

VILNIAUS UNIVERSITETAS

JURGIS KADZIAUSKAS

LĄSTELIŲ MEMBRANŲ FUNKCIONAVIMO TYRIMAI

Habilitacijos procedūrai teikiamų mokslo darbų apžvalga
Fiziniai mokslai, biochemija (04P)

Vilnius, 2009

ISBN 978-9955-33-419-4

Įvadas

Biologinės membranos yra labai svarbios ląstelės, jos organelių funkcionavimui. Membranose esantys baltymai perneša įvairias medžiagas, vykdo energijos virsmus. Membranų integralumo palaikymas, jose esančių baltymų funkcionavimo užtikrinimas yra labai svarbus ląstelės homeostazei.

Membranos yra pirmas barjeras ląstelei sąveikaujant su aplinka. Įvairios cheminės medžiagos, vaistai, spinduliuotė, gali keisti membranų integralumą. Šios pažeidimai gali sukelti membranų pralaidumo pokyčius, slopinti fermentus. Ląstelių membranų pažeidimai gali tiesiogiai arba netiesiogiai veikti įvairius metabolinius procesus. Susidariusios signalinės molekulės, gali pernešti signalą iš vienos ląstelės erdvės į kitas, taip pažeidimai, kilusios vienos ląstelės organelėse, gali būti perduodamos kitoms.

Aktyviosios deguonies formos (ROS) susidaranti organizme tiek metabolinių procesų metu, tiek dėl išorinių veiksnių, pažeidžia biologinių membranų lipidus, jose esančius baltymus. ROS kiekis didėja fotosensibilizuojant ląsteles. Fotosensibilizacija generuoja aktyviausias deguonies formas. Šie pažeidimai gali sukelti ląstelės žūtį, kuri gali vykti įvairiais būdais. Nustačius, kokių būdu žūsta ląstelė, supratus molekulinis šio proceso mechanizmus, galima įvertinti kokios priežastys nukreipia ląstelės žūtį vienu ar kitu keliu, bandyti valdyti šį procesą.

Šios apžvalgos tikslas yra giliau pažvelgti į prokariotų plazminės membranos sąveiką su hibridiniais baltymais, aktyviųjų deguonies formų sukeltas eukariotų membranų pažeidimus, ląstelių atsako ypatybes, membranų integralumo pokyčius, energijos virsmus.

Apžvalgoje nagrinėjami šie klausimai:

1. Hibridinių baltymų Lamb-LacZ sąveika su *E. coli* plazmine membrana ir šių baltymų poveikis ląstelių energijos transformacijai.
2. Aktyviųjų deguonies formų poveikis eukariotų ląstelių plazminės membranos integralumui.
3. Eukariotų ląstelių vidinių pažeidimų poveikis ląstelių energetiniam metabolizmui ir gyvybingumui.
4. Kryptingų mitochondrijų pažeidimų poveikis mitochondrijų užpildo baltymų aktyvumui ir ląstelės žūties būdams.

1. Prokariotų ląstelių membranų sąveika su hibridiniais baltymais LamB-LacZ

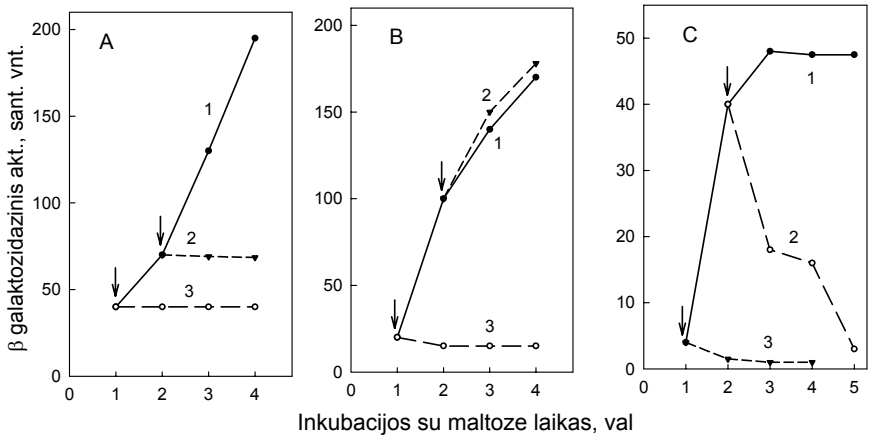
Ląstelės plazminė membrana yra pagrindinis barjeras atsakingas už jonų, molekulių ir makromolekulių patekimą iš ląstelės ar į ląstelę. Bakterijos eksportuoja daugelį baltymų į periplazmą, išorinę membraną, užląstelinę terpę. Pirmajame pernašos etape baltymai susiriša su membrana.

Pernešamų pro membraną baltymų sąveikos su membranomis tyrimui buvo pasirinkti hibridiniai baltymai LamB-LacZ, kuriuos koduoja sulieti *lamB* ir *lacZ* genai. LamB yra bakterijų išorinės membranos baltymas, atsakingas už maltozės pernašą į periplazmą. LacZ yra tirpus citoplazmos baltymas, kurio β galaktozidazinis aktyvumas buvo naudojamas sekti baltymų lokalizacijos vietą. Sulieti genai koduoja dviejų skirtingų baltymų LamB ir LacZ atitinkamas polipeptidines grandines. Genas *lamB-lacZ* 52-4 koduoja baltymą, sudarytą iš baltymo LamB 25 aminorūgščių signalo peptido, prie kurio yra prijungtos 15 subrendusio baltymo aminorūgštys ir 10-1023 baltymo LacZ aminorūgščių (Moreno et al 1980, Benson et al 1984). LamB-LacZ 42-1 baltymas sudarytas iš baltymo LamB signalo peptido prie kurio prijungtos 173 aminorūgštys ir subrendusio LacZ baltymo (Benson et al 1984, Hall et al 1982). Baltymas LamB-LacZ 42-12 sudarytas iš baltymo LamB signalinio peptido prie kurio prijungtos 241 aminorūgštis ir subrendusio LacZ baltymo (Hall et al 1982, Benson ir Silhavy 1983). Matuojant β galaktozidazinį aktyvumą galima nustatyti hibridinio baltymo surišimą su membrana.

Maltozinio operono indukcija bakterijų *E.coli* ląstelėse keičia gyvų bakterijų ląstelių skaičių. Poveikis priklauso nuo LamB baltymo polipeptidinės grandinės ilgio. 52-4 baltymo sintezė neveikia bakterijų augimo. Indukavus LamB-LacZ 42-1 sintezę vyksta negrįžtamasis ląstelių augimo slopinimas. Tuo tarpu LamB-LacZ 42-12, turintis ilgesnę subrendusio LamB baltymo dalį, grįžtamai slopina bakterijų augimą. Tai gali būti susiję su galima baltymo 42-12 pernaša pro membraną (Silhavy T. J. et al 1983), tuo tarpu baltymas 42-1 neprašina pro membraną. Todėl jis gali būti toksiškas tiksliai pernašos metu.

Įvertinant hibridinių baltymų poveikį ląstelei, kyla klausimas apie jų skaidymą ląstelėje. Dalinai į šį klausimą padeda atsakyti bandymai su baltymų sintezės slopikliu

chloramfenikoliu. Slopinant LamB-LacZ 52-4 baltymo sintezę chloramfenikoliu β galaktozidazinis aktyvumas stabilizuojamas pastoviam lygyje (1 pav. A). Nuslopinus baltymo 42-1 sintezę praėjus 1 val. po sintezės indukcijos, β galaktozidazinis aktyvumas krinta praktiškai iki nulio (1 pav. B, kreivė 3). Tačiau β galaktozidazinio aktyvumo kitimas yra nejautrus chloramfenikoliui, pridėtam po 2 val. po indukcijos (1 pav. B, kreivė 2). Visai kitokia priklausomybė stebima indukavus 42-12 baltymo sintezę (1 pav. C). Nepriklausomai nuo chloramfenikolio pridėjimo laiko, β galaktozidazinis aktyvumas sumažėja.



