



VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

Farmacija

Biomedicinos mokslų instituto Farmacijos ir farmakologijos centras

Beata Blotnytė, 5 kursas, 1 gr.

VIENTISŲJŲ STUDIJŲ MAGISTRO
BAIGIAMASIS DARBAS

**Alfa lipoinės rūgšties ir vitamino B1 poveikis oksidaciniam stresui in vitro
melnomos ląstelių kultūros modeliuose**

**The Impact of Alpha-Lipoic Acid and Vitamin B1 on Oxidative Stress in Vitro
Melanoma Cell Culture Models**

Darbo vadovas

Doc.dr. Jūratė Gudonytė

Centro vadovė

Doc. dr. Kristina Garuolienė

Vilnius, 2026

Studento elektroninio pašto adresas: beata.blotnyte@mf.stud.vu.lt

TURINYS

1. SANTRUMPOS	4
2. SANTRAUKA.....	5
3. SUMMARY.....	6
1. ĮVADAS	8
2. TYRIMO AKTUALUMAS	9
3. LITERATŪROS APŽVALGA	10
6.1. Odos vėžys ir jo tipai	10
6.2. Melnomos patogenezė	11
6.3. Melnomos progresavimas ir metastazavimas	12
6.4. Melnomos rizikos veiksniai	13
6.5. Oksidacinis stresas ir melanoma.....	13
6.6. Melnomos ląstelių proliferacija	15
6.7. Antioksidantai ir oksidacinio streso reguliacija onkologijoje	16
6.8. Alfa lipoinė rūgštis ir jos panaudojimas	17
6.9. Alfa lipoinės rūgšties antioksidacinis poveikis onkologijoje	17
6.10. Vitaminas B1 ir jo panaudojimas	18
6.11. Vitamino B1 antioksidacinis poveikis onkologijoje.....	19
6.12. SK-MEL-28 ląstelių linija	21
7. TYRIMO METODIKA	22
7.1. Medžiagos.....	22
7.2. Terpės ir jų priedai.....	22
7.3. Darbo prietaisai.....	23
7.4. Tyrimo objektai	23
7.5. Melnomos ląstelių kultivavimas	23
7.6. Melnomos ląstelių gyvybingumo nustatymas.....	24
7.7. Eksperimentinės grupės	25
7.8. Melnomos ląstelių proliferacijos nustatymas	25
7.9. Melnomos ląstelių reaktyviųjų deguonies formų nustatymas.....	26
7.10. Melnomos ląstelių migracijos nustatymas	26
7.11. Statistinė analizė	27
7.12. Tyrimo seka	27

8. REZULTATAI	28
8.1. Alfa lipinės rūgšties rezultatai	28
8.1.1. Alfa lipinės rūgšties poveikis melanomos ląstelių proliferacijai	28
8.1.2. Alfa lipinės rūgšties poveikis melanomos ląstelių ROS kiekiui.....	30
8.1.3. Alfa lipinės rūgšties poveikis melanomos ląstelių migracijai	32
8.2. Vitamino B1 rezultatai.....	34
8.2.1. Vitamino B1 poveikis melanomos ląstelių proliferacijai	34
8.2.2. Vitamino B1 poveikis melanomos ląstelių ROS kiekiui	36
8.2.3. Vitamino B1 poveikis melanomos ląstelių migracijai.....	37
8.3. Alfa lipinės rūgšties ir vitamino B1 poveikio palyginimo rezultatai.....	40
8.3.1. Skirtingų medžiagų poveikio palyginimas melanomos ląstelių proliferacijai.....	40
8.3.2. Skirtingų medžiagų poveikio palyginimas melanomos ląstelių ROS kiekiui	42
8.3.3. Skirtingų medžiagų poveikio palyginimas melanomos ląstelių migracijai	44
10. IŠVADOS.....	46
11. REKOMENDACIJOS	47
12. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	47

1. SANTRUMPOS

ALR - Alfa lipoinės rūgšties oksiduota forma arba tiokto rūgštis (angl. Alpha-lipoic acid);

B1 - Vitaminas B1;

CCK-8 - Ląstelių skaičiavimo rinkinys (angl. Cell Counting Kit-8);

CDK - Fermentai, reguliuojantys ląstelės ciklą (angl. Cyclin-dependent kinases);

CO₂ - Anglies dioksidas (angl. Carbon dioxide);

DHLR - Dihidrolipoinė rūgštis, redukuota alfa lipoinės rūgšties forma (angl. Dihydrolipoic acid);

DMEM - Dulbecco modifikuota Eagle terpė (angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium);

EDTA - Etilendiamintetraacto rūgštis (angl. Ethylenediaminetetraacetic acid);

H₂O₂ - Vandenilio peroksidas (angl. Hydrogen peroxide);

FBS - Galvijų vaisiaus serumas (angl. Fetal bovine serum);

GSH - Redukuotas glutationas (angl. Glutathione);

GSSG - Oksiduotas glutationas (angl. Oxidized glutathione);

NMSC - Nemelanominis odos vėžys (angl. Non-melanoma skin cancer);

O₂^{•-} - Superoksido anijonas (angl. Superoxide anion);

PBS - Fosfato buferinis tirpalas (angl. Phosphate-buffered saline);

ROS - Reaktyvios deguonies formos (angl. Reactive Oxygen Species);

SOD - Superoksido dismutazė (angl. Superoxide dismutase);

TPP - Tiamino difosfatas, aktyvi tiamino forma (angl. Thiamine diphosphate);

UVA - Ultravioletinės spinduliuotės tipas, kurio bangos ilgis 320-400 nm;

UVB - Ultravioletinės spinduliuotės tipas, kurio bangos ilgis 290-320 nm;

UVC - Ultravioletinės spinduliuotės tipas, kurio bangos ilgis 100-290 nm.

2. SANTRAUKA

Darbo pagrindimas:

Melanoma - agresyvi odos vėžio forma, pasižyminti dideliu metastazavimo potencialu, o sergamumas šia liga pasaulyje nuolat didėja. Oksidacinis stresas yra svarbus melanomos progresavimo veiksnys, todėl alfa lipinės rūgšties ir vitamino B1 poveikio tyrimai *in vitro* melanomos ląstelių modeliuose leidžia įvertinti šių medžiagų įtaką oksidacinio streso procesams.

Tyrimo tikslas:

Įvertinti alfa lipinės rūgšties ir vitamino B1 poveikį oksidacinio streso sukeltai žalai *in vitro* melanomos ląstelių modeliuose.

Tyrimo uždaviniai:

1. Įvertinti alfa lipinės rūgšties poveikį oksidacinio streso paveiktoms *in vitro* melanomos ląstelių modelio proliferacijai, reaktyviųjų deguonies formų kiekiui ir migracijai.
2. Įvertinti vitamino B1 poveikį oksidacinio streso paveikto *in vitro* melanomos ląstelių proliferacijai, reaktyviųjų deguonies formų kiekiui ir migracijai.
3. Palyginti alfa lipinės rūgšties ir vitamino B1 poveikį oksidacinio streso paveikto *in vitro* melanomos ląstelių modelio proliferacijai, migracijai ir reaktyviųjų deguonies formų kiekiui.

Tyrimo metodai:

Naudota melanomos SK-MEL-28 ląstelių linija, kultivuota standartinėmis sąlygomis DMEM terpėje. Ląstelių gyvybingumas nustatytas Neubauer'io kamera ir tripano mėlio metodu. Medžiagų poveikis tirtas taikant skirtingas ALR (1 μ M, 500 μ M, 1 mM) ir vitamino B1 (10 μ M, 500 μ M, 1 mM) koncentracijas. Ląstelių proliferacija analizuota CCK-8 metodu. ROS kiekis nustatytas pagal fluorescencijos intensyvumą. Migracija vertinta analizuojant ląstelių ploto užsidarymą (%) kas 12val. Eksperimentai atlikti trimis nepriklausomais kartojimais. Statistinė analizė vykdyta naudojant „R Commander“ programą, taikant ANOVA ir Dunnett testą, skirtą grupių palyginimui su kontrole. Statistinis reikšmingumas nustatytas, kai $p \leq 0,05$. Grafikai sudaryti naudojant „Microsoft Excel“.

Tyrimo rezultatai:

Nustatyta, kad po 48 val. ALR sumažino ROS kiekį tirtose grupėse, lyginant su kontrole ($p < 0,001$), o sumažėjimas siekė apie 52-54 %. 36 val. ALR slopino ląstelių migraciją 63-84 %, kai 1 μM ($p = 0,0028$), 500 μM ($p = 0,0024$) ir 1 mM ($p = 0,0062$). 48 val. migracija slopinta 54,5-57 % ($p = 0,0179-0,0387$), priklausomai nuo ALR koncentracijos. Po 48 val. B1 1 μM koncentracija proliferaciją skatino 30 % ($p = 0,0246$), o 1 mM slopino 53 % ($p = 0,0009$). Proliferacija slopinama 31,5 % veikiant B1 10 μM ($p = 0,0014$), 77,5 % - B1 500 μM ir 82,5 % - B1 1 mM koncentracijomis ($p < 0,0001$). 48 val., oksidacinis stresas sumažintas 70-82,5 % ($p < 0,001$), palyginus su kontrole. Po 36 val. vitaminas B1 slopino ląstelių migraciją 63-94 %: 10 μM ($p = 0,0226$), 500 μM ($p = 0,0053$) ir 1 mM ($p = 0,0367$). Po 48 val., B1 slopino migraciją 63,5-92 % ($p < 0,001$).

Tyrimo išvados:

1. Alfa lipoinė rūgštis per pusę sumažino oksidacinį stresą, lyginant su kontroline grupe, ir iki 84 % slopino ląstelių migraciją *in vitro*.
2. Vitaminas B1 mažesnėmis koncentracijomis proliferaciją didino beveik trečdaliu, o didesnėmis - slopino iki 53 %. Ilgėjant inkubacijos trukmei, proliferacija buvo slopinta iki 82,5 %. Be to, vitaminas B1 mažino oksidacinį stresą iki 82,5 % bei didesnėmis koncentracijomis slopino migraciją iki 94 % *in vitro*.
3. Palyginus tiriamųjų medžiagų poveikį oksidacinio streso paveiktoms melanomos ląstelėms nustatyta, kad alfa lipoinė rūgštis ir vitaminas B1 skirtingai veikė ląstelių proliferaciją, ROS kiekį ir migraciją *in vitro*.

Raktiniai žodžiai: SK-MEL-28, alfa lipoinė rūgštis, vitaminas B1, oksidacinis stresas, proliferacija, ROS, migracija.

3. SUMMARY

Relevance of the research:

Melanoma is a highly aggressive skin cancer with a strong metastatic potential, and its incidence continues to rise worldwide. Since oxidative stress plays an important role in melanoma progression, investigating the effects of alpha-lipoic acid and vitamin B1 in *in vitro* melanoma cell models may contribute to a better understanding of their impact on oxidative stress mechanisms.

Aim of the study: To evaluate the effects of alpha-lipoic acid and vitamin B1 on oxidative stress-induced damage in *in vitro* melanoma cell models.

Objectives of the study:

1. To evaluate the effect of alpha-lipoic acid on proliferation, reactive oxygen species levels, and migration in an oxidative stress-affected *in vitro* melanoma cell model.
2. To evaluate the effect of vitamin B1 on proliferation, reactive oxygen species levels, and migration in an oxidative stress-affected *in vitro* melanoma cell model.
3. To compare the effects of alpha-lipoic acid and vitamin B1 on proliferation, migration, and reactive oxygen species levels in an oxidative stress-affected *in vitro* melanoma cell model.

Methods:

SK-MEL-28 melanoma cell line was used and cultured under standard conditions in DMEM. Cell viability was determined using a Neubauer chamber and the trypan blue exclusion method. The effects of the tested compounds were evaluated using different concentrations of ALA (1 μ M, 500 μ M, 1 mM) and B1 (10 μ M, 500 μ M, 1 mM). Cell proliferation was analyzed using the CCK-8 assay. ROS levels were determined by measuring fluorescence intensity. Migration activity was assessed by analyzing cell area closure (%) every 12 h. Experiments were performed in three independent replicates. Statistical analysis was conducted using the „R Commander” software, applying ANOVA and Dunnett’s test to compare experimental groups with the control group. Statistical significance was considered at $p \leq 0.05$. Graphical analysis was performed using „Microsoft Excel”.

Results:

After 48 h, ALR significantly reduced ROS levels in all tested groups compared to the control ($p < 0,001$), with reductions ranging from 52% to 54%. ALR also suppressed cell migration after 36 h by 63-84%, depending on concentration: 1 μ M ($p = 0,0028$), 500 μ M ($p = 0,0024$), and 1 mM ($p = 0,0062$). Following 48 h of incubation, migration inhibition remained evident, reaching 54.5-57% ($p = 0,0179$ - $0,0387$). B1 10 μ M increased proliferation by 30% ($p = 0,0246$), whereas 1 mM reduced it by 53% ($p = 0,0009$). After 72 h, proliferation inhibition reached 31.5% at B1 10 μ M ($p = 0,0014$), 77,5% at B1 500 μ M, and 82,5% at B1 1 mM ($p < 0,0001$). In addition, oxidative stress decreased by 70-82,5% after 48 h ($p < 0,001$), compared with the control group. Vitamin B1 also inhibited cell migration by 63-94% after 36 h and by 63,5-92% after 48 h ($p < 0,001$), depending on concentration.

Conclusions:

1. Alpha-lipoic acid reduced oxidative stress by half compared to the control group and inhibited cell migration by up to 84% *in vitro*.
2. At lower concentrations, vitamin B1 increased proliferation by nearly one-third, whereas higher concentrations inhibited proliferation by up to 53%. With prolonged incubation time, proliferation was inhibited by up to 82.5%. In addition, vitamin B1 reduced oxidative stress by up to 82.5% and, at higher concentrations, inhibited migration by up to 94% *in vitro*.
3. Comparison of the effects of the investigated compounds on oxidative stress-induced melanoma cells demonstrated that alpha-lipoic acid and vitamin B1 exerted different effects on cell proliferation, ROS levels, and migration *in vitro*.

Keywords: SK-MEL-28, alpha-lipoic acid, vitamin B1, oxidative stress, cell proliferation, ROS levels, cell migration.

1. ĮVADAS

Piktybiniai navikai išlieka viena didžiausių šiuolaikinės visuomenės sveikatos problemų [1]. Tarptautinės vėžio tyrimo agentūros „GLOBOCAN 2022“ duomenimis, 2022 metais pasaulyje nustatyta apie 20 mln. naujų vėžio atvejų ir beveik 9,7 mln. mirčių [1]. Pasaulio sveikatos organizacija nurodo, kad svarbiausi vėžio rizikos veiksniai yra tabako vartojimas, ultravioletinės (UV) spinduliuotės poveikis, aplinkos tarša bei genetinis polinkis [2]. Siekiant mažinti mirtingumą nuo vėžio, aktualu plėtoti efektyvias gydymo strategijas [6, 9].

Melanoma, laikoma agresyviausia odos piktybine navikine liga, pasižymi polinkiu metastazuoti į plaučius, kepenis, kaulus bei smegenis, todėl blogina pacientų gydymo galimybes ir mažina išgyvenamumą [4]. Nors melanoma sudaro nedidelę visų piktybinių navikų dalį ir gali būti sėkmingai gydoma chirurginiu būdu, vis dar trūksta išsamių tyrimų, analizuojančių alternatyvaus ligos valdymo galimybes [4, 5]. Pastaraisiais metais tikslinė terapija (BRAF/MEK inhibitoriai) ir imunoterapija reikšmingai pagerino metastazavusios melanomos gydymo rezultatus, tačiau dėl įgyto atsparumo ir nevienodo pacientų atsako ilgalaikis išgyvenamumas išlieka ribotas [3, 5]. Vis daugiau dėmesio skiriama naujų melanomos papildomų gydymo strategijų paieškai, įskaitant potencialius bioaktyvius junginius, tokius kaip alfa lipoinė rūgštis ir vitaminas B1, tyrimus *in vitro* [5, 6, 9].

2. TYRIMO AKTUALUMAS

Oksidacinis stresas, atsirandantis sutrikus pusiausvyrai tarp ROS susiformavimo ir antioksidacinės apsaugos, laikomas reikšmingu procesu, prisidedančiu prie navikų formavimosi ir progresavimo [6]. ROS molekulių perteklius prisideda prie DNR pažeidimų, signalinių kelių aktyvacijos ir navikų progresavimo, o šį redokso disbalansą gali moduluoti antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčios medžiagos [6]. Atsižvelgiant į redokso, ROS susidarymo ir antioksidacinės sistemos mechanizmų svarbą vėžio biologijoje bei augantį onkologinių atvejų skaičių, didėja poreikis kurti efektyvias prevencijos ir alternatyvias terapines strategijas [1, 6, 9]. Viena iš potencialių priešnavikinį poveikį turinčių medžiagų yra ALR. Dėl antioksidacinių savybių ALR atlieka svarbų vaidmenį ląstelių metabolizme ir mažina oksidacinį stresą veikdama kaip antioksidantas bei regeneruodama kitus antioksidantus (pavyzdžiui, vitaminą C) [6]. 2012 metais eksperimentiniame *in vivo* ir *in vitro* skirtingų vėžio modelių (SK-N-SH, Neuro-2-a, krūties vėžio SkBr3 ląstelių linijose ir ksenotransplantatų pelių modeliuose) tyrime vertinta, ar ALR, taikyta didesnėmis koncentracijomis (2,5-5 mM), mažina navikinių ląstelių gyvybingumą, proliferaciją ir didina apoptozę visose tirtose ląstelių linijose [7]. Įrodyta, jog vaistas slopino navikinių ląstelių proliferaciją ir skatino ląstelių žūtį tiek *in vitro*, tiek *in vivo* sąlygomis [7]. Kitame eksperimentiniame *in vitro* tyrime pastebėta, kad ALR, derinama su cisplatina, etopozidu ir paklitakseliu, didino plaučių vėžio ląstelių jautrumą chemoterapijai ir skatino jų žūtį, rodydama galimą sinerginį poveikį [8].

Vitaminas B1, veikiantis netiesioginiu antioksidaciniu mechanizmu, prisideda prie oksidacinio streso mažinimo. Tiamino pirofosfatas (TPP), biologiškai aktyvi vitamino B1 forma, veikia kaip kofaktorius fermentams, dalyvaujantiems gliukozės metabolizme, pavyzdžiui, pentozų fosfato kelyje, kuriame susidaro NADPH. NADPH yra būtinas redukuoto glutationo (GSH) atstatymui iš oksiduotos formos (GSSG), o GSH dalyvauja neutralizuojant ROS [9, 66]. Yuan Liu ir k.t. atliktos sisteminės apžvalgos duomenys nurodama, jog didesnis vitamino B1 suvartojimas gali būti susijęs su mažesne kolorektinio vėžio rizika [11]. Nors sisteminės apžvalgos rezultatai teigia galimą atvirkštinę sąsają tarp suvartojamo vitamino B1 ir kolorektinio vėžio rizikos, šio tyrimo duomenys yra riboti, nes nėra vertinamas tiesioginis vitamino B1 poveikis *in vitro* vėžinių ląstelių biologiniams procesams [11]. Dėl šios priežasties būtini eksperimentiniai *in vitro* tyrimai, leidžiantys nagrinėti tiesioginį vitamino B1 poveikį navikinėms ląstelėms.

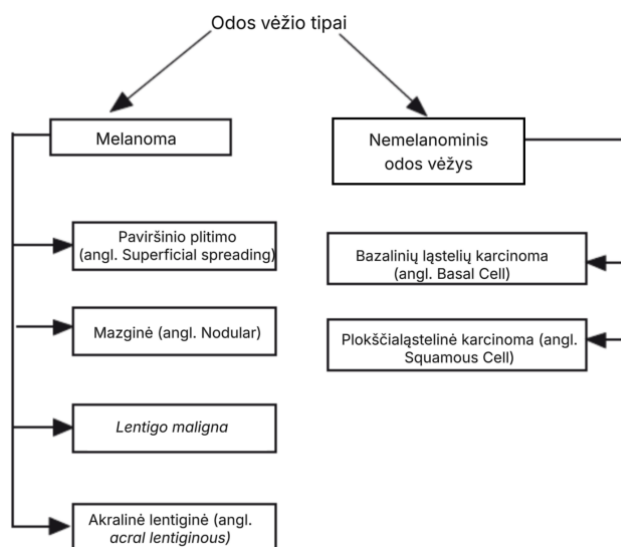
Antioksidacinių sistemų sutrikimai laikomi vieni iš reikšmingiausių mechanizmų, lemiančių melanomos vystymąsi ir atsparumą gydymui, todėl ROS molekules reguliuojantys junginiai gali būti aktualūs terapiniu požiūriu [6, 16]. Kadangi ALR ir B1 pasižymi

skirtingais ROS mažinimo mechanizmais, šių medžiagų poveikis oksidaciniam stresui *in vitro* melanomos ląstelėse gali būti reikšmingas vertinant jų potencialų priešproliferacinį, priešmigracinį ir bendrą priešnavikinį poveikį [7, 11].

3. LITERATŪROS APŽVALGA

6.1. Odos vėžys ir jo tipai

Odos vėžys priskiriamas prie dažniausiai diagnozuojamų onkologinių ligų visame pasaulyje, o jo sergamumo ir mirtingumo rodikliai daugelyje šalių nuosekliai didėja [1, 13]. Skirtingoms odos vėžio formoms būdingas nevienodas demografinis paplitimas, kilmė bei klinikiniai požymiai [13]. Piktybiniai odos navikai skirstomi į dvi pagrindines formas: melanomą ir nemelanominę odos vėžį (NMSC) (1 paveiksle pateikiama odos vėžio tipų klasifikacija), kurios sudaro daugiau nei 90 % visų odos vėžio atvejų [12, 13]. NMSC dažniausiai pasireiškia kaip bazalinių ląstelių karcinoma (BCC) arba plokščialąstelinė karcinoma (SCC) [14]. BCC yra dažniausia piktybinė odos navikinė liga, susiformuojanti iš epidermio bazalinio sluoksnio ląstelių. Tuo tarpu SCC, kylanti iš epidermio keratinocitų, yra antras pagal dažnumą odos vėžio tipas [14].



