

Vilniaus universitetas  
Fizikos fakultetas  
Lazerinių tyrimų centras

Mantvydas Pašakinskas

**Sinerginis vitaminų C ir K<sub>3</sub> citotoksiškumo mechanizmas:  
*in silico, in vitro***

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas  
Biofizikos  
studijų programa

Studentas	Mantvydas Pašakinskas
Leista ginti	2018-05-20
Darbo vadovas	Prof. Habil. Dr. Gintautas Saulis
Konsultantas	Doc. Dr. Alytis Gruodis
Centro direktorius	Prof. Dr. Roaldas Gadonas

## TURINYS

TERMINAI	2
ĮŽANGA	3
1. LITERATŪROS APŽVALGA	4
1.1 Vitamino K <sub>3</sub> formos ir fiziologinis poveikis	4
1.2 Vitamino C citotoksiškumas	5
1.3 Vitamino C formos	7
1.4 Vitaminas C kaip protonų donoras	8
1.5 TERPĖS ĮTAKA	10
1.6 VITAMINŲ C IR K <sub>3</sub> KOMPLEKSAS	12
2. METODIKA	14
2.1 Medžiagos ir priemonės ląstelių kultivavimui	14
2.2 Ląstelių vitališkumo matavimai	15
2.3 Vandensilio peroksido matavimas Amplex <sup>®</sup> Red pagalba	17
2.4 Skaičiavimo metodai	21
3. REZULTATAI	22
3.1 Ląstelių gyvybingumo dinamikos rezultatai	22
3.2 Vandensilio peroksido generavimo vertinimas	24
3.3 Modeliavimai kvantcheminiais metodais	27
4. PAGRINDINIAI REZULTATAI IR IŠVADOS	40
SANTRAUKA	41
SUMMARY	42
5. LITERATŪRA	43

## **TERMINAI**

Vitaminas C – askorbo rūgštis – askorbatas – molekulinė forma

Dehidro-askorbo rūgštis – dehidroaskorbatas – molekulinė forma

Askorbilas • – deprotonuotas askorbatas – joninė forma

Vitaminas K3 – menadionas – molekulinė forma

Vitamino K3 semidiono aniono radikalas – joninė forma

In aqua – HOH – vandeninė (terpė)

HO-O• – hidroksi-peroksil radikalas

HO-OH – vandenilio peroksidas

## IŽANGA

Kiekvieną dieną žmogaus imuninė sistema, organai susiduria su patogeninėmis ar kancerogeninėmis medžiagomis, UV spinduliuote, kurios didina vėžinių susirgimų riziką mūsų organizmuose. Kol yra stengiamasi nustatyti tikslus vėžio atsiradimo ir formavimosi kelius bei vėžio sukėlėjus, dėl nuolat progresuojančių vėžio formų, chemoterapijos bei kito gydymo komplikacijų kiekvienais metais mirštamumas pasaulyje nuolat auga. Šiuo metu naudojami vėžio gydymo metodai ir antivėžiniai vaistai nėra pakankamai efektyvūs. Pagrindinė vėžio gydymo metodų problematika yra susijusi su metodų taikymo specifiškumu, vėžinių ląstelių prigimtimi ir gydymo trukme. Šie veiksniai lemia pakankamai didelį žmonių mirtingumą.

Vienas iš naujų gydymo būdų galėtų būti pasitelktas, naudojant vitaminų C ir K<sub>3</sub> terapiją, kai mišinio poveikis stipresnis nei šių vitaminų atskirai. Šis kompleksas oksidacijos – redukcijos reakcijų pagalba kaip šalutinį produktą išskiria H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vandenilio peroksida). Vandenilio peroksidas, veikdamas kaspazės 3/9, įjungia ląstelės vidinį apoptozės mechanizmą, kuris sąlygoja ląstelės susinaikinimą. Terapija vitaminų C ir K<sub>3</sub> kompleksu galėtų būti naudojama kaip papildoma arba alternatyvi priemonė kartu su šiuo metu taikomų vėžinių susirgimų gydymo invazinėmis metodikomis – radiologija, chirurgija ir pan. Vitaminų C ir K<sub>3</sub> komplekso tyrimų rezultatai daug žadantys, dėlto reikalingas išsamus reakcijos eigos aprašymas – ypač tokio mechanizmo pradžios ir išsibėgėjimo suvokimas.

Darbas atliktas Kaune, Vytauto Didžiojo universitete, Gamtos mokslų fakulteto biologijos katedros biofizikinių tyrimų laboratorijoje 2016–2018 m.

Darbo tikslas – vitaminų C ir K<sub>3</sub> bei jų mišinio citotoksiškumo tyrimas *in vitro* ir *in silico*.

Darbo uždaviniai:

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti vitaminų C ir K<sub>3</sub> *in aqua* citotoksinį poveikį *in vivo* pelės karcinomos ląstelių linijai MH-22A.
2. Fluorescuojančio *Amplex red* dažo metodu atlikti ir įvertinti *in vitro* vandenilio peroksido generavimo efektyvumą vitamino C ir vitaminų C ir K<sub>3</sub> mišinio atveju.
3. Naudojantis kvantinės chemijos metodais, atlikti *in silico* vitamino C *in aqua* terpėje su papildomais Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> jonais bei molekulinio deguonimi ir azotu, kompleksų struktūros analizę ir įvertinti elektroninio sužadavimo galimybes bei pobūdį.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

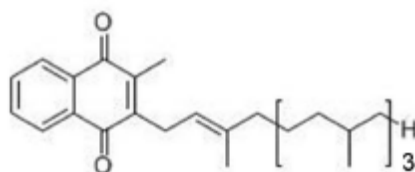
## 1.1 Vitamino K formos ir fiziologinis poveikis

Vitamino K grupei priklauso struktūriškai panašūs junginiai, kurie yra ko-faktoriai baltymų karboksilinimo fermentinėse reakcijose. Nekarboksilintas osteokalcinas (*angl. osteocalcin, unOC*) ir defosfo-nekarboksilintas matricos Gla baltymas (*angl. uncarboxylated matrix gla protein, dp-ucMGP*) yra vitamino K būvio markeriai kauliniame ir kraujagyslių audiniuose [24]. Vitaminas K skirstomas į 3 pagrindines kategorijas: filochinonas ( $K_1$ ), menachinonas ( $K_2$ ) ir menadionas ( $K_3$ ) (1.1 pav.) [1].

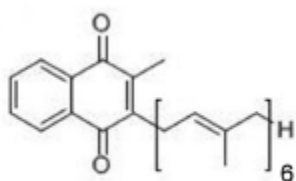
Vitaminas  $K_1$  randamas žaliose lapinėse daržovėse: brokoliuose, salotose, špinatuose, svogūnų laiškuose ir t.t. [3]. Vitamino  $K_2$  formos (MK – 4, MK – 7, MK – 10) yra pagaminama sintezės būdu bakterijų, ypač maistinių produktų tokių kaip jogurtas, natto [4]. Šio vitamino taip pat randama mėsoje, kiaušiniuose, sūryje [5]. Vitaminas  $K_3$  yra sintetinis, tirpstantis riebaluose, vienintelis iš  $K$  grupės vitaminų pasižymintis citotoksiniu poveikiu [1].

Vitaminas  $K$  dalyvauja Gla baltymų matricos karboksilinimo reakcijose arterijų sienelėse, kas lemia svarbų vaidmenį palaikant jų elastingumą [6].

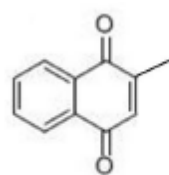
Kitas svarbus vitamino  $K$  vaidmuo yra kaulo metabolizmo reakcijose. Jo trūkumas gali sukelti osteoporozę.[7].



filochinonas (vitaminas  $K_1$ )

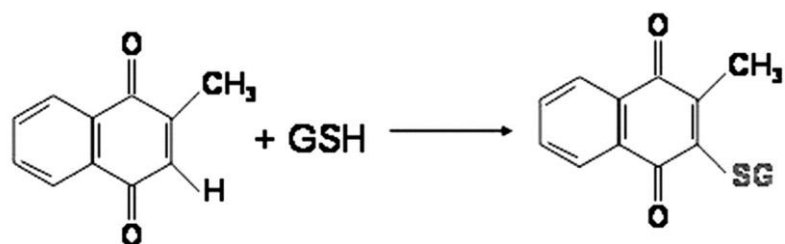


menachinonas (vitaminas  $K_2$ )



menadionas (vitaminas  $K_3$ )

1,1 pav. Vitamino K formos [2].

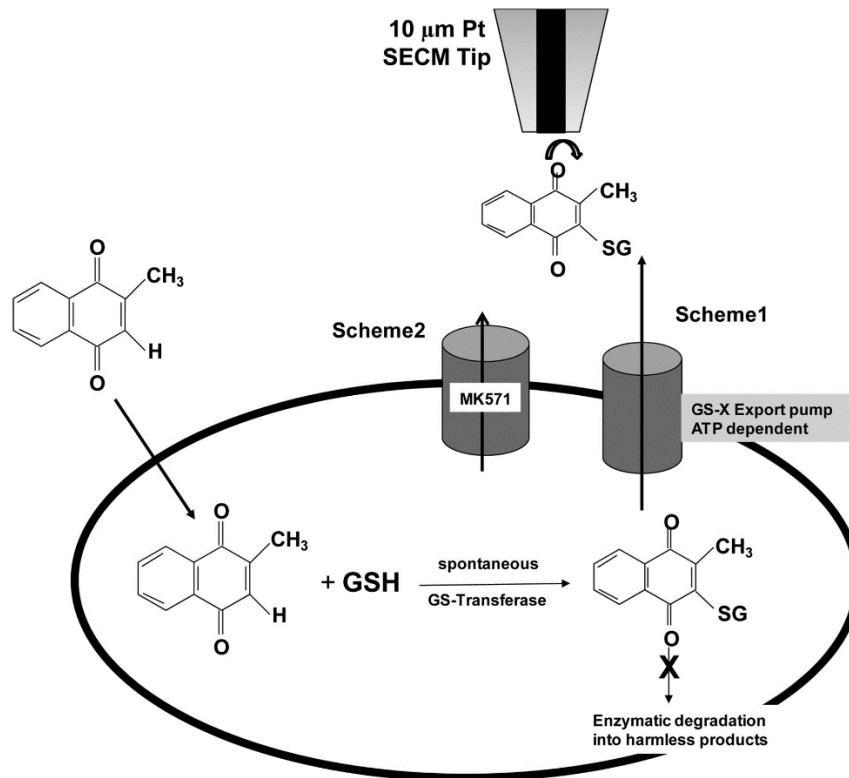


1.2 pav. Glutacionas sureaguoja su vitaminu K<sub>3</sub>, sudarydamas thiodioną [8].

## 1.2 Vitamino K<sub>3</sub> citotoksiškumas

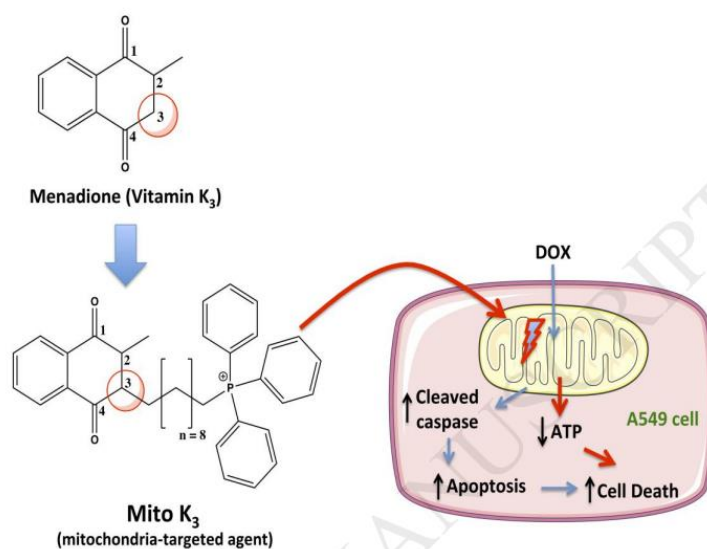
Vitaminas K<sub>3</sub> (menadionas) pasižymi itin stipriu citotoksiškumu ir oksidaciniu poveikiu vėžinėms ląstelėms. Menadionas gali indukuoti ląstelių žūtį keliais būdais - sukeldamas natūralią ląstelių mirtį (apoptozę) arba per autolizės inicijuotą nekrozę. Vitaminas K<sub>3</sub> patekęs į ląstelę sureaguoja su glutationu sudarydamas thiodiono kompleksą 1.2 pav. Šio komplekso susidarymo tikslas neutralizuoti vitaminą K<sub>3</sub>.

Mokslininkai grupė [8] skenuojančiu elektrocheminiu mikroskopu tyrė menadiono sukeltą oksidacinį stresą gyvose HeLa ląstelėse pav 1.3. Buvo nustatyta, kad menadiono hidrofobinė molekulė difunduoja per ląstelės plazminę membraną, o patekusi į ląstelę molekulė pasižymi toksiniu poveikiu. Siekiant panaikinti manadiono toksiškumą, ląstelėje esantis glutacionas jungdamasis su menadionu sudaro thiodioną. Thiodionas yra ląstelės atpažįstamas ir transportuojamas per ląstelės plazminę membraną MRP1 siurbliais, kurie naudoja ląstelės ATP energiją [8]. Ekstraląstelinėje aplinkoje thiodionas buvo aptiktas pasitelkiant elektrocheminį SECM mikroskopą. Thiodiono ekstraląstelinėje aplinkoje aptikta atitinkamai 140, 70, ir 35 μM koncentracijos, kai menadiono koncentracijos buvo 500, 250 ir 125 μM. Pasitelkus modeliavimą nustatyta thiodiono pernašos kinetika, menadiono pernašos greitis  $0.6 \times 10^{-7}$  m/s, 10 kartų didesnis negu menadiono įsisavinimo greitis [8]. Selektiviam MRP1 siurblių slopinimui HeLa ląstelėse buvo panaudotas 50 μM natrio druskos hidratas MK571. Buvo nustatyta, kad thiodiono koncentracija ekstraląstelinėje aplinkoje sumažėjo nuo 140 iki 50 μM, kai menadiono koncentracija 500 μM. Sumažėjęs thiodiono srautas patvirtino iškeltą hipotezę, kad menadiono ir glutaciono komplekso pernašoje dalyvauja MRP1 siurbliai ir, kad glutacionas yra pagrindinis substratas MRP1 pernašos mechanizme [8].



1.3 pav. Vitamino K<sub>3</sub> pernaša ir metabolizmas ląstelėje. Adaptuota pagal [8].

Menadionas, taip pat žinomas kaip vitaminas K<sub>3</sub>. Kaip įprastinė cheminė notacija yra naudojamas vardas – 2-Methylnaphthalene-1,4-dione menaphthone; β- Methyl-1,4-naphthoquinone; 2-Methyl-1,4-naphthodione; 2-Methyl-1,4- naphthoquinone. Šis vitaminas turi potencinę citotoksišią poveikį vykstant oksidacijos – redukcijos reakcijoms, kurių pasekoje gaunama reaktyvios deguonies formos (ROS). Nors padidėjus ROS koncentracija laikoma atitinkamu vėžinių ląstelių mirties mechanizmu, tačiau gali būti nepakankamai efektyvus nužudyti vė-ines ląsteles dėl fenotipiniu adaptacijų. Nepasiant to, sujungus ROS generuojančius agentus su kitomis molekulėmis, kurios „atakuos“ tik dominančius ląstelės receptorių. Mitochondrijų sutrikimas susijęs su daugeliu monių ligų, įskaitant ir vėžį. Atrastas į mitochondrijas nukreiptas agentas – MitoK3 pav. 1.4 kuris buvo sukurtas sujungiant TPP katijona su menadiono C3 pozicija, kuri yra naftakvinono žiede, tai padidina selektyvų kaupimasi mitochondrijose, oksidacijos – redukcijos reakcijas bei atitinkamą biologinį rezultatą. MitoK3 sutrigdo mitochondriju bioenergetinį aparatą sutrigdydama ATP gamyba mitochondrijose, kas sukelia ląstelių žūtį [9].