1 pav. Chloramfenikolio poveikis β galaktozidaziniam aktyvumui indukavus baltymo LamB-LacZ 52-4 (A), 42-1 (B) ir 42-12 (C) sintezę. Chloramfenikolio pridėjimas iki galutinės koncentracijos 100 μ g/ml parodytas strėle. 1 – kontrolė (be chloramfenikolio), 2 ir 3 – pridėjus chloramfenikolio

Hibridiniai baltymai su dalinai ilga LamB baltymo grandine (42-1, 42-12) sumažina ląstelių gyvybingumą, iš kitos pusės susidarius hibridiniams baltymams įsijungia jų skaidymo sistemos. Pirmiausiai suskaidomi 42-1 ir 42-12 baltymai, tuo tarpu LamB-LacZ 52-4, turintis tiksliai 15 subrendusio LamB baltymo aminorūgščių pasižymi dideliu stabilumu. Prokariotų ir eukariotų ląstelėse yra peptidazės, kurios skaido anomalinius baltymus (Goldberg A. L. ir St. John A. C. 1978, Hershko A. ir Ciechanover A. 1982). Hibridiniai baltymai, koduojami sulietų genų, taip pat yra nebūdingi ląstelei, todėl jie gali būti suskaidomi.

Hibridinių baltymų stabilumas didėja, įgaunant jiems konformaciją, būtina β galaktozidaziniams aktyvumui. Hibridinis baltymas 42-1 tampa atsparus po 2 val. kai jo β galaktozidazinis aktyvumas pasiekia maksimumą. Ypatingai toksinis ląstelei yra baltymas 42-1. Šio baltymo įsiterpimas į membraną fiziologinėmis sąlygomis neslopina energiją transformuojančių procesų. Tai matomai susiję su slopinimų kitų baltymų pernašos pro plazminę membraną. Hibridiniai baltymai gali įsiterpti į membraną ir tuo pačiu slopinti kitų baltymų pernašą į periplazmą ir į išorinę membraną, tuo pačiu mažindami ląstelių gyvybingumą (Silhavy T. J. et al 1983, Ito K. et al 1981).

Buvo tirtas skirtingų LamB-LacZ baltymų pasiskirstymas tarp ląstelės apvalkalėlio ir tirpios fazės. Ląstelėse buvo indukuojama hibridinių baltymų sintezė, ląstelės buvo suardomos ir nustatytas β galaktozidazinis aktyvumas tirpioje fazėje ir membranų frakcijoje (1 lentelė).

1 lentelė. Hibridinių LamB-LacZ baltymų išsidėstymas bakterijose *E.coli*

Sulieto <i>lamB-lacZ</i> geno indeksas	β galaktozidazinis aktyvumas (sant. vienet. /min mg baltymo)	
	Tirpi frakcija	Membranų frakcija
52-4	2000	440
42-1	1200	1660
42-12	290	280

Gauti rezultatai rodo, kad baltymai 42-1 ir 42-12 beveik vienodai pasiskirsto tirpioje ir membranų frakcijose. Tuo tarpu baltymas 52-4 pagrindinai yra tirpiojoje frakcijoje. Šis pasiskirstymas priklauso nuo ląstelės energizacijos. Paveikus ląsteles oksidacinio fosforilavimo skyrikliais, sumažėjo baltymo 42-1 β galaktozidazinis aktyvumas. Tai gali būti susiję su transliacijos slopinimu, sumažėjus viduląstelinei ATP koncentracijai. Su membranomis susijusio baltymo β galaktozidazinis aktyvumas sumažėjo 2-10 kartų palyginus su tirpiąja frakcija.

Kyla klausimas, kaip kinta energijos transformacijos efektyvumas, sąveikaujant hibridiniams baltymams su ląstelės membranomis. 2 lentelėje pateikti duomenys apie 42-1 baltymo poveikį į bakterijų *E.coli* protonovaros jėgos dydį.

2 lentelė. Baltymo LamB-LacZ 42-1 poveikis ląstelių *E.coli* protonovaros jėgos dydžiui

Maltozė terpėje	Protonovaros jėgos ir jos sudedamųjų dalių dydžiai (mV)		
	$\Delta\psi$	$Z\Delta pH$	Δp
+	80	85	165
-	130	90	220

Tiriant baltymo 42-1 poveikį protonovaros jėgos dydžiui, buvo parodyta, kad indukavus baltymo sintezę, protonovaros jėgos dydis sumažėja 30 % , daugiausiai sumažėja $\Delta\psi$. Kiti hibridiniai baltymai nekeitė protonovaros jėgos dydžio.

Hibridinių baltymų sąveika su membranomis buvo tirta naudojant dalinai išgrynintus baltymus. Didžiausią santykinę aktyvumą turėjo baltymas 52-4, kuriame baltymo LamB dalis yra mažiausia, o mažiausią – baltymas, turintis 241 subrendusio LamB aminorūgštį. Buvo pagamintos bakterijų *E.coli* vidinės membranų pūslelės ir tirta jų sąveika su hibridiniais baltymais. *E.coli* membranų pūslelės suriša 5-8 kartus daugiau baltymų 42-1 ir 42-12 negu baltymo 52-4. Tai rodo, kad šie baltymai turi papildomas, su membranomis susirišančias aminorūgščių sekas. β galaktozidazinę aktyvumą turinti baltymo molekulės dalis yra nukreipta į išorinę fazę ir yra jautri proteinkinazės K poveikiui.

Hibridinių baltymų sąveikai su membranomis gali dalyvauti ir lipidai, ir baltymai. Mes tyrėme vieno iš baltymus pernešančios sistemos komponentų SecA baltymo įtaką hibridinių baltymų susirišimui. SecA baltymas yra labai svarbus baltymų translokono komponentas (Fekkes et al 1998, de Keyzer J. et al 2003). Tiriant SecA baltymo svarbą mes išskyrėme vidinės membranų pūslelės iš skirtingų sec mutantų. Pakaitinus *E. coli* bakterijas turinčias geno *secA* ts-mutaciją, baltymo SecA sintezė yra slopinama, todėl kaupiasi pernešamų baltymų pirmtakai ir ląstelė žūna (Liss L. ir Oliver D.B., 1986). 3 lentelėje pateikti duomenys rodo, kad išskirtos iš pakaitintų *E.coli* ląstelių vidinės membranų pūslelėse surišto baltymo 42-12 β galaktozidazinis aktyvumas sumažėja nuo 11 % iki 3 %. Tuo tarpu išorinės membranų pūslelių surišto hibridinio baltymo kiekis nepriklausė nuo geno *secA* produkto.

3 lentelė. Sąveika LamB-LacZ su *E. coli* bakterijų, turinčių geno *secA* ts-mutaciją, pūslelėmis

Inkubacijos temperatūra, °C	Baltymo 42-12 surišto su membranų pūslelėmis dalis (%)	
	Plazminė membrana	Išorinė membrana
30	11	4,5
42	3	4,2

Hibridinių baltymų sąveikai su membranų pūslelėmis reikalingas geno *secA* produktas, intaktines pūsleles pakaitinus iki 42 °C surištu baltymų kiekis nesumažėjo.

Hibridinių baltymų sąveikai su membraninėmis pūslelėmis svarbus yra polipeptidinės grandinės hidrofobiškumas. Žinant aminorūgščių seką, buvo paskaičiuotos hibridinių baltymų fizikinės cheminės charakteristikos – antrinė struktūra, hidrofobiškumo profiliai, Eizenbergo kriterijai. Jeigu į hibridinio baltymo sudėtį įeina aminorūgščių likučiai nuo 173 iki 241 aminorūgštis, tai tokie baltymai turi segmentus giminingus membranai. Hibridinis baltymas 52-4 turi tikrai 15 subrendusio LamB baltymo aminorūgščių, jo signalinė seka išsidėsto greta hidrofilinės LacZ dalies, todėl matomai šis hibridinis baltymas blogai sąveikauja su ląstelės membranomis.

2. Eukariotų ląstelių membranų pažeidimų reikšmė

Ląstelių gyvybingumui labai svarbios membranos. Pažeidus plazminę membraną didėja jos pralaidumas kinta ląstelėje jonų, molekulių koncentracija. Dėl mitochondrijų membranų pažeidimų sumažėja elektrocheminis vandenilio jonų gradientas, slopinama ATP sintezės. Membranų pažeidimas gali sukelti jose esančių baltymų funkcinius sutrikimus. Membranų pažeidimams indukuoti mes naudojome fotosensibilizaciją.