1 paveikslas. Odos vėžio tipų klasifikacija (remiantis Elgamal M. straipsniu [10]).

Priešingai nei NMSC, melanoma, kylanti iš melanino sintezę vykdančių ląstelių, t. y. melanocitų, diagnozuojama yra rečiau, tačiau pasižymi didesniu ligos agresyvumu dėl polinkio metastazuoti [16, 23]. Naviko piktybiškumą lemia keli pagrindiniai histopatologiniai rodikliai, tokie kaip naviko storis (angl. Breslow thickness), mitozinis aktyvumas bei regioninių limfmazgių pažeidimas, kurie koreliuoja su intensyvesne proliferacija ir didesne

metastazių rizika [15, 16]. Dažniausiai nustatoma paviršinio plitimo melanoma (angl. superficial spreading melanoma), kuriai būdingas pradinis radialinis augimas epidermyje, vėliau pereinantis į vertikalią invaziją, kai navikinės ląstelės infiltruojasi į dermą ir gilesnius audinius [16, 17]. Mazginė melanoma (angl. nodular melanoma) pasižymi agresyviausia eiga, nes nuo pat pradžių auga vertikaliai ir greitai infiltruojasi į gilesnius audinius, todėl siejama su prastesniu išgyvenamumu. *Lentigo maligna* tipo melanoma dažniausiai išsivysto vyresnio amžiaus asmenims ir yra susijusi su ilgalaikiu UV spinduliuotės poveikiu, o jos vystymasis dažniausiai yra lėtesnis [10, 16]. Rečiau besiformuojanti akralinė lentiginė melanoma (angl. acral lentiginous melanoma) lokalizuojasi delnų, padų ar nagų srityje ir yra diagnozuojama pažengusiose stadijose [10, 16].

Skirtingą melanomos tipų agresyvumą ir klinikinę eigą lemia ląstelėse vykstantys molekuliniai pokyčiai, įskaitant genetines mutacijas, tokias kaip BRAF, NRAS ar c-KIT, kurios aktyvuoja signalinius kelius, ypač MAPK/ERK, ir skatina nekontroliuojamą ląstelių proliferaciją [16]. Be genetinių veiksnių, svarbų vaidmenį atlieka ir pakitęs ląstelių metabolizmas bei redokso pusiausvyros sutrikimai [6]. Atsižvelgiant į melanomos vystymesi dalyvaujančių procesų visumą, didėja susidomėjimas junginiais, galinčiais moduluoti vėžinių ląstelių oksidacinį stresą, įskaitant ALR ir vitaminą B1 [7, 11].

6.2. Melanomos patogenezė

Oda yra ne tik apsauginis barjeras nuo mechaninių pažeidimų, bet ir aktyvus organas, kuriame nuolat vyksta ląstelių atsinaujinimas, melanino sintezė, termoreguliacija bei reakcijos į UV spinduliuotę [17]. Oda sudaryta iš trijų pagrindinių sluoksnių: epidermio, dermos ir poodinio audinio [17]. Epidermį daugiausia sudaro keratinocitai, tačiau jame taip pat randama melanocitų ir kitų ląstelių [17, 18]. Keratinocitai nuolat dauginasi baziniame epidermio sluoksnyje, migruoja į epidermio paviršių ir diferencijuojasi, kol galiausiai suformuoja raginį sluoksnį [17]. Kadangi keratinocitai ir melanocitai epidermyje sudaro glaudžiai sąveikaujančią funkcinę sistemą, keratinocitai išskiria signalines molekules, tokias kaip citokinai, augimo faktoriai bei melanocitus veikiančius signalinius mediatorius (pvz., α -MSH, endotelinas-1). Šios molekulės dalyvauja tarpląstelinėje komunikacijoje, reguliuoja melanocitų funkciją ir melanino sintezę [18, 20]. Sutrikus šių ląstelių sąveikos pusiausvyrai, aktyvuojama endokrininės ir imuninės sistemų sąveika, kurios gali skatinti uždegiminių mediatorių išsiskyrimą ir lemti odos uždegiminiuosius procesus [18]. Nors uždegiminiai procesai nėra tiesioginė melanomos priežastis, lėtinis uždegimas ir sutrikusi odos homeostazė gali

sukurti palankią mikroaplinką melanocitų genetiniams pokyčiams ir navikinių procesų inicijavimui, ypač esant UV spinduliuotės poveikiui [21, 22].

Melanomos vystymasis dažnai prasideda nuo pirminių genetinių mutacijų melanocituose, kurios gali lemti melanocitų hiperplaziją ir apgamų (nevių) susidarymą [22]. Vieni dažniausių genetinių pokyčių, aptinkamų melanocitiniuose apgamuose, yra BRAF mutacijos [22]. Remiantis Yang ir kt. „The genomic landscape of melanoma and its therapeutic implications“ apžvalginio mokslinio šaltinio, ankstyvosiose melanomos stadijose dažniausiai nustatomos BRAF, NRAS, KIT ir TERT promotoriaus mutacijos, o ligai progresuojant dažnai atsiranda CDKN2A, TP53 ir PTEN mutacijos, siejamos su agresyvesniu naviko augimu ir blogesne pacientų klinikine prognoze [24]. Manoma, kad apie 30 % melanomų išsivysto iš jau egzistuojančių melanocitinių apgamų (angl. Nevus-associated melanoma), o dauguma (apie 70 %) atsiranda odoje be aiškiai matomo apgamo (angl. *De novo* melanoma) [26, 62].

6.3. Melanomos progresavimas ir metastazavimas

Melanocitai pasižymi gebėjimu formuoti ir remodeluoti dendritus, proliferuoti ir migruoti baziniame epidermio sluoksnyje, taip sudarydami funkcinis epidermio- melanocitų vienetus. Melanocitų hiperproliferacija gali atsirasti dėl keratinocitų kontrolės praradimo [19]. Šios kontrolės sutrikimas gali būti susijęs su tarpląstelių kontaktų praradimu, keratinocitų sekrecinių signalų pokyčiais arba melanocitų sumažėjusiu jautrumu augimą slopinantiems veiksniams. Pradinėje radialinio augimo fazėje melanomos ląstelės išlieka epidermyje, tačiau progresuojant pirminiam navikui, ląstelės įgyja gebėjimą plisti į gretimus audinius ir patekti į kraujagysles. Navikinių ląstelių diseminacija vyksta limfogeniniu ir hematogeniniu keliu: per limfinę sistemą metastazės dažniausiai pirmiausia plinta į limfmazgius, o per kraujotaką navikinės ląstelės gali išplisti į tolimus organus [19, 20, 23]. Sisteminėje kraujotakoje cirkuliuojančios navikinės ląstelės geba sąveikauti su tikslinių organų kraujagyslių endotelium, adheruoti prie jo ir prasiskverbti per kraujagyslės sienelę į audinių parenchimą [23]. Tačiau ne visos šios ląstelės sugeba suformuoti metastazes, nes jų išgyvenimas ir kolonizacija priklauso nuo sąveikos su audinių mikroaplinka. Šie procesai yra glaudžiai susiję su vėžinių ląstelių metabolizmu ir oksidaciniu stresu [6, 23].

Limfovaskulinė invazija ir intensyvūs navikinių ląstelių proliferacijos procesai lemia itin agresyvų melanomos metastazavimą. Dėl didelio metastazavimo potencialo svarbu tirti medžiagas, galinčias slopinti metastazių formavimąsi [5].

6.4. Melanomos rizikos veiksniai

Tarp įvairių odos vėžio tipų melanoma išsiskiria klinikiniu reikšmingumu, o jos paplitimui reikšmingą įtaką daro odos fototipas ir ultravioletinė (UV) spinduliuotė [25]. Didžiausia sirgimo rizika tenka asmenims, turintiems šviesią, lengvai nudegančią odą (I-II fototipas), taip pat patyrusiems intensyvių protarpinių saulės poveikį ar stiprius nudegimus. Be aplinkos veiksnių, reikšmingas vaidmuo tenka ir genetiniam polinkiui, ypač esant gausiam melanocitinių apgamų skaičiui ar šeiminei melanomos anamnezei [25]. Taip pat nustatyta, kad melanomos riziką gali didinti nusilpusi imuninė sistema, vyresnis amžius bei dirbtinių UV spindulių šaltinių, tokių kaip soliariumai, naudojimas [2, 4].

UV spinduliuotė yra vienas iš svarbiausių melanomos etiologinių veiksnių ir yra skirstoma į tris pagrindinius potipus: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) ir UVC (100-290 nm) [27, 36]. UVC spinduliuotė yra beveik visiškai sugerama ozono sluoksnio ir nepasiekia Žemės paviršiaus, todėl tiesioginio poveikio melanomos vystymuisi neturi [27].

Kitaip nei UVC, UVA ir UVB spinduliai pasiekia odą ir biologiškai veikia melanocitus. UVB spinduliuotė daugiausia veikia epidermį, kuriame yra melanocitai, todėl sukelia tiesioginius DNR pažeidimus, formuodama ciklobutano pirimidino dimerus. Šie pažeidimai sutrikdo genetinės informacijos perdavimą ir sukelia mutacijas genuose, kurie reguliuoja ląstelių augimą bei diferenciaciją [27, 28]. Jei šie DNR pažeidimai nėra tinkamai pašalinami ląstelių DNR reparacijos mechanizmu, mutacijos gali kauptis ir lemti melanomos vystymąsi [27]. Tuo tarpu UVA spinduliai prasiskverbia giliau į odą ir veikia netiesiogiai, skatindami ROS susidarymą, taip lemdami oksidacinio streso atsiradimą [27, 28].

Be tiesioginio genotoksinio vaidmens, UV spinduliuotė slopina odos imuninę atsaką, taip sudarydama palankias sąlygas navikinių ląstelių prisitaikymui ir proliferacijai, o vėliau - metastazavimui [5, 21, 27]. UV spinduliuotė sukelia ROS koncentracijos didėjimą, o tai skatina navikinių ląstelių proliferaciją. Tačiau antioksidacinės sistemos pajėgumą viršijęs ROS kiekis gali sukelti ir ląstelių žūtį. Ši ROS pusiausvyra yra itin svarbi tiriant medžiagų, moduliuojančių oksidacinį stresą, poveikį [6, 21].

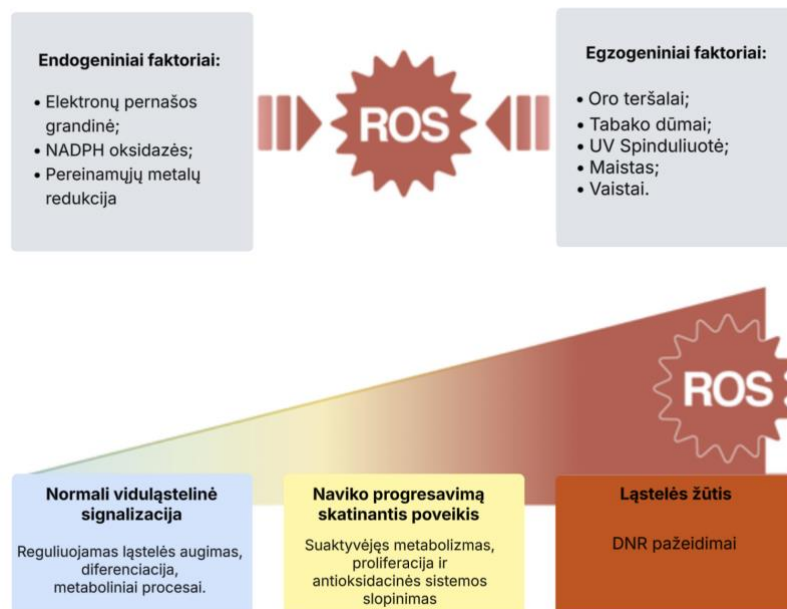
6.5. Oksidacinis stresas ir melanoma

2021 m. publikuotame apžvalginiame straipsnyje nurodoma, kad ROS apima tiek radikalinius, tiek neradikalinius junginius. Biologinėse sistemose svarbiausios ROS formos yra superoksido anijonas ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilo radikalas ($\bullet OH$) ir vandenilio peroksidas (H_2O_2), kurie dalyvauja oksidacinio streso, DNR pažaidos ir navikinių procesų reguliacijoje [34].

ROS, kaip pagrindinis oksidacinio streso indikatorius, susidaro aerobinio kvėpavimo metu, daugiausia mitochondrijų elektronų pernašos grandinėje. ROS generuojamos vykstant oksidaciniam fosforilinimui, ypač I ir III kompleksuose, kur elektronų pernašos metu susidaro $O_2^{\bullet-}$ [34, 35].

Esant vidutiniškai padidėjusiai ROS koncentracijai, melanomos ląstelėse jos veikia kaip svarbūs signaliniai veiksniai, skatinantys proliferaciją ir prisidedantys prie naviko progresavimo (žr. 2 paveikslą). Kita vertus, esant dideliame ROS kiekiui, šios molekulės pažeidžia mitochondrijas, DNR ir kitus ląstelės komponentus, todėl gali inicijuoti ląstelės žūtį. Atsižvelgiant į tai, ROS reikšmė melanomos ląstelėms priklauso nuo jų koncentracijos [48]. Aktualu tai, kad melanoma pasižymi gebėjimu prisitaikyti prie padidėjusio oksidacinio streso, aktyvindama endogenines antioksidacines sistemas ir redokso reguliacijos mechanizmus, tokius kaip GSH sistema bei Nrf2 signalinis kelias. Dėl šios adaptacijos proliferaciniai procesai gali tapti mažiau priklausomi nuo ROS koncentracijos pokyčių, todėl oksidacinio streso sumažinimas ne visada lemia reikšmingą proliferacijos slopinimą ar efektyvų terapinį atsaką taikant atitinkamą gydymą [68].

Melanomos ląstelėse autofagija gali veikti kaip apsauginis mechanizmas, mažinantis oksidacinį stresą ir užtikrinantis ląstelių išgyvenimą. Tačiau esant didelei ROS koncentracijai, autofagija gali prisidėti prie programuotos ląstelės žūties ir aktyvuoti apoptozę [50].



2 paveikslas. ROS vaidmuo ląstelės signalizacijoje ir naviko progresavime [65].

Apoptozės metu aktyvuotos kaspazės skaido citoskeleto ir branduolio struktūrinius baltymus bei aktyvina DNR fragmentaciją sukeliančius fermentus [63]. Ankstyvoje apoptozės

stadijoje fosfatidilserinas eksponuojamas išoriniame ląstelės membranos paviršiuje, veikiantis kaip signalas fagocitams, leidžia atpažinti ir pašalinti žūstančią ląstelę [63]. Vėlesniuose apoptozės etapuose vyksta nuoseklus DNR skaidymas internukleosominėse srityse, susidarant mažesniems fragmentams [63]. Šių procesų visuma lemia programuotą ląstelės žūtį, kuri navikiniame audinyje gali prisidėti prie naviko augimo slopinimo [63].

Apoptozės nustatymui svarbi ne tik biocheminių žymenų analizė (kaspazių aktyvumo testas), bet ir morfologinių pokyčių vertinimas mikroskopu [60, 63]. Minėtus pokyčius galima stebėti mikroskopu, vertinant būdingus apoptozės požymius: ląstelės tūrio sumažėjimą, chromatinio kondensaciją, plazminės membranos pūslėjimąsi bei deformaciją ir ląstelės suskaidymą į apoptotinius kūnelius [52, 60, 63].

Kadangi oksidacinio streso pokyčiai gali paveikti melanomos ląstelių gyvybingumą ir kitus biologinius procesus, *in vitro* tyrimuose svarbu vertinti ne tik antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų, tokių kaip ALR ir vitaminas B1, poveikį ROS kiekiui, bet ir jų įtaką ląstelių morfologiniams pokyčiams [48, 50].

6.6. Melanomos ląstelių proliferacija

Melanomos progresavimui būdinga nevaldoma navikinių ląstelių proliferacija, glaudžiai susijusi su ląstelės ciklo reguliacijos sutrikimais. Ląstelės ciklą kontroliuoja ciklinai ir ciklinui priklausomos kinazės (CDK) [31]. Sutrikus CDK aktyvumo ar jų sąveikos su ciklinais reguliacijai, ląstelės gali apeiti ciklo kontrolinius taškus (pavyzdžiui, G2/M) ir pradėti nekontroliuojamai daugintis [30]. Vienas svarbiausių reguliacinių mechanizmų yra CDK4/6 ir ciklino D kompleksas, kuris skatina ląstelės ciklo perėjimą iš G1 į S fazę. Šį procesą slopina RB baltymas, kuris reguliuoja E2F transkripcinių faktorių aktyvumą ir taip užtikrina, kad DNR replikacija vyktų tik esant tinkamoms sąlygoms [32]. Melanomos ląstelėse dažnai nustatomas p16^{INK4a} (CDKN2A) praradimas arba inaktyvacija, dėl ko padidėja CDK4/6 aktyvumas, sutrinka ląstelės ciklo kontrolė, taip skatinant naviko augimą [32, 33].

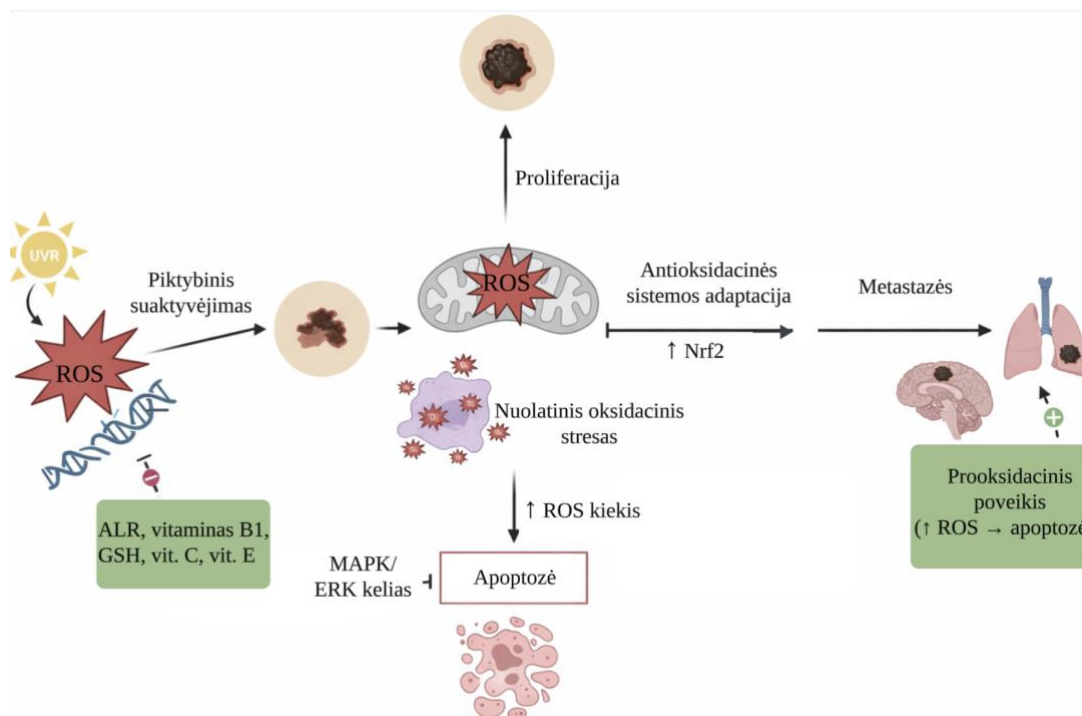
Atsižvelgiant į tai, kad proliferacija yra vienas svarbiausių naviko biologinių rodiklių, tyrimuose jos analizė yra būtina vertinant potencialų tiriamų junginių priešnavikinį aktyvumą [30, 47].

6.7. Antioksidantai ir oksidacinio streso reguliacija onkologijoje

Antioksidacinė sistema susideda iš fermentinių ir nefermentinių komponentų, kurie kartu neutralizuoja ROS ir palaiko ląstelės oksidacinių ir antioksidacinių procesų balansą. Fermentiniai antioksidantai, tokie kaip superoksido dismutazė (SOD), katalazė ir glutationo peroksidazė (GP), konvertuoja itin reaktyvias molekules į mažiau toksiškas formas [6, 37]. Nefermentiniai antioksidantai, įskaitant vitaminus C ir E, ALR, glutationą bei kofermentą Q10, gali tiesiogiai surišti laisvuosius radikalus, regeneruoti kitus antioksidantus [6].

Ląstelės signalinės sistemos, tokios kaip transkripcijos faktorius Nrf2, gali būti aktyvuojamos reaguojant į padidėjusį ROS [6, 51]. Nors transkripcijos faktorius Nrf2 paprastai laikomas svarbiu ląstelės apsauginiu mechanizmu, melanomos ląstelėse jo aktyvacija gali turėti priešingą veikimą [51].

Remiantis Malakoutikhah ir kt. autorių 2023 m. sistetine apžvalga, įrodyta, kad nuolatinė ar padidėjusi Nrf2 aktyvacija melanomos ląstelėse gali skatinti naviko progresavimą. Sumažindamas ROS kiekį, Nrf2 sudaro palankias sąlygas navikinėms ląstelėms išvengti oksidacinės pažaidos. Todėl Nrf2 aktyvacija siejama su sustiprėjusia melanomos ląstelių proliferacija, migracija ir invazija, taip pat su didesne rezistencija chemoterapijai ir kitoms gydymo strategijoms [51].



3 paveikslas. ROS vaidmuo melanomos progresavime ir jų moduliacija antioksidantais [50].

Antioksidantai taip pat gali pasižymėti prooksidacinėmis savybėmis, ypač esant padidėjusiam ROS kiekiui [50, 64]. Literatūroje nurodoma, kad prooksidacinis ALR poveikis gali būti susijęs su pereinamųjų metalų redukcija ir mitochondrijų funkcijos sutrikimais [40, 64]. Šie duomenys rodo, kad ALR gali pasižymėti tiek antioksidacinėmis, tiek prooksidacinėmis savybėmis [64].

