantis geležį (Fe), baltymas ceruloplazminas – suriša plazmos varį (Cu), taip pat svarbus antioksidantinis įvairius metalus (Fe, Cu, Cd, Zn ir t.t.) jungiančių baltymų **metalotioneinų** poveikis.

Antioksidantinei organizmų apsaugai taip pat svarbūs fermentai, redukuojantys mažos molekulinės masės laisvųjų radikalų gaudyklės, o taip pat baltymų – SH grupės – GSH reduktazė bei tioredoksino reduktazė.

NAD(P)H yra svarbus antioksidantinei apsaugai ne tik tuo, kad teikia redukuojančius ekvivalentus oksiduotų antioksidantinių molekulių redukavimui, bet ir tuo, kad gali tiesiogiai “gaudyti” laisvuosius radikalus, kaip ir GSH.

Pastaruoju metu įsigalėjo nuomonė, kad tiek vėžiniai audiniai, tiek transformuotos ląstelės yra labiau prooksidantinės, negu atitinkamos normalios ląstelės, t.y. jose susidaro daugiau aktyviųjų deguonies formų [29]. Ko gero, tai susieta su jų proliferacijos pagreitinimu. Be to, aktyviosios deguonies formos dalyvauja vėžinių ląstelių plitime organizme, tiesiogiai ardydamos kraujotakos indų sienelės arba aktyvuodamos jas ardantį fermentą želatinazę [60].

Manoma, kad transformuotose ląstelėse, palyginus su normaliomis, yra žemesnis antioksidantinių fermentų kiekis. Duomenys rodo, kad auglių ląstelėse beveik visada būna žemesnis MnSOD ir CAT aktyvumas, ir, kaip taisyklė, žemesnis Cu-ZnSOD aktyvumas. Nepaisant to, kad auglio ar transformuotos ląstelės generuoja $\text{O}_2^{\cdot -}$ ir H_2O_2 , kurie normaliose ląstelėse yra superoksido dismutazės induktoriai, jie neindukuoja SOD transformuotose ląstelėse [51].

Daugeliu atveju SOD, CAT ir organiniai antioksidantai yra priešvėžiniai junginiai, t.y. slopina ankstyvasias rentgeno spindulių bei organinių oksidatorių sukeltas kancerogenines stadijas [10].

Prooksidantinių fermentų aktyvumo pokyčiai transformuotose ląstelėse tiriama eilę metų. Kaip vieni iš pagrindinių O_2^- ir H_2O_2 generuojančių sistemų eukariotų ląstelėse, susiję su jų proliferacija, intensyviai tyrinėjamos plazmos membranos NADPH oksidazės.

Nustatyta, kad vėžinėse ląstelėse žymiai (iki 20-50 kartų) gali išaugti ir citozolinis dikumaroliui jautrios NADPH chinonreduktazės (DT – diaforazės) kiekis. Manoma, kad tai yra ląstelės atsakas į „oksidacinį stresą“, nes be įprastų aktyvių šio fermento induktorių, jo sintezę skatina ir H_2O_2 . Šio fermento negalima laikyti nei antioksidantiniu nei prooksidantiniu, tačiau jis svarbus chemoterapijoje, nes aktyvuoja kai kuriuos priešvėžinius chinoninius ir nitro preparatus – diazikoną, dinitrofenilaziridiną CB 1954, indolochinoną E09 [52].

Transformuotų ląstelių prooksidantinių savybių padidėjimas gali padidinti jų jautrumą vaistams ar teršalams, generuojantiems laisvuosius deguonies radikalus [23].

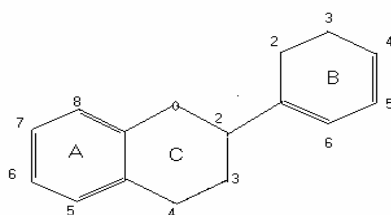
Gilesnis navikinių ląstelių savybių tyrimas pateiks naujos informacijos apie galimus vaistinių junginių veikimo mechanizmus ir padės prognozuoti naujas aktyvias struktūras.

2.2.1. Flavonoidai

Augalai nuo seniausių laikų yra vartojami įvairioms ligoms gydyti, kai kurie iš jų tinkami ir profilaktikai [54].

Flavonoidai – didelė grupė augalinių fenolio junginių, kurie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis *in vitro* ir *in vivo* tyrimuose. Tyrinėjamos epigalokatechino galato, genisteino, kvercetino [45], kurkumino [47], selibinino [70] potencialios priešnavikinės savybės. Pagal dabartinius duomenis identifikuota daugiau kaip 6000 flavonoidų .

Flavonoidai yra cheminė medžiaga, kurios pagrindinę struktūrą sudaro 15 anglies atomų (5 pav.). Jiems būdinga seka $C_6-C_3-C_6$.



5 pav. Flavonoidų cheminės struktūros pagrindas [19]

Flavonoidai, kurie pirenų žiede turi C – 3 padėtyje esančią hidroksilo grupę, yra priskiriami 3-hidroksiflavonoidams (flavonoliai, antocianidiniai, leukoantocianidiniai, ir katechinai), o likusieji priskiriami 3-dezoksiflavonoidams (flavanonai ir flavonai).

Flavonoliai. Labiausiai maiste paplitęs flavonolis yra kvercetas. Jis pasitaiko daugelyje vaisių ir daržovių, bet didžiausia jo koncentracija yra svogūnuose [28].

Flavanonai. Flavanonų beveik išimtinai yra citrusiniuose vaisiuose. Didžiausios jų koncentracijos, t.y., 100 mg/l randamos apelsinų, citrinų ir greipfrutų sultyse [19].

Katechinai. Katechinai randami obuoliuose, kriaušėse, vynuogėse ir persikuose [3]. O didžiausia katechinų koncentracija randama arbatoje ir raudoname vyne [4].

Flavonai. Pagrindiniai maiste randami flavonai yra apigeninas ir luteolinas. Didžiausias flavonų šaltinis yra raudonoji paprika ir salierai [28].

Antocianidiniai. Antocianinas (antocianidino glikozidas) suteikia raudoną, mėlyną, violetinę spalvas valgomiems vaisiams, tokiems kaip slyvos, obuoliai, baklažanai, daugeliui uogų.

Izoflavonoidai. Vyraujantys izoflavonoidai - izoflavonas genisteinas ir daidzeinas. Didžiausiomis koncentracijomis jie randami sojos pupelių ir sojų gaminiuose, o mažiausiomis - ankštiniuose augaluose [39].

2.2.1.1. Flavonoidų savybės

Flavonoidai turi priešuždegiminių savybių - kvercetas, izokvercetas ir rutinas slopina uždegimines reakcijas *in vivo*. Priešuždegiminis poveikis parodė šių flavonolių terapeutinį efektyvumą gydant uždegimines ligas [11].

Flavonoidai kontroliuoja kapiliarų ląsteles ir membranų pralaidumą, slopina trombocitų agregaciją, slopindami fermento ciklooksigenazės veiklumą.

Organizme flavonoidai dalyvauja indukuojant fermentines sistemas – mieloperoksidazę, NADPH oksidazę, ksantinoksidazę, A₂ fosfolipazę, ciklooksigenazę ir kt. Flavonoidai gali paveikti kraujo, nervų, lygiųjų raumenų, neoplastines ląsteles, taip pat jie dalyvauja metalų Fe ir Cu sukeliuose oksidaciniuose, taip pat oksidacinių medžiagų grandinių nutraukimo reakcijose [56].

Klinikinė mitybinė flavonoidų reikšmė įrodyta ir toliau tyrinėjama. Jų gebėjimas sujungti laisvuosius radikalus, metalų jonus, singletinį deguonį, dalyvauti vitamino C apykaitoje, yra svarbus gydant kepenų, širdies kraujagyslių, onkologines ligas. Nuolatinis maisto, kuriame gausu flavonoidų (vaisių, daržovių, arbatos), vartojimas aktyvina visų

organizmo sistemų veiklą, padeda apsaugoti nuo žalingų aplinkos veiksnių [19], atitolina ligų radimąsi.

Flavonoidai rutinas, luteolinas slopina antivėžinio vaisto doksorubicino sukeliama toksinį poveikį širdžiai, kaulų čiulpų ląstelėms, mažindami padidėjusį lipidų peroksidų kiekį širdies audiniuose, atstato fermento gliutationperoksidazės aktyvumą [19].

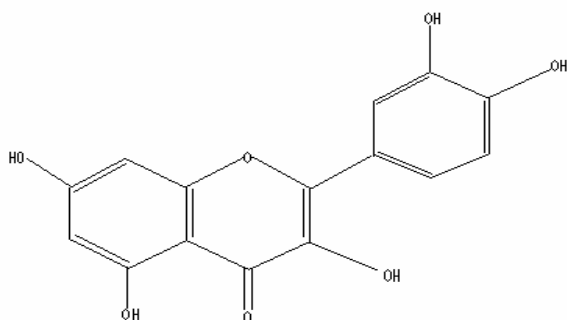
Eksperimentuojant nustatyta, kad flavonoidai didina miokardo atsparumą išemijai. Tyrimais įrodytas antitrombinis flavonoidų veikimas. Kvercetas, rutinas slopino trombocitų agregaciją labai mažos koncentracijos (0,03-0,05 μM) aktyvuotų kolageno skaidulose, be to, į veną įšvirkšti flavonoidai tirpino jau susiformavusį trombą [19].

2.2.1.2. Vitamino C (Askorbo rūgšties) ir flavonoidų sąveika

Biologiškai svarbi askorbo rūgšties ir flavonoidų sąveika biologinėse sistemose. Flavonoidai veikia kaip vitamino C skaidymo faktorius, o askorbo rūgštis apsaugo flavonoidus nuo irimo metabolizmo procesuose. *In vitro* nustatyta, kad flavonoidai lėtina askorbo rūgšties skilimo greitį. Sustabdžius askorbo rūgšties skilimą, dėl apsauginio flavonoidų poveikio galėtų sulėtėti senėjimo procesai, nes padidėjęs askorbo rūgšties metabolitų kiekis teoriškai gali būti svarbiausia mutagenezinė senėjimo priežastis. Flavonoidai, lėtinantys vitamino C metabolizmą, gali sulėtinti senėjimą [19].

2.2.1.3. Kvercetino biologinis aktyvumas

Labiausiai augaliniame maiste paplitęs flavonolis yra kvercetas (3,3',4',5,7 - pentahidroksiflavonas) (6 pav.).



6 pav. Kvercetino (3,3',4',5,7 - pentahidroksiflavono) cheminė struktūra [19]

Kvercetas turi daug biologiškai aktyvių savybių, tokių kaip:

- **antioksidacinių** – apsaugo nuo oksidantų žalos ir neleidžia ląstelei žūti, taip pat tai atskiras mechanizmas, naikinantis deguonies radikalus. Kvercetas yra beveik 5 kartus stipresnis

antioksidantas už vitaminus C ir E. Kvercetas kaip antioksidantas gali būti naudingas laisvųjų radikalų pažeistoms ląstelėms (tačiau kaip ir bet kuris kitas antioksidantas, esant tam tikroms aplinkybėms, jis gali veikti kaip prooksidantas, t. y. pats tampa laisvuju radikalų) [11].

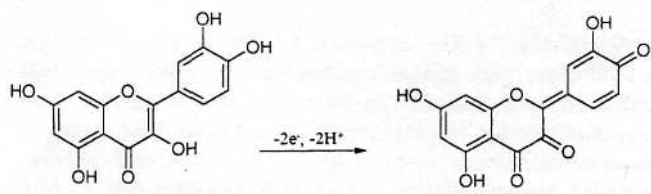
- **priešvėžinių** – naujų tyrimų su gyvūnais duomenimis, kvercetas slopino krūties, gaubtinės žarnos, prostatos, plaučių vėžinių ląstelių augimą. Keletas tyrimų įvertino, kaip kvercetas veikia įvairių formų vėžinius navikus žmogaus organizme. Buvo nustatyta, kad jis mažina naviko apimtį, slopindamas vėžinių ląstelių baltymų aktyvumą ir veiklą. Mokslininkai tikisi, kad kvercetas ir kiti flavonoidai gali sustiprinti priešvėžinių vaistų veikimą [55].
- Kvercetas stabdo vėžį sukeliančių medžiagų poveikį, o maistas su dideliu kverceto kiekiu stipriai sumažina tikimybę susirgti vėžiu [19].
- **priešuždegiminių ir antialerginių** - t. y. palengvina plaučių uždegimą, sinusitą, astmą. Nustatytas priešuždegiminis kverceto poveikis esant paausinių liaukų ir akies tinklainės uždegimui. Kvercetas (kaip ir kiti flavonoidai) veikia imuninę sistemą, ypač gerai stabdo alerginių reakcijų sukėlėjus (histaminus, bradikininus, leukotreinus) [19].
- **prieštrombinių** - kvercetas veikia ir antitrombotiškai, kadangi jis stabdo kraujo plokštelių susitelkimą ir susidarymą, taigi apsaugo kraujagysles nuo trombu, kaip antioksidantas stabdo cholesterolio kaupimąsi kraujagyslėse. Moksliniai tyrimai parodė, kad kvercetas yra stiprus ir selektyvus lipoksigenazės inhibitorius, be to, poveikis šiam fermentui priklauso nuo pH terpės [19].
- **kraujagysles plečiančių** [56].
- **antivirusinių**. Kverceto antivirusinis efektyvumas buvo patvirtintas bandymais su pelėmis. Kiti tyrimai parodė, jog jis yra HIV-1 atvirkštinės transkriptazės inhibitorius ir gali būti pavartotas kaip pagalbinis vaistas šio viruso sukeltai infekcijai gydyti [19].

Kvercetas laikomas junginiu, neutralizuojančiu kenksmingų radikalų citotoksiškumą. Keletas tyrinėtojų įrodė, kad kvercetas, sąveikaudamas su etanoliu, sumažina etanolio sukeltą kepenų cirozę ir lipidų peroksidaciją o kverceto gastroapsauginis poveikis susijęs su jo anti-peroksidacinėmis, antioksidantinėmis ir antihistamininėmis savybėmis [19].

Kverceto metabolizmas ir biologinis aktyvumas buvo ištirtas 1960 – 1970 m. [25], tačiau šių tyrimų *in vivo* buvo paskirtos gana didelės šio tiriamo flavonoido dozės.

2.2.2. Flavonoidų citotoksiškumas

Dičkancaitė ir kt. [15] ir Sergedienė ir kt. [59]. pastebėjo, kad flavonoidų kvercetino, morino, hesperetino, naringenino ir kitų citotoksiškumą galvijų leukemijos virusu transformuotuose ėriuko inkstų fibroblastuose (FLK linija) ir žmogaus promielocitinėse leukeminėse ląstelėse (HL-60 linija) sumažina antioksidantas N,N'-difenil-p-fenilendiaminas (DPPD) ir Fe-jonų chelatorius desferioksaminas, inhibuojantis Fentono reakciją. Be to, šių flavonoidų poveikis buvo lydimas lipidų peroksidacijos. Oksiduojantis kvercetinui susidaro laisvieji radikalai, o galutinis kvercetino oksidacijos produktas yra jo chinometidas (7 pav.), susidarantis izomerizuojantis kvercetino chinonui.