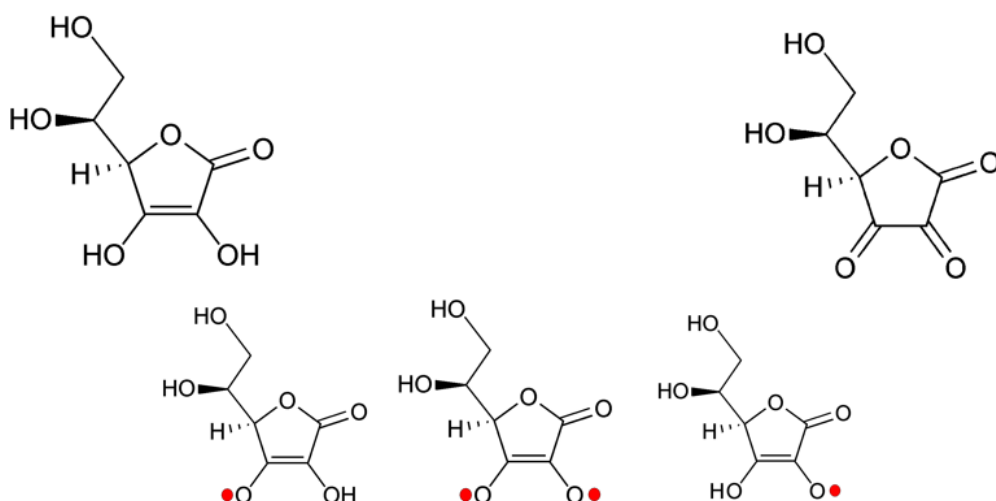


1.4 pav. Vitaminas K<sub>3</sub> ir į mitochondrijas nukreiptas agentas. Adaptuota pagal [9]

### 1.3 Vitamino C formos

Vitaminas C, taip pat gerai žinomas kaip askorbato rūgštis yra maiste, tokiuose kaip citrusiniai vaisiai randamas vitaminas. Yra teigiama, kad askorbatas mažina vėžio ir širdies ligų susirgimus. 1.5 pav. pavaizduotas vitaminas C, dvi askorbo formos (viršuje): redukuota forma (kairėje) ir oksiduota forma (dešinėje), šios formos yra stabilios ir trys joninės formos (apačioje) [11]. Mokslininkas Du ir kiti [12] aprašė pagrindinius aspektus, kuriais remiantis yra klasifikuojama vitamino C veikla: askorbatas kaip hidroksilazių, dioksigenazių enzymų kofaktorius, askorbatas kaip proantioksidantas vėžiniams susirgimams gydyti, askorbatas kaip protonų donoras, askorbatas kaip vandenilio peroksido generacijos valdiklis, askorbatas kaip antioksidantas surišantis laisvuosius radikalus.



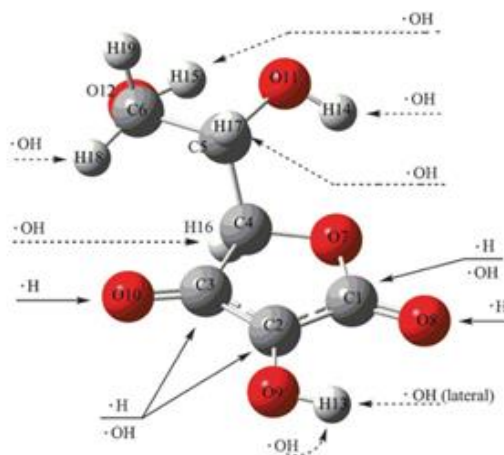


1.5 pav. Vitaminas C: dvi askorbo formos (viršuje) ir trys askorbilinės formos (apačioje) [11]

#### 1.4 Vitaminas C kaip protonų donoras

Mokslininkų grupė [13] nagrinėjo aniono laisvojo radikalo susiformavimą. Norint turėti geresnį supratimą apie antioksidacinę vitamino C elgesį, reakcijos tarp vitamino C (mono anioninė forma AAH(-) ir dviejų radikalų: vandenilio (•)H ir hidroksilo (•)OH buvo modeliuotos, panaudojant B3LYP, BH ir HLYP metodus, kartu naudojant atomų molekulinę teoriją ir energijos dekompozicijos analizę. Buvo tyrinėjamos tokios reakcijos: radikalų papildymai penkianariame žiede AAH(-) bei vandenilio abstrakcija kartu aprašant reakcijų profilius. Labiausiai tikėtinas aktyvusis centras, kuris gali būti atakuojamas reakcijos metu, buvo konstatuotas kaip C2 vieta AAH(-) molekulėje (žr. 6 pav.), kuri skiriasi nuo šios vietos lyginant su C3 vieta neutraliame Vitamine C. (•)OH radikalo prisijungimo reakcijos iš esmės yra difuzijos kontroliuojami procesai, kurie yra priešingi anksčiau suformuotai nuomonei. Naujas šaltinis, formuojantis pagrindiniam laisvajam anijono radikalui AAH(-) molekulėje ir (•)OH atakos procese. Laisvas anijono radikalas gali susiformuoti daugiausia iš H13 atėmimo reakcijų, įtraukiant dviejų tipų kartu veikiančius protonų – elektronų perdavimo mechanizmus.

Apskritai, laisvieji radikalai, atakuojantys AAH(-), gali būti klasifikuojami į du tipus: laisvojo radikalo papildymą ir H (vandenilio) abstrakciją. Galimos atakuojamos vietos H ir OH parodytos 1.6 pav.



1.6 pav. Laisvieji radikalai, atakuojantys askorbatą – galimos atakos vietos. Adaptuota pagal [13].

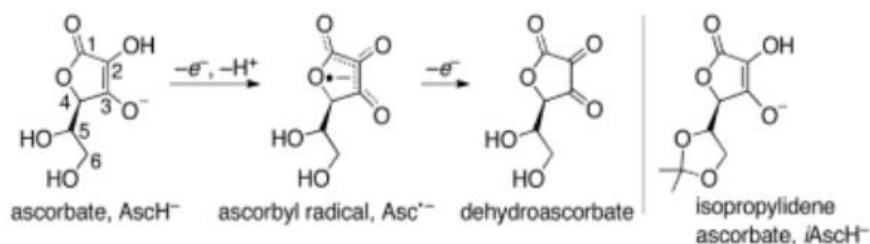
Pasitelkus kvantines teorijos metodą buvo naudojama tankio funkcionala teorija siekiant vandeninėje terpėje modeliuoti askorbo radikalo anijoną  $A^*$ . Buvo pastebėta, kad tarp dviejų deguonies atomų yra įsiterpęs nesuporuotas elektronas tiek tirpiklyje, tiek vakuume po atliktų sukinių tankio skaičiavimų. Apskaičiavus, kuria aplinkos kryptimi yra orientuota hidroksilo grupė, galima daryti prielaidą, kur bus atskirojo protono vieta [14].

Su vandeniu galintis sąveikauti anijono tipas tampa su vandeniu negalinčiu sąveikauti po oksidacijos proceso, tuomet kai vitamino C radikalo anijonas tampa nejonizuotu:  $A^* \rightarrow A$ . Redukcijos metu kuomet susiformuoja  $AH^-$ , kuris stiprina vandenilio ryšį su praradusį vandenilį deguonimi ir silpnina vandenilio ryšį su protoną turinčiu deguonies atomu.

Su vandeniu galintis sąveikauti anijono tipas tampa su vandeniu negalinčiu sąveikauti po oksidacijos proceso, tuomet kai vitamino C radikalo anijonas tampa nejonizuotu:  $A^* \rightarrow A$ . Redukcijos metu kuomet susiformuoja  $AH^-$ , kuris stiprina vandenilio ryšį su praradusį vandenilį deguonimi ir silpnina vandenilio ryšį su protoną turinčiu deguonies atomu.

Warren ir kiti [15] tyrinėjo askorbato kaip visur esančio biologinio kofaktoriaus vandeninių tirpalų chemiją. Labiausiai dominančios buvo daugelis *in vivo* reakcijų, kai askorbatas yra fermentų aktyviajame centre ar ant membranos sąsajos – tokiais atvejais šalia esančios aplinkos įtaka per solvatacijos vyksmus yra dominuojanti. Oksiduojant du askorbato darinius TEMPO radikalais (2,2'-6,6'-tetramethylpiperidine-1-oxyl), esančiais acetonitrile, gauta, kad reakcijos greitis ir oksidacijos varomoji jėga (angl. *driving force*) yra labai jautrūs įvairiems joniniams priedams. Šios reakcijos gali vykti tik per protono ir elektrono pernašą (vandenilio atomas), kaip ir tipinės biologinės askorbato reakcijos (1.7 pav.). Matuojama normalinė ir pusiausvyros konstanta gali kisti iš esmės, pridėdant vandens ar kito polinio tirpinto į acetonitrilo tirpalą. Pasiskirstymo rodiklis ir pusiausvyros

konstanta parodo, kad šis efektas yra termocheminės kilmės, o ne kinetinio efekto pasekmė (kaip būtų galima tikėtis iš solvatacijos).



1.7 pav. Dehidroaskorbato susiformavimas. Adaptuota pagal [15].

Blumberger ir kiti [16] aprašo *ab-initio* molekulinės dinamikos metodą elektrono pernašos modeliavimui. Allen ir kiti [17] pateikia askorbo rūgšties molekulių – neutralių ir kelių joninių tautomerinių rūšių – geometrijos analizę tankio funkcionalo B3LYP metodu. Radikalų sekos analizuojamos, naudojant atvirų sluoksnių (unrestricted) B3LYP metodą. Vieno taško energijos skaičiavimai buvo taip pat atlikti naudojant Møller–Plesset (MP2) ir atvirų sluoksnių (unrestricted) MP2 (UMP2) metodus, atitinkamai uždaro ir atviro tipo sistemoms. Vandeninio tirpalo poveikis įvertintas CPCM ir PCM metodais, naudojant 6-311++G(d,p) bazę.

## 1.5 TERPĖS ĮTAKA

Markus ir kiti [18] išvystė elektrono pernašos reakcijos eigą, kurios vienas iš pritaikymo būdų yratyrinėti sužadavimo eigą metalų kompleksų tirpaluose. Ypač didelis pritaikomumas yra biologinėse sistemose, kadangi maži reakcijos barjerai (iki bebarjerinio lygio) ir fiksuotos reagentų - reaktantų padėtys erdvėje (ląstelinė, tarpląstelinė, mitochondrinė, ribosominė) leidžia vykti trumpo nuotolio elektronų apsikeitimo vyksmams ir jų sukeliams tolimesnėms reakcijoms.

Allen ir kiti [19] nagrinėjo askorbo rūgšties (vitamino C) anijonų su skirtingų metalų katijonais - tokiais kaip  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ir  $\text{Ca}^{2+}$  *in aqua* struktūras ir ryšius tarp skirtingų galimų klasterių. Modeliavimai atlikti pasitelkus tankio funkcionalo teorijos B3LYP metodą, naudojant 6-311++G(d,p) bazę. Pastebėta, kad skirtingi metalo jonai jungiasi prie skirtingų askorbato vietų. Vieno taško energijos skaičiavimai buvo atlikti naudojant MP2/6-311++G(d,p) metodą. Tomasi poliarizuoto kontinumo modelis (angl. PCM) naudojamas norint įvertinti kokia yra vandeninės terpės įtaką įvairių kompleksų stabilumui. Šio uždavinio tikslas yra charakterizuoti elektronų tankio pasiskirstymą pridėdant suderinamumą tarp metalo katijonų ir vitamino C molekulės. Gauti duomenys rodo, kad askorbo rūgšties ir metalo jono ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  ir  $\text{K}^+$ ) komplekso *in aqua* geometrija, kuomet metalo jonas atsiduria tinkamiausioje pozicijoje su katijonais per dvigubą jungtį (=) ties O2 ir O3 atomais  $\text{AAO}_3^-$  anijone. Tačiau divalenčiams katijonams  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ir  $\text{Ca}^{2+}$

yra fiksuojamos kitos pozicijos askorbo rūgšties molekulėje: jos yra ties O1 ir O2 atomais  $AAO_2^-$  askorbo rūgšties anijone.

## 1.6 VITAMINO C CITOTOKSIŠKUMAS

Chen ir kiti [20, 21] tyrinėjo vitamin C citotoksinį poveikį skirtingomis koncentracijomis, neviršijant nustatytos rekomenduojamos paros normos. Jis nagrinėtas dėl to, kad vitamino C šalutinis produktas HOOH tik selektyviai naikina kai kurias vėžines ląsteles nepaveigdamas sveikų organizmo ląstelių. Manoma, kad farmakologinis askorbato kaip vaisto pirmtakas atsiranda formuojantis askorbato radikalui ir vandenilio peroksidui (HOOH) tarpląsteliniam skystyje, kadangi kraujyje aptinkamas kiekis labai mažas. Atlikus tyrimus *in vivo* su žiurkėmis (davus askorbato parentaliniu ar per burną būdu kaip tipinę žmogaus rekomenduojamą dozę - vidutiniškai 0.25-0.5 mg vienam gramui kūno svorio), vitamino C bendra koncentracija kraujyje ir tarpląsteliniam skystyje pasikeičia atitinkamai nuo 50-100  $\mu\text{M}$  iki  $>8 \text{ mM}$ . Tos pačios dozės išskiria askorbato  $<150 \mu\text{M}$  koncentracijos abiejuose skysčiuose. 1.8 pav. pateiktos HOOH susidarymo reakcijos [20].

Gilloteaux ir kiti [22, 23] pabrėžė vitamino C svarbą: askorbato pavidalu jis kaupiamas vėžio ląstelėse ir metabolizuojamas kaip askorbato druska. Tačiau sukauptas ląstelės viduje vitaminas C gali būti oksiduojamas (vieno ar dviejų elektronų perdavimo reakcija) ir gali būti konvertuojamas atgal į askorbatą – NADH tipo semi-hidroaskorbato reduktazės veikla.

Uetaki ir kiti [24] teigia, kad didelis vitamino C kiekis sukelia prooksidacinį poveikį ir selektyviai žudo vėžines ląsteles. Analizuojama vitamino C sukelti medžiagų apykaitos pokyčiai MCF7 žmogaus krūties adenokarcinomos ir HT29 žmogaus gaubtinės žarnos vėžio ląstelėse. Abiejų ląstelių linijų metaboliniai profiliai žymiai pasikeičia: padidėjęs metabolitų kiekis glikolizės ir trikarboksilinės rūgšties ciklo metu. Kai tuo tarpu ATP lygis mažėja didinant vitamino C koncentraciją.

Gauti duomenys duomenys rodo, kad vitaminas C slopino energijos metabolizmą per NAD išsikvojimą, taip sukeldamas vėžiinių ląstelių mirtį

## 1.6 VITAMINŲ C IR K<sub>3</sub> KOMPLEKSAS

Vitamino C (askorbato) ir K3 (menadiono) reakcijos lygtys (1.1..1.5) atspindi pilną reakcijos eigą, kaip kad buvo suformuota Davis Lamson 2010 metų modelyje [25]. Askorbatas reaguoja su vitaminu K3, susidaro askorbilo jonas (praradęs protoną) ir vitaminas K3 (semidiono radikalas), praradęs protoną bei prisijungęs papildomą joną. Susidaręs semidiono radikalas reaguoja su deguonimi ir susidaro menadionas bei superoksido radikalo anijonas.

Askorbatas + E → Askorbatas <sup>-</sup>	1.1
Askorbatas <sup>-</sup> + menadionas → →Askorbilas• + (menadiono radikalo anijonas) • <sup>-</sup>	1.2
(menadiono radikalo anijonas) • <sup>-</sup> + O <sub>2</sub> → → menadionas + (superoksido radikalo anijonas)•	1.3
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> H <sup>+</sup> → HO-O• (hidroperoksil radikalas)	1.4
HO-O• + e → HO-O <sup>-</sup>	1.5
HO-O <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> → HO-OH (vandenilio peroksidas)	1.6

Vitaminų C ir K3 terapinis antivėžinis poveikis žinomas jau seniai, tačiau veikimo mechanizmas iki šiol yra diskusijų objektas. Kokiu būdu molekulinis askorbatas tampa jonizuotu ir kaip prasideda semidiono radikalo aniono produkto formavimas – šie klausimai nagrinėti ankstesniame darbe. Gruodis ir kiti [26] iškėlė idėją, kad tarpmolekulinis krūvio pernašos mechanizmas valdo reakcijos pradžią (1.1–1.2 lygtis). Šis modelis pirmuoju artiniu buvo suformuotas, neatsižvelgus į aplinkos solvatacinę įtaką.

Gilloteaux ir kiti [27] aprašė vitamino C (VC), vitamino K3 (VK3) arba VC citotoksinį poveikį karcinomos ląstelių linijai (T24) ir tolesnę gydymo eigą. Pirmiausia buvo aptikti karcinomos ląstelių membranų defektai. Didesni membranų defektai buvo stebėti, veikiant mišiniu, negu atskirai vitaminu C. Tokių ląstelių mirtis (apoptozė) vyksta per sukeltą oksidacinę stresą.