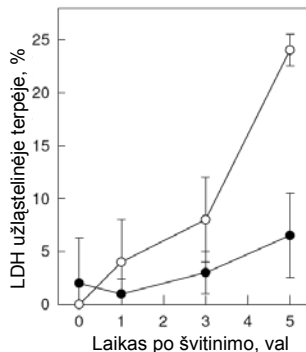
Mes tyrėme eukariotų ląstelių membranų integralumo įtaką ląstelių gyvybingumui. Tyrimus atlikome su BHK (naujagimio sirų žiurkėno fibroblastai), MH-22A (epiteliškos pelės hepatomos ląstelės) ir A-341 (žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelės) ląstelių linijomis.

Sužadinus lokalizuotus membranose fotosensibilizatorius, generuojamos aktyviosios deguonies formos (ROS), kurios pažeidžia membranų lipidus, baltymus, nukleorūgštis. Fotosensibilizatorių aktyvumas priklauso nuo jų lokalizacijos įvairiuose ląstelės erdvėskyriuose, jų koncentracijos bei $^1\text{O}_2$ ir laisvųjų radikalų susidarymo kvantinio našumo. Fotodinaminio poveikio metu susidariusios aktyviosios deguonies

formas difunduoja ne daugiau kaip 20 nm (Moan ir Berg 1991), todėl fotosensibilizatoriaus veikimas priklauso nuo fotosensibilizatoriaus lokalizacijos, nuo jų lipofiliškumo, nuo ląstelių inkubacijos su fotosensibilizatoriumi laiko. Vienas iš plačiai tiriamų fotosensibilizatorių yra mTHPC (mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorinas), jis gerai tirpsta lipiduose (Ma L. et al Int, J. Cancer 1994), lengvai praeina pro plazminę membraną ir gali kauptis organelių membranose. Mes tyrėme mTHPC poveikį membranų integralumui ir energetiniam režimui.

2.1. Eukariotų ląstelių plazminės membranos pažeidimas

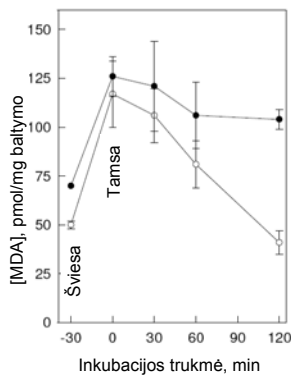
Lipidų pažeidimas turi keisti membranų integralumą, to pasekoje gali kisti membranos pralaidumas. Plazminės membranos pralaidumą registruojame pagal citozolio baltymo laktato dehidrogenazės išėjimą iš ląstelės į inkubacijos terpę. Lipofilinis fotosensibilizatorius mTHPC kaupiasi įvairiose ląstelės membranose – plazminėje, mitochondrijų, Goldžio komplekso, endoplazminiame tinkle (Teiten M. H. et al 2003). Po švitinimo, LDH koncentracija inkubacijos terpėje didėja (2 pav.). Inkubavus ląsteles su fotosensibilizatoriumi 18 val., LDH koncentracija užląstelinėje terpėje padidėjo ~25 %.



2 pav. Plazminės membranos pralaidumo padidėjimas po fotosensibilizacijos. Ląstelės inkubuotos su 0,7 μ M mTHPC, 4 val. (uždari simboliai) arba 18 val. (atviri simboliai), po to švitinta 30 min ($\lambda > 590$ nm, 1 W/m²). Po švitinimo inkubuota DMEM terpėje; brūkšniai – standartinė klaida

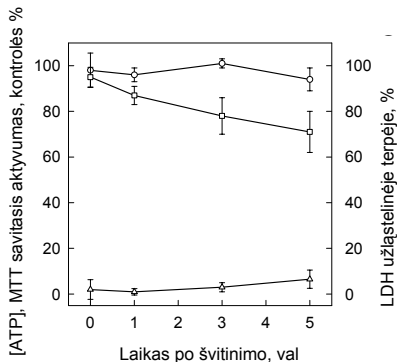
LDH išėjimas iš ląstelių priklausė nuo ląstelių energetinio aprūpinimo. Inkubuojant BHK ląsteles DMEM terpėje, tiksliai 10 % LDH aktyvumo buvo inkubacijos terpėje, tuo tarpu DPBS, LDH aktyvumas išaugo iki 75 %. MH-22A ląstelių membranos pralaidumas LDH buvo mažesnis. Baltymo išėjimas iš ląstelių turi būti susijęs su membranos pralaidumo padidėjimu, su membranos lipidų pažaidomis.

Lipidų pažaidas po fotosensibilizacijos įvertinome matuojant susidariusio malono dialdehido, kuris atspindi nesočiųjų riebalų rūgščių oksidaciją, susidarymą. Apšvietus mTHPC paveiktas ląsteles stebimos nuo dozės priklausomos lipidų pažaidos (3 pav.). Po 30 min nuo švitinimo pradžios malono dialdehido koncentracija išauga $\sim 60 \pm 15$ pmol/mg baltymo. Po švitinimo pabaigos, ląstelėse, kurios buvo inkubuotos visavertėje terpėje po 2 val. lipidų peroksidacijos lygis atsistatė pilnai, iki pradinio lygio. Ląstelės, kurios po švitinimo buvo inkubuotos druskų tirpale, nesugebėjo atstatyti malono dialdehido kiekio ir padidėjusi lipidų peroksidacija išsilaikė inkubuojant ląsteles 2 val. tamsoje. Gautieji rezultatai rodo, kad padidėjusi lipidų peroksidacija yra pradinis atsakas į nuo mTHPC priklausomas ląstelių pažaidas, kurios atsistato inkubuojant ląsteles terpėje turinčioje metabolizmo substratus. Visavertėje terpėje yra stebima lipidų pažaidų reparaciją, matomai todėl LDH išėjimas iš ląstelių yra slopinamas.



3 pav. Lipidų pažaidos po fotosensibilizacijos. Ląstelės inkubuotos su $0,7 \mu\text{M}$ mTHPC 18 val., po to švitinta 30 min ($\lambda > 590 \text{ nm}$, 1 W/m^2). Ląstelės po švitinimo inkubuotos DMEM (atviri simboliai) ar DPBS (uždari simboliai). Brūkšniai – standartinė klaida.

Plazminės membranos pažeidos priklauso nuo ląstelės energetinio aprūpinimo ir nuo sąveikos su mTHPC laiko. Trumpalaikė, 1 val. inkubacija su mTHPC ir po to švitinimas 30 min nesukėlė LDH išėjimo iš ląstelių. Po 4 val. inkubacijos su mTHPC LDH koncentracija inkubacijos terpėje statistiškai patikimai mažesnė nei po 18 val. Ilginant inkubacijos laiką, LDH koncentracija inkubacijos terpėje didėja.

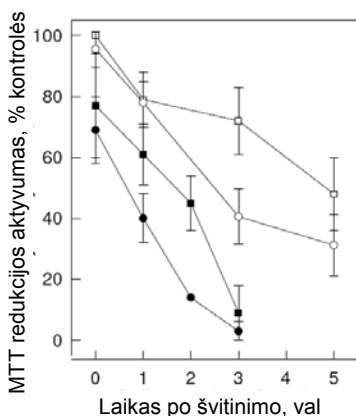


4 pav. Inkubacijos po švitinimo su mTHPC poveikis LDH išėjimui (trikampiai simboliai), ATP kiekiui (apvalūs simboliai) ir MTT savitajam aktyvumui (kvadratiniai simboliai) BHK ląstelėse. Reakcijos sąlygos nurodytos 2 pav., bet inkubuota su mTHPC 4 val

Trumpalaikės inkubacijos su mTHPC metu fotosensibilizatorius pradžioje kaupiasi plazminėje membranoje, po švitinimo lipidų peroksidacija didėja, tačiau plazminės membranos pralaidumas kinta nežymiai. Tiksliai ilgalaikė inkubacija su mTHPC ženkliai padidina membranos pralaidumą baltymams. Gali būti, kad trumpalaikės inkubacijos metu, po švitinimo susidariusios lipidų pažeidos yra atstatomos, sintetinant endoplazminiame tinkle naujus membranos lipodus. Tiksliai ilgalaikė inkubacija su mTHPC (18 val), kai jau gali būti pažeidžiamos ir endoplazminio tinklo membranos bei mitochondrijų, plazminės membranos pralaidumas kinta žymiai. Druskų terpėje, kurioje metaboliniai procesai yra lėtesni, tiek lipidų peroksidacija, tiek plazminės membranos pralaidumo padidėjimas neatsistato. Norėdami patikrinti viduląstelių membranų pažeidimų įtaką membranų integralumui ir ląstelės metabolizmo pokyčiams mes tyrėme fotosensibilizacijos įtaką ląstelės metabolizmui.