Kvercetas

p-chinometidas

7 pav. Kvercetino oksidacinės transformacijos schema [59]

Šis junginys veikia kaip prooksidantas, nes reaguoja su antioksidantu - redukuotu gliutationu, tuo mažindamas jo kiekį ląstelėje. Visa tai rodo, kad flavonoidų ir kitų polifenolinių antioksidantų citotoksiškumas gali būti prooksidantinio tipo, t.y., citotoksiinį poveikį gali turėti jų autooksidacijos (natūralios oksidacijos terpės deguonimi), arba fermentinės oksidacijos, pvz., peroksidazėmis produktai – chinonai arba chinoiminai [59].

Vėlesni tyrimai naudojant FLK ir HL-60 ląsteles [49] detalizavo flavonoidų ir kitų polifenolinių antioksidantų prooksidantinio citotoksiškumo mechanizmą šiose linijose:

a) junginių citotoksiškumas didėjo, mažėjant jų vienelektroninės oksidacijos potencialui ir didėjant lipofiliškumui (oktanolio/vandens pasiskirstymo koeficientui, log P);

b) junginių citotoksiškumą mažino DPPD ir desferioksaminas;

c) junginių citotoksiškumą mažino katalazė, esanti ląstelių inkubacijos terpėje. Tai rodo, kad citotoksiškumą tam tikru laipsniu sukelia polifenolių autooksidacija ne ląstelėse, o terpėje, kurios metu susidaro H₂O₂ (fermentas katalazė negali patekti iš terpės į ląstelę);

d) citotoksiškumą tam tikru laipsniu sukelia ir polifenolių oksidacija ląstelės viduje, nes citotoksiškumą sumažina citochromų P-450 inhibitoriai α -naftoflavonas ir izoniazidas.

Citochromai P-450 atlieka šių junginių hidroksilinimą (įveda papildomą –OH grupę į aromatinį žiedą), o polifenolių hidroksilinimo laipsnio išaugimas greitina jų autooksidaciją, sudarančią prooksidantinius junginius – H_2O_2 ir chinonus/chinometidus. Antra vertus, citotoksiškumą didina 3,5-dinitropirokatechinas, veikiantis kaip o-metilkatecholtransferazės (COMT) inhibitorius. Šis fermentas atlieka o-hidrochinoninių grupių metilinimą (verčia – OH grupes į – OCH_3), tuo mažindamas polifenolių autooksidacijos greitį; e) NAD(P)H: chinonreduktazės (NQO1, DT-diaforazės) inhibitorius dikumarolas mažina kvercetino citotoksiškumą FLK ląstelėse. Tai rodo, kad susidariusių chinoninių/chinometidinių oksidacijos produktų pakartotina redukcija NQO1 didina jų citotoksiškumą [49].

2.3. Apoptozė

2.3.1. Apoptozės fiziologinės funkcijos

Apoptozė arba programuota ląstelių mirtis yra fiziologinis genetiškai reguliuojamas ląstelių pašalinimo mechanizmas, reikalingas audinių homeostazei palaikyti. Terminas apoptozė yra kilęs iš graikų kalbos ir reiškia iškritimą (graik. apoptozis – krintantys lapai).

Organizmui vystantis, apoptozės būdu naikinamos nereikalingos ląstelės, pavyzdžiui, lervos, audiniai varliagyvių ir vabzdžių metamorfozės metu, ar plėvės tarp pirštų, formuojantis žinduolių galūnėms. Apoptozė ne tik palaiko reikiamą ląstelių skaičių organizme, bet ir šalina žalingas ląsteles. Dažnai apoptozė pašalina viruso infekuotas ląsteles, taip išvengiant viruso išplitimo po visą organizmą. Apoptozės būdu taip pat ardomas ląstelės, turinčios DNR pažeidimų ir galinčios supiktybėti. Todėl apoptozė apsaugo organizmą nuo infekcijų bei vėžio [22].

Daugelį metų buvo manoma, kad mažiau pažeista ląstelė išgyvena, o labiau pažeista patiria nekrozę. 1972 m. Dž.Keras su bendraautorais aprašė morfologiškai kitokią mirties rūšį, pavadinta apoptoze [33]. Sakoma, kad apoptozė – tai ląstelės savižudybė arba programuota mirtis, nes ląstelė aktyviai dalyvauja savęs pačios naikinime, sintetindama ir aktyvindama fermentus, kurie branduolio DNR skaldo į fragmentus. Apoptozės metu ląstelė praranda ryšius su kitomis ląstelėmis, įvyksta branduolio chromatinio kondensacija, o vėliau ir branduolio fragmentacija, plazminėje membranoje susiformuoja pūslelės, pati ląstelė susitraukia ir galiausiai suskyla į apoptotinius kūnelius, kuriuos fagocituoja aplinkinės ląstelės [22]

Apoptozė skiriasi nuo nekrozės. Nekrozė – pasyvus, katabolinis, degeneracinis procesas. Vykstant nekrozei ląstelės miršta nuo kenksmingų veiksnių: mechaninių pažeidimų, nuodingų cheminių medžiagų, deguonies trūkumo. Apoptozės metu nekyla uždegiminė reakcija, plazminė membrana išlieka vientisa iki proceso pabaigos, ir tai neleidžia ląstelių turiniui patekti į tarpląstelinį tarpą [1].

Fiziologinės apoptozės metu eliminuojamas ląsteles labai sunku tyrinėti, nes jos labai greitai fagocituojamos. Todėl pagrindiniai morfologiniai ir biocheminiai apoptozės bruožai tiriami ląstelių kultūrose, dirbtinai sukeltą apoptozę įvairiais stimulais [27].

Genetiniai ir molekuliniai apoptozės mechanizmai pirmiausiai buvo ištirti, naudojant kaip eksperimentinį modelį kirmėlę *C.elegans*. Šie tyrimai parodė, kad apoptozė susideda iš kelių nuoseklių etapų: 1) sprendimo fazės, kai vyksta daugybės pro- ir antiapoptotinių, ekstraląstelinių ir intraląstelinių, signalų derinimas; 2) vykdymo fazės, kai yra aktyvinama negrįžtama cisteino proteazių (kaspazių) kaskada; 3) apoptotinių kūnelių fagocitavimo fazės [22].

Apoptotinių ląstelių šalinimas iš organizmo yra reguliuojamas procesas. Apoptozės eigoje ląstelės susiskaido į plazminę membrana apgaubtus darinius, kurie vadinami apoptotiniais kūneliais. Apoptozės būdu mirstančios ląstelės plazminėje membranoje atsiranda savitųjų molekulių, kurias atpažįsta imuninės sistemos ląstelės makrofagai. Jie fagocituoja mirstančias ląsteles ir jas suardo [8].

Neseniai nustatyta, kad makrofagai, fagocituodami apoptotines ląsteles, ne tik saugo organizmą nuo nekrozės sukeliama uždegimo, bet ir aktyviai slopina uždegiminį atsaką. Makrofagai, fagocitavę apoptotines ląsteles, sekretuoja priešuždegiminį citokiną TGFβ (transforming growth factor β), o uždegiminių citokinių, tokių kaip TNFα, sekrecija slopinama [71].

2.3.2. Baltymai, reguliuojantys apoptozės eigą

Programuotos ląstelės mirties įvykdymui būtina energija (ATP) ir specifinių baltymų sintezė. Kai kurių iš šių baltymų raiška yra nuolatinė, o kiti aktyvinami, esant mirties signalams. Pagrindinės mirties molekulės yra proteazės, vadinamos **kaspazėmis** [22].

Kaip dauguma proteazių, kaspazės sintezuojamos kaip neaktyvios prokaspazės, kurios suaktyvinamos, kai jas apardo kiti fermentai, arba autokatalizės būdu [43].

Kaspazės, aktyvinančios kitas kaspazes ir paleidžiančios kaspazių kaskadą, vadinamos **aktyvinančiomis kaspazėmis**. Būdingiausias jų atstovės yra kaspazė-8 (casp-8) ir kaspazė-9 (casp-9). Jos, ardydamos kitas prokaspazes, jas aktyvina [61]. Taip susidaro kaspazių

aktyvinimo kaskada, stiprinanti apoptotinio signalo perdavimą į mitochondrijas, branduolį ir kitas ląstelių struktūras [27].

Substratus hidrolizuojančios kaspazės vadinamos **veikliomis kaspazėmis**, kurios aktyvinamos, veikiant kaspazių kaskadai. Šiuo metu žinoma per šimtą veikliųjų kaspazių substratų, tačiau nuosekli apoptotinio skaidymo eiga dar nėra nustatyta. Veikliosios kaspazės aktyvina gelzoliną ir keičia kitų aktino filamentų bei mikrotubulių dinamiką reguliuojančių baltymų aktyvumą, sukeldamos citoskeleto irimą, membraninių pūslelių susidarymą ir ląstelės fragmentaciją.

Bcl-2 šeimos apoptozės reguliatoriai. Svarbią apoptozės reguliatorių grupę sudaro Bcl-2 šeimos baltymai, kurie gali skatinti arba slopinti apoptozės procesą. Pirmasis šios šeimos atstovas baltymas Bcl-2 buvo aptiktas vėžinėse ląstelėse. Šiam baltymui Bcl-2 būdingas antiapoptotinis poveikis, ypač svarbus vėžinių limfocitų išplitimui limfomos atveju [61].

Pagal struktūrą ir funkcijas Bcl-2 šeimos baltymai skirstomi į 3 grupes. Pirmosios grupės baltymai pasižymi **antiapoptotiniu veikimu**, o antros ir trečios grupės baltymai skatina apoptozę (**proapoptotinis aktyvumas**). Dauguma Bcl-2 šeimos baltymų turi hidrofobines C-galo sekas ir gali jomis įsiterpti į membranas. Antiapoptotinis baltymas Bcl-2 yra vidinėje mitochondrijų membranoje, kur jis dalyvauja palaikant mitochondrijų membranos įtampą. Ši jo savybė labai svarbi, nes mitochondrijos tiesiogiai dalyvauja tam tikruose apoptozės aktyvinimo keliuose [34].

Mitochondrijų proapoptotiniai baltymai. Apoptozę skatina tam tikrų baltymų perėjimas iš mitochondrijų į citozolį. Svarbiausias iš jų yra baltymas citochromas c, kurio funkcija yra elektronų pernaša mitochondrijų kvėpavimo grandinėje, jis yra svarbus oksidacinio fosforilinimo procesui. Apoptozės metu citochromas c iš mitochondrijų išeina į citozolį, kur sąveikauja su baltymu Apaf-1, prokaspazė-9 ir kitais baltymais, iš kurių susidaro makromolekulinis kompleksas apoptosoma, aktyvinantis veikliąsias kaspazes [26].

Kartu su citochromu c iš mitochondrijų išeina kiti proapoptotiniai junginiai, tarp jų oksidoreduktazė AIF, kuri nuo kaspazių nepriklausomu būdu sukelia DNR skaidymą ir atkarpas, tačiau tikslus jo veikimo mechanizmas nėra nustatytas. Kitas proapoptotinis mitochondrijų baltymas Smac slopina kaspazių slopiklių veiklą [26].

Kaspazių slopikliai. Grupė baltymų, vadinamų IAP (inhibitors of apoptosis proteins), jungiasi prie kaspazių katalizinių domėnų ir taip slopina jų aktyvumą [22].

2.3.3. Pagrindiniai apoptozės mechanizmai

Šiuo metu geriausiai ištirti du apoptozės keliai: išorinis arba receptorių kelias ir vidinis arba mitochondrijų kelias [69].

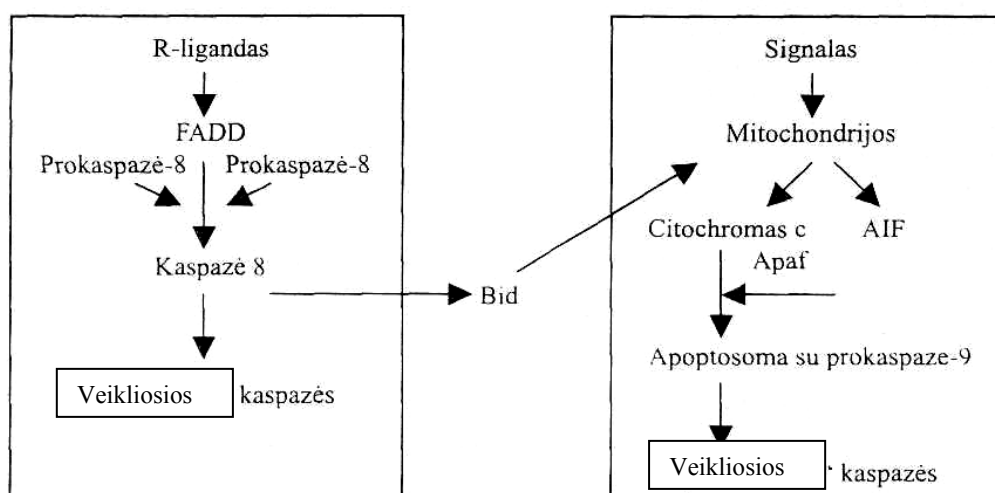
Apoptozę aktyvinančio signalo perdavimas ląstelių mirties receptoriais, priklausančiais TNF receptorių šeimai, prasideda po ligando prisijungimo prie ląstelių mirties receptoriaus (R), jo molekulės polimerizuojasi. Receptorių viduląstelinė sritis prijungia vadinamąsias FADD (Fas-asociate death domain protein) pritaikymo (adaptor) molekules. Šis kompleksas pritraukia ir sukaupia prokaspazės-8 molekules. Padidėjus šių molekulių koncentracijai, jos pradeda skaidyti viena kitą ir taip aktyvuojasi - susidaro kaspazė-8, kuri vėliau aktyvuoja veikliąsias kaspazes, kurios lemia ląstelės mirtį [61]. Išorinis apoptozės kelias yra būdingas imuninės sistemos ląstelėms. Šiuo būdu pašalinamos viruso užkrėstos arba vėžinės ląstelės, taip pat limfocitai imuninio atsako pabaigoje [26].

Dažnai išorinio kelio nepakanka ląstelei sunaikinti. Tokiu atveju kaspazės-8 ne tik tiesiogiai aktyvina veikliąsias kaspazes, bet kartu ir vidinį apoptozės kelią. Iš mitochondrijų atsipalaidavęs citochromas c citoplazmoje susijungia su apoptozės proteazės aktyvinančiu veiksnio (Apaf) ir prokaspaze-9, sudarydami apoptosomą, kur prokaspaze-9 virsta aktyvia kaspaze. Kaspazė-9 aktyvina kitas kaspazes ir taip prasideda apoptozė. Iš mitochondrijų gali atsipalaiduoti ir apoptozę indukuojantis veiksnys (AIF) [26].