Žinodami, jog ROS dalyvauja naviko formavimesi ir progresavime (žr. 3 paveikslą), svarbu tirti medžiagas, galinčias moduluoti jų kiekį. Dėl šios priežasties svarbu tirti antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų poveikį vėžinėms ląstelėms *in vitro*, ypač melanomos atveju, kurios sergamumo rodikliai pastaraisiais metais didėja [1, 37].

6.8. Alfa lipoinė rūgštis ir jos panaudojimas

Alfa lipoinė rūgštis (ALR) ir jos redukuota forma pavadinimu dihidrolipoinė rūgštis (DHLR), yra natūralūs antioksidantai, randami tiek augalų, tiek gyvūnų organizmuose [39, 41]. ALR sintetinama mitochondrijose, kur ji atlieka svarbią funkciją kaip fermentų kofaktorių energijos apykaitos procesuose [39]. Be endogeninės sintezės, ši medžiaga yra pasisavinama su maistu: jos randama raudonojo mėsoje, kepenyse bei žaliosiose daržovėse [39, 53].

Klinikinėje praktikoje vaistas plačiausiai taikomas diabetinės neuropatijos gydymui [39]. ALR taip pat naudojama insulino rezistencijos valdymui, nes gali gerinti gliukozės įsisavinimą ir slopinti uždegiminius procesus. Neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Alzheimerio ar Parkinsono liga, kontekste ALR vertinama dėl gebėjimo apsaugoti neuronus nuo oksidacinės pažeidimo ir palaikyti mitochondrijų funkciją [39, 54].

Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio skiriama ALR vaidmeniui onkologijoje. Tyrimai rodo, kad ši medžiaga gali moduluoti ROS kiekį ir veikti signalinius kelius, tokius kaip Nrf2 ir MAPK/ERK, susijusius su ląstelių proliferacija bei apoptoze, todėl ALR laikoma perspektyviu priešnavikiniu junginiu [16, 39, 51].

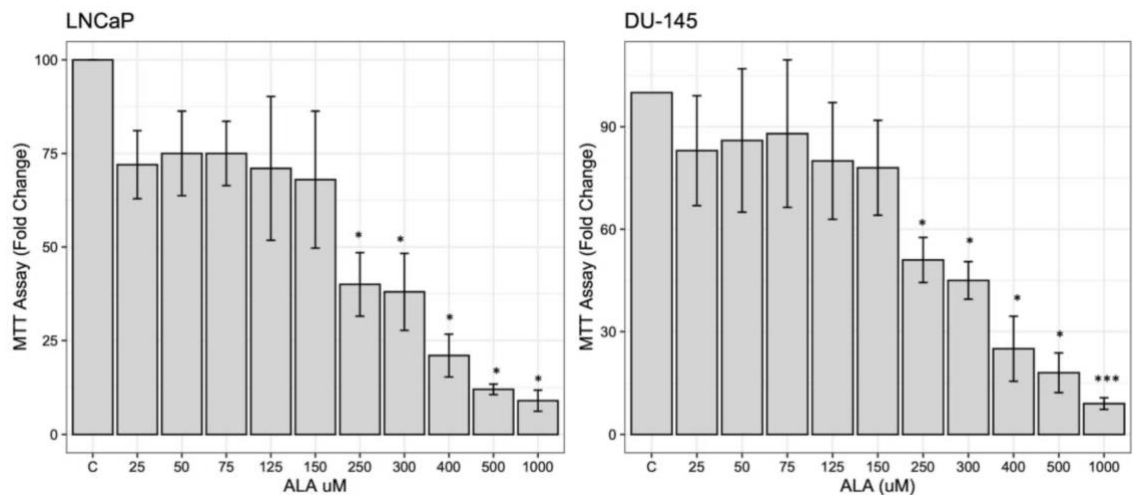
6.9. Alfa lipinės rūgšties antioksidacinis poveikis onkologijoje

Tiek oksiduota ALR, tiek redukuota DHLR pasižymi antioksidaciniu poveikiu ir gali mažinti ROS [39]. DHLR taip pat geba regeneruoti kitus endogeninius antioksidantus, tokius kaip vitaminai C ir E [40, 41]. Be to, abi formos gali neutralizuoti hidroksilo radikalus, hipochlorito rūgštį bei aktyvias deguonies ir azoto rūšis [40].

ALR pasižymi ir netiesioginiu antioksidaciniu poveikiu: gali cheliuoti metalų jonus (oksiduota forma jungiasi su Cu^{2+} ir Zn^{2+} , o DHLR - su Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+}) bei regeneruoti

GSH ir kitus endogeninius antioksidantus [40, 42]. Aktualu ir tai, kad ALR gali aktyvinti antioksidacinius signalinius kelius, tokius kaip Nrf2 [39]. Dėl šių savybių ALR ir DHLR gali stiprinti ląstelės antioksidacinę apsaugą [42].

S. Bossio ir bendraautorių *in vitro* tyrime buvo nagrinėtas ALR poveikis žmogaus prostatos vėžio ląstelių linijoms LNCaP ir DU-145. Ląstelės buvo veikiamos skirtingomis ALR koncentracijomis (25-1000 μ M), o po 48 val. jų gyvybingumas ir proliferacija vertinti MTT testu (4 pav.), o migracija žaizdos gijimo metodu [43].



4 paveikslas. Tyrimo metu nagrinėta prostatos ląstelių kultūros proliferacija, veikiant jas skirtingomis ALR koncentracijomis. Ląstelių proliferacija lyginama su kontrole [43].

Tyrimo rezultatai atskleidė ALR gebėjimą didesnėmis koncentracijomis slopinti proliferaciją ir moduluoti ROS koncentraciją. *In vitro* tyrimas buvo atliktas su prostatos vėžio ląstelėmis, todėl jo rezultatai negali būti tiesiogiai pritaikomi melanomos SK-MEL-28 ląstelių modeliui [43]. Vis dėlto šie duomenys leidžia manyti, kad ALR biologinis poveikis gali skirtis priklausomai nuo ląstelių tipo, todėl jos veikimo tyrimai melanomos ląstelių linijose yra aktualūs siekiant įvertinti galimus oksidacinio streso moduliavimo mechanizmus.

ALR veikimas *in vitro* sąlygomis buvo tirtas tik prostatos vėžio ląstelių modelyje, todėl trūksta tyrimų, nagrinėjančių jos poveikį kitų tipų navikinėms ląstelėms, pvz., melanomos. Todėl reikalingi tolimesni tyrimai, siekiant įvertinti jos įtaką oksidacinio streso procesams ir galimiems biologiniams veikimo mechanizms.

6.10. Vitaminas B1 ir jo panaudojimas

Vitaminas B1 (kitaip tiaminas) yra gyvybiškai svarbus junginys, reikalingas subalansuotai ląstelių veiklai [46]. Siekiant pagerinti jo pasisavinimą ir biologinį prieinamumą, naudojami tiamino dariniai, tokie kaip benfotiaminas. Pastarasis yra riebaluose

tirpus junginys, pasižymintis geresniu bioprieinamumu nei pats tiaminas [55]. Žarnyne benfotiaminas po defosforilinimo paverčiamas į tiaminą, kuris ląstelėse metabolizuojamas į aktyvią formą - tiamino difosfatą (TPP) [46, 55].

Klinikinėje praktikoje tiaminas daugiausia naudojamas jo trūkumo sukeltų būklių, tokių kaip beriberi liga ir Wernicke-Korsakoff sindromas, gydymui bei profilaktikai [56]. Jis taip pat yra reikšmingas gydant metabolinius sutrikimus, įskaitant cukrinį diabetą ir insulino rezistenciją [54, 58]. Nervų sistemoje vitaminas B1 prisideda prie nervinių impulsų perdavimo, todėl vis dažniau tiriamas jo panaudojimas neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Alzheimerio ar Parkinsono liga, kontekste [54, 59]. O tiamino dariniai, kaip benfotiaminas, taikomi diabetinės neuropatijos ligos atvejais [57].

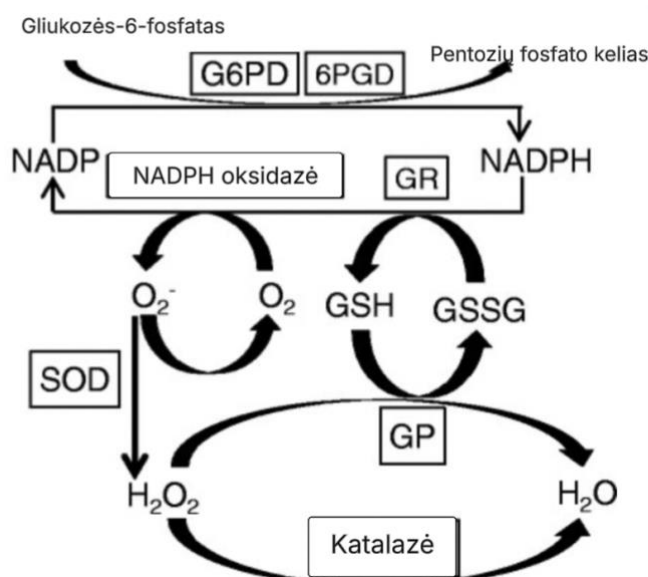
Kadangi ROS reguliacija yra svarbūs ne tik metabolinių bei neurodegeneracinių ligų, bet ir navikinių procesų mechanizmai, vitaminas B1 gali būti aktualus ir melanomos kontekste [44, 54]. Dėl gebėjimo netiesiogiai moduluoti redokso homeostazę per TPP priklausomų fermentų aktyvumą, šio vitamino poveikio vertinimas melanomos ląstelių modeliuose yra svarbus analizuojant ROS pokyčius bei su jais susijusius ląstelinius procesus, tokius kaip proliferacija, autofagija ir apoptozė [46].

6.11. Vitamino B1 antioksidacinis poveikis onkologijoje

Vitaminas B1 gali veikti ROS reguliaciją tiek antioksidaciniu, tiek metaboliniu būdu [46]. Metabolinis šio vitamino poveikis siejamas su TPP, kuris veikia kaip kofaktorius fermentams piruvato dehidrogenazei ir α -ketoglutarato dehidrogenazei, dalyvaujantiems mitochondrijų energijos apykaitoje. Šių fermentų aktyvumas yra svarbus efektyviai ATP sintezei ir stabiliai mitochondrijų funkcijai palaikyti, todėl gali mažėti perteklinė ROS gamyba ląstelėse [44,46]. Kadangi navikinėms ląstelėms būdingas pakitęs energinis metabolizmas, vitaminas B1 ir jo dariniai gali reguliuoti jų metabolinius procesus [46, 55].

TPP veikia kaip transketolazės kofaktorius neoksidacinėje pentozių fosfato kelio fazėje [44, 46]. Transketolazė katalizuoja dviejų anglies atomų fragmentų perkėlimą tarp fosforilintų cukrų, tokių kaip ribozės-5-fosfatas ir ksiluliozės-5-fosfatas. Šių reakcijų metu susidaro metabolitai, įskaitant gliceraldehido-3-fosfatą ir fruktozės-6-fosfatą, kurie gali būti panaudojami glikolizėje bei prisidėti prie pentozių fosfato kelio aktyvumo palaikymo. Taip palaikomas NADPH generavimas oksidacinėje fazėje (žr. 5 paveikslą) [46, 66]. NADPH būtinas glutationo reduktazės (GR) katalizuojamai reakcijai, kurios metu GSSG

redukuojamas į aktyvią GSH formą. GSH yra vienas svarbiausių ląstelės antioksidantų, apsaugančių baltymus, lipidus ir DNR nuo oksidacinės pažeidimo [9, 66]. Be to, superoksido anijonas ($O_2^{\bullet-}$), susidarantis veikiant NADPH oksidazei, dalyvaujant SOD paverčiamas į H_2O_2 , kuris vėliau neutralizuojamas glutationo peroksidazės arba katalazės iki vandens [66].



5 paveikslas. Ląstelės redokso sistemos ciklas, susijęs su pentozių fosfato kelio oksidacinėje fazėje susidarantiu NADPH, ROS ir GSH [66].

Atsižvelgiant į vitamino B1 vaidmenį metaboliniuose procesuose, jo poveikis ląstelėms buvo tirtas ir eksperimentiniuose modeliuose. 2014 metais Hanberry BS ir kt. publikuotame tyrime „High dose vitamin B1 reduces proliferation in cancer cell lines analogous to dichloroacetate“ buvo nagrinėtos žmogaus vėžio ląstelių linijos (SK-N-BE ir Panc-1) ir analizuojama skirtingų vitamino B1 koncentracijų (0,00001 mM-100 mM) įtaka ląstelių proliferacijai bei ROS kiekiui *in vitro* modeliuose. Nustatyta, kad vitamino B1 vaidmuo vėžinių ląstelių proliferacijai yra priklausomas nuo dozės: esant žemoms koncentracijoms proliferacija statistiškai nereikšmingai neslopinama ir gali būti net didėjanti, o esant didelėms koncentracijoms - reikšmingai slopinama [47].

Veikiant didesnėmis vitamino B1 koncentracijomis (~1–10 mM), ląstelių proliferacija sumažėjo apie 25–50 %. Šis poveikis buvo panašus į dichloroacetato, piruvato dehidrogenazės kinazės inhibitoriaus, veikimą [47]. Įvertinta, kad vitaminas B1 mažina piruvato dehidrogenazės fosforilinimą, taip didindamas šio fermento aktyvumą. Be to, jis mažina gliukozės suvartojimą ir laktato gamybą bei didina kaspazės-3 aktyvumą, rodantį apoptozės suaktyvėjimą ir sumažėjusį ląstelių gyvybingumą [46, 47]. Panašūs rezultatai nustatyti ir kituose tyrimuose, kuriuose vertintas vitamino B1 poveikis navikinių ląstelių proliferacijai.

2018 m. X. Liu ir bendraautorių tyrime buvo analizuota vitamino B1 įtaka sveikų krūties epitelinių (MCF10A) ir krūties vėžio (MCF7) ląstelių proliferacijai, naudojant MTT metodą [69]. Buvo įrodyta, kad MCF7 ląstelių proliferacija taip pat mažėjo priklausomai nuo tiriamosios medžiagos koncentracijos. Mažos dozės reikšmingo poveikio neturėjo, tačiau didesnės koncentracijos (0,5 µg/mL arba 1,48 µM) slopino proliferaciją [69].

Yuan Liu su bendraautoriais atliktos sisteminės apžvalgos duomenys leido manyti, jog didesnis vitamino B1 suvartojimas gali būti susijęs su mažesne kolorektinio vėžio rizika [11]. Nors sisteminės apžvalgos rezultatai nurodė atvirkštinę sąsają tarp su maistu suvartojamo vitamino B1 ir kolorektinio vėžio rizikos, šio tyrimo duomenys yra riboti: nėra vertinamas B1 poveikis vėžinių ląstelių gyvybingumui, proliferacijai [11].

Literatūroje B1 siejamas su antioksidacinėmis savybėmis, nes TPP priklausomi fermentai dalyvauja procesuose, susijusiuose su ROS neutralizacija [44, 46, 47]. Vis dėlto daugumoje šio vitamino tyrimų buvo naudotos ne odos vėžio ląstelių linijos ir ne *in vitro* eksperimentų modeliai. Dėl riboto duomenų kiekio apie vitamino B1 poveikį SK-MEL-28 ląstelėms, šis tyrimas gali prisidėti vertinant tinkamų koncentracijų parinkimą bei galimas poveikio tendencijas [46].

Aktualu ir tai, jog atliktas *in vitro* tyrimas leidžia papildyti literatūroje pateikiamus prieštarigus duomenis apie vitamino B1 vartojimą onkologinių pacientų tarpe [29]. Kadangi skirtinguose tyrimuose aprašomas nevienodas B1 poveikis navikinėms ląstelėms, šio tyrimo rezultatai gali prisidėti prie išsamesnio vitamino B1 biologinio veikimo melanomos ląstelėse vertinimo.

6.12. SK-MEL-28 ląstelių linija

SK-MEL-28 yra žmogaus melanomos ląstelių linija, išskirta iš odos audinio ir dažnai taikoma kaip *in vitro* modelis melanomos biologiniams procesams tirti. Remiantis American Type Culture Collection duomenų bazės informacija, SK-MEL-28 ląstelės yra adherentinės žmogaus melanomos ląstelės, todėl jos gali būti kultivuojamos ir taikomos *in vitro* tyrimuose [60]. Melanoma pasižymi dideliu agresyvumu, kuris pasireiškia sparčia ląstelių proliferacija, migracija ir atsparumu terapiniams veiksniams, todėl tokios ląstelių linijos kaip SK-MEL-28 gali būti pasitelkiamos naviko biologijai bei atsakui į įvairius gydymo metodus tirti [19, 23].

Nors SK-MEL-28 ląstelių linija naudojama navikinių ląstelių tyrimuose, šioje ląstelių linijoje vis dar nebuvo tirtas ALR ir B1 poveikis oksidacinio streso rodikliams. Atsižvelgiant į ribotą duomenų kiekį apie šių medžiagų efektą ląstelių gyvybingumui, ROS lygiui ir

migracijai, šios ląstelių linijos taikymas leidžia įvertinti tiriamų medžiagų biologinį poveikį melanomos ląstelėms bei jų antioksidacinį ir potencialų priešnavikinį poveikį [5, 6, 9].

7. TYRIMO METODIKA

7.1. Medžiagos

- 1) Vitaminas B1 buvo naudotas iš Wörwag Pharma firmos 300 mg plėvele dengtų tablečių (Vokietija)*;
- 2) ALR naudota iš Wörwag Pharma firmos 600 mg plėvele dengtų tablečių (Vokietija)*;
- 3) Rinkinys skirtas ląstelių kiekiui suskaičiuoti - CCK8 rinkinys (Sigma- Aldrich, Japonija);
- 4) Fluorometrinis viduląstelinis ROS rinkinys - laboratorinis rinkinys, skirtas ROS kiekiui ląstelėse nustatyti pasitelkiant fluorescenciją (Sigma-Aldrich-JAV);
- 5) Tripano mėlio tirpalas - ląstelių dažiklis (Sigma-Aldrich, JAV);
- 6) PBS - fosfatinis buferinis tirpalas (VWR, Prancūzija).

** Tyrimas nebuvo finansuojamas ar remiamas Wörwag Pharma firmos, o autoriai negavo jokio finansinio atlygio, susijusio su šiuo tyrimu.*

7.2. Terpės ir jų priedai

- 1) DMEM - terpė (Life Technology, JAV);
- 2) FBS - terpės priedas, turintis augimo faktorių, hormonų, baltymų (Biological Industries, Izraelis);
- 3) Tripsino 0,25 % ir EDTA tirpalas - tai fermentinis tirpalas, skirtas prilipusių ląstelių atskyrimui nuo kultūros indo paviršiaus (Lonza, Belgija);
- 4) Penicilino/streptomicino tirpalas (Lonza, Belgija).

Papildomos eksperimento priemonės:

- 1) 15 ir 50 ml tūrio konusiniai mėgintuvėliai;
- 2) 1,5 ml mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai;
- 3) 10, 250 ir 1000 µl tūrio pipetavimo antgaliai (Techno Plastic Products, TPP, Švedija);
- 4) 10 ir 50 ml tūrio švirkštai (B. Braun, Vokietija).

7.3. Darbo prietaisai

- 1) ESCO® CelCulture CO₂ inkubatorius, pagamintas ESCO® kompanijos JAV;
- 2) Infinite® M Nano+ mikroplokštelių spektrofotometras, pagamintas Tecan kompanijos Šveicarijoje;
- 3) Invitrogen™ EVOS™ XL Core Imaging System- apversto šviesinio mikroskopo sistema, pagaminta Thermo Fisher Scientific JAV;
- 4) Multi Vortex V-32 laboratorinis maišytuvas (vorteksas), iš BioSan Latvijos;
- 5) Centrifuga 5804R, pagaminta kompanijos Eppendorf JAV;
- 6) Fisher Scientific analytical series analitinės svarstyklės pagaminta JAV;
- 7) Airstream® Gen 3 Class II Biological Safety Cabinet laminarinio oro srauto spinta, pagaminta kompanijos Esco Singapūre;
- 8) Neubauer'io skaičiavimo kamera Blaubrand filmos, iš Vokietijos;
- 9) 96 šulinėlių mikroplokštelės;
- 10) Automatinė vaizdinimo sistema, Curiosis Celloger Mini Plus su integruota vaizdų analizės programine įranga iš Curiosis, JAV.

7.4. Tyrimo objektai

1. Melanomos SK-MEL-28 ląstelių linija;
2. Alfa lipoinė rūgštis;
3. Vitaminas B1.

7.5. Melanomos ląstelių kultivavimas

SK-MEL-28 ląstelės buvo kultivuojamos 25 cm² paviršiaus ploto flakonuose, auginamos 5 ml DMEM terpėje su priedais. Ląstelės laikytos inkubatoriuje 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂ atmosferai. Augimo terpė buvo keičiama kas 2-3 dienas. Ląstelėms suformavus monosluoksnį, jos buvo persėjamos. Ląstelėms atskirti nuo substrato naudotas 0,25 % tripsino ir 0,1 % EDTA tirpalas, o disociacija stebėta mikroskopiškai. Po disociacijos ląstelės buvo resuspenduojamos šviežioje terpėje ir pasėjamos į naujus auginimo indus. Visos procedūros atliktos aseptiškai, laminarinio oro srauto spintoje, naudojant sterilius reagentus. Gauta ląstelių suspensija buvo naudojama tyrime.

Remiantis American Type Culture Collection (ATCC) duomenų baze, SK-MEL-28 ląstelėms būdinga prilipusi epitelinių ląstelių formos morfologija su fibroblastų tipo verpstės formos ląstelėmis ir netaisyklingais ląstelių kontūrais [60]. Prieš eksperimentą stebėta ląstelių kultūra atitiko šiame šaltinyje aprašytas ląstelių charakteristikas.