2.2 Vidinių ląstelių membranų pažeidimas

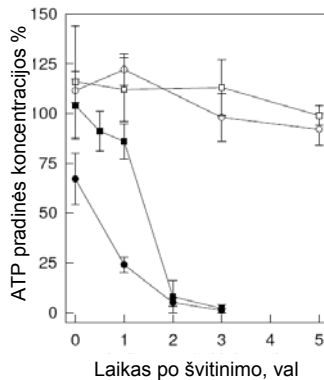
Lipofilinis fotosensibilizatorius mTHPC lokalizuojasi ne tik plazminėje membranoje, bet difuziškai pasiskirsto ląstelių vidinėse membranose, jų tarpe ir mitochondrijose. Tolimesniuose darbo etapuose mes tyrėme fotosensibilizacijos įtaką ląstelės energetiniam metabolizmui. Pagrindinis ląstelės energijos šaltinis yra ATP, kuri susidaro glikolizės ir oksidacinio fosforilinimo metu. Funkcionuojančiose ląstelėse didžiausias ATP kiekis susidaro mitochondrijose. Vienas iš rodiklių atspindintis mitochondrijų metabolizmą yra MTT redukcinio pajėgumo kitimas. MTT redukcinis pajėgumas atspindi oksidoreduktazių, jų tarpe ir mitochondrinių aktyvumą. Fotosensibilizuojant ląsteles, oksidoreduktazių aktyvumas mažėja (5 pav.). Inkubuojant ląsteles DPBS terpėje, iš karto po švitinimo pabaigos MTT redukcinis aktyvumas yra sumažėjęs 20-30 %. Toliau laikant ląsteles tamsoje, praėjus 3 val po švitinimo pabaigos, oksidoreduktazių aktyvumas sumažėja iki nulio. Tuo tarpu inkubuojant visavertėje terpėje, po 3 val inkubacijos tamsoje, MTT redukcinis aktyvumas sumažėja tikrai apie 50 %. Yra nedidelis skirtumas tarp fotosensibilizatorių poveikio skirtingom ląstelių linijom, MH-22A ląstelės yra dalinai atsparesnės.



5 pav. Fotosensibilizacijos poveikis MTT redukcijos aktyvumui BHK-21 (apskritimai) ir MH-22A (kvadratai) ląstelėse. Ląstelės inkubuotos su $0,7 \mu\text{M}$ mTHPC 18 val, po to švitinta 30 min ($\lambda > 590 \text{ nm}$ 1 mW/cm^2), po švitinimo inkubuota DMEM terpėje (balti simboliai) arba DPBS druskų tirpale (juodi simboliai); brūkšniai – standartinė klaida.

Sekančioje bandymų serijoje tyrėme membranos pažeidimų įtaką ląstelės metabolizmui. Pelės hepatomos ląstelės buvo fotosensibilizuotos skirtingos lokalizacijos fotosensibilizatoriais – lipofiliniais mTHPC, endogeniniais porfiriniais ir hidrofiliniu TPPS₄ (*meso*-tetra(4-sulfonatofenil)porfiras). Porfirinai yra lipofilinės medžiagos, jie yra sintetinami mitochondrijose ir jie kaupiasi mitochondrijose. Porfirinai yra sintetinami iš aminolevulino rūgšties (ALA). Hidrofilinis fotosensibilizatorius TPPS₄ lokalizuojasi lizosomose (Dang C. V. ir Semenza G. L. 1999).

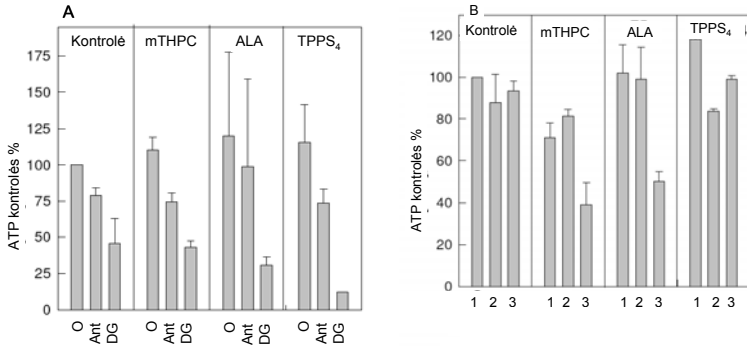
Ląstelės energetinį statusą geriausiai atspindi ATP koncentracijos kitimai. Matuojant po fotosensibilizacijos ATP koncentraciją DPBS terpėje, po 3 val inkubacijos tamsoje, jos koncentracija sumažėja iki nulio (6 pav.). Pastebėtas nežymus skirtumas tarp skirtingų ląstelių linijų. BHK ląstelėse, ATP koncentracija mažėja greičiau negu MH-22A ląstelėse. Jeigu ląstelės po švitinimo buvo inkubuotos visavertėje terpėje, ATP koncentracijos mažėjimas buvo nežymus. Buvo pastebėtas įdomus faktas, kad po švitinimo pirmomis valandomis buvo registruojamas nedidelis (~20 %) ATP koncentracijos išaugimas.



6 pav. Fotodinaminis poveikis ATP koncentracijos pokyčiams BHK-21 (apskritimai) ir MH-22A (kvadratai) ląstelėse. Eksperimento sąlygos nurodytos 5 pav.

Norėdami įvertinti oksidacinio fosforilinimo ir glikolizės indėlį į ATP sintezę, naudojome skirtingus glikolizės ir mitochondrijų kvėpavimo grandinės substratus ir įvairius slopiklius.

Glikolizės procesas buvo slopinamas deoksigliukoze, kuri konkuruoja su gliukoze heksokinazės katalizuojamoje reakcijoje. Elektronų pernaša elektronų pernašos grandine buvo slopinama antimicinu. Po fotosensibilizacijos slopikliai mažino ATP koncentraciją ląstelėse, tačiau deoksigliukozės poveikis buvo ryškesnis (7 pav. A). Antimicinas sumažino ATP koncentraciją ~30 %, tuo tarpu glikolizės slopinimas sumažino ATP koncentraciją net 70 %.

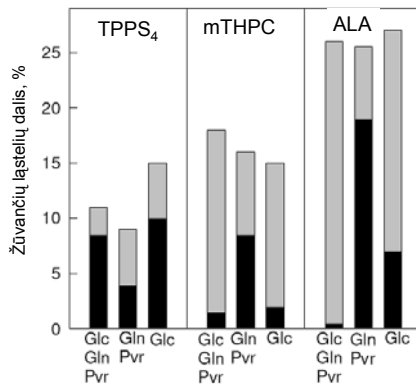


7 pav. Fotosensibilizacijos sukelti ATP koncentracijos pokyčiai MH-22A ląstelėse. A – ląstelės inkubuotos su oksidacinio fosforilinimo ir glikolizės slopikliais, B – su skirtingais energijos substratais. Fotosensibilizuota 0,7 μM mTHPC (8 kJ/m^2), 1 mM ALA (16 kJ/m^2), 50 μM TPPS₄ (65 kJ/m^2). A – švitinimo metu ir po jo ląstelės inkubuotos visavertėje terpėje pridėjus elektronų pernašos slopiklio (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antimicino A, Ant) arba glikolizės slopiklio 5,5 mM 2-deoksigliukozės, DG). B – švitinimo metu ir po jo ląstelės inkubuotos su glikolizės arba trikarboksirūgščių ciklo substratais: 1 – 5,5 mM Glc, 4 mM Gln, 5 mM Pvr, 2 – 5,5 mM Glc, 3 – 4 mM Gln, 5 mM Pvr

Deoksigliukozė slopindama glikolizę mažina ir trikarboksirūgščių ciklo substrato piruvato koncentraciją. Todėl mes palyginome įvairių substratų indelį į susidariusio ATP kiekį. Energizuojant ląsteles glikolizės substratu gliukoze arba substratais, kurie tiesiogiai oksiduojami mitochondrijų (Gln, PVR), susidariusio ATP koncentracija, kontrolinėse ląstelėse, nepriklausė nuo energijos šaltinio (7 pav. B). Fotosensibilizavus ląsteles TPPS₄, kuris pažeidžia lizosomas, sukėlė ATP koncentracijos išaugimą 20 % ląstelėse, kurios buvo inkubuojamos su glikolizės ir oksidacinio fosforilinimo substratais. Tai gali būti susiję arba su ATP sintezės padidėjimu arba su ATP sunaudojimo mažėjimu. Ląstelių fotosensibilizacija su mTHPC, ryškiai sumažina (≥ 50 %) ATP koncentraciją, naudojant substratus, kuriuos tiesiogiai oksiduoja mitochondrijos

(PVR, Gln), tai rodo apie galimas mitochondrijų pažaidas. Gliukozės vaidmuo neapsiriboja tikta energetine. Ji gali valdyti kai kurių genų ekspresiją, ji gali būti įvairių procesų reguliatorius (Rolland et al 2001).