Abu apoptozės mechanizmus sujungia baltymas Bid. Citoplazmoje esantis Bid yra neaktyvus tol, kol jo nepaveikia kaspazė-8. Paveiktas Bid įsiterpia į mitochondrijų membraną ir didina jos nespecifinį laidumą (7 pav.) [69].

Apoptozė aktyvinama mirties receptoriais

Apoptozė aktyvinama mitochondrijomis



7 pav. Dviejų apoptozę sukeliančių mechanizmų tarpusavio sąveika [38]

2.3.4. Apoptozės sutrikimų lemiamos ligos

Normaliam daugialąsčio organizmo egzistavimui būtina pusiausvyra tarp ląstelių dauginimosi ir mirties, kuri lemia ląstelių kaupimąsi, jei dalijimosi greitis viršija naikinimo greitį, normalų audinį, kai abu procesai subalansuoti, ir audinio degeneraciją, jei apoptozės greitis viršija ląstelių dalijimosi greitį. Pažeidus šią pusiausvyrą, vystosi įvairios ligos.

Sulėtėjus ląstelių apoptozei atsiranda autoimuninių ligų (pvz. sisteminis *lupus erythrematosus*, imuninės kilmės glomerulonefritas) [33]; navikų (pvz. folikulinė limfoma, karcinoma su p53 mutacijomis, hormoninės kilmės augliai [43]; virusinės infekcijos. Apoptozei pagreitėjus pradeda ryškėti neurodegeneracinės (pvz. Alzheimerio, Parkinsono liga), širdies ir kraujagyslių ligos (pvz. miokardo infarktas, reperfuzija) [30].

Ypatingą susidomėjimą apoptozės tyrimai kelia todėl, kad apoptozės molekulinio mechanizmo ir reguliacijos išaiškinimas gali suteikti galimybę koreguoti tokių ligų eigą [1].

Apoptozė visiškai nevyksta arba yra slopinama vėžinėse ląstelėse. Tai leidžia genetiškai nestabilioms vėžinėms ląstelėms daugintis ir plisti organizme net ir esant nepalankioms sąlygoms, pavyzdžiui veikiant priešvėžiniams vaistams. Vėžinių ląstelių atsparumas priešvėžinei terapijai neretai būna susijęs su apoptozės procesų sutrikimais. Daugiau kaip 50% vėžinių ląstelių aptinkama geno TP53 mutacija. Baltymas TP53 indukuoja apoptozę ląstelėse, turinčiose daug genetinių pažeidimų. Jis skatina proapoptotinių Bcl-2 šeimos baltymų ir kitų apoptozės veiksmų transkripciją. Tuo tarpu vėžinėse ląstelėse, įprastai turinčiose daug genetinių pažeidimų, defektyvus baltymas TP53 apoptozės aktyvuoti nesugeba. Šalia to, vėžinėse ląstelėse apoptozė gali nevykti ir dėl per didelio antiapoptotinių Bcl-2 šeimos baltymų aktyvumo.

2.3.5. 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. Naudojant šį metodą,

nustatoma, į kokio dydžio fragmentus yra suskilusi DNR. DNR elektroforezė rekomenduojama tiriant vienos rūšies ląsteles.

Šiuo metu plačiausiai atliekami dvi *in situ* fermentinės reakcijos. Viena reakcija apoptozei nustatyti yra TUNEL (angl. TdT mediated dUTP- biotin 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 specifiskumu. 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 (Yaoita et al., 1995). Kita reakcija yra ISEL (In situ end labeling). Atliekant šią reakciją, naudojama DNR polimerazė I, kuri pritvirtina žymėtuosius nukleotidus prie DNR laisvųjų galų, vėliau šis prisijungimas vizualizuojamas naudojant įvairius metodus [68]. DNR polimerazė I prijungia nukleotidus prie nutrauktos DNR 3'- hidroksilintų galų, taip grandinė pailgėja nuo 5'- link 3'- galo. Kad būtų gauti tikslesni rezultatai, reikia derinti tris keturis metodus. Tačiau 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 kraujo serume) [38].

Apoptozė yra palyginti neseniai atrastas ir todėl ne iki galo ištirtas procesas. Tačiau, kaip rodo tyrimai, apoptozė yra svarbi daugelio ligų patogenezėje.

3. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Darbas atliekamas Vilniaus Universiteto Imunologijos institute, Biomodelių laboratorijoje.

3.1. Tyrimo medžiaga

Eksperimentai buvo atlikti naudojant monosluoksninę hepatomos 22a ląstelių liniją (Mouse Hepatoma, 22-asis pirminis navikas, A-subkultūra) gauta iš Biochemijos instituto dr. Virginijos Bukelskienės. Tai indukuotos pelės hepatomos ląstelės, neišlaikiusios panašumo su kepenų ląstelėmis. Vyrauja epitelinio tipo ląstelės, kurias įvedus pelėms po oda susidaro navikai. Ląstelės pasižymi greita proliferacijan ir ląstelių migracija.

3.2. Tyrimo metodai

3.2.1. Ląstelių kultivavimas, jų proliferacijos tyrimas

Hepatomos 22a ląstelių linija tradiciškai auginame DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) terpėje (su 0,3 µg/ml gliutamino), pridedant 10% inaktyvuoto (30 min., 56°C temp.) karvių embriono kraujo serumo (Biological industries, Izraelis), 100 vien/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomocino. Pradinė ląstelių pasėlio koncentracija 3×10^4 ląst./ml. Ląstelės auginamos 37 °C temp. stiklo flakonuose 3 – 4 paras iki pilno monosluoksnio susidarymo. Įvertinamas persėjimui skirtų ląstelių monosluoksnis bei terpės spalva (augant ląstelėms terpė rūgštėja, todėl indikatorius – fenolio raudonasis keičia spalvą iš raudonos į geltoną) ir terpės drumstumas, kuri gali sukelti nusilenkančios nuo substrato ląstelės arba infekcija. Ląstelių monosluoksnis apžiūrimas invertuotu mikroskopu. Augimo terpė nupilama, ląstelių monosluoksnis praplaunamas terpe be serumo ir suardomas veikiant jį 3 – 5 min. 0,25 % tripsino ir 0,02 % Verseno mišiniu (1 :9) termostate 37°C temperatūroje. Kai ląstelių sluoksnis disocijuoja, suspensija praskiedžiama šviežia terpe su fetaliniu veršelio serumu ir ląstelės ir persėjamos į naujus flakonėlius.

Tiriant proliferacinį aktyvumą mūsų bandymuose, ląstelės aukščiau aprašytomis sąlygomis sėjamos į flakonus po 10 ml ląstelių suspensijos. Pradinė pasėlio koncentracija - 30000 ± 1000 ląst./ml. Toliau 3 - 4 paras, vidutiniškai kas 24 h, supernatantas būdavo nupilamas, ląstelių monosluoksnis suardomas.

Ląstelės skaičiuojamos Gorajjevo kameroje, pagamintoje iš storo stiklo pokštelės, kurioje išbraižytas tinklelis. Aplink tinklelį yra dvi skersinės plokštelės, iškilusios virš skaičiavimo tinklelio. Ant šių plokštelių uždedamas dengiamasis stiklelis.

Ant Gorajjevo kameros tinklelio dedamas švarus dengiamasis stiklelis. Jo kraštai pritrinami prie šoninių laukelių paviršiaus taip, kad susidarytų vaivorykštės žiedai. Pipete užlašinama tiriamoji medžiaga. Palaukiama, kol turinys pasklis po visą tinklelį, grioveliuose esantis perteklius nusauginamas. Ląstelės skaičiuojamos penkiuose dideliuose kvadratuose. Jų koncentracija apskaičiuojama pagal formulę

$$X = a/b \cdot c \cdot 10^4;$$

X – ląstelių skaičius 1 ml; a – bendras ląstelių skaičius; b – suskaičiuotų kvadratų skaičius; c – praskiedimo laipsnis.

Nustatomas ląstelių skaičius ir pakartojus bandymą 3 – 5 kartus, sudaroma augimo kreivė.

3.2.2. Ląstelių gyvybingumo ir citotoksiškumo tyrimas

Gyvų ląstelių procentas jų populiacijoje nustatomas prieš ląstelių išsėjimą eksperimentui, o taip pat po eksperimentinių medžiagų poveikio. Kontrolinė kultūra kultivuojama be eksperimentinių medžiagų.

Ląstelės buvo sėjamos į flakonus su dengiamaisiais stikeliais po 5 ml ląstelių suspensijos ir auginamos standartinėmis sąlygomis DMEM terpėje su 10 % fetalinio galvijų serumu ir antibiotikais. Ląstelės buvo veikiamos kvercetinu, miricetinu ir morinu ir kultivuojamos 24 val.

Po 24 val. poveikio stikleliai išimami, plaunami fosfatiniame buferyje, dažomi vitaliniu dažu (0,4% tripano mėliu) ir vertinami šviesiniu mikroskopu (Carl Zeiss Jena, Vokietija). Gyvų ląstelių membrana nepralaidi dažui ir jos lieka nenusidažiusios, o žuvusios ląstelės nusidažo mėlyna spalva.

Kiekviename pavyzdyje ląstelės skaičiuojamos standartiniame ploto vienetu, viename pavyzdyje skaičiuojami 5-10 plotai [49].

Gyvų ląstelių procentas nustatomas pagal formulę:

$$\text{gyvos ląstelės (\%)} = \text{gyvos ląstelės} / \text{visos ląstelės} \times 100.$$

Kartu patikrinamas ląstelių gyvybingumas augimo terpėje.

Eksperimentui naudojama tik ta ląstelių kultūra, kurios gyvybingumas yra virš 95%.

Buvo nustatoma CL₅₀ (koncentracija, sukianti apie 50 % ląstelių žuvimą) po skirtingų koncentracijų kvercetino, miricetino ir morino poveikio. Įvertinus ląstelių skaičių ir pakartojus bandymą 3 – 5 kartus, sudaroma kvercetino, miricetino ir morino citotoksinio poveikio kreivė.

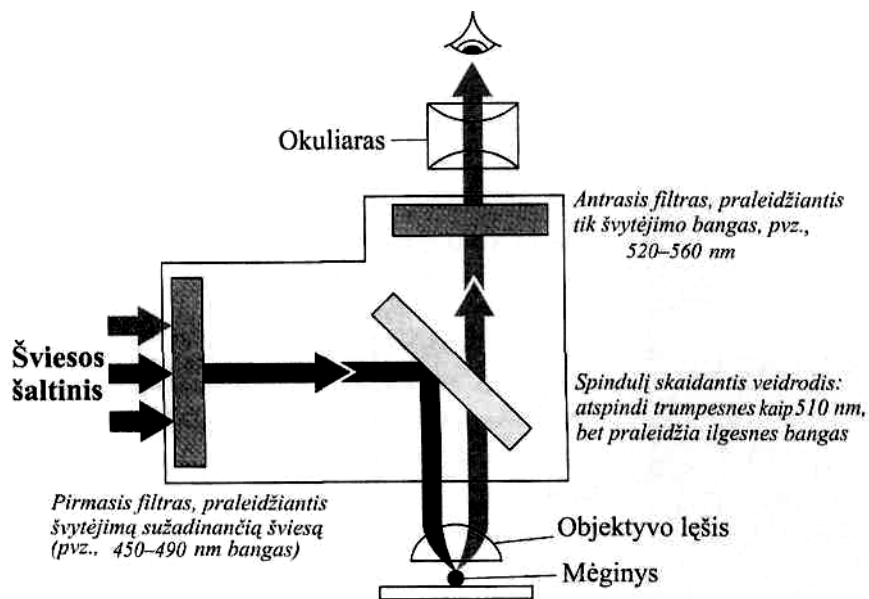
3.2.3. Apoptozės tyrimas fluorescencinės mikroskopijos principu

Apoptozės nustatymui naudojami įvairūs metodai (2.3.7.). Vienas iš apoptozės nustatymo būdu yra fluorescencinė mikroskopija.

Fluorescencinė mikroskopija – šiuo metu pati populiariausia šviesinės mikroskopijos rūšis. Įprastinės šviesinės mikroskopijos atveju pavyzdys yra apšviečiamas balta šviesa, o naudojant fluorescencinę mikroskopiją – tam tikro bangos ilgio šviesa. Dažai, vartojami atliekant fluorescencinę mikroskopiją, vadinami fluorochromais. Apšviestos fluorochromo molekulės sugeria šviesą. Sužadinti jų elektronai pereina į aukštesnę lygmenį. Sužadinta būsena

nėra energetiškai naudinga, todėl elektronai greitai grįžta į pradinį lygmenį, perteklinę energiją išspinduliuodami šilumos ir šviesos pavidalu.

Fluorescencinės mikroskopijos atveju mėginį apšviečianti šviesa nepatenka į okuliarą (8 pav.). dėl to, fluorescuojančios ląstelės sritys matomos kaip švytintys objektai tamsiame fone. Daug gamtinių junginių gali fluorescuoti, pvz., chlorofilas, vitaminai ir kt. Savaimė nešvytinčių objektų tyrimams naudojami fluorescuojantieji dažai, pvz., fluoresceinas, rodaminas. Fluorescencinė mikroskopija yra labai jautrus metodas, tinkamas ląstelės organėlėms tirti.



8.pav. Šviesos spindulių sklaidimas fluorescenciniame mikroskope

Dėl trijų filtro komponentų sąveikos gaunami kontrastingi ryškūs fluorescenciniai vaizdai ant tamsaus bandinio fono.

Eksperimentinių medžiagų poveikis Hep 22a linijos ląstelių apoptozės procesui buvo vertinamas po 24 val. dažant akridino oranžiniu ir etidžio bromidu (AO/EB).

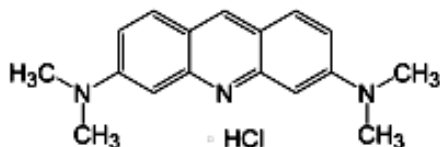
➤ Darbe buvo naudojami šie junginiai:

1. **Kvercetas**. Koncentracija 160 μM .
2. **Miricetas**. Koncentracija 60 μM .
3. **DPPD** (N,N' – difenil-p-fenilendiaminas). Tai yra antioksidantas, slopinantis lipidų peroksidų susidarymą.
4. Desferoksaminas (**Desf**). Tai geležies jonų surišėjas.
5. Dikumarolas (**Dic**). Dikumarolas yra DT–diaforazės inhibitorius.
6. Katalazė – antioksidacinis fermentas.