7.6. Melanomos ląstelių gyvybingumo nustatymas

Ląstelių gyvybingumas nustatomas taikant standartinį tripano mėlio dažymo metodą, naudojant Neubauer'io skaičiavimo kamerą. Metodas paremtas negyvų ląstelių membranos pralaidumu dažui. Neubauer'io kameros didžiuosiuose kvadratuose buvo suskaičiuotas bendras ląstelių skaičius (žr. 6 pav.), po to atskirai įvertintas gyvų (nenusidažiusių nuo tripano mėlio dažo) ląstelių skaičius. Gauti duomenys buvo naudojami skaičiavimuose, įstatant reikšmes į standartines formules ląstelių gyvybingumui nustatyti.

Ląstelių suspensija buvo ruošama PBS tirpale. Skaičiavimui 30 μ l PBS buvo sumaišyta su 20 μ l ląstelių suspensijos ir 50 μ l 0,4 % tripano mėlio tirpalo. Mišinys inkubuojamas 1 minutę, po to užpildoma skaičiavimo kamera ir uždengiama dengiamuoju stikleliu.

Ląstelių gyvybingumo skaičiavimas:

- 1) Ląstelių skaičius 1 ml = $13 \times 5 \times 10^4 = 650000$ ląst./ml
- 2) Bendras ląstelių kiekis = $650000 \times 7 = 4550000$ ląst.
- 3) Ląstelių gyvybingumas (%) = $\left(\frac{4112500}{4550000}\right) \times 100\% = 90,38\%$



6 paveiklas. SK-MEL-28 ląstelių skaičiavimas Neubauer'io kameroje, naudojant tripano mėlio dažą. Raudonu rėmeliu pažymėtas vienas iš Neubauer'io kameros skaičiavimo kvadratų, naudotų ląstelių skaičiavimui. Nuotrauka paimta iš asmenių archyvų.

Prieš eksperimentą nustatytas ląstelių gyvybingumas buvo 90,38%, todėl ląstelių suspensija laikyta tinkama tolimesniam tyrimui.

7.7. Eksperimentinės grupės

Melanomos SK-MEL-28 ląstelių linijos proliferacijai, migracijai ir ROS kiekiui įvertinti buvo sudarytos tyrimo grupės (pateikiama 1-oje lentelėje): kontrolinė bei trys eksperimentinės grupės su paskaičiuotomis skirtingomis koncentracijomis (ALR ir B1). Atlikus tyrimą, eksperimentinių grupių duomenys buvo lyginami su kontrolinės grupės duomenimis.

Tyrimo grupės pavadinimai	Medžiagos	Koncentracijos
Kontrolinė	Dulbecco modifikuota Eagle terpė	-
Eksperimentinė grupė 1	Alfa lipoinė rūgštis	1 μ M
Eksperimentinė grupė 2	Alfa lipoinė rūgštis	500 μ M
Eksperimentinė grupė 3	Alfa lipoinė rūgštis	1 mM
Eksperimentinė grupė 4	Vitaminas B1	10 μ M
Eksperimentinė grupė 5	Vitaminas B1	500 μ M
Eksperimentinė grupė 6	Vitaminas B1	1 mM

1 lentelė. *Melanomos SK-MEL-28 ląstelių linijos tyrimo grupių pavadinimai, jų medžiagos ir koncentracijos.*

ALR ir Vitaminas B1 buvo gauti iš tablečių formos preparatų. Tabletės pirmiausia buvo susmulkintos grūstuvėje iki vientisos miltelių masės, po to pasverta reikiama veikliosios medžiagos masė. Skaičiuojant koncentracijas buvo atsižvelgta į veikliosios medžiagos kiekį tabletėje. Iš susmulkintos medžiagos buvo paruošti pradiniai tirpalai su vitamino B1-100 mM, o ALR-10 mM koncentracijomis, ištirpinant juos DMEM terpėje. Iš šių tirpalų buvo ruošiami darbiniai, eksperimentines grupes atitinkantys, tirpalai, atliekant nuoseklius skiedimus kultūrinėje terpėje iki reikiamų galutinių koncentracijų. Visi tirpalai buvo ruošiami aseptinėmis sąlygomis ir naudojami eksperimentuose nedelsiant po paruošimo.

7.8. Melanomos ląstelių proliferacijos nustatymas

Melanomos SK-MEL-28 ląstelių proliferacija buvo analizuojama taikant Cell Counting Kit-8 (CCK-8) metodą. Šis metodas grindžiamas tuo, kad metaboliškai aktyviose ląstelėse esančios dehidrogenazės redukuoja vandenyje tirpią tetrazolio druską WST-8 į spalvotą, tirpų

formazano junginį. Susidariusio produkto kiekis nustatomas spektrofotometriškai, o jo intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas gyvybingų ląstelių skaičiui mėginyje. CCK-8 metodas pasižymi dideliu jautrumu ir nereikalauja papildomo formazano tirpinimo etapo, skirtingai nei kiti tetrazolio pagrindu paremti metodai (pvz., MTT ar XTT) [67].

SK-MEL-28 ląstelių suspensija buvo pasėta į 96 šulinėlių plokštelę, į kiekvieną šulinėlį įsėjant po 8000 ląstelių 200 μ l mitybinės terpės tūryje. Ląstelės buvo inkubuojamos 16 val. 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂. Po inkubacijos terpė buvo pakeista, įterpta tiriamoji medžiaga, ir ląstelės toliau inkubuotos tomis pačiomis sąlygomis. Į kiekvieną šulinėlį buvo pridėta po 10 μ l CCK-8 reagento, o plokštelė inkubuota dar 2 val. 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂. Absorbancija buvo matuojama 450 nm bangos ilgiu naudojant mikroplokštelių skaitytuvą. Ląstelių proliferacija buvo vertinama po 24, 48 ir 72 val. Siekiant papildomai pagrįsti kiekybinius duomenis, buvo fiksuojamos mikroskopinės ląstelių nuotraukos naudojant ląstelių vaizdinimo sistemą.

7.9. Melnomos ląstelių reaktyviųjų deguonies formų nustatymas

Melnomos SK-MEL-28 ląstelių ROS koncentracija buvo nustatyta fluorometrinio metodu, naudojant fluorescencinį indikatorį DCF-DA (2',7'-dichlorofluoresceino diacetatą). Metodas pagrįstas tuo, kad į ląsteles patekęs nefluorescuojantis junginys oksiduojamas ROS ir virsta fluorescuojančiu produktu - 2',7'-dichlorofluoresceinu (DCF), kurio fluorescencijos intensyvumas tiesiogiai proporcingas ROS kiekiui ląstelėse [38].

SK-MEL-28 ląstelės buvo pasėtos į 96 šulinėlių plokštelę, į kiekvieną šulinėlį įpilant po 200 μ l ląstelių suspensijos. Ląstelės inkubuotos 16 val. 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂. Po pirminės inkubacijos į šulinėlius buvo įpilti tiriamieji tirpalai, o ląstelės toliau inkubuotos 24, 48 ir 72 val. Pasibaigus inkubacijai, terpė buvo pašalinta, o ląstelės 1 val. inkubuotos su DCF-DA indikatoriumi. Po dažymo tirpalas pašalintas, į kiekvieną šulinėlį įpilta po 100 μ l PBS. Fluorescencijos intensyvumas buvo matuojamas 495- 525 nm bangos ilgio intervale, naudojant Tecan mikroplokštelių skaitytuvą. Papildomai fluorescencinio signalo pasiskirstymas ląstelėse buvo nagrinėtas ir fluorescencinėmis nuotraukomis.

7.10. Melnomos ląstelių migracijos nustatymas

Ląstelių suspensija, paruošta auginimo terpėje, buvo perkelta į plokšteles ir inkubuota 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂ atmosferai. Melnomos ląstelių migracija buvo stebima naudojant inkubatoriuje integruotą „Curiosis Celloger“ registravimo sistemą, kuri nustatytais

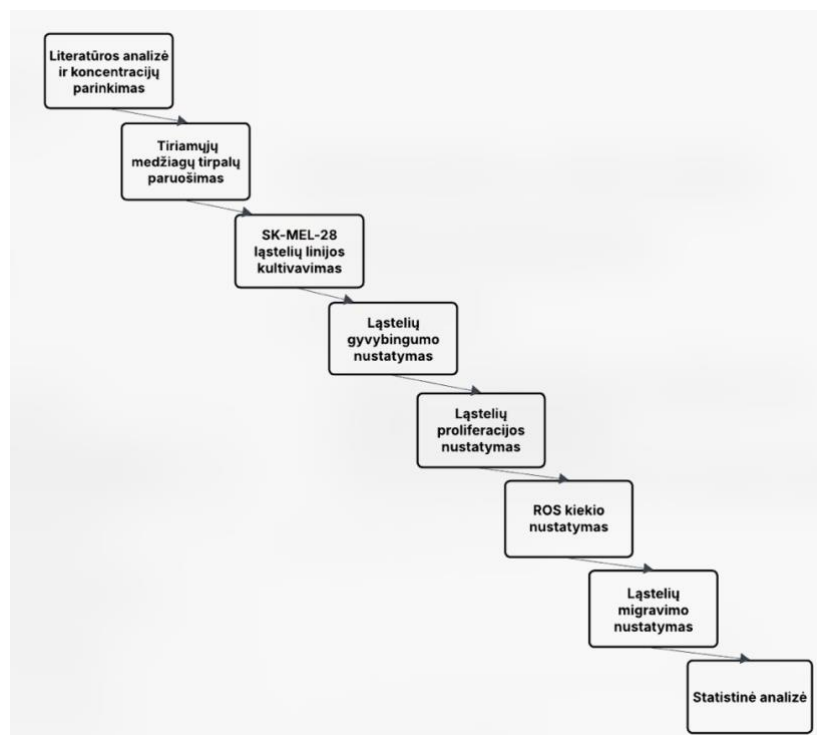
laiko intervalais (0, 12, 24, 36 ir 48 val.) fiksavo ląstelių vaizdus. Vaizdų analizė atlikta naudojant „Curiosis Celloger Mini Plus Analysis” programinę įrangą, į kurią buvo įkelti gauti vaizdai; analizė vykdyta automatizuotai, programiškai nustatant ir apskaičiuojant segmentuotų ląstelių užimamą plotą. Ląstelių užimamo ploto pokytis (angl. Confluence) buvo apskaičiuotas pagal formulę $(C_t - C_0) / (100 - C_0)$, kur C_0 žymi pradinį ląstelių užimamą plotą (%), o C_t - ląstelių užimamą plotą (%) atitinkamu laiko momentu. Fiksuoti migracijos vaizdai buvo palyginti ir analizuoti rezultatų skyriuje.

7.11. Statistinė analizė

Visi eksperimentai buvo atlikti ne mažiau kaip trimis nepriklausomais pakartojimais. Eksperimentinių duomenų statistinė analizė atlikta naudojant „R Commander” programinę įrangą, taikant vienfaktorinę dispersinę analizę (ANOVA). Po jos buvo taikytas Dunnett post hoc testas, siekiant įvertinti, ar eksperimentinių tyrimų rezultatai statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės (DMEM terpės) grupės. Statistiškai reikšmingu laikytas skirtumas, kai $p \leq 0,05$. O eksperimentinių duomenų grafinė vizualizacija atlikta naudojant „Microsoft Excel“ programinę įrangą (versija 16.108).

7.12. Tyrimo seka

Preliminari tyrimo seka, nurodanti eksperimentinio tyrimo eiliškumą, pavaizduota 7 paveiksle.



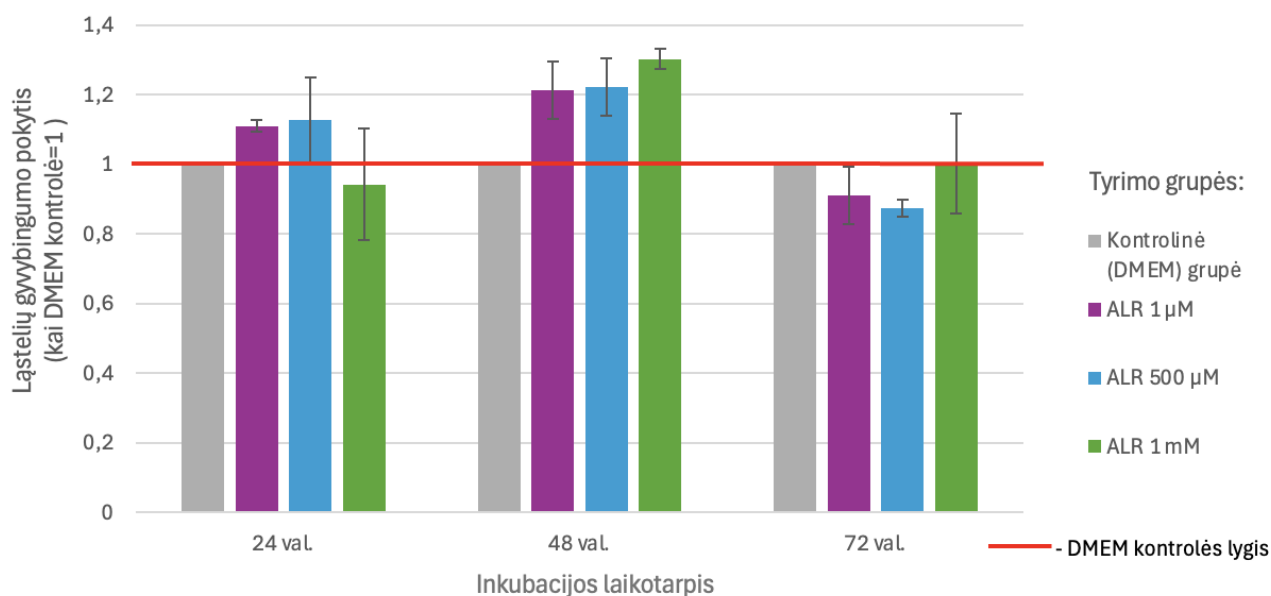
7 paveikslas. Eksperimentinio tyrimo seka. Paveikslo schema sudaryta naudojant „Lucidchart“ programą (Lucid Software Inc., JAV).

8. REZULTATAI

8.1. Alfa lipoinės rūgšties rezultatai

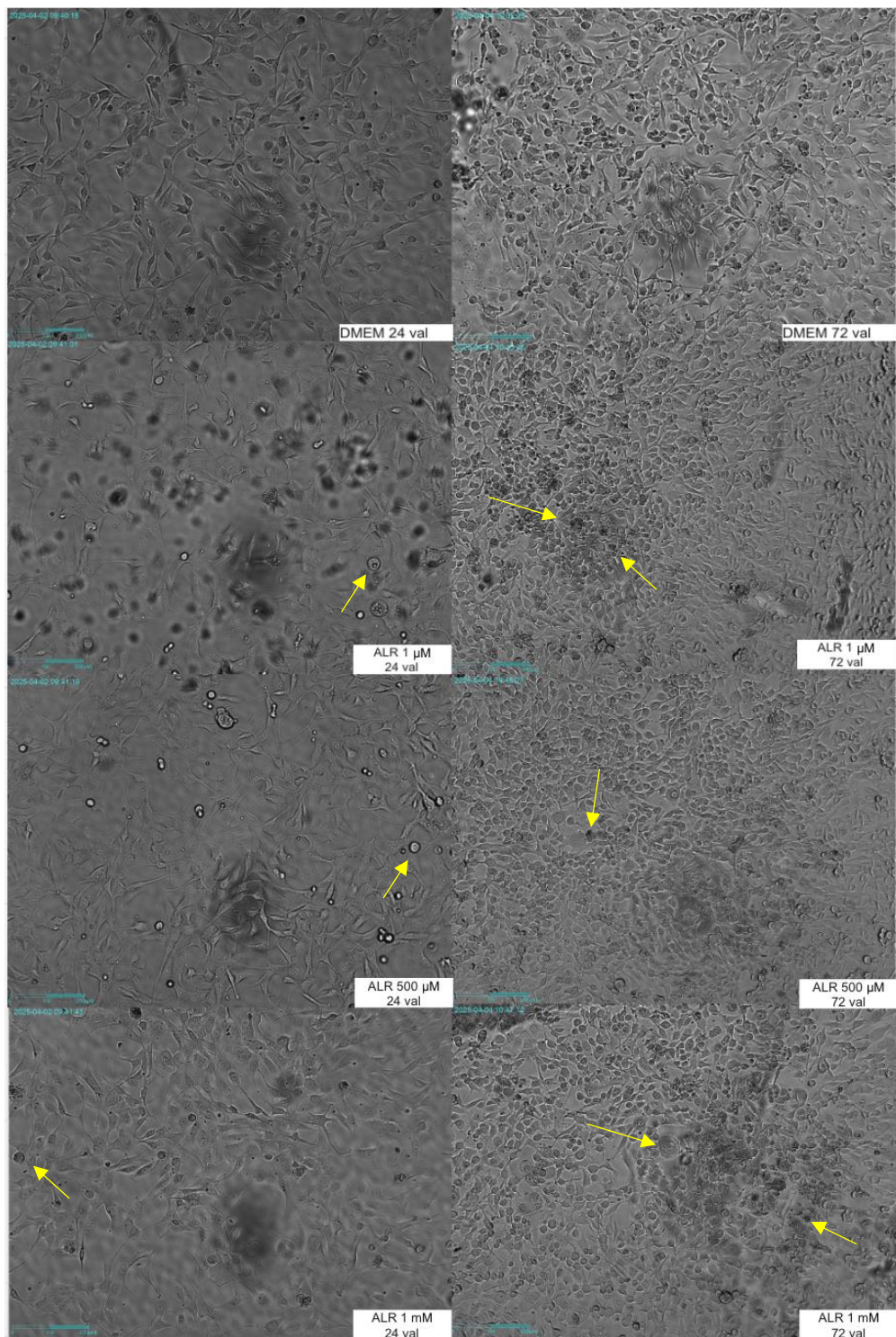
8.1.1. Alfa lipoinės rūgšties poveikis melanomos ląstelių proliferacijai

Eksperimente buvo analizuojamas ALR poveikis SK-MEL-28 ląstelių gyvybingumui, kaip netiesioginiam proliferacijos rodikliui (žr. 8 paveikslą).



8 paveikslas. Skirtingų ALR koncentracijų ($1 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ ir 1mM) poveikis SK-MEL-28 ląstelių gyvybingumui po 24, 48 ir 72 val. inkubacijos. Duomenų reikšmės normalizuotos kontrolinės (DMEM) grupės atžvilgiu.

Analizavus ALR įtaką skirtingais laiko tarpais tiriamosiose grupėse, nė vienu inkubaciniu metu nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų, lyginant su DMEM kontrole. Atlikta statistinė analizė nurodė rezultatus: po 24 val. $p = 0,39$, po 48 val. $p = 0,0632$, o po 72 val. $p = 0,317$, tad visais atvejais p reikšmės viršijo statistinio reikšmingumo ribą ($p > 0,05$).



9 paveikslas. Mikroskopinės nuotraukos, vaizduojančios skirtingų ALR koncentracijų ($1\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$ ir $1\ \text{mM}$) poveikį SK-MEL-28 ląstelių morfologijai po 24 ir 72 val. inkubacijos, lyginant su kontroline DMEM grupe. Geltonomis rodyklėmis pažymėtos ląstelės su morfologiniais pokyčiais.

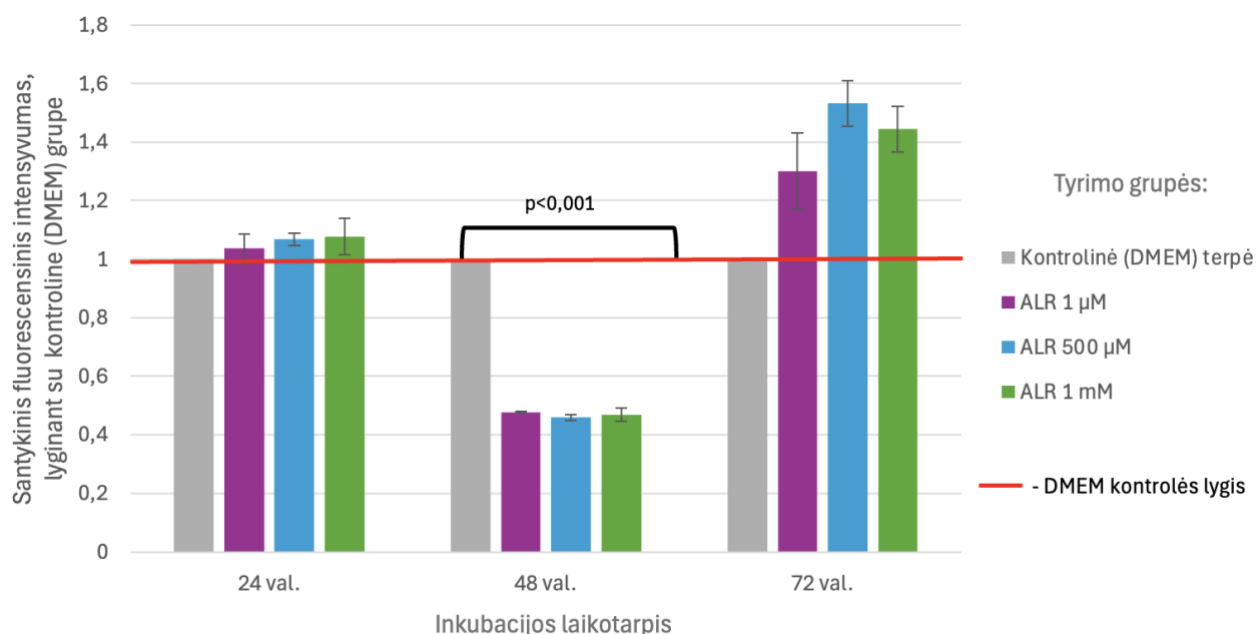
Mikroskopiniai vaizdai (žr. 9 paveikslą) nurodo, kad kontrolinėmis sąlygomis kultivuojamos ląstelės išlaikė joms būdingą adherentinę melanomos morfologiją: buvo išsiplėtusios, netaisyklingos verpstės formos, prisitvirtinusios prie paviršiaus ir sudarančios vientisą monosluoksnį.