Ląstelių fotosensibilizacija sumažina ląstelių gyvybingumą. Yra žinoma, kad aktyviosios deguonies formos, susidariusios fotosensibilizavus ląsteles fotosensibilizatoriais, kurie lokalizuojasi mitochondrijose, sukelia ląstelės žūtį apoptozės būdu (Buytaert E. et al 2007). Vidiniai ir išoriniai veiksniai, kurie padidina mitochondrijų išorinės membranos pralaidumą yra apoptozės stimulai (Green D.R. ir Kroemer G. 2004). Jų poveikyje iš tarpmembraninės ertmės į citozolį išeina citochromas c ir kiti apoptogeniniai veiksniai. Apoptogeninių veiksnių išsiskyrimą turi stimuliuoti ROS susidariusios išorinėje mitochondrijų membranoje arba perėjusios į išorinę membraną. Fotodinaminis poveikis sukelia ląstelių žūtį tiek apoptozės, tiek nekrozės būdu. Apoptozės ir nekrozės procesus įvertinome fluorescencijos metodu, matuojant akridino oranžinio ir etidžio bromido fluorescenciją. ATP yra būtina apoptozei (Leist et al 1997). Tačiau vien ATP koncentracijos padidėjimas fotosensibilizuojant ląsteles TPPS₄ nesukėlė ląstelių žūtis apoptozės būdu, priešingai ląstelėse dominavo žūtis nekrozės būdu. (8 pav.). Tuo tarpu fotosensibilizacija mTHPC arba ALA terpėje, kur

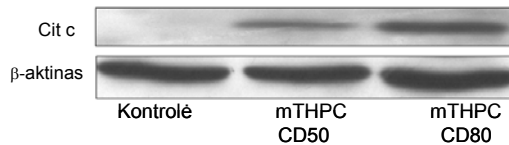


8 pav. Fotosensibilizuotų ląstelių sukelta apoptozė ir nekrozė. Inkubuota: mTHPC – 1,5 val, ALA – 2,5 val, TPPS₄ – 5 val po švitinimo. Apoptozinės ląstelės pilki stulpeliai, nekrozinės ląstelės – juodi. Ląstelės buvo inkubuotos DMEM terpėje su glikolizės arba trikarboksirūgščių ciklo substratais: gliukozė (Glc) 5 mM, glutaminas (Gln) 4 mM, piruvatas (Pvr) 5 mM. Branduolių pokyčiai buvo stebimi fluorescenciniu mikroskopu

kartu buvo glikolizės ir trikarboksirūgščių ciklo substratai sukėlė ląstelių žūtį, daugiausiai apoptozės būdu. Energizuojant ląsteles vien gliukoze, be piruvo rūgšties ir glutamino, nekrozės būdu žūstančių ląstelių skaičius išauga.

Skirtingos lokalizacijos fotosensibilizatoriai sukelia skirtingai sukelia ląstelės žūtį. Fotosensibilizatoriai kurie kaupiasi mitochondrijose, sukelia mitochondrijų membranų pažeidimą ir apoptotiniai signalai išeina pro išorinę membraną į citozolį (Manna S.K. et al. 1998). Vienas iš svarbiausių apoptogeninių signalų yra citochromas c.

Fotosensibilizavus ląsteles mTHPC tomis sąlygomis, kai gyvų ląstelių skaičius lieka 50 % citochromo c kiekis citozolyje padidėja (9 pav.). Padidinus fotosensibilizacijos dozę (CD80), citochromo c kiekis žymiai padidėja.



9 pav. Citochromo c išėjimas į citozolį fotosensibilizuotose mTHPC A-431 ląstelėse. Citochromas c nustatytas Western blot metodu. Ląstelės inkubuotos su 0,1 μg/ml mTHPC 18 val, šviesta 1 ir 3 min (1,0 kJ/m².(CD50) ir 2,9 kJ/m² (CD80))

Vienas iš galimų citochromo c išėjimo iš mitochondrijų tarpmembraninės ertmės į citozolį kelių yra pro nespecifinio pralaidumo porą, kurią slopina ciklosporinas (CspA), savitasis ciklofilino slopiklis (Andreeva et al 1995). Išėjęs citochromas c aktyvina kaspazę-3, kurios aktyvumas buvo registruotas naudojant DEVD substratą. Ląstelių fotosensibilizacija su mTHPC aktyvina DEVD-savitąją kaspazę (4 lentelė).

4 lentelė. DEVD-savitosios kaspazės aktyvumas mTHPC fotosensibilizuotose MH-22A ląstelėse

Poveikis	Kaspazės aktyvumas pmol/min
Kontrolė	0
Kontrolė su CspA	0
Švitinta 0,6 kJ/m ²	2,6
Švitinta 0,6 kJ/m ² su CspA	3,3
Švitinta 1,8 kJ/m ²	1,8
Švitinta 1,8 kJ/m ² su CspA	1,8

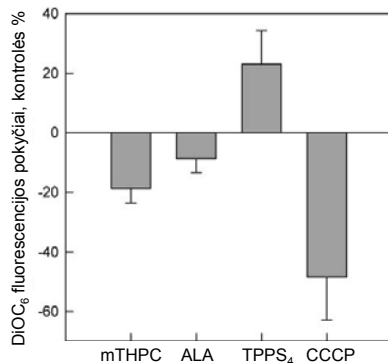
Ląstelės buvo inkubuotos su 0,15 μg/ml mTHPC 18 val., kaspazės aktyvumas nustatytas po 2 val po švitinimo

Nespecifinio pralaidumo poros uždarymas ciklosporinu nesumažino kaspazės-3 aktyvumo, priešingai, esant mažom švitinimo dozėms ($0,6 \text{ kJ/m}^2$) kaspazės aktyvumas padidėjo.

Lipofiliniai fotosensibilizatoriai kaupiasi įvairiose ląstelės membranose. Citochromo c išėjimą į citozolį, kaspazių aktyvinimą, gali sukelti ir kiti proapoptoziniai Bcl2 šeimos baltymai, esantys esantys endoplazminiame tinkle (Murphy K.M., et al 2000). Jie padidina mitochondrijų išorinės membranos pralaidumą ir skatina citochromo c išėjimą iš mitochondrijų (Kessel D., Reiners J. J. Jr (2007). Sekančiame darbo etape mes tyrėme mitochondrijų atsaką į mitochondrijų membranos pažaidas ir į mitochondrijų užpildę esančių fermentų slopinimą

2.3. Kryptingos mitochondrijų pažaidos

Ląsteles fotosensibilizavome mTHPC ir ALA, po fotosensibilizacijos membranos įtampa sumažėjo, tuo tarpu ląsteles inkubavus hidrofiliniu su TPPS₄, membranos įtampa net 20 % išaugo (10 pav.) Mitochondrijų membranos įtampą registruojame matuodami lipofilinio katijoninio fluorochromo DiOC₆, kuris yra pernešamas į mitochondrijas dėka $\Delta\psi$, fluorescenciją. Matome, kad lipofiliniai fotosensibilizatoriai mažina membranos įtampą, matomai didindami vidinės membranos pralaidumą.