7. α -naftoflavonas – citochromo P-450 1A1/1A2 inhibitorius.
 8. Izoniazidas – citochromo P-450 2E1 inhibitorius.
 9. 3,5 - dinitropirotechinas – o-metilkatecholamintransferazės (COMT) inhibitorius.
- Darbe buvo naudojami keli fluorochromai:

Akridino oranžas (AO). ($C_{17}H_{19}N_3 \cdot HCl \cdot ZnCl_2$)

[3,6-bis(dimetilamino)akridino cinko chlorido dviguba druska].



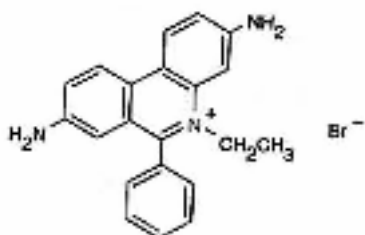
9 pav. Akridino oranžo cheminė struktūra

AO patenka į gyvas ir negyvas ląsteles. Jis jungiasi prie natyvos (dvigrandės) DNR kaip monomeras, todėl stebint fluorescenciniu mikroskopu, matoma žalia spalva. Taip pat jis gali prisijungti ir prie denatūruotos struktūros. Nudažo nuo žalios iki geltonos spalvos priklausomai nuo pH. AO gali jungtis ir prie viengrandės DNR, tada bus matoma raudona spalva. Taip pat jungiasi prie viengrandžių RNR ir nudažo jas oranžine spalva. Gyvų ląstelių branduolys švyti žalia spalva, o citoplazma gali būti gelsva.

Po patekimo į rūgštines granules AO protonizuojasi ir lokalizuojasi vidinėje granulės membranoje. Taip granulėse susidaro didelė protonizuoto AO koncentracija. Jei granulės pašarmėja, AO neutralizuojamas ir egzocitozės būdu gali pereiti granulės membraną.

Etidžio bromidas (EB). ($C_{21}H_{20}N_3Br$)

[2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantridin bromidas].



10 pav. Etidžio bromido cheminė struktūra

EB - policiklinis fluorescencinis dažas. Jis patenka į negyvas ląsteles, nes gyvų ląstelių membrana jam nepralaidi. Jis interkaluoja į dvigrandę DNR (tarp daugybės bazių porų) ir matymo lauke švyti oranžine spalva. EB šiek tiek gali jungtis prie antrinių struktūrų viengrandžių RNR molekulių ir švytėti raudonai, todėl negyvos ląstelės turi oranžinį chromatiną, o citoplazma būna rausva.

Gyvų, apoptotinių ir nekrotinių ląstelių procentas buvo nustatomas dažant AO/EB: naudojamas dažų mišinys: 100 µg/ml akridino oranžinio ir 100 µg/ml etidžio bromido. 15 µl dažų mišinio dedama ant objektyvinio stiklelio uždengiama dengiamuoju stikleliu. Analizuojama fluorescenciniu mikroskopu (bangos ilgis 500 nm). Šiuo būdu nudažytų ląstelių masėje išskyrėme dvejų rūšių 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 chromatinas);

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 skaičiuojama 2 kartus ar daugiau kartų po 100 ląstelių. Ląstelių pavyzdžiai buvo stebimi x100 ir x400 N-PLAN objektyvu ir fotografuojami Leica DMLB mikroskopine sistema.

3.2.4. Statistinis duomenų įvertinimas

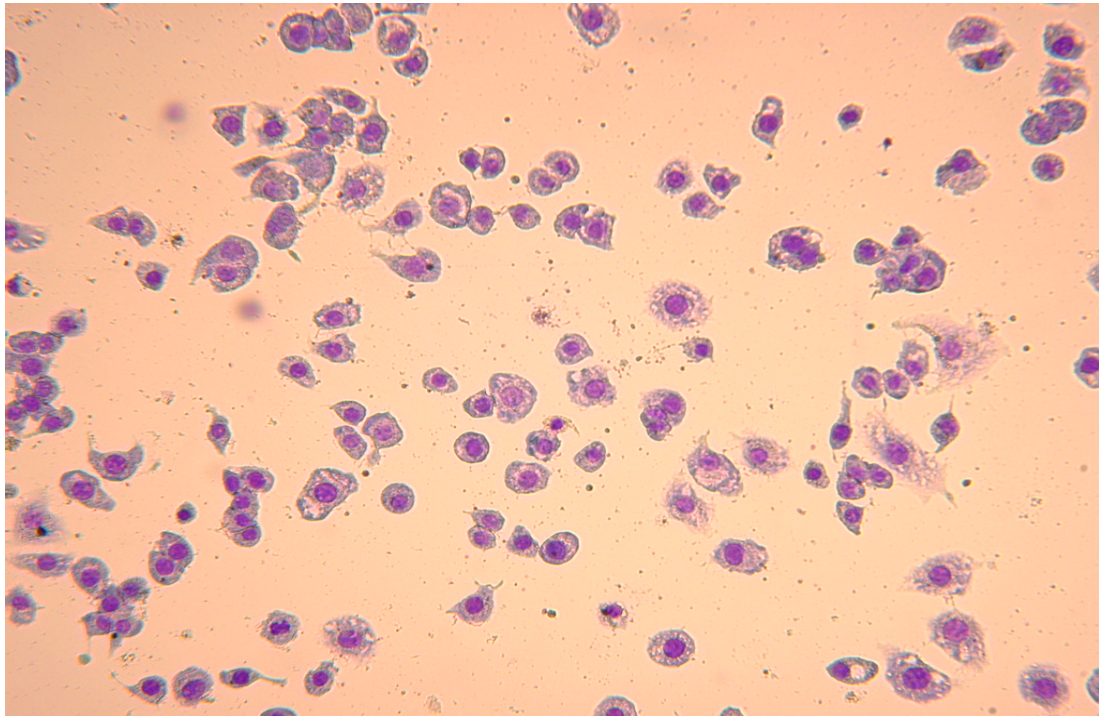
Statistinis duomenų apdorojimas atliktas programomis Microsoft Excel ir Sigma Plot versija 1.02. Duomenys pateikti apskaičiuavus aritmetinį vidurkį ir standartinę paklaidą. Atliktas Stjudento T-testas, pagal jį rezultatai reikšmingi ir patikimi, kai $p < 0,05$.

4. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

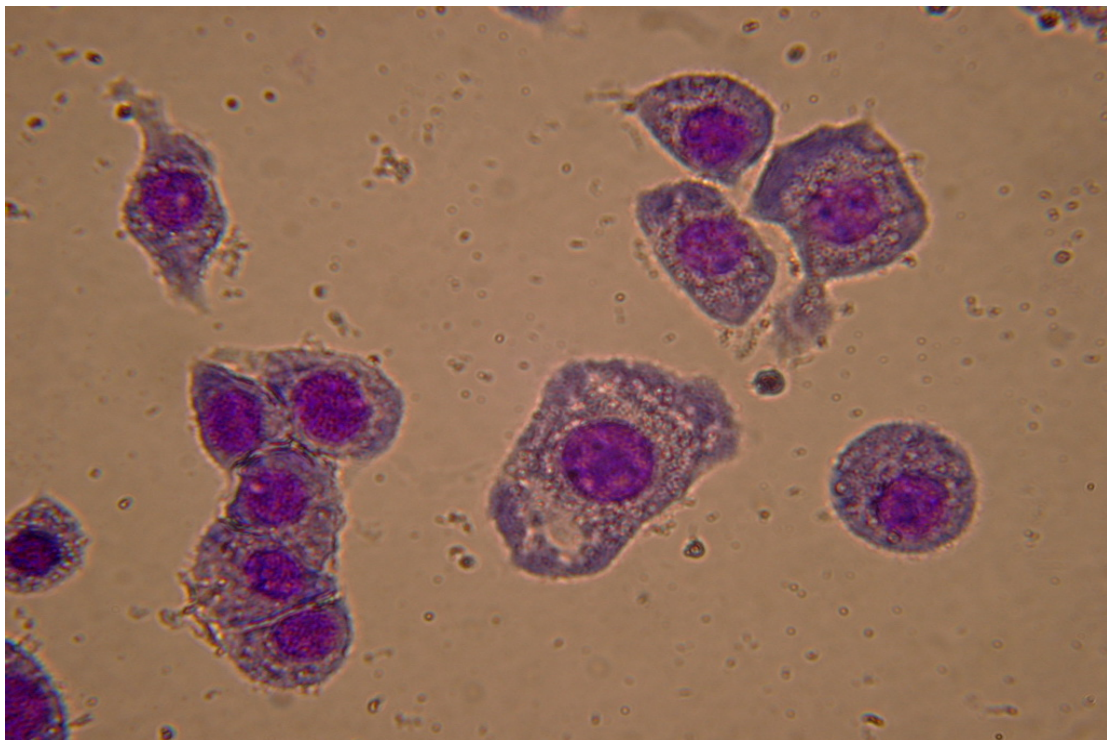
4.1. Hep 22a ląstelių linijos morfologija

Morfologiniu požiūriu šios linijos ląstelės yra apvalios ar ovalios formos, Hep 22a linijos ląstelės yra smulkios, sudaro trabekulines struktūras, auga formuodamos monosluoksnį (11, 12, 13, 14 pav.).

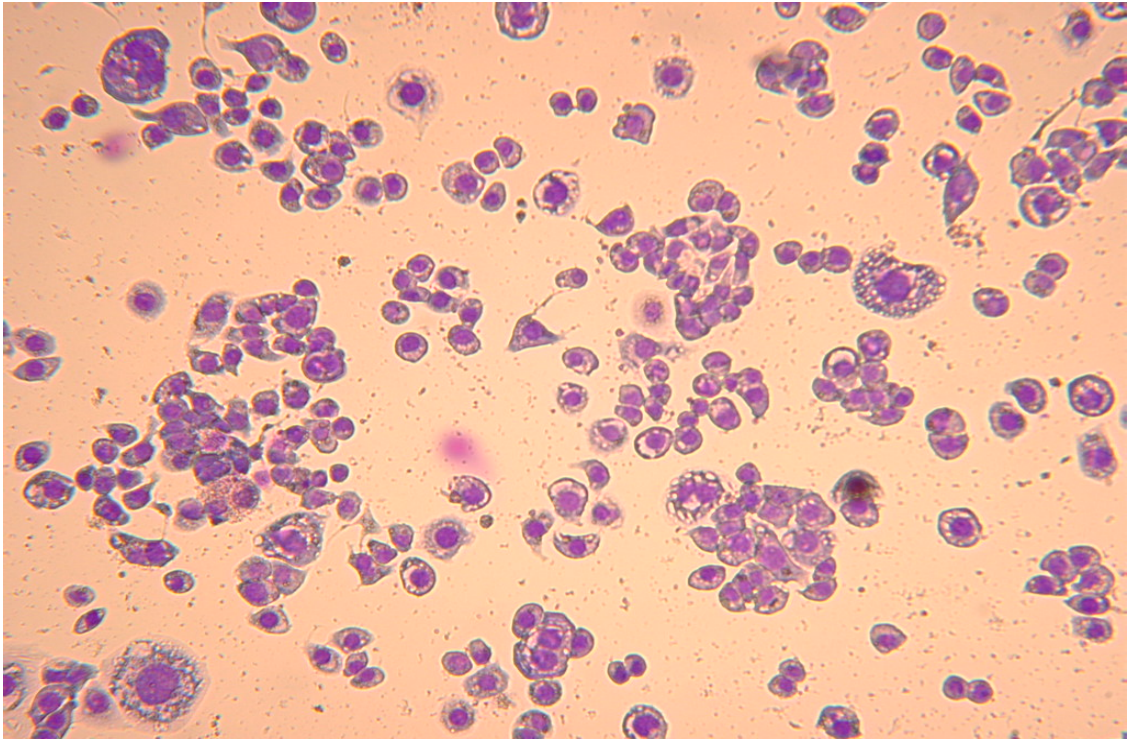
Optimalus ląstelių pasėlio tankis – 3×10^4 ląst./ml, persėjimo koeficientas 1:2 – 1:4. Ląstelės pasižymi labai greita proliferacija ir pilną monosluoksnį ląstelės suformuoja per 3 paras.



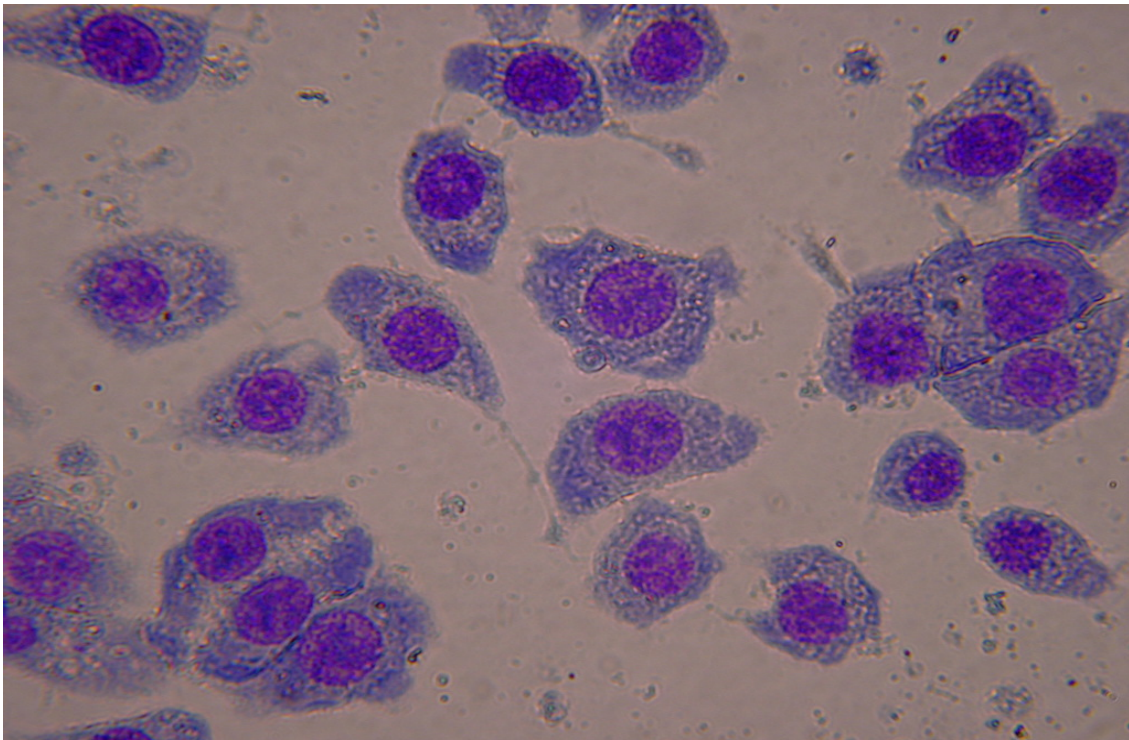
11 pav. Hep 22a ląstelių linijos 1 paros monosluoksnis (100X). Ląstelės dažytos klasikiniu Romanovskio metodu