Buvo vizualiai pastebėta, kad po 24 val. tirtose ALR koncentracijų grupėse įvyko morfologiniai pokyčiai: ląstelės apvalėjo, sumažėjo jų adhezija, matoma citoplazmos granuliacija ir ląstelių fragmentų atsiradimo požymiai.

Po 72 val. inkubacijos kontrolinėmis (DMEM) sąlygomis stebėtos tipiską melanomos morfologiją turinčios ląstelės: jos buvo tankiai išsidėsčiusios ir išlaikiusios būdingus verpstės formos kontūrus. Tuo tarpu ALR paveiktose grupėse buvo matomi nuo skirtingų koncentracijų priklausomi ląstelių morfologiniai pokyčiai: stebėtas jų apvalėjimas, heterogeniškesnis pasiskirstymas ir ryškus fragmentų susidarymas, ypač esant didžiausiai (1 mM) ALR koncentracijai.

8.1.2. Alfa lipinės rūgšties poveikis melanomos ląstelių ROS kiekiui

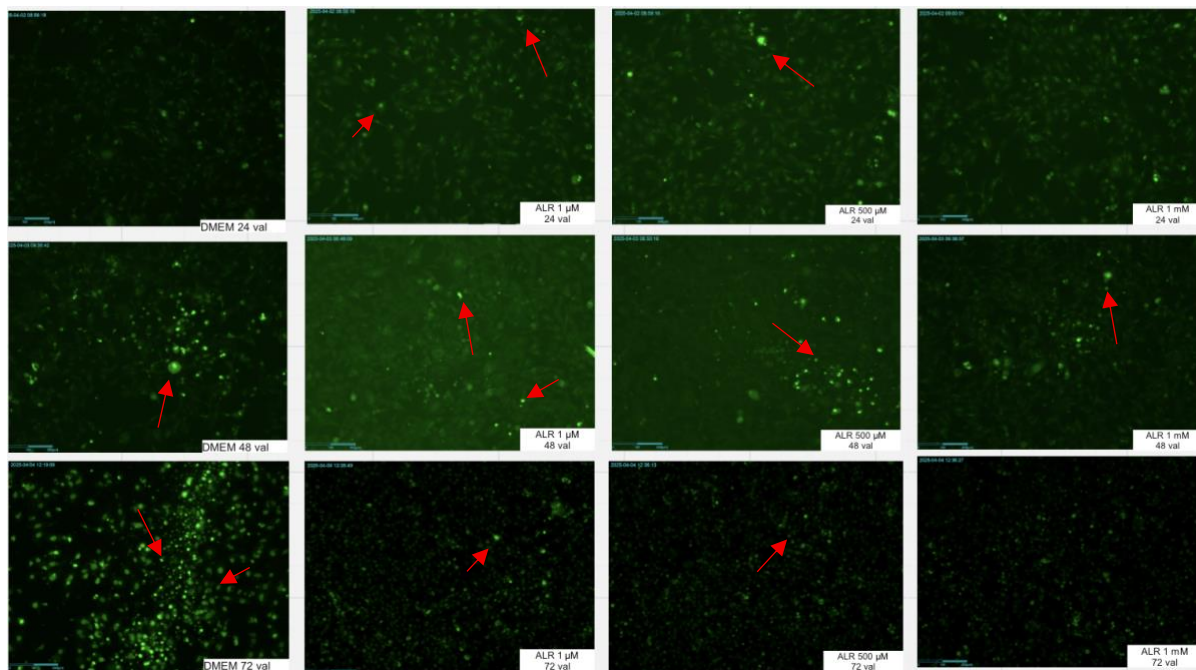
Grafike pateiktos santykinio fluorescencinio intensyvumo normalizuotos reikšmės, pagal kurias buvo vertinamas ROS kiekis (žr. 10 paveikslą).



10 paveikslas. Skirtingų ALR koncentracijų (1 μ M, 500 μ M ir 1 mM) poveikis ROS priklausomam fluorescenciniam intensyvumui SK-MEL-28 ląstelėse, lyginant su kontrole. Reikšmės normalizuotos kai DMEM kontrolė = 1. Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti skliaustais, nurodant atitinkamas p reikšmes.

Po 24 val. statistiškai reikšmingi pokyčiai tiriamosiose grupėse nenustatyti ($p = 0,443$). Tuo tarpu po 48 val. nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp eksperimentinių ir kontrolės grupių ($p = 0,000195$). Visose tirtose vaisto koncentracijų grupėse, lyginant su DMEM, santykinis fluorescencinis intensyvumas statistiškai patikimai sumažėjo ($p < 0,001$). Veikiant ALR1 μ M koncentracijai ROS lygis sumažėjo 52 %, esant ALR 500 μ M - 54%, o

ALR1 mM - 53%, lyginant su DMEM duomenimis. Po 72 val. statistškai patikimų skirtumų ROS signalo intensyvumui nebuvo nustatyta ($p = 0,21$).



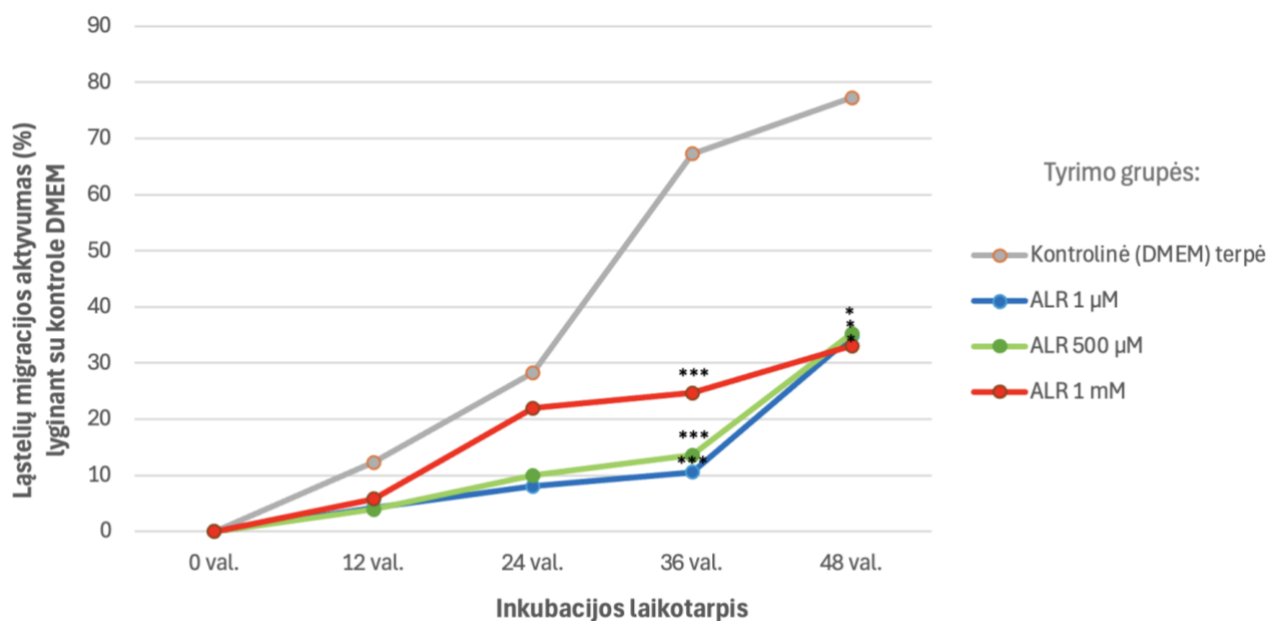
11 paveikslas. Fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, atspindintys skirtingų ALR koncentracijų (1 μ M, 500 μ M ir 1 mM) poveikį ląstelių ROS kiekiui. Intensyvesni fluorescenciniai signalo taškai ląstelėse pažymėti raudonomis rodyklėmis.

Analizuojant fluorescencinio mikroskopo vaizdus buvo nustatyta (žr. 11 paveikslą), kad po 24 val. kontrolinėje ląstelių grupėje fluorescencinis signalas tolygus ir vidutinio intensyvumo, atspindintis bazinį ROS lygį. Taip pat buvo pastebėta, kad skirtingos vaisto koncentracijos nesukėlė aiškių vizualinių ROS signalo skirtumų nuotraukose.

48 val. nagrinėtuose vaizduose buvo stebėtas sumažėjęs fluorescencinio signalo intensyvumas ALR koncentracijų grupėse, lyginant su DMEM grupe. ROS signalo intensyvumas priklausė nuo tiriamos medžiagos koncentracijos: mažiausios koncentracijos grupėje nustatytas intensyvesnis signalas, o ALR 500 μ M ir ALR 1 mM koncentracijose stebėtas silpnesnis ROS signalas.

Po 72 val. kontrolinėmis sąlygomis augintų ląstelių nuotraukose pastebėtas padidėjęs fluorescencinio signalo intensyvumas, palyginti su ankstesnių DMEM grupės laiko taškų vaizdais. Priešingai, vaisto koncentracijomis paveiktose eksperimentinėse grupėse fluorescencinio signalo intensyvumas buvo mažesnis nei kontrolinėje grupėje: intensyviausi fluorescencijos taškai buvo fiksuoti ALR 1 μ M grupėje, o ALR 500 μ M ir ALR 1 mM koncentracijose stebėtas silpnesnis signalas.

8.1.3. Alfa lipoinės rūgšties poveikis melanomos ląstelių migracijai

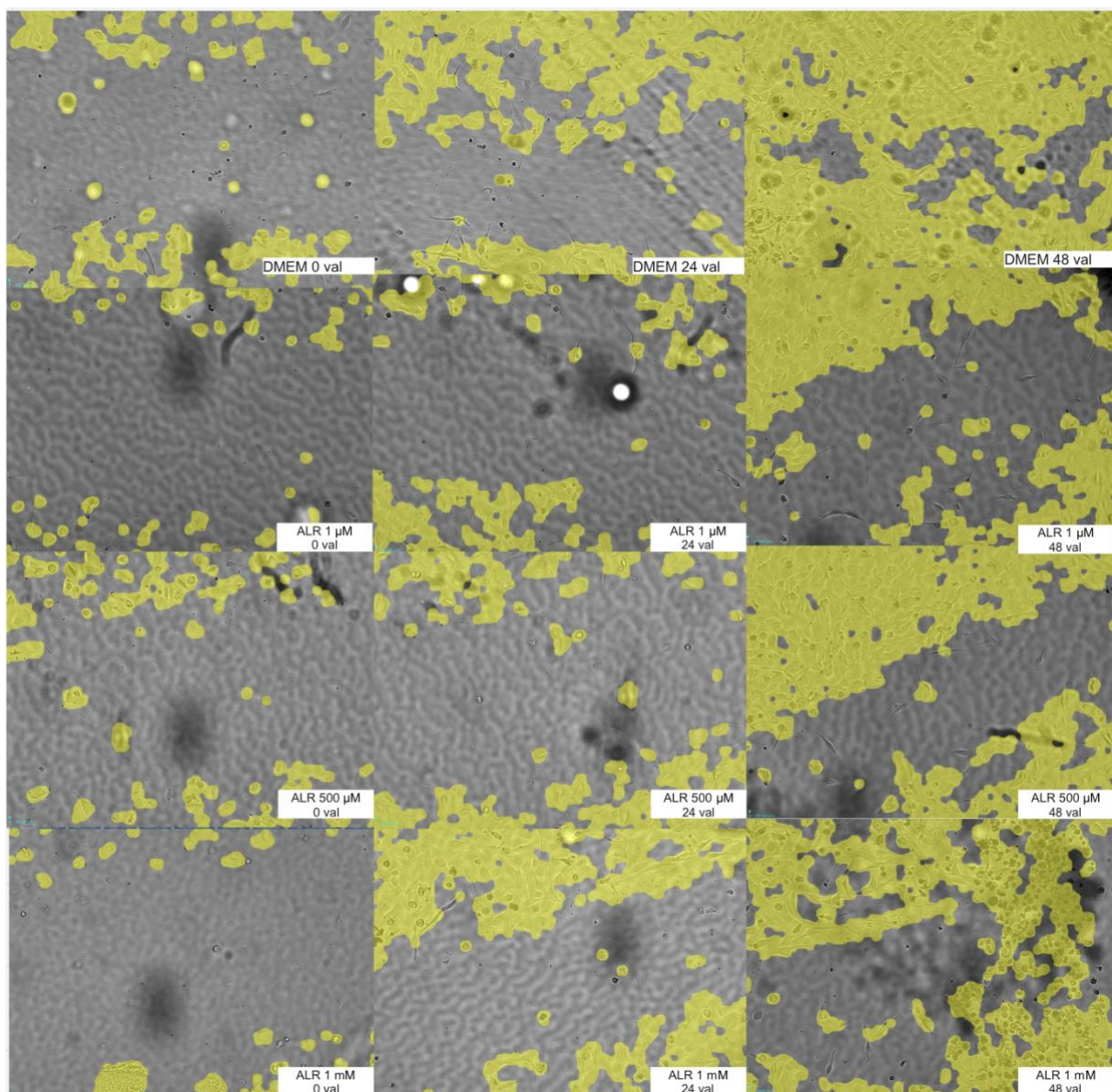


12 paveikslas. Ląstelių migracijos aktyvumas (%) 0-48 val. laikotarpiu, veikiant skirtingomis ALR koncentracijomis SK-MEL-28 ląstelėse. Eksperimentinių grupių reikšmių statistinis reikšmingumas, lyginant su kontroline (DMEM) grupe: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Nagrinėjant ALR grupių duomenis buvo nustatyta, kad po 12 ir 24 val. laikotarpio statistškai patikimas ALR efektas ląstelių migracijai nebuvo įrodytas.

Po 36 val. kontrolinėje grupėje migracija didėjo iki 67 % (žr. 12 paveikslą), o ALR koncentracijų paveiktose grupėse segmentuotas ląstelių ploto užsidarymas siekė 10,5 % esant ALR 1 μM, 13,5 % - ALR 500 μM bei 25 % ALR 1 mM koncentracijomis. Palyginus su DMEM grupės duomenimis, tai atitiko atitinkamai 84 % ($p = 0,0028$), 80 % ($p = 0,0024$) ir 63 % ($p = 0,0062$) mažesnę migracijos aktyvumą tarp grupių.

Praėjus 48 val., visose tirtose ALR grupėse buvo stebėtas segmentuoto ląstelių ploto užsidarymo didėjimas 33-35 %, o DMEM grupėje vertė siekė 77,3 %. Palyginus eksperimentų duomenis su kontrole, migracijos aktyvumas ALR grupėse sumažėjo 55 % esant ALR 1 μM ($p = 0,0218$), 54,5 % - ALR 500 μM ($p = 0,0387$) ir 57 % - ALR 1 mM ($p = 0,0179$) koncentracijomis.



13 paveikslas. Melanomos SK-MEL-28 ląstelių migracijos mikroskopiniai vaizdai (0, 24 ir 48 val.) po skirtingų ALR koncentracijų ($1\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$ ir $1\ \text{mM}$) poveikio, lyginant su kontroline (DMEM) grupe. Geltona spalva pažymėtas segmentuotas ląstelių užimamas plotas.

Mikroskopijos vaizdai (žr. 13 paveikslą) rodo, kad 0 val. visose grupėse ląstelių užimamas plotas buvo minimalus, nesiskiriantis tarp kontrolinės ir ALR grupių.

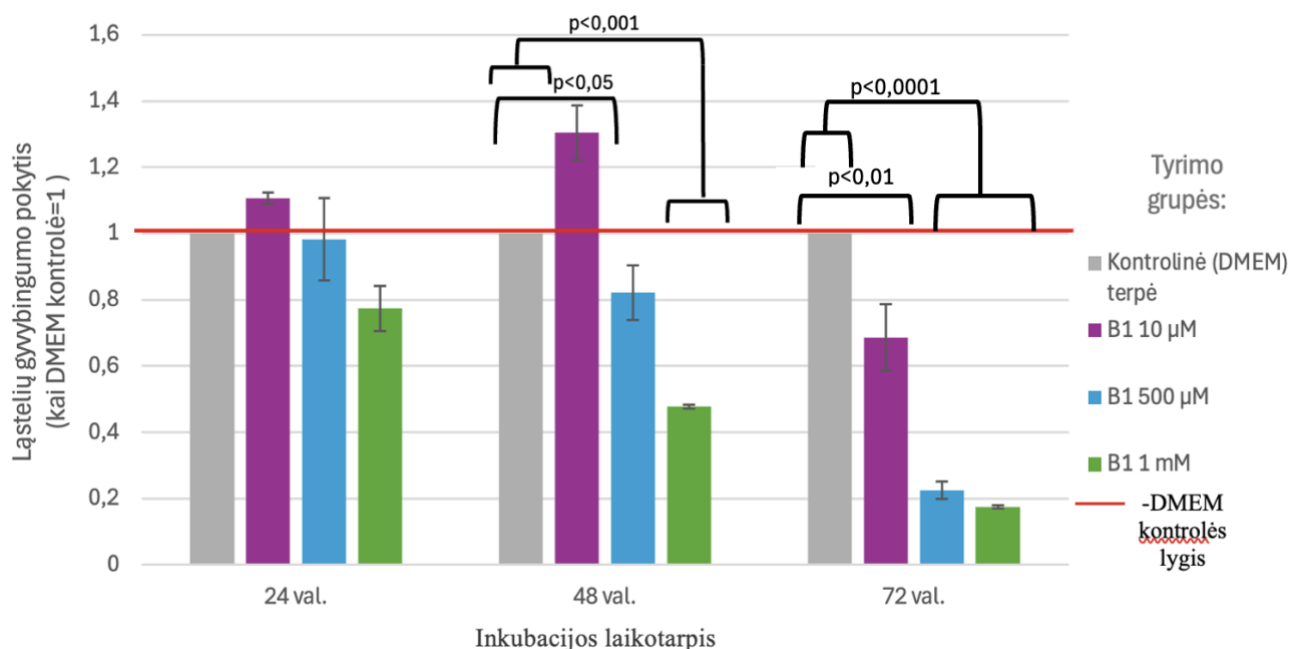
Po 24 val. kontrolinėje (DMEM) grupėje buvo stebėtas ląstelių plitimas į laisvą plotą, o geltonai pažymėta segmentuota ląstelių zona didėjo. Tuo tarpu ALR paveiktose grupėse migracija taip pat vyko, tačiau ląstelių užimamas plotas mažėjo didėjant ALR koncentracijai: didžiausias migracijos aktyvumas stebėtas ALR $1\ \text{mM}$ grupėje.

Po 48 val. kontrolinėje grupėje beveik visa laisva sritis buvo užpildyta migruojančių ląstelių, tuo tarpu ALR paveiktose grupėse ląstelių užimamas plotas išliko mažesnis. Mikroskopijos vaizduose segmentuotas ląstelių plotas tarp skirtingų ALR koncentracijų nesiskyrė.

8.2. Vitamino B1 rezultatai

8.2.1. Vitamino B1 poveikis melanomos ląstelių proliferacijai

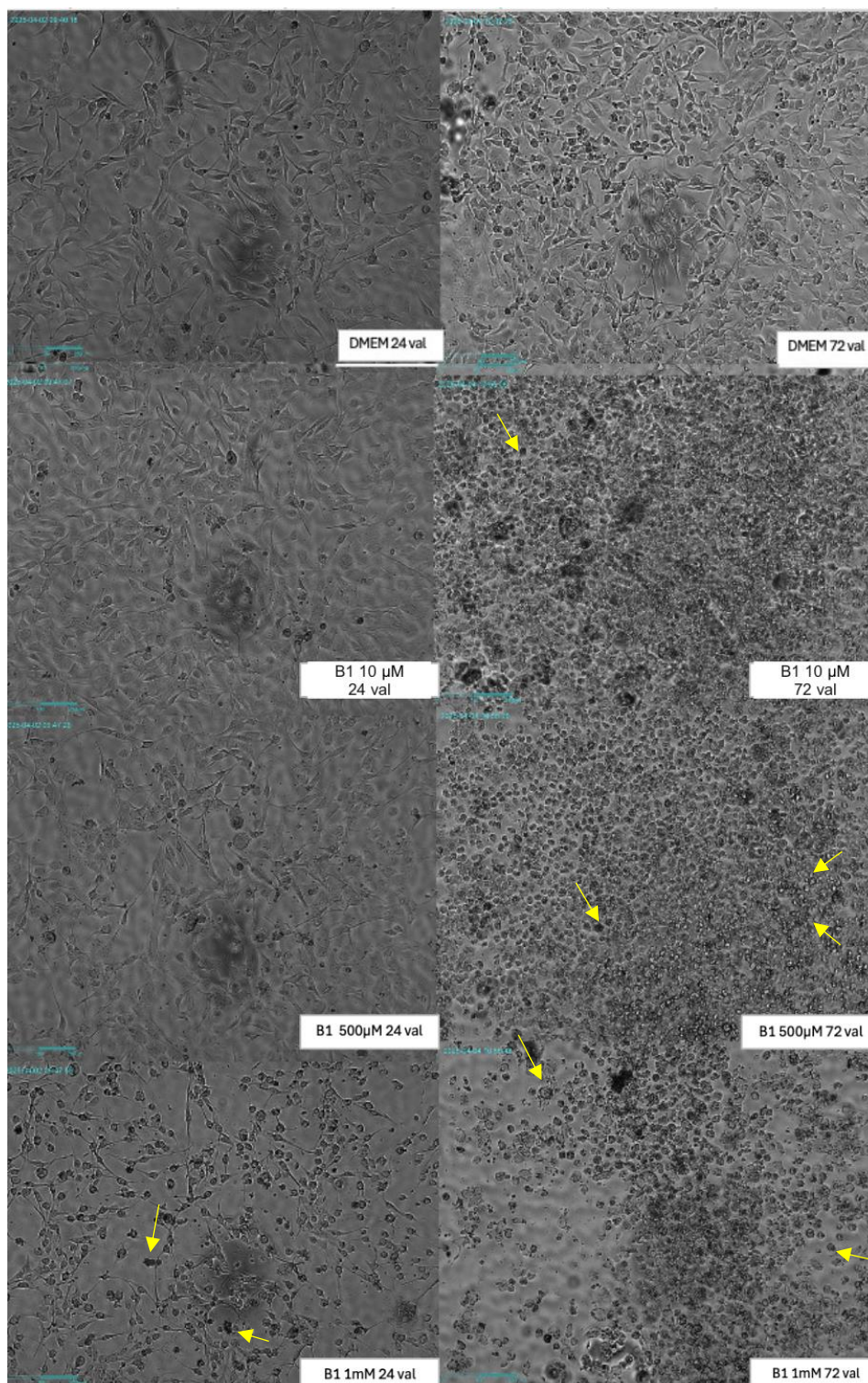
SK-MEL-28 ląstelių proliferacija skirtingais laiko intervalais buvo vertinama pagal ląstelių gyvybingumo pokyčius (žr. 14 paveikslą).