10 pav. Mitochondrijų įtampos pokyčiai fotosensibilizuotose MH-22A ląstelėse. Membranos įtampos pokyčiai buvo vertinami pagal DiOC₆ fluorescencijos pokyčius. Ląstelės buvo inkubuojamos su $0,7 \mu\text{M/ml}$ mTHPC (18 val), su $50 \mu\text{g/ml}$ TPPS₄ (4 val) ir 1mM aminolevulinio rūgšties ALA (4 val). Brūkšniai – standartinė klaida

Kitoje darbo dalyje mes tyrėme kaip oksidacinis stresas, sukeltas mitochondrijų viduje veikia ląstelės. Nustatyta, kad padidėjus ROS yra aktyvinama apoptozė (Ott M. et al 2007). ROS (singuletinis deguonis) mitochondrijų viduje buvo generuojamos švitinant rodaminą 123 (Rod123) arba safraniną (Safr).

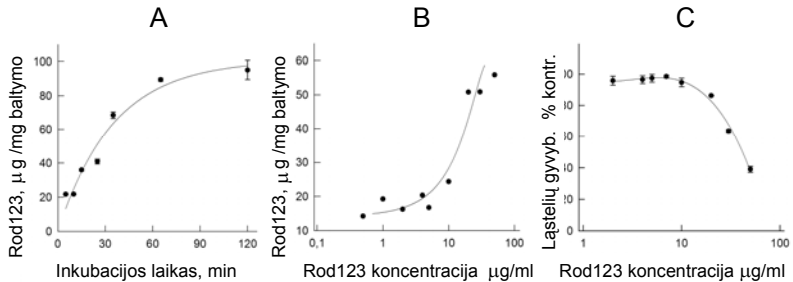
Rodaminas 123 ir safraninas yra lipofiliniai katijonai, kurie elektroforetiškai patenka tiesiai į mitochondrijų vidų dėka ant vidinės membranos esančios membranos įtampos (minus viduje) (Palmiera et al 1996, Modica-Napolitano J.C 2001,). Jie nepatenka į vidines ląstelių pūsles, lizosomas (Johnson L.V. et al 1980, Chen L. B. 1988), o jų kiekis mitochondrijose priklauso nuo elektrinių potencialų skirtumo. Mes pasirinkome šiuos dažus norėdami sukelti fotopazaidas mitochondrijų viduje.

Rodamino 123 yra plačiai naudojamas fluorescencinis žymuo tirti gyvas mitochondrijas, jo fluorescencinė kvantinė išeiga yra didelė $\Phi_F = 0,9$ (Chow A. et al 1986). Tai rodo, kad tripletinės būsenos, kuri svarbi 1O_2 , vieno iš svarbiausių veiksmų fotodinaminėje terapijoje, kvantinė išeiga yra maža. Lazerinės fotolizės eksperimentai parodė, kad tripletinės būsenos kvantinė išeiga $\Phi_T = 0,1$. Tačiau buvo pastebėta, kad rodamino 123 sukeltas fototoksiškumas priklausė nuo deguonies koncentracijos, tai rodo, kad ROS yra fotopazaidų skatintojas ar tarpininkas (Richmond R.C. ir O'Hara J.A. 1993).

Mes palyginome rodamino 123 sukeltas fotopazaidas su stipraus fotosensibilizatoriaus mTHPC, kurio tripletinės būsenos kvantinė išeiga $\Phi_T = 0,9$ (Berenbaum M.C. et al 1986) veikimu.

MH-22A ląstelės buvo inkubuojamos su rodaminu 123, po 60 min. ląstelės jau buvo prisotintos dažu ir tolimesnė inkubacija nežymiai didino viduląstelinę rodamino 123 koncentraciją (11 pav. A). Rodamino 123 pernaša į ląsteles yra membranos įtampos žymuo, ji gana plačiose ribose, iki 10 $\mu\text{g/ml}$ nepriklauso nuo Rod123 koncentracijos inkubacijos terpėje. (11 pav. B). Esant didesnėms rodamino 123 koncentracijoms, pernaša į ląsteles ženkliai padidėja ir padidėjimas koreliuoja su ląstelių gyvybingumo sumažėjimu tamsoje (11 pav. C). Buvo parodyta, kad rodaminas 123 slopina mitochondrijų bioenergetines funkcijas, esant jo koncentracijoms didesnėms nei 10 $\mu\text{g/ml}$ (Modica-Napolitano J.S. et al 1984, Atlante A. et al 1992). Matomai mitochondrijų perkrova rodaminu pažeidžia ląstelių homeostazę. Be to yra žinoma, kad žūstančios

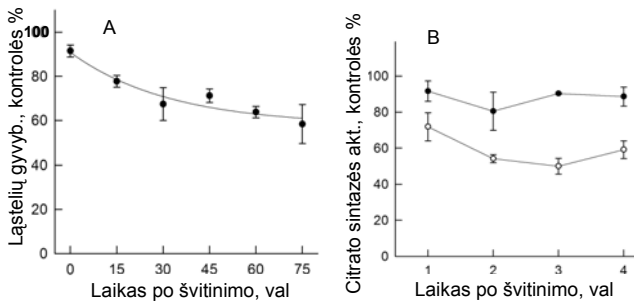
ląstelės nekontroliuojamai absorbuoja didelius medžiagų, esančių inkubacijos terpėje, kiekius. Tenka pažymėti, kad šie rodamino 123 poveikiai yra nešvitinant ląstelių.



11 Pav. Rodamino 123 patekimas į MH-22A ląsteles ir ląstelių gyvybingumas.

(A) – Rodamino 123 sugėrimo priklausomybė nuo inkubacijos laiko; ląstelės buvo inkubuojamos terpėje su 5 µg/ml rodamino 123. (B) – Rodamino 123 sugėrimo priklausomybė nuo rodamino 123 koncentracijos inkubacijos terpėje. Ląstelės buvo inkubuojamos 1 val. Ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo rodamino koncentracijos. Ląstelių gyvybingumas matuotas pagal MTT redukciją

Todėl tirdami mitochondrijų pažaidas, mes netyrėme rodamino toksiškumo, esant didelėms rodamino koncentracijoms, apsiribojome fotopažaidomis, esant 5 µg/ml rodamino 123. Ši koncentracija nesukėlė didelių pokyčių mitochondrijų pasiskirstyme ląstelėje ir neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui.



12 pav. Fotosensibilizacijos rodaminu poveikis MH-22A ląstelių gyvybingumui

(A) ir citrato sintazės aktyvumui (B). Ląstelių gyvybingumas buvo matuotas MTT metodu, po 24 val. po švitinimo. Ląstelės inkubuotos 1 val. su 5 µg/ml Rod 123 prieš švitinant 509±5 nm, 29 W/m² 60 min. Atviri simboliai: ląstelės švitintos, uždari simboliai – ląstelės nešvitintos.

Didžiausias ląstelių gyvybingumo sumažėjimas siekė 40 % švitinant ląsteles inkubuotas su rodaminu 60 min ($104,4 \text{ kJ/m}^2$) (12 pav. A). Tuo tarpu toks pat gyvybingumo praradimas mTHPC-PDT pasiektas esant $0,72 \text{ kJ/m}^2$ (45 sek veikiant šviesai).

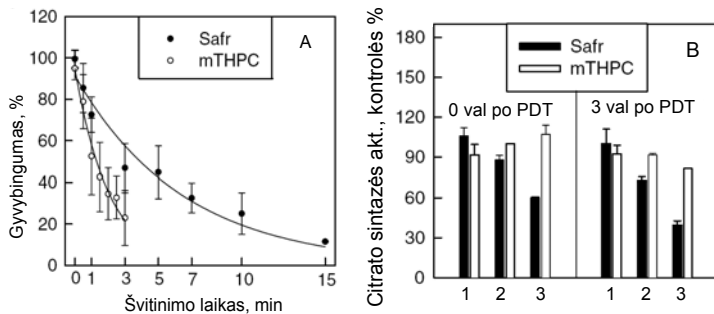
Reikia pastebėti, kad apšvitinus ląsteles, inkubuotas su rodaminu 123, vyksta mitochondrijų morfologiniai pokyčiai – padidėja mitochondrijų dalijimasis, praėjus 24 val po švitinimo neatsistato mitochondrijų tinklai.

