

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**RASA JARAŠIENĖ - BURINSKAJA**

**MOLEKULINIAI CHINONŲ IR POLIFENOLIŲ SUKELTOS PELĖS  
HEPATOMOS LĄSTELIŲ ŽŪTIES MECHANIZMAI**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04P)

Vilnius, 2018

Disertacija rengta 2010-2014 m. Vilniaus universiteto Biochemijos institute.

Disertacija ginama eksternu.

**Mokslinis konsultantas**

habil. dr. Narimantas Čėnas (Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras,  
Biochemijos institutas; fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

## TURINYS

SANTRUMPOS.....	6
ĮVADAS .....	8
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA .....	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	15
1.1. Vėžys ir jo gydymo strategijos.....	15
1.2. Signalų perdavimas organizme .....	17
1.2.1. Mitogenų aktyvinamų baltymų kinazių perduodami signalai ląstelėje .....	17
1.2.1.1. ERK1/2 signalinis kelias .....	19
1.2.1.2. JNK1/2 signalinis kelias .....	20
1.2.1.3. p38 signalinis kelias.....	21
1.2.2. Streso aktyvinamos baltymų kinazės ir jų vaidmuo oksidacinio streso metu .....	22
1.3. Transkripcijos faktorius p53 .....	23
1.4. Ląstelių žūtis .....	25
1.4.1. Apoptozė .....	25
1.4.2. Nekrozė .....	27
1.4.3. Autofagija .....	29
1.5. Oksidacinio streso ir kitų bioredukcinių reiškinių vaidmuo priešvėžinės chemoterapijos procese.....	30
1.6. Chinoniniai junginiai ir jų citotoksiškumo mechanizmai .....	31
1.6.1. Vienelektroninė fermentinė chinonų redukcija, ROS susidarymas ir jų citotoksinis poveikis .....	33
1.6.2. Dvielektroninė chinonų fermentinė redukcija ir jos fiziologinis poveikis .....	35
1.7. Aziridinil-pavaduotų benzochinonų citotoksiškumas .....	36

1.7.1. Aziridinilbenzochinono 2,5-diaziridinil-3,6-dimetil-1,4-benzochinono (MeDZQ) citotoksiškumas .....	38
1.7.2. Aziridinilbenzochinono 2,5-diaziridinil-3-(hidroksimetil)-6-metil-1,4-benzochinono (RH1) citotoksiškumas .....	38
1.8. Polifenoliniai junginiai ir jų citotoksinio veikimo mechanizmai .....	40
1.8.1. 3,3,4,5,7-pentahidroksiflavono (QUE) citotoksiškumas .....	43
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	46
2.1. Naudotos medžiagos .....	46
2.2. Darbo metodai .....	48
2.2.1. Ląstelių auginimas kultūroje <i>in vitro</i> .....	49
2.2.1.1. Tyrimams naudotos ląstelės .....	49
2.2.1.2. Ląstelių auginimas <i>in vitro</i> .....	50
2.2.1.3. Ląstelių proliferacijos/gyvybingumo vertinimas MTT metodu .....	51
2.2.1.4. Ląstelių žūties analizė fluorescenciniu mikroskopu .....	52
2.2.1.5. Ląstelių gyvybingumo vertinimas dažant tripano mėliu .....	53
2.2.1.6. Ląstelių gyvybingumo vertinimas tėkmės citometru .....	53
2.2.2. DNR pažeidimų vertinimas kometos metodu .....	53
2.2.3. Baltymų kiekio nustatymas .....	55
2.2.3.1. Ląstelių suardymas ultragarsu .....	55
2.2.3.2. Baltymų kiekio nustatymas Lowry metodu .....	55
2.2.3.3. Baltymų kiekio nustatymas Bradfordo metodu .....	56
2.2.4. NQO1 aktyvumo nustatymas MH-22A ląstelėse .....	56
2.2.5. Signalinių molekulių raiškos tyrimas .....	57
2.2.5.1. Ląstelių lizavimas .....	57
2.2.5.2. Baltymų elektroforezė .....	57
2.2.5.3. Imunoblotingas .....	58

2.2.6. Statistinė duomenų analizė .....	59
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	60
3.1. Chinonų ir polifenolių citotoksiškumas MH-22A ląstelėse .....	60
3.2. Chinonų ir polifenolių sukeliama ląstelių žūtis.....	63
3.3. NQO1 vaidmuo MH-22A ląstelių žūties procese .....	64
3.4. Oksidacinio streso reikšmė RH1 bei QUE poveikio metu .....	66
3.5. DNR pažeidimų reikšmė RH1 bei QUE poveikio metu .....	68
3.6. MAP kinazių vaidmuo RH1 bei QUE indukuotame MH-22A ląstelių žūties procesu .....	71
3.6.1. MAPK kinazės ERK vaidmuo .....	71
3.6.2. MAPK kinazės JNK vaidmuo.....	76
3.6.3. MAPK kinazės p38 vaidmuo .....	80
3.7. Transkripcijos faktoriaus p53 vaidmuo.....	85
3.8. Rezultatų aptarimas .....	90
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	100

## SANTRUMPOS

- AO** – akridino oranžinis (*acridine orange*);
- Ap-1** - transkripcijos veiksnių šeima 1 (*activator protein 1*);
- AZQ** – 2,5-Bis(1-aziridinil)-3,6-bis-(karboksiamino)-1,4-benzochinonas (2,5-Bis(1-aziridinyl)-3,6-bis-(carbethoxyamino)-1,4-benzoquinone);
- b5R** – NADH:citochromo b5 reduktazė (*NADH:cytochrome b5 reductase*);
- Bcl-2** – apoptozę reguluojanti/slopinanti baltymų šeima (protein family Bcl-2 involved in the regulation of apoptosis; name is derived from B-cell lymphoma);
- BZQ** - 2,5-bis(2'-hidroksietilamino)-3,6-diaziridinil-1,4-benzochinonas (2,5-bis(2'-hydroxyethylamino)-3,6-diaziridinyl-1,4-benzoquinone);
- cL<sub>50</sub>** – junginių koncentracija, sukianti 50 % ląstelių žūtį (*the concentration of compound causing 50 % cell death*);
- DESF** – desferioksaminas (*deferroxamine*);
- DIK** – dikumarolis (*dicumarol*);
- DISC** - mirtį skatinantis signalinis kompleksas (*death-inducing signaling complex*);
- DMSO** – dimetilsulfoksidas (*dimethyl sulfoxide*);
- DPPD** - N, N'-difenil-p-fenilendiaminas (*N,N'-Diphenyl-p-phenylenediamine*);
- DQ** - 2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzochinonas (durochinonas), (2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzoquinone);
- DZQ** - 2,5-diaziridinil-1,4-benzochinonas (2,5-diaziridinyl-1,4-benzoquinone);
- E<sup>0</sup><sub>7</sub>** - standartinis chinono/hidrochinono poros redokso potencialas (*standard redox potential of quinone/ hydroquinone couple*);
- E<sup>1</sup><sub>7</sub>** - redokso poros chinono/semichinono potencialas (*redox potential of quinone/semiquinone couples*);
- E<sup>2</sup><sub>7</sub>** - vienelektroninės oksidacijos potencialas (*single-electron oxidation potential*);
- EB** – etidžio bromidas (*ethidium bromide*);
- Endo G** – endonukleazė G (*endonuclease G*);
- ERK1/2** – užląstelinių signalų reguliuojama kinazė 1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases 1/2*);
- FAD** – flavino adenino dinukleotidas (*flavin adenine dinucleotide*);
- FADD** - Fas asocijuotas baltymas su mirties domenu (*Fas-associated death domain*);
- FADH<sub>2</sub>** – redukuotas FAD (*reduced form of flavin adenine dinucleotide*);
- FB** – fosfatinis buferis (*phosphate-buffered saline, PBS*);
- GSH** – redukuotas glutationas (*reduced glutathione*);
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - vandenilio peroksidas (*hydrogen peroxide*);

**JNK** –c-Jun N-galinė kinazė (*c-Jun N-terminal kinases*);

**MAPK** – mitogeno aktyvinama baltymų kinazė (*mitogen-activated protein kinase*);

**MAPKK** – MAP kinazės kinazė (*MAPK kinase*);

**MAPKKK** – MAPK kinazės kinazė (*MAPK kinase kinase*);

**MeDZQ** - 2,5-diaziridinil-3,6-dimetil-1,4-benzochinonas (*2,5-dimethyl-3,6-diaziridinyl-1,4-benzoquinone*);

**MIMP** – mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas (*outer mitochondrial membrane permeability*);

**MTT** - 3, (4,5-dimetil thiazolil-2) 2,5-difenil-tetrazolio bromidas (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*);

**NADH** – nikotinamido adenino dinukleotidas (*nicotinamide adenine dinucleotide*);

**NADPH** – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*);

**NQO1** – NAD(P)H: chinono oksidoreduktazė 1 (*NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1*);

**NQO2** – NAD(P)H:chinono oksidoreduktazė 2 (*NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2*);

**p38** – MAP kinazių kaskados baltymų kinazė (*p38 mitogen-activated protein kinase*);

**P450R** – NADPH:citochromo p450 reduktazė (*NADPH:cytochrome P450 reductase*);

**p53** – naviką slopinantis baltymas, turintis trnskripcinį aktyvumą (*tumor suppressor protein containing transcriptional activation*);

**QH<sub>2</sub>** - hidrochinonas (*hydroquinone*);

**QSAR** - kiekybinis struktūros-aktyvumo ryšys (*QUEntitative structure–activity relationship*);

**QUE** - 3,3',4',5,7 – pentahidroksiflavonas (kvercetas) (*quercetin*);

**Raf** – pirmoji MAP kinazių kaskados baltymų kinazė (*serine/threonine-specific protein kinase*);

**Ras** – mažas GTPazinis baltymas, aktyvinantis MAP kinazes (*Ras protein*);

**RH1** - 2,5-diaziridinil-3-(hidroksimetil)-6-metil-1,4-benzochinonas (*2,5-diaziridinyl-3-(hydroxymethyl)-6-methyl-1,4-benzoquinone*);

**RNR** - ribonukleino rūgštis (*ribonucleic acid*);

**ROS** – aktyviosios deguonies formos (*reactive oxygen species*);

**SAPK** – streso aktyvinamos baltymų kinazės (*stress-activated protein kinases*).

## IVADAS

Vėžys - liga, kuri vis dar nusineša daug žmonių gyvybių. Jos atsiradimui įtakos turi ne tik genetiniai aspektai, bet ir tam tikri aplinkos veiksniai: netinkama mityba, rūkymas, alkoholio vartojimas, viršsvoris ir kita. Daug pasaulio mokslininkų ieško efektyvių preparatų, slopinančių piktybinių ląstelių augimą arba tiesiog specifiskai žudančių vėžines ląsteles. Tyrimai vykdomi modeliniuose organizmuose *in vivo*, ląstelių kultūrose ir fermentinėse sistemose *in vitro*, atliekami rentgenostruktūrinės analizės ir kompiuterinio modeliavimo eksperimentai, vykdomi įvairūs proteominiai ir genominiai tyrimai. Pagrindinis tokių darbų tikslas - siekti chemoterapinių preparatų selektyvumo, t. y., aukšto jų toksiškumo navikinių ląstelių atžvilgiu ir žemo toksiškumo sveikų ląstelių atžvilgiu.

Šis darbas skirtas chinonų ir polifenolių priešnavikinio aktyvumo molekulinį mechanizmų tyrimui, atsižvelgiant ir į jų kiekybinius struktūros-aktyvumo ryšius (QSAR). Daugelis chinonų (ubi- ir plastrochinonai) įvairiuose organizmuose veikia kaip elektronų pernešėjai, o įvairių mikroorganizmų bei augalų sintetinami nafto- ir antrachinonai dažnai atlieka apsaugines funkcijas, susietas su jų sukeliama oksidaciniu stresu, t. y., pagreitinta reaktyviųjų deguonies formų (ROS), atsirandančių dėl chinonų laisvųjų radikalų reoksidacijos deguonimi, generacija.

Chinoninių junginių priešnavikinis aktyvumas yra žinomas nuo 1960-70 metų, antraciklinų ir mitomicinų, taikomų chemoterapijoje, junginių poveikis yra grindžiamas jų sukeliama oksidaciniu stresu. Be to, antraciklinai įsiterpia į DNR, tuo pažeisdami jos struktūrą, o mitomicinų redukcijos produktai kovalentiškai modifikuoja DNR. Kita svarbi nuo 1970 m. tiriamų junginių klasė yra aziridinil-pavaduoti benzochinonai. Be laisvųjų radikalų sukeliama oksidacinio streso šiems junginiams yra būdingi ir kiti poveikio mechanizmai: DNR alkilinimas jų redukuotomis formomis (hidrochinonais), oksidacinis stresas, susijęs su jų hidrochinoninių formų lėta (auto)oksidacija, bei tiesioginis



DNR alkilinimas žemo redokso potencialo aziridinil-benzochinonais. Nors šių junginių klinikiniai tyrimai patyrė ir sėkmes, ir nesėkmes (pastarosios buvo siejamos su šalutiniu šių junginių poveikiu), tačiau 1996 m. susintetinto aziridinil-benzochinono RH1 (2,5-diaziridinil-3-(hidroksimetil)-6-metil-1,4-benzochinono), ikiklinikinių ir 1-ios fazės klinikinių tyrimų rezultatai 2005-2011 metais buvo gana sėkmingi, nors klausimų liko gana daug.

Biocheminio toksiškumo ir navikų chemoterapijos kontekste pakankamai svarbi yra ir minėta lėta redukuotųjų chinonų (hidrochinonų) (auto)oksidacija, kuri yra siejama su polifenolinių junginių (polihidroksibenzenų ir flavonoidų), pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis, citotoksiškumu. Šie junginiai dažnai traktuojami kaip naudingi maisto komponentai ar priedai, nors toks apibendrinimas nėra tikslus.

Šiame darbe analizuojami trijų tarpusavyje susietų grupių junginių – aziridinil-pavaduotų chinonų, aziridinil-nepavaduotų chinonų ir polifenolių citotoksiškumo mechanizmai, pagrindinį dėmesį skiriant signalinių molekulių raiškos ir vaidmens tyrimui. Tyrimai atlikti piktybinio augimo modeliu naudojant pelės hepatomos ląstelių liniją (MH-22A). Šioms ląstelėms būdinga aktyvi proliferacija bei suaktyvėję ląstelės prooksidaciniai procesai. MH-22A ląstelių linija plačiai naudojama onkologiniuose tyrimuose, priešvėžinių vaistų paieškai.

Šio **darbo tikslas** yra nustatyti ksenobiotikų - aziridinil pavaduoto benzochinono RH1 ir polifenolio kvercetino (QUE, 3,3,4,5,7-pentahidroksiflavono) galimus citotoksinius veikimo mechanizmus, piktybinėse pelės hepatomos ląstelėse, įvertinant signalinių molekulių vaidmenį ląstelių žūties procese.

### **Uždaviniai:**

1. Įvertinti pasirinktų chinoninių ir polifenolinių ksenobiotikų citotoksinį aktyvumą ir nustatyti didžiausiu aktyvumu pasižyminčius junginius.

2. Nustatyti tiriamų junginių – aziridinil-pavaduoto benzochinono RH1, aziridinil-nepavaduoto chinono DQ bei polifenolinio QUE - citotoksiškumo intensyvumą ir indukuojamos žūties pobūdį pelės hepatomos MH-22A ląstelių kultūroje.
3. Nustatyti NQO1 raišką ir aktyvumą MH-22A ląstelėse.
4. Ištirti NQO1 bei oksidacinio streso vaidmenį RH1, DQ bei QUE indukuotame ląstelių žūties procese.
5. Nustatyti DNR pažaidų įtaką RH1, DQ bei QUE indukuojamos ląstelių žūties procesui.
6. Įvertinti mitogenais aktyvuojamų baltymų kinazių (MAPKs) šeimos signalinių molekulių vaidmenį MH-22A ląstelėms atsakant į poveikį tiriamais junginiais.
7. Nustatyti transkripcijos faktoriaus p53 vaidmenį tiriamame ląstelių žūties procese.

### **Mokslinio darbo aktualumas ir naujumas**

**Darbo aktualumas** yra susietas su galimu aziridinil-benzochinonų taikymo navikų chemoterapijoje perspektyvomis. Aziridinil-pavaduoti benzochinonai - nuo 1970 m. tiriami junginiai, kurių pradinės priešnavikinio poveikio stadijos (NQO1 bioredukcinė aktyvacija, oksidacinis stresas) yra pakankamai gerai suprastos (Di Francesco *et al*, 2004; Šarlauskas *et al*, 2015; Nemeikaitė-Čėnienė *at al*, 2003; 2015), tačiau trūksta informacijos apie vėlesnių stadijų citotoksinius mechanizmus - signalinių baltymų raišką ir jų vaidmenį ląstelės žūties procese. Kadangi chinonų citotoksiškumas yra iš dalies susietas ir su jų redukuotųjų formų (polifenolių) oksidacija generuojant ROS, buvo vertintas ir polifenolių citotoksiškumas vėžinėse MH-22A ląstelėse.

Šio **darbo naujumas** yra signalinių baltymų raiškos ir jų vaidmens atskleidimas vėžinių MH-22A ląstelių žūties procese, veikiant ląsteles aziridinil-pavaduotais ir aziridinil-nepavaduotais benzochinonais bei polifenoliu kvercetinu.

Pirmą kartą buvo iširta mitogenų aktyvinamų baltymų kinazių (MAPK) bei transkripcijos faktoriaus p53 signalinių kelių vaidmuo MH-22A ląstelių žūtis procese po poveikio RH1 ir QUE.

Nustatyta, kad galimai antiapoptotinį ERK veikimą lemia oksidacinis stresas. Tuo tarpu, streso aktyvinima baltymų kinazė JNK buvo atsakinga už MH-22A ląstelių išgyvenimą po RH1 poveikio, o QUE atveju dalyvavo indukuotame ląstelių žūtis procese. Kinazė p38, priešingai nei JNK, po RH1 poveikio dalyvavo perduodant žūtis signalą, t. y., registruotas jos proapoptozinis veikimas, o po QUE poveikio – nustatytas neutralus šios kinazės vaidmuo. Taip pat parodyta, kad p53 raiška nėra būdinga MH-22A ląstelėms, bet ją indukavo RH1 junginys. Nustatėme, kad p53 baltymas po RH1 poveikio gali lemti ląstelių išgyvenimą.

### **Ginamieji teiginiai**

- ✓ Aziridinil-pavaduotas benzochinonas RH1 ir polifenolis kvercetas (QUE) indukuoja apoptozinę pelės hepatomos MH-22A ląstelių žūtį.
- ✓ Tiriamųjų junginių - RH1 ir QUE - citotoksinis veikimas realizuojamas dviem mechanizmais: dalyvaujant fermentui NAD(P)H: chinono reduktazei bei oksidaciniam stresui.
- ✓ RH1 sukelia DNR pažaidas, kurios priklauso tiek nuo oksidacinio streso, tiek ir nuo NQO1 vykdomos dvielektroninės redukcijos; QUE sukelia DNR pažaidas, kurios priklauso tik nuo NQO1 fermento aktyvumo.
- ✓ Antioksidantai slopina tiriamų junginių citotoksinį poveikį, tačiau šių junginių oksidacinio streso indukuoti viduląsteliniai mechanizmai MH-22A ląstelėse skiriasi nuo žinomo oksidacinio streso sukėlėjo – vandenilio peroksido – indukuotų streso kinazių pokyčių.
- ✓ Po poveikio tiriamais junginiais ERK kinazės antiapoptotinį veikimą galimai lemia oksidacinis stresas.

- ✓ JNK signalinio kelio vaidmuo yra priešingas pelės hepatomos ląsteles paveikus aziridininil-pavaduotu chinonu RH1 arba polifenoliu QUE.
- ✓ p53 baltymo raiška nėra būdinga MH-22A ląstelėms, tačiau RH1 aktyvino šio baltymo rašką, kuri reikalinga tirtų ląstelių išgyvenimui.

## **PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA**

### Straipsniai:

R. Jarašienė-Burinskaja, M. Alksnė, V. Bartuškienė, V. Voišnienė, J. Burinskij, N. Čėnas, V. Bukelskienė. Study of cytotoxic effects of 2,5-diaziridinyl-3,6-dimethyl-1,4-benzoquinone (MeDZQ) in mouse hepatoma cells. EXCLI Journal. 2017; 16:151-159.

A. Nemeikaitė-Čėnienė, R. Jarašienė, H. Nivinskas, J. Šarlauskas, N. Čėnas. Cytotoxicity of anticancer aziridinyl-benzoquinones in murine hepatome MH-22A cells: the properties of RH1-resistant subline. Chemija. 2015; 26:46-50.

J. Šarlauskas, A. Nemeikaitė-Čėnienė, H. Nivinskas, V. Miliukienė, R. Jarašienė, M. Pečiukaiytė, D. Baltriukienė, V. Bukelskienė, K. Krištopaitis, N. Čėnas. Redox reactions and cytotoxicity mechanisms of anticancer aziridinyl-substituted-1,4-benzoquinones: a minireview. Chemija. 2015; 26:208.

### Pranešimai konferencijose:

J. Šarlauskas, K. Krištopaitis, N. Čėnas, V. Miliukienė, D. Baltriukienė, R. Jarašienė. Aziridinyl-substituted benzo-1,4-quinones: preliminary investigation on their synthesis, x-ray structure, redox active properties and biological activity. 8th eurasian meeting on heterocyclic chemistry (20-24 September 2014. Tbilisi, Georgia).

N. Čėnas, A. Nemeikaitė-Čėnienė, R. Jarašienė, V. Miliukienė, A. Imbrasaitė., H. Nivinskas, J. Šarlauskas. Cytotoxicity of antitumor aziridinyl-quinone RH1 in transformed and primary mammalian cell lines. International Symposium on medicinal Chemistry (7-11 September 2014. Lisbon, Portugal).

A. Nemeikaitė-Čėnienė, N. Čėnas, V. Miliukienė, R. Jarašienė, A. Marozienė, V. Vidžiūnaitė, J. Šarlauskas. QSARs in the Prooxidant Cytotoxicity of Polyphenolic Antioxidants in Transformed and Primary Mammalian Cells. International Symposium on medicinal Chemistry (7-11 September 2014. Lisbon, Portugal).

R. Jarašienė, M. Pečiukaitytė, K. Bastytė, N. Čėnas, V. Bukelskienė. The impact of oxidative stress for quercetin-induced MH-22A cell death. 13-toji tarptautinė Lietuvos biochemikų draugijos konferencija (18-20 birželio 2014. Birštonas, Lietuva).

R. Jarašienė, M. Pečiukaitytė, V. Bukelskienė, D. Baltriukienė, D. Kučiauskas, J. Šarlauskas, N. Čėnas “Study of the quinones-induced molecular mechanisms in cancerous MH-22A cell death. “EMBO conference: Cellular signalling and cancer therapy (23-27 May 2014. Cavtat, Croatia).

R. Jarašienė, M. Pečiukaitytė, V. Bukelskienė, D. Baltriukienė, J. Šarlauskas, N. Čėnas “Study of the antitumor effect of aziridinybenzoquinones in mouse hepatoma cells“. 12 Felasa Secal Congress (10-13 June 2013. Barcelona, Spain).

A. Nemeikaitė-Čėnienė, R. Jarašienė, H. Nivinskas, J. Šarlauskas, N. Čėnas “Sensitivity and resistance of murine hepatoma MH-22A cells to bioreductively activated aziridinybenzoquinone RH1“. Medicinal redox inorganic chemistry conference 2013 (20-22 Juny 2013. Erlangen, Germany).

N. Čėnas, V. Miliukienė, Z. Anusevičius, L. Misevičienė, L. Karvelis, A. Nemeikaitė-Čėnienė, R. Jarašienė, J. Šarlauskas. New aziridinil-substituted quinones: preliminary investigation of enzymatic reduction and cytotoxic activity on mammalian cells. V Internacional conference BIFI 2012. (1-4 February 2012. Zaragoza, Spain).

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Vėžys ir jo gydymo strategijos

Vėžio gydymui naudojami metodai grindžiami navikinių ląstelių sunaikinimu, jų proliferacijos stabdymu bei diferenciacijos indukavimu. Tuo tikslu vėžinėse ląstelėse ieškoma specifinių taikinių, kurie būtų jautrūs chemoterapiniams agentams. Kai kada chemoterapija kombinuojama su chirurginiu metodu, radioterapija, hipertermija.

Chemoterapija pradėta naudoti 1940 m. Tai vėžio gydymas citotoksinais ar citostatinais preparatais, t. y. vaistais, kurie naikina vėžines ląsteles ar stabdo jų proliferaciją. Tačiau citotoksinės medžiagos veikia ne vien vėžines, bet ir sveikas organizmo ląsteles, todėl chemoterapinis gydymas turi šalutinį poveikį. Dabartinius chemoterapinius vaistus pagal jų cheminę struktūrą ir veikimo mechanizmą galima skirstyti į kelias grupes: alkilinantys, antimetaboliniai, slopinantys topoizomerazių veiklą, antimitoziniai, citotoksiniai agentai (Torres, 2007).

**Alkilinantys chemoterapiniai vaistai** pažeidžia vėžines ląsteles, alkilindami ląstelės baltymus, RNR ar DNR. Dėl to prasideda DNR bazių porų neatitikimai, bazių pašalinimas, grandinių trūkiai. Šie vyksmai toliau aktyvuoja programuotą ląstelės žūtį – apoptozę (Homer, 2013). Alkilinantys agentai ląstelę gali veikti bet kurioje jos ciklo stadijoje. Todėl jie gali būti naudojami įvairių rūšių vėžinių susirgimų gydymui. Tačiau šie vaistai neatskiria normalios ląstelės nuo vėžinės ir sąveikauja su abiejų tipų ląstelių DNR. Dėl šios priežasties gydymas tokiais vaistais turi nemažai šalutinių poveikių. Vienas iš jų yra didelė tikimybė atsirasti antriniams vėžiniams susirgimams, kurie lemia šių vaistų savybę veikti visas greitai besidalijančias ląsteles (Latosińska ir Latosińska, 2013).

Šiai grupei priklauso daugelis priešvėžinių agentų. Iš jų geriausiai žinomi azoto-iproto ( $-N(CH_2CH_2Cl)_2$ ) ir aziridino ( $-N(CH_2CH_2)$ ) grupes turintys

junginiai (Siddik, 2005). Alkilinančių vaistų grupei dažnai priskiriami ir agentai, savo sudėtyje turintys platiną (Latosińska ir Latosińska, 2013).

**Antimetabolitiniai chemoterapiniai vaistai** veikia dviem būdais: stabdo fermentų, atsakingų už DNR sintezę, veikimą ir įsiterpia į DNR ir RNR grandines, sukeldami jų trūkius ar priešlaikinę grandinių sintezės terminaciją. Tokie DNR ir RNR struktūros pakitimai toliau aktyvuoja apoptozinę ląstelių žūtį. Šių vaistų, skirtingai nei alkilinančių agentų, poveikis priklauso nuo ląstelės ciklo. Jie dažniausiai veikia ląstelę jai esant S ciklo fazėje. Antimetabolitiniai chemoterapiniai vaistai pagal jų struktūrą ir funkciją gali būti skirstomi į folinės rūgšties analogus bei purinų ir pirimidinų nukleozidų analogus (Lind, 2011; Robak ir Robak, 2013).

**Topoizomerazių veiklą slopinantys vaistai** - tai agentai, veikiantys topoizomerazių I ir II aktyvumą. Topoizomerazės yra fermentai, kontroliuojantys tridimensinę DNR struktūrą. Tam, kad galėtų vykti replikacija ir transkripcija, jos perkerpa ir vėl susiuvu DNR grandines (Holden, 2001; Nitiss, 2009; Pommier ir Cushman, 2009; Pommier *et al.*, 2010; Lind, 2011).

**Antimitozinių chemoterapinių vaistų grupė** sutrikdo vėžinių ląstelių mitozę. Šie vaistai, kurie yra naudojami klinikinėje praktikoje, mitozę stabdo veikdami mikrovamzdelius. Antimitoziniai chemoterapiniai agentai yra skirstomi į mikrovamzdelius stabilizuojančius ir mikrovamzdelius destabilizuojančius medikamentus (Gascoigne ir Taylor, 2009; Lind, 2011). Kai kurie naujos kartos antimitoziniai preparatai veikia kaip Cdk, Chk, Aurora kinazių ir į Polo panašios kinazės (*Polo-like kinase*) slopikliai. Nustatyta, kad visų šių kinazių raiška vėžinėse ląstelėse yra padidėjusi. Tačiau klinikiniuose tyrimuose šie nauji antimitoziniai vaistai nebuvo tokie veiksmingi, kaip medikamentai, veikiantys mikrovamzdelius (Marzo ir Naval, 2013).

**Citotoksiniai agentai** - mišri vaistų grupė. Šios grupės agentai vėžines ląsteles veikia keliais būdais: 1) įsiterpia į DNR ir sutrikdo topoizomerazės II veiklą; 2) skatina laisvųjų radikalų, kurie pažeidžia ląstelės membranas,



baltymus ir DNR susidarymą; 3) aktyvuoja apoptozinę ląstelių žūtį per tam tikrus signalinius kelius. Šiai vaistų grupei priklauso antraciklinai, aktinomicinas, bleomicinas, plicamicinas ir mitomicinai. Šie junginiai, išskyrus bleomiciną, ląstelę gali veikti bet kurioje jos ciklo stadijoje (Latosińska ir Latosińska, 2013).

Šiame darbe tiriami junginiai - aziridinil-pavaduoti ir nepavaduoti chinonai bei polifenoliai - priklauso citotoksinių, bet iš dalies ir alkilinančių agentų grupei.

## **1.2. Signalų perdavimas organizme**

Organizme kiekviena ląstelė sąveikauja su kitomis ląstelėmis ir su daugeliu tarpląstelių signalinių molekulių, kurios pagal savo poveikio pobūdį yra skirstomos į išgyvenimą, dalijimąsi, diferenciaciją ir mirtį lemiančius veiksnius. Šių veiksnių perduodamą signalą atpažįsta ląstelės membraniniai ar viduląsteliniai receptoriai, kurie toliau signalą perduoda viduląstelių procesų grandinei. Ląstelės viduje jis keliauja arba kaip baltymų fosforilinimo kaskada, arba kaip antrinių signalinių molekulių srautas.

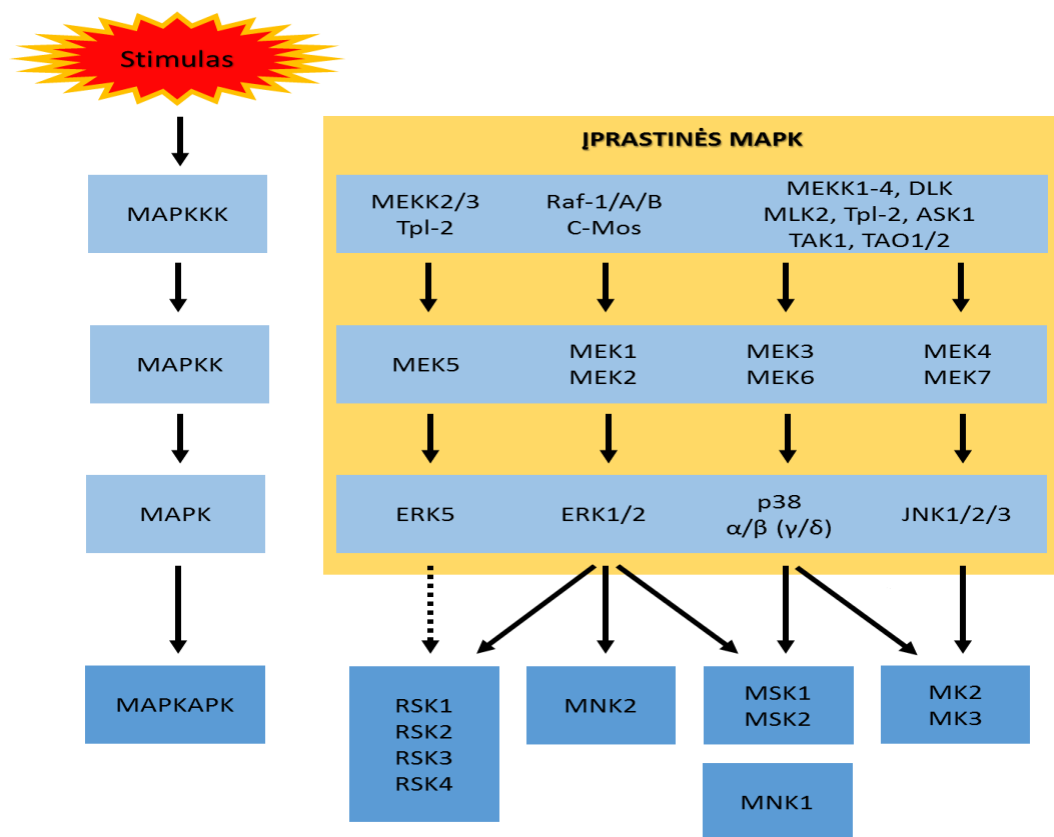
Jei signalas perduodamas fosforilinant ir tokiu būdu aktyvinant kinazes vieną po kitos, toks signalinis kelias vadinamas kinazių kaskada.

### **1.2.1. Mitogenų aktyvinamų baltymų kinazių perduodami signalai ląstelėje**

Mitogeno aktyvinamos baltymų kinazės (MAPK) – tai ląstelės baltymų šeima, kurios atstovai užląstelių molekulių, tokių kaip augimo veiksniai ar streso induktoriai, signalus ląstelėje perduoda aktyvindami įvairius viduląstelių signalų perdavimo komponentus. MAPK yra vienos iš evoliuciškai seniausių signalo perdavimo kelių ir yra plačiai paplitusios skirtinguose fiziologiniuose procesuose. Šiai šeimai priklausančių kinazių signalo perdavimo būdas yra gana universalus: jos fosforilina baltymus, kuriuose šalia prolino yra serino arba treonino amino rūgšties liekana (Pearson *et al.*, 2001). Visi MAP kinazių aktyvinami keliai turi bendrą bruožą -

vykstančią kaskadinę kinazių aktyvaciją (1 pav.). Kiekviename MAPK kelyje dalyvauja bent trys kinazės – MAPK kinazės kinazė (MAPKKK), dvigubo specifiškumo MAPK kinazė (MAPKK) ir MAP kinazė.

MAPK kinazės kinazę (MAPKKK) dažniausiai aktyvina mažosios GTPazės arba jas tiesiogiai fosforilina aktyvuoti membraniniai receptoriai. Po aktyvacijos MAPKK kinazė fosforilina ir taip aktyvuoja antrąsias MAPK kelyje dalyvaujančias kinazes – MAPKK. Pastarosios fosforilina ir aktyvuoja trečiąsias MAPK signaliniame kelyje dalyvaujančias kinazes - MAPK. MAP kinazės yra aktyvuojamos fosforilinant jų Thr-X-Tyr motyvą. Šios kinazės gautą signalą toliau perduoda transkripcijos veiksniams ar kitoms kinazėms (Krauss, 2008; Cargnello *et al.*, 2011).



1 pav. MAP kinazių signaliniai keliai (pagal Cargnello *et al.*, 2011).

MAPK paprastai turi MAPKK ir substrato prisitvirtinimo vietas. Tai lemia didelio afiniškumo baltymas-baltymas sąveikos susidarymą. Ši sąveika užtikrina tai, kad tinkama MAPKK aktyvuoja reikiamą MAP kinazę.

Visos eukariotinės ląstelės turi daugybę MAPK signalinių kelių, kurie koordinuoja genų raišką, mitozę, metabolizmą, judėjimą, išgyvenimą, apoptozę ir diferenciaciją (Cargnello *et al.*, 2011). Iki šiol geriausiai ištirtos žinduolių organizme esančios MAPK yra ERK, JNK ir p38. Tačiau pastarojo meto tyrimai taip pat pradeda atskleisti ir kitų MAPK reguliaciją ir funkcijas (Huang *et al.*, 2010; Cargnello *et al.*, 2011; Morrison, 2012).

#### **1.2.1.1. ERK1/2 signalinis kelias**

1989-1991 m. atrastos ERK1 ir ERK2 kinazės buvo priskirtos naujai identifikuotų baltymų kinazių šeimai. ERK1/2 signalinis kelias yra laikomas tarsi visų MAPK signalinių kelių prototipas, jį reguliuoja užląsteliniai signalai, kurie į ląstelę perduodami per įvairius receptorius (Plotnikov *et al.*, 2011).

ERK1 ir ERK2 - tai homologinės izoformos kinazės, kurių raiška yra randama beveik visuose audiniuose. Šios šeimos kinazės savo aktyvacijos kilpoje turi Thr-Glu-Tyr (TEY) motyvą. Jų masė yra atitinkamai 44 ir 42 kDa, tarpusavyje jie pasižymi beveik 85 proc. pirminės struktūros panašumu (Aebersold *et al.*, 2004; Rubinfeld *et al.*, 2004; Krause *et al.* 2012). ERK1/2 signalinis kelias aktyvuojamas atsakant į augimo veiksnius, mitogenus, citokinus, kurie skatina ląstelių augimą, dalijimąsi ir diferenciaciją. Užląsteliniai signalai dažniausiai aktyvuoja ERK1/2 per Ras-Raf-MEK kelią. Tai yra, pirmiausiai ligandai sąveikauja su receptoriais; labiausiai ištirti - tirozino kinazės receptoriai, lokalizuoti plazminėje membranoje. Toliau prasideda tirozino liekanų autofosforilinimas, formuojasi baltyminiai kompleksai, kurie lemia įvykių grandinę: aktyvinami ląstelėje ramybės būsenoje esantys Ras baltymai, kurie toliau sąveikauja su Raf šeimos kinazėmis. Aktyvuotos Raf kinazės fosforilina dvi MAPKK – MEK1 ir MEK2, kurios toliau aktyvuoja ERK1/2, fosforilindamos jo Thr-Glu-Tyr (TEY) motyvą (Huang *et al.*, 2010).

Po ERK1/2 aktyvacijos pakinta jų struktūra, o tai leidžia efektoriams prisijungti prie ERK1/2 bei joms translokuotis į branduolį ir aktyvuoti branduolinius substratus, kurie sukelia atitinkamą ląstelės atsaką (Runchel *et*

*al.*, 2011). Visi ERK1/2 substratai turi Pro-X-Ser/Thr-Pro motyvą, kuriame ERK1 fosforilina seriną, o ERK2 – treoniną. Po substrato fosforilinimo jis aktyvinamas arba nuslopinamas (Runchel *et al.*, 2011).

#### **1.2.1.2. JNK1/2 signalinis kelias**

JNK šeimos baltymai buvo identifikuoti kaip stresu aktyvinamos kinazės, ekspresuojamos paveikus ląsteles baltymų sintezės slopikliais. JNK sudaro mažiausiai 10 izoformų, sudarytų iš JNK1, JNK2 ir JNK3 genų, tarpusavyje susipynusių mRNR. Ląstelėse JNK1 ir JNK2 ekspresuojamos nuolatos, tuo tarpu JNK3 dažniausiai aptinkama tik smegenyse (Runchel *et al.*, 2011). JNK kinazių šeimos baltymams jų aktyvinimo kilpoje (*T-loop*) yra būdingas Thr-Pro-Tyr (TPY) motyvas (Morrison, 2012). Kiekvienas JNK genas ekspresuoja arba 46, arba 54 kDa dydžio baltymus. JNK1, JNK2 ir JNK3 molekulių katalizinių centrų pirminėje struktūroje nustatytas didesnis negu 85 proc. tarpusavio panašumas (Pearson *et al.*, 2001).

JNK kaskados aktyvinamos įvairiais citokiniais, DNR ir baltymų sintezės slopikliais, stresu (UV spinduliuote, karščio ar osmosiniu šoku), augimo veiksniais bei mitogenais (Pearson *et al.*, 2001). JNK kaskada inicijuojama po MAPKKK aktyvinimo. Kinazės MAPKKK (MEKK1-4, MLK2,3; TAO1, TAK1, ASK1) fosforilina ir taip aktyvuoja kinazes MEK4 ir MEK7, kurios po to aktyvina JNK, jos aktyvavimo kilpoje fosforilindamos treoniną ir tiroziną (Huang *et al.*, 2010). Toliau JNK fosforilina savo substratus, kurių pagalba sukiamas atitinkamas stimului atsakas (Runchel *et al.*, 2011).