14 paveikslas. Skirtingų vitamino B1 koncentracijų (10 µM, 500 µM ir 1 mM) poveikis SK-MEL-29 ląstelių proliferacijai tiriamuoju laiku per 72 val., lyginant su kontroline (DMEM) grupe. Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti skliaustais, pažymėjus p reikšmes.

Praėjus 24 val., B1 grupėse statistiškai reikšmingų pokyčių nenustatyta ($p = 0,0611$). Po 48 val. eksperimentinės grupės statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo kontrolinės grupės ($p = 0,000041$). Lyginant su kontroline grupe, B1 10 µM koncentracija statistiškai reikšmingai skatino proliferaciją 30% ($p = 0,0246$), o veikiant B1 1 mM – ją slopino 53% ($p = 0,0009$).

Po ilgesnės inkubacijos trukmės, t. y. po 72 val., nustatyti statistiškai reikšmingi grupių skirtumai ($p < 0,0001$). Nustatyta, jog proliferacija statistiškai patikimai sumažėjo visose tirtose eksperimentinėse grupėse: B1 10 µM sumažėjo 31,5 % ($p = 0,0014$), B1 500 µM - 77,5 %, o B1 1 mM - 82,5 % (abiem atvejais $p < 0,0001$), lyginant su kontrolinės grupės reikšmėmis.



15 paveikslas. Mikroskopiniai vaizdai, vaizduojantys skirtingų vitamino B1 koncentracijų ($10\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$ ir $1\ \text{mM}$) poveikį SK-MEL-28 ląstelių morfologijai po 24 ir 72 val. inkubacijos. Geltonomis rodyklėmis pažymėtos ląstelės su morfologiniais pokyčiais.

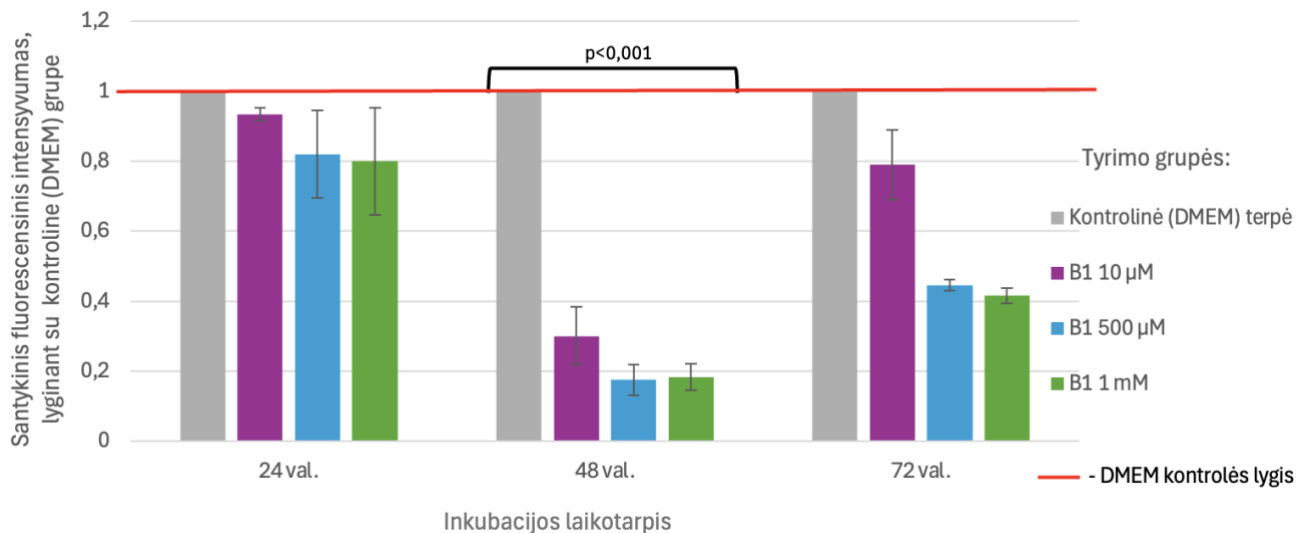
Siekiant išsamiau įvertinti vitamino B1 poveikį, kiekybiniai proliferacijos duomenys buvo papildyti mikroskopinėmis nuotraukomis (15 pav.). Po 24 val. kontrolinėje terpėje augusios ląstelės pasižymėjo būdinga SK-MEL-28 morfologija: buvo adherentinės, verpstės formos ir netaisyklingo kontūro, o ląstelės tolygiai pasiskirsčiusios. B1 koncentracijų paveiktų

grupių mikroskopijos vaizduose ląstelės pasižymėjo melanomos ląstelių morfologija, tačiau veikiant didžiausia koncentracija B1 1 mM buvo pastebėtos pavienės apvalėjančios ląstelės ir smulkūs besiformuojantys ląsteliniai fragmentai.

Po 72 val. DMEM grupės ląstelės mikroskopiniuose vaizduose išlaikė būdingą morfologiją. Tuo tarpu tiriamosiose grupėse stebėtas ląstelių membranų apvalėjimas, atsiskyrimas nuo paviršiaus ir suirimas. Vizualiai įvertinus vaizdus, visose B1 grupėse stebėti panašūs ląstelių morfologiniai pokyčiai.

8.2.2. Vitamino B1 poveikis melanomos ląstelių ROS kiekiui

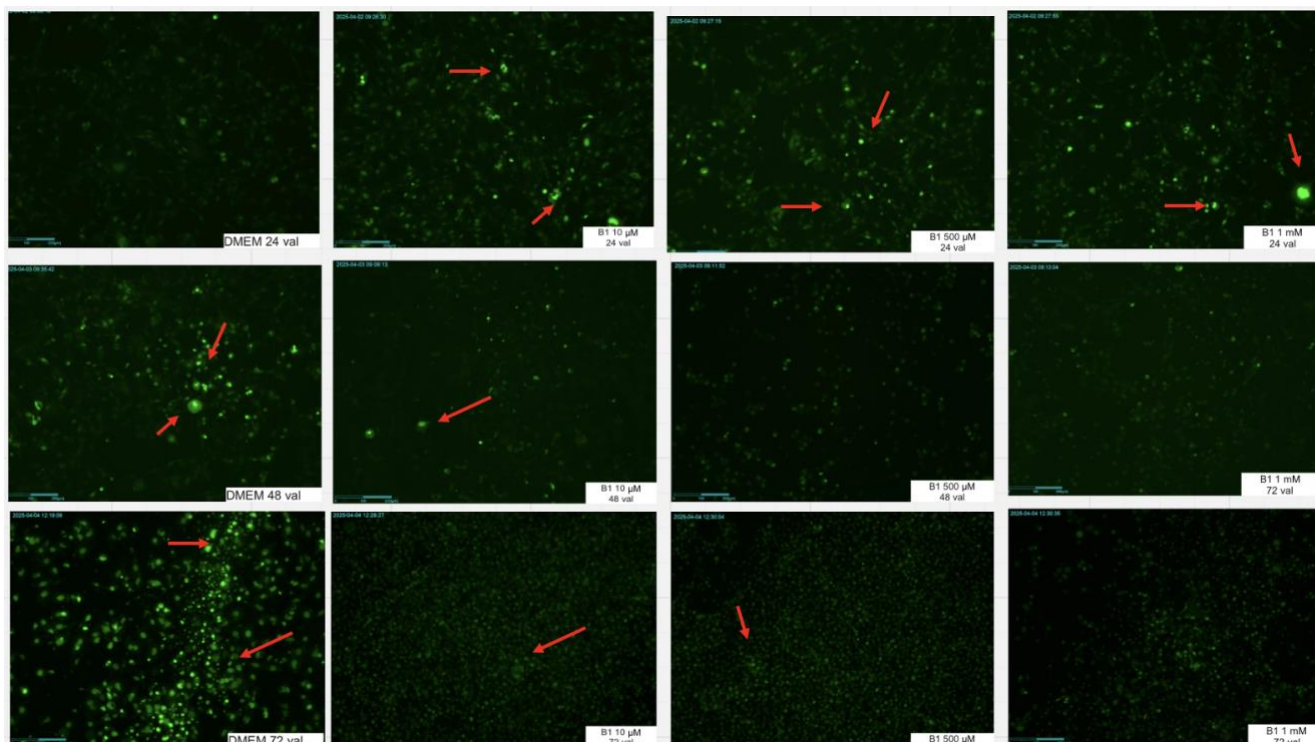
Fluorescijos intensyvumas buvo naudojamas kaip netiesioginis ROS kiekio ląstelėse rodiklis, o eksperimentiniai duomenys lyginti su kontroline grupe (žr. 16 pav.).



16 paveikslas. Skirtingų vitamino B1 koncentracijų (10 μM, 500 μM ir 1 mM) poveikis nuo ROS priklausomam fluorescensiniam intensyvumui SK-MEL-28 ląstelėse, lyginant su kontroline DMEM grupe. Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti skliaustais, nurodant p reikšmę.

Analizuojant po 24 val., reikšmingų skirtumų tarp B1 ir kontrolinės grupių nebuvo nustatyta ($p = 0,452$). Praėjus 48 val. laikotarpiui nustatyti statistiškai reikšmingi grupių skirtumai ($p < 0,0001$). Statistinė analizė parodė, kad tirtose vitamino B1 koncentracijose fluorescencijos intensyvumas buvo statistiškai reikšmingai sumažėjęs, palyginus su DMEM grupe ($p < 0,001$). ROS kiekis melanomos ląstelėse sumažėjo 70 % veikiant B1 10 μM, 82,5 % - B1 500 μM ir 82 % - B1 1 mM koncentracijomis.

Praėjus 72 val., statistiškai reikšmingų skirtumų tarp tiriamųjų grupių ir kontrolinės grupės nenustatyta ($p = 0,115$).



17 paveikslas. Fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, atspindintys vitamino B1 poveikį ląstelių ROS kiekiui. Intensyvesni fluorescenciniai signalo taškai ląstelėse pažymėti raudonomis rodyklėmis.

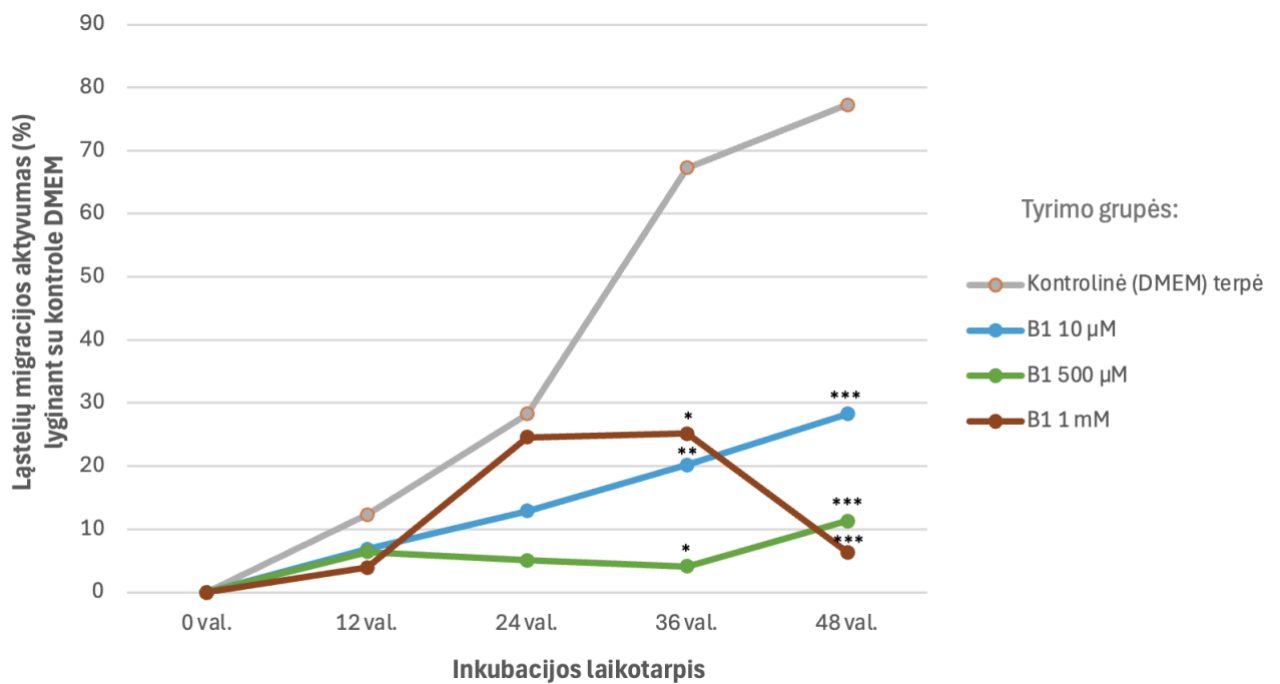
Mikroskopijos vaizduose nagrinėta ROS fluorescencinio signalo pokyčiai skirtingose tyrimų grupėse (žr. 17 pav.). Po 24 val. DMEM grupės nuotraukoje buvo vertintas tolygaus ir silono intensyvumo fluorescencinis signalas. Tuo tarpu B1 grupėse stebėtas tolygiai pasiskirstęs, intensyvesnis fluorescencinis signalas nei kontrolinėje grupėje.

Po 48 val. tiriamosiose grupėse fluorescencijos intensyvumas buvo mažesnis nei DMEM grupėje, ypač veikiant didesnėms vitamino B1 koncentracijoms. Tai atitinka kiekybiniuose ROS tyrimuose nustatytą statistškai reikšmingą pokytį (žr. 16 paveikslą).

Po 72 val. DMEM grupėje stebėta padidėjusi, tačiau netolygiai pasiskirsčiusi fluorescencija, o eksperimentinėse grupėse jos intensyvumas išliko mažesnis.

8.2.3. Vitamino B1 poveikis melanomos ląstelių migracijai

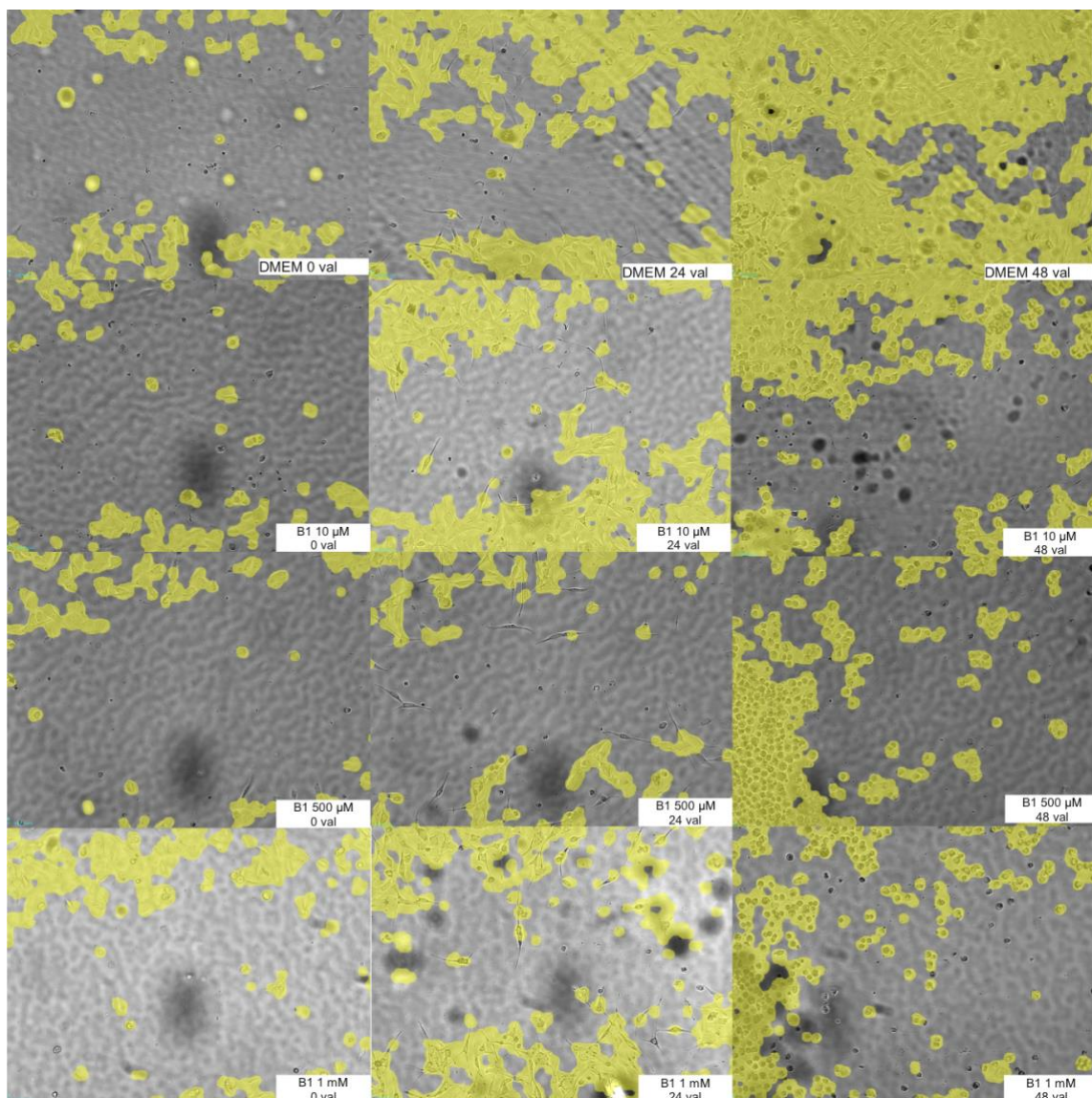
18 paveiksle pateikti ląstelių migracijos aktyvumo (%) pokyčiai, veikiant skirtingoms vitamino B1 koncentracijoms, lyginant su kontroline grupe.



18 paveikslas. Ląstelių migracijos aktyvumas (%) nuo 0- 48 val., veikiant skirtingomis vitamino B1 koncentracijomis. Lyginant su DMEM: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Po 12-24 val. statistiškai reikšmingų pokyčių nenustatyta ($p = 0,283$ ir $p = 0,247$). Po 36 val. DMEM grupėje buvo pastebėtas migracijos padidėjimas iki 67 %, o vitamino B1 paveiktose grupėse migracijos aktyvumas siekė 20 % veikiant B1 10 µM, 4 % - B1 500 µM bei 25 % - B1 1 mM koncentracijomis. B1 grupėse migracijos aktyvumas, palyginti su kontrole, sumažėjo atitinkamai 70 %, 94 %, ir 63 %.

Praėjus 48 val., kontrolinėmis sąlygomis migracija pasiekė didžiausią reikšmę - 77 %. Tuo tarpu vitamino B1 paveiktose grupėse migracijos aktyvumas siekė 28 % tiriant su 10 µM, 11 % - 500 µM bei 6 % - 1 mM koncentracijomis. Palyginti su DMEM grupe, B1 paveiktose grupėse nustatytas atitinkamai 63,5 %, 85 % ir 92 % mažesnis migracijos aktyvumas. Visose B1 grupėse nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai, palyginti su kontroline grupe ($p < 0,001$).



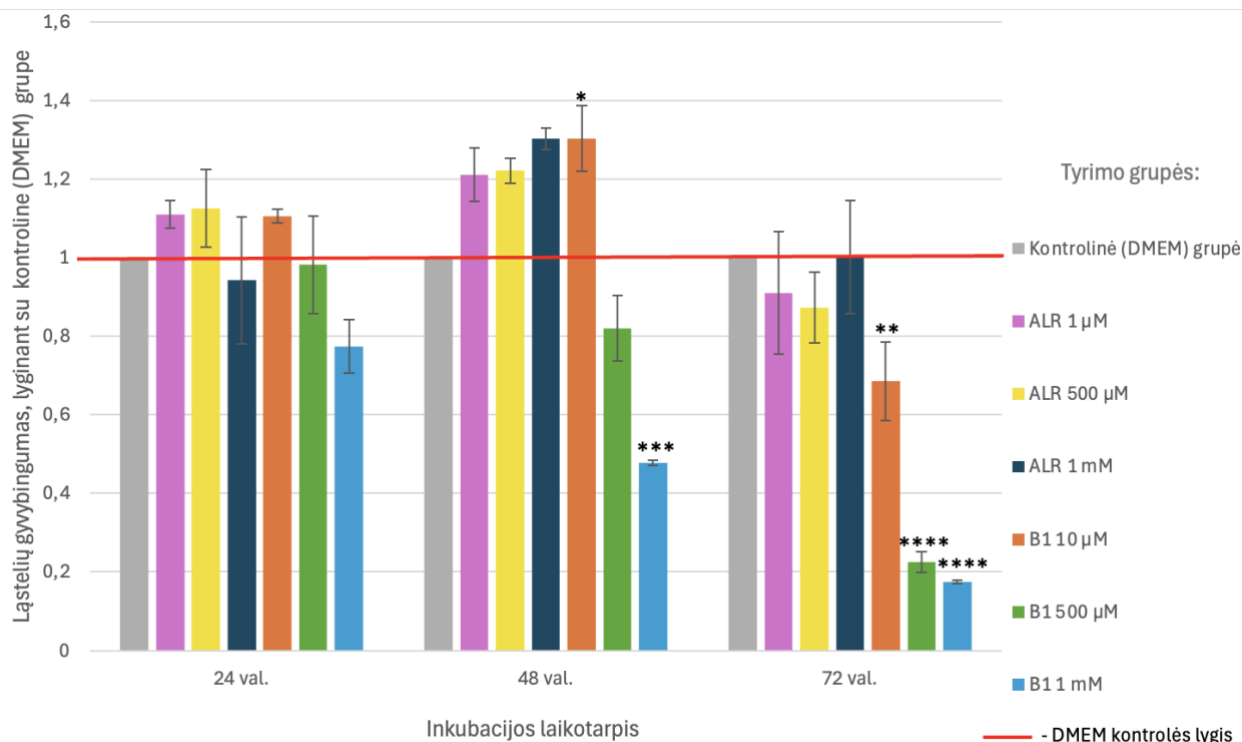
19 paveikslas. Ląstelių migracijos vaizdai (0, 24 ir 48 val.) veikiant skirtingomis vitamino B1 koncentracijomis ir kontrolėje (DMEM) grupėje. Geltona spalva pažymėta segmentuota ląstelių užimama sritis.