Rodaminas 123 yra sutinkamas mitochondrijų užpilde, todėl jo kaip fotosensibilizatoriaus taikiniai galėtų būti fermentai, esantys mitochondrijų užpilde. Mes matavome fotosensibilizacijos poveikį trikarboksirūgščių ciklo tirpaus užpildo fermento citrato sintazės aktyvumui. Šio fermento aktyvumo sumažėjimas rodo vidinės mitochondrijų ertmės pažaidas. Inkubuojant ląsteles tamsoje su rodaminu 123 buvo pastebėtas nežymus (10 %) citrato sintazės aktyvumo sumažėjimas. Tačiau fotosensibilizuotose ląstelėse citrato sintazės aktyvumas ženkliai sumažėjo ir siekė 50 % buvusio lygio (12 pav. B). Tuo tarpu po fotosensibilizacijos su mTHPC, fermento aktyvumo slopinimas siekė 10 – 15 % kuris atsistatė po 2 val.

Rodamino 123 sukeltos mitochondrijų pažaidos yra nedidelės, reikalingos didelės švitinimo dozės, todėl efektyvesnei singuletinio deguonies produkcijai mitochondrijų viduje mes naudojome katijoninį fotosensibilizatorių safraniną, kurio singuletinio deguonies susidarymo kvantinė išeiga yra didelė (Akerman K.E ir Wikstrom M.K 1976, Bunting J.R. 1992).

Safranino ir mTHPC lokalizacija A431 ląstelėse buvo nustatyta fluorescenciniu konfokaliniu mikroskopu.. Naudodami klasikinius mitochondrijų žymenis MitoTracker Deep Red ir MitoTracker Green mes parodėme, kad safranino fluorescencija atitinka mitochondrijų buvimo vietas ląstelėje. Lyginant mTHPC ir mitochondrijų žymenų fluorescenciją nustatėme, kad šių medžiagų fluorescencijos vietos dalinai sutampa, tai dar kartą patvirtina, kad dalis mTHPC yra lokalizuota ir mitochondrijose.

Apšvitus ląsteles, abu fotosensibilizatoriai efektyviai mažino nuo šviesos priklausantį ląstelių gyvybingumą. (13 pav. A). Vienas fotosensibilizatorius ar tikrai ląstelių švitinimas neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui.



13 pav. Fotosensibilizatorių safranino ir mTHPC poveikis A431 ląstelių gyvybingumui ir citrato sintazės aktyvumui. (A) Ląstelių gyvybingumas buvo tirtas dažant ląsteles kristaliniu violetiniu. Švitinimo sąlygos: safraninas 509±5 nm, 21 W/m², mTHPC, 660±5 nm, 16 W/m². (B) Citrato sintazės aktyvumas. Švitinimo sąlygos: 1 – kontrolė, 2 – CD50, 3 – CD80. Safraninas CD50, 3 min 5,2 kJ/m²; safraninas CD80, 10 min, 17,4 kJ/m²; mTHPC CD50, 1 min, 1 kJ/m², mTHPC CD80, 3 min, 2,9 kJ/m². Citrato sintazės aktyvumas ląstelių lizatuose buvo matuojamas iš karto po švitinimo arba po 3 val

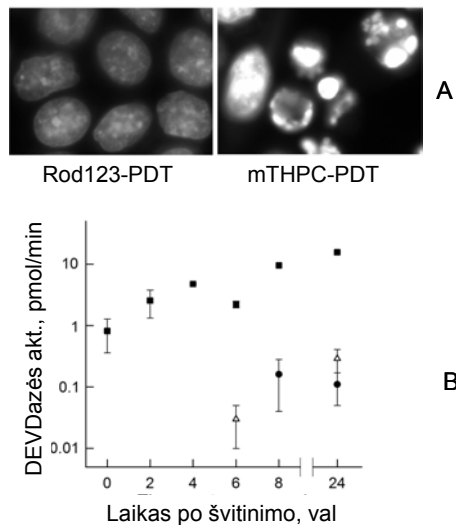
Lipofiliniai fotosensibilizatoriai sukelia ląstelių žūtį fotosensibilizatoriai sukelia ląstelių žūtį apoptotinės ir nekrotinės būdu, silpna fotosensibilizacija sukelia apoptozę, tuo tarpu didelė – nekrozę (Chernyak B. V. et al 2006, Alvarez M.G. et al 2005). Dauguma tolimesnių eksperimentų buvo atliekami tomis švitinimo sąlygomis, kuriomis gyvų ląstelių skaičius po švitinimo sumažėjo arba 50 % (CD50) arba 80 % (CD80). Safranino-PDT atveju buvo švitinama 3 arba 10 min (atitinkamai 5,2 arba 17,4 kJ/m², 509±5 nm), o mTHPC-PDT 1 arba 3 min (1 arba 2,9 kJ/m², 660±5 nm).

Švitinant buvo slopinamas mitochondrijų užpildo fermentų aktyvumas (13 pav. B). Iš karto po šviesos poveikio citrato sintazės aktyvumas nekito, esant terpėje mTHPC. Tuo tarpu ląstelėse, inkubuotose su safraninu fermento aktyvumas sumažėjo 40 % esant CD80. Ryškaus citrato sintazės aktyvumo sumažėjimo nebuvo pastebėta inkubuojant ląsteles 3 min su mTHPC ir matuojant fermento aktyvumą po 3 val. Didelis (22 %) citrato sintazės aktyvumo sumažėjimas buvo pastebėtas veikiant ląsteles safraninu po 3 val (CD50). Esant CD80, fotosensibilizuotose mTHPC ląstelėse, citrato sintazės aktyvumas sumažėjo 20 % ($P < 0,001$), tuo tarpu safraninu veiktose ląstelėse citrato sintazės aktyvumas sumažėjo net 61 % ($P = 0,003$). Greitas citrato sintazės aktyvumo

sumažėjimas safranino-PDT yra pasekmė katijoninio dažo safranino pernašos į mitochondrijų užpildą ir jame esančių fermentų pažaidų.

Norėdami išsiaiškinti kokį poveikį vidinės mitochondrijų ertmės pažaidos turi ląstelių žūčiai mes tyrėme žūties būdus, fotosensibilizavus ląsteles safraninu ir rodaminu.

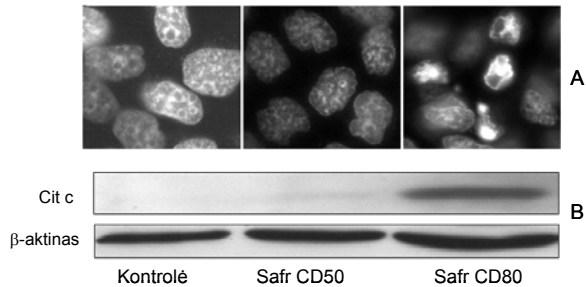
Yra nustatyta, kad išorinės mitochondrijų membranos pralaidumo padidinimas ir citochromo c išėjimas yra pagrindinis vidinis apoptozės stimulus. Norėdami išsiaiškinti ar pažeidus ne mitochondrijų membraną, o mitochondrijų viduje esančius taikinius keičiasi ląstelių morfologija ir žūties būdai, mes fotosensibilizavome ląsteles fotosensibilizatoriais, kurie kaupiasi mitochondrijų viduje – rodaminu 123 ir safraninu.



14 pav. Fotosensibilizacijos indukuota apoptozė. (A) Hoechst 33342 fluorescencija po PDT. Inkubacija su rodaminu 123, 4 val; mTHPC, 1,5 val. (B) DEVDazės aktyvumas po PDT. Trikampiai – nepaveiktos, kontrolinės ląstelės. Rutuliukai: inkubuota su 5 $\mu\text{g/ml}$ rodaminu 123 1 val; švitinimas, 509 \pm 5 nm, 29 W/m², 60 min. Kvadratėliai: inkubuota su 0,15 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC 18 val, švitinimas, 660 \pm 5 nm, 16 W/m², 45 sek

Fotosensibilizavus rodaminu 123, buvo nustatytos tik kelios žuvusios ląstelės apoptotiniu ar nekroziniu būdu (toks pat kiekis buvo nustatytas ir kontroliniuose mėginiuose) (14 pav. A). Fotosensibilizacija rodaminu 123 nepadidino citochromo c išėjimo iš ląstelių ir neaktyvino kaspazės-3 (14 pav. B).