Gerai žinoma JNK substratų grupė yra AP-1 transkripcijos faktoriai. Pagrindiniai AP-1 transkripcijos faktorių sudarantys baltymai priklauso Jun ir Fos baltymų šeimoms. Be jų, į AP-1 sudėtį dar įeina ir ATF bei Maf šeimų baltymai. Visiems baltymams, sudarantiems AP-1, yra būdinga “leucino užtrauktuko“ struktūra, kurios dėka jie dimerizuojasi ir jungiasi prie DNR (Shaulian, 2010).

### 1.2.1.3. p38 signalinis kelias

MAP kinazė p38 buvo atrasta kaip priešūždegiminio vaisto piridilimidazolo taikiny. Šis vaistas sumažina endotoksinų stimuliuojamą TNF $\alpha$  išskyrimą. Šiuo metu yra žinomos keturios p38 izoformas: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  ir p38 $\delta$  (Sabio *et al.*, 2014), iš kurių dvi ( $\alpha$  ir  $\beta$ ) aptinkamos visų audinių ląstelėse (Zarubin ir Han, 2005). Remiantis sekos homologija, specifiskumu substratams ir jautrumu įvairiems cheminiams slopikliams, p38 MAP kinazių šeima skirstoma į dvi grupes. Pirmajai grupei priklauso p38 $\alpha$  ir p38 $\beta$ , antrajai – p38 $\gamma$  ir p38 $\delta$  (Sabio *et al.*, 2014).

Šias kinazes aktyvina MAP kinazių kinazės (MKK3/4/6/7), kurios fosforilina visai p38 kinazių šeimai būdingą Thr-Gly-Tyr (TGY) motyvą (Pearson *et al.*, 2001).

Kinazė p38, kaip ir JNK, priklauso stresu aktyvinamų kinazių grupei. Šias kinazes gali aktyvinti tiek augimo faktoriai, tiek ir įvairūs streso faktoriai - uždegiminiai citokinai, UV spinduliuotė, šilumos šokas, deguonies radikalai ir kt. Aktyvuota p38 sukelia uždegimą, apoptozę, skatina ląstelės diferenciaciją, bet taip pat ji gali dalyvauti ir proliferacijos procese. Nustatyta, kad p38 dalyvauja kontroliuojant ląstelės dalijimosi ciklo patikros taškus G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>-S ir G<sub>2</sub>-M. (Pritchard *et al.*, 2013).

p38 kinazės kaskada prasideda nuo MAPKKK aktyvinimo. Šios kinazės toliau fosforilina ir aktyvina MAPKK kinazes (MKK3, MKK4, MKK6), kurios toliau dvigubu fosforiliniu aktyvina visai p38 šeimai būdingą Thr-Gly-Tyr motyvą ir tokiu būdu aktyvuoja šią kinazę (Pearson *et al.*, 2001; Morrison, 2012).

Aktyvinta p38 tiesiogiai tarpininkauja transkripcijos faktorių, tokių kaip TCF šeimos atstovai Elk1 ir SAP1, aktyvinimo procese. p38 taip pat fosforilina baltymų kinazes, kurios svarbios tarpląstelinėms signalų amplifikacijai, bei MAPKAPK2 ir MAPKAPK3 kinazes, kurios toliau fosforilina mažus

šiluminio šoko (*heat-shock*) baltymus HSP27 arba transkripcijos faktorius, tokius kaip ATF1, SRF, MNK (Porta *et al.*, 2011).

Kinazės p38 izoformų p38 $\alpha$  ir p38 $\beta$  daug ekspresuojama vėžio ląstelėse. Nustatyta, jog p38 $\alpha$  stabdo vėžinių ląstelių proliferaciją slopindamas JNK-cJun kelią. Taip pat buvo ištirta, kad p38 $\alpha$  gali stabdyti ROS kaupimąsi bei kepenų pažeidimą, taip sumažindamas pradinės vėžio stadijos ląstelių proliferaciją (Huang *et al.*, 2010).

### **1.2.2. Streso aktyvinamos baltymų kinazės ir jų vaidmuo oksidacinio streso metu**

JNK ir p38 baltymų šeimos priklauso taip vadinamoms streso aktyvinamoms baltymų kinazėms (SAPKs). SAPKs yra aktyvuojamos ląstelei patiriant stresą, pvz., paveikus jonizuojančia radiacija, chemoterapiniais preparatais. Kinazės SAPKs gali aktyvinti oksidacinis stresas ar DNR pažeidimas ląstelėje. Aktyvuotos JNK ir p38 kinazės gali dalyvauti ląstelių apoptozės, proliferacijos, diferenciacijos procesuose (Huang *et al.*, 2010). Šios kinazės reguliuoja platų spektrą baltymų ir transkripcijos faktorių, keičiančių genų raišką ląstelėje (Martindale *et al.*, 2002).

Žinoma, kad oksidacinio streso metu dėl padidėjusio mitochondrijų membranų pralaidumo į citoplazmą patekę Ca<sup>2+</sup> jonai aktyvuoja JNK kinazę bei sukelia citochromo c išskyrimą iš mitochondrijų į citozolį, kuris, manoma, aktyvuoja p38 kinazę (Kuwabara *et al.*, 2008). Po DNR pažeidimų vykstančios SAPK aktyvacijos metu yra aktyvinama tirozino kinazė c-Abl, kuri toliau aktyvuoja MAPKKK ir taip signalas kinazių kaskada perduodamas į SAPK (Helbig *et al.*, 2011). Manoma, kad iš karto po atsiradusių DNR pažeidimų JNK ir p38 kinazių aktyvacija skatina ląstelių išgyvenimą. Tačiau vykstant ilgalaikiai šių kinazių aktyvacijai susidaro dideli transkripcijos faktoriaus AP-1 kiekiai, kurie aktyvuoja Fas ligando (FAS-L) transkripciją ir ląstelės apoptozę (Wynand ir Bernd, 2006).

### 1.3. Transkripcijos faktorius p53

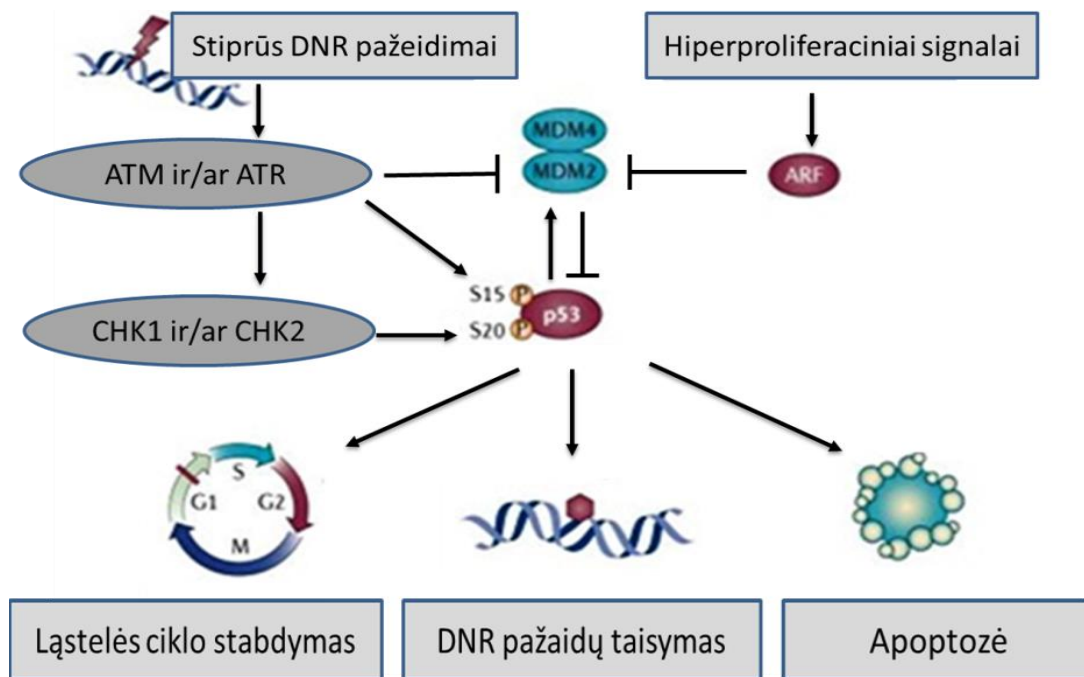
Baltymas p53 atrastas 1979 m. (Linzer *et al.*, 1979; Lane *et al.*, 1979). Parodyta, kad jis tiesiogiai rišasi su DNR ir veikia kaip transkripcijos faktorius, reguliuojantis ląstelės ciklą, apoptozę ir DNR pažeidimų taisymą (Thakur *et al.*, 2012; Stegh, 2012). Sveikose, streso nepažeistose ląstelėse p53 baltymo kiekis ir aktyvumas labai maži, o jo funkcija – stabdyti ląstelės piktybėjimo procesą. Tuo tarpu, stresinėmis sąlygomis, p53 baltymas ląstelėse aktyvinamas, t. y., vyksta jo daugybinis fosforilinimas (Maclaine ir Hupp, 2009). Nustatyta, kad maždaug pusėje vėžinių ląstelių p53 koduojančiame gene aptinkamos mutacijos ir tada, akivaizdu, pasikeičia šio baltymo vaidmuo.

Genas, koduojantis baltymą p53, vadinamas TP53 (angl. *tumor protein p53*). Jis yra 17-os chromosomos trumpajame petyje, kurio pažeidimai itin dažni piktybinėse ląstelėse. Mutuotas p53 gali ne tik aktyvinti navikinių ląstelių proliferacijos ir angiogenezės procesus, bet ir slopinti apoptozę (Fearon, 2011). Šio signalinio kelio atkūrimas ir p53 funkcijos aktyvinimas gali būti naudojamas priešvėžinei terapijai (Muller ir Vousden, 2014).

p53 vaidmuo, geriausiai ištirtas įvykus DNR pažeidimui ir vykstant hiperproliferacijai (2 pav.) (Bieging *et al.*, 2014).

Atlikdamas savo priešvėžinį vaidmenį p53 gali veikti keliais būdais:

1. aktyvuoti DNR reparacijos baltymus, kai buvo pažeista DNR;
2. sustabdyti ląstelės ciklą G1/S taške, kur yra atpažįstamos DNR pažeidimos;
3. inicijuoti apoptozę, jei paaiškėja, kad DNR pažeidimai yra nepataisomi.



2 pav. Apibendrinta p53 aktyvacijos ir atsako schema (pagal Bieging *et al.*, 2014).

Dėl tokių transkripcijos faktoriaus p53 savybių stabdoma streso paveiktų/pažeistų ląstelių proliferacija (Madan *et al.*, 2012).

Vienas iš svarbiausių DNR pažeidimų - dvigubos grandinės trūkiai (De Zio *et al.*, 2013). Šiuos trūkius gali sukelti įvairūs veiksniai, tarp kurių ir jonizuojanti spinduliuotė (JR), veikianti tiesiogiai arba netiesiogiai per JR sukurtas reaktyviausias deguonies formas (ROS) ( Zhao *et al.*, 2012). Eukariotinės ląstelės, reaguodamos į stresą ir DNR pažeidimą, inicijuoja įvairius DNR reparacijos būdus. AP-1 ir p53 yra vieni iš svarbiausių genotoksinio streso įjungiamų transkripcijos faktorių, kurie dalyvauja DNR taisymo genų transkripcijos aktyvacijoje. Pagal turimus duomenis, p53 reguliuoja 10 iš 25 DNR reparacijos genų: *ddb2*, *fen1*, *karp1*, *mgmt*, *mlh1*, *msh2*, *pcna*, *pms2*, *polh* ir *xpc*. Kai genotoksinis stresas aktyvina AP-1 ir p53, gali vykti daugybinė reparacijos genų aktyvacija esant vienos rūšies DNR struktūros pažeidimui. Dėl šios priežasties gali būti vykdomas efektyvus DNR pažeidimų taisymas (Christmann ir Kaina, 2013).



Baltymas p53 atlieka svarbų vaidmenį ląstelės ciklo patikros taškuose (Broustasa ir Lieberman, 2014). Vienas iš galimų aktyvinto p53 genų taikinių yra nuo ciklino priklausomos kinazės inhibitorius p21, kuris inaktyvuoja ciklino E/CDK2 ir ciklino D/Cdk4/6 kompleksus, tokiu būdu stabdydamas perėjimą iš G1 į S ląstelės ciklo fazę (Deckbar *et al.*, 2011; Mombach *et al.*, 2014). Yra žinoma, kad p53 transkripcijos stadijoje slopina ciklino B, CDC25B ir į polo panašią kinazę 1 (Plk1), kuri yra reikalinga perėjimui į mitozės stadiją (Broustasa ir Lieberman, 2014).

Be to, p53 gali dalyvauti ne tik nuo transkripcijos priklausomame, bet ir nuo transkripcijos nepriklausomame apoptozės procese. Tuo atveju taip pat galimi du keliai; kiekvienas iš jų priklauso nuo p53 lokalizacijos – šis baltymas gali būti tiek citozolyje, tiek ir mitochondrijose. Nors jų buvimo vietos skirtingos, bet abu apoptozės indukavimo keliai susilieja, nes abiem atvejais inicijuojama mitochondrijų išorinės membranos permeabilizacija, lemianti, kad ir iš jos (membranos) į citoplazmą išeina proapoptoziniai baltymai (Martinez-Rivera ir Siddik, 2012). Kai proapoptozinių baltymų kiekis pasiekia kritinį lygį, šie sukelia ląstelės žūtį (Zhao *et al.*, 2012; De Zio *et al.*, 2013).

#### **1.4. Ląstelių žūtis**

Vėžio chemoterapijai ypatingai svarbu suprasti ląstelės žūtį reguliuojančius signalinius kelius. Šiuo metu yra žinomi šie ląstelių žūties tipai: apoptozė, nekrozė ir autofagija. Jie dažniausiai skirstomi pagal morfologinius kriterijus (Kroemer *et al.*, 2009). Ląstelių žūtis dar gali būti apibūdinama pagal fermentinius kriterijus, t. y., pagal skirtingas klases proteazių, dalyvaujančių ląstelių žūties procese (kaspazes, katepsinus, transglutaminazes), ir pagal branduolio pasikeitimus (programuota ar atsitiktinė, fiziologinė ar patologinė žūtis) (Durpez *et al.*, 2009).

##### **1.4.1. Apoptozė**

1972 m buvo aprašytas ląstelių žūties būdas – apoptozė, kuri nuo pat jos atradimo susilaukė labai didelio susidomėjimo (Kerr *et al.*, 1972). Ji laikoma pagrindine programuota, genetiškai kontroliuojama ląstelių žūties forma. Šio

ląstelių žūties būdo paskirtis – pažeistų ar nepageidaujamų ląstelių pašalinimas iš organizmo, suaktyvinant iš anksto užprogramuotus ląstelinius mechanizmus. Apoptozė yra sudėtingas procesas, kurio metu ląstelė praranda ryšį su gretimomis ląstelėmis, vyksta eilė morfologinių ir biocheminių branduolio, citoplazmos ir plazminės membranos pakitimų: sumažėja ląstelės apimtis, sutankėja chromatinas, DNR sukarpoma į trumpus fragmentus ir ląstelė subyra į apoptozinius kūnelius. Apoptoziniai kūneliai yra greitai atpažįstami, juos fagocituoja kaimyninės ląstelės arba makrofagai (Alberts *et al.*, 2002; Ulukaya *et al.*, 2011). Nustatyta, kad apoptozė gali vykti dviem būdais: per vidinį – mitochondrijų kelią arba išorinį - mirties receptorių kelią.

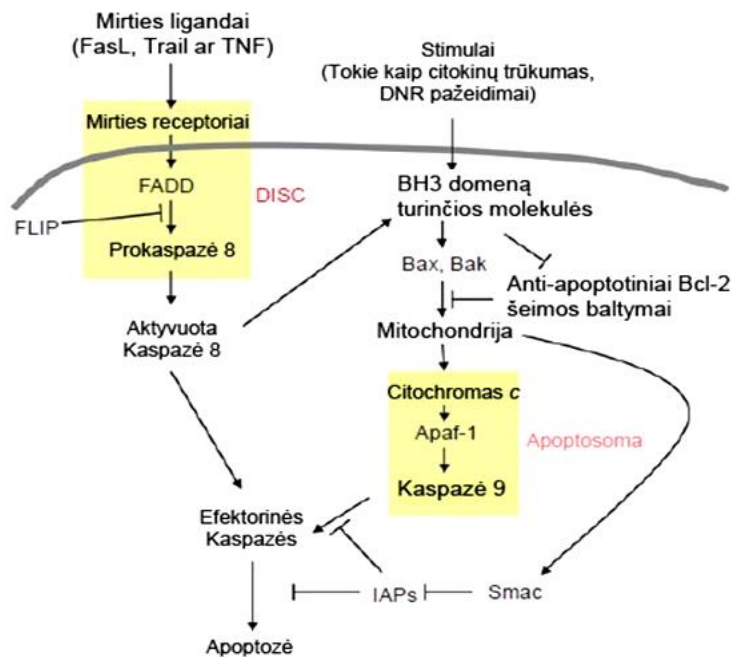
**Vidinis arba mitochondrijų kelias** inicijuoja apoptozę, dalyvaujant įvairiems išoriniams bei vidiniams veiksniams, kurių perdavime netarpininkauja receptoriai, bet dalyvauja mitochondrijos (Elmore, 2007). Dirgikliai gali būti labai įvairūs: radiacija, laisvieji radikalai, virusinės infekcijos, augimo faktorių trūkumas ir kt., dėl kurių pakinta mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas (MIMP) ir iš mitochondrijų į citoplazmą patenka savitos molekulės, kurios sukelia kaspazių aktyvaciją ir kitus procesus, dėl kurių vyksta negrįžtamas apoptozės procesas: suskaldoma branduolyje esanti DNR, ląstelės turinys supakuojamas į pūsleles, kurias vėliau fagocituoja kaimyninės ląstelės arba fagocitai (Alberts *et al.*, 2002; Indran *et al.*, 2011).

Kadangi apoptozė yra genetiškai reguliuojama ląstelių žūties forma, jai reikalinga tam tikrų genų raiška arba jos slopinimas. Be Bcl-2 genų, koduojančių reguliacinius apoptozės baltymus, apoptozei yra svarbūs p53 genai, koduojantys vėžio supresorių ir transkripcijos faktorių p53. Baltymas p53 padidina ląstelės oksidacijos-redukcijos potencialą kontroliuojančių genų transkripciją, todėl ląstelėje pradeda gamintis reaktyvūs deguonies dariniai, kurie sutrikdo mitochondrijų reguliaciją (Green ir Reed, 1998; Blatt ir Glick, 2001).

Apoptozė gali vykti ir nuo kaspazių nepriklausomu keliu (Stevens *et al.*, 2013). **Išorinis arba mirties receptorių kelias** inicijuojamas, specifiniams

veiksniams sąveikaujant su transmembraniniais receptoriais. Tokia sąveika sukelia receptorių konformacinius pakitimus, kurie perduodami per ląstelės membraną (Rastogi *et al.*, 2009).

Šie du keliai yra tarpusavyje susiję: vienas kelias gali turėti įtakos kito kelio vyksmams (Indran *et al.*, 2011). Abu jie užsibaigia efektorinėje apoptozės stadijoje, kai inicijuojamos efektorinės kaspazės ir, nepriklausomai nuo pradinio kelio, ląstelės žūsta tuo pačiu būdu (3 pav.) (Elmore, 2007).



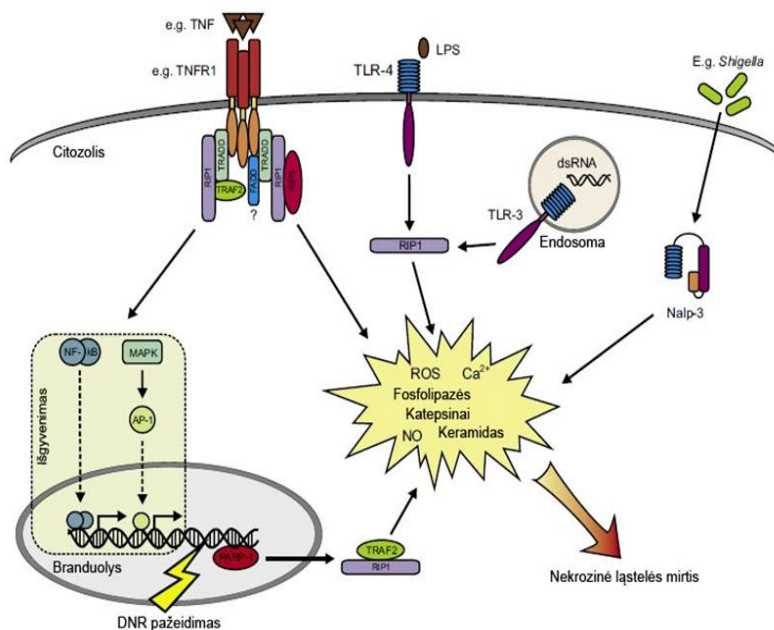
3 pav. Apoptozės vidinis ir išorinis keliai (pagal Elmore, 2007).

### 1.4.2. Nekrozė

Nekrozė – mirties forma, kuri apima didelį kiekį ląstelių ir sukelia uždegiminį atsaką audiniuose. Ilgą laiką nekrozė buvo laikoma atsitiktine, nekontroliuojama ir energijos nereikalaujančia ląstelių žūties forma. Tokia ji ir yra, kai žūtį sukelia fizinis ar cheminis poveikis, pvz., hipertermija ar detergentų sukelta citolizė. Nekrozinė ląstelės žūtis įvyksta ir dėl daugelio kitų priežasčių. Ją gali sukelti reaktyviosios deguonies formos (ROS), katepsinai, fosfolipazės, NO ir keramidas. Pavyzdžiui, ROS oksiduoja/peroksiduoja polinesočiąsias riebalų rūgštis, esančias membranose, dėl to iš mitochondrijų ir

lizosomų į aplinką patenka hidrolazės, lipazės ir nukleazės, kurios ir sukelia nekrozinę ląstelės žūtį (Proskuryakov ir Gabai, 2010).

Dabar nustatyta, jog nekrozinė ląstelės žūtis gali būti ir programuota, valdoma nuo kaspazių priklausomais keliais. Ši nekrozės forma pavadinta - nekroptoze. Galutinėje nekroptozės fazėje, kaip ir nekrozės atveju, suyra mitochondrijų, lizosomų ir plazminės membranos (Vandenabeele *et al.*, 2010) (4 pav.). Ją sukelia labai stiprūs cheminiai, mechaniniai pažeidimai arba, reguliuojamos žūtis atveju, tam tikri stimulai. Nekroptoze dažniausiai pasireškia, sutrikus kaspazių kontroliuojamai ląstelių žūčiai (Stevens *et al.*, 2013). Daugelyje ląstelių, ligandui aktyvavus mirties receptorių, pagrindinis ląstelės žūtis kelias yra apoptozė, o ne nekrozė. Tačiau jeigu kaspazių aktyvumas apoptoziniame kelyje yra sutrikęs, nekrozė ima veikti kaip atsarginis ląstelių žūtis kelias (Durpez *et al.*, 2009). Nekrozinė ląstelė pasižymi tuo, kad nesugeba palaikyti savo vientisumo, plazminė membrana tampa pralaidi, įvyksta vandens ir užląstelinių jonų skverbimasis į ląstelės vidų. Ląstelė padidėja, išbrinksta organelės, ypač mitochondrijos. Chromatinas nekrozinėje ląstelėje beveik nepakinta, bet gali vykti jo fragmentacija. Ląstelės plazminei membranai suirus, į tarpląstelinę ertmę patenka mirštančios ląstelės turinys, kuris organizme sukelia uždegiminį atsaką (Murakami *et al.*, 2011).



4 pav. Galimi nekrozės mechanizmai (pagal Durpez *et al.*, 2009).

### 1.4.3. Autofagija

Autofagija - tai biodegradacijos procesas, kurio metu vyksta ląstelės savaiminis susinaikinimas, t. y., suskaidomos biomolekulės ir pažeistos organelės (Lorin *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2011). Ląstelės žūtį autofagijos būdu gali sukelti badavimas, deguonies trūkumas, audinių ir ląstelių persitvarkymas bei temperatūriniai pokyčiai (Tsujimoto *et al.*, 2005). Vykstant autofagijai, savo funkciją atlikę baltymai ar organelės yra apribojami dvimembranės struktūros – susiformuoja autofagosoma (Finkel *et al.*, 2007; Jodi *et al.*, 2010; Lorin *et al.*, 2013). Vėliau autofagosoma žinduolių ląstelėse susilieja su lizosoma ir vyksta tolesnis baltymų ar organelių perdirbimas iki elementų, kurie vėl bus panaudoti ląstelės metabolizme (Lorin *et al.*, 2013; Essick *et al.*, 2010).

Autofagijos procesas gali pašalinti veiksnius, sukeliančius ląstelės stresinę būseną, pavyzdžiui, pašalinti pažeistas mitochondrijas, tokiu būdu sutrukdant aktyvių deguonies formų sudarymą ir ląstelės žūtį. Autofagija taip pat atlieka svarbų vaidmenį šalinant pažeistą endoplazminį tinklą, mažinant DNR pažeidimus ir genominių nestabilumą. Vėžinės ląstelės, kuriose autofagija yra apribota, pasižymi padidintu genetiniu nestabilumu ir sparčia proliferacija. DNR pažeidimai gali indukuoti stresinį p53 atsaką. Esant šio baltymo funkcijos sutrikimams, ląstelėse gali būti stimuliuojama proliferacija, nepaisant DNR pažeidimų ir vykstančios autofagijos (Altman *et al.*, 2012).

Nustatyta, kad naviko augimas ir autofagija, kaip ir atsparumas chemoterapijai, gali priklausyti nuo ląstelių oksidacinės būsenos. Kiekvienos ląstelės ar organizmo gyvavimo laikotarpiu patiriamas anaerobinis metabolizmas lemia trumpalaikės oksidacinio streso būklės, dėl to atsiranda įvairių struktūrų pažeidimų (He LQ *et al.*, 2013; Stonys *et al.*, 2013; Essick ir Sam, 2010). Ląstelės, kurių autofagijos funkcija susilpnėjusi, nesugeba pašalinti ROS padarytos žalos ir besikaupiantys pažeisti baltymai bei organelės lemia ląstelės žūtį (Stonys *et al.*, 2013).

Sekančiuose poskyriuose aptarsime ROS susidarymo įtaką navikų vystymuisi ir priešvėžinei chemoterapijai.

### **1.5. Oksidacinio streso ir kitų bioredukcinų reiškinų vaidmuo priešvėžinės chemoterapijos procese**

Flavininių, geležies-sieros (FeS) ir heminių oksidoreduktazinių fermentų katalizės metu, pvz., mitochondrijų kvėpavimo arba fotosintetinio elektronų pernešimo, arba mikrosominio hidroksilinimo grandinėse NAD(P)H ar kitų elektronų donorų redukciniai ekvivalentai yra sunaudojami deguonies ( $O_2$ ) redukcijai į vandenį ( $H_2O$ ). Tačiau šių procesų metu ląstelėje susidaro ir šalutiniai produktai, t. y., deguonies radikalai ir kitos aktyvios deguonies junginių formos (ROS):  $O_2^-$  (superoksido radikalas);  $H_2O_2$  (vandenilio peroksidas) ir  $OH\cdot$  (hidroksilo radikalas). Šie produktai yra žalingi ląstelei, nes ROS (per)oksiduoja baltymus, paveikia DNR: a) ląstelių membranose indukuoja įvairius pokyčius, tokius, kaip padidėjęs ląstelių membranų pralaidumas, membranų struktūriniai defektai, transmembraniniai pralaidumo kanalai (Marnett, 1999); b) laisvieji radikalai reaguoja su branduolio ir mitochondrijų DNR ir sukelia jos vijos įtrūkius (Oikawa *et al.*, 2003) ir c)  $H_2O_2$  gali oksiduoti -SH grupes baltymuose ir moduluoti baltymų aktyvumą (Marinho *et al.*, 2013). ROS poveikyje gali atsirasti DNR bazių porų pakitimai, rečiau pasitaiko delecijos ar intarpai. Jei šios mutacijos atsiranda ląstelėms svarbiuose genuose, gali prasidėti kancerogenezės procesas (Waris ir Ashan, 2006). Nors DNR pažeidimai yra labai dažnai aptinkami oksidacinio streso metu, yra manoma, jog lipidų peroksidacija, o ne DNR pažeidimai, yra atsakinga už oksidacinio streso metu sukliamą ląstelių žūtį (Avery, 2011). Tačiau ROS toksišką poveikį homeostazėje neutralizuoja ląstelės antioksidantiniai mechanizmai, kurie skirstomi į tris grupes: ląstelinius, membraninius ir užląstelinius (Gutteridge, 1995). Medžiagos, kurios žymiai prailgina arba visiškai sustabdo substratų oksidavimą, vadinamos antioksidantais. Ląsteliniams antioksidantams priskiriami fermentai superoksiddismutazės, peroksidazės, katalazės, gliutatio reduktazė, o

užląsteliniams antioksidantams – įvairūs metalus surišantys baltymai (Oberley, 2002). Membraniniams antioksidantams priskiriami mažos molekulinės masės gaudyklės (pavyzdžiui, vitaminas E ir jo dariniai) (Betteridge, 2000).

Antra vertus, vėžio ir kitų patologijų atveju ROS generacija gali ir pagreitėti, t. y., vykta oksidacinis stresas, kurio ląstelės antioksidacinės sistemos nesugeba pilnai neutralizuoti. Tokių procesų šaltiniai gali būti įvairūs: mitochondrijų kvėpavimo grandinės sutrikimai, uždegiminių citokinų metabolizmo reakcijos, lipoksigenazių bei citochromo P-450 veikla, sutrikusi ATP sintezė, augimo faktorių įtaka NAD(P)H-oksidazės aktyvumui (Pelicano *et al.*, 2004). ROS gali atsirasti ir dėl išorinių veiksnių, tokių kaip UV ir jonizuojančios spinduliuotės, aplinkos toksinų ir chemoterapinių preparatų poveikio (Martindale ir Holbrook, 2002; Waris ir Ashan, 2006; Klaunig *et al.*, 2011). Oksidacinis stresas pasireiškia ir esant antioksidantų trūkumui.

Sekančiuose poskyriuose aptariame chinonų bei jų redukuotųjų formų (polifenolių) vaidmenį ROS susidaryme ir kituose su bioredukicine aktyvacija susietuose procesuose, svarbiuose priešvėžinėje chemoterapijoje.

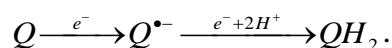
### **1.6. Chinoniniai junginiai ir jų citotoksiškumo mechanizmai**

Chinonai (Q) yra aromatiniai diketonai, kuriems yra būdingas redokso virsmų grįžtamumas su jų dvielektroninės redukcijos produktais *p*-hidrochinonais arba *o*-hidrochinonais (katecholiais) (QH<sub>2</sub>), o taip pat su jų tarpiniais vienelektroninės redukcijos produktais (semichinonais, Q<sup>•-</sup>) (Bolton *et al.*, 2000). Chinonai dalyvauja daugelyje gyvūnų ir augalų ląstelių biocheminių procesų, pvz., jie perneša elektronus mitochondrijų kvėpavimo ir fotosintezės procesuose, postransliacinėje baltymų modifikacijoje, metabolizuojant ląstelės signalines molekules, antioksidantus ir signaliniams tokoferoliams giminingus junginius (Rucker *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Shearer ir Newman, 2008; Bentinger *et al.*, 2010). Kiti gamtiniai chinonai (antraciklinai, mitomicinai, naftochinonai ir benzochinonai) turi antibiotinių ir priešvėžinių savybių, todėl

gali būti traktuojami kaip biologiškai aktyvūs junginiai (Volpe *et al.*, 2010; Nirmala *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2007).

Chinonai, patekę į ląstelę, dažniausiai ne iš karto būna aktyvūs. Kad jie taptų aktyvūs ir galėtų sukelti ląstelių žūtį, jie turi būti redukuoti. Chinonus ląstelėse lengvai redukuoja tam tikri fermentai – reduktazės (P450R, b5R, NQO1, karbonilo reduktazė ir tioredoksino reduktazė).

Chinonai dvielektronės redukcijos metu yra redukuojami iki hidrochinų (QH<sub>2</sub>). Ši redukcija vyksta dviem pakopomis, susidarant tarpiniam semichinono (Q<sup>•-</sup>) radikalui, kuris vėliau redukuojamas iki hidrochinono (Rich *et al.*, 1980):

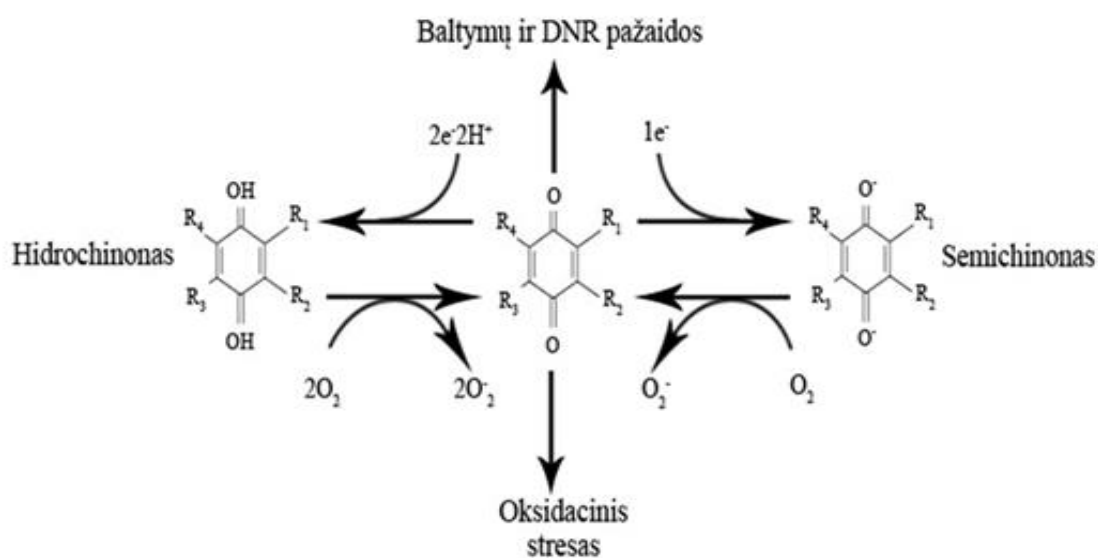


Kadangi semichinonų  $pK_a$  ( $pK_a(QH^{\bullet})$ ) yra žemas (2,0-5,1) prie pH 7.0, jie egzistuoja anijoninėje formoje. Pirmojo elektrono pernašos energetika yra charakterizuojama redokso poros chinono/semichinono potencialu,  $E^1_7$ . Biologiškai aktyvių chinonų  $E^1_7$  kinta nuo 0,36 V iki -0,5 V (Wardman, 1989; O'Brien, 1991). Antrojo elektrono pernaša yra lydima dviejų protonų pernešimo, nes hidrochinonai disocijuoja prie aukštesnių pH ( $pK_a(QH_2) = 7.0-13.0$ ), ir yra charakterizuojama  $E^2_7$ . Standartinis chinono/hidrochinono poros redokso potencialas  $E^0_7$  yra lygus  $(E^1_7 + E^2_7)/2$  ir yra nustatomas elektrochemiškai. Kaip taisyklė,  $E^1_7 \ll E^2_7$ , todėl Q<sup>•-</sup> yra nestabilus, o chinono  $E^1_7$  yra nustatomas impulsinės radiolizės metodais (Wardman, 1989; Bailey ir Ritchie, 1985). Elektronus atiduodantys radikalai (hidroksi-, alkoksi-, amino grupės) sumažina  $E^1_7$  ir  $E^0_7$  reikšmes, o elektronus priimantys pakaitalai (nitro-, karboksi-, sulfo- grupės) jas padidina. Aromatinės sistemos išplėtimas sumažina  $E^1_7$  ir  $E^0_7$  reikšmes (Wardman, 1989; O'Brien, 1991).

Nepaisant skirtingų struktūrų, galioja keli bendri chinonų aktyvacijos ir poveikio ląstelei mechanizmai (5 pav.) (Bolton *et al.*, 2000; Monks *et al.*, 1992). Visų pirma tai, kad chinonų citotoksiškumas yra susijęs su jų vien- ir dvielektroninės redukcijos, kurią dažniausiai katalizuoja flavininiai fermentai,



greičiu. Antra, antraciklinams (adriamicinui, daunorubicinui ir pan.) yra būdinga interkaliacija į DNR, ir, greičiausiai, topoizomerazių slopinimas, kuri žymiai prisideda prie šių junginių citotoksiškumo. Be to, teigiamas antraciklinų krūvis skatina jų akumuliaciją ląstelėje, tuo padidindamas jų citotoksiškumą (Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005). Trečia, kadangi chinonai yra elektrofiliniai junginiai, jie lengvai reaguoja su sieros turinčiais nukleofilais, pvz., GSH ar cisteino liekanomis baltymuose. Todėl ląstelėse sumažėja GSH kiekis. Prie chinono žiedo prisijungus sieros atomui, po to šiam junginiui susioksidavus, gaunamas chinono tioeteris. Chinono tioeteriai yra daugelio neurologinių susirgimų priežastis (Monks *et al.*, 1997). Be to, kai kurie chinonai reaguoja su nukleofilinėmis amino grupėmis, esančiomis baltymuose arba DNR (Bolton *et al.*, 2000).



**5 pav. Pagrindiniai chinonų veikimo mechanizmai: laisvųjų radikalų formavimas ir sukeliama DNR ir baltymų pažeidimai (pagal Bolton *et al.*, 2000).**

Toliau yra aptariami citotoksiniai chinonų vien- ir dvielektroninės redukcijos vaidmenys.

### **1.6.1. Viennelektroninė fermentinė chinonų redukcija, ROS susidarymas ir jų citotoksinis poveikis**

Viennelektroninę chinonų redukciją ląstelėje atlieka flavininės dehidrogenazės-elektrontransferazės, dažniausiai mikrosomų NADPH:

citochromo P-450 (citochromo *c*) reduktazė (FK 1.6.2.4) ir mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksas I (NADH:ubichinono reduktazė, FK 1.6.5.9) (Čėnas *et al.*, 2004). Šiems fermentams yra būdingas didelis neutralaus flavininio semichinono (FMN) ar FADH) stabilumas redokso pusiausvyroje. Be to, galimi chinonų laisvųjų radikalų šaltiniai yra ir žinduolių NADPH:adrenodoksinoreduktazės (FK 1.18.1.6) ir FeS baltymo adrenodoksino kompleksas (Marcinkevičienė *et al.*, 1990), kur pagrindinį vaidmenį atlieka FeS baltymo katalizuojama chinonų redukcija.

Reaguojant su aukščiau minėtais fermentais, chinonų reakingumas ( $\log k_{cat}/K_m$ ) paraboliskai didėja, didėjant chinonų vienelektroninės redukcijos potencialui ( $E^1_7$ ) (Čėnas *et al.*, 2004). Tai atitinka „išorinės sferos“ elektrono pernešimo modelį šiose reakcijose (Marcus ir Sutin, 1985). Po chinono radikalo ( $Q^{\cdot-}$ ) reoksidacijos deguonimi seka superoksido ( $O_2^{\cdot-}$ ) susidarymas, kuris, savo ruožtu, sukelia  $H_2O_2$  susidarymą. Deguonis efektyviai oksiduoja semichinonus, kurių  $E^1_7 \leq -0,1$  V (O'Brien, 1991). Toliau,  $Fe^{2+}$  ar kitų metalų jonų reakcijos su  $H_2O_2$  metu (*Fentono reakcija*) susidaro hidroksilo radikalas ( $OH^{\cdot}$ ), kuris ir yra svarbiausias agentas, hidroksiliantis baltymus, fosfolipidus ir DNR (Ollinger ir Kågedal, 2000). Todėl, tiriant priešnavikinį chinonų veikimą, yra ypatingai svarbu nustatyti jų nespecifinį, t. y., oksidacinio streso sukeltą citotoksiškumą, ir jį eliminuoti. Tipiškai, pastarasis citotoksiškumas didėja, didėjant chinonų  $E^1_7$ , ir yra charakterizuojamas  $\Delta \log cL_{50}/\Delta E^1_7 \sim -10$  V<sup>-1</sup>, kur  $cL_{50}$  yra chinono koncentracija, sukelianti 50 % ląstelių žūtį (Šarlauskas *et al.*, 2015; O'Brien, 1991; Wardman, 1990). Antra vertus, įskaitant ir aukšto (0,0-0,2 V)  $E^1_7$  chinonus, jų citotoksiškumas gali būti aprašomas ir paraboline  $\log cL_{50}$  vs.  $E^1_7$  priklausomybe (Šarlauskas *et al.*, 2015; Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2003; 2015), t. y., su ribinės  $cL_{50}$  vertės pasiekimu. Tai gali būti susieta su kritine chinonų citotoksiškumo riba dėl jų nestabilumo, greičiausiai dėl jų greitų reakcijų su, pavyzdžiui, -SH grupėmis, kurios gali sumažinti jų ROS generacijos efektyvumą (Wardman *et al.*, 1995). Be to, šio tipo citotoksiškumas yra inhibuojamas Fe-chelatoriaus desferioksamino (desferalio), antioksidanto

*N,N'*-difenilen-*p*-diamino (DPPD) ir skatinamas BCNU (1,3-bis (2-chloretil) - 1-nitrozokarbamidas) , kuris yra antioksidacinio fermento gliutationreduktazės inaktyvatorius (Ollinger ir Brunmark, 1991).