## 2. METODIKA

### 2.1 Medžiagos ir priemonės ląstelių kultivavimui

1. Tyrimams buvo naudojama pelės kepenų karcinomos MH-22A ląstelių linija. Naudojama moksliniuose tyrimuose, kaip pelės bei žmogaus karcinomos modelis. Šios ląstelės naudojamos tiek *in vitro* tyrimams, tiek gali būti skiepijama singeninėms C3HA linijos pelėms *in vivo*, kur suformuoja navikus
2. Ląstelių linijos palaikymui buvo naudota ląstelių auginimo terpė, paruošta iš: Dulbecco's modifikuotos Eagle's terpės - DMEM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija), papildytos 10 % embrioninio jaučio serumo - FBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) ir 1 % L – Glutamino tirpalo (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).
3. Tyrimams buvo naudojama pelės kepenų karcinomos MH-22A ląstelių linija. Naudojama moksliniuose tyrimuose, kaip pelės bei žmogaus karcinomos modelis. Šios ląstelės naudojamos tiek *in vitro* tyrimams, tiek gali būti skiepijama singeninėms C3HA linijos pelėms *in vivo*, kur suformuoja navikus.
4. Ląstelių auginimui Petri lėkštelėse buvo naudota ląstelių auginimo terpė, papildomai papildyta 100 U/ml penicilino ir 100 µl streptomicino antibiotikų (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).
5. Ląstelių monosluoksnio pakėlimui nuo flakonėlio dugno buvo naudojamas 0,25 % tripsino-0,02 % EDTA tirpalas (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).
6. Ląstelių skaičiaus tirpale nustatymui naudotas tripano mėlio dažų tirpalas 0,4 % (Sigma-Aldrich co Ltd., Irvine, UK).
7. Vitamino citotoksiškumui nustatyti buvo naudojamas vitamino K<sub>3</sub> tirpalas pagamintas iš menadiono natrio bisulfato miltelių 95 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) ir ląstelių auginimo terpės su antibiotikais. Vitamino K<sub>3</sub> tyrimai buvo atliekami su šiomis koncentracijomis ilgos inkubacijos metu: 0,04, 0,02, 0,01, 0,004, 0,001 ir 0,0004 mM. Trumpos inkubacijos su vitaminu K<sub>3</sub> metu buvo naudojamos šios koncentracijos: 0,6, 0,5, 0,4, 0,1, 0,04, 0,02 ir 0,01 mM.
8. Ląstelėms fiksuoti buvo naudojamas 96 proc. etanolis (AB Stumbras, Kaunas, Lietuva).

9. Ląstelių kolonijų dažymui naudotas Gram kristalo violeto tirpalas (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Vokietija).
10. Ląstelės buvo auginamos 25 cm<sup>2</sup> paviršiaus ploto flakonėliuose (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Vokietija).
11. Ląstelių išsėjimui buvo naudojamos 9,2 cm<sup>2</sup> Petri lėkštelės (Greiner Bio-One GmbH).
12. Eksperimentas buvo atliekamas steriliose sąlygose vertikalaus srauto laminare Aura Vertical S.D.4, (BIOAIR Instruments, Siciano, Italija).
13. Išsodintos ląstelės buvo auginamos inkubatoriuje su vandens marškinėliais IR AutoFlow Water-Jacketed Incubator NU- 2500E (NuAire, Inc., Plymouth, JAV).
14. Ląstelių nusodinimui buvo naudota centrifuga OPN-3YXL4 (Rusija), centrifuguojama 2 min 10000 aps./min greičiu.
15. Ląstelių skaičiaus tirpale apskaičiavimui buvo naudojamas Neubauerio hemocitometras (Neubauer improved, Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburgas, Vokietija).
16. Ląstelių kolonijoms skaičiuoti naudotas binokuliarinis stereo mikroskopas MBS-9 (rus. *MBC-9*) (Rusija).
17. Flakonėliui su užaugintomis ląstelėmis apžiūrėti, bei ląstelėms skaičiuoti hemocitometro kameroje naudotas invertuotas mikroskopas Eclipse TS 2 LED (Nikon, Tokijas, Japonija).

## 2.2 Ląstelių vitališkumo matavimai

Buvo augintos pelių kepenų karcinomos ląstelės (MH-22A linija), visą savaitę kartu su maitinamuoju tirpalu maitinant vitaminu C, vitaminu K3 ir vitaminų C ir K3 mišiniu.

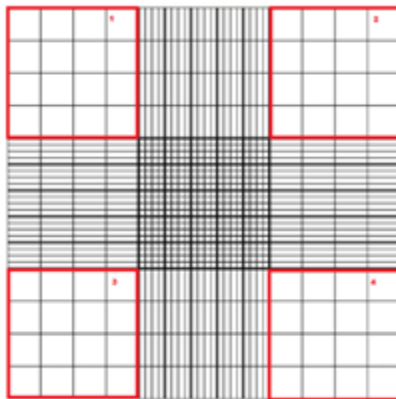
**Ląstelių kolonijų fiksavimas ir dažymas.** Užaugusios Petri lėkštelėse ląstelių kolonijos po 7 parų auginimo buvo fiksuojamos. Nuo Petri lėkštelių buvo nupilta terpė. Į lėkštelės įpilama 96 proc. etanolio tirpalo. Po 20 min etanolis nupilamas, o lėkštelės perplaunamos šaltu pratekančiu vandeniu. Ląstelės nudažomos *Gram-crystal-violet* tirpalu. Dažalas po 1 min nupilamas, o lėkštelės perplaunamos šaltu pratekančiu vandeniu ir išdžiovinamos.

**Ląstelių koncentracijos nustatymas** Tyrimui buvo reikalinga ląstelių suspensijos koncentracija - 1 milijonas mililitre. Po persėjimo metu gauto tirpalo su ląstelėmis, buvo paimta 10  $\mu$ l ląstelių suspensijos, ji buvo išmaišoma su 90  $\mu$ l tripano mėlynojo dažais. Vėliau ląstelės buvo

užlašintos ant Neubauerio hemocitometro ir suskaičiuotos, kaip parodyta 2.1 pav. Hemocitometro kameros keturiuose kampiniuose laukeliuose (apvesti langeliai) buvo suskaičiuotas ląstelių kiekis ir išvestas vidurkis. Pradinė ląstelių koncentracija  $C$  buvo nustatyta pagal formulę:

$$C = A * 10^4 * B, \quad 2.1$$

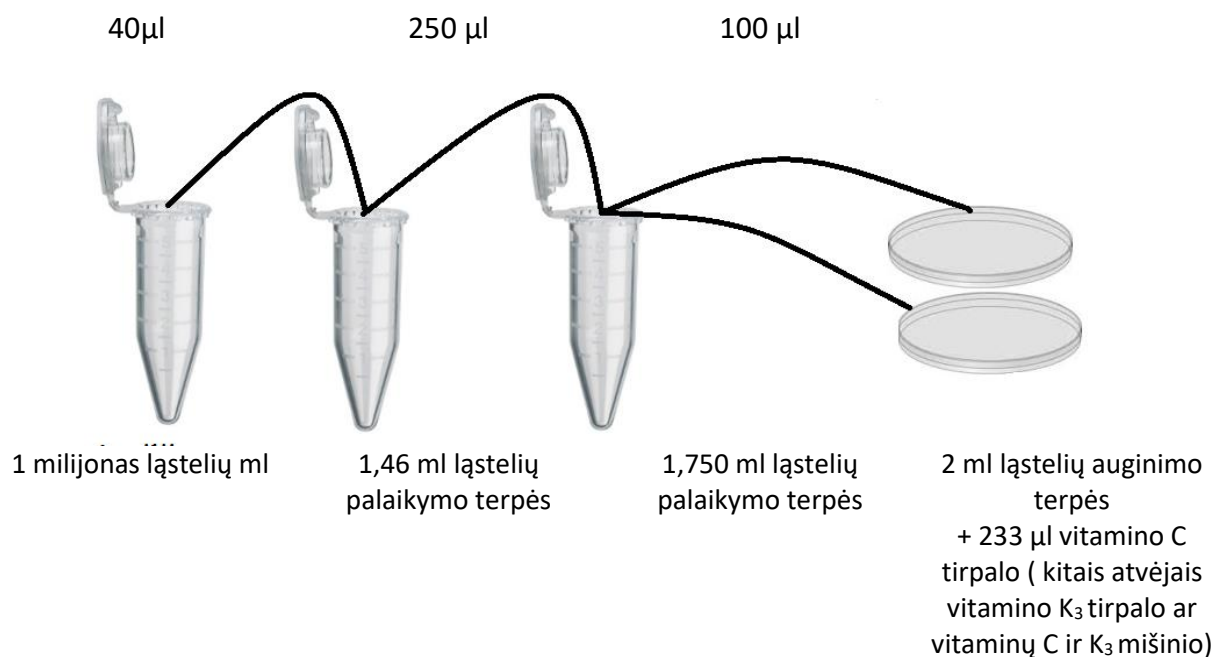
čia  $A$  – ląstelių vidurkis,  $B$  – praskiedimų skaičius ( šiuo atveju 10).



2.1 pav. Hemocitometro kamera, kurioje skaičiuojamos ląstelės (apvesti langeliai)

**Vitaminų citotoksiškumo nustatymas.** Vitaminų  $C$ ,  $K_3$  ir jų mišinio citotoksiškumas buvo nustatomas ląstelių kolonijų formavimosi analizės būdu. Tai analizės metodas skirtas nustatyti ląstelių gyvybingumą *in vitro*. Šis metodas paremtas vienos ląstelės gebėjimu dalintis ir suformuoti koloniją. 2.1 pav. pateikta ląstelių išsėjimo schema. Į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlį, kuriame yra 1 milijonas ląstelių ml, paimama 40  $\mu$ l ir įdedama į antrąjį mėgintuvėlį, kuriame yra 1,46 ml ląstelių palaikymo terpės. Tuomet iš antro mėgintuvėlio paimama 250  $\mu$ l ir įdedama į trečiąjį mėgintuvėlį, kuriame yra 1,750 ml ląstelių palaikymo terpės. Iš trečiojo mėgintuvėlio paimama po 100  $\mu$ l ir išsėjama į dvi skirtingas *Petri* lėkšteles. Į kontrolines lėkšteles įdedama 233  $\mu$ l ląstelių palaikymo terpės, o į kitas 233  $\mu$ l vitamino  $C$  arba  $K_3$  arba  $C$  ir  $K_3$  mišinio.





2.2 pav. Ląstelių išsėjimo schema.

**Ląstelių gyvybingumo ir paklaidų nustatymas.** Gyvybingų ląstelių dalis (GLDL) buvo skaičiuojama pagal formulę:

$$GLD = \frac{A}{B} * 100\% \quad 2.2$$

čia A - ląstelių kolonijų skaičiaus vidurkis kiekvienai vitamino K<sub>3</sub> koncentracijai, B - nepaveiktų vitaminu K<sub>3</sub>, (kontrolinių) ląstelių kolonijų skaičiaus vidurkis. Standartinis nuokrypis buvo apskaičiuotas pagal formulę:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - x_{vid.})^2}{(n-1)}} \quad 2.3$$

Čia **x** - ląstelių kolonijų skaičius, gautas vieno tyrimo metu; **x vid.** - trijų tyrimų ląstelių kolonijų skaičiaus vidurkis; **n** - imties vidurkis.

### 2.3 Vandensilio peroksido matavimas Amplex<sup>®</sup> Red pagalba

Naudojamas Amplex<sup>®</sup> Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (A22188, Invitrogen, Molecular Probes, USA). Pasiruošiamas Amplex Red (AR) dažas: 154 µg Amplex<sup>®</sup> Red (10-acetil-3,7-dihidroksifenoksazinas) sumaišomas su 1 ml dimetilsulfoksido ir išdalinamas į porcijas po 26 µl, kurios bus laikomos šaldymo kameroje (-20 °C) ir bus išimamos maždaug pusvalandis prieš bandymą, kad atšiltų. Taip pat, pasiruošiama krienų peroksidazė (angl. *Horseradish peroxidase* (HRP): paimama 3 mg peroksidazės (3 U), skiedžiama su 1 ml distiliuoto vandens ir išdalinama po

10 µl porcijas, kurios taip pat bus laikomos šaldymo kameroje iki eksperimento. Kameroje laikoma dėl, to, kad dažas yra jautrus šviesai ir oro aplinkai, dėl to dažą reikia naudoti tą pačią dieną.

Toliau paruošiamas darbinis AR tirpalas:

1. Paimama viena porcija AR ir į 26 µl įpilame 26 µl naudojamos terpės;
2. Paimama viena porcija HRP ir į 10 µl įpilame 490µl naudojamos terpės;
3. Iš paruošto AR paimama 50 µl ir įpylima į atskirą mėgintuvėlį;
4. Į tą patį mėgintuvėlį įpylama 100 µl HRP tirpalo ir dar pridedama 4,85 ml naudojamos terpės. Gauname 3 µM koncentracijos Amplex<sup>®</sup> Red tirpalą.

### **Kalibracinės kreivės paruošimas:**

Paruošiami įvairių koncentracijų H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tirpalai. Ruošiama iš 3 % vandenilio peroksido, kurio koncentracija 20 mM (Valentis UAB, Lietuva) (lentelė 3).

Paruošti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tirpalai supilstomi po 50 µl į mikroplokštelės (CLS3615, Sigma-Aldrich, Corning®, Europe) šulinėlius ir ant jų užpilama po 50 µl darbinio AR tirpalo. Ir matuojama fluorescencija su spektrofluorimetru (Tecan Group, Mannedorf, Switzerland). Buvo nustatyti toki parametrai: bangos ilgis Ex/Em 535/590, Gain – 25, shaking 10 s. Iš gautų rezultatų sudaroma kalibracinė kreivė.

**Lentelė 1.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tirpalų paruošimas.

Nr.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Koncentracija	Paruošimas
V0	20 mM	Pradinis tirpalas
V1	10 mM	Paimama 500 µl iš V0 ir skiedžiama 500 µl PBS (fosfatinis buferis) arba H <sub>2</sub> O (kai kalibracinė ruošiama SMEM, RPMI terpėms)
V2	1 mM	100 µl iš V1 + 900 µl PBS arba H <sub>2</sub> O
V3	200 µM	100 µl iš V2 + 400 µl PBS arba H <sub>2</sub> O
V4	100 µM	200 µl iš V3 + 200 µl PBS arba H <sub>2</sub> O
V5	50 µM	200 µl iš V4 + 200 µl PBS arba H <sub>2</sub> O
V6	20 µM	100 µl iš V3 + 900 µl PBS arba H <sub>2</sub> O
V7	10 µM	500 µl iš V6 + 500 µl PBS arba H <sub>2</sub> O
Kontrolė	0	Fiziologinis tirpalas arba H <sub>2</sub> O

**Lentelė 2.** VitC/vitK<sub>3</sub> tirpalų koncentracijos naudojamos eksperimente.

Vitaminas C	Vitaminas K <sub>3</sub>
1 μM	0.01 μM
10 μM	0.1 μM
100 μM	1 μM
200 μM	2 μM
400 μM	4 μM
1 mM	10 μM
2 mM	20 μM
Kontrolė (terpė)	Kontrolė (terpė)

Naudojamos PBS (Produkto nr. P5493-1L, Sigma, USA), SMEM (Produkto nr. M8167, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija) terpės ir RPMI (Produkto nr. R0883, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija).

1. Paruošiamas darbinis AR tirpalas.
2. Tada ruošiami atitinkamų koncentracijų vitamino C ir vitamino K<sub>3</sub> tirpalai.
3. Tada į mikroplokštelę supilstomi paruošti vitamino C ir vitamino K<sub>3</sub> tirpalai:
  - a. 25 μl vitC ir 25 μl vitK<sub>3</sub> ir 50 μl darbinio AR tirpalo, daroma trys pakartojimai
  - b. 25 μl vitC ir 25 μl terpės (PBS) ir 50 μl darbinio AR tirpalo, daroma trys pakartojimai
  - c. arba 25 μ vitK<sub>3</sub> ir 25 μl terpės (PBS) ir 50 μl darbinio AR tirpalo, daroma trys pakartojimai
4. Matuojama fluorescencija su spektrofluorimetru (Tecan Group, Mannedorf, Switzerland).  
Buvo nustatyti toki parametrai: bangos ilgis Ex/Em 535/590, Gain – 25, shaking 10 s.

**Vitamino C tirpalų paruošimas:**

Naudotas vitaminas C buvo 5 % (procentai) askorbo rūgšties 50 mg/ml sterilus injekcinis tirpalas (Sanitas, Kaunas, Lietuva). Ampulėje yra 2 ml 283,9 mM koncentracijos askorbo rūgšties. Tirpalas skiedžiamas naudojama terpe (Lentelė 3).

**Lentelė 3.** Vitamino C įvairių koncentracijų tirpalų paruošimas

Nr.	Koncentracija mėgintuvėlyje	Paruošimas	Reali koncentracija
V0		Ampolė pradinis tirpalas	283900 $\mu\text{M}$
V1	2000 $\mu\text{M}$	Paimama 105,67 $\mu\text{l}$ iš V0 ir užpilama 1394 $\mu\text{l}$ naudojamos terpės	20000 $\mu\text{M}$
V2	1000 $\mu\text{M}$	52,83 $\mu\text{l}$ iš V0 + 1447 $\mu\text{l}$	10000 $\mu\text{M}$
V3	600 $\mu\text{M}$	31,7 $\mu\text{l}$ iš V0 + 1468,3 $\mu\text{l}$	6000 $\mu\text{M}$
V4	400 $\mu\text{M}$	21,1 $\mu\text{l}$ iš V0 + 1478,9 $\mu\text{l}$	4000 $\mu\text{M}$
V5	200 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{l}$ iš V3 + 1000 $\mu\text{l}$	2000 $\mu\text{M}$
V6	100 $\mu\text{M}$	375 $\mu\text{l}$ iš V4 + 1125 $\mu\text{l}$	1000 $\mu\text{M}$
V7	10 $\mu\text{M}$		100 $\mu\text{M}$
V8	1		10 $\mu\text{M}$

**Vitamino K<sub>3</sub> tirpalų paruošimas:**

Atsisverti 0,1 g vitamino K<sub>3</sub> (Menadion sodium bisulfatas; M5750, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Vokietija). Jis ištirpinamas 1 ml naudojamos terpės (gaunasi 361,48 mM koncentracija). Toliau daromi skiedimai gauti reikiamas koncentracijas (Lentelė 4).