12 pav. Hep 22a ląstelių linijos 1 paros monosluoksnis (400X). Ląstelės dažytos klasikiniu Romanovskio metodu



13 pav. Hep 22a ląstelių linijos 2 parų monosluoksnis (100X). Ląstelės dažytos klasikiniu Romanovskio metodu



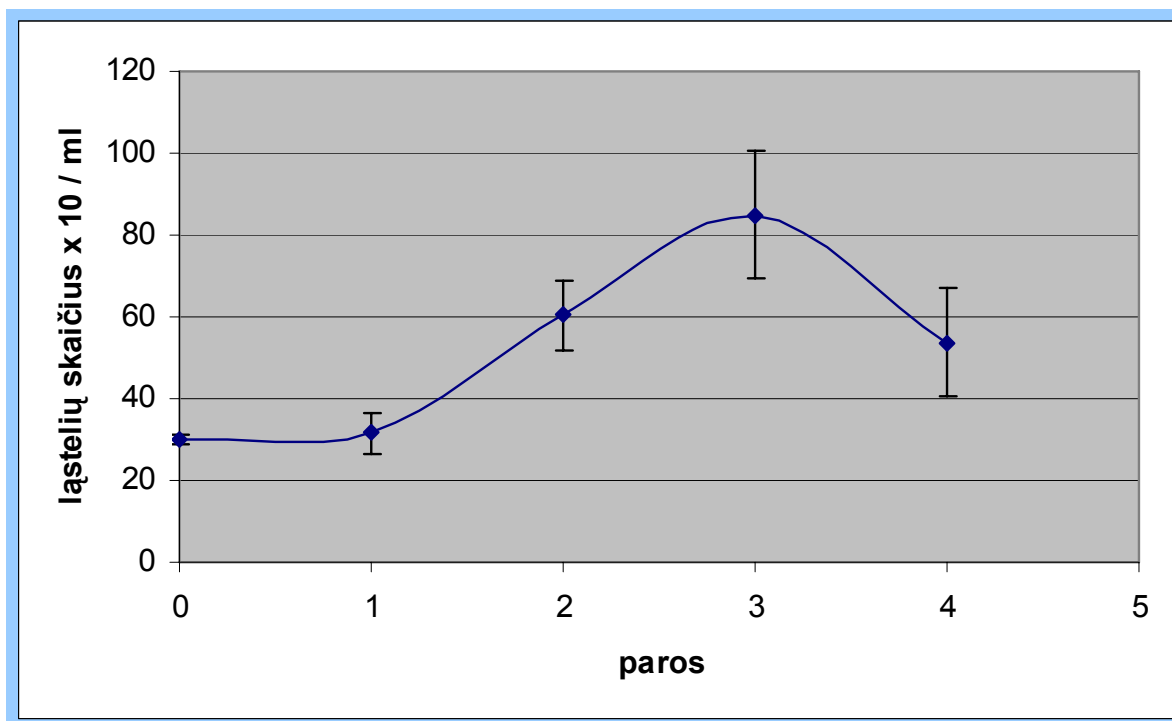
14 pav. Hep 22a ląstelių linijos 2 parų monosluoksnis (400X). Ląstelės dažytos klasikiniu Romanovskio metodu

4.2. Hep 22a ląstelių linijos augimo dinamika

Sekančiame tyrimo etape stebėjome ląstelių populiacijos augimo dinamiką. Sėjome ląsteles standartinėmis aprašytais sąlygomis ir kiekvieną parą skaičiavome ląstelių skaičių. Ląstelių pasėlio tankis 30000 ± 1000 ląst./ml. Statistiniam įvertinimui bandymą kartojome 3 kartus.

Norėdami sudaryti augimo kreivę, ląsteles auginome 4 paras. Kiekvieną parą buvo skaičiuojamas gyvų ląstelių kiekis ir sudaroma ląstelių augimo kreivė (15 pav.).

Pastebėjome, kad 1-ą parą ląstelių koncentracija praktiškai nepadidėjo arba kito nežymiai, 2 – ą parą ląstelės proliferavo aktyviausiai, augimo tempas buvo santykinai pastovus, o 3 – ą parą ląstelės pasiekė maksimumą ir jų pradėjo mažėti (1 lentelė). Greičiausiai taip atsitiko dėl to, kad trūksta maisto komponentų (mitybinės terpės), o taip pat užpildomas plotas ant kurio ląstelės yra prisitvirtinusios. Todėl, kai ląstelės nebeturi, kur plėstis ir pradeda žūti, jas būtina persėti.



15 pav. Hep 22a linijos ląstelių augimo dinamika

1 lentelė. Hep 22a ląstelių linijos augimo ir proliferacijos tyrimo rezultatai, visais atvejais $p < 0,05$

Paros	Ląstelių skaičius (vidurkis) ir standartinė paklaida / ml M ± m
1	31,66 ± 4,71
2	60,41 ± 8,28
3	85,00 ± 14,88
4	53,63 ± 13,80

4.3. Kvercetino, miricetino ir morino citotoksiškumas Hep 22a ląstelių linijai

Literatūrinėje apžvalgoje (2.2.) atkreipėme dėmesį, kad prooksidantinių savybių padidėjimas yra vienas iš svarbiausių transformuotos ląstelės požymių. Transformuotose ląstelėse žymiai išauga prooksidantinių fermentų aktyvumas, žinant laisvųjų radikalų vaidmenį proliferacijoje, išaugusį oksidacinį aktyvumą galima susieti su padidėjusiu proliferacinių transformuotų ląstelių aktyvumu.

Šiuolaikinėje chemoterapijoje naudojami įvairūs antioksidantai. Pastaraisiais metais atkreiptas dėmesys į tai, kad junginiai turintys savo struktūroje B žiede hidroksilo grupes pasižymi stipriomis antioksidantinėmis savybėmis. Tačiau, tam tikromis sąlygomis, tie patys junginiai tampa prooksidantais, ir prooksidantinėmis savybėmis, ir yra toksiški navikinėms ląstelėms.

Augalai nuo seniausių laikų yra vartojami įvairioms ligoms gydyti. Flavonoidai – tai augalinės kilmės junginiai, randami vaisiuose, daržovėse, arbatose, kurie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Sintetiniai antioksidantai polifenoliai labai plačiai naudojami maisto pramonėje kaip įvairūs priedai ir konservantai.

Mūsų darbo tikslas buvo ištirti flavonoidinių ir kitų polifenolinių antioksidantų citotoksiškumo aspektą – galimą jų prooksidantinio tipo citotoksiškumą, nes atitinkamos flavonoidų koncentracijos yra citotoksiškos, o citotoksiškumo mechanizmai, nors ir labai plačiai tyrinėjami visame pasaulyje, lieka neaiškūs.

Citotoksiškumas kiekybiškai buvo vertinamas po 24 val. auginimo (15 pav.). Kadangi Hep 22a ląstelių kiekis per 24 val augimo padidėja nežymiai, t.y. 15-25 %, laikoma, kad flavonoidų poveikis Hep 22a ląstelėms atspindi jų citotoksiškumą, bet ne augimo inhibiciją.

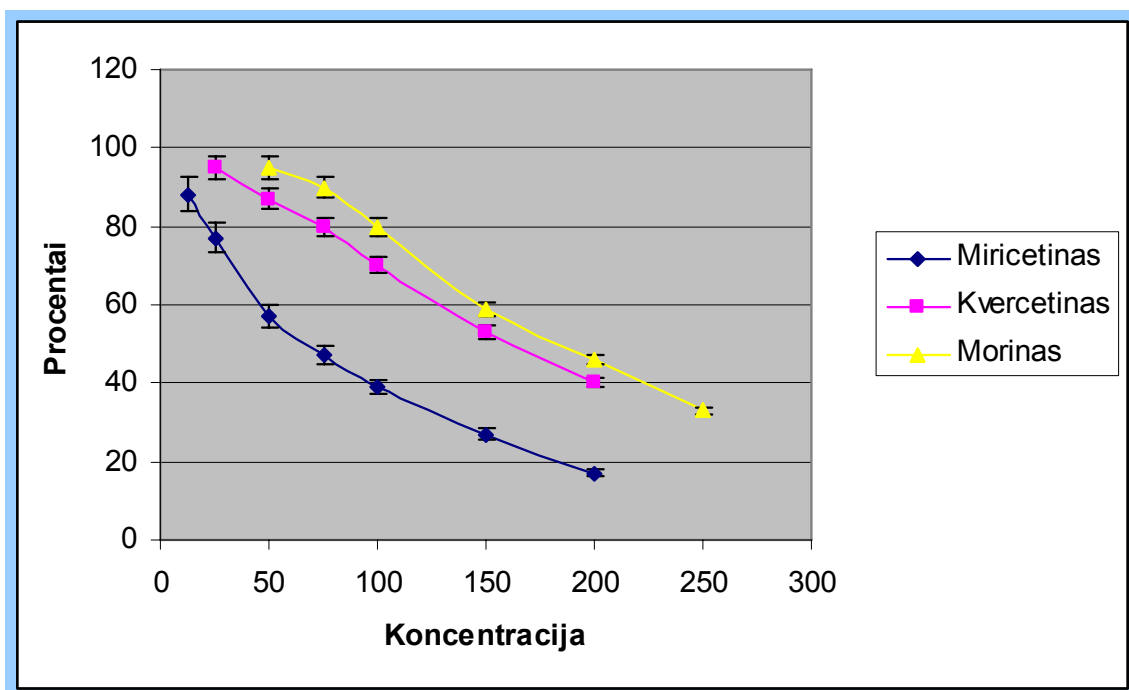
Ląstelių kontrolė – 100 %, o negyvų ląstelių visuose mėginiuose būdavo iki 1 %, todėl šio darbo statistikai įtakos nedaro.

Hep 22a linijos ląstelės buvo veikiamos skirtingos koncentracijos (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 150; 200 μ M) kvercetinu, morinu ir miricetinu (2 lentelė).

16 pav. duomenys rodo, kad 24 val. laikotarpiu kvercetino cL_{50} , t.y., koncentracija, sukianti 50 % ląstelių žūtį, lygi $157 \pm 7 \mu$ M, morino $cL_{50} = 190 \pm 15 \mu$ M, o miricetino $cL_{50} = 60 \pm 3 \mu$ M. Panaši citotoksiškumo tendencija – miricetinas > kvercetinas \geq morinas pastebėta ir FLK bei HL-60 ląstelėse [49].

2 lentelė. Kvercetino, miricetino ir morino citotoksinio poveikio Hep22 a ląstelių linijai tyrimas, visais atvejais $p < 0,05$

Junginiai arba medžiagos	Koncentracija (μ M)	Ląstelių gyvybingumas (procentais)
Kontrolė		98,02 \pm 1,98
Dimetilsulfoksidas (DMSO)		94,19 \pm 1,98
Kvercetinas	200 μ M	40,44 \pm 3,68
Kvercetinas	150 μ M	53,21 \pm 3,73
Kvercetinas	100 μ M	70,78 \pm 4,59
Kvercetinas	50 μ M	87,36 \pm 3,16
Kvercetinas	25 μ M	95,77 \pm 3,01
Miricetinas	200 μ M	17,29 \pm 2,13
Miricetinas	150 μ M	27,67 \pm 3,86
Miricetinas	100 μ M	39,45 \pm 3,86
Miricetinas	50 μ M	55,71 \pm 3,36
Miricetinas	25 μ M	77,78 \pm 4,14
Miricetinas	12,5 μ M	88,11 \pm 3,79
Miricetinas	6,25	95,32 \pm 3,49
Morinas	250 μ M	33,69 \pm 4,21
Morinas	200 μ M	46,99 \pm 4,42
Morinas	150 μ M	59,41 \pm 3,53
Morinas	100 μ M	80,54 \pm 3,91
Morinas	50 μ M	90,39 \pm 4,11
Morinas	25 μ M	95,52 \pm 3,57

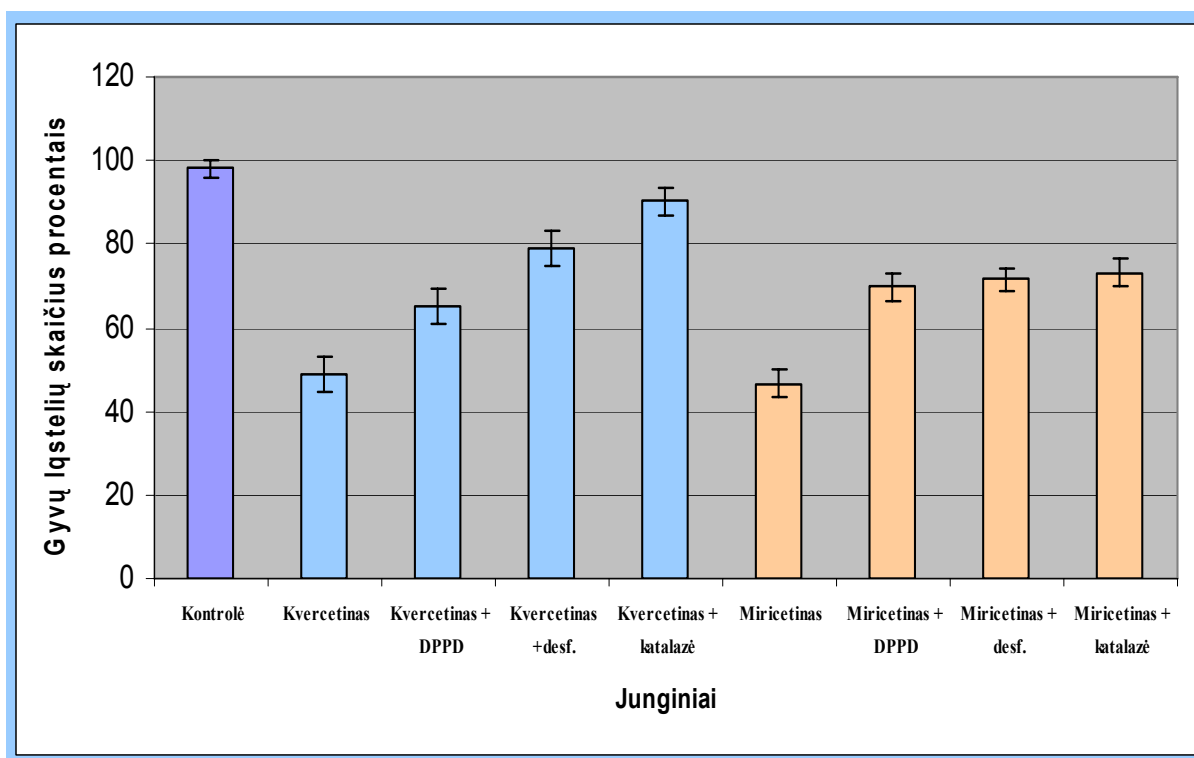


16 pav. Kvercetino, miricetino ir morino citotoksiškumo nustatymas

Sekančiame darbo etape ištirtas antioksidantų poveikis kvercetino ir miricetino citotoksiškumui. Nustatyta, kad DPPD, desferoksaminas ir katalazė statistiškai patikimai mažina šių flavonoidų citotoksiškumą (3 lentelė).