19 paveiksle pateikti melanomos ląstelių migracijos vaizdai skirtingose eksperimentinėse grupėse. 0 val. nuotraukose segmentuotų ląstelių užimamo ploto užimimas buvo panašus DMEM ir tiriamosiose grupėse, o po 24 val. visose grupėse stebėtas šio ploto padidėjimas. Vis dėlto šiame laiko taške kontrolinėje grupėje ląstelių užimamas plotas liko didesnis.

Vizualiai buvo pastebėta, kad DMEM grupėje ląstelės sparčiausiai plito į laisvą sritį, o po 48 val. užėmė didžiausią plotą. Vitamino B1 paveiktose grupėse fiksuotas mažesnis ląstelių ploto didėjimas, t. y. mažesnis ląstelių išplitimas veikiant skirtingomis koncentracijomis, lyginant su kontrole.

8.3. Alfa lipinės rūgšties ir vitamino B1 poveikio palyginimo rezultatai

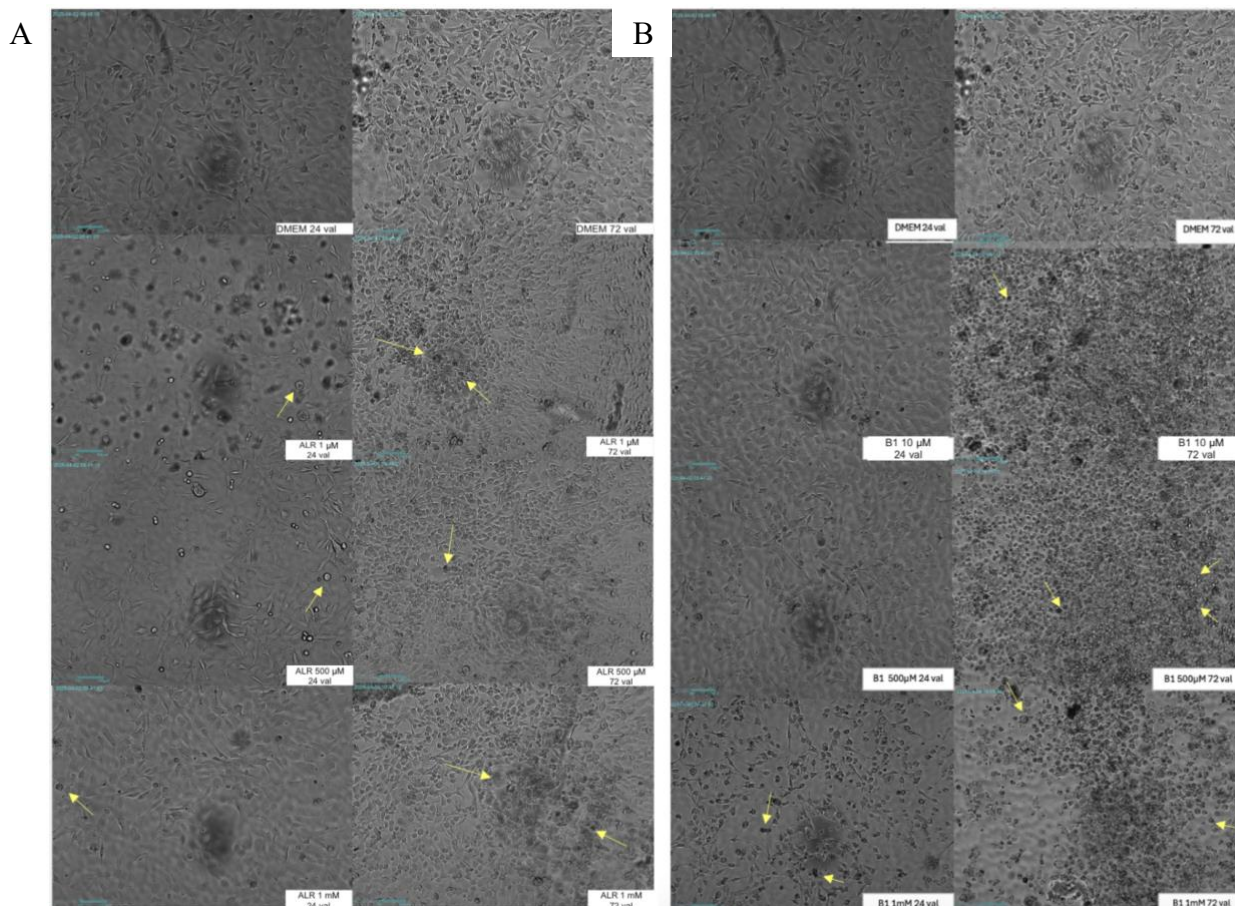
8.3.1. Skirtingų medžiagų poveikio palyginimas melanomos ląstelių proliferacijai



20 paveikslas. ALR ir vitamino B1 koncentracijų poveikis SK-MEL-28 ląstelių proliferacijai per 72 val. laiko tarpą, Statistinis reikšmingumas, lyginant su DMEM: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Medžiagų poveikis melanomos ląstelių proliferacijai buvo nagrinėtas 20 paveiksle. ALR poveikis SK-MEL-28 ląstelių ląstelių gyvybingumui visais tirtais laiko intervalais buvo statistiškai nereikšmingas. 24 val. statistiškai reikšmingų proliferacijos pokyčių nenustatyta ir B1 tirtose grupėse, tačiau po 48 val. B1 grupės reikšmingai skyrėsi nuo kontrolės. 48 val. B1 10 μM koncentracija proliferaciją skatino 30 % ($p = 0,0246$), o didžiausia tirta B1 1 mM koncentracija ją slopino 53 % ($p = 0,0009$).

Po 72 val. visose vitamino B1 grupėse nustatytas statistiškai patikimas proliferacijos slopinimas. Ryškiausias proliferacijos sumažėjimas stebėtas veikiant B1 500 μM ir B1 1 mM koncentracijomis, kai proliferacija sumažėjo atitinkamai 77,5 % ir 82,5 % ($p < 0,0001$).

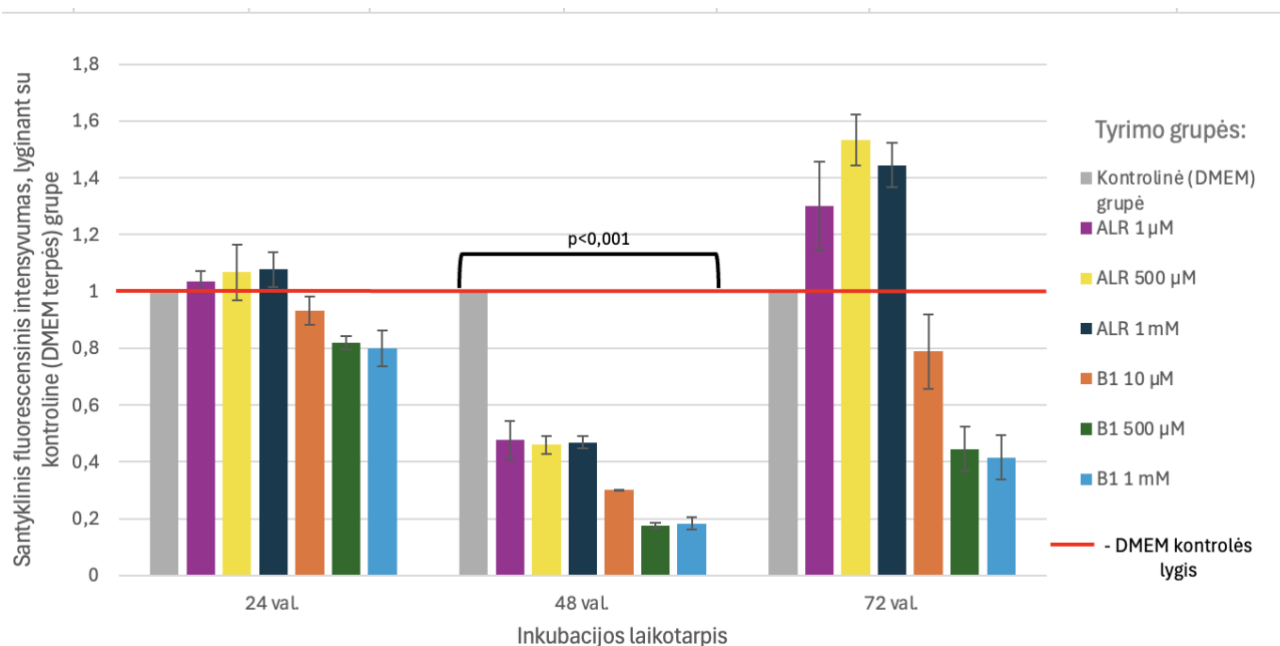


21 paveikslas. Mikroskopiniai vaizdai, vaizduojantys skirtingų ALR ir B1 koncentracijų ($10\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$ ir $1\ \text{mM}$) poveikį SK-MEL-28 ląstelių morfologijai po 24 ir 72 val. inkubacijos. Geltonomis rodyklėmis pažymėtos ląstelės su morfologiniais pokyčiais. A - ALR poveikis ROS fluorescencijai; B - vitamino B1 poveikis ROS fluorescencijai.

Palyginus ALR ir vitamino B1 paveiktų grupių mikroskopinius vaizdus (žr. 21 paveikslą), po 72 val. abiejose grupėse stebėti ląstelių morfologiniai pokyčiai, palyginti su DMEM grupėmis. ALR paveiktose grupėse nustatytas ląstelių apvalėjimas, heterogeniškesnis pasiskirstymas ir fragmentų susidarymas, ypač veikiant ALR $1\ \text{mM}$ koncentracijai.

B1 $1\ \text{mM}$ grupėje po 24 val. stebėtos pavienės apvalėjančios ląstelės ir smulkūs ląsteliniai fragmentai, o po 72 val. - ląstelių membranų apvalėjimas. Tuo tarpu kontrolinėse DMEM grupėse ląstelės viso eksperimento metu išlaikė būdingą adherentinę melanomos morfologiją.

8.3.2. Skirtingų medžiagų poveikio palyginimas melanomos ląstelių ROS kiekiui

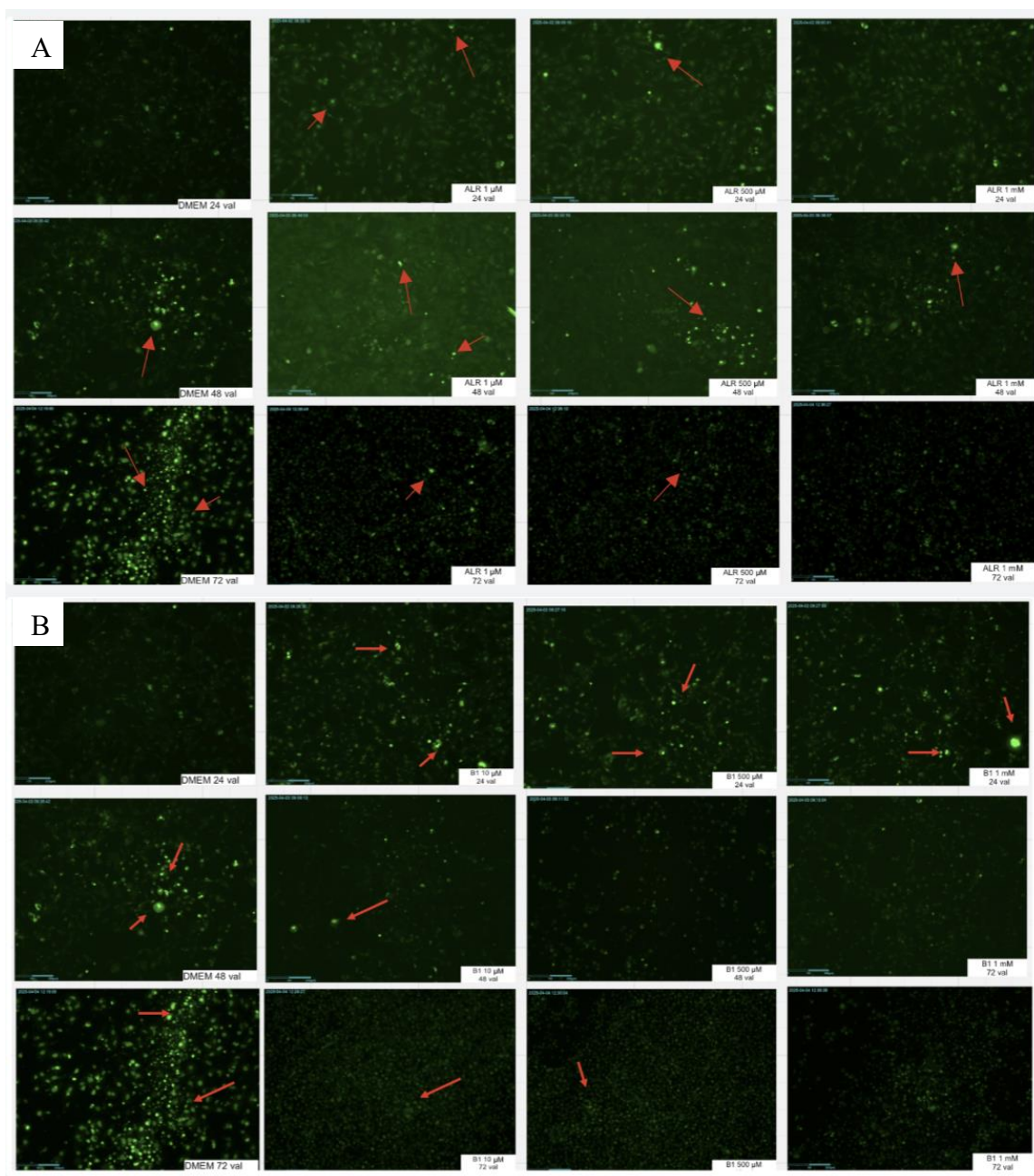


22 paveikslas. Skirtingų ALR ir vitamino B1 koncentracijų poveikis ROS priklausomam fluorescenciniam intensyvumui SK-MEL-28 ląstelėse, lyginant su kontroline DMEM grupe. Statistiškai reikšmingi pokyčiai tarp grupių pažymėti skliaustu, nurodant p vertę.

24 val. nei ALR, nei vitamino B1 paveiktose grupėse statistiškai reikšmingų ROS fluorescencijos intensyvumo skirtumų, palyginti su kontroline DMEM grupe, neturėjo (žr. 22 paveikslą).

Po 48 val. abiejų medžiagų grupėse nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai (ALR $p = 0,000195$; B1 $p < 0,0001$). ALR paveiktose grupėse ROS signalo intensyvumas sumažėjo 52 % veikiant ALR 1 μ M, 54 % - ALR 500 μ M ir 53% - ALR 1 mM koncentracijomis, o vitamino B1 grupėse ROS signalas sumažėjo 70 % tiriant su B1 10 μ M, 82,5 % - B1 500 μ M ir 82 % - B1 1 mM koncentracijomis.

Praėjus 72 val., statistiškai reikšmingų skirtumų nei ALR, nei vitamino B1 paveiktose grupėse nenustatyta.



23 paveikslas. Fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, atspindintys ALR ir B1 poveikį ląstelių ROS kiekiui. Intensyvesni fluorescenciniai signalo taškai ląstelėse pažymėti raudonomis rodyklėmis. A - ALR poveikis ROS fluorescencijai; B - vitamino B1 poveikis ROS fluorescencijai.

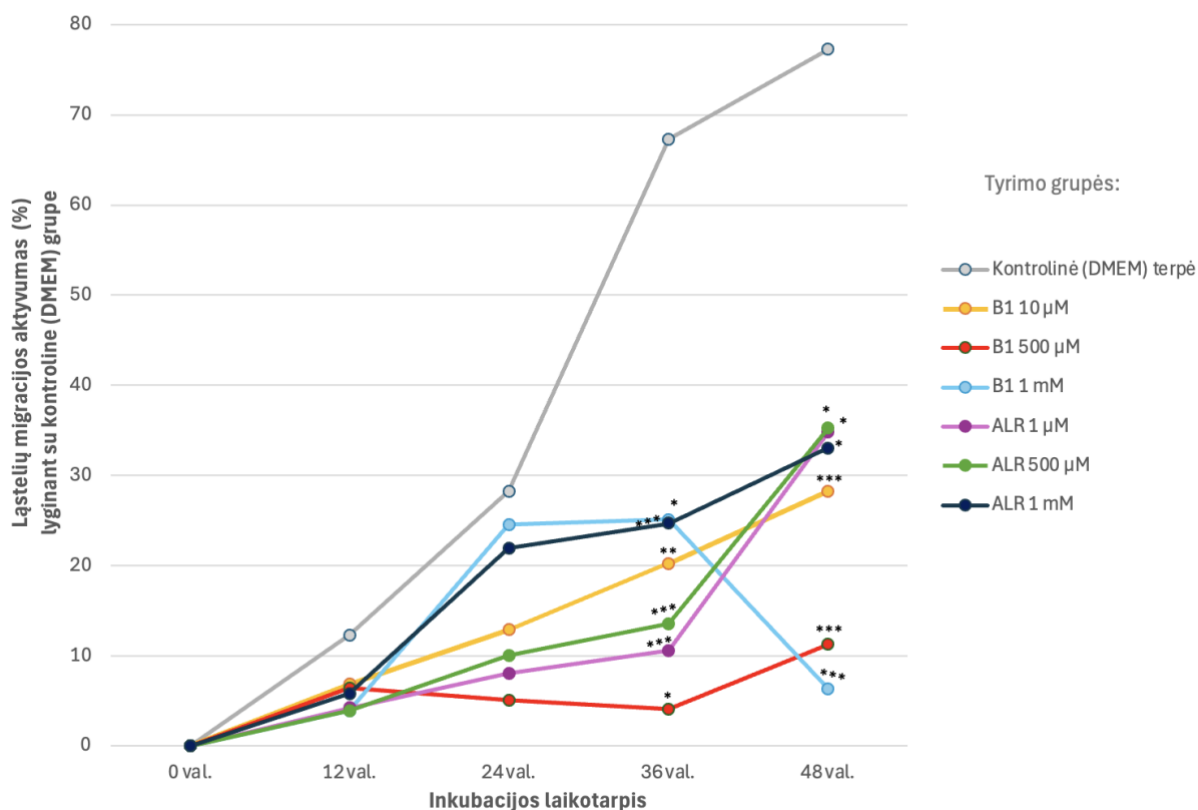
Palyginus ALR ir vitamino B1 paveiktų grupių fluorescencinės mikroskopijos vaizdus (žr. 23 paveikslą), po 24 val. abiejų eksperimentų DMEM grupėse buvo aptiktas silpno intensyvumo fluorescencinis signalas. ALR grupėse aiškių vizualių ROS signalo skirtumų tarp koncentracijų nenustatyta, tuo tarpu B1 grupėse stebėtas intensyvesnis fluorescencinis signalas nei kontrolinėje grupėje.

Po 48 val. tiek ALR, tiek B1 paveiktose grupėse fluorescencijos intensyvumas buvo mažesnis nei DMEM grupėse. ALR grupėse intensyvesnis signalas stebėtas esant mažiausiai

koncentracijai, o ALR 500 μM ir ALR 1 mM koncentracijose nustatytas silpnėsnis signalas. B1 grupėse mažesnis intensyvumas taip pat buvo stebėtas didėjant koncentracijai.

Po 72 val. abiejų eksperimentų DMEM grupėse stebėtas padidėjęs fluorescencijos intensyvumas. Tuo tarpu ALR ir B1 paveiktose grupėse fluorescencijos intensyvumas išliko mažesnis nei kontrolinėse grupėse.

8.3.3. Skirtingų medžiagų poveikio palyginimas melanomos ląstelių migracijai



24 paveikslas. Ląstelių migracijos aktyvumas (%) nuo 0- 48 val., veikiant skirtingomis ALR ir vitamino B1 koncentracijomis. Statistinę reikšmingumą lyginant su DMEM: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Palyginus abiejų medžiagų poveikį SK-MEL-28 ląstelių migracijai buvo nustatyta (žr. 24 paveikslas), kad po 12–24 val. statistiškai reikšmingų pokyčių nei ALR, nei B1 paveiktose grupėse nebuvo.

Po 36 val., palyginus su DMEM grupe, migracijos aktyvumas ALR grupėse buvo mažesnis 84 % esant ALR 1 μM , 80 % - ALR 500 μM ir 63 % - ALR 1 mM koncentracijomis. B1 paveiktose grupėse migracijos aktyvumas, lyginant su kontroline grupe, buvo mažesnis atitinkamai 70 % veikiant B1 10 μM , 94 % - B1 500 μM ir 63 % - B1 1 mM koncentracijomis.