**Lentelė 4.** Vitamino K<sub>3</sub> įvairių koncentracijų tirpalų paruošimas.

Nr.	Koncentracija mėgintuvėlyje	Paruošimas	Reali koncentracija
V0		0,1 g VitK <sub>3</sub> + 1ml naudojamos terpės	361,48 mM
V1		276,6 $\mu\text{l}$ iš V0 + 1723,4 $\mu\text{l}$ naudojamos terpės	50 mM
V2		40 $\mu\text{l}$ iš V1 + 1960 $\mu\text{l}$ naudojamos terpės	1 mM
V3	20 $\mu\text{M}$	400 $\mu\text{l}$ iš V2 + 1600 $\mu\text{l}$ naudojamos terpės	200 $\mu\text{M}$
V4	10 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{l}$ iš V2 + 1800 $\mu\text{l}$ naudojamos terpės	100 $\mu\text{M}$
V5	4 $\mu\text{M}$	80 $\mu\text{l}$ iš V2 + 1920 $\mu\text{l}$ naudojamos terpės	40 $\mu\text{M}$
V6	2 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{l}$ iš V3 + 1800 $\mu\text{l}$ naudojamos terpės	20 $\mu\text{M}$
V7	1 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{l}$ iš V4 + 1800 $\mu\text{l}$ naudojamos terpės	10 $\mu\text{M}$
V8	0,1 $\mu\text{M}$		1 $\mu\text{M}$
V9	0,01 $\mu\text{M}$		0,1 $\mu\text{M}$

## 2.4. Skaičiavimo metodai

Kompiuterinė chemija (arba kvantinė molekulių teorija) yra cheminės fizikos kryptis, kur Šredingerio lygties pagalba sprendžiamos problemos, susijusios su medžiagų molekulinės struktūros geometrijos, pagrindinės ir sužadintųjų elektroninių bei virpesinių būsenų energetikos, konformerizmo ir tautomerizmo pasireiškimu įvairiose terpėse. Nors skaičiavimo rezultatai paprastai papildo informaciją, gautą cheminiais eksperimentais, kai kuriais atvejais galima numatyti ir iki šiol nepastebėtus cheminius reiškinius. Kompiuterinės chemijos metodas yra plačiai naudojamas kuriant naujus vaistus ir medžiagas. Tokių savybių pavyzdžiai yra struktūra ( numatomos sudedamųjų atomų pozicijos), absoliučiosios ir santykinės (sąveikos) energijos, elektroniniai krūvio paskirstymai, dipoliai ir didesni daugiapoliai momentai, virpesiniai dažniai, reaktyvumas arba kiti spektroskopiniai matavimai [28].

Naudojami metodai apima ir statines, ir dinamines situacijas. Tiriamoji arba simuliuojamoji molekulinė sistema gali būti viena molekulė, molekulių grupė, klasteris, želė arba kieta medžiaga. Rezultatai, gauti kompiuterinės chemijos metodais, savo tikslumu svyruoja nuo labai apytikslių iki labai tikslių; pastarieji paprastai yra įmanomos tik mažoms sistemoms. *Ab initio* metodai yra visiškai pagrįsti kvantine mechanika ir pagrindinėmis fizinėmis konstantomis. Kiti metodai vadinami empiriniais ar pusempiriais, nes jie naudoja papildomus empirinius parametrus [29].

Šiame darbe skaičiavimai buvo atlikti kvantinės molekulių teorijos metodais, naudojantis GAUSSIAN-16 paketu [30]. Pagrindinės elektroninės būsenos komplekso geometrijos optimizacija buvo atlikta tankio funkcionalo B3LYP metodu, panaudojus 6-31+G(d) bazę (įskaičius difuzines funkcijas sunkiesiems atomams ir poliarizacines d funkcijas). Skaičiavimai buvo atlikti, įskaitant solvatacinius efektus poliarizuoto kontinuumo PCM metodu (tirpiklis HOH). Optimizuotos geometrijos (t. y., tokios geometrijos, kai komplekso energija mažiausia) struktūroms buvo suskaičiuoti elektroninio sužadavimo spektrai. Elektroninės singuletinės sugerties spektras buvo skaičiuotas TD metodu [31].

### 3. REZULTATAI

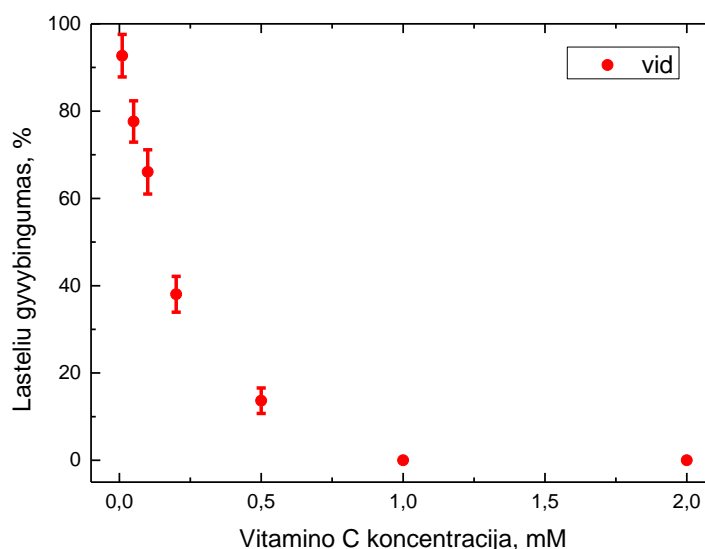
#### 3.1 LAŠTELIŲ GYVYBINGUMO DINAMIKOS REZULTATAI

Ląstelių gyvybingumo tyrimai buvo atlikti su pelės karcinomos ląstelių linija (MH–22A). Šios ląstelės pasirinktos dėl didelio panašumo su žmogaus karcinomos ląstelėmis, greitu ląstelių dalijimusi. Bandymai atlikti su vitaminu K<sub>3</sub>, vitaminu C bei jų kompleksu C.. K<sub>3</sub>,

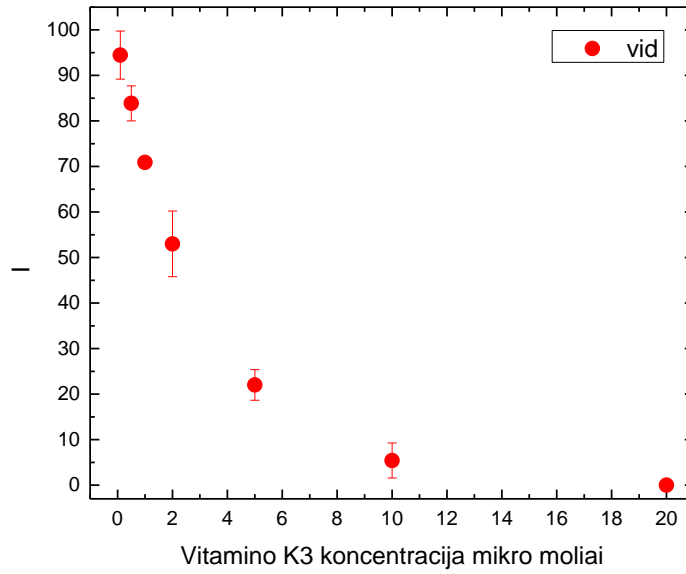
3.1 pav. pateikiama procentinė ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo skirtingų vitamino C koncentracijų. Grafike matomas ląstelių gyvybingumo mažėjimas didėjant vitamino C koncentracijai. Daroma išvada, kad vitaminas C turi citotoksinį poveikį MH–22A vėžinėms ląstelėms.

3.2 pav. pateikiama procentinė ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo skirtingų vitamino K<sub>3</sub> koncentracijų. Grafike matomas ląstelių gyvybingumo mažėjimas didėjant vitamino K<sub>3</sub> koncentracijai. Daroma išvada, kad vitaminas K<sub>3</sub> turi citotoksinį poveikį MH–22A vėžinėms ląstelėms. Naudotos vitamino K<sub>3</sub> koncentracijos yra 100 kartų mažesnės nei vitamino C, nes žmogaus organizmui didesnės koncentracijos būtų toksiškos [32].

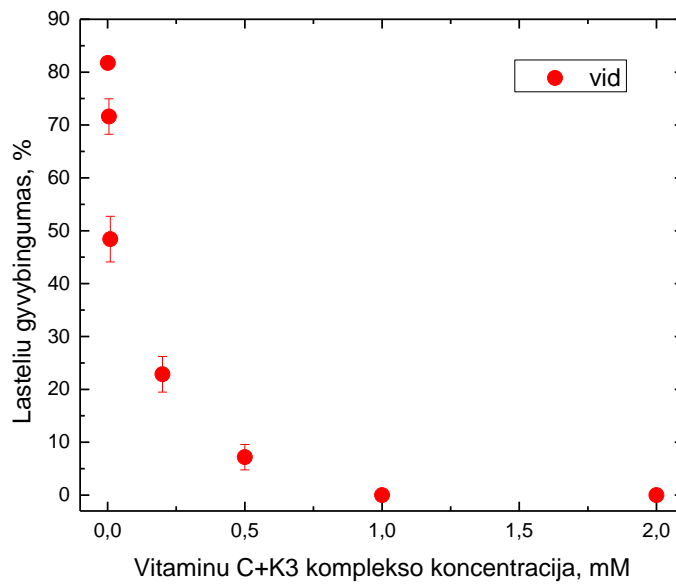
3.3 pav. pateikiama MH-22A linijos ląstelių gyvybingumo (%) priklausomybė nuo vitamino C ir K<sub>3</sub> koncentracijos.



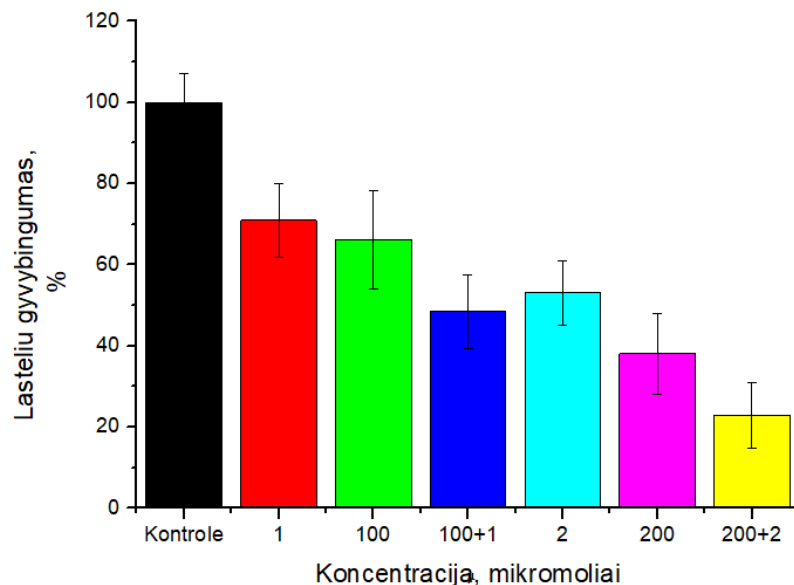
3.1 pav. MH-22A linijos ląstelių gyvybingumo (%) priklausomybė nuo vitamino C koncentracijos.



3.2 pav. MH-22A linijos ląstelių gyvybingumo (%) priklausomybė nuo vitamino K3 koncentracijos.



3.3 pav. MH-22A linijos ląstelių gyvybingumo (%) priklausomybė nuo vitamino C ir K3 koncentracijos.



3.4 pav. MH-22A linijos ląstelių gyvybingumo (%) priklausomybės nuo vitaminų C ir K<sub>3</sub> koncentracijos (apjungti 2.3, 2.4, 2.5 pav. duomenys)

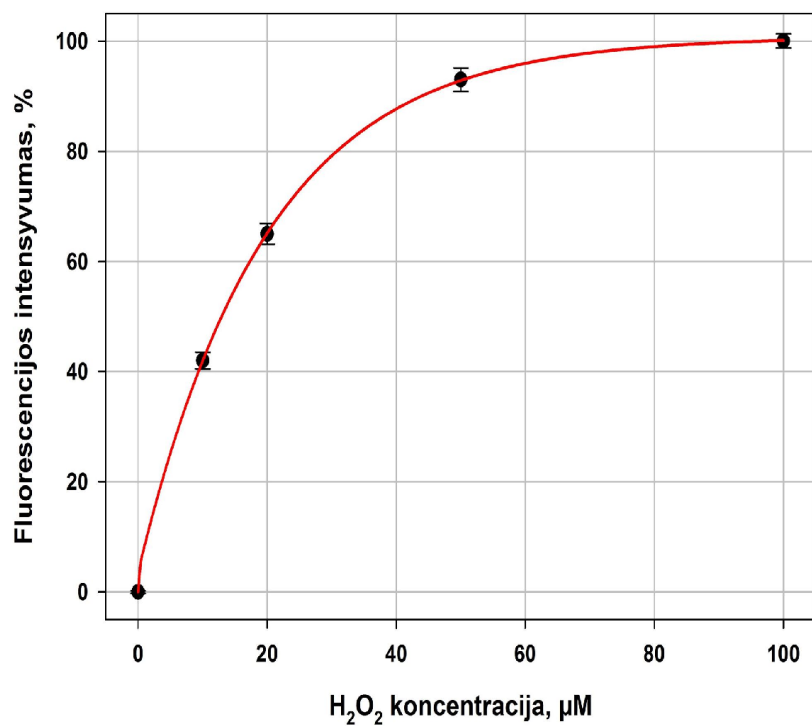
3.4 pav. pateikiama 3.4 pav. MH-22A linijos ląstelių gyvybingumo (%) priklausomybės nuo vitaminų C ir K<sub>3</sub> koncentracijos (apjungti 2.3, 2.4, 2.5 pav. duomenys). Kaip matome iš grafikų vitamino C ir K<sub>3</sub> kompleksas turi didžiausią citotoksinį poveikį. Palyginimui esant vitamino C 100 mM, sunaikinama 30 %, vitamino K<sub>3</sub> 1 μM, sunaikinama apie 26 %, o esant jų kompleksui – 50 % ląstelių. Šie duomenys įrodo, kad vitaminas K<sub>3</sub> sustiprina vitamino C poveikį vėžinėms ląstelėms.

### 3.2 VANDENILIO PEROKSIDO GENERAVIMO VERTINIMAS

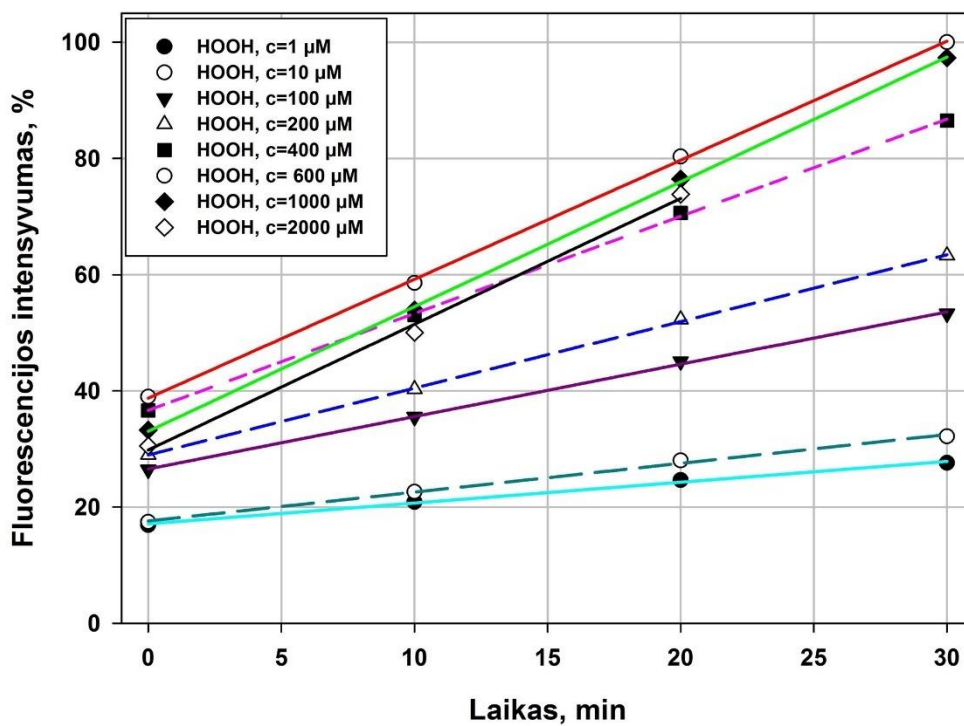
3.5 pav. pavaizduota vandenilio peroksido kalibracinė kreivė. Vandenilio peroksidas, sureagavęs su *Amplex Red* dažais, fluorescuoja. Kaip matome iš grafiko, didėjant vandenilio peroksido koncentracijai, fluorescencijos intensyvumas didėja.