### **1.6.2. Dvielektroninė chinonų fermentinė redukcija ir jos fiziologinis poveikis**

Žinduolių ląstelėse vyksta ir dvielektroninė chinonų redukcija, kur pagrindinį vaidmenį atlieka NAD(P)H:chinono oksidoreduktazė (NQO1 arba DT-diaforazė, FK 1.10.5.1) (Ross ir Siegel, 2004). Šis homodimerinis fermentas yra sudarytas iš dviejų 32 kD subvienetų. Abu NQO1 dimero aktyvieji centrai, turintys FAD kofaktorius, yra lokalizuoti subvienetų interfaziniame domene (Faig *et al.*, 2000). Dauguma DT-diaforazės (>90 %) yra aptinkama citozolyje, tačiau nedidelis šio baltymo kiekis randamas ir branduolyje. NQO1 labiausiai paplitusi kepenyse, inkstuose ir virškinamajame trakte. Daugeliu atvejų NQO1 aktyvumas vėžinėse ląstelėse yra žymiai padidėjęs lyginant su sveikomis organizmo ląstelėmis (Siegel *et al.*, 2012).

DT-diaforazės oksidatorių spektras labai platus, tai įvairios struktūros chinonai, jų epoksidai, nitroaromatiniai ir azojunginiai (Misevičienė *et al.*, 2006). NQO1 yra efektyviai inhibuojama dikumarolo, kurio konkurentinė NAD(P)H atžvilgiu  $K_i$  priklausomai nuo eksperimento sąlygų kinta nuo 10 iki 100 nM (Anusevičius *et al.*, 2002).

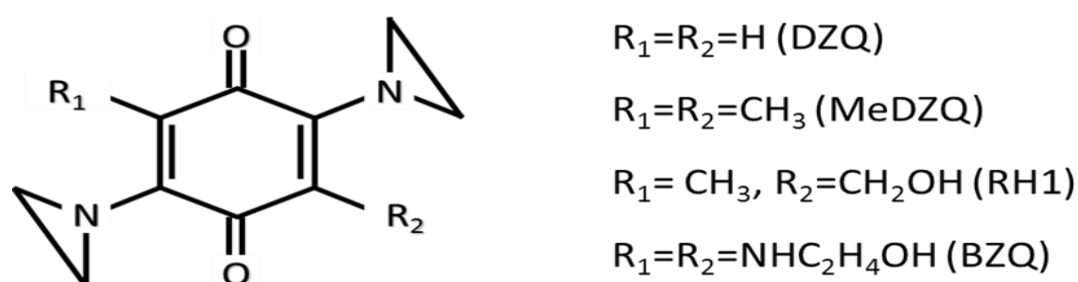
Viena iš DT-diaforazės funkcijų yra kai kurių chinonų, pvz., alkilpavaduotų benzo- ir naftochinonų detoksifikacija, nes dvielektroninės redukcijos metu yra išvengiama semichinonų susidarymo, kurie gali sukelti oksidacinį stresą (Nguyen *et al.*, 2013). Dvielektroninės redukcijos metu susidarę santykinai stabilūs hidrochinonai fermentinėse reakcijose yra konjuguojami su gliukurone rūgštimi arba sulfatu, susidarant hidrofiliniams junginiams, lengviau pašalinamiems iš ląstelių (Ross *et al.*, 2000). Taip pat NQO1 dėka yra išvengiama ir chinonų kovalentinio prisijungimo prie ląstelės nukleofilų, nes susidarę stabilūs hidrochinonai prie nukleofilų savaime

prisijungti nebegali (Ross *et al.*, 2000). Be to, NQO1 stabilizuoja p53 baltymą, ir taip padeda išvengti jo degradacijos proteosomose (Asher *et al.*, 2001).

Tačiau NQO1 atliekamos dvielektronės redukcijos metu gali susidaryti ir citotoksiški hidrochinonai. Jie gali autooksiduotis, sukeldami oksidacinį stresą. Kaip taisyklė, NQO1 stimuliuoja arba nedaro įtakos hidroksinaftochinonų (5-hidroksi-1,4-naftochinono, 5,8-dihidroksi-1,4-naftochinono ir jų darinių) citotoksiškumui, nes jų hidrochinonai labai greitai reoksiduojasi (Ollinger ir Brunmark, 1991). Šiame kontekste atskirus atvejus sudaro aziridinil-pavaduotų benzochinonų, kaip potencialių priešvėžinių preparatų, poveikio mechanizmai bei gamtinių polifenolinių antioksidantų ((poli)hidroksibenzenų ir flavonoidų) prooksidacinis poveikis. Šie klausimai bus nagrinėjami dviejuose sekančiuose poskyriuose.

### 1.7. Aziridinil-pavaduotų benzochinonų citotoksiškumas

Aziridinil-pavaduoti 1,4-benzochinonai nuo 1970 m. yra traktuojami kaip priešvėžiniai vaistai, tačiau jų taikymą dažnai riboja pašalinis poveikis (Di Francesco *et al.*, 2004), pasireiškiantis limfiniam audiniui, kaulų čiulpams ir kraujui (Hargreaves *et al.*, 2000; Begleiter *et al.*, 2007). Jų tipiškos formulės yra pateiktos 6 pav.



6 pav. Aziridinil – pavaduotų benzochinonų struktūrinė formulė.

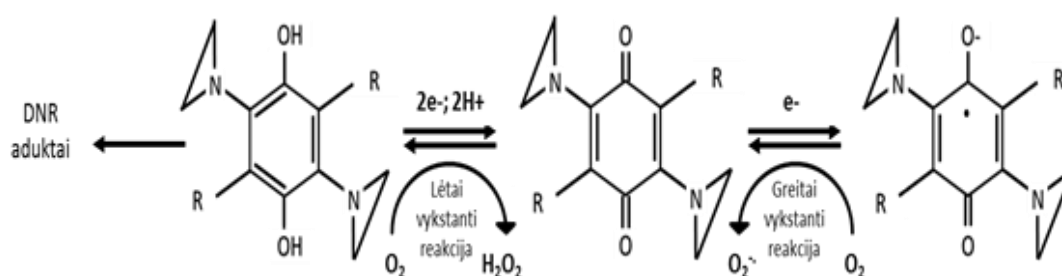
Aukštas priešvėžinis šių junginių aktyvumas pagrindinai yra siejamas su jų dvielektrone redukcija, kurią vykdo NQO1 (Di Francesco *et al.*, 2004), o šio fermento aktyvumas daugelyje vėžinių ląstelių yra žymiai didesnis nei sveikose ląstelėse.

Yra žinomi trys galimi citotoksiniai aziridinil-benzochinonų veikimo mechanizmai (7 pav.):

**a) jų fermentinė dvielektronė redukcija iki aziridinil-hidrochinonų,** kurie žymiai lengviau alkilina DNR; aziridino grupių DNR alkilinantys aktyvumas didėja, didėjant jų protonizacijos  $pK_a$ , kuris išauga stiprėjant pakaitalų elektronodonorinėms savybėms; pavyzdžiui, DZQ ir AZQ aziridino  $pK_a$  yra 3,8-4,0, tuo tarpu jų hidrochinonų  $pK_a$  yra 7,5 ir 8,3, atitinkamai (Šarlauskas *et al.*, 2015); bioredukcinis DNR alkilinimas yra būdingas 2e-redukuotiems diaziridinil-pavaduotais chinonams, pvz., MeDZQ, DZQ, AzQ, kurių  $E^{17} = -0,05 - -0,23$  V (Di Francesco *et al.*, 2004; Čėnas *et al.*, 2004); šie chinonai tiesiogiai nealkilina DNR, tačiau šiuo atveju dėl lėtos hidrochinonų autooksidacijos gali pasireikšti oksidacinis stresas (Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005);

**b) oksidacinis stresas, sukeltas aziridinil-pavaduotų chinonų vienelektroninės redukcijos ir laisvųjų radikalų susidarymo:** kai kada aziridinil-pavaduoti benzochinonai paklūsta toms pačioms parabolinėms  $\log k_{cat}/K_m$  priklausomybėms nuo  $E^{17}$ , kaip ir jų aziridinil-nepavaduoti analogai (Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2003; Čėnas *et al.*, 2004) ir

**c) tiesioginis DNR alkilinimas,** kuris yra būdingas žemo redokso potencialo junginiams, pvz. BZQ ( $E^{17} = -0,38$  V, ir  $pK_a = 4,5$ ) (Butler *et al.*, 1989; Hargreaves *et al.*, 2000; Di Francesco *et al.*, 2004).



**7 pav. Aziridinil-1,4-benzochinonų bioredukcija: a) jų dvielektronė redukcija iki hidrochinonų, b) vienelektronė redukcija iki aniono radikalo.**

### **1.7.1. Aziridinilbenzochinono 2,5-diaziridinil-3,6-dimetil-1,4-benzochinono (MeDZQ) citotoksiškumas**

2,5-diaziridinil-3,6-dimetil-1,4-benzochinonas (MeDZQ) yra vienas iš chinonų, pasižymintis priešvėžiniu poveikiu (6 pav.). Nors MeDZQ yra puikus NQO1 substratas, tačiau dėl blogo tirpumo jo pritaikymo galimybės yra ribotos. Tik redukuotas MeDZQ alkilina ir neteisingai suriša DNR grandines, taip sukeldamas toksišią poveikį ląstelėms (Lee *et al.*, 1992; Hargreaves *et al.*, 1997; Hargreaves *et al.*, 2000). Eksperimentais *in vitro* yra parodyta, kad MeDZQ yra selektyviai toksiškas ląstelėms, turinčioms aukštus NQO1 kiekius (Beall *et al.*, 1995). Citotoksišią MeDZQ efektą gali sukelti ir P450R indukuota vienelektronė redukcija. Tačiau dėl P450R sukulto citotoksinio poveikio yra aktyvuojamas nekrozinis, o ne apoptozinis ląstelės žūties kelias. Apoptozinė ląstelės žūtis yra sukeliama dėl NQO1, bet siūlomi apoptozės indukcijos mechanizmai yra beveik neištirti (Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005).

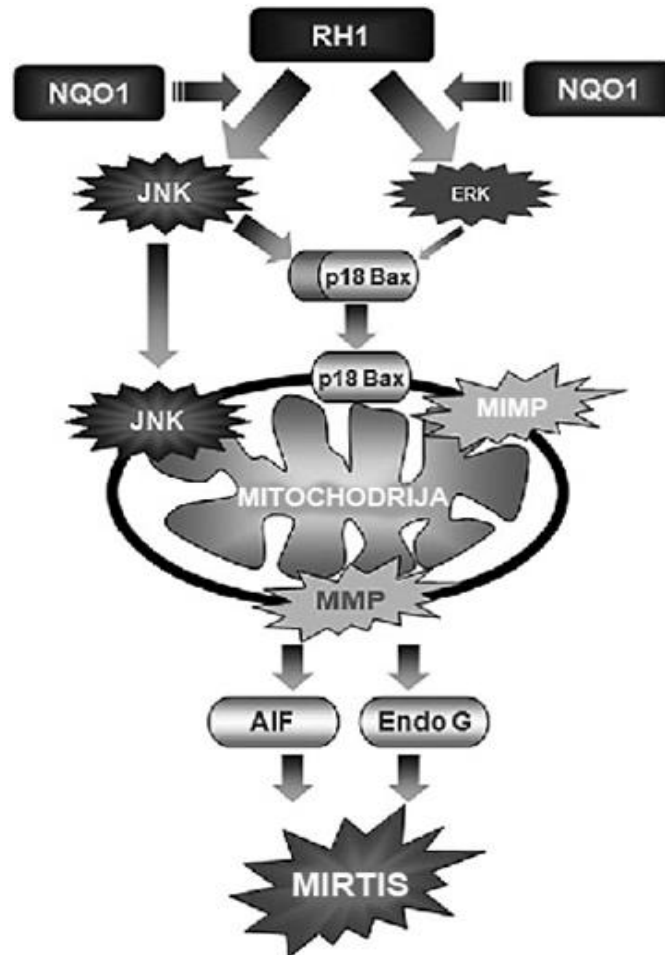
### **1.7.2. Aziridinilbenzochinono 2,5-diaziridinil-3-(hidroksimetil)-6-metil-1,4-benzochinono (RH1) citotoksiškumas**

Mūsų darbe tiriamas vienas iš stipriausių priešvėžinių poveikių turinčių chinonų – aziridinil-benzochinonas 2,5-diaziridinil-3-(hidroksimetil)-6-metil-1,4-benzochinonas (RH1) (6 pav.). RH1 priešvėžinis poveikis buvo charakterizuotas ikiklinikiniais ir 1-osios fazės klinikiniais tyrimais (Ward *et al.*, 2005; Hussein *et al.*, 2009). Palyginus su MeDZQ, hidroksimetilo grupė suteikia RH1 didesnę tirpumą vandenyje, ir tai, galbūt, apsprendžia jo didesnę citotoksiškumą (Danson *et al.*, 2004). Yra nustatyta, kad RH1 aktyvumas yra žymiai didesnis tose ląstelėse, kuriose NQO1 raiška yra padidėjusi (Danson *et al.*, 2004). Todėl manoma, kad pagrindinis priešvėžinis RH1 veikimas pasireiškia dėl NQO1 vykdomos šio chinono dvielektronės redukcijos (Tudor *et al.*, 2005, Pierce *et al.*, 2010).

Nors buvo neatmesta galimybė, kad RH1 bioaktyvacijai ir citotoksiškumui įtakos gali turėti ir kiti fermentai, pvz., P450R, ar NADH:citochromo *b*<sub>5</sub> reduktazė (Tudor *et al.*, 2005), vėlesni tyrimai parodė,

kad šių fermentų įtaka yra menka arba vidutiniška (Yan *et al.*, 2008; Begleiter *et al.*, 2007).

Taip pat yra duomenų apie RH1 indukuojamos apoptozės mechanizmą ląstelėse, kurios turi didelius NQO1 kiekius (8 pav.).



8 pav. RH1 sukeliama apoptozė ląstelėje (pagal Park *et al.*, 2011).

RH1 aktyvuoja JNK ir ERK kinazes, kurios svarbios mitochondrijų keliu sukeliama ląstelių apoptozei. Aktyvuota JNK indukuoja baltymo Bax skėlimą ir šio baltymo translokaciją į mitochondrijas. Mitochondrijose Bax sukelia mitochondrijų membranos potencialo pakitimą, dėl kurio prasideda mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas (MIMP). Dėl MIMP iš mitochondrijų į citoplazmą patenka baltymai, atsakingi už apoptozės vyksmą. Tačiau JNK kinazė ir pati gali translokuotis į mitochondrijas, kuriose vykdo baltymų Bcl-2 ir Bcl-xL fosforilinimą, taip sukeldama ląstelės žūtį (Park *et al.*, 2011). Taip pat manoma, kad p53 gali turėti įtakos RH1 sukeliama ląstelių

apoptozei, nes chinonai skatina šio, pastoviai ląstelėse sintetinamo, baltymo aktyvaciją (Park *et al.*, 2011).

### **1.8. Polifenoliniai junginiai ir jų citotoksinio veikimo mechanizmai**

Biocheminės toksikologijos ir navikų chemoterapijos kontekste pakankamai svarbi yra ir aukščiau paminėta lėta redukuotųjų chinonų (hidrochinonų) (auto)oksidacija, kuri yra susieta su polifenolinių junginių (polihidroksibenzenų ir flavonoidų), šiaip jau pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis, citotoksiškumu (Marozienė *et al.*, 2012, Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005). Šie junginiai dažnai traktuojami kaip naudingi maisto komponentai ar priedai, nors toks apibendrinimas yra rizikingas.

Polifenoliai, kurių išskirtinis bruožas yra dvi ar daugiau fenolinių grupių junginio sudėtyje, randami daugelyje vaisių ir daržovių (Vinson *et al.*, 1998; Vinson *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2006). Jie yra atsakingi už organizmo apsaugą nuo UV spindulių ir agresyvių patogenų, o maistui gali suteikti kartumą, aštrumą, spalvą ir kvapą bei oksidacinį stabilumą. XX a. pabaigoje atlikti epidemiologiniai tyrimai ir metaanalizė parodė, kad ilgalaikis vartojimas augalų, kurie turi didelį kiekį polifenolių, gali apsaugoti nuo vėžio (Kuriyama *et al.*, 2006; Vauzour *et al.*, 2010), širdies ir kraujagyslių ligų (Hertog, *et al.*, 1993; Ambrose *et al.*, 2004) ir neurodegeneracinių sutrikimų (Checkoway *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2005). Polifenoliai yra skirstomi į fenolines rūgštis, stilbenus, lignanus ir flavonoidus (Padney *et al.*, 2009):

**Fenolinės rūgštys** (hidroksibenzoinės ir hidroksicinaminės rūgštis dariniai) randamos kai kuriose daržovėse, tokiose kaip juodieji ridikai, svogūnai ir pan., jų koncentracija šiuose augaluose siekia iki iki 10 mg/kg. Dažniausiai tai yra *p*-kumarininė, kofeininė, ferulinė ir sinapinė rūgštis.

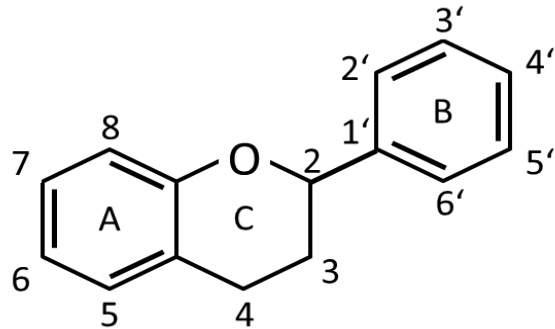
**Stilbenai** turi du fenilo fragmentus, sujungtus metileno (-CH=CH-) tilteliu. Augaluose stibenai atlieka priešgrybinių fitoaleksinų - junginių, kurie sintezuojami tik esant žaizdai arba infekcijai, vaidmenį. Vienas iš geriausiai



ištirtų ir natūraliai aptinkamų stibenų yra resveratrolis, kuris randamas daugiausiai vynuogėse ir vyne.

**Lignanai**, difenoliniai junginiai, turintys 2,3-dibenzilbutano struktūrą, kuri susiformuoja po dviejų cinamono rūgščių liekanų dimerizacijos. Didžiausius lignanų kiekius turi linų sėmenys.

**Flavonoidai** yra labiausiai tyrinėta ir gausiausia polifenolių grupė ( $n > 6000$ ). Šie junginiai turi du benzeno žiedus (A ir B), tarpusavyje sujungtus deguonį turinčiu pireno žiedu (C) (Chang, 2009) (9 pav.). Pakaitų, prijungtų prie pagrindinės flavonoidų



9 pav. Struktūrinė flavonoidų formulė.

struktūros, skaičius ir prigimtis - veiksniai, nulemiantys jų chemines ypatybes ir biologinį aktyvumą. Didėjantis hidroksilų ir angliavandenių liekanų skaičius didina junginių tirpumą vandenyje, tuo tarpu hidroksilo grupių metilinimas mažina tirpumą vandenyje. Laisvos hidroksilo grupės yra labiau reaktyvios negu glikozilintos ar metilintos (Halbwirth, 2010).

Flavonoidai yra skirstomi į šešias pagrindines grupes: flavonoliai, flavanonai, katechinai, flavonai, antocianidai, izoflavonoidai (Perron *et al.*, 2009). Klinikinė šių junginių reikšmė jau seniai įrodyta – jie yra visuotinai pripažinti antioksidantai, kurie gali apsaugoti ląsteles nuo oksidacinio streso (Rice-Evans *et al.*, 1996). Jų gebėjimas neutralizuoti laisvuosius radikalus ir singletinį deguonį, koordinuoti metalų jonus ir dalyvauti vitamino C apykaitoje yra svarbūs gydant įvairius susirgimus, pvz., širdies ir kraujagyslių, onkologines, kepenų ir kitas ligas. Be to, yra žinoma, kad flavonoidai nuo žalingo oksidacijos poveikio saugo mažo tankio lipoproteinus. Dėl visų šių savybių jie pasižymi priešūždegiminėmis, priešalerginėmis, priešvirusinėmis, priešvėžinėmis savybėmis. Flavonoidai žmogaus organizme negaminami, todėl jų būtina gauti su maistu. Nuolatinis maisto, kuriame gausu flavonoidų,

vartojimas aktyvina visų organizmo sistemų veiklą, padeda apsisaugoti nuo žalingų aplinkos veiksnių bei atitolina ligas. Tačiau aukštos flavonoidų koncentracijos yra ir citotoksiškos. Žemiau pateikiami pagrindiniai flavonoidų ir kitų polifenolių citotoksiškumo mechanizmai.

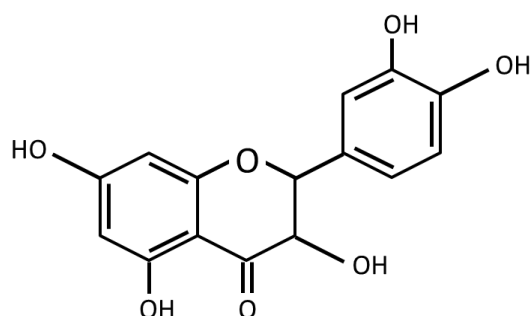
**1. Prooksidantinis veikimas.** Prooksidantinis flavonoidų veikimas yra susietas su jų autooksidacija ląstelių auginimo terpėje ir ląstelės viduje (Sergedienė *et al.*, 1999; Boersma *et al.*, 2000; Galati *et al.*, 2002; Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005). Šias reakcijas pagreitina deguonies ir pereinamųjų metalų (Fe, Cu) jonai (Carocho *et al.*, 2013; Galati *et al.*, 2002). Jų metu formuojasi ROS ir peroksilo radikalai, kurie žaloja DNR, lipidų ir kitų biologinių molekulių struktūras, taip pat jie gali dalyvauti mitochondrinio kvėpavimo slopinime.

Tipiškai, flavonoidų prooksidantinis aktyvumas ir citotoksiškumas didėja, didėjant –OH grupių skaičiui, ypač B-žiede. Tai yra susieta su redokso poros fenoksilo radikalas/fenolis ( $E^{27}$ ) potencialo mažėjimu. Keturių linijų ląstelėse (FLK (galvijų leukemijos virusu transformuoti ėriuko embriono fibroblastai), MH-22A (pelės hepatomos ląstelės), HL-60 (žmogaus promielocitinės leukemijos ląstelės) ir pirminiuose pelės splenocituose nustatyta, kad flavonoidų citotoksiškumas didėja ( $\log cL_{50}$  mažėja), mažėjant jų  $E^{27}$ , ir didėjant jų lipofiliškumui ( $\log D$ , oktanolio/pH 7,0 buferinio tirpalo pasiskirstymo koeficientui) (Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005; Miliukienė *et al.*, 2014). Nustatyta, kad citochromų P-450 katalizuojamas flavonoidų hidroksilinimas ar jų oksidacinis demetilinimas skatina jų citotoksiškumą, tuo tarpu katechol-*o*-metiltransferazės (COMT) katalizuojamas metilinimas jį mažina (Miliukienė *et al.*, 2014). Polihidroksibenzenų citotoksiškumui būdingi panašūs kiekybiniai struktūros-aktyvumo ryšiai (QSAR), tačiau šie junginiai yra sistemiškai toksiškesni nei flavonoidai. Greičiausiai, tai susieta su jų didesniu aktyvumu COMT katalizėje. Kitas galimas flavonoidų prooksidantinio toksiškumo mechanizmas gali pasireikšti dalyvaujant polifenolių oksidaciją vykdančioms peroksidazėms (Galati *et al.*, 2002) ir tirozinazei, kuri gali būti daugiau ekspresuojama melanomos ląstelėse.

**2. Kinazių slopinimas.** Flavonoidai gali atlikti svarbų vaidmenį, valdydami baltymų ir lipidų kinazių signalinius kelius (Boly *et al.*, 2011), tiesiogiai jungdamiesi prie kinazių ir moduluodami jų fosforilinimą (Hou ir Kumamoto, 2010). Flavonoidai gali dalyvauti fosfoinozido (PI) -3-kinazės, Akt/baltymų kinazės B (PKB), tirozino kinazių, baltymų kinazės C (PKC), mitogenų aktyvuotų baltymų (MAP) kinazių ir kitų kinazių signalinėse kaskadose (Hou ir Kumamoto, 2010; Boly *et al.*, 2011; Lolli *et al.*, 2012).

**3. Topoizomerazių inhibicija.** Gamtiniai polifenoliai gali inhibuoti ir topoizomerazės II vykdomą DNR karpymą, t. y., būti topoizomerazės II inhibitoriais (Bandeletti *et al.*, 2008). Jie gali būti skirstomi į dvi klases, t. y., nuo redokso reakcijų nepriklausomus inhibitorius, tokius kaip kvercetas ir kempferolis, ir redoks-priklausomus inhibitorius, pavyzdžiui, epigalokatechino galatas ir epigalokatechinas.

#### 1.8.1. 3,3,4,5,7-pentahidroksiflavono (QUE) citotoksiškumas

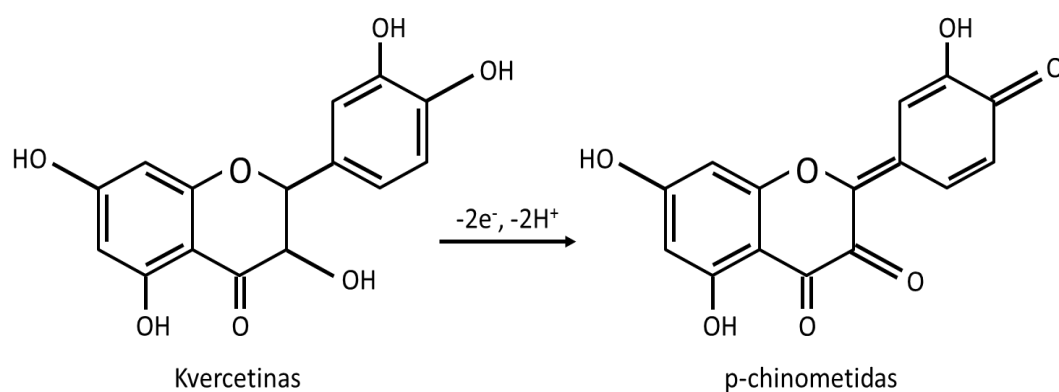


10 pav. QUE struktūrinė formulė.

Vienas labiausiai paplitusių ir tyrinėjamų polifenolių yra flavonoidas kvercetas (3,3',4,5,7-pentahidroksiflavonas, QUE) (10 pav.). Maiste esantis kvercetas dažniausiai yra glikozido formos. Žmogaus organizme jis metabolizuojamas tokiuose

organuose, kaip plonoji ir gaubtinė žarna, kepenys, inkstai (Gibellini *et al.*, 2011; Spagnuolo *et al.*, 2012). Kverceto junginių modifikacijos vyksta gliukozidinę formą hidrolizuojant iki aglikono, kuris toliau modifikuojamas enterocitinėms transferazėms prikabinant metilo, sulfato grupes ar gliukurono rūgštį. Kvercetas pasižymi dideliu antioksidantiniu, priešuždegiminiu ir proapotoziniu veikimu. Todėl šis flavonoidas gali būti laikomas natūraliai aptinkamu agentu, skirtu tiek vėžio prevencijai, tiek vėžiniams susirgimams gydyti (Mocanu *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2013; Vargas ir Burd, 2010).

Kvercetino poveikis priklauso nuo ląstelių gebėjimo jį įsisavinti bei nuo jo koncentracijos. Kvercetas geba atiduoti savo elektronus reaktyviosioms deguonies formoms (ROS), kurios sąveikauja su išorinėmis kvercetino molekulės -OH grupėmis, o taip pat aktyvina ląstelės viduje esančią ROS surišimo sistemą, tokiu būdu mažindamas ROS sukeltą DNR pažeidimą ląstelėje (Mocanu *et al.*, 2013; Akan ir Garip, 2013). Toks antioksidantinis veikimas dažniausiai pasireiškia esant 1-40  $\mu\text{M}$  kvercetino koncentracijai. Junginio koncentracijai viršijus 40  $\mu\text{M}$ , dažniausiai pasireiškia prooksidantinis medžiagos veikimas. Tada kvercetas pats gali sukelti pažeidimą ląstelėse bei įjungti ląstelėje esančius apoptozės mechanizmus. Oksiduojantis kvercetinui, susidaro laisvieji radikalai, o galutinis kvercetino oksidacijos produktas yra jo chinometidas (11 pav.), susidarantis izomerizuojantis kvercetino chinonui. Šis junginys gali reaguoti su ląstelės redukuotu GSH, kitais tioliais, sudarydamas atitinkamus tiolinius konjugatus (prooksidantinis veikimas) (Lu *et al.*, 2006; Boersma *et al.*, 2000), ir modifikuodamas (Gliszczynska-Swiglo *et al.*, 2003). Duomenys apie tai, ar NQO1 regeneruoja kvercetiną, tuo apsaugodama ląsteles nuo jo toksiškumo, yra prieštaringi (Gliszczynska-Swiglo *et al.*, 2003; Boots *et al.*, 2005)



**11 pav. Kvercetino oksidacinės transformacijos schema.**

Taip pat kvercetino prooksidantinis veikimas susijęs su navikinių ląstelių proliferacijos slopinimu (Spagnuolo *et al.*, 2012; Mocanu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2010). Priklausomai nuo ląstelių tipo, kvercetas stabdo proliferaciją G<sub>2</sub>/M arba G<sub>1</sub> ląstelės ciklo stadijose (Jeong *et al.*, 2009). Šis

junginys gali sutrikdyti ROS metabolizmą ir sukelti apoptozę nuo mitochondrijų priklausomu keliu (Gibellini *et al.*, 2010). Esant tam tikroms sąlygoms, kvercetas gali sudaryti pakankamai reaktyvių deguonies formų, kad sukeltų nuo laisvųjų radikalų priklausomą apoptozę mažiausiai per keletą signalinių kelių (Gibellini *et al.*, 2010). Be proliferacijos stabdymo ir apoptozės, kverceto antivėžinis aktyvumas gali sukelti autofagiją, ląstelių migracijos blokavimą bei riebiųjų rūgščių sintezės, reikalingos membranos sintezei *de novo*, slopinimą (Angst *et al.*, 2013). Svarbu paminėti ir tai, jog įtaką efektui daro ne tik šio junginio koncentracija, bet ir veikimo trukmė (Deng *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2011).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Naudotos medžiagos

Darbe tirtus 1,4-benzochinonus MeDZQ ir RH1 susintetino VU Biochemijos instituto vyresnysis mokslo darbuotojas dr. Jonas Šarlauskas.

**Įvairios paskirties reagentai ir jų kilmė:** BSA, Triton X-100, akrilamidas, bis-akrilamidas, TrisBase, glicinas, EDTA, TrisHCl, tetrametiletilendiaminas (TEMED), metanolis, natrio dodecil sulfatas (SDS), nieriebaus pieno milteliai, NaF, DMSO, aprotininas, fenilmetilsulfonil floridas (PMSF), natrio ortovanadatas ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), glicerolis, merkaptoetanolis, amonio persulfatas (AP), Tween 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH,  $\text{CuSO}_4$ , Folin reagentas, NADH, citochromas C, menadionas, durochinonas, kvercetas, fosfatinis buferis (FB) įsigyti iš *Sigma-Aldrich, USA*. Bradfordo reagentas pirktas iš *Thermo Fisher Scientific, USA*. Chemoluminescencijos tirpalai įsigyti iš *Invitrogen, USA*.

**Dažai:** 3-(4,5-dimetilthiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazolio bromidas (MTT), akridino oranžinis ir etidžio bromidas (AO/EB), tripano mėlis pirkti iš *Sigma-Aldrich, USA*.

**Signalinių molekulių slopikliai** - PD98059, SP600125, SB203580, PIF- $\alpha$ , DIK (dikumarolis), DPPD (*N,N'*-difenil-*p*-fenilendiaminas), DESF (desferioksaminas) gauti iš *Sigma-Aldrich, USA*.

**Signalinių molekulių aktyvumo tyrimuose naudoti antikūnai** prieš: ERK (triušio, toliau (t)) (*Cell Signaling Technologies, Beverly, USA*), p-ERK (t) (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA*), JNK1/2 (pelės, toliau (p)) (*BD BioScience, San Jose, CA, USA*), p- JNK1/2 (p) (*Cell Signaling Technologies, Beverly, USA*), p38 (p) (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA*), p-p38 (t) (*Cell Signaling Technologies, Beverly, USA*), p53 (t) (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA*), p-p53(t) (*Cell Signaling Technologies, Beverly, USA*), NQO1 (p) (*Cell Signaling Technologies,*

*Beverly, USA*). Antriniai antikūnai prieš triušio ir pelės antigenus, konjuguoti su krienų peroksidaze, gauti iš *Abcam, Cambridge, UK*. Visi antikūnai skiesti pagal gamintojų rekomendacijas.

**Ląstelių auginimui** naudotos Dulbecco's modifikuota Eagle's (DMEM) ir Iscove's modifikuota Dulbecco (IMDM) terpės, įsigytos iš *Sigma-Aldrich, USA*. Jų priedai – fetalinis veršelio serumas (FVS) iš *Life Technologies, USA*; antibiotikai - penicilino-streptomicino (atitinkamai 100 VV/ml ir 100 µg/ml) mišinys ir 0,25 % tripsino – EDTA tirpalas, pirkti iš *Biological Industries, Israel*. Ląstelių auginimui naudoti indai įsigyti iš *Greiner Bio-One, Germany*.

**Tirpalai ląstelių lizavimui ir baltymų lizatų paruošimui.** Ląstelių lizavimui buvo ruošiamas **lizės buferis**: 10 mM TrisHCl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 5 mM NaF; 0,1 % BSA; 1 % Triton X-100. Prieš naudojant buferį, pridedama 20 µg/ml aprotinino, 1 mM PMSF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Paruošto tirpalo pH turi būti 7,2. Baltymų koncentracijų nustatymui naudotas **Bredfordo reagentas**. **Pavyzdžio buferis** (4 x SDS): 25 % 1 M TrisHCl, pH 6,8; 40 % glicerolio; 8 % SDS; 4 % merkaptoetanolio; 1-5 % bromfenolio mėlio dažo; iki reikiamo tūrio pripilama dejonizuoto vandens ir laikoma –20 °C temperatūroje.

**Tirpalai, naudoti elektroforezėje.** **Tirpalai geliams:** **4x akrilamido/Bis-akrilamido tirpalas**: 30 % akrilamido; 0,8 % bis-akrilamido; **4x TrisHCl/SDS tirpalas**, pH 8,8: 1,5 M TrisHCl, pH 8,8; 0,4 % SDS; paruoštas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje; **4x TrisHCl/SDS tirpalas**, pH 6,8: 0,5 M TrisHCl, pH 6,8; 0,4 % SDS; laikoma 4 °C temperatūroje; 10 % amonio persulfatas; tetrametiletildiaminas. **Buferiai: elektroforezės pernašos buferis**: 25 mM TrisBase, 0,2 M glicino, 0,5 % SDS; buferio pH 8,3; **baltymų pernašos buferis**: 10 mM TrisBase, pH 8,3; 90 mM glicino, 0,05 % SDS; 10 % metanolio.

**Tirpalai signalinių molekulių vaizdinimui.** **Nuplovimo tirpalas**: 150 mM NaCl; 10 mM TrisHCl, pH 7,5; 0,05 % Tween 20; **blokavimo tirpalas** ruošiamas nuplovimo tirpale, pridedant 1-3 % neriebaus pieno miltelių; 0,01 % NaN<sub>3</sub>.

**Tirpalai baltymų aktyvumui nustatyti. Buferis ląstelių suardymui ultragarsu:** 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, pH 7; prieš pat naudojimą pridedama 20 mM PMSF. **Buferis baltymų aktyvumų matavimui:** 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, pH 7; 0,01 % Tween 20; 0,25 mg/ml BSA.

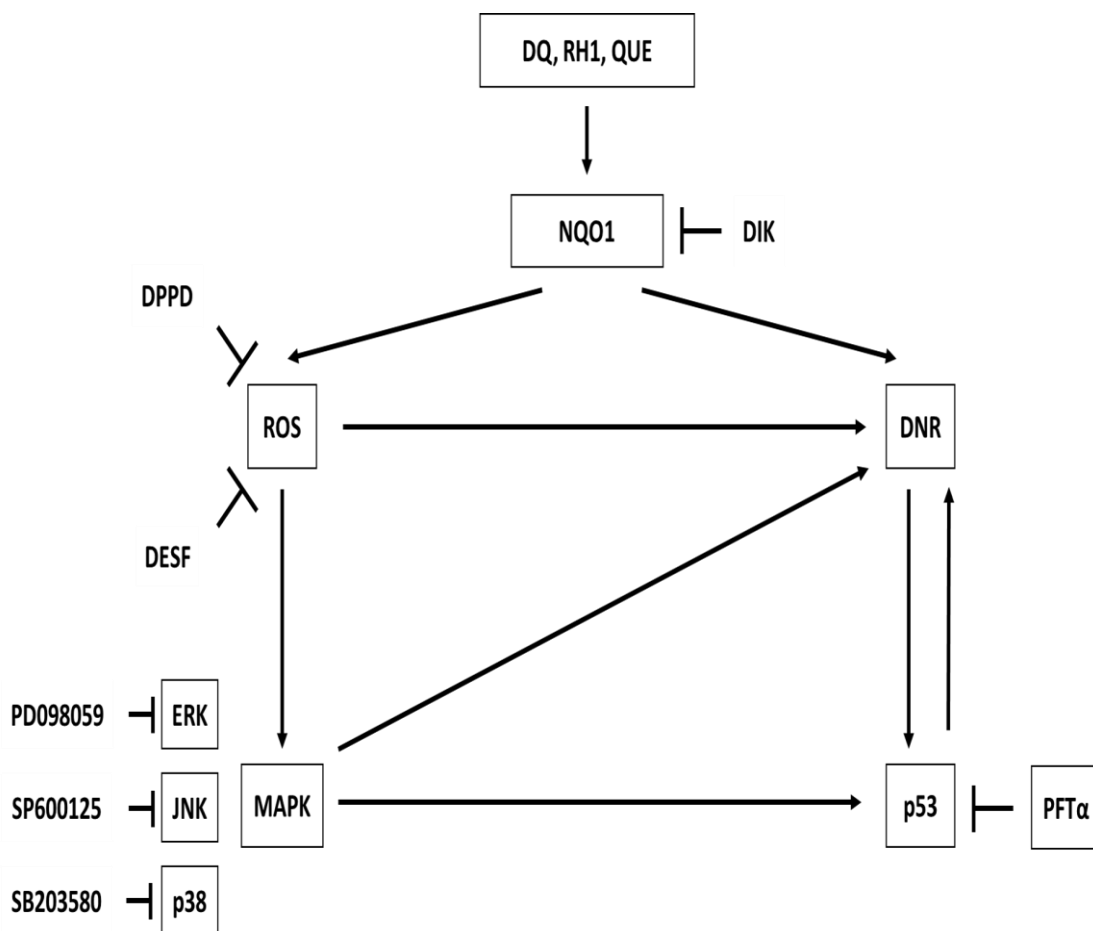
**Tirpalai baltymų nustatymui Lowry metodu:** 2 %  $\text{NaCO}_3$  (0,1 N NaOH tirpale); 0,5 %  $\text{CuSO}_4$  (1 % Na citrate ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ )); Folino reagentas.

**Kometos metodui naudoti tirpalai ir buferiai.** Normalios lydymosi temperatūros agarozės tirpalas 1 % (laikoma 4 °C temperatūroje), žemos lydymosi temperatūros agarozės tirpals 1 % (tirpinama fosfatiniame buferyje). **Lizės buferis**, pH 10: 2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris; prieš pat naudojimą pridedama 1 % Triton X-100, 10 % DMSO; laikoma 4 °C temperatūroje. **Elektroforezės buferis**, pH > 13: 0,001 M EDTA, 0,3 M NaOH; laikoma 4 °C temperatūroje. **Neutralizacijos buferis**, pH 7,5: 0,4 M Tris; laikoma 4 °C temperatūroje (pH matuotas naudojantis Adwa AD 1020 matuokliu; pasiekti nurodytai pH reikšmei naudotas 20 % NaOH tirpalas).