48 val., migracijos aktyvumas ALR grupėse buvo mažesnis 55 % esant ALR 1 μ M, 54,5 % - ALR 500 μ M ir 57 % - ALR 1 mM koncentracijomis. B1 koncentracijų paveiktose grupėse migracijos aktyvumas buvo mažesnis 63,5 % tiriant su B1 10 μ M, 85,5 % - B1 500 μ M ir 92 % B1 1 mM koncentracijomis ($p < 0,001$).

9. DISKUSIJA

Atliktas tyrimas yra vienas pirmųjų Lietuvoje, kuriame buvo nuosekliai vertintas ir tarpusavyje lygintas alfa lipinės rūgšties bei vitamino B1 poveikis oksidaciniam stresui SK-MEL-28 melanomos ląstelių modelyje. Gauti rezultatai papildo onkologinių tyrimų duomenis, kadangi šių medžiagų poveikis anksčiau buvo tirtas tik kituose navikinių ląstelių modeliuose. Tyrimo duomenys taip pat prisideda prie vitamino B1 poveikio vertinimo onkologinių ligų kontekste, nes literatūroje pateikiami prieštaringi duomenys apie galimą vitamino B1 sąsają su odos vėžio rizika [29].

Šiame eksperimente buvo nustatytas dvejopas B1 proliferacijos atsakas: B1 10 μ M koncentracija proliferaciją padidino 30 %, o didesnė B1 1 mM - sumažino 53 %, palyginti su kontroline grupe. 72 val., visose vitamino B1 grupėse stebėtas ryškus proliferacijos slopinimas, stiprėjantis didėjant koncentracijai. Panašūs rezultatai aprašyti Hanberry BS ir kt. tyrime, kuriame naudojant neuroblastomos ir kasos vėžio ląstelių linijas, įrodyta, kad didesnės vitamino B1 koncentracijos pasižymėjo antiproliferaciniu poveikiu [47]. Tačiau mikroskopijos vaizduose taip pat buvo pastebėti ląstelių morfologiniai pokyčiai, galintys rodyti citotoksinį ar apoptotinį poveikį. Vis dėlto šis efektas nepatvirtintas, nes nebuvo atliktas kaspazių aktyvumo testas. Rezultatai leidžia manyti, kad vitamino B1 poveikis proliferacijai priklausė nuo koncentracijos ir inkubacijos trukmės.

Bossio ir kt. autorių atliktame prostatos vėžio *in vitro* tyrime buvo įrodyta, kad ALR statistiškai reikšmingai slopino navikinių ląstelių proliferaciją didesnėms koncentracijoms [43]. Tačiau šiame tyrime, naudojant SK-MEL-28 melanomos ląstelių modelį, analogiškas antiproliferacinis poveikis nebuvo patvirtintas. Tikėtina, kad eksperimento metu pasirinktos neoptimalios ALR koncentracijos: didesnės dozės galėjo lemti mikroskopijos vaizduose stebėtus citotoksiškumui būdingus morfologinius požymius. Kadangi tyrimo metu specifiniai apoptozės žymenys nebuvo vertinti, šios prielaidos patvirtinti nebuvo galima.

Analizuojant ALR ir vitamino B1 poveikį oksidaciniam stresui SK-MEL-28 ląstelėse nustatyta, kad abi medžiagos pasižymėjo antioksidacinėmis savybėmis. 48 val. nustatytas statistiškai reikšmingas ROS kiekio sumažėjimas: ALR paveiktose grupėse jis sumažėjo apie 50 %, o vitamino B1 grupėse - iki 82,5 %, lyginant su DMEM grupe. Šie rezultatai rodo, kad vitaminas B1 oksidacinį stresą melanomos ląstelėse slopino efektyviau nei ALR.

Buvo įrodyta, kad abi medžiagos slopino migracijos aktyvumą. Po 36 val. ryškiausias ALR antimigracinis poveikis stebėtas esant mažiausiai koncentracijai (ALR 1 μ M), kai migracijos aktyvumas sumažėjo iki 84 % kontrolės atžvilgiu. Tuo tarpu stipriausias vitamino B1 poveikis stebėtas B1 500 μ M grupėje, kur migracijos aktyvumas sumažėjo 94 %. Gauti duomenys leidžia teigti, kad vitaminas B1 pasižymėjo stipresniu antimigraciniu efektu SK-MEL-28 melanomos ląstelėse nei ALR. Šis poveikis galėjo būti susijęs su ryškesniu ROS kiekio sumažėjimu vitamino B1 paveiktose grupėse.

Tyrimui būdingi ir tam tikri ribotumai. Pavyzdžiui, buvo naudojamos tik trys skirtingos ALR ir vitamino B1 koncentracijos, todėl siauras koncentracijų intervalas galėjo riboti biologinio poveikio įvertinimo tikslumą. Be to, nebuvo nustatyta minimali tiriamųjų medžiagų koncentracija, sukelianti biologinį poveikį SK-MEL-28 ląstelėms. Oksidacinio streso vertinimas buvo atliekamas kas 24 val. per 72 val. laikotarpį, todėl galėjo būti nepastebėti ankstyvieji ar trumpalaikiai ROS koncentracijų pokyčiai. Taip pat eksperimento metu nebuvo atlikti apoptozės žymenų testai, todėl ląstelių citotoksiškumo lygis liko neįvertintas. Rezultatų variacijai įtakos galėjo turėti ir tai, kad eksperimentai buvo atlikti trimis nepriklausomais pakartojimais, o tai galėjo sumažinti statistinį rezultatų patikimumą.

Nepaisant paminėtų ribotumų, tyrimas leido įvertinti alfa lipoinės rūgšties ir vitamino B1 poveikį SK-MEL-28 ląstelių proliferacijai, oksidaciniam stresui ir migracijai bei suteikė reikšmingų duomenų apie skirtingų šių medžiagų koncentracijų biologinį poveikį šiai melanomos ląstelių linijai. Gauti duomenys gali būti aktualūs tolesniems melanomos biologinių procesų tyrimams.

10. IŠVADOS

1. Alfa lipoinė rūgštis per pusę sumažino oksidacinį stresą, lyginant su kontroline grupe, ir iki 84 % slopino ląstelių migraciją *in vitro*.
2. Vitaminas B1 mažesnėmis koncentracijomis proliferaciją didino beveik trečdaliu, o didesnėmis - slopino iki 53 %. Ilgėjant inkubacijos trukmei, proliferacija buvo slopinta iki 82,5 %. Be to, vitaminas B1 mažino oksidacinį stresą iki 82,5 % bei didesnėmis koncentracijomis slopino migraciją iki 94 % *in vitro*.
3. Palyginus tiriamųjų medžiagų poveikį oksidacinio streso paveiktoms melanomos ląstelėms nustatyta, kad alfa lipoinė rūgštis ir vitaminas B1 skirtingai veikė ląstelių proliferaciją, ROS kiekį ir migraciją *in vitro*.

11. REKOMENDACIJOS

1. Rekomenduojama tirti abiejų medžiagų poveikį skirtingais inkubacijos laikotarpiais: įtraukiant papildomus tarpinius laiko taškus (pvz., kas 6 val.) bei ilgesnę stebėjimo trukmę iki 96 valandų, kad būtų galima tiksliau įvertinti jų biologinį poveikį.
2. Rekomenduojama nustatyti, ar tiriamųjų medžiagų poveikyje ląstelėse vyko citotoksiniai ar apoptotiniai procesai, taikant specifinius metodus, pavyzdžiui, kaspazių aktyvumo testą.
3. Rekomenduojama vertinti šių medžiagų efektą skirtingoms melanomos ir kitų navikų ląstelių linijoms, siekiant įvertinti gautų rezultatų pritaikomumą platesniame priešnavikiniame kontekste.

12. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–263. doi:10.3322/caac.21834.
2. World Health Organization. Cancer [Internetinis šaltinis]. Geneva: WHO; 2025 [Peržiūrėta 2026 m. vasario mėn.]. Prieiga per internetą: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
3. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):274–284. doi:10.1038/nrc2622
4. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(11):1366–1379. doi:10.1080/15384047.2019.1640032.
5. Pekarek L, Sánchez-Cedra A, Dbouk YJ, Ospino LR, Iglesias Pedrejón B, Bernier L. Paradigm of biomarkers in metastatic melanoma. *Oncol Lett.* 2024;29(2):78. doi:10.3892/ol.2024.14214.
6. Yan S, Lu J, Chen B, Yuan L, Chen L, Ju L, et al. The multifaceted role of alpha-lipoic acid in cancer prevention, occurrence, and treatment. *Antioxidants (Basel).* 2024;13(8):897. doi:10.3390/antiox13080897.
7. Feuerecker B, Pirsig S, Seidl C, Aichler M, Feuchtinger A, Bruchelt G, et al. Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2012;13(14):1425–1435. doi:10.1080/15384047.2012.707198.
8. Puchsaka P, Chaotham C, Chanvorachote P. α -Lipoic acid sensitizes lung cancer cells to chemotherapeutic agents and anoikis via integrin $\beta 1/\beta 3$ downregulation. *Int J Oncol.* 2016;49(4):1445–1456. doi:10.3892/ijo.2016.3624.
9. Zastre JA, Sweet RL, Hanberry BS, Ye S. Linking vitamin B1 with cancer cell metabolism. *Cancer Metab.* 2013;1:16. doi:10.1186/2049-3002-1-16.
10. Elgamal M, Abdelaziz A, El-Sayed A. Automatic skin cancer images classification. *Int J Adv Comput Sci Appl.* 2013;4(3):287–294. doi:10.14569/IJACSA.2013.040342.

11. Liu Y, Xiong WJ, Wang L, Rang WQ, Yu C. Vitamin B1 intake and the risk of colorectal cancer: a systematic review of observational studies. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2021;67(6):391–396. doi:10.3177/jnsv.67.391.
12. Ali ML, Roky AH, Azad SMAK, Shaikat AH, Meem JN, Hoque E, et al. Autophagy as a targeted therapeutic approach for skin cancer: evaluating natural and synthetic molecular interventions. *Cancer Pathog Ther*. 2024;2(4):231–245. doi:10.1016/j.cpt.2024.01.002.
13. Ciążyńska M, Kamińska-Winciorek G, Lange D, Lewandowski B, Reich A, Sławińska M, et al. The incidence and clinical analysis of non-melanoma skin cancer. *Sci Rep*. 2021;11(1):4337. doi:10.1038/s41598-021-83502-8.
14. Nanz L, Keim U, Katalinic A, Meyer T, Garbe C, Leiter U. Epidemiology of keratinocyte skin cancer with a focus on cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2024;16(3):606. doi:10.3390/cancers16030606.
15. Lallas K, Kyrgidis A, Chrysostomidis A, Vakirlis E, Apalla Z, Lallas A. Clinical, dermatoscopic, histological and molecular predictive factors of distant melanoma metastasis: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2024;202:104458. doi:10.1016/j.critrevonc.2024.104458.
16. Dummer R, Schadendorf D, Ascierto PA, Arance A, Berking C, Brown MP, et al. Melanoma: molecular pathogenesis and therapeutic management. *Lancet*. 2022;399(10328):1615–36. doi:10.1016/S0140-6736(22)00376-6.
17. Yousef H, Alhajj M, Fakoya AO, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [Peržiūrėta 2026 m. vasario mėn.].
Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
18. Jin R, Luo L, Zheng J. The trinity of skin: skin homeostasis as a neuro–endocrine–immune organ. *Life*. 2022;12(5):725. doi:10.3390/life12050725.
19. Marrapodi R, Bellei B. The keratinocyte in the picture: cutaneous melanoma microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2024;16(5):913. doi:10.3390/cancers16050913.
20. Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):679–91. doi:10.1038/nri2622.
21. Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri ML, Girolomoni G. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):329–34. doi:10.2174/1568010054022033.
22. Prkačin I, Šamija I, Filipović N, Vucić M, Vučić M, Ferara N, Šitum M. Frequency of BRAF Mutations in Dysplastic Nevi, Lentigo Maligna, and Melanoma In Situ. *J Clin Med*. 2024 Aug 15;13(16):4799. doi:10.3390/jcm13164799.
23. Damsky WE Jr, Rosenbaum LE, Bosenberg M. Decoding melanoma metastasis. *Cancers*. 2011;3(1):126–163. doi:10.3390/cancers3010126.
24. Yang TT, Yu S, Khale Ke CL, Cheng ST. The genomic landscape of melanoma and its therapeutic implications. *Genes (Basel)*. 2023;14(5):1021. doi:10.3390/genes1405102.
25. Conforti C, Zalaudek I. Epidemiology and risk factors of melanoma: a review. *Dermatol Pract Concept*. 2021;11(Suppl 1):e2021161S. doi:10.5826/dpc.11S1a161S.
26. Mihulecea CRJ, Rotaru M. Review: The key factors to melanomagenesis. *Life (Basel)*. 2023 Jan 8;13(1):181. doi:10.3390/life13010181.
27. Sun X, Yu S, Zhang H. Ultraviolet radiation and melanomagenesis. *Front Oncol*. 2020;10:951. doi:10.3389/fonc.2020.00951.

28. Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light and their role in skin cancer. *Photochem Photobiol Sci.* 2020;19:24-34. doi:10.1039/c9pp00386b.
29. Huang S, Shi L, Ma Y, Zhu Y, Liang Y, Huang H. The association between vitamin B1 intake and risk of non-melanoma skin cancer in U.S. adults: a cross-sectional study [Internetinis šaltinis]. *Front Nutr.* 2025;12:1571991. doi:10.3389/fnut.2025.1571991. Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2025.1571991/full> [Peržiūrėta 2026-05-09]
30. Almalki SG. The pathophysiology of the cell cycle in cancer and treatment strategies using various cell cycle checkpoint inhibitors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023;149(18):15767–15783. doi:10.1007/s00432-023-05333-4.
31. Zheng S, Chen Y, Zhu Z, Li N, He C, Koeffler HP, et al. Exploiting targeted degradation of cyclins and cyclin-dependent kinases for cancer therapeutics: a review. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2025;26(8):713–739. doi:10.1631/jzus.B2500021.
32. Kaur M, Khan N, Pathak S, Singh M, Kumar S, Singh RK. The Emerging Role of Cyclin-Dependent Kinases (CDKs) in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3219. doi:10.3390/ijms19103219. PMID: 30349309; PMCID: PMC6213534.
33. Kreuger IZM, Sliker RC, van Groningen T, van Doorn R. Therapeutic strategies for targeting CDKN2A loss in melanoma. *J Invest Dermatol.* 2023;143(1):3–12. doi:10.1016/j.jid.2022.07.028.
34. Andrés Juan C, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4642.
35. Valenta H, Erard M, Dupré-Crochet S, Nüße O. The NADPH oxidase and the phagosome. In: Hallett MB, Savill JS, editors. *Molecular and cellular biology of phagocytosis*. Adv Exp Med Biol. Cham: Springer; 2020. p. 153–177.
36. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *J Invest Dermatol.* 2017;137(4):841–851. doi:10.1016/j.jid.2016.12.025.
37. Kozlov AV, Javadov S, Sommer N. Cellular ROS and antioxidants: Physiological and pathological role. *Antioxidants (Basel).* 2024;13(5):602. doi: 10.3390/antiox13050602
38. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow cytometry. In: Armstrong D, editor. *Advanced protocols in oxidative stress II*. Methods Mol Biol. 2010;594:57–72. doi:10.1007/978-1-60761-411-1_4.
39. Superti F, Russo R. Alpha-lipoic acid: biological mechanisms and health benefits. *Antioxidants (Basel).* 2024;13(10):1228. doi:10.3390/antiox13101228.
40. Wollin SD, Jones PJH. Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;84(2–3):179–186. doi:10.1016/S0022-3166(02)16208-5.
41. Ghibu S, Richard C, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L. Antioxidant properties of an endogenous thiol: alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;54(5):391–398. doi:10.1097/FJC.0b013e3181be7554.

42. Shanaida M, Lysiuk R, Mykhailenko O, Hudz N, Abdulsalam A, Gontova T, et al. Alpha-lipoic acid: an antioxidant with anti-aging properties for disease therapy. *Curr Med Chem*. 2024. doi:10.2174/0109298673300496240416114827.
43. Bossio S, Perri A, Gallo R, De Bartolo A, Rago V, La Russa D, et al. Alpha-lipoic acid reduces cell growth, inhibits autophagy, and counteracts prostate cancer cell migration and invasion: evidence from in vitro studies. *Int J Mol Sci*. 2023;24(23):17111. doi:10.3390/ijms242317111.
44. Whitfield KC, Bourassa MW, Adamolekun B, Bergeron G, Bettendorff L, Brown KH, et al. Thiamine deficiency disorders: diagnosis, prevalence, and a roadmap for global control programs. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1430(1):3–43. doi:10.1111/nyas.13919.
45. Lonsdale D. The importance of thiamine (vitamin B1) in humans. *Biosci Rep*. 2023;43(10):BSR20230374. doi:10.1042/BSR20230374.
46. Kaźmierczak-Barańska J, Halczuk K, Karwowski BT. Thiamine (vitamin B1)-an essential health regulator. *Nutrients*. 2025;17(13):2206. doi:10.3390/nu17132206.
47. Hanberry BS, Berger R, Zastre JA. High-dose vitamin B1 reduces proliferation in cancer cell lines analogous to dichloroacetate. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;73(3):585–594. doi:10.1007/s00280-014-2386-z.
48. Li L, Zeng Z, Ma T, Hu B, Guo M, Wang Q. The role of ROS-mediated mitochondrial dysfunction in the development of malignant melanoma. *Exp Dermatol*. 2025;34(9):e70168. doi:10.1111/exd.70168.
49. Becker AL, Indra AK. Oxidative Stress in Melanoma: Beneficial Antioxidant and Pro-Oxidant Therapeutic Strategies. *Cancers*. 2023;15(11):3038. doi:10.3390/cancers15113038.
50. Wang Y, Zhao Y, Ma S, Ruan Y, Zhao Y, Yang Y. Role of ROS-mediated autophagy in melanoma. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17):9777. doi:10.3390/ijms23179777.
51. Malakoutikhah Z, Mohajeri Z, Dana N, Haghighjooy Javanmard S. The dual role of Nrf2 in melanoma: a systematic review. *BMC Mol Cell Biol*. 2023;24(1):5. doi:10.1186/s12860-023-00466-5.
52. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(4):603–619. doi:10.18632/aging.100934.
53. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*. 2001;17:888–895. doi:10.1016/S0899-9007(01)00658-X.
54. Liu F, Bai Q, Tang W, Zhang S, Guo Y, Pan S, et al. Antioxidants in neuropsychiatric disorder prevention: neuroprotection, synaptic regulation, microglia modulation, and neurotrophic effects. *Front Neurosci*. 2024;18:1505153. doi:10.3389/fnins.2024.1505153.
55. Volvert ML, Seyen S, Piette M, Evrard B, Gangolf M, Plumier JC, Bettendorff L. Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol*. 2008;8:10. doi:10.1186/1471-2210-8-10.
56. Wiley KD, Singh J. Vitamin B1 (thiamine) deficiency. In: StatPearls [Internetinis šaltinis]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 Jan– [Peržiūrėta 2026 m. balandžio 14d.]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537204/>
57. Miranda-Massari JR, Gonzalez MJ, Jimenez FJ, Allende-Vigo MZ, Duconge J. Metabolic correction in the management of diabetic peripheral neuropathy: improving clinical results

- beyond symptom control. *Curr Clin Pharmacol*. 2011;6(4):260–273. doi:10.2174/157488411798375967
58. Muley A, Fernandez R, Green H, Muley P. Effect of thiamine supplementation on glycaemic outcomes in adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2022;12(8):e059834. doi:10.1136/bmjopen-2021-059834
 59. Gibson GE, Hirsch JA, Fonzetti P, Jordan BD, Cirio RT, Elder J. Vitamin B1 (thiamine) and dementia. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1367(1):21–30. doi:10.1111/nyas.13031
 60. American Type Culture Collection (ATCC). SK-MEL-28 (HTB-72) cell line [Internetinis šaltinis]. Manassas (VA): ATCC; [Peržiūrėta 2026m. balandžio 15d.]. Prieiga per internetą: <https://www.atcc.org/products/htb-72>
 61. Thomas NE, Edmiston SN, Tsai YS, Parker JS, Googe PB, Busam KJ, et al. Utility of TERT promoter mutations for cutaneous primary melanoma diagnosis. *Am J Dermatopathol*. 2019;41(4):264–272. doi:10.1097/DAD.0000000000001259.
 62. Dessinioti C, Befon A, Stratigos AJ. The association of nevus-associated melanoma with common or dysplastic melanocytic nevus: a systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel)*. 2023;15(3):856. doi:10.3390/cancers15030856.
 63. Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:87. doi:10.1186/1756-9966-30-87.
 64. Tüzüner BA, Turkyilmaz Mutlu IB, İpekçi H, Üstündağ ÜV, Tunalı-Akbay T, Emekli-Alturfan E, et al. The effects of lipoic acid on markers of oxidative stress and inflammation in the lungs of valproic acid-treated rats. *J Turk Chem Soc Sect A Chem*. 2024;11(4):1441–1448. doi:10.18596/jotcsa.1520611.
 65. Nakamura H, Takada K. Reactive oxygen species in cancer: current findings and future directions. *Cancer Sci*. 2021;112(10):3945–3952. doi:10.1111/cas.15068.
 66. Obayashi Y, Arisaka H, Yoshida S, Mori M, Takahashi M. The protection mechanism of proline from D-galactosamine hepatitis involves the early activation of ROS-eliminating pathway in the liver. *SpringerPlus*. 2015;4:199. doi:10.1186/s40064-015-0969-8.
 67. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell viability assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., red. *Assay Guidance Manual* [Internetinis šaltinis]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004– [Peržiūrėta 2026 m. balandžio 15 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
 68. Venza I, Venza M, Visalli M, Lentini G, Teti D, d'Alcontres FS. ROS as regulators of cellular processes in melanoma. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:7157215. doi:10.1155/2021/7157215.
 69. Liu X, Montissol S, Uber A, Ganley S, Gross A, Berg K, et al. The effects of thiamine on breast cancer cells. *Molecules*. 2018;23(6):1464. doi:10.3390/molecules23061464.