3.6 pav. pavaizduota vitamino C sugeneruoto vandenilio peroksido kinetinė priklausomybė nuo laiko esant skirtingoms koncentracijoms. Bėgant laikui vandenilio koncentracija didėja, tačiau matoma kai vitamino C koncentracija 600 μM yra pasiekiamas 100 % fluorescencijos intensyvumas (raudona kreivė) ir kai vitamino koncentracija didinama matomas mažesnis fluorescencijos intensyvumas dėl askorbato įsotėjimo (atitinkamai žalia ir juoda kreivės).



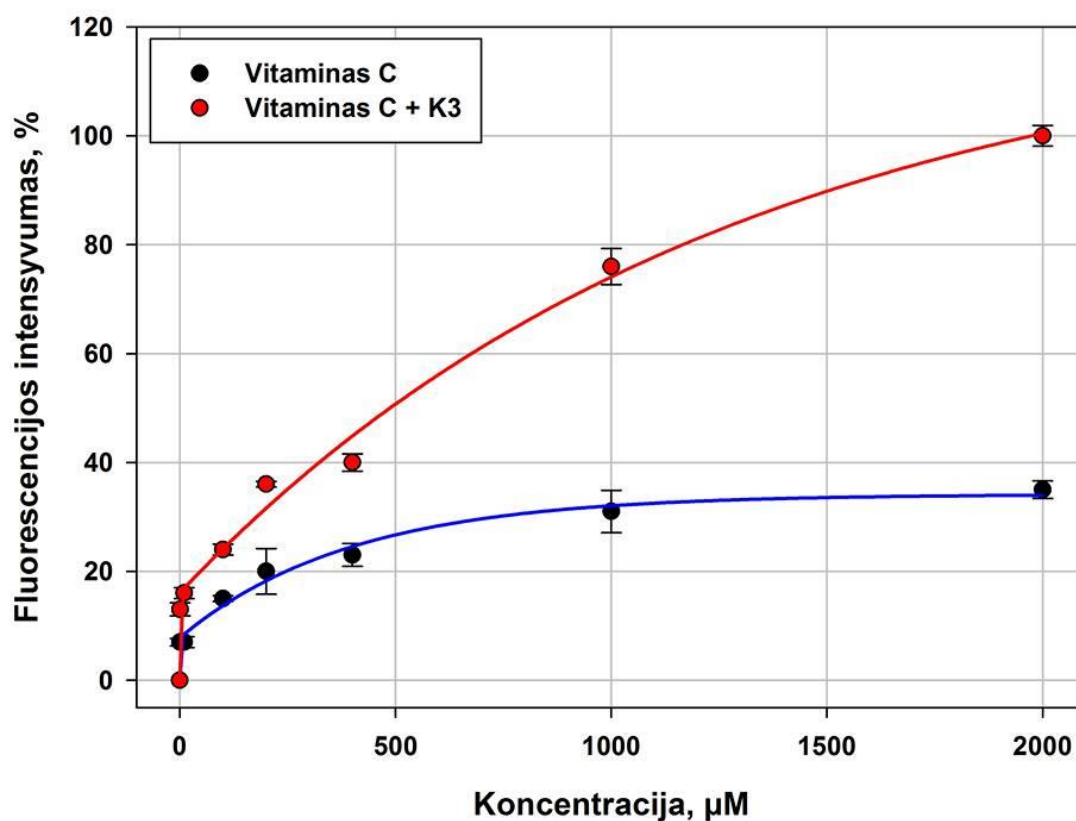


3.5 pav. Vandenilio peroksido kalibracinė kreivė



3.6 pav. Vitamino C sugeneruoto vandenilio peroksido kinetinė priklausomybė nuo laiko, esant skirtingoms koncentracijoms.

3.7 pav. pateikta vitaminų C ir K<sub>3</sub> komplekse naudojamos koncentracijos buvo santykiu 100:1 todėl koncentracijai didelio poveikio neturėjo. Kaip matome iš grafiko, komplekso išskiriamas vandenilio peroksido fluorescencijos intensyvumas žymiai didesnis nei vitamino C atskirai.



3.7 Vitamino C ir vitaminų C..K3 komplekso fluorescencijos intensyvumas esant skirtingoms koncentracijoms.

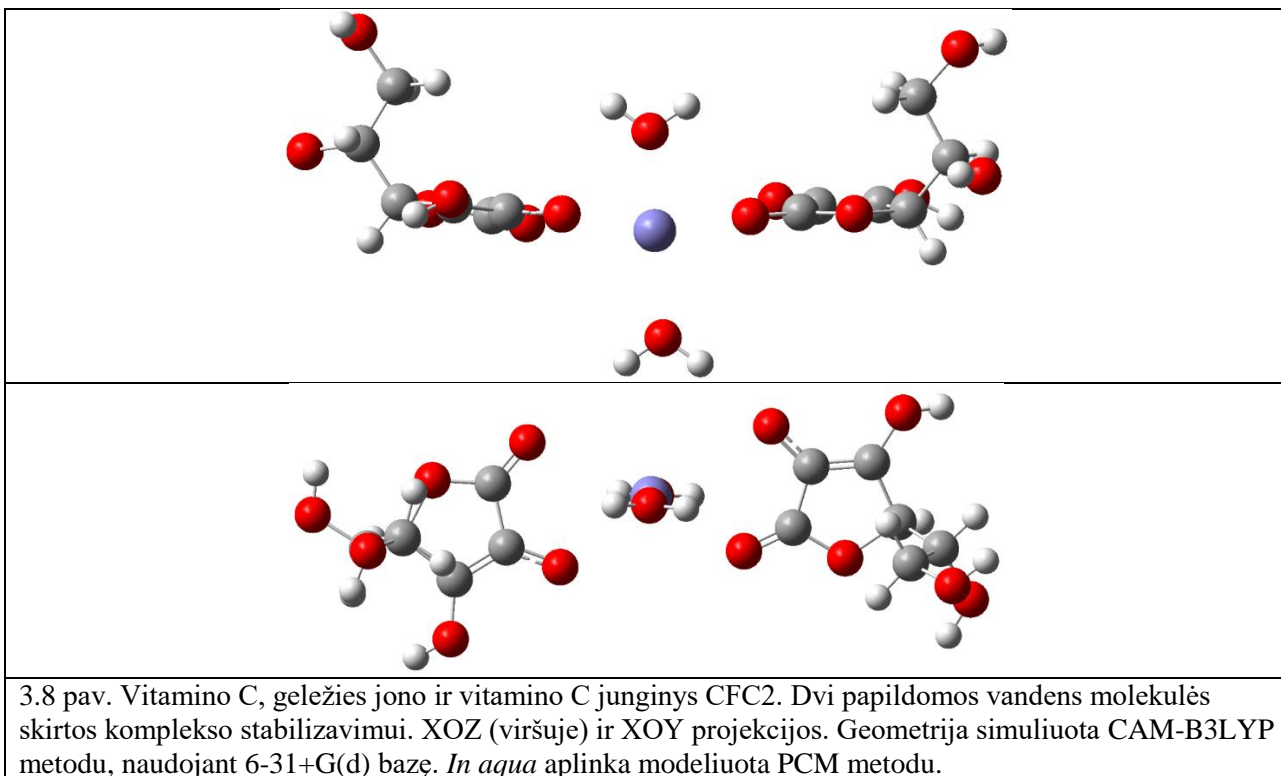
### 3.3. Modeliavimai kvantcheminiais metodais

Naudojantis Gaussian16 [30] paketu, buvo atlikti kelių modeliųjų struktūrų geometrijos simuliacijos.

Molekulės pagrindinės būsenos geometrija buvo simuliuota tankio funkcionalo CAM-B3LYP metodu, naudojant 6-31+G(d) bazę su poliarizacinėmis *d* funkcijomis ir difuzinėmis funkcijomis sunkiesiems atomams (šiuo atveju C, N, O, Fe). *In aqua* aplinka modeliuota PCM metodu (solvent=water).

#### 3.3.1 Vitamino C ir geležies jono sąveika

3.8 pav. pateiktas vitamino C, geležies jono  $Fe^{2+}$  ir vitamino C junginys CFC2. Dėl komplikotos struktūros pateikiamos dvi junginio CFC2 projekcijos: XOZ (viršuje) ir XOY. Geležies jonas jungiasi prie vitamino C per karbonilų deguonies atomus, jungtis formuojant plokštumoje 3,4 pozicijose – taip sudaromas tarpmolekulinis tiltelis. Taip suformuojamos silpna elektroniškoji (mažesnis atstumas) ir koordinacinė (metališkoji) (didesnis atstumas) jungtys. Dvi papildomos vandens molekulės, kurios jungiasi prie geležies jono iš viršaus ir iš apačios, yra skirtos kompleksui stabilizuoti.



Lentelė 5. CFC2: elektroninio sužadavimo energijos ir osciliatorių stipriai. TD(singlets) metodas.

N	Sužadintosios elektroninės būsenos Sn užpilda iš pagrindinės S0 būsenos per viendalelinių šuolių rinkinį	Sužadintosios būsenos energija (eV), šuolį atitinkantis bangos ilgis (nm) ir šuolio osciliatoriaus stipris f
1	Excited State 1: 95B →116B -0.38997 99B →116B -0.47715	0.0529 eV, 23441.69 nm, f=0.0000
2	Excited State 2: 95B →117B 0.29565 99B →117B 0.36156	0.1486 eV, 8343.29 nm, f=0.0000
3	Excited State 3: 95B →118B -0.31565 99B →118B -0.38642 99B →123B 0.29814	0.2101 eV, 5901.30 nm, f=0.0000
4	Excited State 4: 95B →136B 0.27303 99B →136B 0.33286 99B →137B -0.30339	0.5193 eV, 2387.36 nm, f=0.0000
5	Excited State 5: 92A →111A -0.39568 104A →111A -0.45426 106A →111A 0.39010	1.2334 eV, 1005.24 nm, f=0.0000
6	Excited State 6: 91A →110A -0.42686 105A →110A 0.41072	1.5069 eV, 822.76 nm, f=0.0000

5 lentelėje yra pateiktos elektroninio sužadavimo energijos ir osciliatorių stipriai. Sužadintosios elektroninės būsenos Sn užpilda formuojama iš pagrindinės S0 būsenos per viendalelinių šuolių rinkinį.

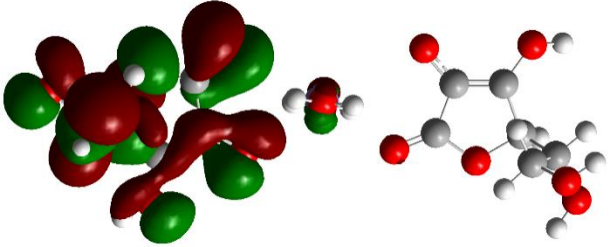
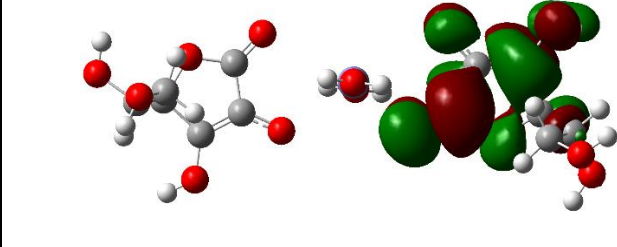
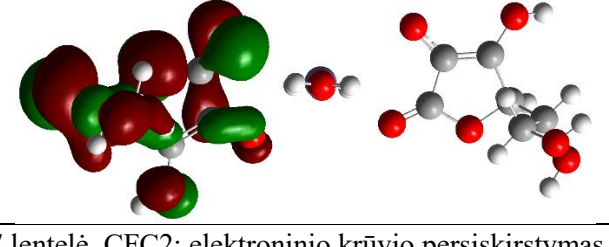
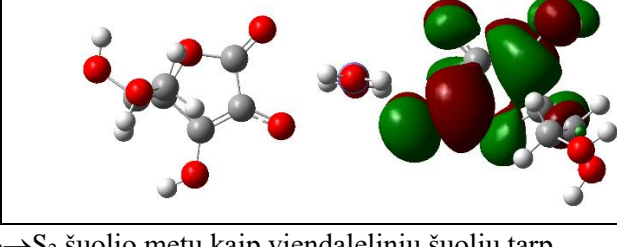
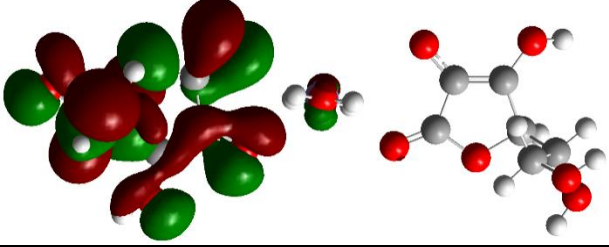
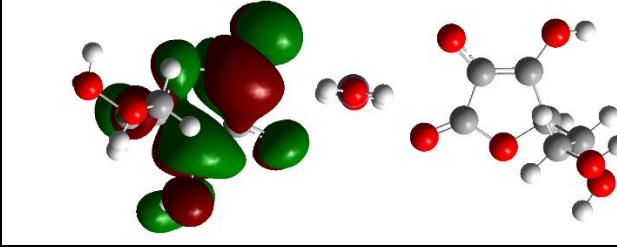
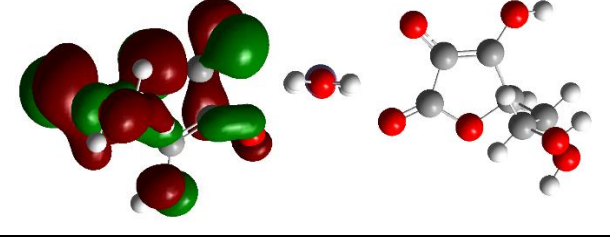
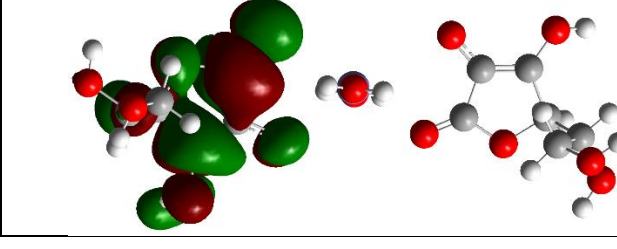
6-10 lentelėse yra pateikti elektroninio debesėlio tankio persiskirstymai šuolių į S<sub>1</sub> - S<sub>6</sub> būsenas metu. Elektroninė būseną gali būti užpildyta, atliekant viendalelinius šuolius tarp molekulinų orbitalių.

Šešios žemiausios sužadintosios elektroninės būsenos yra visiškai uždraustos (osciliatoriaus stipris 0). Bandant įvertinti krūvio persiskirstymo tipus, galima išskirti dvi charakteringas dinamikas:

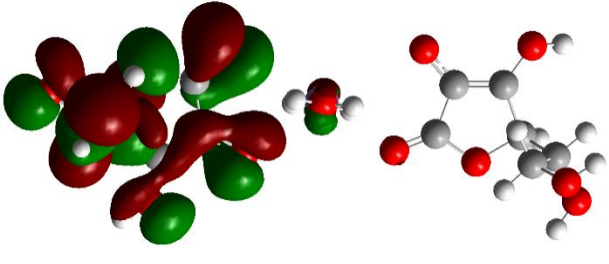
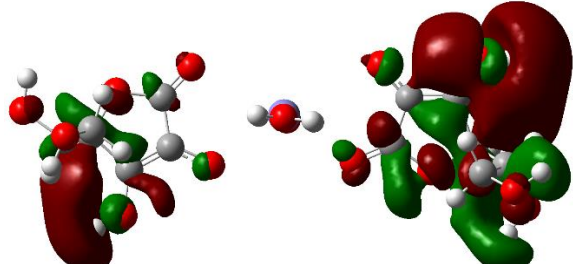
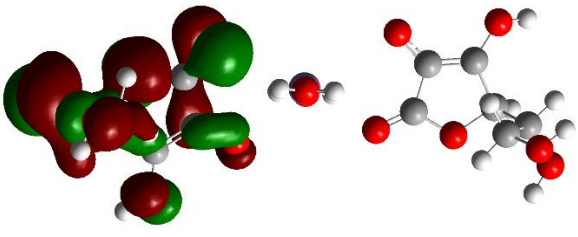
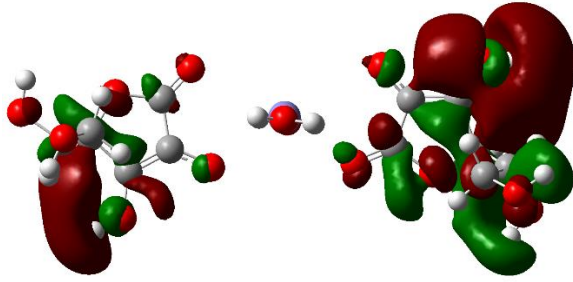
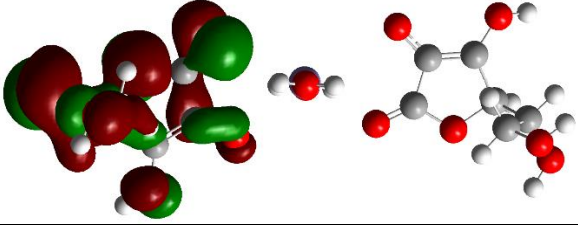
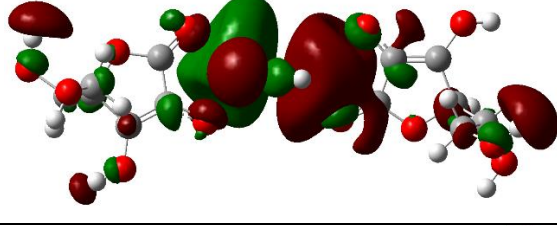
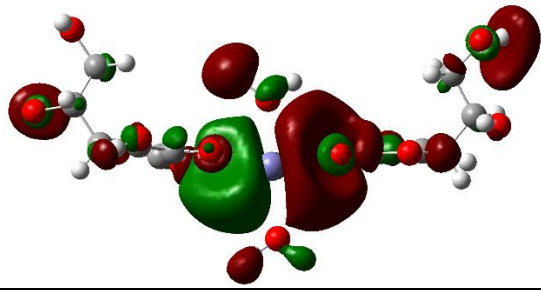
- a) šuoliai iš MO-95 ir MO-99 (6-9 lentelės);
- b) šuoliai iš MO-91,92 ir MO-104,105,106 (10-11 lentelės).
  1. Tarpmolekulinis CT šuolis iš vieno vitamino C į kitą vitaminą C, kai tarpininkas geležies jonas yra nežymiai perdengtas arba neperdengtas. Žemiausios energijos būsenos pasiekiamos, vykstant  $\pi \rightarrow \pi^*$  šuoliams iš MO-95 ir MO-99 į MO-116 ir MO-117 (6-7 lentelės).
  2. Tarpmolekulinis CT šuolis iš vieno vitamino C į kitą vitaminą C ir tarpmolekulinis CT šuolis iš vieno vitamino C į tiltelio Fe joną – tokiu atveju tarpininkas geležies jonas yra iš esmės