## 2.2. Darbo metodai

Šio darbo tikslas siektas ir uždaviniai įgyvendinti vadovaujantis pateikta darbo schema (12 pav.). Literatūros duomenimis, pagrindinis citotoksinis aziridinil-benzochinonų veikimo mechanizmas yra susietas su jų dvielektrone redukcija, kurią vykdo NQO1 fermentas. Dėl šios priežasties pirmiausia buvo nustatytas MH-22A ląstelėse esantis šio fermento kiekis ir aktyvumas. Vėliau, panaudojan NQO1 slopiklį DIK, vertinome ar šis fermentas reikalingas tiriamųjų junginių citotoksiškumo pasireiškimui. Analizavome, ar ląstelių žūtis yra oksidacinio streso (panaudojant antioksidantus DPPD ir DESF) pasekmė, ar DNR pažaidų rezultatas (naudotas kometų metodas). Galiausiai, siekiant išsiaiškinti tiriamųjų junginių veikimo mechanizmus, panaudojant slopiklius (PD98059, SP600125, SB203580 ir PFT $\alpha$ ), buvo analizuotas svarbių ląstelės gyvybinių procesų reguliatorių - streso aktyvinamų kinazių (ERK, JNK, p-38) bei transkripcijos veiksnio p-53 vaidmuo ląstelių gyvybiniams procesams.





12 pav. Darbo schema.

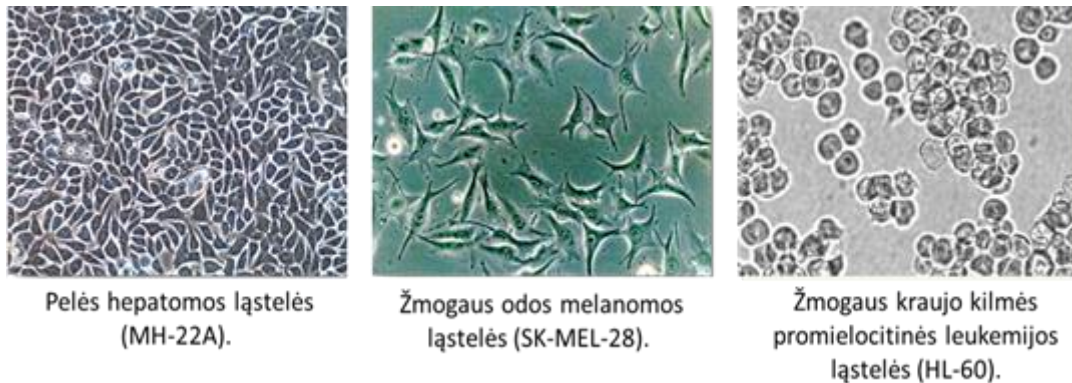
## 2.2.1. Ląstelių auginimas kultūroje *in vitro*

### 2.2.1.1. Tyrimams naudotos ląstelės

Tyrimams atlikti buvo naudotos monosluoksninės pelės hepatomos (MH-22A; *VU Biochemijos instituto ląstelių kolekcija*) ląstelės (13 pav.). MH-22A linijos ląstelės greitai dauginasi, gali augti ir *in vivo*, ir *in vitro*. MH-22A linija išvesta 1948 – 1951 metais Maskvoje. Tai pelės kepenų ląstelės, paveiktos ortoaminoazotoluolu. Gauta vėžinių ląstelių linija yra praradusi panašumą su kepenų ląstelėmis (Александрян *et al.*, 1972). *In vitro* jos auga sudarydamos monosluoksnį. MH-22A linijos ląstelės naudojamos kancerogenezės proceso analizei, piktybinių ląstelių charakterizavimui, priešvėžinių vaistų paieškai.

Vertinant fermento NQO1 raišką MH-22A ląstelėse, palyginimui buvo naudotos žmogaus odos melanomos (SK-MEL-28; *Cell Line Service*,

Germany) ir suspensinės žmogaus promielocitinės leukemijos (HL-60; *Cell Line Service, Germany*) ląstelių linijos (13 pav.).



**13 pav. Pelės hepatomos (MH-22A), žmogaus odos melanomos (SK-MEL-28) ir žmogaus kraujo kilmės promielocitinės leukemijos (HL-60) ląstelių linijų morfologija.**

SK-MEL-28 ląstelių linija gauta iš žmogaus odos pirminio naviko. Šiame darbe šios linijos ląstelės buvo naudotos kaip teigiama kontrolė, nes literatūroje yra duomenų, jog šios linijos ląstelės pasižymi aukštu NQO1 kiekiu bei aktyvumu (Doherty *et al.*, 1998).

HL-60 ląstelių linija gauta 1977 m. iš žmogaus, sirgusio ūmia promielocitine leukemija, periferinio kraujo. Šią ląstelių liniją daugiausiai sudaro promielocitai. Darbe ši ląstelių linija buvo naudojama kaip neigiama kontrolė NQO1 tyrimuose (Perez-Sacau *et al.*, 2007; Pink *et al.*, 2000).

MH-22A ir SK-MEL-28 ląstelės buvo auginamos DMEM terpėje, o suspensinės HL-60 ląstelės IMDM terpėje. Šios terpės buvo paruoštos su 10 % FVS ir antibiotikais (penicilino 100 VV/ml ir streptomicino 100 µg/ml). Ląstelės persėjamos kas 2-3 dienas ir laikomos 37 °C laipsnių temperatūroje, 5 % CO<sub>2</sub> aplinkoje. Ląstelių monosluoksnio suardymui buvo naudojamas 0,25 % tripsino-EDTA mišinys.

#### **2.2.1.2. Ląstelių auginimas *in vitro***

Monosluoksninės MH-22A, SK-MEL-28 ląstelės buvo persėjamos, padalinant ląsteles į du flakonius. Prieš sėjimą šviesiniu invertuotu mikroskopu (*OLYMPUS CX41, Olympus corp., Japan*) buvo įvertinamas ląstelių monosluoksnis, terpės spalva (augant ląstelėms terpė rūgštėja, todėl indikatorius – fenilo raudonasis keičia spalvą iš rausvos į geltoną). Persėjant

sena terpė pašalinta, monosluoksnis praplautas terpe be serumo, du kartus skalauta EDTA – 0,25 % tripsino mišiniu, monosluoksnis inkubuotas buvusio tirpalo garuose 5-10 min., aplinkoje esant 37 °C. Kai ląstelių monosluoksnis disocijavo, suspensija praskiesta šviežia terpe, ląstelės suskaičiuotos, paruošta reikiamo tankio (300 tūkst./ml) ląstelių suspensija, kuri padalinta į naujus flakonėlius (po 5 ml) palaikymui arba išsėta į 96 duobučių plokštelės šulinėlius (po 100 µl) eksperimentui.

Suspensinės HL-60 ląstelės buvo persėjamos kas 2-3 dienas. Persėjant šias ląsteles sena suspensija buvo centrifuguota, nuosėdos praskiestos šviežia auginimo terpe ir reikiamu ląstelių tankiu išpilstyta į naujus flakonėlius arba plokštelės šulinėlius eksperimentui.

Į eksperimentui naudotų ląstelių suspensiją buvo pridedamas reikiamas kiekis tiriamų medžiagų.

#### **2.2.1.3. Ląstelių proliferacijos/gyvybingumo vertinimas MTT metodu**

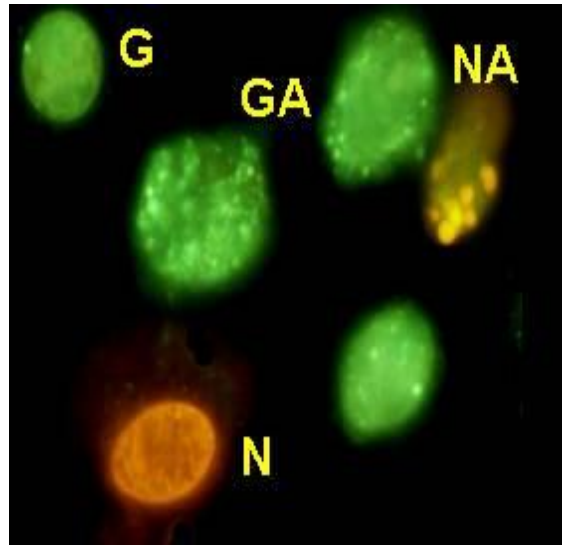
Gyvų ląstelių dalies nustatymui, o kartu ir jų proliferacinio aktyvumo arba žuvimo vertinimui buvo naudojamas standartinis MTT metodas. Tai kolorimetrinis metodas, paremtas gyvų ląstelių mitochondrijų fermentų gebėjimu tirpų geltonos spalvos MTT redukuoti iki violetinės spalvos netirpius kristalus formuojančio formazano.

Po ląstelių išsėjimo praėjus 24 val., nuo jų buvo pašalinta augimo terpė, monosluoksnis 2 kartus praplautas fosfatinu buferiu (FB: 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl). Ant ląstelių buvo užpiltas 0,2 mg/ml MTT tirpalas, inkubuota 1 h 37 °C termostate (*HERAcell150i, Thermo Scientific, USA*). Susidarę kristalai buvo ištirpinti etilo alkoholyje (96 %), plokštelių skaitytuvu (*Varioskan Flash, Thermo Scientific, USA*) išmatuotas optinis tankis (pasirinkus 570 nm bangos ilgį). Optinis tankis yra tiesiogiai proporcingas gyvų ląstelių skaičiui.

#### 2.2.1.4. Ląstelių žūties analizė fluorescenciniu mikroskopu

Ląstelių žūties analizė buvo vertinta naudojant fluorescuojančių, su DNR besijungiančių dažų mišinį: akridino oranžinį (AO, 100 µg/ml) ir etidžio bromidą (EB, 100 µg/ml), ištirpintą FB.

Vertinant tiriamų junginių citotoksinį efektą, prieš dieną išsėtos MH-22A ląstelės buvo paveiktos tiriamomis medžiagomis. Po 24 val. poveikio visos disperguotos ląstelės buvo surinktos ir ši suspensija 10 min. centrifuguota centrifugoje



**14 pav. Ląstelių, dažytų OA ir EB dažų mišiniu, vaizdas fluorescenciniu mikroskopu (G – gyvos, GA – gyvos apoptozinės, NA – negyvos apoptozinės, N- nekrozinės ląstelės).**

(CL10, Thermo scientific, USA) 1500 aps./min. greičiu. Supernatantas nupiltas, iš nuosėdų paimta 30 µl ląstelių suspensijos, kuri buvo sumaišyta su 3 µl AO ir EB dažų mišinio. Ląstelių žūtis vertinta fluorescenciniu mikroskopu (*Olympus IX51, Olympus corp., Japan*). Kiekviename mėginyje skaičiuojama 3 x 100 ląstelių; pagal gyvų ir negyvų ląstelių dalį šiame skaičiuje galima spręsti apie ląstelių gyvybingumą.

Tokiu būdu dažant ląsteles, jų populiacijoje galima išskirti penkių rūšių ląsteles: gyvas (G- vientisas ryškiai žalias branduolys); gyvas apoptozines (GA - kondensuotas ar fragmentuotas branduolys, švyti žalsvai); negyvas apoptozines (NA - branduolys fragmentuotas, oranžinės spalvos); nekrozines (N - branduolys vientisas, nusidažęs oranžine spalva; citoplazmos likučiai tamsiai rusvi); be chromatino (blyškiai gelsvas, netekusios DNR, dažosi silpnai oranžine spalva) (Mercille ir Massie, 1994) (*14 pav.*).

#### **2.2.1.5. Ląstelių gyvybingumo vertinimas dažant tripano mėliu**

Po poveikio tiriamomis medžiagomis ląstelių gyvybingumas papildomai buvo tikrintas jas dažant tripano mėliu. Šis dažas gali patekti tik į negyvas ląsteles, todėl pastarosios ląstelės nusidažo tamsiai mėlyna spalva.

Po 24 val. poveikio su tiriamomis medžiagomis ląstelių monosluoksnis buvo disperguotas, surinkta suspensija centrifuguota 10 min. 1500 aps./min. Nupylus supernatantą ir ląstelės skiedžiant auginimo terpe buvo paruošiama reikiamo tankio ląstelių suspensija. Ši suspensija buvo sumaišoma santykiu 1:1 su 0,4 % tripano mėlio tirpalu, paruoštu FB. Po 3 min. kiekviename mėginyje šviesinio mikroskopo (*Olympus CX 41, Olympus corp., Japan*) pagalba skaičiuota 3 kartus po 100 ląstelių, kurias sudarė nusidažiusios (mėlynos) ir nenusidažiusios (skaidrios) ląstelės.

#### **2.2.1.6. Ląstelių gyvybingumo vertinimas tėkmės citometru**

Po tiriamųjų poveikių iš kiekvienos ląstelių auginimo plokštelės duobutės į atskirus mėgintuvėlius buvo surinkta auginimo terpė, joje gali būti neprilipusių ląstelių, o likęs monosluoksnis disperguotas įprastiniu tripsino ir EDTA mišiniu, gauta suspensija buvo surinkta į tą patį atitinkamą mėgintuvėlį. Kiekviename mėgintuvėlyje suskaičiuotas ląstelių kiekis, optimalus suspensijos tankis 100 – 500 ląst./ $\mu$ l. 180  $\mu$ l paruoštos ląstelių suspensijos buvo sumaišyta su 20  $\mu$ l dažu ViaCount (*Millipore*), inkubuota 15 min. Toliau ląstelių suspensijos analizė atlikta tėkmės citometru Guava (*Guava easyCyte 8HT, Millipore, Life-Science-Research, USA*) vadovaujantis gamintojo instrukcija.

#### **2.2.2. DNR pažaidų vertinimas kometos metodu**

Šiuo paprastu, bet jautriu metodu buvo vertinamos DNR pažaidos, sukeltos tiriamųjų junginių.

Preparatų gaminimo išvakarėse švarūs nuriebalinti objektiniai stikleliai (šlifuoti krašteliais) buvo padengti pirmuoju agarozės sluoksniu. Tuo tikslu kiekvienas stiklelis kelioms sekundėms buvo pamerkiamas į karštą (60–80 °C)

1 % normalios lydymosi temperatūros agarozės tirpalą. Stiklelį ištraukus, apatinė jo pusė nušluostoma filtriniu popieriumi ir stiklelis padedamas džiūti horizontalioje padėtyje. Kitą dieną buvo gaminami preparatai.

Po 24 valandų medžiagų poveikio, iš kiekvienos ląstelių auginimo plokštelės duobutės buvo nusiurbta auginimo terpė, o likęs monosluoksnis disperguotas įprastiniu tripsino ir EDTA mišiniu, gauta suspensija surinkta į mėgintuvėlį, pridėta 1ml FB ir centrifuguota 10 min. 1500 aps./min. Supernatantas nupiltas, o nusėdusios ląstelės praskiestos 1 ml FB, Gorjajevo kameros pagalba suskaičiuotos ląstelės. Optimalus suspensijos tankis - 50-60 tūkst. ląst/ml.

40 μl paruoštos ląstelių suspensijos ir 40 μl agarozės greitai supipetuojama, tuomet iš kiekvieno Ependorfo mėgintuvėlio paimama 80 μl šio ląstelių ir agarozės mišinio ir užlašinama ant 1 % normalios lydymosi temperatūros agarozė padengtų objektinių stiklelių. Mėginiai uždengti dengiamaisiais stikleliais. Objektiniai stikleliai su į agarozę įterptomis ląstelėmis 10 min. padėti į šaldytuvą (4 °C). Po to visi objektiniai stikleliai su į agarozę įterptomis ląstelėmis, nuėmus nuo jų dengiamuosius stiklelius, buvo panardinti į vonelę su iki 4 °C atšaldytu lizės buferiu. Lizės procedūra buvo vykdoma 90 minučių, po to preparatai išimti ir 5 min. panardinti į distiliuoto vandens vonelę. Lizės metu yra pašalinamos membranos, tirpūs ląstelių komponentai bei daugelis histonų. DNR lieka prisitvirtinusi prie matrikso.

Po lizės procedūros preparatai skubiai sudėti į COMET – 20 SYSTEM (*Scie-Plas, UK*) iki 5 °C atšaldytą vonelę (stiklelių šlifuoti galai nukreipti į elektrodų pusę). Į ją pripilta 540 ml iki 4 °C atšaldyto šarminio elektroforezės buferio. Tokiomis sąlygomis preparatai buvo laikomi 20 min., po to įjungtas srovės šaltinis ir 30 min. vykdoma elektroforezė (srovės stiprumas – 300 mA, įtampa – 20–19 V). Elektrolizės metu susiformuoja į kometas panašios struktūros (Azqueta *et al.*, 2011). Kometos galvą sudaro nepažeista DNR, o uodegą - dėl trūkių grandinėse atsipalaidavusi ir link anodo pasislinkusi DNR.

Po šarminėmis sąlygomis atliktos pavienių ląstelių gelio elektroforezės aptinkami tiek viengrandžiai, tiek ir dvigrandžiai DNR trūkiai ir šarmui jautrios vietos. Pasibaigus elektroforezei, preparatai buvo neutralizuojami 30 min. neutralizacijos buferyje, tada išimti ir 5 min. dažyti 80 µl EB, kuris įsiterpia tarp dvigubos spiralės bazių porų (Liao *et al.*, 2009). Dažų perteklius nuplautas preparatus panardinus 10 min. į distiliuotą vandenį. Nuplauti, dar šlapi preparatai uždengti dengiamaisiais stikleliais padedami į šaldytuvą ir ten laikyti iki mikroskopinės analizės.

Preparatai analizuoti fluorescenciniu (*Nikon Eclipse 80i, Nikon corp., Japan*) mikroskopu vaizdą padidinus 400 kartų. Branduolių analizė atlikta ir procentinis DNR kiekis kometos uodegoje apskaičiuotas panaudojus kompiuterinę vaizdų analizės programą *LUCIA*. Analizuota po 100 branduolių iš kiekvieno preparato.

### **2.2.3. Baltymų kiekio nustatymas**

#### **2.2.3.1. Ląstelių suardymas ultragarsu**

Po poveikio tiriamaisiais chinonais nuo ląstelių nupilta auginimo terpė, monosluoksnis disperguotas EDTA ir tripsino mišiniu. Gauta suspensija surinkta į atskirus mėgintuvėlius, centrifuguota 15 min. 1500 aps./min. greičiu. Ant nuosėdų užpilta buferio (0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, pH 7; prieš pat naudojimą pridedama 20 mM PMSF), skirto ląstelių suardymui ultragarsu, mėginiai laikyti lede. Ląstelių ardymas ultragarsu vykdomas *Bandelin Sonopuls HD 2070 (BANDELIN electronic, Germany)* aparatu: kiekvienas mėginys 4 kartus po 20 s veiktas 30 % galingumo ultragarsu su 20 s pauzėmis. Tuomet visi mėginiai buvo centrifuguoti 0 – 4 °C temperatūroje 45 min. 10 000 aps./min. greičiu. Taip paruošti mėginiai buvo saugomi -20 °C temperatūroje.

#### **2.2.3.2. Baltymų kiekio nustatymas Lowry metodu**

Baltymo koncentracijos matavimas: į pasiruoštus mėgintuvėlius pripilama po 390 µl buferio, skirto ląstelių suardymui ultragarsu, 10 µl tiriamo baltymo tirpalo, 2 ml 2 %  $\text{NaCO}_3$  ir 40 µl 0,5 %  $\text{CuSO}_4$ . Į kontrolinį

mėgintuvėlį pilta 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 2 ml 2 %  $\text{NaCO}_3$  ir 40  $\mu\text{l}$  0,5 %  $\text{CuSO}_4$ . Inkubuota 10 min., po to į kiekvieną mėgintuvėlį pilta po 200  $\mu\text{l}$  Folino reagento. Inkubuota 45 min. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos pasiruošti tirpalai po 1 ml supilstyti į kiuvetę ir spektrofotometru (*Hitachi-557, Japan*) matuotas optinis tankis pasirinkus 750 nm bangos ilgį. Pagal gautus rezultatus visuose mėgintuvėliuose suvienodinta baltymo koncentracija.

Lowry metodas yra labai jautrus pH pokyčiams, todėl atliekant matavimus mėginių pH buvo 10 - 10,5 (Lowry *et al.*, 1951).

### **2.2.3.3. Baltymų kiekio nustatymas Bradfordo metodu**

Šis metodas yra pagrįstas dažo, Kumasi brilianto mėlio, specifine sąveika su baltymų arginino ir aromatinėmis aminorūgštimis, bei susidariusio komplekso spektrofotometriniams koncentracijos matavimams, esant 596 nm bangos ilgiui (Bradford, 1976). Norėdami išmatuoti baltymo koncentraciją šiuo metodu į pasiruoštus mėgintuvėlius pylėme po 1 ml distiliuoto vandens, 2  $\mu\text{l}$  tiriamo baltymo tirpalo ir po 300  $\mu\text{l}$  Bradfordo reagento. Į kontrolinį mėgintuvėlį pilama tik 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  ir 300  $\mu\text{l}$  Bradfordo reagento. Gauti tirpalai po 500  $\mu\text{l}$  supilstomi į 24 duobučių plokštelę, optinė sugertis matuota spektrofotometru *Varioskan Flash (Thermo scientific, USA)*, pasirinkus 596 nm bangos ilgį. Pagal gautus rezultatus visuose mėgintuvėliuose buvo sulyginama baltymų koncentracija.

Tokiu būdu paruošti ląstelių lizatai su sulygingomis baltymų koncentracijomis buvo maišomi santykiu 3:1 su 4 x SDS pavyzdžio buferiu. Baltymai denatūruoti 5 min. inkubuojant juos verdančiame vandenyje. Lizatai laikomi -20 °C.

### **2.2.4. NQO1 aktyvumo nustatymas MH-22A ląstelėse**

Į atskirus mėgintuvėlius buvo pridedama po 10  $\mu\text{M}$  menadiono, 50  $\mu\text{M}$  NADH, 50  $\mu\text{M}$  citochromo C ir 50  $\mu\text{M}$  tiriamo baltymo tirpalo. Inkubuota 10 min., po to spektrofotometru (*Hitachi-557, Japan*) matuotas optinis tankis, pasirinkus 550 nm bangos ilgį. Kiekvienas matavimas kartotas į reakcijos



mišinį pridedant 20  $\mu$ M NQO1 slopiklio – dikumarolio. Skaičiuojamas NQO1 aktyvumas, kuris išreikštas kaip nM redukuoto citochromo C/ min mg baltymo.

## **2.2.5. Signalinių molekulių raiškos tyrimas**

### **2.2.5.1. Ląstelių lizavimas**

Po ląstelių poveikių tiriamosiomis medžiagomis nuo monosluoksnio buvo pašalinama augimo terpė ir užpilamas reikiamas kiekis lizės buferio (1-am ląstelių milijonui naudojamas 1 ml lizės buferio) Buferio sudėtis: 10 mM TrisHCl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 5 mM NaF; 0,1 % BSA; 1 % Triton X - 100, prieš naudojant į buferį pridedama 20  $\mu$ g/ml aprotinino, 1 mM PMSF, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; paruošto tirpalo pH 7,2.

Plokštelė su ląstelėmis ir lizės buferiu laikoma lede 20 min. Tuomet plokštelės turinys perkeliamas į atšaldytus mėgintuvėlius ir centrifuguojama 0 – 4 °C temperatūroje 15 min. 14 000 aps./min. greičiu. Mėginyje esantis baltymų kiekis buvo nustatomas Bradfordo metodu (aprašyta skyrelyje 2.10.3.), po to buvo sulyginama baltymų koncentracija mėginiuose.

### **2.2.5.2. Baltymų elektroforezė**

Paruoštas 10 % skiriamasis gelis: 10-iai ml šio gelio naudota Akiril/Bis – 3 ml; 4 x TrisHCl/SDS pH 8,8 – 2 ml;  $\text{H}_2\text{O}$  – 2,4 ml; AP - 58  $\mu$ l; TEMED – 8  $\mu$ l. Sudėjus visus reagentus, viskas gerai išmaišyta ir polimerinta poliakrilamido gelio paruošimo gardelėje. Kad poliakrilamido gelio paviršius būtų lygus, prieš polimerizaciją buvo užpiltas izopropanolis. Jis po polimerizacijos nupiltas, gelio paviršius nuplautas distiliuotu vandeniu.

Kai 10 % skiriamasis gelis susipolimerino, buvo ruošiamas 4 % koncentruojamasis gelis. 4 % koncentruojamo gelio 5,08 ml gamybai reikia Akiril/Bis – 0,6 ml; 4 x TrisHCl/SDS pH = 6,8 – 1 ml;  $\text{H}_2\text{O}$  – 2,2 ml; AP – 36  $\mu$ l ir TEMED – 10  $\mu$ l. Sudėjus visus reikiamus reagentus, jie buvo gerai išmaišyti. 4 % koncentruojamasis gelis užpiltas ant 10 % skiriamojo poliakrilamido gelio paviršiaus ir įdėtos “šukos”.

Kai 4 % koncentruojamojo gelio polimerizacija baigiasi, buvo surinktas elektroforezės aparatas, pripilta elektroforezės buferio, atsargiai išimtos “šukos”. Į gautas “kišenes” įnešta po 30 μl paruoštų žinomos baltymų koncentracijos ląstelių lizatų ir paleista 120 V elektros srovė. Kai bromfenolio mėlio dažas išeina iš gelio, srovė išjungžiama.

### **2.2.5.3. Imunoblotingas**

Po elektroforezės baltymai iš skiriamojų gelio buvo pernešti ant PVDF arba nitroceliuliozinės membranos. Tuo tikslu membrana yra iškerpama taip, kad būtų truputį didesnė už skiriamojų gelio paviršių. PVDF membrana apie 5 s palaikoma metanolyje, tada 1 min. pamerkiama į distiliuotą vandenį. Po plovimo vandenių PVDF perkeliama į pernašos buferį. Nitroceliuliozinė membrana iš karto perkeliama į pernašos buferį. Vatmano popierius taip pat yra pamerkiamas į pernašos buferį (15 min.). Toliau baltymai pernešami iš skiriamojų gelio ant PVDF arba nitroceliuliozinės membranos. Tuo tikslu ant pernašos aparato dedami 2 sluoksniai vatmano popieriaus (išmirkyto pernašos buferyje), membrana, gelis ir vėl 2 sluoksniai vatmano popieriaus (išmirkyto pernašos buferyje). Pašalinami oro burbulai ir paleidžiama srovė. Pernešimas vykdytas 15 min., elektros srovės stiprumas pusiau sausos pernašos atveju buvo 5 mA vienam kvadratiniam gelio centimetrui.

Po pernešimo membrana buvo pamerkiama į blokavimo tirpalą, kur nespecifinio susirišimo vietos blokuojamos Bloto tirpale (5 % neriebaus pieno miltelių, 10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween - 20) 1 val. kambario temperatūroje.

Po to membrana plauta plovimo tirpalu 3 kartus po 5 min. Tada apie 2-3 val. membrana inkubuota su antikūnais prieš tiriamus baltymus. Po pirmos inkubacijos membrana dar kartą plauta plovimo tirpalu 3 kartus po 5 min. Tada ant membranos užpilti antriniai antikūnai (rūšiai specifiniai), konjuguoti su krienų peroksidaze, inkubuota 1 val. Po antrosios inkubacijos membrana vėl plauta plovimo tirpalu 3 kartus po 5 min. Imunoblotas išryškintas chemiluminescencijos metodu (*ECL, Amersham International*).

Tiriamų signalinių molekulių baltymų kiekio kontrolei naudotas  $\beta$ -aktinas,  $\alpha$ -tubulinas arba nudažyta *Protein stain* dažu viršutinė skiriamąjo gelio dalis.

#### **2.2.6. Statistinė duomenų analizė**

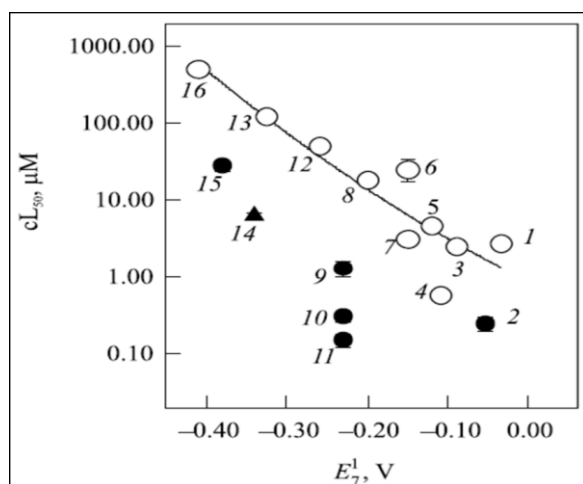
Duomenys statistiškai analizuoti naudojant programą Microsoft Office Excel 2010. Duomenys pateikiami kaip vid.  $\pm$  SN ( $\pm$  standartinis nuokrypis), apskaičiuoti iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų. Duomenų patikimumas vertintas lyginant nesuporuotų, dviejų nuokrypių *Student t*-testą. Duomenys laikyti patikimais, kai  $p < 0,05$ . Daugiaparametrinė regresinė analizė atlikta naudojant programą Statistica (StatSoft, 4.3 versija).

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Darbas skirtas chinoninių ir polifenolinių ksenobiotikų indukuojamos ląstelių žūties mechanizmų išaiškinimui. Piktybinių ląstelių modeliu naudota pelės hepatomos MH-22A ląstelių linija. Ląstelių pasirinkimą lėmė fiziologinė kepenų funkcija - čia vyksta pagrindiniai ksenobiotikus metabolizuojantys procesai, o kepenų vėžys – dažnai pasitaikantis susirgimas. Kai kuriuose palyginamuosiuose tyrimuose naudotos SK-MEL-28 ir HL-60 linijų ląstelės. Visų pirma nustatyti chinonų ir polifenolių struktūros-aktyvumo ryšiai, ypatingą dėmesį šiuo atveju skiriant jų vienelektroninės redukcijos arba oksidacijos energetikos (redokso potencialo) vaidmeniui. Įvertinus eilės šių junginių citotoksišumą, tolesniems pagrindiniams tyrimams buvo pasirinkti du didžiausiu aktyvumu pasižymintys junginiai - aziridinil-benzochinonas RH1 ir flavonoidas kvercetas (QUE). Eilė bandymų buvo atlikta ir su kitu aziridinil-benzochinonu MeDZQ. Gautus rezultatus lyginome su modelinio junginio, aziridinilo grupės neturinčio chinono – durochinono (DQ) sukeliamaisiais efektais, nes šio chinono citotoksinis poveikis ląstelėms pasireiškia tik per oksidacinį stresą (Goeptar *et al.*, 1992; Linhartova *et al.*, 2013). Kadangi chinonų citotoksiškumą gali nulemti oksidacinis stresas ir redukcinė aktyvacija NQO1, pagrindinį dėmesį skyrėme tam, kad atskirtume ir detaliau apibūdintume šių faktorių vaidmenį ląstelės žūtyje, tame tarpe ir DNR pažaidoje bei signalinių baltymų ekspresijoje. Kadangi prooksidantinis QUE citotoksiškumas gali būti lydimas DNR ir kitų molekulių alkilavimo (Gliszczynska-Swiglo *et al.*, 2003; Walle *et al.*, 2003), jo poveikis taip pat buvo lyginamas su alkilinančio ir nealkilinančio chinono poveikiu.

#### 3.1. Chinonų ir polifenolių citotoksiškumas MH-22A ląstelėse

Nustatėme, kad tiriami chinonai MH-22A kultūroje pasižymėjo skirtingu citotoksišku aktyvumu (15 pav., 1 lentelė).



15 pav.  $cL_{50}$  priklausomybė aziridinil-nepavaduotų chinonų (neužpildyti skrituliukai), aziridinil-pavaduotų chinonų (juodai užpildyti skrituliukai) ir daunorubicino (juodai užpildytas trikampis) nuo redokso poros chinono/semichinono potencialo prie pH 7.0 ( $E^1_7$ ) MH-22A ląstelėse.

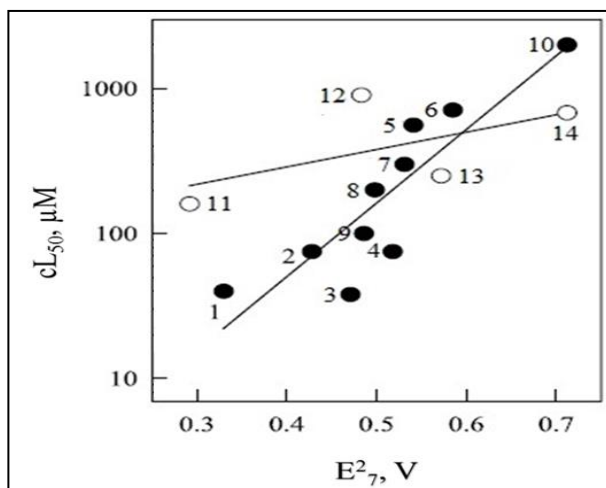
Junginių citotoksiškumas kiekybiškai buvo vertintas MTT metodu po 24 poveikio valandų.

Jautriausiai pelės hepatomos ląstelės reagavo į aziridinil-pavaduotą benzochinoną RH1. Kiek mažiau citotoksiškas buvo MeDZQ.

**1 lentelė.** Tirtų chinonų redokso poros chinono/semichinono potencialo, esant pH 7.0 ( $E^1_7$ ) (pagal: Wardman *et al*, 1989 ir Di Francesco *et al*, 2004) ir jų  $cL_{50}$  koncentracijos MH-22A ląstelių kultūroje po 24 val. poveikio palyginimas.

Nr.	Junginys	$E^1_7$ , V	$cL_{50}$ , $\mu$ M
1.	2,3-dichlor-1,4-naftochinonas	-0.035	$2.7 \pm 0.1$
2.	DZQ	-0.054	$0.25 \pm 0.05$
3.	5-hidroksi-1,4-naftochinonas	-0.09	$2.5 \pm 0.04$
4.	5,8-dihidroksi-1,4-naftochinonas	-0.11	$0.58 \pm 0.05$
5.	9,10-fenantreno chinonas	-0.12	$4.6 \pm 0.3$
6.	Trimetil-1,4-benzochinonas	-0.15	$25.0 \pm 8.0$
7.	1,4-naftochinonas	-0.15	$3.1 \pm 0.05$
8.	2-metil-1,4-naftochinonas	-0.20	$18.0 \pm 1.3$
9.	Trimetil-aziridinil-1,4-benzochinonas	-0.23	$1.3 \pm 0.3$
10.	MeDZQ	-0.23	$0.31 \pm 0.05$
11.	RH1	-0.23	$0.12 \pm 0.02$
12.	Tetrametil-1,4-benzochinonas	-0.26	$59.0 \pm 5.0$
13.	1,8-dihidroksi-1,4-antrachinonas	-0.325	$120 \pm 15.0$
14.	Daunorubicinas	-0.34	$5.9 \pm 0.5$
15.	BZQ	-0.38	$28.0 \pm 4.0$
16.	2-hidroksi-1,4-naftochinonas	-0.41	$500 \pm 80$

Analogiškus tyrimus atlikus vertinant polifenolių citotoksiškumą nustatėme, kad flavonoidai ir hidroksibenzenai pasižymi skirtingu citotoksiniu aktyvumu MH-22A ląstelių kultūroje (16 pav., 2 lentelė).



16 pav.  $cL_{50}$  priklausomybė hidroksibenzenų (juodai užpildyti skrituliukai) ir flavonoidų (neužpildyti skrituliukai) nuo vienelektroninės oksidacijos potencialo ( $E^{27}$ ) MH-22A ląstelėse.

Junginių citotoksiškumas kiekybiškai buvo vertinamas MTT metodu po 24 poveikio valandų.

Analogiški rezultatai buvo gauti ląsteles dažant tripano mėliu (rezultatai nepateikiami).

**2 lentelė.** Tirtų polifenolių redokso poros fenoksilo radikalas/fenolis potencialas, esant pH 7.0 ( $E^{27}$ ) (pagal: Wardman *et al.*, 1989 ir Jovanovic *et al.*, 1998) ir jų  $cL_{50}$  koncentracijos MH-22A ląstelių kultūroje po 24 val. poveikio palyginimas.

Nr.	Junginys	$E^{27}(V)$	$cL_{50}\mu M$
<b>Hidroksibenzenai</b>			
1.	Di-3,5-t-butyl-katecholis	0.39	$40 \pm 6\mu M$
2.	t-butylhidrochinonas	0.46	$75 \pm 12\mu M$
3.	4-metil-katecholis	0.46	$45 \pm 5\mu M$
4.	Katecholis	0.53	$75 \pm 15\mu M$
5.	Kofeino rūgštis	0.54	$560 \pm 60\mu M$
6.	Metilgalatas	0.56	$450 \pm 30\mu M$
7.	Etilgalatas	0.56	$300 \pm 50\mu M$
8.	Bis(1,6-heksanediol)- galatas	0.56	$200 \pm 40\mu M$
9.	Oktilgalatas	0.56	$100 \pm 20\mu M$
10.	4-metoksifenolis	0.73	$\geq 2000\mu M$
<b>Favonoidai</b>			
11.	Kvercetas	0.33	$140 \pm 25 \mu M$
12.	Taksifolinas	0.50	$900 \pm 100\mu M$
13.	Morinas	0.60	$250 \pm 35\mu M$
14.	Kempferolas	0.75	$680 \pm 80\mu M$

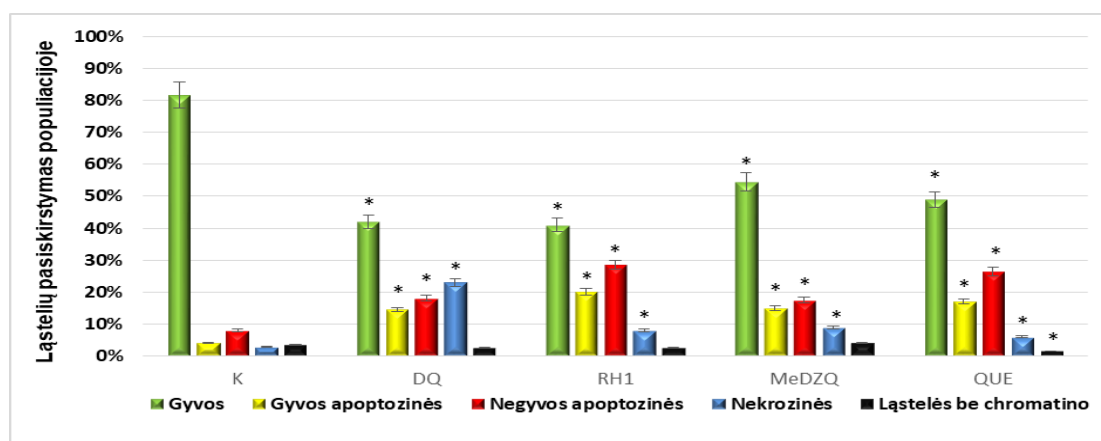
Įvertinę gautus rezultatus, tolimesniems tyrimams pasirinkome aziridinilo grupę turintį benzochinoną RH1 ir polifenolį QUE, kurių  $cL_{50}$  atitinkamai yra  $0.12 \pm 0.02 \mu M$  ir  $140 \pm 25 \mu M$ . Kaip modelinį junginį tyrimams naudojome 2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzochinoną – durochinoną (DQ), kurio  $cL_{50}$  koncentracija yra beveik 500 kartų didesnė už RH1 -  $59 \mu M$ . Taip pat, tiriamų

junginių citotoksiškumą palyginome su kito aziridinil-pavaduoto benzochinono – MeDZQ (RH1 analogas) – veikimu, kurio cL<sub>50</sub> tirtose MH-22A ląstelėse yra 0.31 ± 0.1 μM.