3 lentelė. Antioksidantų įtaka flavonoidų citotoksiškumui, n ≥ 3, visais atvejais p < 0,05

Junginiai arba medžiagos	Gyvų ląstelių skaičius procentais (vidurkis)
Kontrolė	98,32 ± 1,68
Kvercetas, 160 μM	48,65 ± 4,23
Kvercetas, 160 μM + DPPD, 2,5 μM	65,32 ± 4,23
Kvercetas, 160 μM + desferoksaminas, 300 μM	78,92 ± 4,32
Kvercetas, 160 μM + katalazė, 100 vien/ml	90,34 ± 3,40
Miricetinas, 60 μM	46,64 ± 3,41
Miricetinas, 60 μM + DPPD, 2,5 μM	69,67 ± 3,47
Miricetinas, 60 μM + desferoksaminas, 300 μM	71,68 ± 2,65
Miricetinas, 60 μM + katalazė, 100 vien/ml	73,24 ± 3,25



17 pav. 2 μ M DPPD, 300 μ M desferoksamino ir 100 vien/ml katalazės poveikis polifenolių citotoksiškumui. Hep 22a ląstelių gyvybingumas flavonoidų poveikyje pagal tripano mėlio įjungimą

Tai rodo, kad analogiškai FLK ir HL-60 ląstelių atveju, flavonoidų citotoksiškumas hepatomoje irgi yra prooksidantinis.

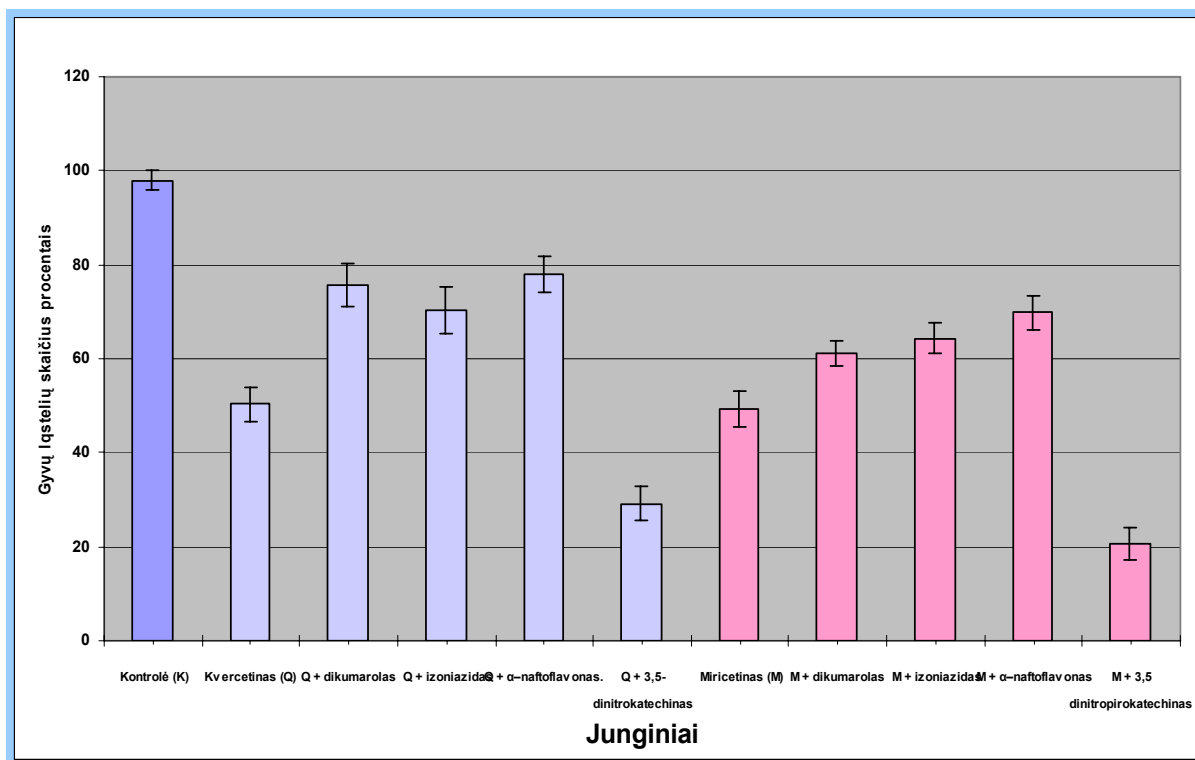
Ląstelių skaičiaus padidėjimą nulėmė aktyvuotųjų deguonies formų poveikio neutralizavimas.

Galima padaryti išvadą, kad tirtų flavonoidų citotoksiškumo mechanizmas yra prooksidantinis, nes procesą apsaugoja antioksidantai DPPD ir desferoksaminas.

Kadangi kepenų ląstelėse paprastai yra daug DT-diaforazės ir citochromų P-450, buvo ištirtas ir šių fermentų inhibitorių poveikis flavonoidų citotoksiškumui hepatomoje. Buvo tirti dikumarolas – DT-diaforazės inhibitorius, α -naftoflavonas – citochromo P-450 1A1/1A2 inhibitorius, izoniazidas – citochromo P-450 2E1 inhibitorius. Duomenys pateikti 4 lentelėje rodo, kad šie junginiai statistiškai patikimai apsaugo nuo flavonoidų citotoksiškumo. Be to, katechol-o-metiltransferazės inhibitorius 3,5-dinitropirokatechinas statistiškai patikimai didina flavonoidų citotoksiškumą.

4 lentelė. Fermentų inhibitorių įtaka flavonoidų citotoksiškumui, $n \geq 3$, visais atvejais $p < 0,05$

Junginiai arba medžiagos	Gyvų ląstelių skaičius procentais (vidurkis)
Kontrolė	97,93 ± 2,07
Kvercetas (160 μM)	50,32 ± 3,66
Kvercetas, (160 μM) + dikumarolas (20 μM)	75,65 ± 4,29
Kvercetas, (160 μM) + α-naftoflavonas (5 μM)	77,65 ± 4,36
Kvercetas, (160 μM) + izoniazidas (1 mM)	70,32 ± 4
Kvercetas, (160 μM) + 3,5-dinitropirokatechinas (5 μM)	29,15 ± 3,65
Miricetas (60 μM)	49,56 ± 3,99
Miricetas, (60 μM) + dikumarolas (20 μM)	61,54 ± 5,6
Miricetas (60 μM) + α-naftoflavonas (5 μM)	69,97 ± 4,36
Miricetas (60 μM) + izoniazidas (1 mM)	64,47 ± 4,18
Miricetas (60 μM) + 3,5-dinitropirokatechinas (5 μM)	20,65 ± 3,54



18 pav. Fermentų inhibitorių įtaka flavonoidų citotoksiškumui, $n = 3$, visais atvejais $p < 0,05$

DT-diaforazės vaidmens mechanizmas flavonoidų ir kitų polifenolių citotoksiškume nėra aiškus, nes jos inhibitorius dikumarolas mažina kvercetino citotoksiškumą FLK ląstelėse, neveikia p-metoksifenolio citotoksiškumo [49], bet didina 5,8-dihidroksikumarino citotoksiškumą [50]. Antra vertus, citochromų P-450 ir COMT inhibitorių poveikis flavonoidų citotoksiškumui hepatomoje yra analogiškas duomenims, gautiems su FLK ląstelėmis. Kvercetas ir miricetas nėra citochromų P-450 substratai, tačiau COMT efektyviai metilina šių junginių B-žiedo hidroksilus. Todėl šio fermento poveikyje susidaro sunkiau besioksiduojantys flavonoidų produktai, t.y., turi sumažėti prooksidantinis jų toksiškumas. Todėl šio fermento inhibicija didina flavonoidų citotoksiškumą. Citochromai P-450 gali demetilinti kvercetino ir miricetino metilinimo produktus, t.y., regeneruoti jų pradines formas, kurios toliau lengvai oksiduojasi, t.y., didinti jų prooksidantinį citotoksiškumą. Todėl šių fermentų inhibicija mažina flavonoidų citotoksiškumą.

4.4 Apoptozės indukcijos tyrimas flavonoidų poveikyje.

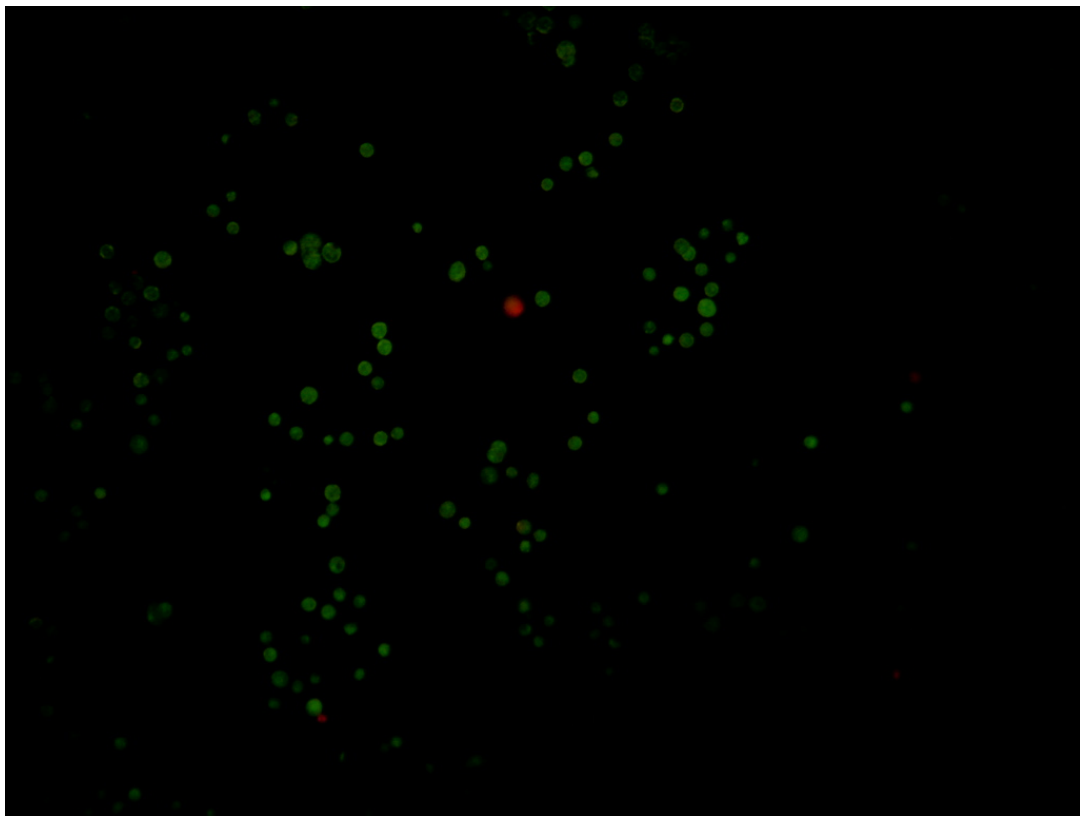
Paskutiniame darbo etape buvo tirta prooksidacinio apoptozės sukėlimo mechanizmo galimybė, veikiant hepatomą flavonoidais.

Po 24 val. poveikio, stiklelius su ląstelių monoslukšniu plovėme fosfatiniu buferiniu tirpalu ir dažėme akridino oranžiniu ir etidžio bromidu (AO/EB) ir analizavome liuminiscenciniu mikroskopu. Preparatuose skaičiuotos gyvos, apoptotinės ir nekrotinės ląstelės (19 pav.).

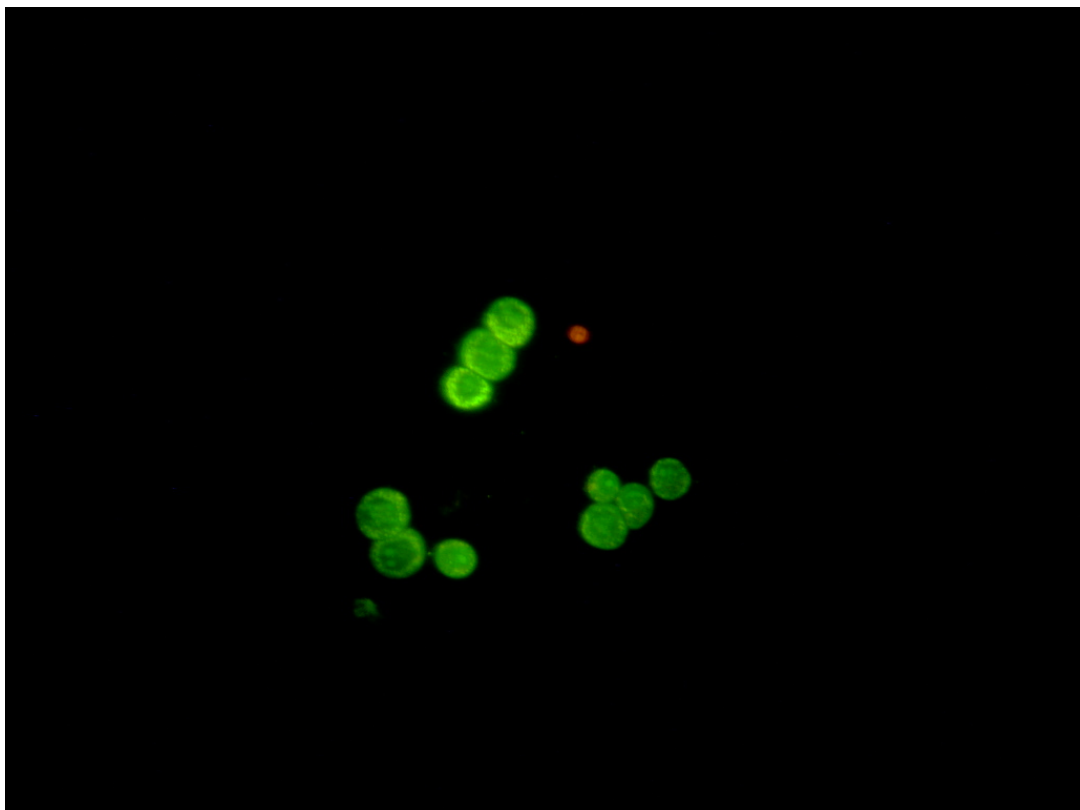
Stebėjome, kad 24 val. inkubuojant hepatomos ląsteles su junginių koncentracijomis atitinkančiomis cL_{50} , t.y. 160 μ M kvercetino ar 60 μ M miricetino, gyvų ląstelių frakcijose rastas apoptotinių ląstelių kiekis siekė 30 % (20 pav.).