- perdengtas, kai dalyvauja krūvio persiskirstymo procese. Šios aukštesnės energijos būsenos pasiekiamos, vykstant  $\pi \rightarrow \pi^*$  šuoliams iš MO-95 ir MO-99 į MO-118 (pirmas atvejis) ir vykstant  $\pi \rightarrow \pi^*$  šuoliams iš MO-95 ir MO-99 į MO-123 (antras atvejis) (8 lentelė).
3. Tarpmolekulinis nepilnas CT šuolis iš vieno vitamino C į kitą vitaminą C, kai tarpininkas prie geležies jono asocijuotos dvi vandens molekulės n-elektronais dalyvauja krūvio persiskirstymo procese. Aukštos energijos būsenos pasiekiamos, vykstant  $\pi \rightarrow \pi^*$  ir  $n \rightarrow \pi^*$  šuoliams iš MO-95 ir MO-99 į MO-136 ir MO-137 (5 lentelė).
  4. Krūvio persiskirstymas tarp dviejų fragmentų, kai pirmąjį sudaro vitaminas C ir geležies jonas, o antrąjį – vitaminas C. Šios aukštos energijos būsenos pasiekiamos, vykstant  $\pi \rightarrow d^*$  šuoliams iš MO-91 ir MO-92 į MO-111, MO-110 (10-11 lentelės).

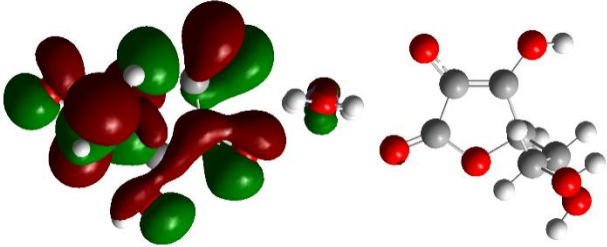
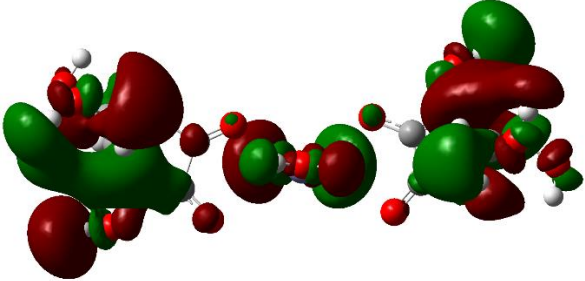
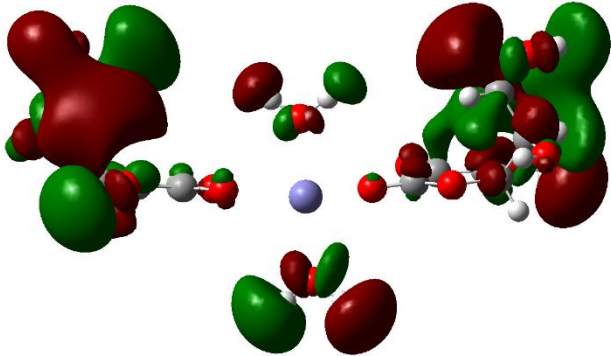
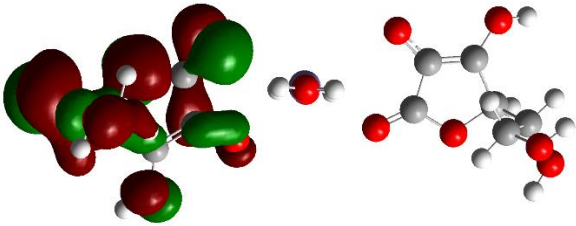
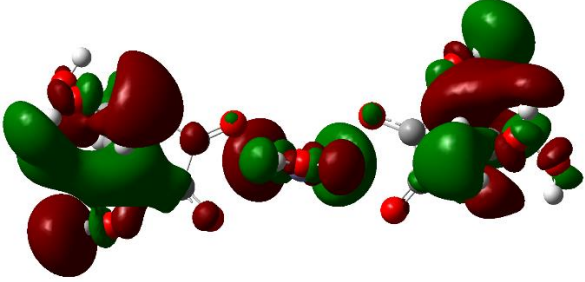
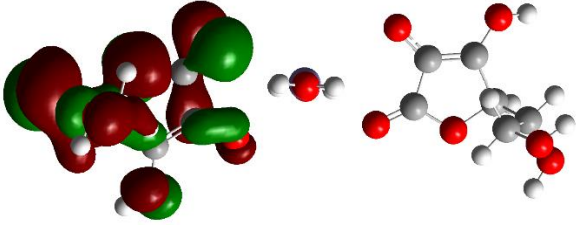
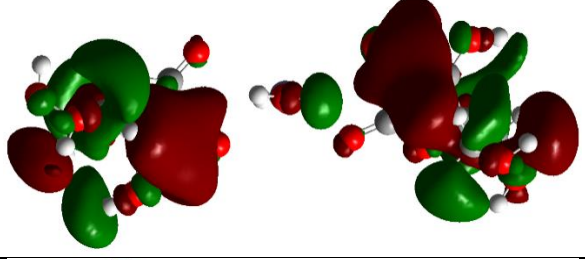
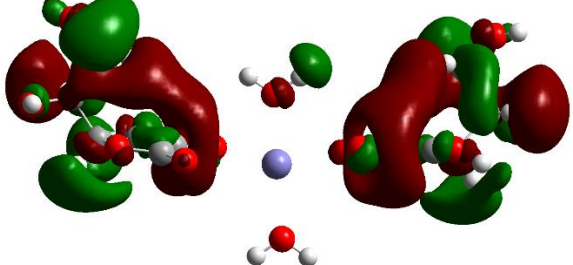
Apibendrinant galima pasakyti, kad MO orbitalių susiformavimas skirtas krūvio persiskirstymui ir tarp dviejų vitamino C molekulių per geležies joną, ir krūvio sancaupai apie geležies centrą, kuris karbonilų deguonies atomų tilteliu jungia abi askorbato molekules. Charakteringa yra tai, pilnas šuolio draudimas dėl sunkaus atomo efekto (šiuo atveju geležies) nulemia nulinį osciliatoriaus stiprį.

6 lentelė. CFC2: elektroninio krūvio persiskirstymas $S_0 \rightarrow S_1$ šuolio metu kaip viendalelinių šuolių tarp molekulių orbitalių rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).		
95B $\rightarrow$	116B	-0.38997
		
99B $\rightarrow$	116B	-0.47715
		
7 lentelė. CFC2: elektroninio krūvio persiskirstymas $S_0 \rightarrow S_2$ šuolio metu kaip viendalelinių šuolių tarp molekulių orbitalių rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).		
95B $\rightarrow$	117B	0.29565
		
99B $\rightarrow$	117B	0.36156
		

8 lentelė. CFC2: elektroninio krūvio persiskirstymas  $S_0 \rightarrow S_3$  šuolio metu kaip viendalelinių šuolių tarp molekulinėsiu orbitaliū rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).

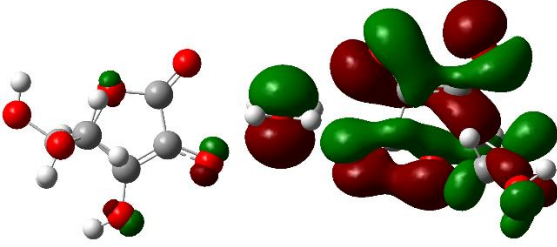
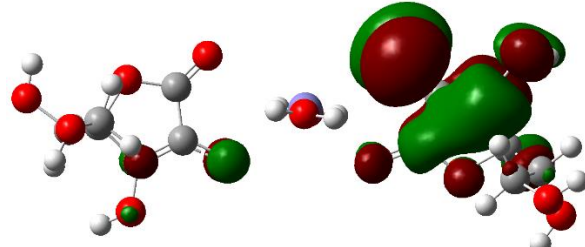
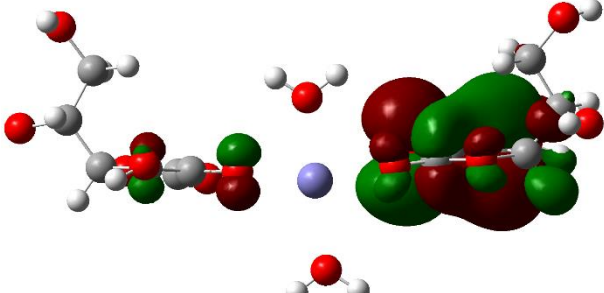
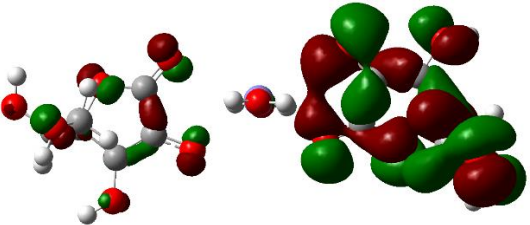
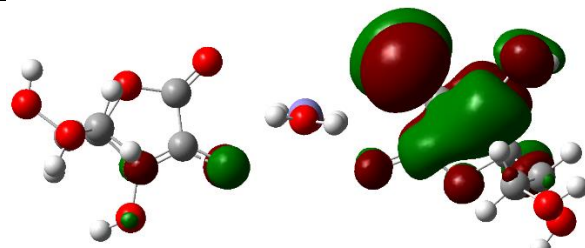
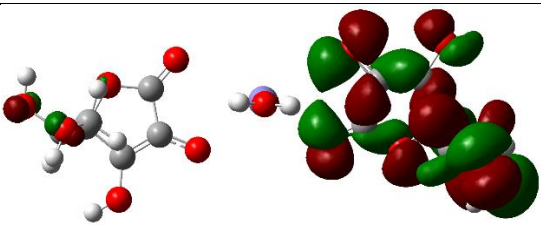
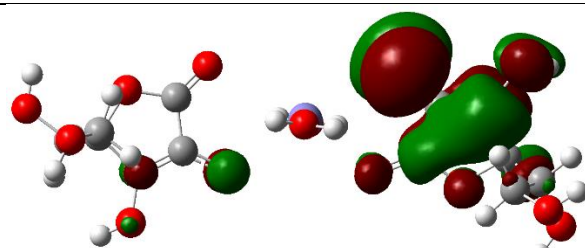
		95B $\rightarrow$	118B	-0.31565
				
		99B $\rightarrow$	118B	-0.38642
				
		99B $\rightarrow$	123B	0.29814
				
				

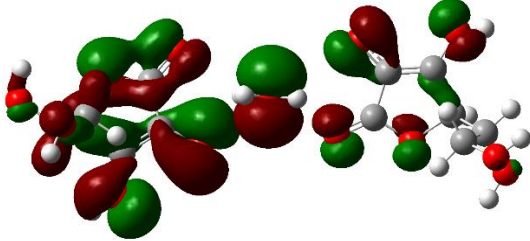
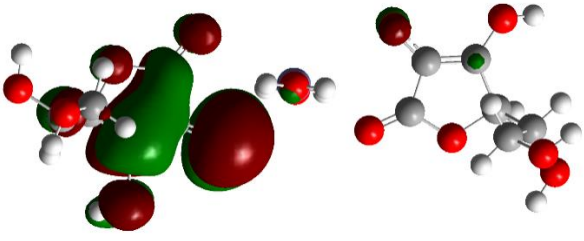
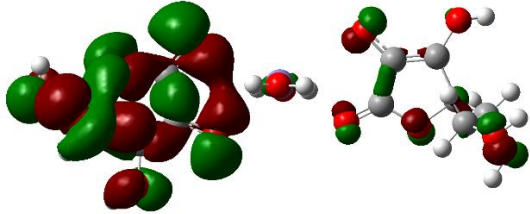
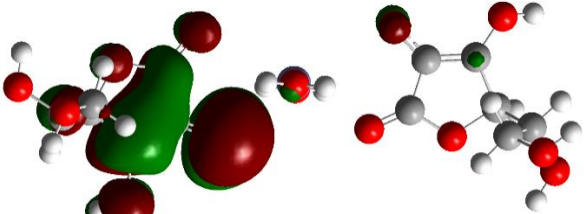
9 lentelė. CFC2: elektroninio krūvio persiskirstymas  $S_0 \rightarrow S_4$  šuolio metu kaip viendalelinių šuolių tarp molekulių orbitalių rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).

		95B →	136B	0.27303
				
				
		99B →	136B	0.33286
				
		99B →	137B	-0.30339
				
				



10 lentelė. CFC2: elektroninio krūvio persiskirstymas  $S_0 \rightarrow S_5$  šuolio metu kaip viendalelinių šuolių tarp molekulių orbitalių rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).

92A →	111A -0.39568
	
	
104A →	111A -0.45426
	
106A →	111A 0.39010
	

11 lentelė. CFC2: elektroninio krūvio persiskirstymas $S_0 \rightarrow S_6$ šuolio metu kaip viendalelinių šuolių tarp molekulių orbitalių rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).			
	91A $\rightarrow$	110A	-0.42686
			
	105A $\rightarrow$	110A	0.41072
			

### 3.3.2 C..K<sub>3</sub> kompleksas su Mg<sup>2+</sup> ir molekulinio deguonimi

3.9 pav. pateiktas vitamino C, magnio jono Mg<sup>2+</sup> ir vitamino K<sub>3</sub> junginys P11. Dėl komplikotos struktūros pateikiamos skirtingos junginio projekcijos. Magnio jonas jungiasi tarp vitamino C ir K<sub>3</sub> suformuodamas atvirą L – tipo struktūrą. Magnio jonas tampa tarpmolekuliniu tilteliu tarp dviejų molekulių.

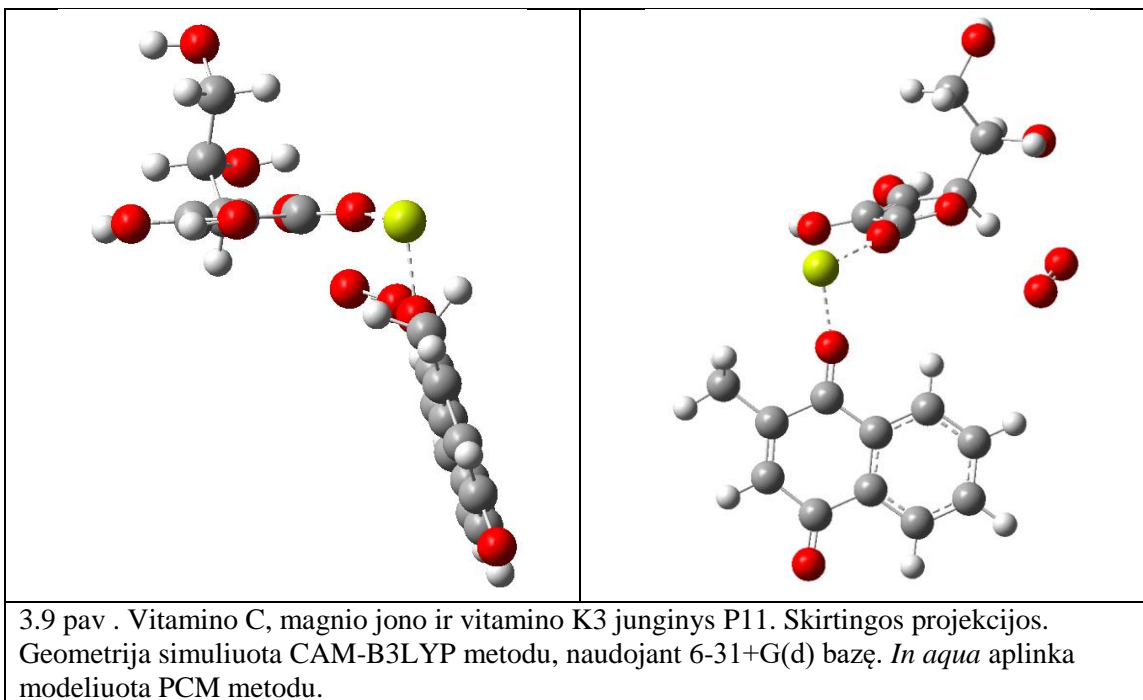
Elektroniniai sužadainimai buvo skaičiuoti pusempiriu TD metodu, įskaitant tik singuletinius šuolius. 12 lentelėje yra pateiktos elektroninio sužadainimo energijos ir osciliatorių stipriai. Sužadintosios elektroninės būsenos  $S_n$  užpilda formuojama iš pagrindinės  $S_0$  būsenos per viendalelinių šuolių rinkinį.