### 3.2. Chinonų ir polifenolių sukeliama ląstelių žūtis

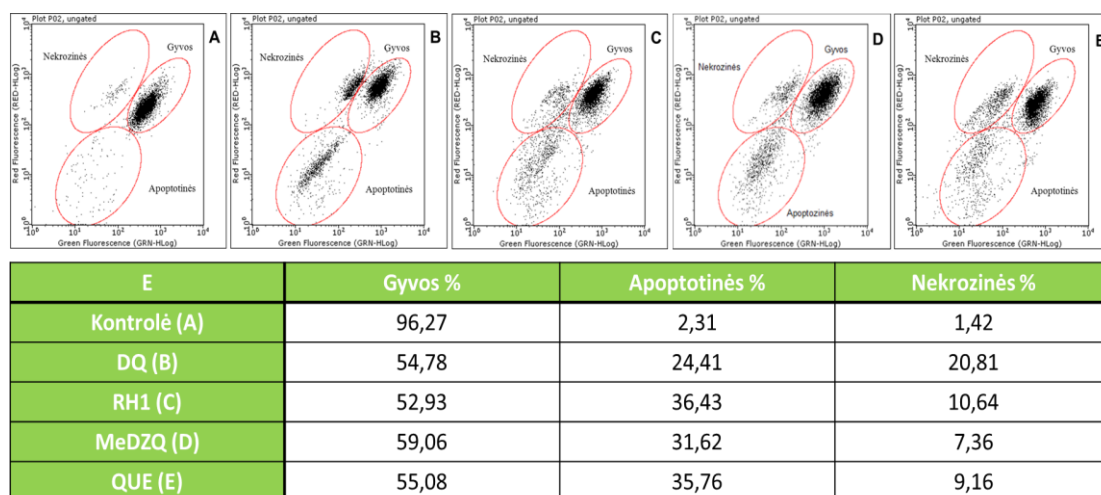
Prieš pradėdami vertinti pasirinktų medžiagų aktyvinius molekulinis mechanizmus, fluorescentinės mikroskopijos bei tėkmės citometrijos metodais ištyrėme RH1, MeDZQ, QUE bei DQ sukeltą žūtį MH-22A ląstelėse. Bandymų standartizacijai buvo naudojamos junginių koncentracijos, atitinkančios cL<sub>50</sub>.

Gauti rezultatai parodė, kad po poveikio RH1 ir MeDZQ vyravo apoptozės būdu žūstančios ląstelės, sudarančios apie pusę visos populiacijos. Iš jų, po RH1 poveikio, 28.5 % buvo negyvų ir 20 % gyvų apoptozinių ląstelių. Nekrozės būdu žuvusių ląstelių buvo mažiau negu 10 %. Po poveikio QUE taip pat vyravo apoptozinė ląstelių žūtis: 26.5 % negyvų ir 17 % gyvų apoptozinių ląstelių. Kiek kitokie rezultatai gauti paveikus MH-22A ląsteles DQ. Čia apoptozės ir nekrozės būdu žuvusių ląstelių kiekis buvo panašus ir sudarė atitinkamai 32.5 % (iš jų 14.5 % buvo gyvos ir 18 % negyvos apoptozinės ląstelės) ir 23 % nuo visų ląstelių (17 pav.).



17 pav. Ląstelių žūtis analizė po poveikio DQ, RH1, MeDZQ ir QUE panaudojant AO/EB dažų mišinį. Procentinis gyvų, apoptozinių ir nekroziinių ląstelių pasiskirstymas po poveikio DQ (59 μM), RH1 (0,12 μM), MeDZQ (0,31 μM) ir QUE (140 μM). Poveikių trukmė – 24 val. \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės (ląstelės be poveikio) ir DQ, RH1, MeDZQ bei QUE veiktų ląstelių (p < 0,05).

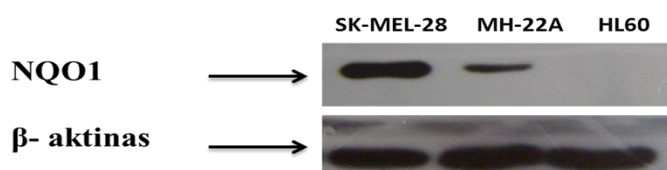
Panaši tendencija buvo gauta ir analizuojant ląstelių žūtį tėkmės citometru. Iš 18 pav. pateiktų duomenų matome, kad po poveikio RH1, MeDZQ ir QUE vyrauja apoptozinė ląstelių žūtis, tuo tarpu DQ paveiktose MH-22A ląstelėse yra santykinai didesnis nekrozės būdu žuvusių ląstelių kiekis.



**18 pav. Ląstelių žūties analizė tėkmės citometru.** Procentinis gyvų, apoptozinių ir nekrozinių ląstelių pasiskirstymas: A – kontrolė (ląstelės be poveikio), B – E - po poveikių: B - DQ (59  $\mu$ M), C - RH1 (0,12  $\mu$ M), D – MeDZQ (0,31  $\mu$ M) ir E - QUE (140  $\mu$ M). Poveikių trukmė – 24 val.

### 3.3. NQO1 vaidmuo MH-22A ląstelių žūties procese

Darbe naudota MH-22A ląstelių linija yra navikinės kilmės, tačiau tikslių duomenų apie NQO1 kiekį šiose ląstelėse nėra. Todėl pirmiausia buvo patikrintas MH-22A ląstelėse esantis NQO1 fermento kiekis. Palyginimui buvo naudotos žmogaus melanomos SK-MEL-28 linijos ląstelės, kurios, literatūros duomenimis, pasižymi dideliu NQO1 kiekiu (Doherty *et al.*, 1998) bei žmogaus promielocitinės leukemijos HL-60 ląstelės, kuriose NQO1 aktyvumas labai mažas, o raiška imunoblotingo metodu praktiškai neregistruojama (Perez-Sacau *et al.*, 2007; Pink *et al.*, 2000).



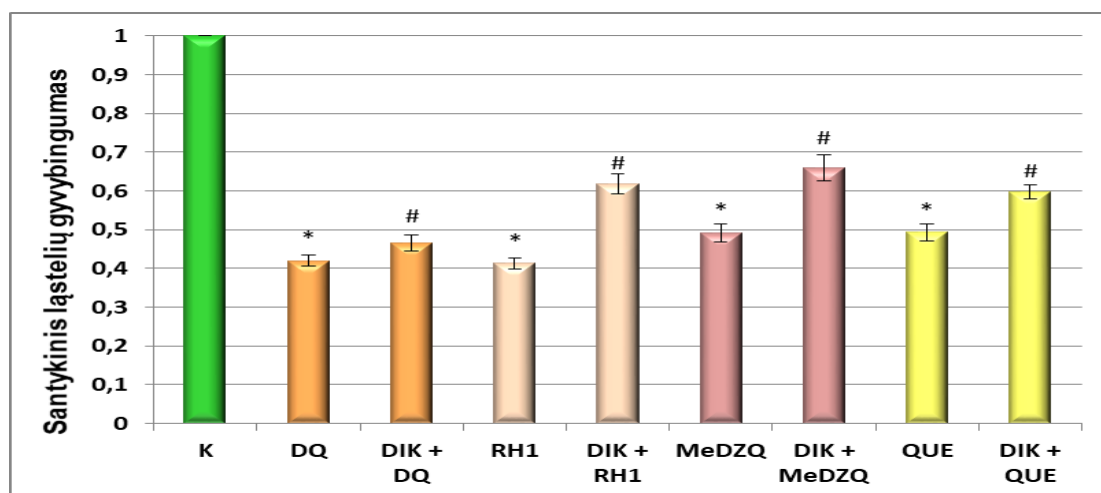
**19 pav. NQO1 raiškos palyginimas SK-MEL-28, MH-22A, HL-60 ląstelėse.**



Gauti rezultatai rodo (19 pav.), kad MH-22A ląstelėms būdinga NQO1 raiška, tačiau ji yra žymiai mažesnė nei šio baltymo lygis SK-MEL-28 ląstelėse. Įvertinus NQO1 aktyvumą MH-22A ląstelėse nustatyta, kad jis yra  $79,5 \pm 7,5 \text{ nmol} \times \text{mg baltymo}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ .

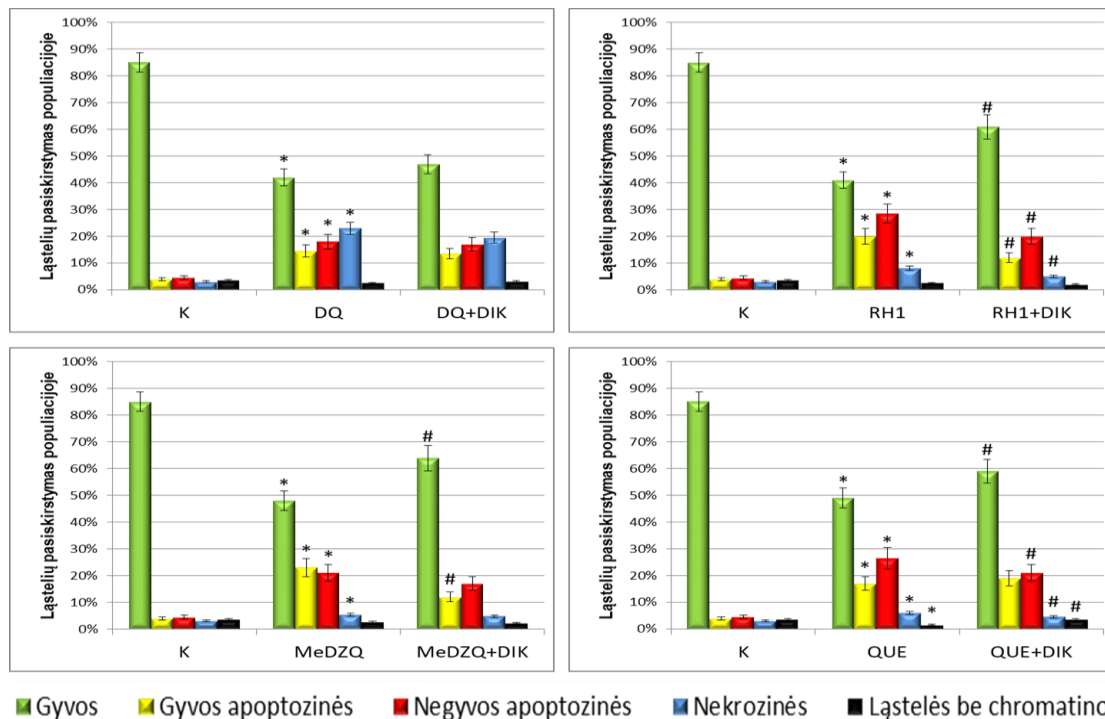
Norėdami įvertinti fermento NQO1 vaidmenį tiriamųjų junginių – RH1, MeDZQ, QUE bei DQ aktyviname ląstelių žūties procese, naudojome NQO1 slopiklį – dikumarolį (DIK) (Scott *et al.*, 2011).

Nustatėme, kad DIK didino MH-22A ląstelių gyvybingumą po poveikio visais tiriamaisiais junginiais (20 pav.), tačiau po RH1, MeDZQ ir QUE poveikių DIK veikimas buvo gerokai ryškesnis - čia gyvų ląstelių kiekis buvo žymiai didesnis nei po DQ poveikio.



**20 pav. NQO1 vaidmens tyrimas po DQ, RH1, MeDZQ bei QUE poveikių.** NQO1 slopikliu DIK (20  $\mu\text{M}$ ) ląstelės buvo veikiamos 30 min., po to buvo pridamos tiriamos medžiagos DQ (59  $\mu\text{M}$ ), RH1 (0,12  $\mu\text{M}$ ), MeDZQ (0,31  $\mu\text{M}$ ) ir QUE (140  $\mu\text{M}$ ). Poveikiai MH-22A ląstelių gyvybingumui vertinti MTT metodu; K - vienitui prilygintas ląstelių kiekis po 24 val. be poveikio \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės ir DQ, RH1, MeDZQ, QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1, MeDZQ ir QUE, bei ląstelių, paveiktų DIK kartu su vienu iš tiriamųjų junginių ( $p < 0,05$ ).

Šiuos rezultatus patvirtino gyvybingumo analizė - DIK stabdė tiriamų junginių indukuojamą ląstelių žūties procesą (21 pav.). Pastebėta, kad nuslopinus NQO1 aktyvumą, mažėja apoptozinių ląstelių, tačiau beveik nekinta nekrozės būdu žuvusių ląstelių kiekis.



**21 pav. DIK poveikio MH-22A ląstelių žūties pobūdžiui vertinimas, panaudojant AO/EB dažų mišinį.** DIK (20  $\mu$ M) ląstelės buvo veikiamos 30 min. prieš pridendant tiriamas medžiagas - DQ (59  $\mu$ M) RH1 (0,12  $\mu$ M), MeDZQ (0,31  $\mu$ M) bei QUE (140  $\mu$ M). \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės (ląstelės be poveikio) ir DQ, RH1, MeDZQ bei QUE paveiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1, MeDZQ ar QUE, bei ląstelių, paveiktų DIK kartu su vienu iš tiriamųjų junginių ( $p < 0,05$ ).

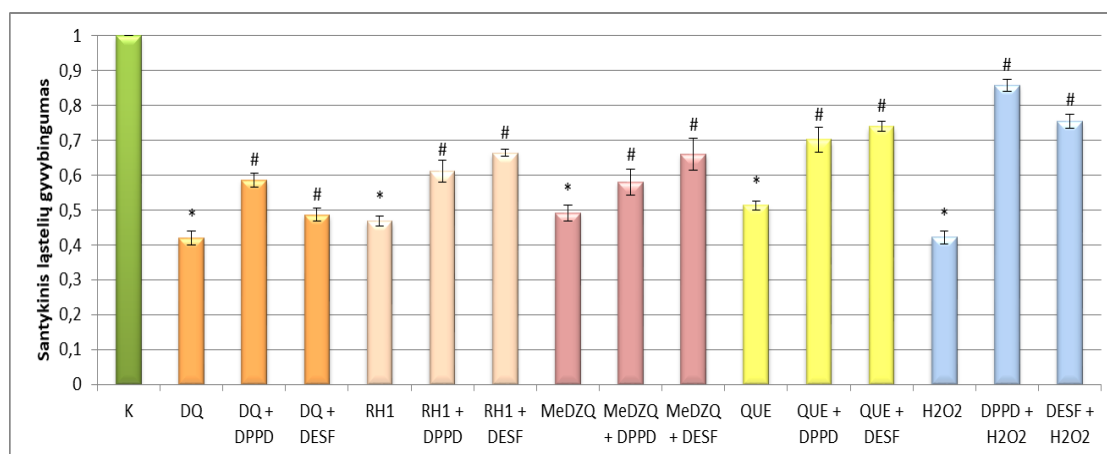
Papildomai ląstelių gyvybingumas buvo analizuotas tėkmės citometru, gauti analogiški rezultatai (rezultatai nepateikiami). Taigi, MH-22A ląstelių kultūroje slopinant NQO1 aktyvumą, gyvų ląstelių kiekis po RH1 ir QUE poveikių patikimai didėjo. Tačiau po modelinio benzochinono DQ poveikio kartu su slopikliu DIK šis skirtumas nebuvo toks ryškus. Ląstelių gyvybingumą tausojantis DIK vaidmuo, o tuo pačiu ir NQO1 reikšmė citotoksiniame procese buvo registruota ir po MH-22A ląstelių poveikio MeDZQ.

### 3.4. Oksidacinio streso reikšmė RH1 bei QUE poveikio metu

Norėdami įvertinti oksidacinio streso reikšmę tiriamais junginiais indukuotame ląstelių žūties procese naudojome du antioksidantus – N, N'-difetil-p-fenilendiaminą (DPPD) ir desferioksaminą (DESF) (Shimoni *et al.*, 1994; Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005). Gautus rezultatus lyginome su ląstelių

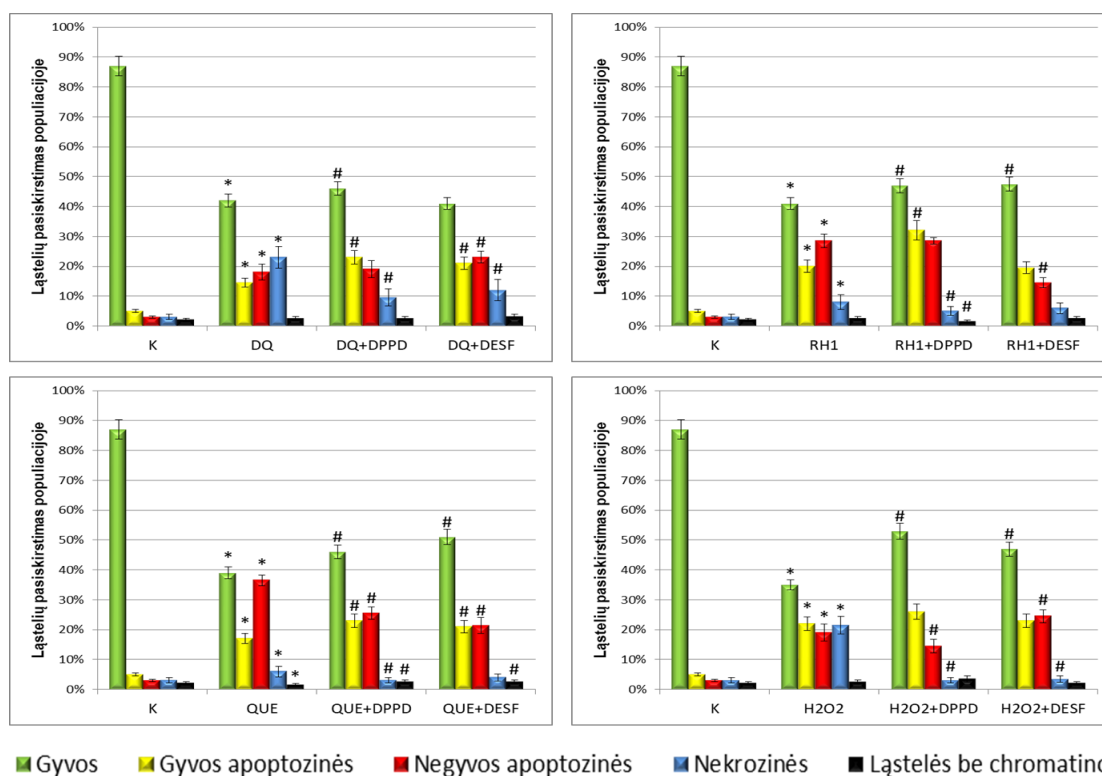
gyvybingumu po poveikio žinomam oksidacinio streso induktoriui – vandenilio peroksidu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Analizuojant antioksidantų įtaką tiriamųjų medžiagų veikimui MH-22A ląstelių kultūroje buvo nustatyta, kad po poveikio vien tik DQ, RH1, MeDZQ arba QUE gyvų ląstelių dalis buvo mažesnė negu ląsteles veikiant antioksidantais DPPD arba DESF kartu su vienu iš tiriamų junginių (22 pav.). Tai rodo, kad antioksidantas DPPD patikimai didina DQ, RH1, MeDZQ ir QUE veikiamų ląstelių gyvybingumą. Ląstelių kultūroje sukėlus oksidacinį stresą žinomam oksidacinio streso induktoriui H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> buvo gauti analogiški rezultatai. Abu antioksidantai H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> paveiktų ląstelių gyvybingumą padidino beveik dvigubai. Tirtomis medžiagomis veiktų ląstelių gyvybingumą šie antioksidantai didino mažiau, bet patikimai.



**22 pav. DPPD ir DESF įtaka tiriamųjų chinonų veikimui: gyvų ląstelių dalis po poveikio DQ, RH1, MeDZQ, QUE ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Antioksidantais DPPD arba DESF ląstelės buvo veikiamos 30 min. prieš pridendant tiriamas medžiagas. Poveikis MH-22A ląstelių gyvybingumui vertintas MTT metodu; K - vienetui prilygintas ląstelių kiekis po 24 val. be poveikio. \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės ir DQ (59 μM), RH1 (0,12 μM), MeDZQ (0,31 μM), QUE (140 μM) bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM) veiktų ląstelių (p < 0,05). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1, MeDZQ, QUE ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bei ląstelių, paveiktų antioksidantais DPPD (2 μM) arba DESF (300 μM) kartu su viena iš tirtų medžiagų (p < 0,05).

Panašūs rezultatai buvo pastebėti analizuojant ląstelių žūties būdą - ląsteles nudažius AO/EB dažų mišiniu (23 pav.). MH-22A ląstelės, paveiktos vien tik tiriamosiomis medžiagomis, buvo mažiau gyvybingos už paveiktąsias antioksidantais kartu su viena iš tirtų medžiagų.



**23 pav. MH-22A ląstelių žūties analizės rezultatai panaudojant AO/EB dažų mišinį.** Antioksidantais DPPD (2  $\mu\text{M}$ ) arba DESF (300  $\mu\text{M}$ ) ląstelės buvo veikiamos 30 min. prieš pridėdant tiriamas medžiagas - DQ (59  $\mu\text{M}$ ), RH1 (0,12  $\mu\text{M}$ ), QUE (140  $\mu\text{M}$ ) bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200  $\mu\text{M}$ ). \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės (ląstelės be poveikio) ir DQ, RH1, QUE bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> paveiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1, QUE ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bei ląstelių, paveiktų antioksidantais DPPD (2  $\mu\text{M}$ ) arba DESF (300  $\mu\text{M}$ ) kartu su viena iš tirtų medžiagų ( $p < 0,05$ ).

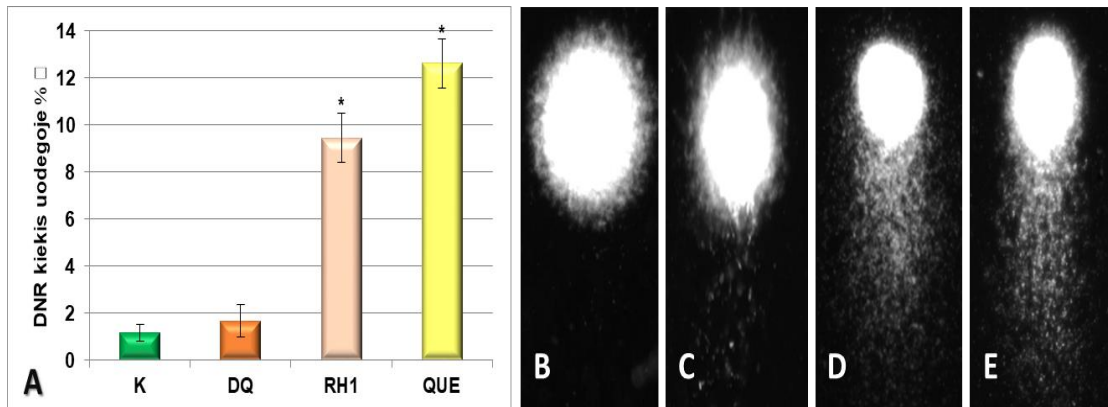
Analogiški rezultatai buvo gauti ląstelių gyvybingumą vertinant tripano mėliu bei tėkmės citometru (rezultatai nepateikiami).

### 3.5. DNR pažeidų reikšmė RH1 bei QUE poveikio metu

Norėdami įvertinti mūsų tirtų medžiagų galimą dar vieną citotoksiinį veikimo būdą - sukelti DNR pažeidas - panaudojome kometų metodą. Naudojant šį metodą ląstelių gyvybingumas turi būti didesnis nei 80 proc., todėl DNR pažeidų vertinimui naudojome mažesnes negu cL<sub>50</sub> tiriamų junginių koncentracijas – 25  $\mu\text{M}$  DQ, 0,03  $\mu\text{M}$  RH1 bei 75  $\mu\text{M}$  QUE.

DNR pažeidų, susidariusių paveikus MH-22A ląsteles tirtais junginiais, kiekį atspindi rezultatai, pateikti 24 pav. Matome, kad intensyviausiai DNR pažeidas sukėlė polifenolis QUE. Po aziridinil-pavaduoto benzochinono RH1

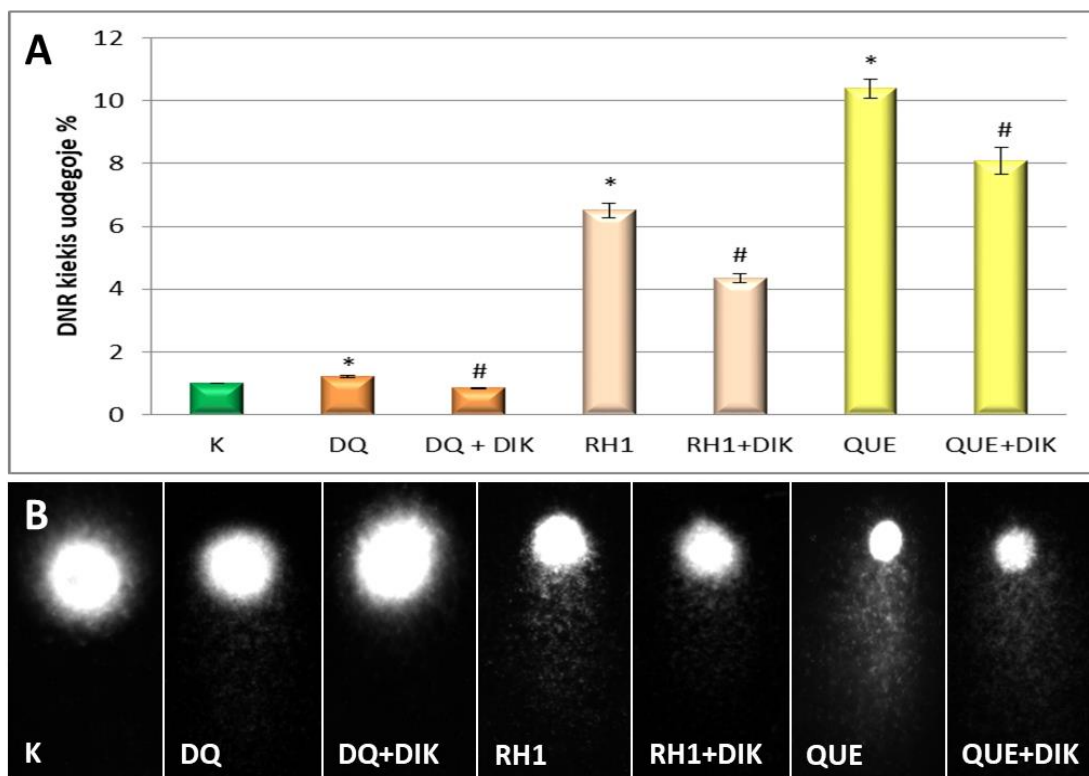
poveikio taip pat nustatytas reikšmingas DNR pažeidų kiekis, tuo tarpu modelinis benzochinonas DQ beveik neturėjo įtakos DNR pažeidų atsiradimui.



**24 pav. Procentinis DNR kiekis kometos „uodegoje“ po poveikio DQ, RH1 ir QUE.** A – kiekybinis DNR kiekio vertinimas kometos „uodegoje“ po 24 val. poveikio tiriamaisiais junginiais: DQ (25  $\mu$ M), RH1 (0,03  $\mu$ M) ir QUE (75 $\mu$ M); B-E kometų vaizdai (B – kontrolė (ląstelės be poveikio), toliau – poveikiai tiriamais junginiais: C - DQ, D – RH1, E – QUE). \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės (ląstelės be poveikio) ir RH1 bei QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ).

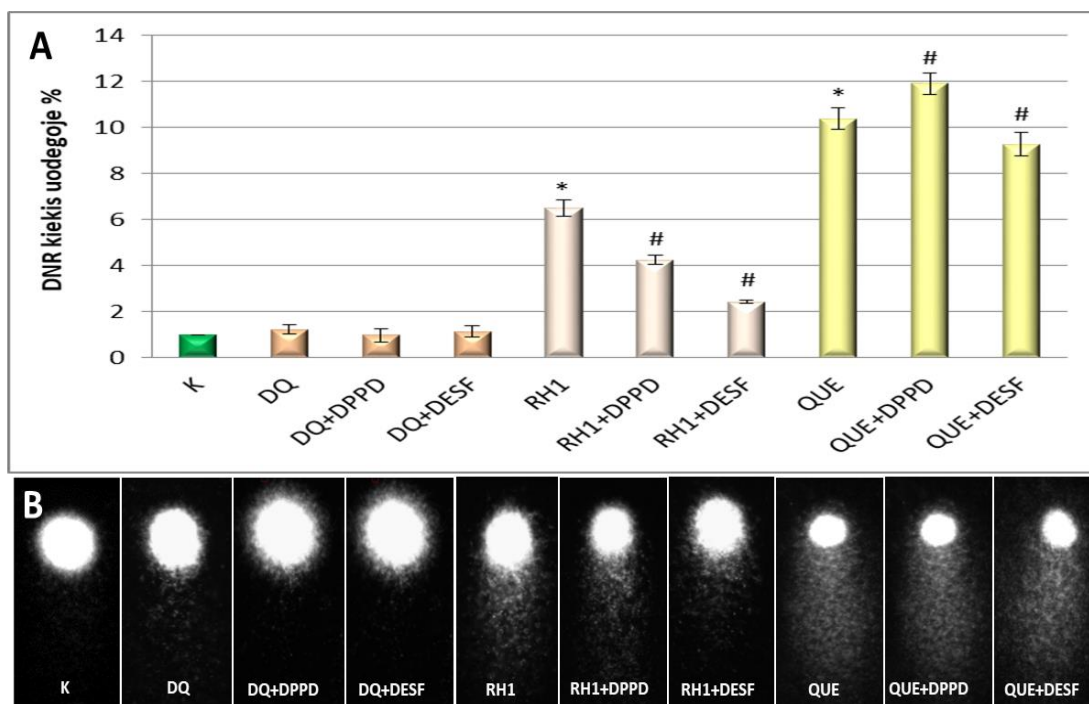
DNR pažeidos gali atsirasti dėl kelių priežasčių: NQO1 poveikio, susidarant aziridinil-hidrochinonams, kurie, savo ruožtu, gali alkilinti DNR (šio fermento vaidmenį aprašėme 3.3 skyriuje); taip pat DNR pažeidos gali susidaryti ir dėl oksidacinio streso, o kad oksidacinis stresas pasireiškia po RH1 bei QUE poveikio, taip pat nustatėme anksčiau (žr. 3.4 sk.).

Norėdami įvertinti, kas mūsų tiriamu atveju lemia DNR pažeidų atsiradimą, pirmiausia tyrėme NQO1 vaidmenį šiame procese. Tuo tikslu vėl naudojome šio fermento inhibitorių DIK. Nustatėme, kad DIK patikimai sumažino RH1 ir QUE sukeltą DNR pažeidų kiekį (25 pav.).



**25 pav. NQO1 vaidmuo DNR paųaidų susidaryme.** DIK (20  $\mu\text{M}$ ) tiriamos MH-22A ląstelės veikiamos 30 min. prieš pridendant tiriamas medžiagas - DQ (25  $\mu\text{M}$ ), RH1 (0,03  $\mu\text{M}$ ) bei QUE (75  $\mu\text{M}$ ). A – kiekybinis DNR kiekio vertinimas kometos „uodegoje“ po 24 val. poveikio tiriamaisiais junginiais; B - kometų vaizdai. \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės (ląstelės be poveikio) ir DQ, RH1 bei QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1 ar QUE, bei ląstelių, paveiktų DIK kartu su vienu iš tiriamųjų junginių ( $p < 0,05$ ).

Tačiau DIK tik iš dalies sumažino RH1 ir QUE sukeltą DNR paųaidų kiekį, todėl tikėtina, kad šiame procese yra svabus ir kitas ląstelių ųities induktorius - tiriamų junginių poveikio metu susidarantis oksidacinis stresas, kurio įtaką ųities procese jau nustatėme. Siekdami tai patvirtinti ar paneigti, naudojome antioksidantus - DPPD (2  $\mu\text{M}$ ) ir DESF (300  $\mu\text{M}$ ). DNR paųaidų, susidariusių paveikus MH-22A ląsteles tiriamais junginiais ir antioksidantais, mastą atspindi rezultatai, pateikti 26 pav. Matome, kad tiek DPPD, tiek ir DESF efektyviai sumažino RH1 indukuojamų DNR paųaidų kiekį. Panaši tendencija po DESF poveikio stebėta ir QUE paveiktoje ląstelių populiacijoje, tačiau DPPD veikimas šiuo atveju buvo priešingas - paųaidų kiekis net padidėjo. DQ poveikio metu antioksidantai veikė panašiai - mažino jų indukuotą DNR paųaidų kiekį, tačiau gauti skirtumai buvo nepatikimi.



**26 pav. Oksidacinio streso vaidmuo DNR pažeidimų susidaryme.** Antioksidantais DPPD (2  $\mu\text{M}$ ) bei DESF (300  $\mu\text{M}$ ) tiriamos MH-22A ląstelės buvo veikiamos 30 min. prieš pridėdant tiriamas medžiagas - DQ (25  $\mu\text{M}$ ), RH1 (0,03  $\mu\text{M}$ ) bei QUE (75  $\mu\text{M}$ ). A – kiekybinis DNR kiekio vertinimas kometos „uodegoje“ po 24 val. poveikio tiriamaisiais junginiais; B - kometų vaizdai. \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės (ląstelės be poveikio) ir RH1 bei QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik RH1 ar QUE, bei ląstelių, paveiktų DPPD ar DESF kartu su vienu iš tiriamųjų junginių ( $p < 0,05$ ).

### 3.6. MAP kinazių vaidmuo RH1 bei QUE indukuotame MH-22A ląstelių žūties procese

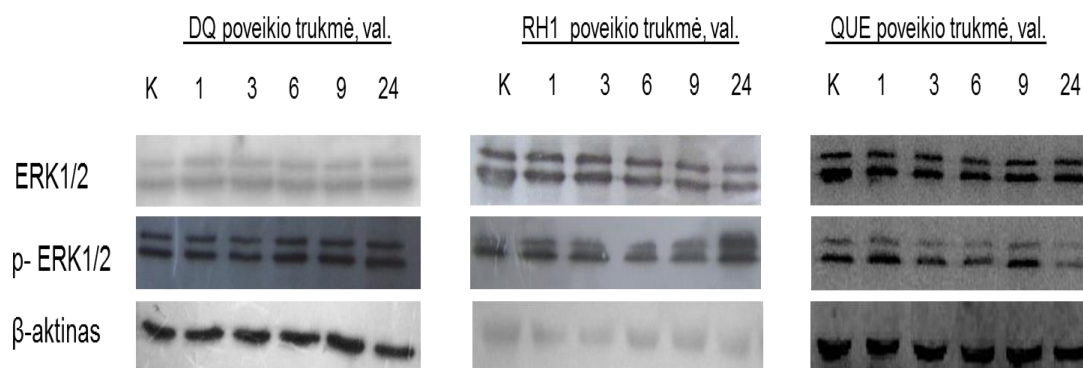
MAPK signalinė kaskada yra viena iš geriausiai ištirtų signalinių kelių, dalyvaujančių ląstelėms atsakant į įvairius stresinius poveikius, tarp kurių yra ir oksidacinis stresas (Huang *et al.*, 2010). Todėl šių kinazių vaidmuo, tikėtina, yra svabus ir mūsų tiriamų poveikių metu. Siekdami išsiaiškinti analizuojamų skirtingos molekulinės struktūros junginių indukuoto nevienodo citotoksinio aktyvumo mechanizmus, vertinome ERK, JNK ir p38 MAP kinazių raiškos ir aktyvinimo kinetiką bei šių molekulių vaidmenį MH-22A ląstelėse po tiriamų junginių poveikio.

#### 3.6.1. MAPK kinazės ERK vaidmuo

Imunoblotingo metodu įvertinus tiriamų medžiagų - RH1, QUE bei DQ įtaką ERK kinazių raiškai ir fosforilinimui nustatėme, kad tiriamas ląstelės



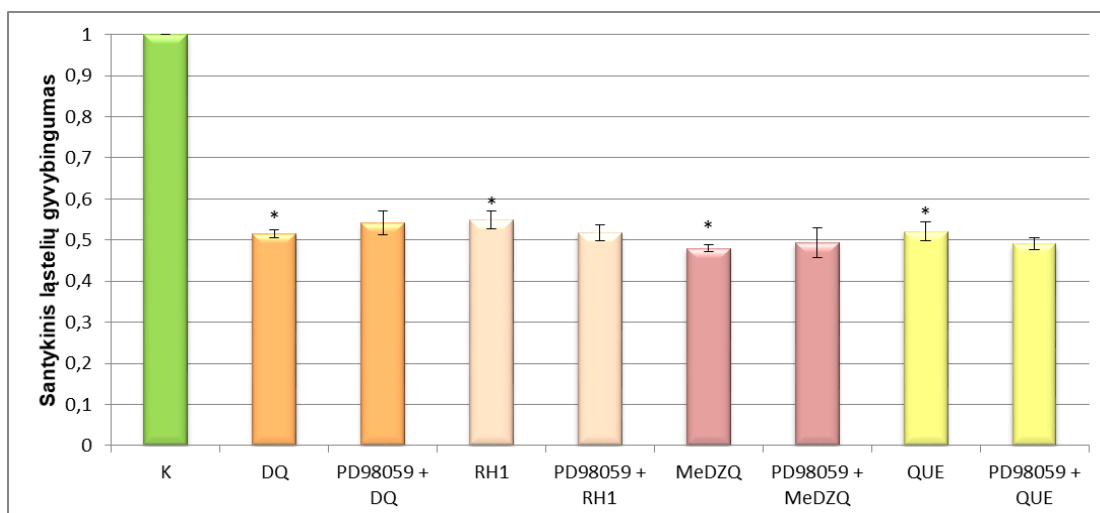
veikiant DQ, RH1 ir QUE, baltymų ERK1/2 raiška išlieka pastovi visas 24 val., o fosfo-ERK1/2 lygis kinta po ilgesnio RH1 ir QUE poveikio: 24-tą val. RH1 indukavo fosfo-ERK1/2 lygio padidėjimą, tuo tarpu po poveikio QUE atvirkščiai – stebimas sumažėjimas (27 pav.). Paveikus ląsteles aziridinil-pavaduotu chinonu MeDZQ (rezultatai nepateikiami) nebuvo registruota nei kinazės ERK raiškos, nei fosforilinimo pokyčių.



**27 pav. ERK1/2 ir fosfo-ERK1/2 baltymų raiškos lygio pokyčiai MH-22A ląstelėse 24 val. laikotarpyje po poveikių junginiais DQ (59 μM), RH1 (0,12 μM) bei QUE (140 μM).**

Toliau ERK kinazės vaidmenį vertinome, naudodami netiesioginį jos slopiklį PD98059, kuris, slopindamas MEK1/2 aktyvumą, slopina ERK kinazės aktyvinimą. Gauti rezultatai pateikiami 28 pav. Matome, kad ERK slopiklis mūsų tiriamų junginių atvejais ryškesnės įtakos MH-22A ląstelių gyvybingumui neturėjo. Panašūs rezultatai gauti ir po poveikio aziridinil-pavaduotu chinonu MeDZQ, slopiklis PD98059 ryškesnės įtakos ląstelių gyvybingumui neturėjo.

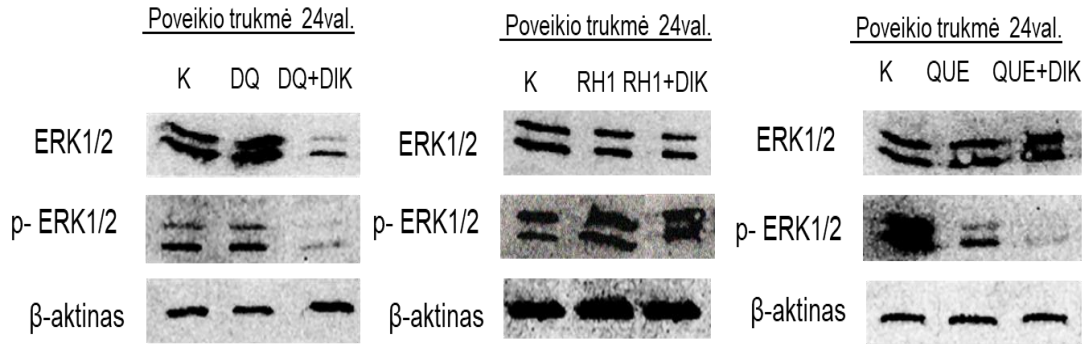




**28 pav. ERK kinazės slopiklio PD98059 įtaka MH-22A ląstelių gyvybingumui po poveikių tiriamais junginiais.** Ląstelės buvo veikiamos slopikliu PD98059 (20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridėdant tiriamus junginius DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M), MeDZQ (0,31  $\mu$ M) ar QUE (140  $\mu$ M). Efektas vertintas MTT metodu po 24 poveikio valandų ir išreikštas santykinio gyvybingumo vidurkiu, apskaičiuotu iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų,  $\pm$  SN; K - vienetai prilygintas ląstelių kiekis po 24 val. be poveikio \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės ir DQ, RH1, MeDZQ ar QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ).

**NQO1 ir ERK ryšys.** Toliau tyrėme, kaip kinta ERK raiškos ir fosforilavimo lygis, paveikus MH-22A ląsteles tiriamomis medžiagomis (DQ, RH1, QUE) bei NQO1 inhibitoriumi DIK.