Vadinasi abu flavonoidai patikimai indukuoja apoptozę. Pastebėjome, kad miricetino koncentracija, sukelianti apoptozę 30 % ląstelių buvo mažesnė, vadinasi šis junginys sukelia apoptozę stipriau. Nuotraukoje (21 pav.) matome, kad hepatomos ląstelėse, veikiant 160 μ M kvercetino, atsiranda nemažai apoptotinių ląstelių.

Antioksidanto DPPD poveikis labai sumažino apoptotinių ląstelių skaičių. Tą patį stebėjome ir įvedus desferoksamina. Todėl galima teigti, kad apoptozės sukėlimui šių junginių poveikyje turi įtakos oksidacinis stresas (5 lentelė).



A 1 2

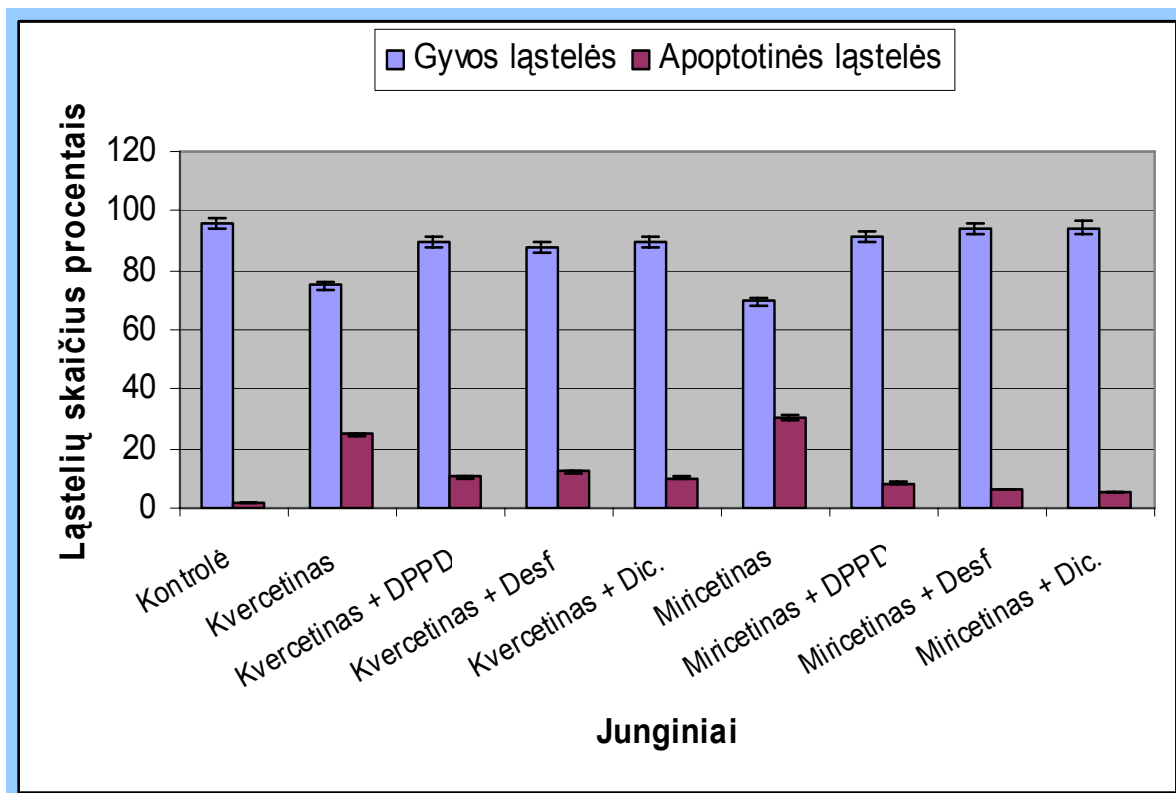


B 1

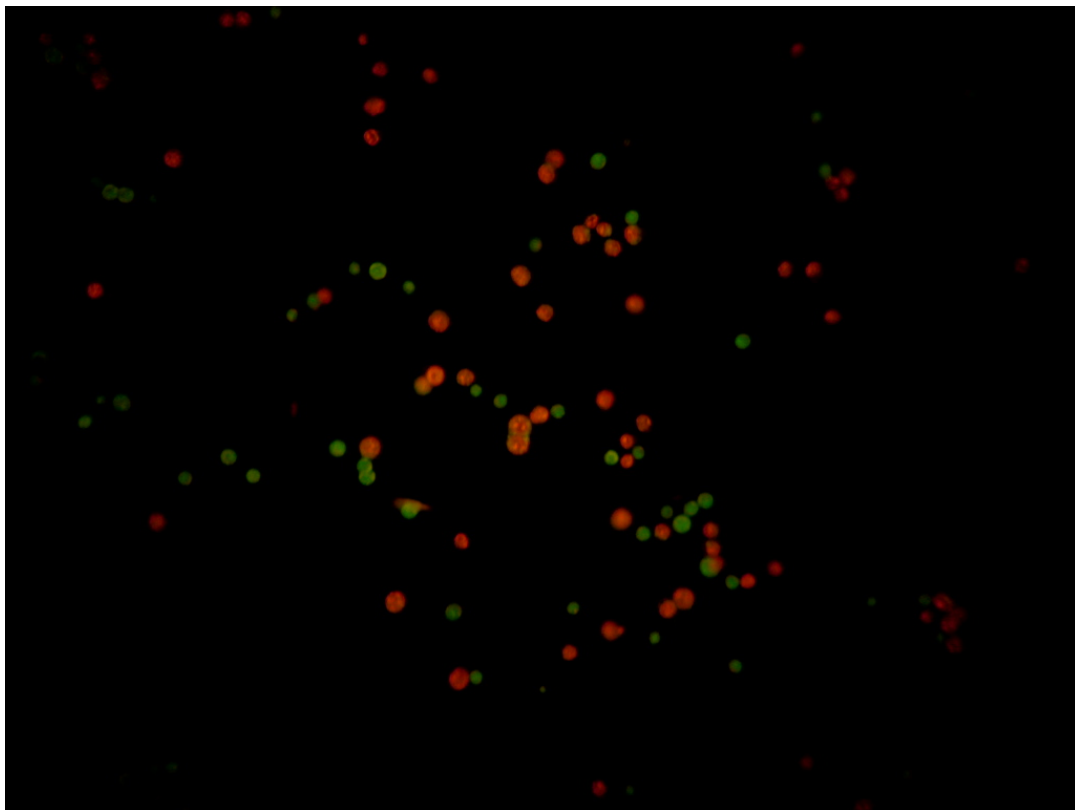
19 pav. Hep 22a ląstelių linijos monosluoksnis (kontrolė) po nusidažymo akridino oranžiniu ir etidžio bromidu . A - (100x); B – (400x). 1 – gyva ląstelė, 2 – apoptotinė

5 lentelė. Flavonoidų sukelta Hep 22a ląstelių apoptozė: antioksidantinis poveikis, visais atvejais $p < 0,05$

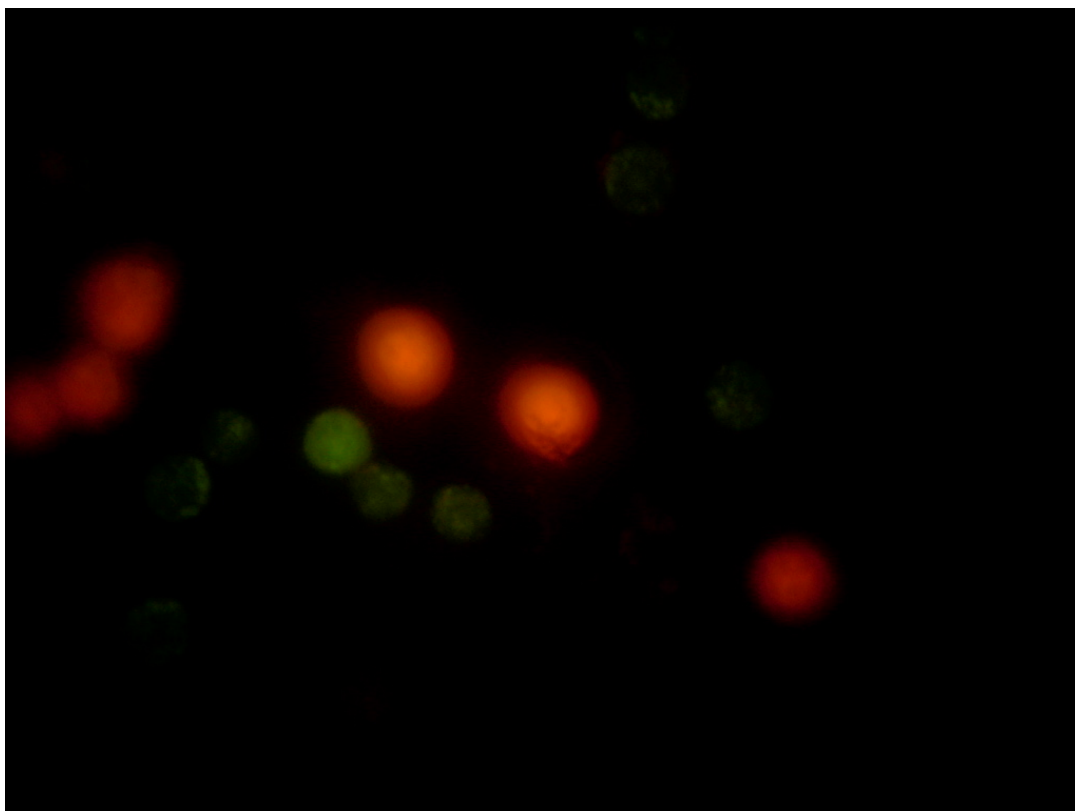
Medžiagos arba junginiai	Ląstelių skaičius procentais (vidurkis)	
	Gyvos ląstelės	Apoptotinės ląstelės
Kontrolė	95,92 ± 2,12	2 ± 1,01
Kvercetas	75,00 ± 3,44	24,75 ± 3,68
Kvercetas + DPPD	89,25 ± 1,11	10,50 ± 1,26
Kvercetas + Desf	87,66 ± 0,49	12,33 ± 0,49
Kvercetas + Dic.	89,75 ± 1,31	10,25 ± 1,31
Miricetas	69,50 ± 2,19	30,33 ± 2,30
Miricetas + DPPD	91,00 ± 1,29	8,50 ± 1,71
Miricetas + Desf	94,00 ± 2,58	6,00 ± 2,58
Miricetas + Dic.	94,40 ± 0,51	5,60 ± 0,51



20 pav. Kvercetino (160 μ M) ir miricetino (60 μ M) sukelta Hep 22a ląstelių apoptozė: antioksidantinis poveikis



A 1 2



B 1 2

21 pav. Hep 22a linijos ląstelės po kvercetino (160 μ M) poveikio. Kvercetino sukelta apoptozė. A - (100x); B - (400x). 1 – gyva ląstelė, 2 – apoptotinė.

Analogiškame eksperimente dikumarolas ženkliai sumažino apoptotinių ląstelių skaičių. Tai įrodo, kad apoptozės indukcijai reikšmės turi ne tik oksidacinis stresas, bet ir fermento DT – diaforazės veikla. DT-diaforazė nepriklauso nei antioksidantinėms nei prooksidantinėms ląstelės sistemos fermentams, bet ji aktyvuoja kai kuriuos priešvėžinius preparatus ir vykdo dvielektroninę redukciją.

5. APIBENDRINIMAS

Ląstelės metabolizme svarbų vaidmenį vaidina oksidacijos – redukcijos reakcijos, kuriose deguonis yra elektronų akceptorius. Įvairių cheminių reakcijų metu gali susidaryti ir aktyviosios deguonies formos – superoksido anijonas, vandenilio peroksidas, hidroksilo radikalas, singletinis deguonis, kurios pažeidžia įvairias biomolekules.

Augalai nuo seniausių laikų yra vartojami įvairioms ligoms gydyti. Flavonoidai – tai augalinės kilmės junginiai, randami vaisiuose, daržovėse arbatose, kurie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Sintetiniai antioksidantai polifenoliai labai plačiai naudojami maisto pramonėje, kaip įvairūs priedai ir konservantai. Vienas jų - kvercetas. Kverceto antioksidacinis poveikis priklauso nuo to, kad jis reaguoja su laisvaisiais radikalais, sudarydamas fenoksidalus, kurie yra ne tokie aktyvūs. Tačiau aukštos kverceto koncentracijos yra citotoksiškos, o citotoksiškumo mechanizmai, nors ir labai plačiai tyrinėjami visame pasaulyje, lieka neaiškūs.

Mūsų darbo tikslas ir buvo ištirti kverceto ir kitų flavonoidų poveikį Hep 22a linijos ląstelėms.

Hep 22a ląstelių linija pasirinkta neatsitiktinai. Tai pelių hepatomos ląstelių kultūra, kuri pasižymi navikinėmis ląstelėms būdingomis savybėmis – neribota proliferacija ir ląstelių migracija. Vyrauja epitelinio tipo ląstelės, kurias persėjus po oda susidaro navikai. Ląstelės gerai auga tiek *in vivo*, tiek *in vitro*. Ląstelės pailgos, prisitvirtinusios prie substrato, sudaro monosluoksnį.

Tirtų flavonoidų citotoksiškumo mechanizmas yra prooksidacinis, nes nuo citotoksiškumo apsaugojo procesą apsaugojo antioksidantas DPPD, desferoksaminas ir antioksidatorinis fermentas katalazė.

DPPD ir Desf įvedimas patikimai padidino ląstelių skaičių. Dikumarolo - DT – diaforazės inhibitoriaus įvedimas į kultūrinę aplinką taip pat padidino ląstelių skaičių.

Citochromų P-450 inhibitorių α -naftoflavono ir izoniazido, bei katechol-o-metiltransferazės (COMT) inhibitoriaus 3,5-dinitropirokatechino poveikis rodo, kad COMT

metilina kvercetiną ir miricetiną, tuo mažindama jų citotoksiškumą hepatomoje. Citochromai P-450 demetilina metilinimo produktus, tuo didindami flavonoidų citotoksiškumą. DT-diaforazė didina kvercetino ir miricetino citotoksiškumą hepatomoje, tačiau šio reiškinio mechanizmas nėra aiškus.

Sekančiame darbo etape nustatėme, kad abi medžiagos (kvercetas ir miricetas) patikimai indukuoja apoptozę.

DPPD ir desferoksamino poveikis rodo, kad tam įtakos turėjo oksidacinis stresas. Analogiškame eksperimente dikumarolas taip pat sumažino apoptotinių ląstelių skaičių. Tai įrodo, kad apoptozės indukcijai reikšmės turi ne tik oksidacinis stresas, bet ir fermento DT – diaforazės veikla.