13-16 lentelėse pavaizduotas elektroninio krūvio persiskirstymas tarp vitamino K<sub>3</sub> ir molekulinio deguonies. Šiame sužadainime vitaminas C nedalyvauja.

14 lentelėje matomas elektroninio krūvio persiskirstymas iš vitamino K<sub>3</sub> ir molekulinio deguonies į vitaminą C per Mg<sup>2+</sup> joną, kuris tampa tarpmolekuliniu tilteliu, per kurį persiskirsto krūvis.

15 lentelėje matomas krūvio persiskirstymas prie Mg<sup>2+</sup> jono.

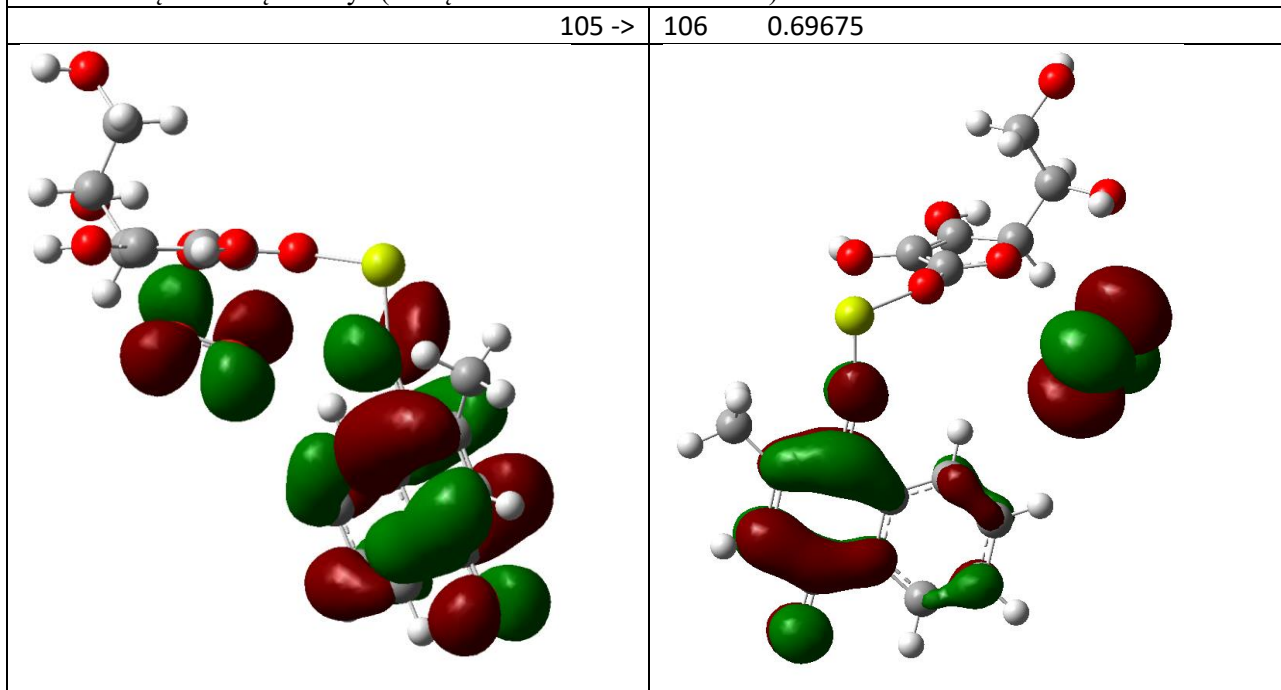
Iš šių lentelių galima daryti išvadą, kad kai magnis įsiterpia į šį kompleksą ir suformuoja L-tipo atvirąją struktūrą, elektrono pernaša vyksta keliais etapais, kas lėtina reakcijos eigą ir HOOH susidarymą.



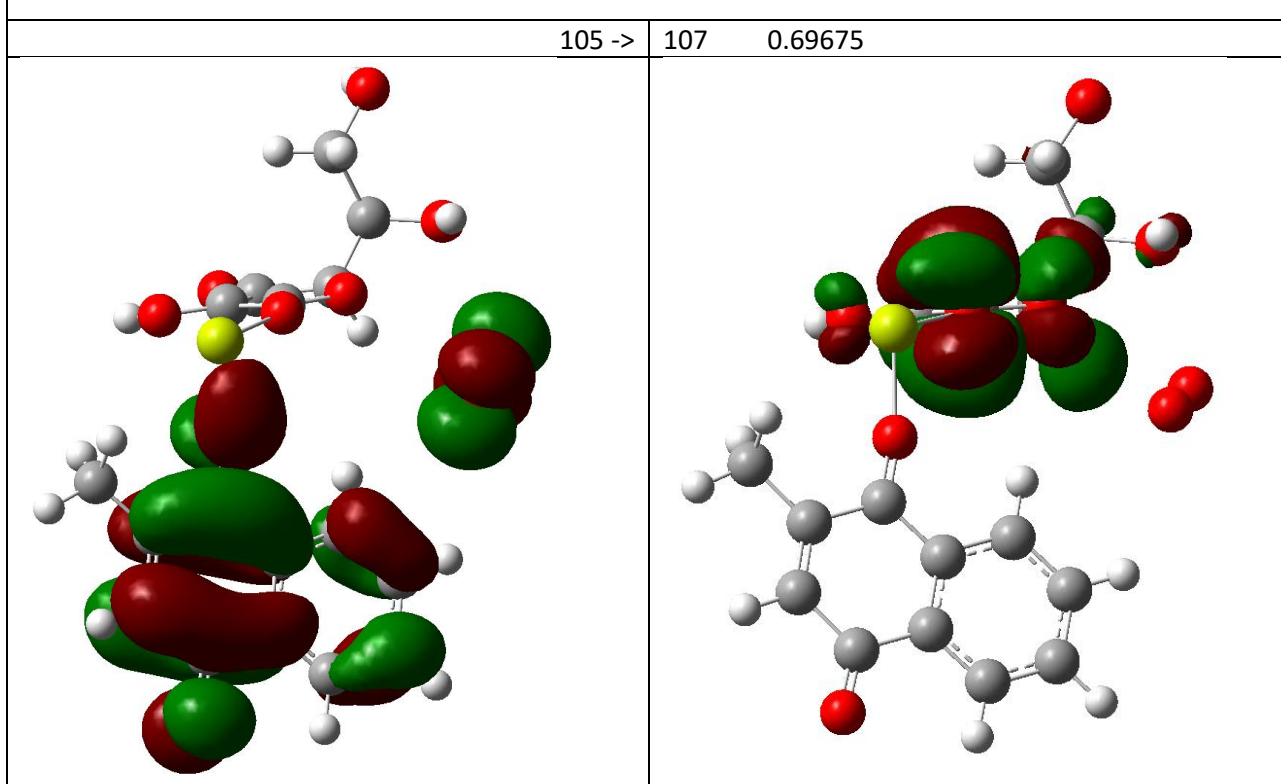
12 lentelė. CMGK: elektroninio sužadavimo energijos ir osciliatorių stipriai. TD(singlets) metodas

N	Sužadintosios elektroninės būsenos $S_n$ užpilda iš pagrindinės $S_0$ būsenos per viendalelinių šuolių rinkinį	Sužadintosios būsenos energija (eV), šuolį atitinkantis bangos ilgis (nm) ir šuolio osciliatoriaus stipris $f$
1	Excited State 2: 105 → 106 0.69675	0.2339 eV 5300.25 nm $f=0.0102$
2	Excited State 3: 105 → 107 0.69675	0.6679 eV 1856.21 nm $f=0.0014$
3	Excited State 4: 105 → 108 0.7	1.4393 eV 861.45 nm $f = 0.0152$
4	Excited State 6: 105 → 109 0.7	2.1105 eV 587.46 nm $f=0.0284$

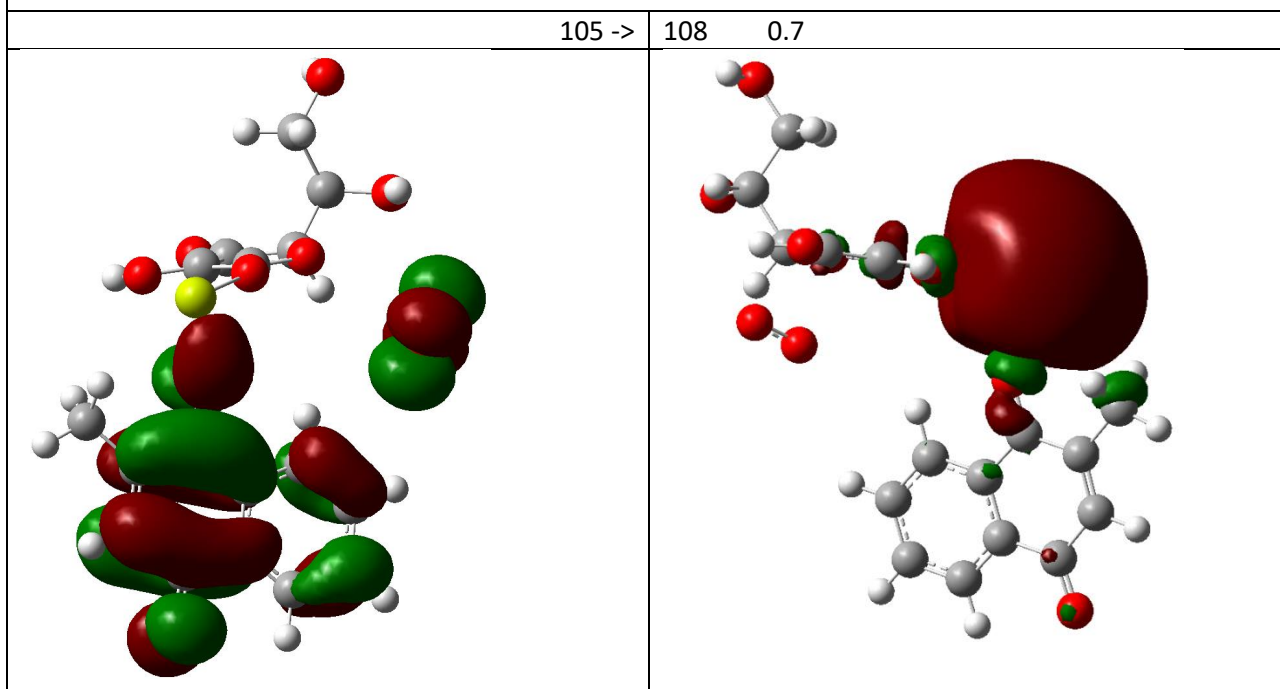
13 lentelė. CMGK: elektroninio krūvio persiskirstymas  $S_0 \rightarrow S_2$  šuolio metu kaip vienadelinių šuolių tarp molekulinė orbitalių rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).



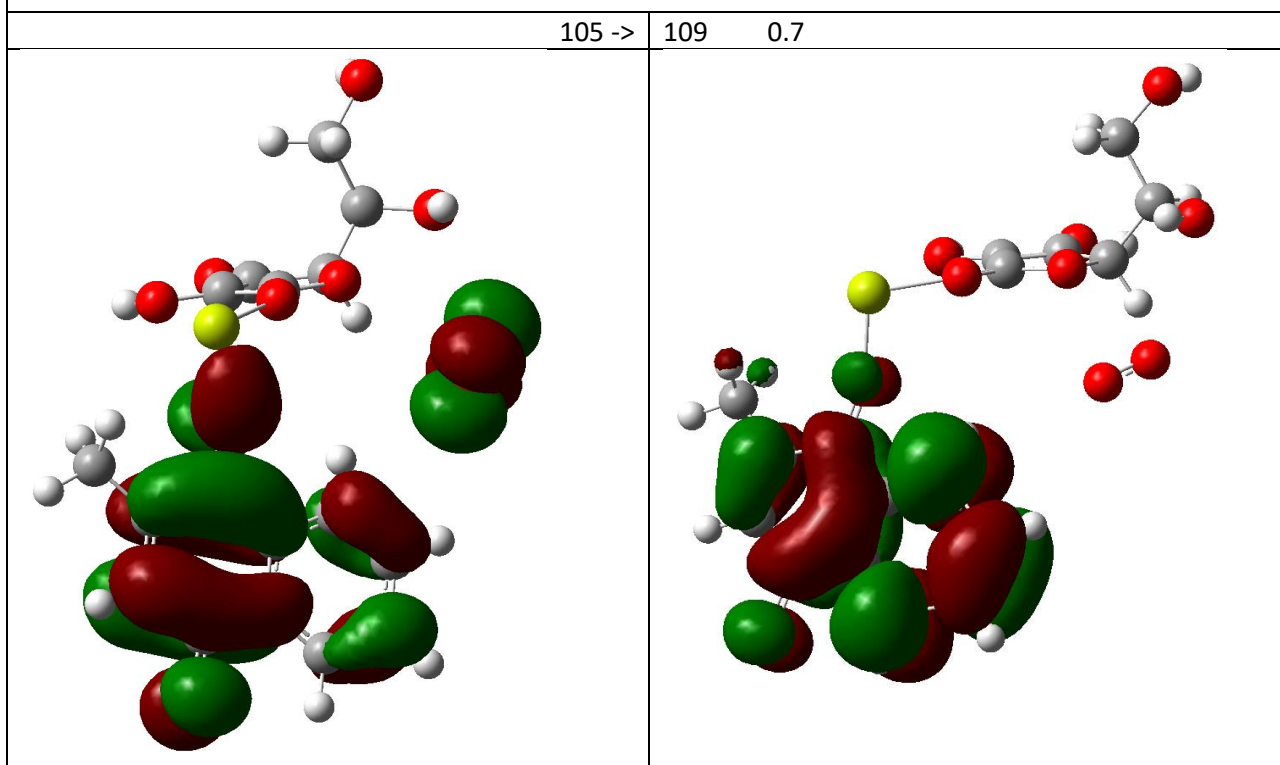
14 lentelė. CMGK: elektroninio krūvio persiskirstymas  $S_0 \rightarrow S_3$  šuolio metu kaip vienadelinių šuolių tarp molekulinė orbitalių rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).



15 lentelė. CMGK: elektroninio krūvio persiskirstymas  $S_0 \rightarrow S_4$  šuolio metu kaip vienadelinių šuolių tarp molekulinė orbitalių rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).