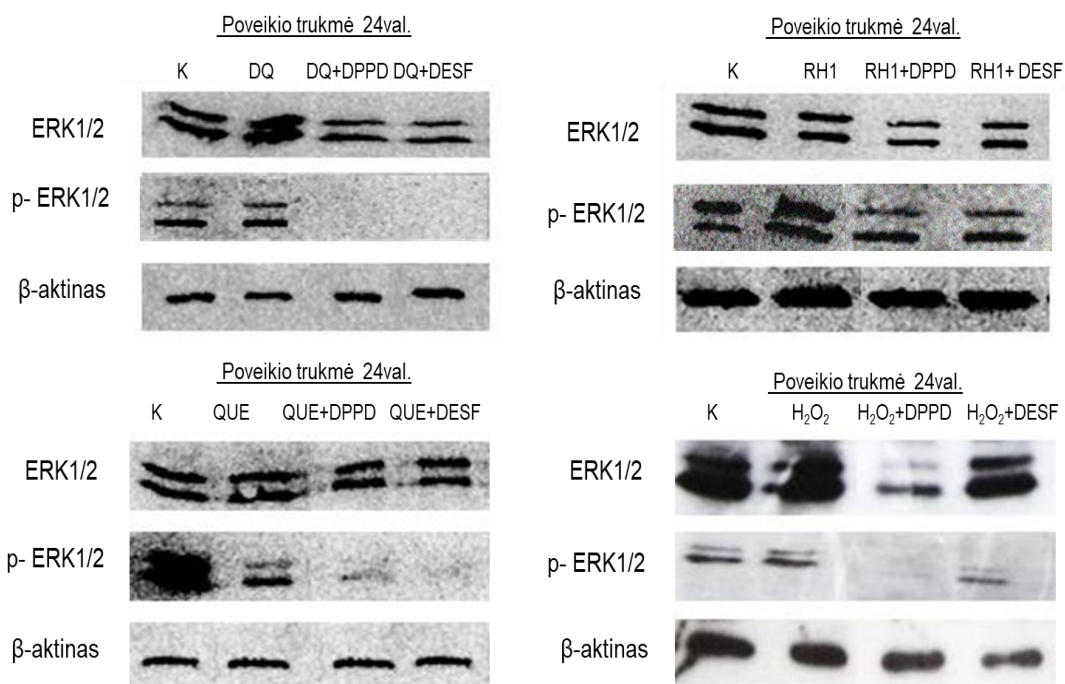
29 paveiksle pateikti duomenys atspindi ERK bei fosfo-ERK lygio pokyčius, nuslopinus fermento NQO1 aktyvumą. DIK turėjo įtakos tirtų baltymų raiškos lygio pokyčiams po modelinio aziridinil-nepavaduoto benzochinono DQ bei QUE poveikių. DIK poveikis ERK raiškai buvo nevienareikšmis - po DQ poveikio ji sumažėjo, o po QUE poveikio, atvirkščiai, padidėjo. Iš gautų rezultatų matome, kad DIK žymiai sumažino fosfo-ERK baltymo lygį po DQ bei QUE poveikių, tačiau nekeitė tirto baltymo lygio po RH1 poveikio.



**29 pav. DIK įtaka ERK1/2 ir fosfo-ERK1/2 baltymų lygiui MH-22A ląstelėse.** MH-22A ląstelės buvo veikiamos DIK (20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridendant tiriamas medžiagas - DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M) bei QUE (140  $\mu$ M). Baltymų lygis analizuotas po 24 poveikio valandų.

**Oksidacinio streso įtaka ERK raiškai.** Vertindami antioksidantų DPPD bei DESF poveikį MAPK kinazės ERK1/2 raiškai ir fosforilinimui nustatėme, kad 24-tą poveikio valandą antioksidantai nežymiai keitė ERK1/2 raišką po DQ bei RH1 poveikių (30 pav.), tuo tarpu palyginimui naudoto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atveju, po H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poveikio kartu su DPPD buvo nustatytas gana ryškus ERK1/2 baltymo lygio sumažėjimas.

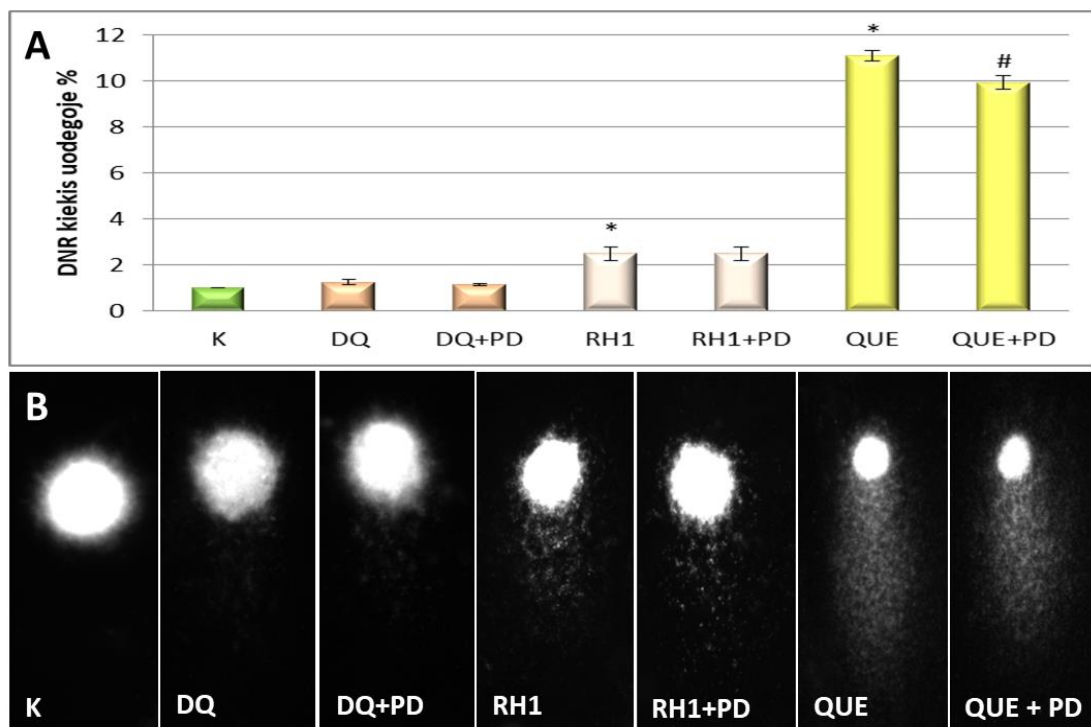
Fosforilinta ERK baltymo forma po tiriamųjų junginių bei antioksidantų poveikio taip pat kito: DQ, QUE ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atveju - antioksidantai reikšmingai slopino fosfo-ERK baltymo lygį. Po RH1 poveikio ERK 1/2 fosforilinimo lygis taip pat mažėjo ir grįžo į kontrolinių ląstelių populiacijoje registruotą fosfo-ERK baltymo lygį.



**30 pav. Oksidacinio streso įtaka ERK1/2 ir fosfo-ERK1/2 baltymų lygiui MH-22A ląstelėse.** MH-22A ląstelės veiktos DPPD (2  $\mu$ M) bei DESF (300  $\mu$ M) 30 min. prieš pridėdant tiriamus junginius - DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M) bei QUE (140  $\mu$ M). Baltymų lygis analizuotas po 24 poveikio valandų.

Apibendrinant baltymo ERK1/2 raiškos ir fosforilinimo pokyčius po tirtų junginių poveikių galima teigti, šis signalinis kelias nėra svarbus RH1 veikimui dalyvaujant NQO1 fermentui, tačiau galimai dalyvauja tirtų ląstelių atsake į šio chinono sukeltą oksidacinį stresą. Kiek kitoks ERK signalinio kelio vaidmuo yra modelinio benzochinono DQ ir polifenolio QUE veikimo metu – registruoti ERK raiškos ir fosforilinimo pokyčiai po DIK ir antioksidantų pridėjimo parodo, kad šis kelias visgi dalyvauja MH-22A ląstelėms atsakant į DQ bei QUE poveikius.

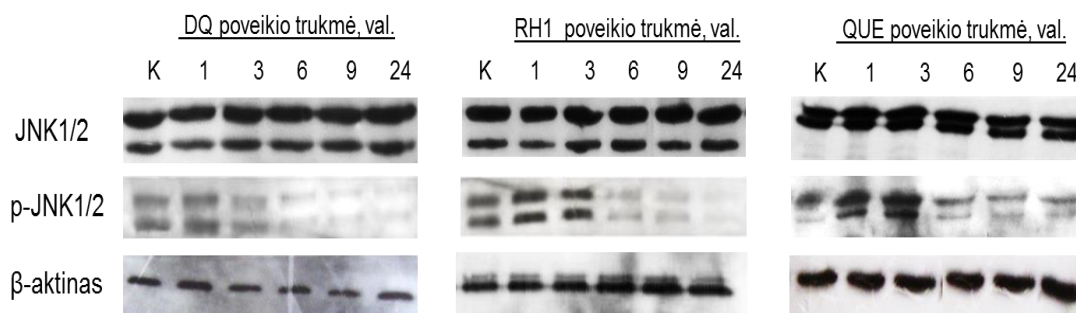
**ERK vaidmuo DNR pažeidų sukėlime.** Anksčiau esame nustatę, kad mūsų tiriamos medžiagos - RH1 bei QUE - efektyviai indukuoja DNR pažeidas. Šioje darbo dalyje vertiname ERK signalinės molekulės vaidmenį DNR pažeidų susidarymo procese. Tuo tikslu naudojome netiesioginį ERK1/2 kinazės slopiklį PD98059. Gauti rezultatai pateikti 31 pav. Matome, kad ERK 1/2 baltymo nuslopinimas neturi ryškesnio poveikio RH1 ir DQ indukuotam DNR pažeidų kiekiui, tuo tarpu slopiklis PD98059 nežymiai, bet statistiškai patikimai slopino QUE sukeltas pažeidas.



**31 pav. ERK1/2 vaidmuo DNR paųaidų susidarymo procese.** MH-22A ląstelės buvo veikiamos slopikliu PD98059 (PD, 20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridendant tiriamas medžiagas - DQ (25  $\mu$ M), RH1 (0,03  $\mu$ M) bei QUE (75  $\mu$ M). A – kiekybinis DNR kiekio vertinimas kometos „uodegoje“ po 24 h poveikio tiriamaisiais junginiais; B - kometų vaizdai.\*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės (ląstelės be poveikio) ir RH1 bei QUE paveiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik QUE bei ląstelių, veiktų PD98059 kartu su QUE ( $p < 0,05$ ).

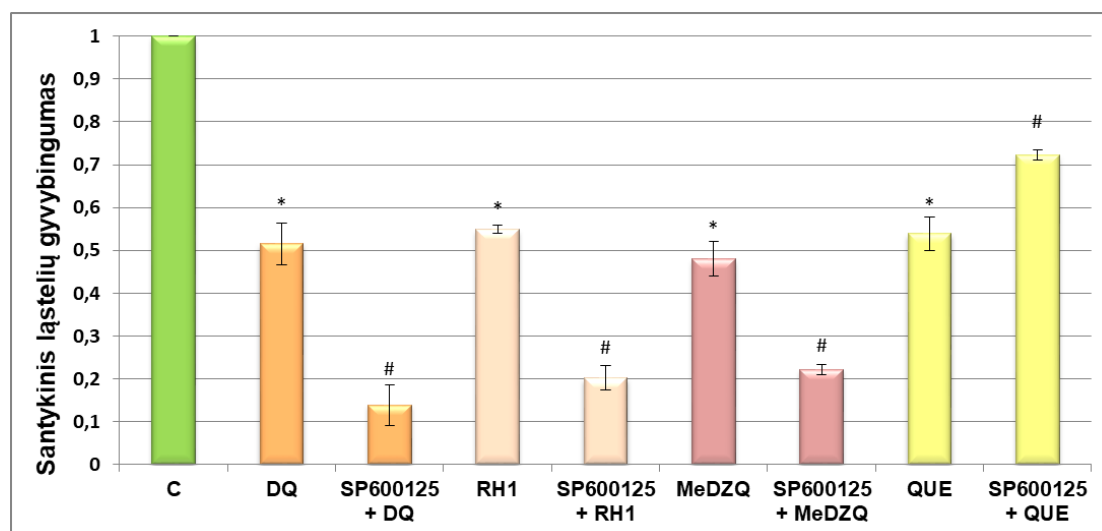
### 3.6.2. MAPK kinazės JNK vaidmuo

Pirmiausia 24-ių valandų laikotarpyje įvertinome JNK raiškos ir fosforilinimo dinamiką MH-22A ląsteles paveikus tiriamomis medžiagomis - RH1, QUE bei DQ. Gauti rezultatai pateikiami 32 pav. Matome, kad JNK1/2 raiška visais atvejais išlieka pastovi, tačiau keičiasi šio baltymo fosforilinimo lygis, kuris kinta laike, t. y., veikiant DQ, RH1 bei QUE po 1-3 valandų stebimas padidėjęs fosfo-JNK1/2 lygis, kuris visais atvejais nuo šeštos poveikio valandos staigiai mažėjo. Panašūs rezultai gauti ir po poveikio aziridinil-pavaduotu chinonu MeDZQ (duomenys nepateikiami).



**32 pav. JNK1/2 ir fosfo-JNK1/2 baltymų raiškos lygis MH-22A.** MH-22A ląstelės veiktos DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M) bei QUE (140  $\mu$ M).

JNK signalinio kelio vaidmens įvertinimui MH-22A ląstelių žūties procese naudojome JNK slopiklį SP600125 (33 pav.), kuris tiesiogiai slopina tolesnį signalo perdavimą ir tokiu būdu neleidžia aktyvuoti vieno iš pagrindinio šios kinazės taikinio branduolyje – transkripcijos veiksnio c-Jun (Cargnello ir Roux, 2011; Bennett *et al.*, 2001).

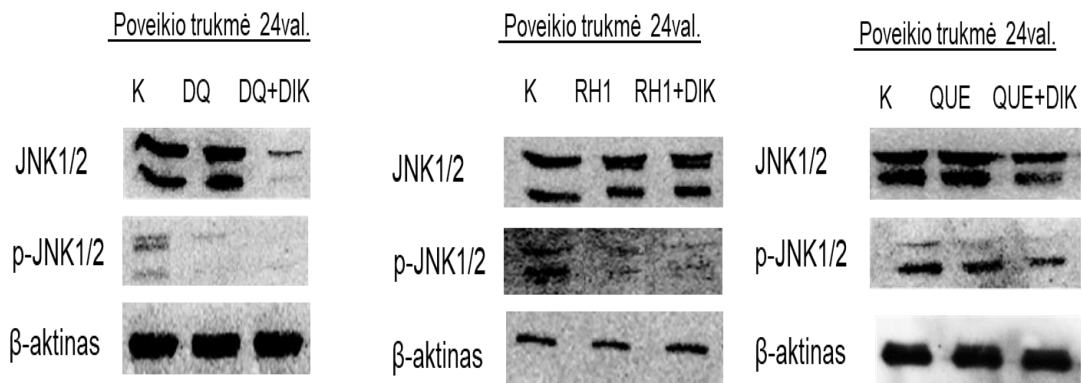


**33 pav. JNK kinazės slopiklio SP600125 įtaka MH-22A ląstelių gyvybingumui paveikus tiriamais junginiais.** Ląstelės buvo veikiamos slopikliu SP600125 (20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridėdant DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M), MeDZQ (0,31  $\mu$ M) ar QUE (140  $\mu$ M). Efektas vertintas MTT metodu po 24 val. poveikio ir išreikštas santykinio gyvybingumo vidurkiu, apskaičiuotu iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų,  $\pm$  SN: K - vienetui prilygintas ląstelių kiekis po 24 val. be poveikio \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės ir DQ, RH1, MeDZQ ar QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1, MeDZQ ar QUE, bei ląstelių, paveiktų slopikliu SP600125 kartu su viena iš tiriamųjų medžiagų ( $p < 0,05$ ).

Gauti rezultatai parodė, kad SP600125 patikimai mažina ląstelių gyvybingumą po poveikio benzochinonais DQ, RH1 ir MeDZQ – gyvų ląstelių

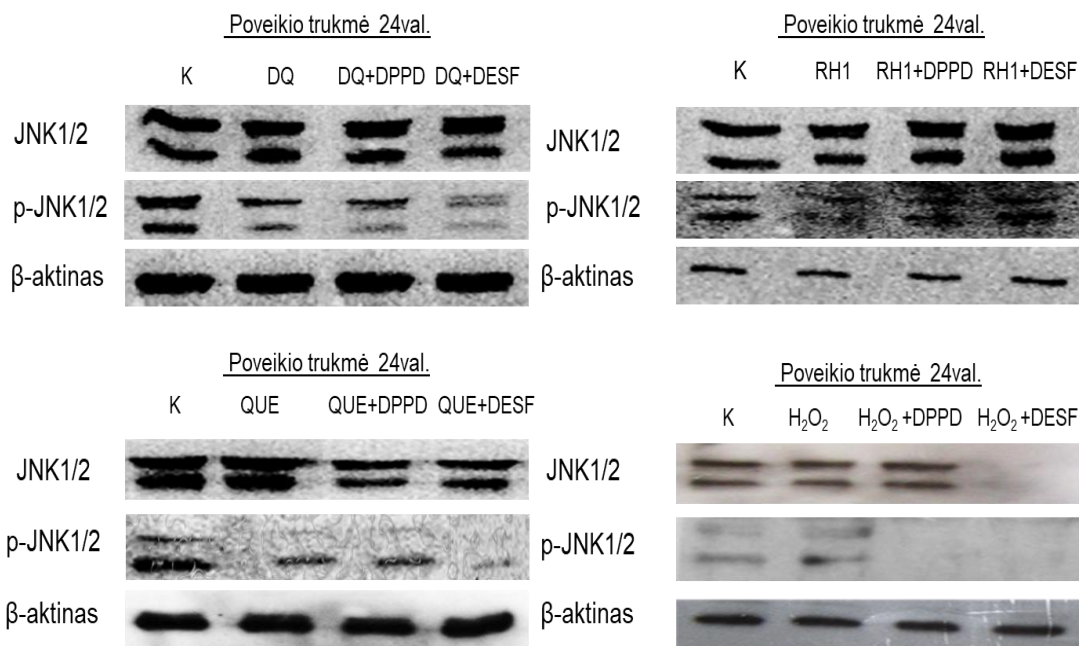
dalis čia buvo daugiau nei 2 kartus mažesnė nei populiacijose, veiktose vien tik DQ, RH1 ar MeDZQ, tačiau po polifenolio QUE poveikio, atvirkščiai, JNK nuslopinimas lėmė didesnę atsparumą tiriamam junginiui. Pats slopiklis SP600125 neturėjo įtakos tiriamų ląstelių gyvybingumui (duomenys nepateikiami).

**NQO1 ir JNK1/2 ryšys.** Vertindami NQO1 vaidmenį po tiriamųjų junginių poveikio, iš pradžių ląsteles paveikėme NQO1 slopikliu – DIK. Nustatėme, kad DIK mažino JNK raišką ir fosforilinimą paveikus tik kartu su modeliniu chinonu DQ, o kartu su RH1 ir QUE beveik neturėjo įtakos nei JNK raiškai, nei jo fosforilinimui (34 pav.).



**34 pav. DIK įtaka JNK1/2 ir fosfo-JNK1/2 baltymų lygiui MH-22A ląstelėse.** NQO1 slopikliu DIK (20  $\mu$ M) tiriamos MH-22A ląstelės buvo veikiamos 30 min. prieš pridendant tiriamas medžiagas - DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M) bei QUE (140  $\mu$ M). Baltymų lygis analizuotas po 24 poveikio valandų.

**Oksidacinio streso įtaka JNK1/2 raiškai.** Šiuo atveju vertinome MAPK kinazės JNK1/2 vaidmenį MH-22A ląstelėse po 24 valandų poveikio tiriamomis medžiagomis ir antioksidantais. Nustatėme, kad antioksidantai DPPD bei DESF nekeitė JNK1/2 raiškos lygio veikiant DQ, tačiau abu slopikliai ją nežymiai didino po RH1 poveikio, ir nežymiai mažino po QUE poveikio. Tik DESF palyginimui naudoto  $H_2O_2$  atveju turėjo didelės įtakos JNK raiškos lygio sumažėjimui. Įvertinus JNK fosforilinimo lygį nustatyta, kad jis po DQ bei QUE poveikių, kaip ir po palyginimui naudoto  $H_2O_2$ , - mažėjo, o paveikus RH1 šios kinazės fosforilinimo lygis net padidėjo (lyginant su vieno RH1 poveikiu) (35 pav.).

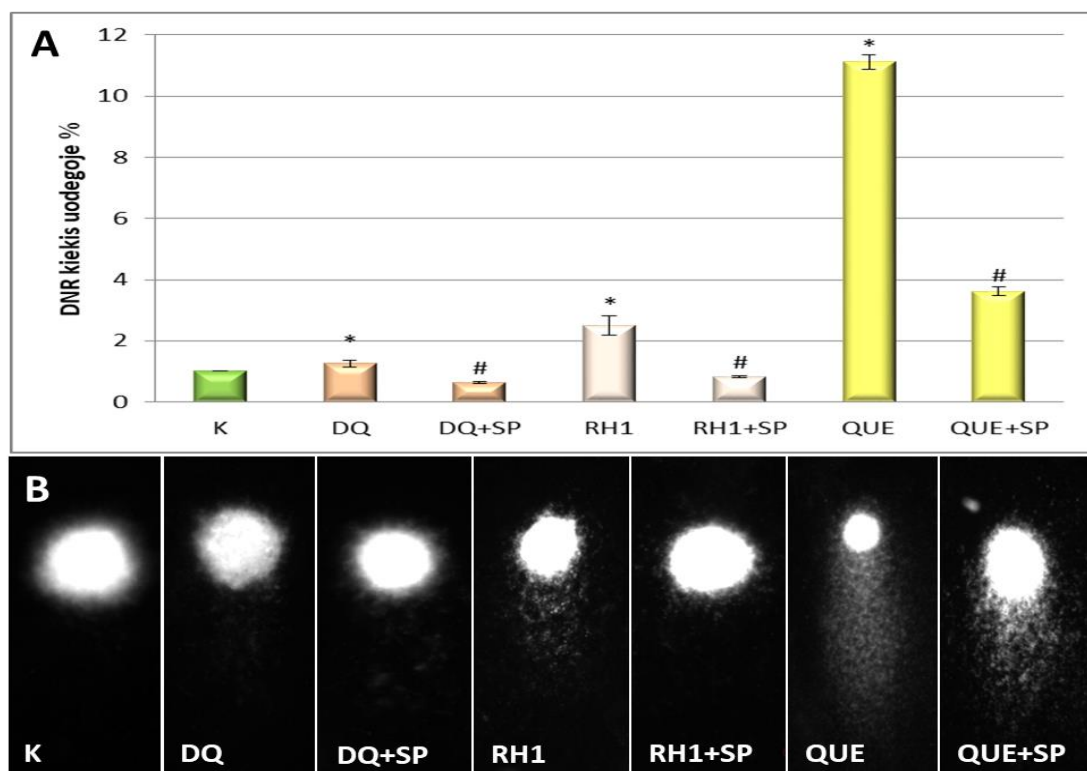


**35 pav. Oksidacinio streso įtaka JNK1/2 ir fosfo-JNK1/2 baltymų lygiui MH-22A ląstelėse.** MH-22A ląstelės veikiamos antioksidantais DPPD (2  $\mu$ M) bei DESF (300  $\mu$ M) 30 min. prieš pridedant tiriamas medžiagas - DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M) bei QUE (140  $\mu$ M). Baltymų lygis analizuotas po 24 poveikio valandų.

JNK kinazė yra svarbi apoptozinio signalo perdavime (Dhanasekaran ir Reddy, 2008). Mūsų rezultatai rodo, kad JNK signalinis kelias dalyvauja tiriamų medžiagų indukuojamame MH-22A ląstelių žūties procese, kurį nulemia pasireiškiantis oksidacinis stresas, ir, po QUE poveikio, dalyvauja apoptozės iniciacijoje, o po DQ, RH1 bei MeDZQ poveikių, atvirkščiai, apsaugo ląsteles nuo toksinio šių medžiagų veikimo.

***JNK vaidmuo DNR pažeidimų susidaryme.*** Siekdami įvertinti JNK1/2 kinazės vaidmenį tiriamųjų junginių indukuojamame DNR pažeidimų susidaryme, vėlgi ląsteles veikėme šios kinazės slopikliu SP600125. Nustatėme, kad SP600125 efektyviai mažino DNR pažeidimų susidarymą 24 val. veikiant ląsteles aziridinil-benzochinonu RH1 bei polifenoliu QUE. DNR pažeidimų sumažėjo net ir po poveikio modeliniu chinonu DQ (36 pav).





**36 pav. JNK vaidmuo DNR paųaidų susidaryme.** MH-22A ląstelės veikiamos slopikliu SP600125 (SP; 20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridendant tiriamas medžiagas - DQ (25  $\mu$ M), RH1 (0,03  $\mu$ M) bei QUE (75  $\mu$ M). A – kiekybinis DNR kiekio vertinimas kometos „uodegoje“ po 24 val. poveikio tiriamaisiais junginiais; B - kometų vaizdai.\*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės ir DQ, RH1 bei QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1 ar QUE, bei ląstelių, paveiktų slopikliu SP600125 kartu su vienu iš tiriamųjų junginių ( $p < 0,05$ ).

### 3.6.3. MAPK kinazės p38 vaidmuo

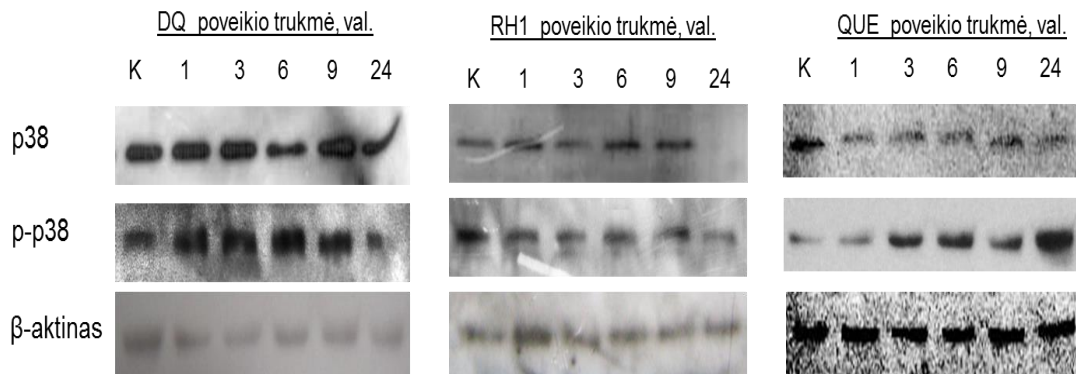
Vertindami p38 MAP kinazės vaidmenį ištyrėme DQ, RH1 ir QUE įtaką p38 raiškai ir aktyvavimui. Gauti rezultatai parodė, kad paveikus ląsteles DQ, 1-3-ią val. matomas labai nedidelis p38 raiškos lygio padidėjimas, kuris išlieka gana pastovus iki 24-tos val. p38 fosforilinimo lygis, ląsteles paveikus DQ, patikimai padidėjo jau po pirmos poveikio valandos ir toks išliko iki 9-tos valandos. 24-tą val. fosforilinto p38 lygis krito iki kontrolinių ląstelių baltymo fosfo-p38 lygio.

Ląsteles paveikus RH1, 6-9 valandą buvo stebimas nedidelis p38 raiškos padidėjimas, kuris po 24 valandų išnyksta (37 pav.). Fosfo-p38 lygis visomis



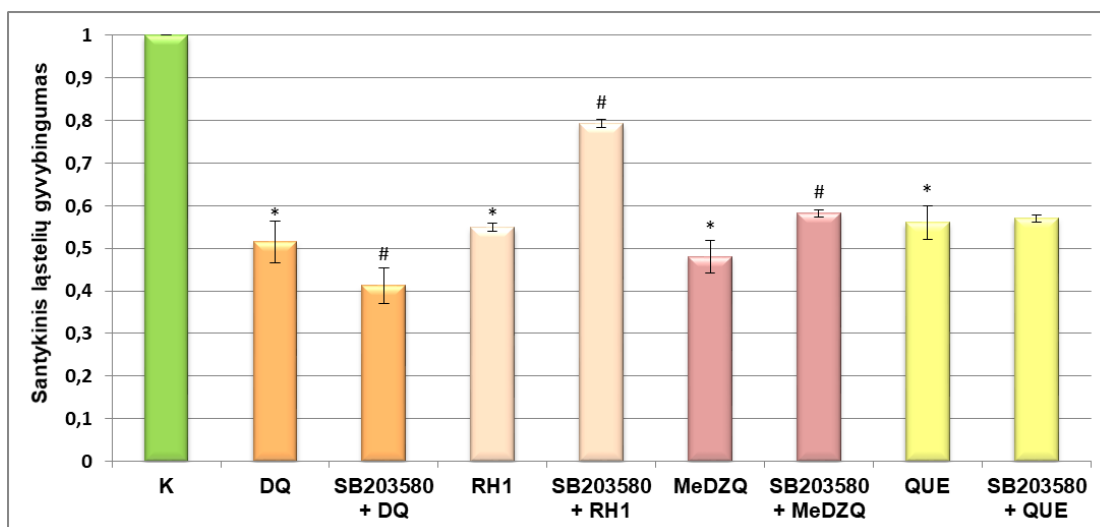
tirtomis RH1 poveikio valandomis išlieka pastovus, bet žemesnis nei kontrolinėse (RH1 neveiktose) MH-22A ląstelėse.

Ląsteles paveikus QUE, p38 raiškos lygis visomis poveikio valandomis išlieka gana pastovus, tačiau žemesnis nei kontrolinėse ląstelėse. Fosfo-p38 lygis MH-22A ląstelėse polifenolio QUE poveikio metu palaipsniui didėja ir maksimumą pasiekia 24-tą valandą.



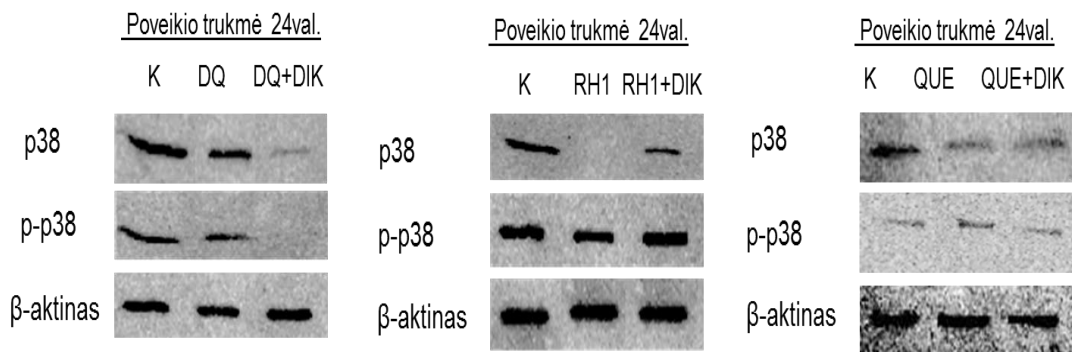
**37 pav. p38 ir fosfo-p38 baltymų raiškos pokyčiai MH-22A ląstelėse po 24 val. poveikio.** MH-22A ląstelės veiktos - DQ (59 μM), RH1 (0,12 μM) bei QUE (140 μM).

Siekdami įvertinti p38 MAPK vaidmenį MH-22A ląstelėse jas paveikus RH1, QUE, MeDZQ ir DQ, naudojome šios kinazės slopiklį SB203580, kuris slopina katalitinį p38 aktyvumą, konkuruodamas su ATP dėl prisijungimo prie p38 ir tokiu būdu fosforilintai kinazei neleidamas toliau fosforilinti ir aktyvuoti kitų, žemiau esančių taikinių (Kumar *et al.*, 1999). Taigi, paveikę tiriamas ląsteles SB203580, nustatėme, kad jis patikimai didina ląstelių gyvybingumą po poveikio aziridinil-benzochinonais RH1 ir MeDZQ (38 pav.). Tačiau priešinga tendencija buvo pastebėta ląsteles paveikus slopikliu SB203580 ir modeliniu chinonu DQ. Šiuo atveju ląstelių gyvybingumas nežymiai mažėjo, o QUE poveikiui slopiklis SB203580 įtakos neturėjo. Pats slopiklis SB203580 tiriamų ląstelių gyvybingumo neveikė (duomenys nepateikiami).



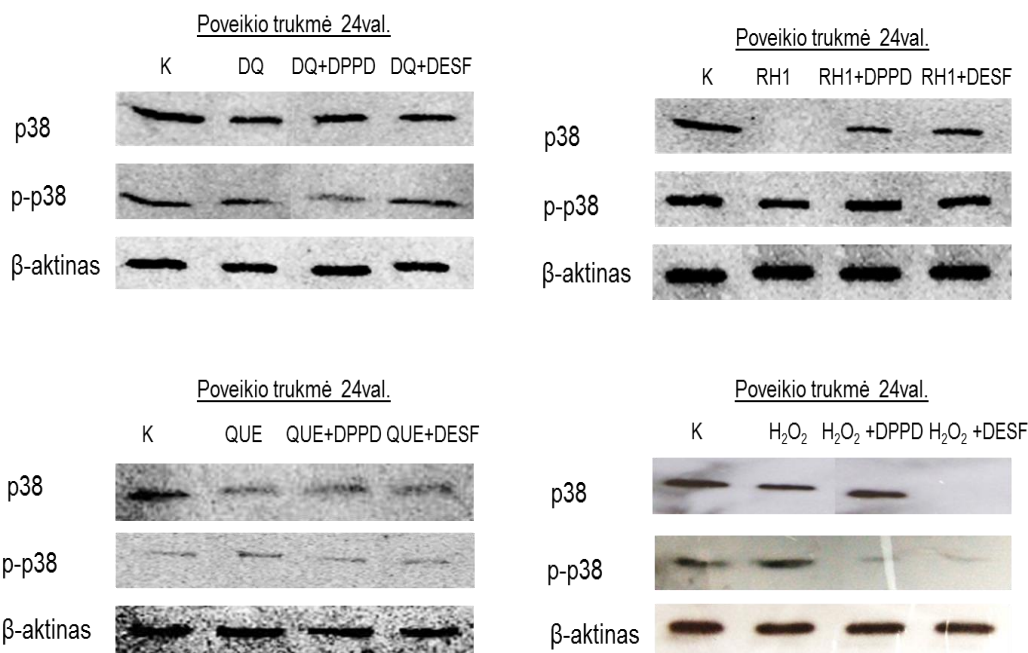
**38 pav. p38 kinazės slopiklio SB203580 įtaka MH-22A ląstelių gyvybingumui po poveikių tiriamais junginiais.** Ląstelės buvo veikiamos slopikliu SB203580 (20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridėdant DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M), MeDZQ (0,31  $\mu$ M) ar QUE (140  $\mu$ M). Efektas vertintas MTT metodu po 24 poveikio valandų ir išreikštas santykinio gyvybingumo vidurkiu, apskaičiuotu iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų,  $\pm$  SN: K - vienetai prilygintas ląstelių kiekis po 24 val. be poveikio \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės ir DQ, RH1, MeDZQ ar QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1, MeDZQ ar QUE, bei ląstelių, paveiktų slopikliu SB203580 kartu su viena iš tiriamųjų medžiagų ( $p < 0,05$ ).

**NQO1 ir p38 ryšys.** Toliau vertinome, ar turi NQO1 fermentas įtakos p38 MAPK raiškos bei aktyvumo pokyčiams po tiriamų poveikių. Panaudoję NQO1 slopiklį DIK nustatėme, kad modelinio benzochinono DQ atveju tiek p38 raiška, tiek ir fosforilinimas mažėjo, lyginant su vieno DQ poveikiu. RH1 poveikio metu šis slopiklis turėjo reikšmingos įtakos p38 raiškai – DIK atstatė RH1 sukeltą p38 raiškos sumažėjimą, tačiau neturėjo įtakos p38 fosforilinimo lygiui po RH1 poveikio. Tuo tarpu polifenolio QUE poveikio metu DIK nesukėlė ryškesnių p38 raiškos pokyčių, tačiau atstatė kontrolinį fosfo-p38 baltymo lygį (39 pav.).



**39 pav. NQO1 slopiklio DIK įtaka p38 ir fosfo-p38 baltymų lygiui MH-22A ląstelėse.** MH-22A ląstelės buvo veikiamos slopikliu DIK ( $20\mu\text{M}$ ) 30 min. prieš pridėdant tiriamas medžiagas - DQ ( $59\mu\text{M}$ ), RH1 ( $0,12\mu\text{M}$ ) bei QUE ( $140\mu\text{M}$ ). Baltymų lygis analizuotas po 24 poveikio valandų.

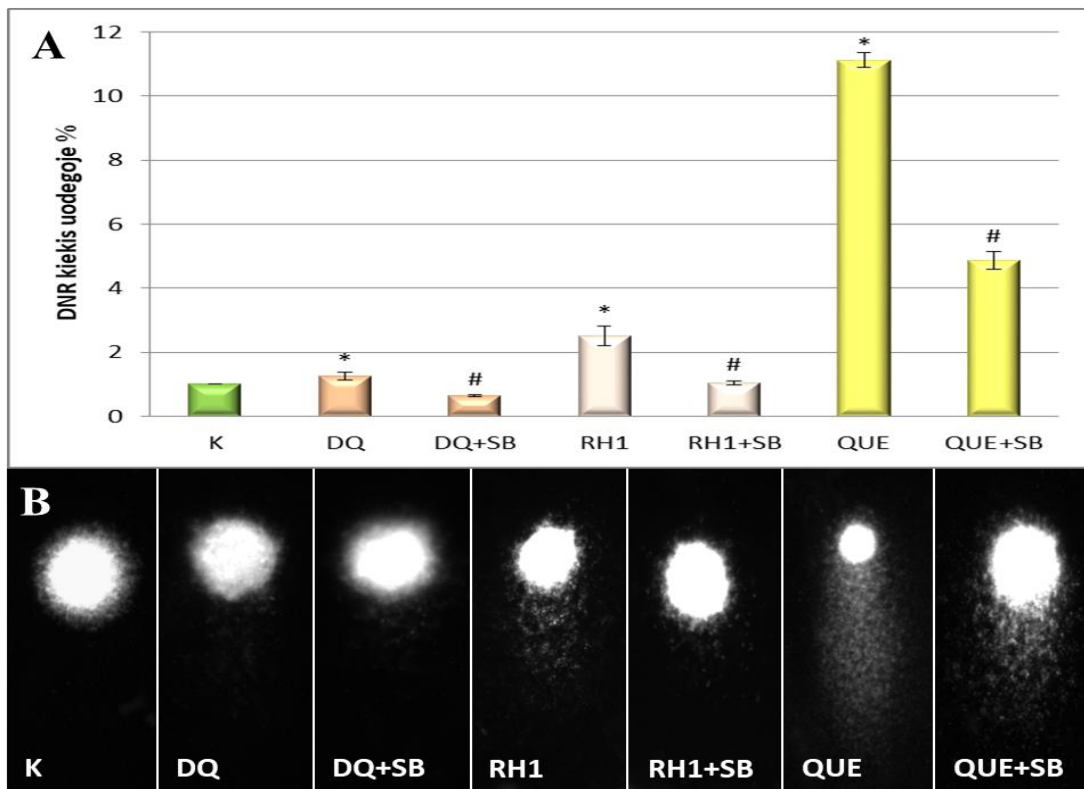
***Oksidacinio streso įtaka p38 MAPK raiškai.*** Vertinant antioksidantų DPPD ir DESF įtaką p38 MAPK kinazės vaidmeniui po tiriamųjų junginių poveikio nustatėme, kad antioksidantai neturėjo reikšmingos įtakos kinazės p38 raiškai ir aktyvinimui po DQ ir QUE poveikių, tačiau pastaruoju atveju, antioksidantai gražino p-p38 baltymo raišką į kontrolinį lygį. Tačiau paveikus ląsteles RH1, antioksidantai DPPD ir DESF aktyvino sumažėjusią iki minimumo p38 raišką ir nežymiai padidino fosforilinto baltymo lygį. Palyginimui, po poveikio oksidacinio streso induktoriumi  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tik DESF slopino p38 raišką bei aktyvinimą, o kitas antioksidantas DPPD reikšmingos įtakos neturėjo. Abu naudoti antioksidantai mažino p-p38 baltymo raišką (40 pav.).



**40 pav. Oksidacinio streso įtaka p38 ir fosfo-p38 baltymų lygiui MH-22A ląstelėse.** MH-22A ląstelės buvo veikiamos DPPD (2  $\mu$ M) bei DESF (300  $\mu$ M) 30 min. prieš pridedant tiriamas medžiagas - DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M) bei QUE (140  $\mu$ M). Baltymų lygis analizuotas po 24 poveikio valandų.