6. IŠVADOS

1. Kvercetino cL_{50} (koncentracija, sukianti apie 50 % Hep 22a linijos ląstelių žuvimą) yra $157 \pm 7 \mu M$, morino $cL_{50} = 190 \pm 15 \mu M$, o miricetino $cL_{50} = 60 \pm 3 \mu M$.
2. Tirtų flavonoidų citotoksiškumo mechanizmas yra prooksidantinis, nes nuo citotoksiškumo procesą apsaugojo antioksidantas DPPD, desferoksaminas ir fermentas katalazė.
3. Citochromų P-450 inhibitorių α -naftoflavono ir izoniazido, bei katechol-o-metiltransferazės (COMT) inhibitoriaus 3,5-dinitropirotechino poveikis rodo, kad COMT metilina kvercetiną ir miricetiną, tuo mažindama jų citotoksiškumą hepatomoje. Citochromai P-450 demetilina metilinimo produktus, tuo didindami flavonoidų citotoksiškumą. DT-diaforazė didina kvercetino ir miricetino citotoksiškumą hepatomoje, tačiau šio reiškinio mechanizmas nėra aiškus.
4. Nustatyta, kad kvercetino ir miricetino sukelta apoptozė Hep 22a linijos ląstelėse yra prooksidantinio pobūdžio. Apoptozės indukcijai reikšmės turi ne tik oksidacinis stresas, bet ir fermento DT-diaforazės veikla.

7. ABSTRACT

Flavonoids are widely distributed in edible plants, and considered to be dietary antioxidants. Flavonoids can protect cell from „oxidative stress“, but the same flavonoids compound could behave as both antioxidant and prooxidants, depending on concentration and free radical source. Among the flavonoids, quercetin is one of the most widely studied flavonoids and had biological, pharmacological, and medicinal properties. Besides the chemopreventive effects, other biological function of quercetin are believed to improve antioxidant defence systems in living organisms.

The aim of this work was to analyse the effects of flavonoids (quercetin, myricetin and morin) in Hep 22a cells.

Materials and methods:

- **Cell culture cytotoxicity studies;**

Flavonoids and the other components were obtained from Sigma, and used as received.

- **Study with fluorescence microscope**
- **Statistical analysis**

Results and discussion:

Hep 22a cell line is the a mouse hepatoma cell line, which is posses of unlimited proliferation and migration features.

Quercetin concentration for 50 % death of Hep 22a cells (cL₅₀) was 160 µM, myricetin concentration was 60 µM, and morin concentration was 190 µM,.

The citotoxicity of flavonoids in Hep 22a cells was partly inhibited by catalase, by the antioxidant *N,N'*-diphenyl-*p*-phenylene diamine DPPD, desferrioxamine and by dicumarol, an inhibitor of DT-diaphorase thus showing its prooxidant character.

Inhibitors of cytochromes P-450, α -naphthoflavone and izoniazide, decreased the cytotoxicity of flavonoids, whereas 3,5-dinitrocatechol, an inhibitor of catechol-*o*-methyltransferase (COMT), increase it.

Next, we examined the effects of the antioxidant on cytotoxicity and apoptosis induction. Quercetin is a dietary anticancer chemical that is capable of inducing apoptosis in tumor cells. We also investigated the effects of quercetin and myricetin on apoptosis of Hep 22a cells. Quercetin and myricetin induced apoptosis in 30 % of cells.

The antioxidant *N,N'*-diphenyl-*p*-phenylene diamine DPPD, desferrioxamine and the inhibitor of NQ01 by dicumarol, protect against apoptosis induction by all compounds of investigation, but to a different extent. This shows that for all compounds investigated, there exists a common apoptosis and cytotoxicity mechanism, oxidative stress.

Šis eksperimentinis darbas yra mano magistrantūros studijas apibūdinantis rezultatas, atspindintis, ką Medicinos fakulteto vadovų – profesorių ir dėstytojų dėka bei rūpesčiu išmokau, sužinojau ir patyriau.

Širdingai dėkoju pagrindinei vadovei dr. Aušrai Nemeikaitei – Čėnienei už didelį dėmesį ir rūpestį, dr. Narimantui Čėnui, pateikusiam vertingų pastabų, vadovei dr. Aldonai Dringelienei už nuoširdžią pagalbą.

Dėkoju Virginijai Bukelskienei ir Daivai Baltrukienei už konsultacijas ir eksperimentinę medžiagą ir daugeliui kitų už galimybę rengti šį darbą, sudariusiems sąlygas eksperimentams ir jų apibendrinimui.

Prisipažinsiu, jo rengimas ir gynimas yra svarbus įvykis mano gyvenime. Jūsų man suteiktas mokslo žinias ir pasitikėjimą stengsiuosi pateisinti nuoširdžiu ir kvalifikuotu darbu.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aravind L., Dixit V. M., Koonin E. V. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science*. 2000; 291(5507): 1279-1284.
2. Arthur J. R. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci*. 2000; 57 (13-14): 1825-1835.
3. Arts I. C. van de Putte B. Hollman P. C. Catechin contents of food commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric food Chem*. 2000; 48: p.1746-1751.
4. Arts I. C. van de Putte B. Hollman P. C. Catechin contents of food commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *Agric food Chem*. 2000; 48: 1752-1757.
5. Bergamini C. M. Gambetti S., Dondi A., Cervelati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr. Pharm. Des*. 2004; 10 (14): 1611-1626.
6. Black H. S., Pro-oxidant and antioxidant mechanisms of BHT and β carotene in photocarcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*. 2002; 7: 1044-1055.
7. Bounous G., Molson J. H. The antioxidant system. *Anticancer Res*. 2003; 23 (2B): 1411-1415.
8. Bredesen D. E. CD 47 and dead signaling in the immune system. *Apoptosis*. 2000: 299-306.
9. Cerutti P. A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*. 1994; 344 (8926): 862-863.
10. Cerutti P. A. Prooxidant states and tumor promotion. *Science*. 1985; 227: 375-381.
11. Chopra M., Fitzsimons P. E., Strain J. J., Thurnham D. J., Howard A. N. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentration. *Clin. Chem*. 2000; 46: 1162-1170.
12. Černiauskiene L. R. Antioksidantiniai vitaminai E ir A: epidemiologiniai, klinikiniai ir eksperimentiniai tyrimai. Kaunas, 1994: 93.
13. Das U. N. A radical approach to cancer. *Med. Sci. Monit*. 2002; 8: 79-92.
14. Das U. N. Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 1999; 61 (3): 157-163 .
15. Dičkancaitė E., Nemeikaitė A., Karvelytė A., Čėnas N. Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: structure-activity relationships. *Biochem. Mol. Biol. Int*. 1998; 45: 923-930.
16. Dupui C., Virion A., Ohayon R. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalysed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J. Biol. Chem*. 1991; 266: 3739-3745.

17. Emanuel N. M. Kinetics and free radical mechanisms of aging and carcinogenesis. Age-related factors to carcinogenesis. - Lyon, IARC Sci. Publ. 1985: 127 – 150.
18. Emanuel N. M., Lipchina L. P. Leukemia in mice and main features of its development under the action of inhibitors of chain oxidative processes. Dokl. AN SSSR. 1958; 121: 141-144 (rus).
19. Erlund I. Review on the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 2004, 24, p.851-874.
20. Fang Y. Z., Yang S., Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 2002; 18 (10): 872-879.
21. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1983; 23: 239-257.
22. Goyal L. Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell*. 2001; 104(6): 805-808.
23. Greenwald E.R. Cancer chemoprevention. *B. M. J.* 2002; 324 (7339): 714-718.
24. Greenwald P. Cancer chemoprevention. *B. M. J.* 2002; 324 (97339): 217-230.
25. Griffiths L. A., Barrow A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem.* 1972; 130: 1161-1162.
26. Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathway of apoptosis. *Life Sci.* 2001; 69: 2957-2964.
27. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407: 770.-776.
28. Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Katan M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly used in the Netherlands. *J. Agric food Chem.* 1992; 40: 2379-2383.
29. Hristozov D., Gadjeva V., Vlaykova T., Dimitrov G. Evaluation of oxidative stress in patients with cancer. *Arch. Physiol. Biochem.* 2001; 109 (4): 331-336.
30. Yaoita H., Ogawa K., Maehara Y., Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45: 630-641.
31. Katsoulis K., Kontakiotis T., Leonardopoulos I., Kotsoyili A., Legakis I. N., Patakas D. Serum total antioxidant status in severe exacerbation of asthma: correlation with severity of the disease. *J. Asthma.* 2003; 40 (8): 947-854.
32. Kazakevičius R. V., Janulevičiūtė N. M., Ročka V. S. Oksidacinis stresas ir patologiniai procesai. *Laboratorinė medicina.* 2002; 1 (13): 37-12.
33. Kerr J. F. R., Wulie A. H., Curie A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972; 29; 239-257.
34. Kroemer G., Reed J. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 2000; 6: 513-519.

35. Kučinskienė Z. Laisvaradikalinė oksidacija, antioksidantinė gynyba ir ligos. *Laboratorinė medicina*, 2001; 1 (9): 31-37.
36. Lamson D. W., Brignall M. S. Antioksidantai in cancer therapy; their action and interaction with oncologic therapies. *Altern. Med. Rev.* 1999; 4 (5): 152-163.
37. Lamson D. W., Brignall M. S. Antioxidants and cancer therapy II: quick reference guide. *Altern. Med. Rev.* 2000; 5 (2): 152-163.
38. Lesauskaitė V., Ivanovienė L., Programuota ląstelių mirtis: molekuliniai mechanizmai ir jų nustatymo metodai. *Medicina*. 2002; 38 (9): 969-75.
39. Liggins J., Bluck L. J., Runswick S., Atkinson C., Coward W. A., Bingham S. A. Daidzen and gastein contents of vegetables. *Br. J. Nutr.* 2000; 84: 717-725.
40. Maly F. E. The B lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Rad. Res. Commun.* 1990; 8: 143-148.
41. Marnett L. J. Lipid peroxidation – DNA damage by malonaldehyde. *Mutat. Res.* 1999; 424 (1-2): 83-95.
42. Marnett L. J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21 (3): 361-370.
43. Martin S.J., Green D.R. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell*. 1995; 82: 346-352.
44. Miyamoto Y., Koh Y. H., Park Y. S., Fujiwara N., Sakiyama H., Misonou Y., Okawara T., Suzuki T., Honke K., Taniguchi N. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive response. *Bioch. Chem.* 2003; 384 (4): 567-574.
45. Miodini P., Fioravanti L., Di Fronzo G., Cappelletti V. The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *Br. J. Cancer*. 1999; 80 (8): 1150-1155.
46. Murell G. A. C., Francis M. J. O., Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem.* 1990; 265: 659-665.
47. Navis I., Sriganth P., Premalatha B. Dietary curcumin with cisplatin administration modulates tumour marker indices in experimental fibrosarcoma. *Pharmacol. Res.* 1999; 39 (3): 175-179.
48. Nemeikaitė-Čėnienė A., Dringelienė A., Šarlauskas J., Narimantas Č. Role of NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO) in apoptosis induction by aziridinylnbenzoquinones RH and MeDZQ. *Acta Biochem. Pol.* 2005; 52 (4): 937-941.
49. Nemeikaitė-Čėnienė A., Imbrasaitė A., Sergėdienė E., Čėnas N. Quantitative structure-activity relationships in prooxidant cytotoxicity of polyphenols: Role of potential of phenoxy radical/phenol redox couple. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005; 441: 182-190.

50. Nemeikaitė-Čėnienė A., Marozienė A., Pukalskas A., Venskutonis P. R., Čėnas N. Redox properties of novel antioxidant 5,8-Dihydroxycoumarin: implications for its prooxidant cytotoxicity. *Z. Naturforsch.* 2005; 60 (11-12): 849-854.
51. Oberley L. W. Anticancer therapy by expression of superoxide dismutase. *Antiox. Redox Signaling.* 2001; 3 (30): 461-472.
52. Oberley T. D. Oxidative damage and cancer. *Am. J. Pathol.* 2002; 160 (2): 403-408.
53. Oikawa S., Furukawa A., Asada H., Hirakawa K., Kawanishi S. Catechins induce oxidative damage to cellular and isolated DNA through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic. Res.* 2003; 37 (8): 881-890.
54. Park E. J., Pezzuto J. M., Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metast. Rev.* 2002; 21 (3-4): 231-255.
55. Pereira M. A., Grubbs C. J., Barnes L. H., Ji H., Olson G. R., Eto I. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 1305-1311.
56. Perez-Vizcaino F., Ibarra M., Cogolludo A. L., Duarte J., Zaragoza-Arnez F., Moreno L. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance resistance arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 302: 66-72.
57. Policastro L., Molinari B., Lancher F., Blanco P., Podhajcer O. L., Costa C. S., Rojas P., Duran H. Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide. *Mol. Carcinogen.* 2004; 39: 103-113.
58. Praškevičius A., Ivanovienė L., Stasiūnienė N., Burneckienė J., Rodovičius H., Lukoševičius L., Kondrotas D. *Biochemija.* Kaunas: KMU leidykla. 2003: 174; 195; 432.
59. Sergedienė E., Jónsson K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Rietjens I. M. C. M., Čėnas N. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidant to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Lett.* 1999; 462: 392-396.
60. Shaughnessy S. G., Whaley M., Lafrenie R. M., Orr F. W. Walker 256 tumor cell degradation of extracellular matrices involved a latent gelatinase activated by reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 304: 314-321.
61. Slee E.A., Hartle M.T., Kluck R.M. Ordering the cytochrome c initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999; 144: 281-92.

62. Tobatabaie t., Vasquez Weldon A., Moore D. R., Katake Y. Free radicals and the pathogenesis of type I diabetes, beta-cell cytokine-mediated free radicals generation *via* cyclooxygenase-2. *Diabetes*. 2003; 6 97 0: 1130-1137.
63. Tolnai S., Morgan J. F. Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids. VII. Effect of acid-fatty acid salts. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1966; 44 (6): 979-981.
64. Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism and function of Coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1660 (1-2): 171-179.
65. Vinceti M., Rovesti S., Bergomi M., Vivoli G. The epidemiology of selenium and human cancer. *Tumori*. 2000; 86 (2): 105-118.
66. Vladimirov J. A. Free radicals and antioxidant. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk*. 1998; 7: 105-118. (rus).
67. Whiteman M., Hoper D. C., Scott G. S., Koprowski H., Halliwell b. Inhibition of hypochlorous acid – induced cellular toxicity by nitrite. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99 (19): 12061-12066.
68. Wijasman J. H., Jonker R.R., Ketjzer R. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem*. 1993; 41: 7-12.
69. Wu M., Ding H. F., Fisher D. E., Apoptosis: Molecular mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*. London. Nature Publishing Group. 2001.
70. Zi X., Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implication for prostatic cancer intervention. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96 (13): 7490-7495.
71. Zvitrovsky B., KMroemer G., Apoptosis and genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2004; 5: 752-762.