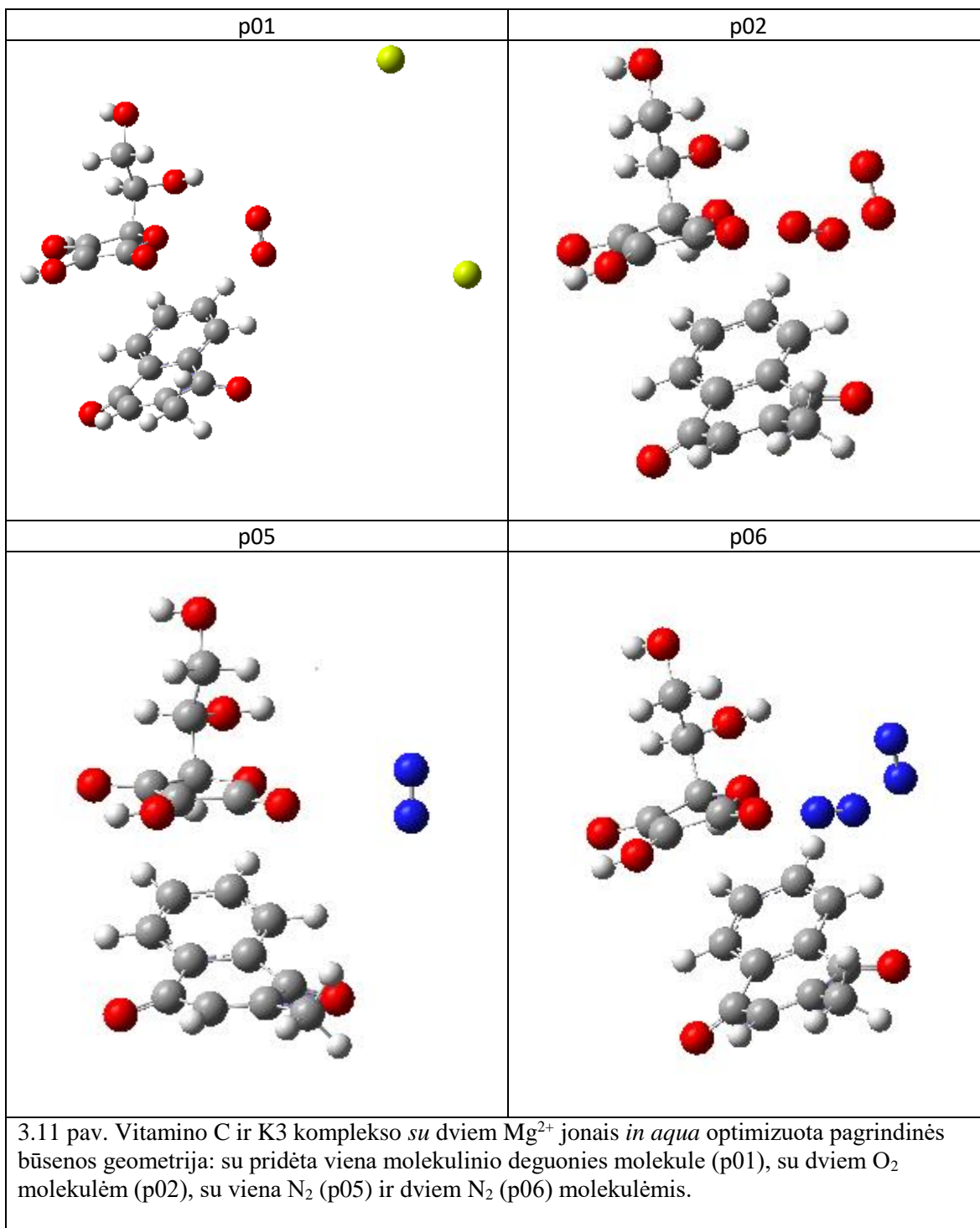


16 lentelė. CMGK: elektroninio krūvio persiskirstymas  $S_0 \rightarrow S_6$  šuolio metu kaip vienadelinių šuolių tarp molekulinė orbitalių rinkinys (MO įvardintos būsenos numeriu).



### 3.3.3. Vitaminų C .. K3 komplekso struktūros vertinimas dėl solvatacinių veiksmių

3.11 pav. pateikta vitamino C ir K<sub>3</sub> komplekso su dviem Mg<sup>2+</sup> jonais *in aqua* optimizuota pagrindinės būsenos geometrija: su pridėta viena molekulinio deguonies molekule (p01), su dviem O<sub>2</sub> molekulėmis (p02), su viena N<sub>2</sub> (p05) ir dviem N<sub>2</sub> (p06) molekulėmis.



Jonų padėtis gali būti labai įvairi, tačiau molekulinio deguonies buvimas komplekso artimoje aplinkoje išstumia magnio jonus. Iš molekulinio deguonies ir molekulinio azoto, pradiniu etapu išdėstytą apie vitaminų C ir  $K_3$  kompleksą *in aqua*, formuojasi solvacinį apvalkalą - tačiau tik apie vitaminą C. Susidarius tokiam  $O_2$ ,  $N_2$  solvaciniam apvalkalui, apsunkinamos vitamino C elektroninės donorinės savybės – pirmasis reakcijos etapas pagal Davis Lamson 2010 modelį tampa draustinas. Tačiau šitoks išsidėstymas tampa neįtakojančiu į pavienio vitamino C savybes – kad ir neefektyviai, tačiau generuoti vandenilio peroksidą. Deguonis iš solvacinės aplinkos šios reakcijos metu yra eikvojamas produktui susidaryti.

#### 4. PAGRINDINIAI REZULTATAI IR IŠVADOS

1. Vitaminai C ir K<sub>3</sub> citotoksiški *in vitro* pelės karcinomos MH-22A linijos ląstelėms tiek kiekvienas atskirai, tiek ir mišinyje santykiu 100:1. Efektyviausias poveikis – paveikus mišiniu (100:1), išgyvenamumas mažiausias (<10 %, kai vitamino C koncentracija 0,5 mM).
2. Fluorescuojančio Amplex red dažo pagalba atliekant *in vitro* experimentus, nustatytas efektyvus vandenilio peroksido HOOH generacijos kanalas: vitaminų C ir K<sub>3</sub> mišinio sugeneruotas HOOH kiekis yra gerokai didesnis nei vitamino C atskirai. Neefektyvus HOOH generacijos kanalo atveju, kai HOOH generuoja tik vitaminas C, yra stebima HOOH kiekio dinamika, ištęsta laike (iki 30 min.) su koncentraciniu įsisotinimu.
3. Atlikus struktūrų geometrijos simuliacijas kvantinės chemijos metodais (*in silico*) ir įvertinus energetinius parametrus, konstatuojama, kad:
  - a) Fe<sup>2+</sup> jonas *in aqua* terpėje suriša dvi vitamino C molekules per karbonilų deguonies atomus. Tokio surišimo (silpna elektronine ir koordinacine jungtimis) pakanka, kad vitaminas C nedalyvautų pirminiame etape, kai startuoja vandenilio peroksido generavimo reakcijos pagal Davis Lamson 2010 modelį.
  - b) molekulinio deguonies ir molekulinio azoto buvimas šalia vitaminų C ir K<sub>3</sub> komplekso *in aqua* kuria solvacinį apvaskalą tik apie vitaminą C. Susidarius tokiam solvaciniam apvaskalui, apsunkinamos vitamino C elektroninės donorinės savybės – pirmasis reakcijos etapas pagal Davis Lamson 2010 modelį tampa draustinas.
  - c) papildomo Mg<sup>2+</sup> jono įsiterpimas į vitamino C ir K<sub>3</sub> kompleksą *in aqua* terpėje sąlygoja labai efektyvus tiltelio tarpmolekulinei elektrono pernašai susiformavimą – tokiu būdu pirmasis reakcijos etapas pagal Davis Lamson 2010 modelį tampa pilnai leistas ir labai efektyvus.



Mantvydas Pašakinskas

**Sinerginis vitaminų C ir K<sub>3</sub> citotoksiškumo mechanizmas: *in silico*, *in vitro*, *in vivo***

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Atlikus struktūrų geometrijos simuliacijas kvantinės chemijos metodais (*in silico*) ir įvertinus energetinius parametrus, konstatuojama, kad: a) Fe<sup>2+</sup> jonas *in aqua* terpėje suriša dvi vitamino C molekules per karbonilų deguonies atomus. Tokio surišimo (silpna elektronine ir koordinacine jungtimis) pakanka, kad vitaminas C nedalyvautų pirminiame etape, kai startuoja vandenilio peroksido generavimo reakcijos pagal Davis Lamson 2010 modelį. b) molekulinio deguonies ir molekulinio azoto buvimas šalia vitaminų C ir K<sub>3</sub> komplekso *in aqua* kuria solvacinę apvaskalą tik apie vitaminą C. Susidarius tokiam solvaciniam apvaskalui, apsunkinamos vitamino C elektroninės donorinės savybės – pirmasis reakcijos etapas pagal Davis Lamson 2010 modelį tampa draustinas. c) papildomo Mg<sup>2+</sup> jono įsiterpimas į vitamino C ir K<sub>3</sub> kompleksą *in aqua* terpėje sąlygoja labai efektyvaus tiltelio tarpmolekulinei elektrono pernašai susiformavimą – tokiu būdu pirmasis reakcijos etapas pagal Davis Lamson 2010 modelį tampa pilnai leistas ir labai efektyvus.

Fluorescuojančio *Amplex red* dažo pagalba atliekant *in vitro* experimentus, nustatytas efektyvus vandenilio peroksido HOOH generacijos kanalas: vitaminų C ir K<sub>3</sub> mišinio sugeneruotas HOOH kiekis yra gerokai didesnis nei vitamino C atskirai. Neefektyvus HOOH generacijos kanalo atveju, kai HOOH generuoja tik vitaminas C, yra stebima HOOH kiekio dinamika, ištęsta laike (iki 30 min.) su koncentraciniu įsisotinimu.

Nustatyta, kad vitaminų C ir K<sub>3</sub> *in aqua* citotoksinis poveikis *In vivo* pelės karcinomos ląstelių linijai MH-22A buvo stebėtas ir atskirai paveikus vitaminu C, ir vitaminu K<sub>3</sub>, ir vitaminų C ir K<sub>3</sub> mišiniu. Efektyviausias poveikis – paveikus mišiniu (100:1), išgyvenamumas mažiausias (<10 %, kai vitamino C koncentracija 0.5 mM).

Mantvydas Pašakinskas

**Sinergetic mechanism of the cytotoxicity of vitamins C and K3: *in silico*, *in vitro*, *in vivo***

Master thesis

SUMMARY

The simulations of geometry of structures using *in-silico* methods and the evaluation of energy parameters show that: a) Fe<sup>2+</sup> ion in aqua binds two vitamin C molecules through carbonyl oxygen atoms. Such binding (weak electronic and coordination connections) is enough to prevent vitamin C from entering the initial phase when generation of hydrogen peroxide starts from initial reactions according to the Davis Lamson 2010 model. b) the presence of molecular oxygen and molecular nitrogen in addition to the vitamin C and K3 complex in aqua creates the first solvation shell for vitamin C. This shell essentially complicates the electronic donor properties of vitamin C - the first reaction step according to the Davis Lamson 2010 model becomes prohibited. c) replacing of additional Mg<sup>2+</sup> ion in the *in aqua* complex between the vitamins C and K3 results the formation of a highly efficient bridge for following intermolecular electron transport, thus making the first reaction phase, according to the Davis Lamson 2010 model, fully operational and highly effective. By running the *in vitro* experiments in order to establish the effective hydrogen peroxide HOOH generation channel by means of fluorescent *Aplex red* dye, it was concluded that the amount of HOOH generated by the vitamin C and K3 mixture is significantly higher than vitamin C alone. In the case of the ineffective HOOH generation channel, when HOOH generates the vitamin C only, the dynamics of HOOH was observed, expanding in time (up to 30 min) with concentration saturation.

It has been shown that cytotoxic effects of vitamin C and K3 mixture *in aqua* have been observed *in vivo* for mouse carcinoma cell line MH-22A. The general effect is the lowest survival (<10% when the concentration of vitamin C is 0.5 mM) after the mixture (100: 1).

## LITERATŪRA

- 1 J. Du, J. J. Cullen, G. R. Buettner. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1826 (2012) 443–457
- 2 D. Ivanova, Z. Zhelev, P. Getsov, B. Nikolova, I. Aoki, T. Higashi, R. Bakalova. Vitamin K: Redox-modulation, prevention of mitochondrial dysfunction and anticancer effect. *Redox Biol.* 16 (2018) 352–358
- 3 G. Lippi and M. Franchini. Vitamin K in neonates: facts and myths. *Blood Transfus.* 9 (1) (2011) 4–9. ISSN 1723-2007.
- 4 E. Mahdinia, A. Demirci, A. Berenjian, Optimization of *Bacillus subtilis* natto growth parameters in glycerol-based medium for vitamin K (menaquinone-7) production in biofilm reactors, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 41 (2018) 195–204.
- 5 M.J. Shearer, A. Bach, M. Kohlmeier, Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health, *J. Nutr.* 126 (Suppl 4) (1996) 1182S–1186S.
- 6 J. Danzieger, Vitamin K-dependent proteins, warfarin, and vascular calcification, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3 (2008) 1504–1510.
- 7 Pearson DA. Bone health and osteoporosis: the role of vitamin K and potential antagonism by anticoagulants. *Nutr. Clin. Pract.* 22(5) (2007) 517-544.
- 8 D. Koley and A. J. Bard. Inhibition of the MRP1-mediated transport of the menadione-glutathione conjugate (thiodione) in HeLa cells as studied by SECM. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 109(29) (2012) 11522-11527. ISSN 1091-6490.
- 9 Teixeira J, Amorim R, Santos K, Soares P, Datta S, Cortopassi GA, Serafim TL, Sardão VA, Garrido J, Borges F, Oliveira PJ. Disruption of mitochondrial function as mechanism for anti-cancer activity of a novel mitochondriotropic menadione derivative. *Toxicology.* 393 (2018) 123–139
- 10 Buettner GR, Schafer FQ. Albert Szent-Györgyi: vitamin C identification. *Biochemist.* 28 (2006) 31–33.
- 11 J. A. Cieslak and J. J. Cullen. Treatment of Pancreatic Cancer with Pharmacological Ascorbate. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16 (2015) 759–770.
- 12 J. Du, J. J. Cullen, G. R. Buettner. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1826 (2012) 443–457.

- 13 Li P, Shen Z, Wang W, Ma Z, Bi S, Sun H, Bu Y. The capture of H and OH radicals by vitamin C and implications for the new source for the formation of the anion free radical. *Phys Chem. Chem. Phys.*;12(20) (2010) 5256–5267
- 14 F. Costanzo, M. Sulpizi, J. Vandevondele, R.G. Della Valle and M. Sprik. Ab initio molecular dynamics study of ascorbic acid in aqueous solution. *Molecular Physics*, 105 (01) (2007) 17-23
- 15 J. J. Warren and J. M. Mayer. Tuning of the thermochemical and kinetic properties of ascorbate are tuned by its local environment: solution chemistry and biochemical implications. *J. Am. Chem. Soc.* 132(22) (2010) 7784–7793.
- 16 J. Blumberger, Y. Tateyama, and M. Sprik. Ab initio molecular dynamics simulation of redox reactions in solution. *Comp. Phys. Comm.* 169 (2005) 256–261.
- 17 R. N. Allen, M. K. Shukla, D. Reed, J. Leszczynski; Ab initio study of the structural properties of ascorbic acid (vitamin C). *Int. J. Quantum Chem.* 106 (2006) 2934–2943
- 18 Marcus RA, Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 811:265–322
- 19 R. N. Allen, M. K. Shukla and J. Leszczynski. Ab initio insight on the interaction of ascorbate with  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  metal cations. *Int. J. Quantum Chem.* 106(11) (2006) 2366–2372.
- 20 Qi Chen, Michael Graham Espey, Andrew Y. Sun, Je-Hyuk Lee, Murali C. Krishna, Emily Shacter, Peter L. Choyke, Chaya Pooput, Kenneth L. Kirk, Garry R. Buettner, and Mark Levine. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (21) (2007) 8749–8754.
- 21 Chen Q, Espey MG, Krishna MC, et al. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:13604-13609.
- 22 Jamison JM, Gilloteaux J, Nassiri MR, et al. Cell cycle arrest and autschizis in a human bladder carcinoma cell line following vitamin C and vitamin K3 treatment. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:337-351.
- 23 Gilloteaux J, Jamison JM, Neal DR, Summers JL. Cell death by autschizis in TRAMP prostate carcinoma cells as a result of treatment by ascorbate: menadione combination. *Ultrastruct. Pathol.* 2005;29:221-235.

- 24 Megumi Uetaki, Sho Tabata, Fumie Nakasuka, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Sci. Rep.* 5 2015, 13896; doi: 10.1038/srep13896 (2015).
- 25 Davis W. Lamson, Yu-Huan Gu, Steven M. Plaza, Matthew S. Brignall, Cathy A. Brinton, Angela E. Sadlon. The Vitamin C:Vitamin K3 System – Enhancers and Inhibitors of the Anticancer Effect. *Alternative Medicine Review* 15(4) (2010) 345.
- 26 A. Gruodis, N. Galikova, K. Šarka, R. Saule, D. Batiuškaitė, and G. Saulis. Mechanism of Intermolecular Electron Transfer in Bionanostructures. *Nanodevices and Nanomaterials for Ecological Security. - NATO Science for Peace and Security Series. Series B: Physics and Biophysics.* Ed. By Yuri N. Shunin and Arnold E. Kiv. - ISBN 978-94-007-4121-8 (PB) – Springer: 2012. - 183-190
- 27 Gilloteaux J, Jamison JM, Arnold D, Summers JL. Autoschizis: another cell death for cancer cells induced by oxidative stress. *Ital J Anat Embryol.* 2001;106(2 Suppl 1):79-92.
- 28 Clifford E. Dykstra, Gernot Frenking, Kwang S. Kim and Gustavo E. Scuseria. *Theory and Applications of Computational Chemistry.* ISBN: 978-0-444-51719-7
- 29 Smith, S. J.; Sutcliffe, B. T. (1997). The development of computational chemistry in the United Kingdom. *Reviews in Computational Chemistry.* 10: 271–316
- 30 Gaussian 16, Revision B.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 201.
- 31 C.J. Tomlin , I. Mitchell, A.M. Bayen, M. Oishi. Computational techniques for the verification of hybrid systems. *Proceedings of the IEEE* ( Volume: 91, Issue: 7, July 2003 )
- 32 Gruodis Alytis, Galikova Nuriija, Šarka Karolis, Saulė Rita, Batiuškaitė Danutė, Saulis Gintautas. On the mechanism of synergistic cytotoxicity of vitamins C and K3 :

experiments in vitro and quantum-chemical analysis. *Biophys. J.* 102(3) suppl. 1 (2012) 576.