*p38 vaidmuo DNR pažeidimų atsiradimui.* Vertindami p38 kinazės vaidmenį DNR pažeidimų atsiradimui po tiriamųjų junginių poveikio, naudojome šios kinazės slopiklį SB203580 ir vertinome, ar pakinta RH1, QUE bei DQ sukeltų DNR pažeidimų kiekis.

Gauti rezultatai pateikiami 41 pav. Matome, kad p38 kinazės slopiklis patikimai sumažino DNR pažeidimų kiekį po visų tiriamųjų medžiagų poveikio.



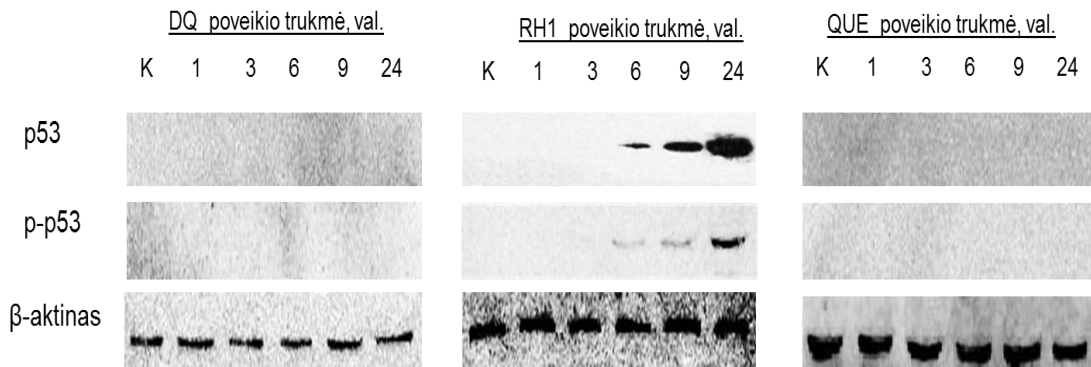
**41 pav. p38 vaidmuo DNR pažeidimų atsiradimui.** MH-22A ląstelės buvo veikiamos slopikliu SB203580 (SB, 20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridėdant tiriamas medžiagas - DQ (25  $\mu$ M), RH1 (0,03  $\mu$ M), bei QUE (75  $\mu$ M). A – kiekybinis DNR kiekio vertinimas kometos „uodegoje“ po 24 val. poveikio tiriamaisiais junginiais; B - kometų vaizdai.\*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės ir DQ, RH1 bei QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1 ar QUE, bei ląstelių, paveiktų slopikliu SB203580 kartu su vienu iš tiriamųjų junginių ( $p < 0,05$ ).

Taigi, kinazė p38 dalyvauja piktybinių MH-22A ląstelių DNR pažeidimų susidarymo procese, ląsteles veikiant mūsų tirtais chinonais ir polifenoliu. Analogiški rezultatai gauti ir tiriant JNK įtaką DNR pažeidimų susidarymui.

### 3.7. Transkripcijos faktoriaus p53 vaidmuo

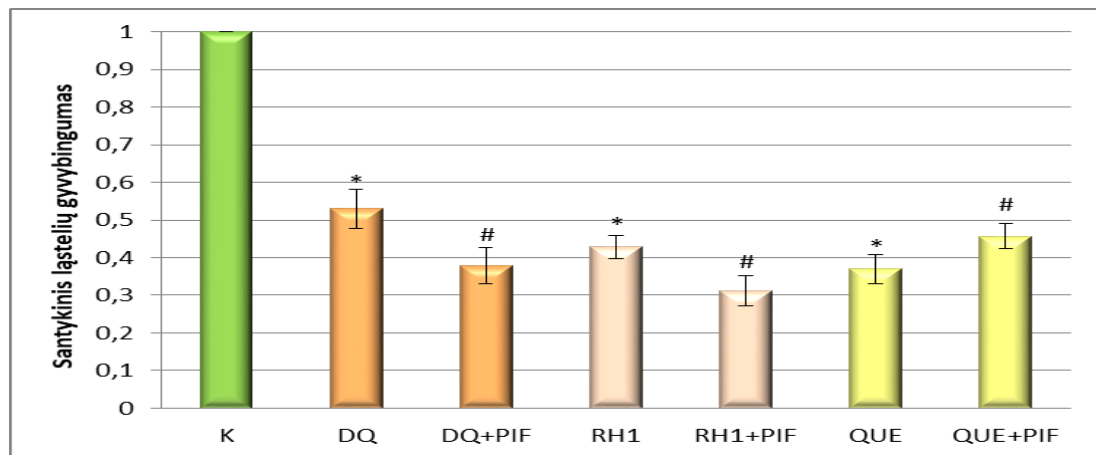
Siekdami išanalizuoti chinonų ir polifenolių indukuojamus citotoksinių veikimo molekulinis mechanizmus, įvertinome p53 baltymo raiškos ir aktyvinimo kinetiką MH-22A ląstelėse tiriamų junginių DQ, RH1 bei QUE poveikių metu. Nustatėme, kad tiriamoms MH-22A ląstelėms šio baltymo raiška nėra būdinga. Iš trijų tirtų junginių tik RH1 po ilgesnio poveikio laiko ją indukavo. Lygiagrečiai tuo pat metu buvo stebimas fosfo-p53 baltymo lygio padidėjimas, kuris gali būti siejamas su p53 baltymo raiškos aktyvinimu. Kiti

tirti junginiai - nei modelinis benzochinonas DQ bei polifenolis QUE – jokios įtakos p53 raiškai neturėjo (42 pav.).



42 pav. p53 ir fosfo-p53 baltymų raiškos lygis MH-22A ląstelėse po tiriamų poveikių DQ (59 μM), RH1 (0,12 μM) bei QUE (140 μM).

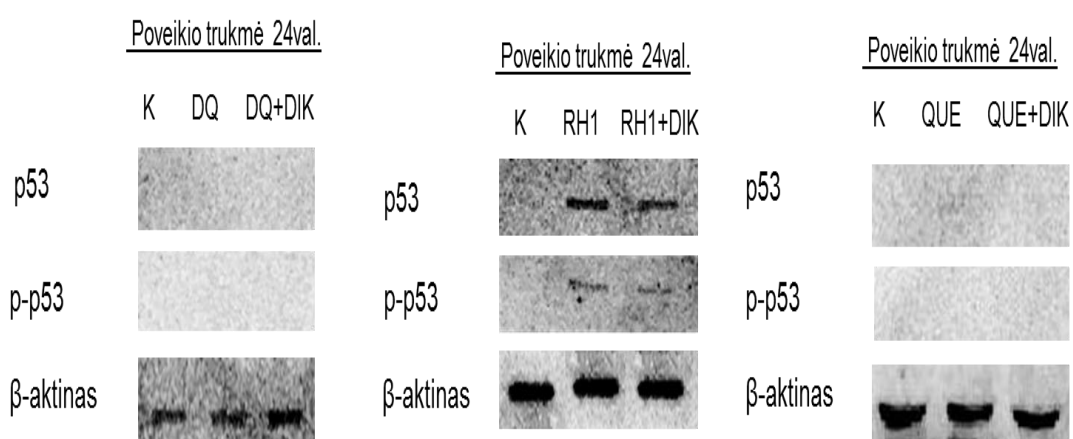
Mūsų rezultatai leidžia manyti, kad RH1 citotoksinis aktyvumas pasireiškia dalyvaujant p53. Siekdami tai įvertinti, panaudojome šio baltymo slopiklį pifitriną-α (PIF-α) (43 pav.). MTT metodu buvo įvertintas MH-22A ląstelių gyvybingumas po DQ, RH1, QUE bei kartu su slopiklio PIF-α poveikiu. Nustatėme, kad PIF-α patikimai sumažino ląstelių gyvybingumą po DQ ir RH1



43 pav. p53 baltymo slopiklio PIF-α įtaka MH-22A ląstelių gyvybingumui po poveikių tiriamais junginiais. Slopikliu PIF-α (20 μM) ląstelės buvo veikiamos 30 min. prieš pridėdant DQ (59 μM), RH1 (0,12 μM) ar QUE (140 μM). Efektas vertintas MTT metodu po 24 poveikio valandų ir išreikštas santykinio gyvybingumo vidurkiu, apskaičiuotu iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų, ± SN; K - vienetai prilygintas ląstelių kiekis po 24 val. be poveikio \*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės ir DQ, RH1 ar QUE veiktų ląstelių (p < 0,05). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1 ar QUE, bei ląstelių, paveiktų slopikliu PIF-α kartu su viena iš tiriamųjų medžiagų (p < 0,05).

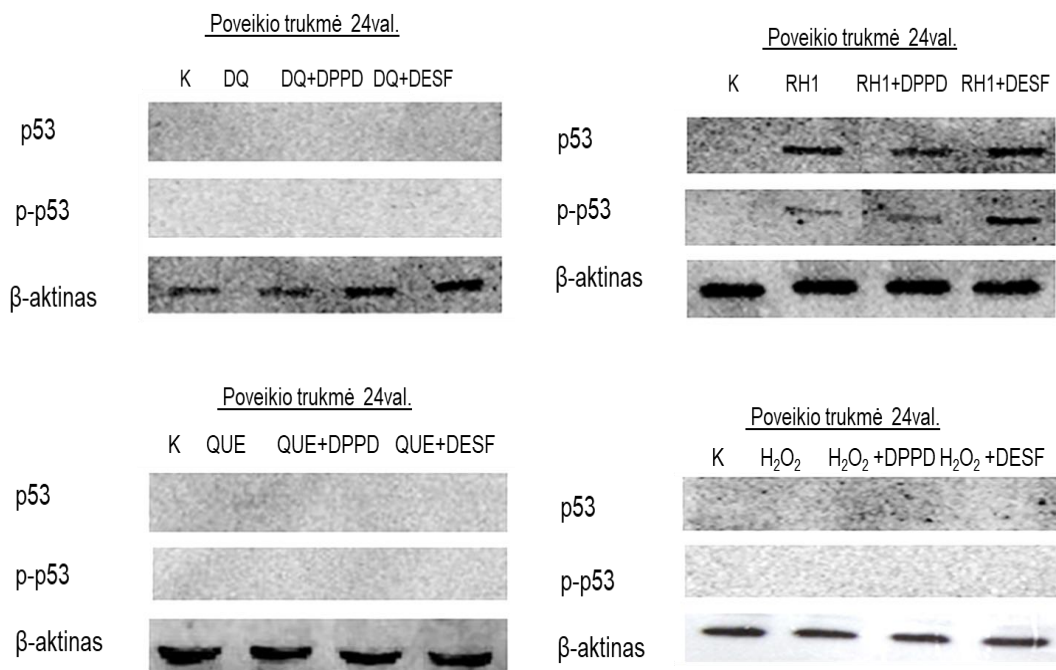
poveikių, tačiau padidino po QUE poveikio (43 pav.). Taigi, nežiūrint to, kad DQ bei QUE neidukavo p53 raiškos, tačiau PIF- $\alpha$  keitė ląstelių atsaką į tiriamų junginių poveikius. Tyrimuose naudota PIF- $\alpha$  koncentracija įtakos ląstelių gyvybingumui neturėjo (duomenys nepateikiami).

**NQO1 ir p53 ryšys.** Siekiami įvertinti šių baltymų ryšį po aziridinil-benzochinono RH1 poveikio, analizavome NQO1 slopiklio DIK įtaką p53 raiškos pokyčiams. Nustatėme, kad DIK ryškios įtakos šio baltymo raiškai ir fosforilinimui neturėjo (44 pav.).



**44 pav. NQO1 slopiklio DIK įtaka p53 ir fosfo-p53 baltymų lygiui MH-22A ląstelėse.** MH-22A ląstelės buvo veikiamos slopikliu DIK (20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridėdant tiriamas medžiagas - DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M) bei QUE (140  $\mu$ M). Baltymų lygis analizuotas po 24 poveikio valandų.

**Oksidacinio streso įtaka p53 raiškai.** Tuo pačiu būdu buvo įvertinta antioksidantų įtaka p53 raiškos bei fosforilinimo pokyčiams veikiant tiriamais junginiais. Gauti rezultatai pateikti 45 pav. Matome, kad DPPD nekeitė RH1 poveikio, bet DESF labai nežymiai skatino p53 fosforilinimą. Antioksidantai neindukavo p53 raiškos esant DQ ir QUE.

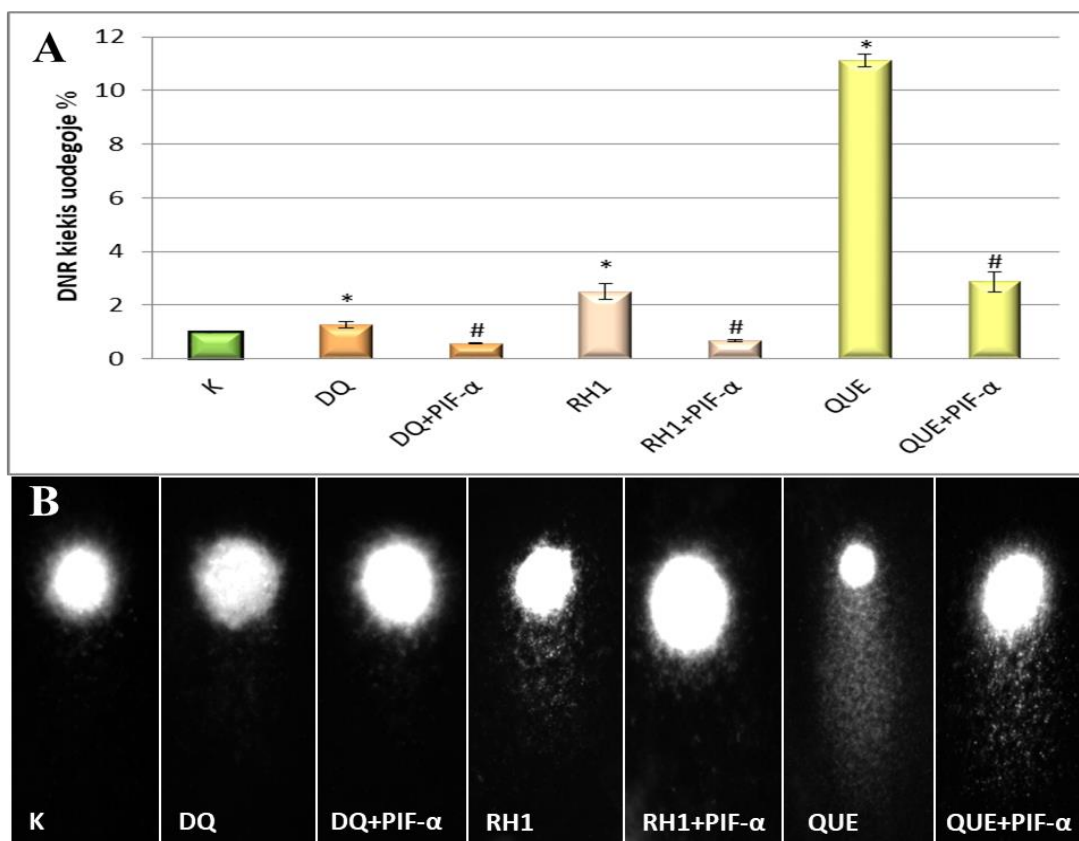


**45 pav. Oksidacinio streso įtaka p53 ir fosfo-p53 baltymų lygiui MH-22A ląstelėse.** MH-22A ląstelės buvo veikiamos DPPD (2  $\mu$ M) bei DESF (300  $\mu$ M) 30 min. prieš pridėdant tiriamas medžiagas - DQ (59  $\mu$ M), RH1 (0,12  $\mu$ M) bei QUE (140  $\mu$ M). Baltymų lygis analizuotas po 24 poveikio valandų.

Iš gautų duomenų matome, kad modelinio benzochinono DQ ir polifenolio QUE indukuotame ląstelių žūties procese p53 ne vaidina svarbaus vaidmens, tuo tarpu po RH1 veikimo, stebint p53 raišką ir jo fosforilintos formos lygį, matyti, kad p53 dalyvauja aziridinil-pavaduoto benzochinono RH1 sukeltos ląstelių žūties procese.

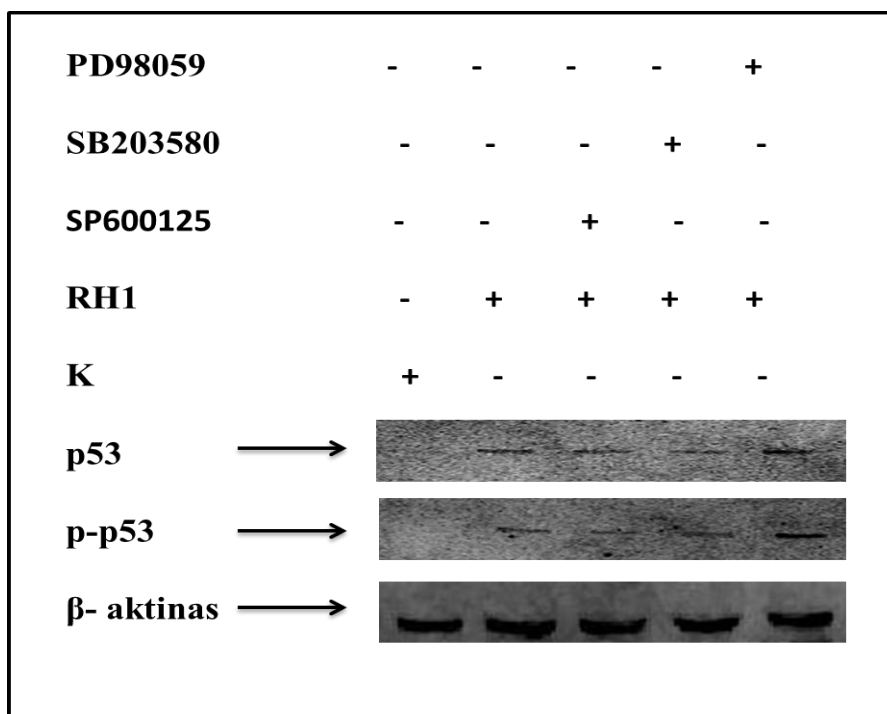
***p53 vaidmuo DNR pažeidimų susidaryme.*** Vertindami transkripcijos faktoriaus p53 vaidmenį DNR pažeidimų sukėlime po tiriamųjų junginių poveikio, naudojome šio baltymo slopiklį - PIF- $\alpha$ . Gauti rezultatai parodė, kad PIF- $\alpha$  patikimai sumažino RH1, QUE ir net DQ sukeltą DNR pažeidimų kiekį (46 pav.).





**46 pav. p53 vaidmuo DNR paųaidų susidaryme.** MH-22A ląstelės buvo veikiamos PIF- $\alpha$  (20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridendant tiriamas medžiagas - DQ (25  $\mu$ M), RH1 (0,03  $\mu$ M) bei QUE (75  $\mu$ M). A – kiekybinis DNR kiekio vertinimas kometos „uodegoje“ po 24 h poveikio tiriamaisiais junginiais; B - kometų vaizdai.\*Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolės (ląstelės be poveikio) ir DQ, RH1 bei QUE veiktų ląstelių ( $p < 0,05$ ). # Statistiškai patikimi skirtumai tarp ląstelių, veiktų tik DQ, RH1 ar QUE, bei ląstelių, paveiktų slopikliu PIF- $\alpha$  kartu su vienu iš tiriamųjų junginių ( $p < 0,05$ ).

**p53 ir MAPK ryšys.** Paskutinis svarbus šio darbo etapas – įvertinti ERK, JNK bei p38 kinazių sąsajas su transkripcijos veiksmu p53 tiriamų poveikių metu. Tuo tikslu buvo vertinta p53 raiška bei jos fosforilinimo lygis, panaudojus atitinkamus šių MAP kinazių slopiklius. Šiuo atveju DQ ir QUE junginiai nebuvo tirti, nes jie neindukavo p53 raiškos. Analizuojant gautus rezultatus matome, kad nei p38 kinazės slopiklis SB203580, nei JNK kinazės slopiklis SP600125 reikšmingos įtakos baltymo p53 raiškai ir aktyvinimui neturėjo. Kiek kitoks vaizdas stebėtas analizuojant šio baltymo lygį ir aktyvinimą po poveikio ERK kinazės slopikliu PD98059 – šiuo atveju stebėtas p53 raiškos ir jo fosforilinimo lygio padidėjimas (47 pav.).



**47 pav. p53 ir fosfo-p53 baltymų lygis MH-22A ląstelėse.** Ląstelės buvo veikiamos PD98059 (20  $\mu$ M), SB203580 (20  $\mu$ M) bei SP600125 (20  $\mu$ M) 30 min. prieš pridėdant RH1 (0,12  $\mu$ M). Baltymų lygis analizuotas po 24 poveikio valandų.

### 3.8. Rezultatų aptarimas

Darbe buvo kiekybiškai įvertintas eilės chinonų ir polifenolių citotoksiškumas MH-22A ląstelėse. Ištirti DQ, RH1, MeDZQ ir QUE toksinio veikimo mechanizmai, pagrindinį dėmesį skiriant signalinių molekulių raiškos ir vaidmens tyrimui navikinėse pelės hepatomos MH-22A linijos ląstelėse. Gauti rezultatai yra vertingi nustatant kitų aziridinil-pavaduotų chinonų ir polifenolių citotoksinio/terapinio poveikio mechanizmus. Visų pirma, aptarsime chinonų ir polifenolių struktūros-citotoksiškumo ryšius ir oksidacinio streso bei bioredukcinės aktyvacijos vaidmenis citotoksiškumo, apoptozės ir DNR pažeidimų indukcijoje:

**a) Chinonų citotoksiškumo mechanizmai.** Aziridinil-nepavaduotų chinonų citotoksiškumas didėja, didėjant jų vienelektronės redukcijos potencialui ( $E^{1\cdot}$ ) (15 pav., 1 lentelė). Šie rezultatai sutampa su kitų ląstelių linijų tyrimų duomenimis (Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2003; Šarlauskas *et al.*, 2015; O’Brien, 1991; Wardman, 1990). Tokia priklausomybė rodo, kad

pagrindinis veiksnys, nulemiantis tirtų junginių citotoksiškumą, yra laisvųjų radikalų generacija (O'Brien, 1991; Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2003). Pastarieji susidaro vienelektronės redukcijos, atliekamos NADPH:citochromo P-450 reduktazės ir kitų vieną elektroną pernešančių fermentų metu (Čėnas *et al.*, 2004). Tai patvirtina ir apsauginis antioksidantų DPPD ir DESF poveikis (22, 23 pav.). Tačiau aziridinil-pavaduoti chinonai DZQ, RH1, MeDZQ, BZQ bei trimetil-aziridinil-1,4-benzochinonas yra gerokai toksiškesni nei galima tikėtis iš jų vienelektroninės redukcijos potencialo (15 pav.). Tai galima paaiškinti jų papildomu citotoksiškumo mechanizmu - bioredukcine aktyvacija, t. y., dvielektronine redukcija iki aziridinil-pavaduotų hidrochinonų, vėliau alkilinančių DNR (Butler *et al.*, 1989; Hargreaves *et al.*, 2000; Di Francesco *et al.*, 2004, Pierce *et al.*, 2010). Kadangi šie junginiai taip pat sukelia oksidacinį stresą, DPPD ir DESF mažina jų citotoksiškumą kaip ir DQ ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atveju. Tačiau, skirtingai nei DQ atveju, RH1 ir MeDZQ citotoksiškumas yra efektyviai slopinamas NQO1 inhibitoriaus dikumarolo (20, 21 pav.). Tai ir įrodo NQO1 vaidmenį aziridinil-pavaduotų chinonų citotoksiškume. NQO1 aktyvumas MH-22A ląstelėse, 79,5 nmol × mg<sup>-1</sup> × min<sup>-1</sup>, yra vidutinio lygio lyginant su SK-MEL-28 ląstelėmis (19 pav.) ir su daugeliu kitų NCI (*National cancer Institute, JAV*) tirtų žmogaus vėžio linijų (Ross ir Siegel, 2004) ląstelėmis, kurių aktyvumas siekia 100-1000 nmol × mg<sup>-1</sup> × min<sup>-1</sup>. Antra vertus, žemo redukcijos potencialo aziridinil-pavaduotas chinonas BZQ gali tiesiogiai alkilinti DNR net ir nevykstant bioredukcinei aktyvacijai (Butler *et al.*, 1989; Di Francesco *et al.*, 2004). Tai ir paaiškina padidintą BZQ citotoksiškumą (15 pav.). Šis junginys yra neaktyvus NQO1 substratas, jo redukcijos maksimalus greitis yra <1% MeDZQ redukcijos greičio (Anusevičius *et al.*, 2002). Lygiagrečiai ištirto chemoterapinio antraciklino daunorubicino padidintas citotoksiškumas (15 pav.) gali būti nulemtas jo aminocukraus liekanos teigiamo krūvio, kuris padidina jų viduląstelinę akumuliaciją ir interkaliaciją į DNR (Hindenburg *et al.*, 1989; Mohan ir Rapoport, 2010).

**b) Prooksidantinis polifenolių citotoksiškumas.** Polifenolių citotoksiškumas didėja, mažėjant šių junginių vienelektroninės oksidacijos potencialui ( $E^{27}$ ) ir didėjant jų lipofiliškumui. Tuo įsitikinome palyginę metil-, etil ir oktilgalato citotoksiškumus (16 pav., 2 lentelė). Šie duomenys analogiški gautiesiems FLK ir HL-60 ląstelių kultūrose ir pirminiuose pelių splenocituose (Miliukienė *et al.*, 2014, Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005). Rezultatai rodo, kad ir šiuo atveju toksiškumą daugiausia nulemia polifenolių oksidacijos į jų chinoninius/chinometidinius produktus greitis. Prooksidantinį polifenolių citotoksiškumą MH-22A ląstelėse patvirtina ir apsauginis DESF ir DPPD poveikis (22, 23 pav.). Ląstelių apsauga dikumarolu (20, 21 pav.) rodo, kad NQO1 skatina QUE citotoksiškumą. Galima manyti, kad oksiduojantis QUE, susidaro viena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekulė, o NQO1 gali redukuoti susidariusį QUE chinoną ir regeneruoti QUE (Boots *et al.*, 2005). Tada QUE oksiduotąsi pakartotinai ir generuotų daugiau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o tai padidintų jo citotoksiškumą. Tačiau ši interpretacija gali tikti ne visiems atvejams, nes, pavyzdžiui, CHO ląstelėse padidinta NQO1 raiška koreliuoja su ląstelių atsparumu QUE, o dikumarolas stiprina QUE citotoksiškumą (Gliszczyńska-Świgło *et al.*, 2003).

**c) Oksidacinio streso ir NQO1 vaidmuo ląstelių žūties procese bei jų ryšys su DNR pažaidomis.** Chinonai sukelia tiek apoptozinę, tiek ir nekrozinę ląstelių žūtį, o pastaroji dažniausiai siejama su jų laisvųjų radikalų poveikiu, t. y., oksidaciniu stresu (Malorni *et al.*, 1993; Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2011; Sun ir Ross, 1996). Veikiant polifenoliams susidariusios aktyviosios deguonies formos indukuoja ir apoptozinę ląstelių žūtį (Bhattacharya *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014). Mūsų gauti rezultatai patvirtina literatūros duomenis, kad chinonai MeDZQ, RH1 ir DQ bei polifenolis QUE sukelia tiek apoptozinę, tiek nekrozinę ląstelių žūtį (17, 18 pav.). Tačiau pastebima, kad DQ, kurio citotoksiškumas gali pasireikšti tik dėl laisvųjų radikalų susidarymo, santykinai efektyviau sukelia nekrozinę, bet ne apoptotinę ląstelės žūtį. Tai primena FLK ląstelių tyrimų duomenis, kur veikiant MeDZQ ar RH1 susidaro daugiau gyvų apoptozinių ląstelių, nei

veikiant DQ (Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005). Galima teigti, kad MeDZQ, RH1 ir QUE atvejais dalyvauja papildomi citotoksiškumo mechanizmai, skatinantys apoptozę. Kadangi dikumarolas mažina negyvų ir gyvų apoptozinių ląstelių kiekį veikiant šiais junginiais (21 pav.), galima teigti, kad apoptozėje dalyvauja su NQO1 susieti procesai. Tai yra, stebimas ryšys tarp intensyvesnių apoptozinių procesų bei didesnių DNR paųaidų po poveikių RH1 ir QUE (24 pav.), ir NQO1 veikimo, šį teiginį iliustruoja tai, jog dikumarolas sumažina DNR paųaidas (25 pav.). Šiuos teiginius patvirtina literatūros duomenys apie RH1 dalyvavimą DNR paųeidimuose, nepriklausančiuose nuo oksidacinio streso (Dehn *et al.*, 2005). Tačiau mūsų atveju RH1 sukeltos DNR paųaidos taip pat yra slopinamos ir antioksidantais (26 pav.), todėl galima manyti, kad jas sukelia ir šio junginio generuojamos aktyviosios deguonies formos. Tačiau DESF ir DPPD poveikiai QUE sukeltoms DNR paųaidoms yra neųymūs ir priešingi vienas kitam (26 pav.). Šiuo atveju, galima manyti, kad yra inhibuojama topoizomerazė-II ir/ar DNR tiesiogiai alkilina chinoninis QUE oksidacijos produktas, nes, inkubuojant <sup>14</sup>C ųymėtą kvercetiną Caco-2 ir HepG2 ląstelių kultūrose pastebėti jo kovalentiniai aduktai su baltymais ir DNR (Walle *et al.*, 2003). Taigi, mūsų atveju, antioksidantai DESF ir DPPD efektyviausiai slopina DQ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, RH1 ir QUE sukeltą nekrozę, ir QUE sukeltą negyvų apoptozinių ląstelių susidarymą (23 pav.), o kitais atvejais jų poveikis yra menkliau išreikštas arba nevienareikšmis. Kadangi šiais ųūties atvejais yra paųeidžiama ląstelės išorinė membrana, galima teigti, kad ji ir yra visų šių junginių generuojamų aktyviosios deguonies formų taikiny. DQ sukeliama apoptozė nėra lydima ųymių DNR paųaidų (25 pav.), todėl galima manyti, kad šiuo atveju oksidacinis stresas didina ir mitochondrijų membranų pralaidumą, kuris, savo ruožtu, sukelia tiek apoptozinę, tiek nekrozinę ląstelių ųūtį (Kovaltowski *et al.*, 2001).

Aaptarėme apoptozės ir DNR paųaidų mechanizmus, susietus su tiesioginiu aktyviosios deguonies formų arba alkilinančių reakcijos produktų

poveikiu. Toliau aptarsime signalinių baltymų raišką veikiant RH1, DQ ir QUE bei jų ryšį su ląstelės žūtimi.

**MAP kinazių vaidmuo.** Žinoma, kad chinonų poveikyje vėžinėse ląstelėse aktyvuojamos SAPK dalyvauja apoptozės indukcijoje (Park *et al.*, 2011). Be to, nustatyta, jog šias kinazes gali aktyvinti tiek DNR pažeidimai, tiek ir oksidacinis stresas (Wynand ir Bernd, 2006; Kovtun *et al.*, 2000). Duomenys apie nereaguojančių su –SH grupėmis pilnai pavaduotų chinonų įtaką MAP kinazėms yra negausūs ir prieštaringi: A549 ląstelėse RH1 stimuliuo ERK, JNK ir p38 fosforilinimą (Stulpinas *et al.*, 2016), o chinonas embelinas stimuliuo JNK ir p38 ERK1/2 fosforilinimą (Avisetti *et al.*, 2014); MDA-MB-231 ląstelėse RH1 indukavo apoptozę, manomai mitochondrinę, dalyvaujant JNK (Park *et al.*, 2011); doksorubicinas aktyvavo ERK žiurkės kepenų epitelio ląstelėse (Abdelmoksen *et al.*, 2005); reinas aktyvavo JNK ir p38 fosforilinimą, bet nedalyvaujant ROS (Lin *et al.*, 2003), ir pirolochinolinchinonas slopino p38 ir JNK fosforilinimą pirminėse mikroglijos ląstelėse (Yang *et al.*, 2014), bet aktyvavo ERK NIH3T3 pelės fibroblastuose (Kumazawa *et al.*, 2007).

Duomenys apie QUE poveikį MAP kinazėms yra gausūs, bet taip pat prieštaringi. Pavyzdžiui, po QUE poveiko susidarę ROS indukavo apoptozinę ląstelių žūtį dalyvaujant p38 (Lee *et al.*, 2010). Tačiau QUE slopino ERK fosforilinimą žmogaus gliomos (Pan *et al.*, 2015) ir HepG2 ląstelėse (Granado-Serrano *et al.*, 2008), bet stimuliuo ją HL-60 ląstelėse dalyvaujant ROS (Lee *et al.*, 2015). Choriokarcinomos ląstelėse QUE sukelta apoptozė buvo lydima ERK, JNK ir p38 fosforilinimo greičiausiai dalyvaujant ROS (Lim *et al.*, 2017). Tokių pavyzdžių galima pateikti ir daugiau.

Šiame darbe tyrėme chinonų DQ bei RH1 ir polifenolio QUE poveikį MAPK raiškai bei fosforilinimui ir šiuos efektus siejome su ERK, JNK bei p38 kinazių dalyvavimu apoptozės procese. Mūsų duomenys parodė, kad JNK inhibitorius SP600125 didino MH-22A ląstelių gyvybingumą QUE poveikio atveju (33 pav.) bei mažino DNR pažeidimų kiekį (36 pav.). Tačiau kiti

duomenys atrodo prieštarigiau, nes SP600125 didino DQ ir RH1 indukuojamą citotoksiškumą (33 pav.), bet mažino DNR pažaidų kiekį (36 pav). Savo ruožtu, p38 inhibitorius SB203580 mažino DQ, RH1 ir QUE sukeliama DNR pažaidų kiekį (41 pav.) bei RH1 indukuojamą citotoksiškumą, bet didino DQ citotoksinį poveikį, o QUE atveju poveikio neturėjo (38 pav.). Manome, kad tai susieta su šių junginių lygiagrečiu poveikiu NQO1 raiškai, nes SB203580 ją skatino kontrolinėse ląstelėse (Qureshi *et al.*, 2008), bet slopino jos padidėjimą veikiant įvairiems polifenoliams (Tsai *et al.*, 2011; Roubalova *et al.*, 2016; Ahn *et al.*, 2017). SP600125 slopino NQO1 raišką kontrolinėse ląstelėse (Qureshi *et al.*, 2008), o duomenų apie PD98059 poveikį nerasta.

Todėl ryšio tarp apoptozės ir kinazių raiškos įvertinimui buvo panaudota daugiaparametrinė regresinė analizė, anksčiau naudota apoptozės aprašymui FLK ląstelėse (Nemeikaitė-Čėnienė *et al.*, 2005). Kintamaisiais, pateiktais 3 lentelėje, naudotas apoptotinių ląstelių procentas (A) arba apoptotinis indeksas  $A/(A+G)$ , kur G - gyvų ląstelių dalis, išreikšta procentais, pagal 21 paveiksle pateiktus duomenis. Sąlygiškai priimama, kad kinazių raiškos rodiklis yra 1, kai jis artimas kontrolinėse ląstelėse nustatytam lygiui, 1,5 – kai išauga, 0,5 – kai sumažėja, ir 0 - kai išnyksta. Ištyrus A arba  $A/(A+G)$  priklausomybę nuo pavienių kinazių ekspresijos, gauta, kad p-ERK, p38 ir p-p38 kinazių raiška didėja apoptozinės ląstelių žūties metu, o JNK mažėja, tačiau duomenys statistiškai nepatikimi (duomenys nepateikti). Daugiaparametrinėje analizėje gauti kiek tikslesni rezultatai:

$$A/(A+G) = (27,550 \pm 3,487) + (1,024 \pm 5,276) \text{ ERK} - (7,600 \pm 3,905) \text{ p-ERK} + (13,248 \pm 5,049) \text{ JNK} - (3,214 \pm 5,972) \text{ p-JNK} - (13,972 \pm 6,122) \text{ p38} - (2,973 \pm 4,915) \text{ p-p38} \quad (r^2 = 0,5838, F(6,10) = 2,338) \quad (1)$$

Šiuo atveju JNK raiškos mažėjimas apoptozės metu ( $p = 0,025$ ) ir p38 raiškos padidėjimas ( $p = 0,046$ ) yra statistiškai patikimi. p-ERK raiška mažėja, bet yra menkai statistiškai patikima ( $p = 0,080$ ). Naudojant kintamuoju apoptotinių ląstelių procentą (3 lentelė), duomenys dar mažiau statistiškai patikimi, tačiau

apoptozės įtaka JNK, p-ERK ir p38 raiškai yra ta pati (duomenys nepateikti). Kitų MAP kinazių raiškos pokyčių charakterizuoti nepavyko.

Apibūdinat ROS ir alkilinimo vaidmenį kinazių raiškai ir fosforilinimui, aprašytuose pagal 3 lentelėje pateiktus parametrus, priimama, kad ROS poveikis kontrolinei ląstelių populiacijai ir visose tiriamose populiacijose esant DPPD ir DESF lygus 0. Alkilinimo poveikis kontrolėje, visais atvejais su DQ ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ir RH1 atveju su dikumarolu lygus 0, o visais kitais atvejais lygus 1 (3 lentelė). Šiuo būdu gauta, kad p38 ekspresiją menkai statistiškai patikimai slopina tiek ROS, tiek alkilinimas: (0,789±0,109) – (0,276±0,133) ROS – (0,276±0,133) alkilinimas,  $r^2 = 0,3934$ ,  $F(2,14) = 4,540$ . ROS ir alkilinimo poveikiui būdingas  $p = 0,057$ . Tačiau p-ERK raišką patikimai skatina ROS ( $p = 0,029$ ): (0,237±0,199) + (0,592±0,244) ROS – (0,033±0,244) alkilinimas,  $r^2 = 0,2960$ ,  $F(2,14) = 2,944$ . Kitų kinazių indukcijos kelių apibūdinti nepavyko. Todėl mūsų atveju tikėtina, kad p-ERK yra galimai antiapoptotinis faktorius, indukuojamas oksidacinio streso, JNK RH1 poveikio atveju yra antiapoptotinis faktorius su neapibrėžtu indukcijos mechanizmu, o p38 galimai slopina ROS ir alkilinimas.

**p53 raiška.** Mūsų tirtose ląstelėse tik RH1 indukavo p53 raišką (42 pav.). Kadangi p53 raiška nėra būdinga MH-22A ląstelėms, o ją indukuoja tik RH1, kuris sukelia didžiausią apoptotinį atsaką (17 pav.), todėl p53 galėtų veikti kaip proapoptotinis faktorius. Tokius rezultatus gavo ir Ngo ir kt. (1998), tyrę p53 indukciją aziridinil-pavaduotais benzochinonais MCF-7 ląstelėse. Pastaruoju atveju, ši indukcija yra slopinama dikumarolo. Tačiau mūsų atveju, p53 baltymo slopiklis PIF- $\alpha$  padidino ląstelių žūtį po RH1 poveikio. Tai rodo, kad šiuo atveju RH1 veikia kaip antiapoptotinis veiksnys. Manoma, kad p53 dalyvauja ir RH1 sukeltamoje nuo NQO1 priklausomoje RKO ląstelių žūtyje (Park *et al.*, 2011). Panašūs rezultatai gauti ir mūsų atveju. Tai rodo, kad p53 raišką bent dalinai sukelia DNR pažeidos, atsiradusios veikiant RH1 ir NQO1 reakcijos produktams. Žinoma, kad MAPK fosforilina ir aktyvuoja p53 (Wu, 2004), tačiau mūsų rezultatai parodė, kad JNK aktyvacija nekeičia p53 ir p-p53



raiškos, o nuslopinus ERK, p53 raiška ir fosforilinimas šiek tiek didėja (47 pav.). Tačiau tam reikia papildomų tyrimų, kurie padėtų identifikuoti tarpinius taikinius ląstelėje.

Tai, kad QUE, sukeliantis intensyvias DNR pažaidas (24 pav.) neindukuoja p53 (42 pav.), yra būdinga ir MCF-7 (Choi *et al.*, 2001), žmogaus epitelio (O'Prey *et al.*, 2003), ir OE33 adenokarcinomos ląstelėms (Zhang *et al.*, 2008), nors daugeliu kitų atvejų stebima p53 indukcija. Matomai, šis poveikis priklauso nuo ląstelių tipo, QUE koncentracijos ir poveikio trukmės. Kadangi p53 indukuoja ne visos DNR pažaidos, galima manyti, kad RH1 ir QUE sukelia skirtingų tipų DNR pažaidas. Atskirai reikia aptarti pifitrino- $\alpha$  poveikį QUE citotoksiškumui (43 pav.) ir DNR pažaidų kiekiui (46 pav.), kuris iš pirmo žvilgsnio prieštarauja QUE nesugebėjimui indukuoti p53. Tačiau žinoma, kad PIF- $\alpha$  jungiasi ir prie aromatinių angliavandenilių receptoriaus (AhR), dalyvaujančio NQO1 sintezėje (Hoagland *et al.*, 2005), ir gali slopinti NQO1 ekspresiją (Wang *et al.*, 2012). p53 raiška nėra priklausoma nuo AhR (Hoagland *et al.*, 2005). Todėl galima manyti, kad PIF- $\alpha$  ir mūsų atveju lygiagrečiai mažina NQO1 ekspresiją, tuo mažindamas QUE citotoksiškumą (43 pav.) ir DNR pažaidas (46 pav.). Tai analogiška QUE sukeltų efektų slopinimui NQO1 inhibitoriumi dikumarolu (20, 25 pav.). Be to, sumažėjusia NQO1 ekspresija galima paaiškinti ir RH1 sukeltų DNR pažaidų slopinimą PIF- $\alpha$  (46 pav.). Tačiau ši problema nėra galutinai išspręsta ir reikalauja papildomų tyrimų, kadangi PIF- $\alpha$  stimuliuoja RH1 citotoksiškumą (43 pav.).

Ištyrę chinono RH1 ir QUE poveikį matome, kad nors jų citotoksiškumas ir skirtingas, bet kai kurie jo mechanizmai yra panašūs, ir skiriasi nuo nealkilinančio DQ citotoksiškumo mechanizmu. Tai gali būti paaiškinama tuo, kad tiek RH1 hidrochinonas, susidaręs dvielektroninės redukcijos metu, tiek chinoniniai/chinometidiniai QUE oksidacijos produktai gali alkilinti DNR (Walle *et al.*, 2003; Gliszczynska-Swiglo *et al.*, 2003). Be to, ląstelių žūtį sukelia ir visais atvejais veikiantis oksidacinis stresas.

**3 lentelė.** Ryšys tarp apoptotinių ląstelių kiekio, apoptotinio indekso, ROS arba alkilinančio poveikio ląstelei ir MAP ekspresijos.

Nr.	Sąlygos	A (%)	A/(A+G) (%)	Poveikis		ERK1/2	p-ERK1/2	JNK	p-JNK	p38	p-p38
				ROS	Alkilinimas						
1	Kontrolė	3±1	4±1	0	0	1	1	1	1	1	1
2	DQ	14±1	25±5	1	0	1	1	1	0	0,5	0,5
3	DQ + DPPD	23±3	31±6	0	0	0,5	0	1	0	0,5	0,5
4	DQ + DESF	21±1	33±6	0	0	0,5	0	1	0	0,5	0,5
5	DQ + DIK	13±2	22±5	1	0	0	0	0	0	0	0
6	RH1	20±1	32±5	1	1	1	1,5	1	0,5	0	0,5
7	RH1 + DPPD	32±3	38±6	0	1	0,5	0,5	1,5	0,5	0,5	1
8	RH1 + DESF	20±1	28±3	0	1	0,5	0,5	1,5	0,5	0,5	1
9	RH1 + DIK	11±3	15±5	1	0	1	1,5	1	0,5	0,5	1
10	QUE	17±1	27±6	1	1	1	0,5	1	0,5	0,5	1
11	QUE + DPPD	23±3	31±6	0	1	1	0	0,5	0,5	0,5	1
12	QUE + DESF	21±2	25±3	0	1	1	0	0,5	0	0,5	1
13	QUE + DIK	19±2	25±5	1	1	1,5	0	1	0,5	0,5	0,5
14	MeDZQ	19±3	32±8	1	1	1	1	1	1	0	0
15	MeDZQ + DIK	12±2	15±5								
16	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	23±2	22±5	1	0	1	1	1	1	1	1
17	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DPPD	26±3	32±5	0	0	0,5	0	1	0	1	0
18	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DESF	23±2	31±5	0	0	1	0	0	0	0	0

## IŠVADOS

1. Aziridinil-nepavaduotų chinonų citotoksiškumas pelės hepatomos MH-22A linijos ląstelėms yra nulemtas oksidacinio streso ir didėja, didėjant jų vienelektroninės redukcijos potencialui. Aziridinil-pavaduotų chinonų didesnį citotoksiškumą lemia NQO1 katalizuojamas alikilinančių hidrochinonų susidarymas.
2. Polifenolių citotoksiškumas MH-22A ląstelėse yra nulemtas oksidacinio streso ir alkilinimo jų oksidacijos produktais. Citotoksiškumas didėja, mažėjant polifenolių vienelektroninės oksidacijos potencialui.
3. Aziridinil-pavaduotas chinonas RH1 ir polifenolis kvercetas (QUE) sukelia intensyvesnį apoptotinį atsaką nei aziridinil-nepavaduotas durochinonas (DQ). Tai susieta su alkilinimo procesais.
4. Tiriant RH1, DQ ir QUE sukeltą ląstelių žūtį, DNR pažeidimų susidarymą, MAP kinazių raišką ir fosforilinimą nustatyta, kad galimai antiapoptotinį ERK veikimą lemia oksidacinis stresas, o JNK vaidmuo chinonų ir polifenolių indukuojamame žūties procese nevienareikšmis. Tuo tarpu p38 MAPK pasižymi MH-22A ląstelių žūtį indukuojančiu veikimu, tačiau šios kinazės raišką ir fosforilinimą galimai slopina oksidacinis stresas ir alkilinimas.
5. p53 baltymo raiška nėra būdinga MH-22A ląstelėms, tačiau ją specifiskai sukelia RH1. Šiuo atveju p53 veikia kaip antiapoptotinis faktorius.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdelmohsen K, von Montfort C, Stuhlmann D, Gerber PA, Decking UK, Sies H, Klotz LO. Doxorubicin induces EGF receptor-dependent downregulation of gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Biol Chem.* 2005; 386(3): 217-23.
2. Aebersold DM, Shaul YD, Yung Y, Yarom N, Yao Z, Hanoch T, Seger R. Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(22): 10000-15.
3. Ahn CB, Je JY, Kim YS, Park SJ, Kim BI. Induction of Nrf2-mediated phase II detoxifying/antioxidant enzymes in vitro by chitosan-caffeic acid against hydrogen peroxide-induced hepatotoxicity through JNK/ERK pathway. *Mol Cell Biochem.* 2017; 424: 79-86.
4. Akan Z and Garip AI. Antioxidants May Protect Cancer Cells from Apoptosis Signals and Enhance Cell Viability. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(8): 4611-4614.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Programmed Cell Death (Apoptosis). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26873/>
6. Altman BJ and Rathmell JC. Metabolic Stress in Autophagy and Cell Death Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4: a008763.
7. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: An update. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43: 1731-1737.
8. Angst E, Park JL, Moro A, Lu QY, Lu X, Li G, King J, Chen M, Reber HA, Go VL, Eibl G, Hines OJ. The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Pancreas.* 2013; 42(2): 223-9.
9. Anusevičius Ž., Šarlauskas J., Čėnas N. Two – electron reduction of quinones by rat liver NAD(P)H: quinone oxidoreductase: Quantitative structure – activity relationships. *Arch Biochem Biophys, Elsevier,* 2002; 404(2): 254-262.
10. Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:1188-93.
11. Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J.* 2011; 434:201-10.
12. Avisetti DR, Babu KS, Kalivendi SV. Activation of p38/JNK pathway is responsible for embelin induced apoptosis in lung cancer cells: transitional role of reactive oxygen species. *PLoS One.* 2014; 22; 9(1): e87050.
13. Azqueta A, Gutzkow KB, Brunborg G, Collins AR. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutat Res.* 2011; 724(1-2): 41-5.
14. Bailey S I, Ritchie I M. A cyclic voltammetric study of the aqueous electrochemistry of some quinones. *Electrochimica Acta.* 1985; 30(3): 3-12.
15. Bandele OJ, Clawson SJ, Osheroff N. Dietary polyphenols as topoisomerase II DNA-poisons: B ring and C ring substituents determine the mechanism of enzyme-mediated cleavage enhancement. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21: 1253–1260.
16. Beall HD, Murphy AM, Siegel D, Hargreaves RH, Butler J, Ross D. Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate): quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) as a target for bioreductive antitumor quinones: quinone cytotoxicity and selectivity in human lung and breast cancer cell lines. *Mol Pharmacol.* 1995; 48:499-504.
17. Begleiter A, Leith MK, Patel D, Hasinoff BB. Role of NADPH cytochrome P450 reductase in activation of RH1. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007; 60(5): 713-23.
18. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 13681-6.

19. Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396: 74-9.
20. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000; 49(2 Suppl 1): 3-8.
21. Bhattacharya U, Halder B, Mukhopadhyay S and Giri AK. Role of oxidation-triggered activation of JNK and p38 MAPK in black tea polyphenols induced apoptotic death of A375 cells. *Cancer Science.* 2009; 100: 1971–8.
22. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2014; 14(5): 359-70.
23. Blatt NB. and Glick GD. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg Med Chem* 2001; 9: 1371-1384.
24. Boersma MG, Vervoort J, Szymusiak H, Lemanska K, Tyrakowska B, Čenas N, Segura-Aguilar J, Rietjens IMCM. Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. *Chem Res Toxicol.* 2000; 13: 185–191.
25. Boly R, Gras T, Lamkami T, Guissou P, Serteyn D, Kiss R, Dubois J. Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. *Int J Oncol.* 2011; 38(3): 833-842.
26. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2000; 13: 135-60.
27. Boots AW, Bast A, Haenen GR. No role of DT-diaphorase (NQO1) in the protection against oxidized quercetin. *Febs Letters.* 2005; 579(3): 677-82.
28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
29. Broustasa CG ir Lieberman HB. DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis. *Radiat Res.* 2014; 181(2): 111–130.
30. Butler J, Hoey BM., Ward TH. The alkylation of DNA in vitro by 2,5-bis(2-hydroxyethylamino)-3, 6-diaziridinyl-1,4-benzoquinone (BZQ)—I. *Biochem. Pharmacol.* 1989; 36: 923-927.
31. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75(1): 50-83.
32. Chang T. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences.* 2009; 10: 2440-2475.
33. Checkoway H, Powers K, Smith-Weller T, Franklin GM, Longstreth WT, Swanson PD. Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. *Am. J. Epidemiol.* 2002; 155: 732-738.
34. Cheng S, Gao N, Zhang Z, Chen G, Budhraj A, Ke Z, Son YO, Wang X, Luo J, Shi X. Quercetin induces tumor-selective apoptosis through downregulation of Mcl-1 and activation of Bax. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(23): 5679-91.
35. Choi JA, Kim JY , Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *International Journal of Oncology.* 2001; 19(4): 837-44.
36. Christmann M ir Kaina B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(18): 8403–8420.
37. Čenas N, Anusevičius Ž, Nivinskas N, Misevičienė L and Šarlauskas J. Structure-activity relationships in two-electron reduction of quinones. *Method. Enzymol.* 2004; 382: 258-277.
38. Danson SJ, Ward TH, Butler J, Ranson M. DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30: 437–449.
39. De Zio D, Cianfanelli V, Cecconi F. New Insights into the link between DNA damage and apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(6): 559–571.
40. Deckbar D, Jeggo PA, Lobrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Biochem Mol Biol.* 2011; 46(4): 271–283.

41. Dehn DL, Inayat-Hussain SH, Ross D. RH1 induces cellular damage in an NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1-dependent manner: relationship between DNA cross-linking, cell cycle perturbations, and apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 313(2): 771-9.
42. Deng XH, Song HY, Zhou YF, Yuan GY, Zheng FJ. Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin in vitro. *Exp Ther Med.* 2013; 6(5): 1155-1158.
43. Dhanasekaran DN ir Reddy EP. JNK Signaling in apoptosis. *Oncogene.* 2008; 27(48): 6245-6251.
44. Di Francesco AM, Ward TH, Butler J. Diaziridinylbenzoquinones. *Methods Enzymol.* 2004; 382: 174-93.
45. Doherty GP, Leith MK, Wang X, Curphey TJ, Begleiter A. Induction of DT-diaphorase by 1,2-dithiole-3-thiones in human tumour and normal cells and effect on anti-tumour activity of bioreductive agents. *Br J Cancer.* 1998; 77: 1241-52.
46. Durpez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenaabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 2009; 11: 1050-62.
47. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: 495-516.
48. Essick EE, Sam F. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, ageing and cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2010; 3(3): 168-77.
49. Faig M, Bianchet MA, Talalay P, Chen S, Winski S, Ross D and Amzel LM. Structures of recombinant human and mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductases: species comparison and structural changes with substrate binding and release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 3177-3182.
50. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011; 6: 479-507.
51. Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature.* 2007; 448(7155): 767-74.
52. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology.* 2002;177(1): 91-104.
53. Gascoigne KE, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci.* 2009; 122:2579-85.
54. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cossarizza A. Interfering with ROS Metabolism in Cancer Cells: The Potential Role of Quercetin. *Cancers (Basel).* 2010; 2(2): 1288-311.
55. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cooper EL, Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 591356.
56. Gliszczyńska-Swigło A, van der Woude H, de Haan L, Tyrakowska B, Aarts JM, Rietjens IM. The role of quinone reductase (NQO1) and quinone chemistry in quercetin cytotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 2003; 17(4): 423-31
57. Goepfert AR, Te Koppele JM, Neve EP, Vermeulen NP. Reductase and oxidase activity of rat liver cytochrome P450 with 2,3,5,6-tetramethylbenzoquinone as substrate. *Chem Biol Interact.* 1992; 83: 249-69.
58. Goepfert AR, Te Koppele JM, van Maanen JM, Zoetemelk CE, Vermeulen NP. One-electron reductive bioactivation of 2,3,5,6-tetramethylbenzoquinone by cytochrome P450. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43: 343-52.
59. Granado-Serrano AB, Angeles MM, Bravo L, Goya L and Ramos S. Time-course regulation of quercetin on cell survival/proliferation pathways in human hepatoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008;52:457-64.
60. Green D.R. and Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281: 1309-1312.
61. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41(12 Pt 2): 1819-28.

62. Halbwirth H. The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. *Int J Mol Sci.* 2010; 11(2): 595-621.
63. Hargreaves RHJ, Hartley JA, Butler J. Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents: DNA alkylation by aziridinyquinones. *Front. Biosci.* 2000; 5: 172.
64. Hargreaves RH, Mayalarp SP, Butler J, McAdam SR, O'Hare CC, Hartley JA. Cross-linking and sequence specific alkylation of DNA by aziridinyl quinones. 2. Structure requirements for sequence selectivity. *J Med Chem.* 1997; 40: 357-61.
65. He LQ, Lu JH, Yue ZY. Autophagy in ageing and ageing-associated diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2013; 34(5): 605–11.
66. Helbig L, Damrot J, Hülsenbeck J, Köberle B, Brozovic A, Osmak M, Fiket Z, Kaina B, Fritz G. Late Activation of Stress-activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Kinases Triggered by Cisplatin-induced DNA Damage in Repair-defective Cells. *J Biol Chem.* 2011; 286: 12991–13001.
67. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993; 342: 1007-1011.
68. Hindenburg AA, Gervasoni JE Jr, Krishna S, Stewart VJ, Rosado M, Lutzky J, Bhalla K, Baker MA, Taub RN. Intracellular distribution and pharmacokinetics of daunorubicin in anthracycline-sensitive and -resistant HL-60 cells. *Cancer Res.* 1989; 49(16): 4607-14.
69. Hoagland MS, Hoagland EM and Swanson HI. The p53 Inhibitor Pifithrin- $\alpha$  Is a Potent Agonist of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2005; 314(2): 603-10.
70. Holden JA. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2001; 1:1-25.
71. Homer RJ. *Cancer Concepts: Cancer Treatment Drugs.* 1st ed. Worcester: University of Massachusetts Medical School; 2013.
72. Hou DX, Kumamoto T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 13: 691–719
73. Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell.* 2010; 1: 218-26.
74. Hussein D, Holt SV, Brookes KE, Klymenko T, Adamski JK, Hogg A. Preclinical efficacy of the bioreductive alkylating agent RH1 against paediatric tumours. *Br J Cancer.* 2009; 101: 55–63.
75. Yan C, Kepa JK, Siegel D, Stratford IJ, Ross D. Dissecting the role of multiple reductases in bioactivation and cytotoxicity of the antitumor agent 2,5-diaziridinyl-3-(hydroxymethyl)-6-methyl-1,4-benzoquinone (RH1). *Mol Pharmacol.* 2008; 74: 1657-65.
76. Yang C, Yu L, Kong L, Ma R, Zhang J, Zhu Q, Zhu J, Hao D. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) inhibits lipopolysaccharide induced inflammation in part via downregulated NF- $\kappa$ B and p38/JNK activation in microglial and attenuates microglia activation in lipopolysaccharide treatment mice. *PLoS One.* 2014; 14; 9(10):e109502.
77. Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1807: 735-45.
78. Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem.* 2009; 106(1): 73-82.
79. Jodi M, Coates M D, Joseph M, Galante MD, Richard J and Bold MD. Cancer therapy beyond apoptosis: autophagy and anoikis as mechanisms of cell death. *Surgical Research.* 2010; 164: 301–308.
80. Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, Hara Y. Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *Flavonoids in Health and Disease.* 1998; 137–61.

81. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4): 239-57.
82. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 254: 86-99.
83. Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 2940-5.
84. Kowaltowski AJ, Castilho RF and Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters*. 2001; 495, doi: 10.1016/S0014-5793(01)02316-X.
85. Krause EG, Vetter R. *Biochemical Mechanisms in Heart Function*. Springer Science & Business Media, 2012; 225-30.
86. Krauss G. *Biochemistry of signal transduction and regulation*. 4th ed. Weinheim:Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2008.
87. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009; 16(1): 3-11.
88. Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 263: 825-31.
89. Kumazawa T, Hiwasa T, Takiguchi M, Suzuki O, Sato K. Activation of Ras signaling pathways by pyrroloquinoline quinone in NIH3T3 mouse fibroblasts. *Int J Mol Med*. 2007; 19(5): 765-70.
90. Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, Kikuchi N, Nakaya N, Nishino Y, Tsubono Y, Tsuji I. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: The Ohsaki study. *JAMA*. 2006; 296: 1255-1265.
91. Kuwabara M, Asanuma T, Niwa K, Inanami O. Regulation of Cell Survival and Death Signals Induced by Oxidative Stress. *J Clin Biochem Nutr*. 2008; 43: 51–57.
92. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979; 278(5701): 261–3.
93. Latosińska JN, Latosińska M. *Anticancer Drug Discovery — From Serendipity to Rational Design*. Drug Discovery. 1st ed. El-Shemy HA, editor. InTech, 2013.
94. Lee CS, Hartley JA, Berardini MD, Butler J, Siegel D, Ross D, Gibson NW. Alteration in DNA cross-linking and sequence selectivity of a series of aziridinylbenzoquinones after enzymatic reduction by DT-diaphorase. *Biochemistry*. 1992; 31: 3019-25.
95. Lee YJ, Song JH, Oh MH, Lee YJ, Kim YB, Im JH, Lee SH. ERK1/2 activation in quercetin-treated BEAS-2B cell plays a role in Nrf2-driven HO-1 expression. *Mol Cell Toxicol*. 2011; 7(4): 347 – 55.
96. Lee KM, Jeon SM and Cho HJ. Interleukin-6 induces microglial CX3CR1 expression in the spinal cord after peripheral nerve injury through the activation of p38 MAPK. *European Journal of Pain*. 2010;14:682.e1–682.e12.
97. Lee WJ, Hsiao M, Chang JL, Yang SF, Tseng TH, Cheng CW, Chow JM, Lin KH, Lin YW, Liu CC, Lee LM, Chien MH. Quercetin induces mitochondrial-derived apoptosis via reactive oxygen species-mediated ERK activation in HL-60 leukemia cells and xenograft. *Archives of Toxicology*. 2015; 89(7): 1103-17.
98. Lee WS, Yi SM, Yun JW, Jung JH, Kim DH, Kim HJ, Chang SH, Kim GS, Ryu CH, Shin SC, Hong SC, Choi YH, Jung JM. Polyphenols Isolated from *Allium cepa* L. Induces Apoptosis by Induction of p53 and Suppression of Bcl-2 through Inhibiting PI3K/Akt Signaling Pathway in AGS Human Cancer Cells. *Journal of Cancer Prevention*. 2014; 19(1): 14-22.
99. Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*. 2009; 48(1): 46-53.



100. Lim W, Yang C, Bazer FW and Song G. Chrysophanol Induces Apoptosis of Choriocarcinoma Through Regulation of ROS and the AKT and ERK1/2 Pathways. *J. Cell. Physiol.* 2017; 232: 331-9.
101. Lin S, Li JJ, Fujii M, Hou DX. Rhein inhibits TPA-induced activator protein-1 activation and cell transformation by blocking the JNK-dependent pathway. *Int J Oncol.* 2003; 22(4): 829-33.
102. Lind MJ. Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine.* 2011; 39: 711-6.
103. Linhartova P, Gazo I, Shaliutina A, Hulak M. The in vitro effect of duroquinone on functional competence, genomic integrity, and oxidative stress indices of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Toxicol In Vitro.* 2013; 27: 1612-9.
104. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17(1): 43–52.
105. Lolli G, Cozza G, Mazzorana M, Tibaldi E, Cesaro L, Donella-Deana A, Meggio F, Venerando A, Franchin C, Sarno S, Battistutta R, Pinna LA. Inhibition of protein kinase CK2 by flavonoids and tyrphostins. A structural insight. *Biochemistry.* 2012; 7: 51(31): 6097-107.
106. Lorin S, Hamai A, Mehrpour M, Codogno P. Autophagy regulation and its role in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2013; 23(5): 361-79.
107. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.
108. Lu J, Papp LV, Rodriguez-Neto S, Zhivotovsky B, Holmgren A. Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Res.* 2006; 66: 4410–4417.
109. Maclaine NJ, Hupp TR. The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging.* 2009; 1(5): 490-502.
110. Madan E, Gogna R, Kuppusamy P, Bhatt M, Pati U, Mahdi A A. TIGAR induces p53-mediated cell-cycle arrest by regulation of RB–E2F1 complex. *Br J Cancer.* 2012; 107(3): 516–526.
111. Malorni W, Paradisi S, Iosi F, Santini MT. Two different pathways for necrotic cell death induced by free radicals. *Cell Biol Toxicol.* 1993; 9: 119-30.
112. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; 81: 230S-242S.
113. Marcinkevičienė J, Čenas N, Kulys J, Usanov SA, Sukhova NM, Selezneva IS, Gryazev VF. Nitroreductase reactions of the NADPH: adrenodoxin reductase and the adrenodoxin complex. *Biomed Biochim Acta.* 1990; 49(4): 167-72.
114. Marcus RA and Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 811: 265-322.
115. Marinho HS, Cyrne L, Cadenas E, Antunes F. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> delivery to cells: steady-state versus bolus addition. *Methods Enzymol.* 2013; 526:159-73.
116. Marnett LJ. Lipid peroxidation – DNA damage by malonaldehyde. *Mutat. Res.* 1999; 424 (1-2): 83-95.
117. Marozienė A, Nemeikaitė-Čėnienė A, Vidžiūnaitė R, Čenas N. Correlation between mammalian cell cytotoxicity of flavonoids and the redox potential of phenoxyl radical/phenol couple. *Acta biochimica polonica.* 2012; 2: 299-305.
118. Martindale JL and Holbrook N J. Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. *Cel Physiol.* 2002; 192: 1–15.
119. Martinez-Rivera M ir Siddik Z H. Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem Pharmacol.* 2012; 83(8): 1049–1062.
120. Marzo I, Naval J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. *Biochem Pharmacol.* 2013; 86:703-10.

121. Mauro A, Ciccarelli C, De Cesaris P, Scoglio A, Bouché M, Molinaro M, Aquino A, Zani BM. PKC $\alpha$ -mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *J Cell Sci.* 2002; 115:3587-3599.
122. Mercille S, Massie B. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotech. Bioeng.* 1994; 44: 1140-50.
123. Miliukienė V, Nivinskas H, Čėnas N. Cytotoxicity of anticancer aziridinyl-substituted benzoquinones in primary mice splenocytes. *Acta Biochim Pol.* 2014; 61(4): 833-6.
124. Misevičienė L, Anusevičius Ž, Šarlauskas J, Čėnas N. Reduction of nitroaromatic compounds by NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1): the role of electron-accepting potency and structural parameters in the substrate specificity. *Acta Biochim Pol.* 2006; 53(3): 569-76.
125. Mocanu MM, Surcel M, Ursaciuc C, Katona E, Ganea C. Antiproliferative effect of quercetin in mammary and epidermoid cancer cells. *Rom Biotech Lett.* 2013; 18(6): 8796-03.
126. Mohan P, Rapoport N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. *Mol Pharm.* 2010; 7(6): 1959-73.
127. Monks TJ, Hanzlik RP, Cohen GM, Ross D, Graham DG. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992; 112:2-16.
128. Monks TJ, Jones DC. The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers. *Current Drug Metabolism.* 2002; 3:425-438
129. Monks TJ, Lau SS. Biological reactivity of polyphenolic glutathione conjugates. *Chem. Res. Toxicol.* 1997; 1296-1313.
130. Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 1: 4(11).
131. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell.* 2014; 25(3): 304-17.
132. Murakami Y, Miller JW, Vavvas DG. RIP kinase-mediated necrosis as an alternative mechanisms of photoreceptor death. *Oncotarget.* 2011; 2:497-509.
133. Nemeikaitė-Čėnienė A, Dringelienė A, Šarlauskas J, Čėnas N. Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) in apoptosis induction by aziridinylbenzoquinones RH1 and MeDZQ. *Acta Biochim Pol.* 2005; 52: 937-41.
134. Nemeikaitė-Čėnienė A, Jarašienė R, Nivinskas H, Šarlauskas J, Čėnas N. Cytotoxicity of anticancer aziridinyl-benzoquinones in murine hepatoma MH22a cells: the properties of RH1-resistant subline. *Chemija.* 2015; 26(1): 46–50.
135. Nemeikaitė-Čėnienė A, Sergedienė E, Ačaitė J, Čėnas N. Role of intracellular accumulation in the prooxidant cytotoxicity of daunorubicin. *Biologija.* 2005; 1: 55-7.
136. Nemeikaitė-Čėnienė, Šarlauskas J, Anusevičius Z, Nivinskas H, Čėnas N. Cytotoxicity of RH1 and related aziridinylbenzoquinones: involvement of activation by NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) and oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2003, 416 (1): 110-118.
137. Ngo EO, Nutter LM, Sura T, and Gutierrez PL. Induction of p53 by the Concerted Actions of Aziridine and Quinone Moieties of Diaziquone. *Chem. Res. Toxicol.* 1998;11(4): 360–8.
138. Nguyen MV, Lardy B, Rousset F, Hazane-Puch F, Zhang L, Trocmé C, Serrander L, Krause KH, Morel F. Quinone compounds regulate the level of ROS production by the NADPH oxidase Nox4. *Biochem Pharmacol.* 2013; 85: 1644-54.
139. Nirmala MJ, Samundeeswari A, Sankar PD. Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Research in Plant Biology.* 2011; 1: 01-14.
140. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 338-50.
141. O'Brien PJ. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Int.* 1991; 80(1): 1-41.

142. O'Prey J, Brown J, Fleming J, Harrison PR. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*. 2005; 66(11): 2075-88.
143. Oberley TD. Oxidative damage and cancer. *Am. J. Pathol.* 2002; 160 (2): 403-408.
144. 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.
145. Ollinger K ir Kågedal K. Induction of apoptosis by redox-cycling quinones. *Subcell Biochem.* 2000; 36: 151-170.
146. Ollinger K, Brunmark A. Effect of Hydroxy Substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1991; 266: 21496-503.
147. Pan HC, Jiang Q, Yu Y, Mei JP, Cui YK, Zhao WJ. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. *Neurochemistry International*. 2015; 80: 60-71.
148. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009; 2(5): 270-278.
149. Park MT, Song MJ, Oh ET, Lee H, Choi BH, Jeong SY, Choi EK, Park HJ. The anti-tumour compound, RH1, causes mitochondria-mediated apoptosis by activating c-Jun N-terminal kinase. *Br J Pharmacol.* 2011; 163:567-85.
150. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22(2): 153-83.
151. Pelicano H, Carney D and Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug res upd.* 2004; 7: 97-110.
152. Pérez-Sacau E, Díaz-Peñate RG, Estévez-Braun A, Ravelo AG, García-Castellano JM, Pardo L, Campillo M. Synthesis and pharmacophore modeling of naphthoquinone derivatives with cytotoxic activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *J Med Chem.* 2007; 50(4): 696-706.
153. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.* 2009; 53(2): 75-100.
154. Picco V, Pages G. Linking JNK activity to the DNA damage response. *Genes Cancer.* 2013; 4(9-10): 360-368.
155. Pierce SE, Guziec LJ, Guziec FS, Brodbelt JS. Characterization of aziridinylbenzoquinone DNA cross-links by liquid chromatography-infrared multiphoton dissociation-mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 2010; 23: 1097-104.
156. Pink JJ, Planchon SM, Tagliarino C, Varnes ME, Siegel D, Boothman DA. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of beta-lapachone cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2000; 275(8): 5416-24.
157. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813: 1619-33.
158. Pommier Y, Cushman M. The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8:1008-14.
159. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 2010; 17: 421-33.
160. Porta H, Cancino-Rodezno A, Soberón M, Bravo A. Role of MAPKp38 in the cellular responses to pore-forming toxins. *Peptides.* 2011; 32: 601-6.
161. Pritchard AL, Hayward NK. Molecular pathways: mitogen-activated protein kinase pathway mutations and drug resistance. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(9): 2301-9.
162. Proskuryakov SY, Gabai VL. Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr Pharm Des.* 2010; 16: 56-68.
163. Qureshi HY, Ricci G, Zafarullah M. Smad signaling pathway is a pivotal component of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 regulation by transforming growth factor beta

- in human chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2008; 1783(9): 1605-12.
164. Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine*. 2007; 2: 567–83.
  165. Rastogi RP, Richa, Sinha RP. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal* 2009; 8: 155-181.
  166. Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(7): 933-56.
  167. Rich PR, Bendall DS. The kinetics and thermodynamics of the reduction of cytochrome c by substituted p-benzoquinols in solution. *Biochim Biophys Acta*. 1980; 592(3): 506-18.
  168. Robak P, Robak T. Older and new purine nucleoside analogs for patients with acute leukemias. *Cancer Treat Rev*. 2013; 39: 851-61.
  169. Ross D and Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol*. 2004; 382: 115-144.
  170. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact*. 2000; 129: 77-97.
  171. Roubalova L, Biedermann D, Papoušková B, Vacek J, Kuzma M, Kren V, Ulrichova J, Dinkova-Kostova AT, Vrba J. Semisynthetic flavonoid 7-O-galloylquercetin activates Nrf2 and induces Nrf2-dependent gene expression in RAW264.7 and Hepa1c1c7 cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2016; 260: 58-66.
  172. Rubinfeld H, and Seger R. The ERK cascade as a prototype of MAPK signaling pathways. *Methods Mol. Biol*. 2004; 250: 1-28.
  173. Rucker R, Storms D, Sheets A, Tchapanian E, Fascetti A. Biochemistry: is pyrroloquinoline quinone a vitamin? *Nature*. 2005; 433: E10-1; discussion E11-2.
  174. Runchel C, Matsuzawa A, Ichijo H. Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(1): 205-18.
  175. Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol*. 2014. pii: S1044-5323(14)00022-0.
  176. Scott KA, Barnes J, Whitehead RC, Stratford IJ, Nolan KA. Inhibitors of NQO1: identification of compounds more potent than dicoumarol without associated off-target effects. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81: 355-63.
  177. Sergedienė E., Jönsson K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Rietjens I. M. C. M., Čenas N. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidant to HL-60 cells: description of Quantitative structure-activity relationships. *FEBS Lett*. 1999; 462: 392-396.
  178. Shaulian E. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal*. 2010; 22: 894-9.
  179. Shearer MJ, Newman P. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost*. 2008; 100: 530-47.
  180. Shen HM. and Codogno P. Autophagic cell death. Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy*. 2011; 7(5): 457-465.
  181. Shimoni E, Armon R, Neeman I. Antioxidant properties of deferoxamine. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1994; 71: 641-4.
  182. Siddik ZH. Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: DNA-Interactive Alkylating Agents and Antitumour Platinum-Based Drugs. *The Cancer Handbook*. 1st ed. Houston: The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center; 2005.
  183. Siegel D, Yan C, Ross D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83: 1033-40.
  184. Spagnuolo C, Russo M, Bilotto S, Tedesco I, Laratta B, Russo GL. Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1259: 95-103.

185. Stegh AH. Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - The promises, challenges, and perils. *Expert Opin Ther Targets*. 2012; 16(1): 67-83.
186. Stevens JB, Abdallah BY, Liu G, Horne SD, Bremer SW, Ye KJ, Huang JY, Kurkinen M, Ye CJ, Heng HH. Heterogeneity of cell death. *Cytogenet Genome Res*. 2013; 139(3): 164-73.
187. Stonys R, Kazbarienė B, Didžiapetrienė J. Common molecular mechanisms of ageing and cancer. *Health sciences*. 2013; 23(6): 54-57.
188. Stulpinas A, Imbrasaitė A, Krestnikova N, Šarlauskas J, Čėnas N, Kalvelytė AV. Study of Bioreductive Anticancer Agent RH-1-Induced Signals Leading the Wild-Type p53-Bearing Lung Cancer A549 Cells to Apoptosis. *Chem Res Toxicol*. 2016; 19; 29(1): 26-39.
189. Sun X, Ross D. Quinone-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via DT-diaphorase mediated bioactivation. *Chem Biol Interact*. 1996; 100: 267-76.
190. Sutherland BA, Rahman RMA, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *Nutritional Biochemistry*. 2006; 17: 291–306.
191. Šarlauskas J , Nemeikaitė-Čėnienė A, Nivinskas H, Miliukienė V , Jarašienė R , Pečiukaitytė M, Baltriukienė D, Bukelskienė B, Krikštopaitis K, Čėnas N. Redox reactions and cytotoxicity mechanisms of anticancer aziridinyl-substituted-1,4-benzoquinones: a minireview. *Chemija*. 2015; 26(3): 208–217.
192. Thakur VS, Gupta K, Gupta S. Green tea polyphenols increase p53 transcriptional activity and acetylation by suppressing class I histone deacetylases. *Int J Oncol*. 2012; 41(1): 353-61.
193. Torres LS, editor. *Cancer Drug Resistance Research Perspectives*. 1st ed. New York: Nova Science; 2007.
194. Tsai CW, Lin CY, Wang YJ. Carnosic Acid Induces the NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 Expression in Rat Clone 9 Cells through the p38/Nuclear Factor Erythroid-2 Related Factor 2 Pathway. *The Journal of Nutrition*. 2011; 141(12): 2119–25.
195. Tsujimoto Y and Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*. 2005; 12: 1528–1534.
196. Tudor G, Alley M, Nelson CM, Huang R, Covell DG, Gutierrez P, Sausville EA. Cytotoxicity of RH1: NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase (NQO1)-independent oxidative stress and apoptosis induction. *Anticancer Drugs*. 2005; 16(4): 381-91.
197. Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct*. 2011; 29: 468-80.
198. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(10): 700-14.
199. Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutr Rev*. 2010; 68(7): 418-28.
200. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients*. 2010; 2: 1106-1131.
201. Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant QUEntity and QUElity in foods: Vegetables. *Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46: 3630–3634.
202. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant QUEntity and QUElity in foods: Fruits. *Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: 5315–5321.
203. Volpe A, Racioppi M, D'Agostino D, Cappa E, Filianoti A, Bassi PF. Mitomycin C for the treatment of bladder cancer. *Minerva Urol Nefrol*. 2010; 62: 133-44.
204. Wallea T, Vincentb TS, Wallea UK. Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochemical Pharmacology*. 2003; 65: 1603–10.

205. Wang G, Zhang J, Liu L, Sharma S, Dong Q. Quercetin Potentiates Doxorubicin Mediated Antitumor Effects against Liver Cancer through p53/Bcl-xl. *PLoS One*. 2012; 7(12): e51764.
206. Wang HJ, Lee EY, Han SJ, Kim SH, Lee BW, Ahn CW, Cha BS, Lee HC. Dual pathways of p53 mediated glucolipototoxicity-induced apoptosis of rat cardiomyoblast cell: activation of p53 proapoptosis and inhibition of Nrf2-NQO1 antiapoptosis. *Metabolism*. 2012; 61(4): 496-503.
207. Wang X, Thomas B, Sachdeva R, Arterburn L, Frye L, Hatcher PG, Cornwell DG, Ma J. Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michael adduct formation and induction of endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 3604-9.
208. Ward TH, Danson S, McGown AT, Ranson M, Coe NA, Jayson GC, et al. Preclinical evaluation of the pharmacodynamic properties of 2,5-diaziridinyl-3-hydroxymethyl-6-methyl-1,4-benzoquinone. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 2695–2701.
209. Wardman P, Dennis MF, Everett SA, Patel KB, Stratford MR, Tracy M. Radicals from one-electron reduction of nitro compounds, aromatic N-oxides and quinones: the kinetic basis for hypoxia-selective, bioreductive drugs. *Biochem Soc Symp*. 1995; 61: 171-94.
210. Wardman P. Bioreductive activation of quinones: redox properties and thiol reactivity. *Free Radic Res Commun*. 1990; 8(4-6): 219-29.
211. Wardman P. Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution. *J Phys Chem Ref Data*. 1989; 18(4): 1637-1755.
212. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*. 2006; 5: 14.
213. Wynand PR and Bernd K. DNA damage – induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006; 12(9): 440-50.
214. Wu GS. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 2004; 3(2): 156-61. Epub 2004 Feb 1.
215. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*. 2005; 15(1): 11-8.
216. Zhang Q, Zhao XH and Wang ZJ. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(6): 2042-53.
217. Zhao Y, Lou I C, Conolly R B. Computational Modeling of Signaling Pathways Mediating Cell Cycle Checkpoint Control and Apoptotic Responses to Ionizing Radiation-Induced DNA Damage. *Dose Response*. 2012; 10(2): 251–273.
218. Алексанян ЮТ, Басмаджян МЕ, Мовсесян КС, и др. Линия перевиваемой мышинной гепатомы. *Бюл. Эксп. Биол. Мед*. 1972; 5: 94-95.

## **PADĖKA**

Esu dėkinga visiems už paramą ir pagalbą šio darbo metu. Ypatingai ir nuoširdžiai norėčiau padėkoti:

Darbo vadovui prof. habil. dr. Narimantui Čėnui už pagrindines idėjas, vertingus patarmus bei kritines pastabas.

Dr. Virginijai Bukelskienei už visokiariopa pagalbą, vertingus patarimus ir moralinį palaikymą visų doktorantūros studijų metu.

Dr. Daivai Baltriukienei už reikšmingas pastabas, patarimus bei pagalbą ieškant sprendimų susidūrus su problemomis.

Už susintetintus junginius dėkoju VU Biochemijos instituto Ksenobiotikų biochemijos skyriaus vyresniajam mokslo darbuotojui dr. Jonui Šarlauskiui.

Už pagalbą ir patarimus matuojant fermentų aktyvumą dėkoju VU Biochemijos instituto Ksenobiotikų biochemijos skyriaus mokslo darbuotojui dr. Henrikui Nivinskiui.

Už galimybę pasinaudoti tėkmės citometru dėkoju VU Biochemijos instituto jaunesniajai mokslo darbuotojai Dr. Marijai Ger.

Už pagalbą, patarimus ir galimybę atlikti kometų metodą dėkoju VU GMF Botanikos ir genetikos katedros docentui Vaidotui Morkūnui ir Gintarei Urbonaitei.

Kolegoms Mildai Alksnei, Egidijui Šimoliūnui, Evaldui Balčiūnui, Violetai Bartuškienei ir visiems Biomodelių skyriaus darbuotojams už pagalbą ieškant atsakymų ir sprendimų susidūrus su problemomis, už reikšmingas pastabas, bei pagalba atliekant eksperimentus.

Šeimai už kantrybę, besąlygišką palaikymą ir begalinį supratimą.

## **FINANSINĖ PARAMA**

- Visuotinės dotacijos projektas VP1-3.1-ŠMM-07-K-01-103 „Molekuliniai chinonų ir polifenolių toksiškumo ir priešnavikinio aktyvumo mechanizmai: fermentinės redokso reakcijos, citotoksiškumas, signalo perdavimas ir proteomika“.
- LVMSF stipendija 2011-2012.
- LVMSF stipendija 2012-2013.