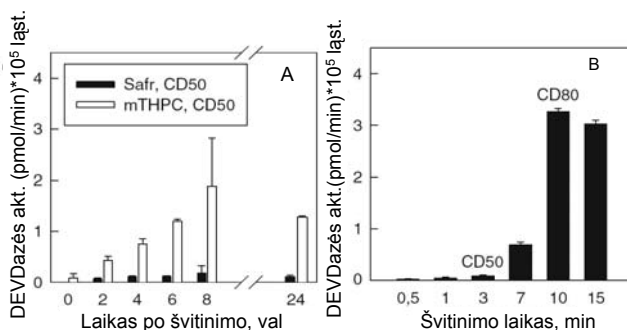
Ląstelės atsaką į fotosensibilizaciją tyrėme esant skirtingom citotoksinėm safranino dozėm nuo CD10 iki CD80. Fotosensibilizuojant ląsteles safraninu, tomis sąlygomis, kai gyvų ląstelių skaičius lieka 50 % (CD50) buvo nustatytos tikrai kelios ląstelės žūstančiosapoptozės ar nekrozės būdu (15 pav. A). Taip pat nustatyti pėdsakai išėjusio iš mitochondrijų citochromo c (15 pav. B), bei nedidelis kaspazės-3



15 pav. Fotosensibilizacijos sukelta apoptozė. (A) Hoechst 33342 fluorescencija A-431 ląstelėse po fotosensibilizacijos. Inkubacijos laikas po švitinimo: Safr-PDT CD50 ir CD80 – 4 val (B) citochromo c išėjimas į citozolį po 3 val švitinimo

aktyvumas (16 pav. A). Tuo tarpu lyginant su lipofiliniu fotosensibilizatoriumi mTHPC, jo poveikis esant CD50 rodė ryškia ląstelių žūtį apoptozės būdu - ląstelės tapo apvalios, susitraukė, įvyko branduolio kondensacija citochromas c išėjo į citozolį (9 pav.), bei buvo aktyvinama kaspazė-3 (DEVDazės aktyvumas išaugo) (16 pav.). Nekrozės būdu žūnančių ląstelių skaičius buvo nežymus, mažiau nei 2 %.

Gauti rezultatai rodo, safranino-PDT metu, naudojant dozes mažesnės nei CD50, ląstelės nežuvo nei nekrozės, nei apoptozės būdu, net praėjus 72 val po švitinimo. Tačiau didelės safranino-PDT dozės virš CD70 sukėlė žymią apoptozę: charakteringai pakito ląstelės ir branduolio morfologija (15 pav. A), ryškiai padidėjo citochromo c išėjimas į citozolį (15 pav. B), padidėjo kaspazės-3 aktyvumas (16 pav. A, B). Safranino-PDT sukeltos apoptozės metu, apie 2 % ląstelių žūna ir nekrozės būdu.



16 pav. Kaspazės-3 aktyvinimas po fotosensibilizacijos. (A) Kaspazės-3 aktyvumas po Safr-PDT ir mTHPC-PDT. (B) DEVDazės aktyvumas po Safr-PDT po 3 val inkubacijos po švitinimo pabaigos

Fotosensibilizatoriai, kurie pažeidžia mitochondrijų membranas sukelia citochromo c išėjimą, aktyvina kaspazę-3, bei sukelia ląstelės žūtį apoptozės būdu. Tie fotosensibilizatoriai, kurie pasiskirsto mitochondrijų viduje nesukelia ląstelės žūties apoptozės būdu. Apoptozę sukelia tiksliai taikant dideles fotosensibilizacijos dozes.

Perspektyvos

Mūsų atliktuose tyrimuose buvo palygintos įvairių membranų pažeidimų poveikis membranų pralaidumui, metabolizmui, žūties būdams. Toliau numatoma atlikti tyrimu su skirtingos histogenezės ir diferenciacijos laipsnio ląstelėmis. Numatoma tirti ląstelių membranų pažeidimų įtaką ląstelių gyvybingumui, medžiagų apykaitai, ląstelės energetiniam aprūpinimui. Numatoma tirti aktyviųjų deguonies formų poveikį ląstelės ciklui, nustatyti ląstelių žūties autofagijos būdu mechanizmus. Šie tyrimai pagilins žinias apie aktyviųjų deguonies formų sukeltus ląstelės žūties mechanizmus.

Išvados

1. Hibridinių baltymų Lamb-LacZ sąveika su *E. coli* membranų pūslelėmis priklauso nuo membranos baltymo LamB polipeptidinės grandinės ilgio ir nuo baltymo SecA buvimo membranose.
2. Aktyviųjų deguonies formų generacija eukariotų ląstelėse padidina lipidų peroksidacijos lygį, padidina plazminės membranos pralaidumą baltymams, sumažina ląstelės oksidoreduktazių aktyvumą.
3. Ląstelių gyvybingumo pokyčiai mažiau jautrūs aktyviųjų deguonies formų susidarymui mitochondrijų viduje ir mitochondrijų vidinės ertmės pažeidimams, nei ląstelių membranų pažeidimams.
4. Ląstelių žūties būdai priklauso nuo membranų pažeidimų lokalizacijos, poveikio dozės, poveikio ląstelės metabolizmui stiprumo, ląstelės energetinio aprūpinimo.

Habilitacijos procedūrai teikiamų mokslinių publikacijų sąrašas

Monografijos

1. J. Didžiapetrienė, S. Uleckienė, L. L. Gričiūtė, K. P. Valuckas, V. Atkočius, J. Kadziauskas. Antioksidantai onkologijoje. Nauda ir vartojimo rizika. (Monografija). Lietuvos mokslas. 2004, 49 knyga, 153 p.

Straipsniai

leidiniuose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) duomenų bazes

1. A. Sasnauskiene, J. Kadziauskas, N. Vezelyte, V. Jonusiene, V. Kirvelienu. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis*. 2009 v. 14, Issue3, p. 276-286. (*ISI Web of Science*).
2. A. Sasnauskienė, J. Kadziauskas, D. Labeikytė, V. Kirvelienė. Rhodamine 123-mediated photodamage to mitochondrial interior does not develop hallmarks of apoptosis in MH22 cells. *Biologija* 2009, Nr 1 (priimta į spaudą). (*ISI Master Journal List*).
3. V. Sabaliauskiene, A. Sasnauskiene, J. Kadziauskas, V. Kirvelienu. The effect of photodynamic treatment on the activity of regulatory glycolytic enzymes in A431 cells. *Biologija*. 2008, v. 2, Nr 3, p. 174-177. (*ISI Master Journal List*).
4. V. Kirvelienu, A. Sadauskaite, J. Kadziauskas, S. Sasnauskiene, B. Juodka. Correlation of death modes of photosensitized cells with intracellular ATP

concentration. FEBS Letters. ISSN 0014-5793. Elsevier, 2003, v. 553, p. 167-172. (*ISI Web of Science*).

5. V. Kirveliėne, L. Prasmickaitė, J. Kadziauskas, R. Bonnett, B. D. Djelal, B. Juodka. Post-exposure processes in Temoporfin-photosensitized cells *in vitro*: reliance on energy metabolism. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, v. 41, p. 173-180, 1997. (*ISI Web of Science*).
6. L. Prasmickaitė, V. Kirveliėne, J. Kadziauskas and B. Juodka. Dynamics of lipid peroxidation and cell membrane injury in photosensitized cells *in vitro*. Biofactors. ISSN 0951-6433. 1997, v. 6, p. 243-244. (*ISI Master Journal List*).

Straipsniai

leidiniuose, įtrauktuose į kitas tarptautines duomenų bazines, patvirtintas Lietuvos Mokslo tarybos

1. A. Sadauskaitė, E. Pimpė, J. Kadziauskas, V. Kirvelienė, B. Juodka. Cytochrome c translocation in m-THPC photosensitized murine hepatoma MH22 cells *in vitro* Biologija, 2003, Nr. 3, p. 16-18. (*CAB Abstracts*).
2. A. Sadauskaitė, Ž. Dapkūnas, J. Kadziauskas, V. Kirvelienė. Propagation of cytotoxic processes in response to photodynamic treatment with ALPcS₄ *in vitro*. Biologija. 2004. Nr. 2 (I priedas). p. 138-141. (*CAB Abstracts*).
3. V. Kirvelienė, A. Sadauskaitė, J. Kadziauskas, B. Juodka. Cell death induced by photosensitisers of different intracellular localisation: Control by ATP concentration. 2000, Nr. 2, p. 146-149. (*CAB Abstracts*).
4. J. Kadziauskas, V. Kirveliėne, L. Prasmickaitė, B. Juodka. The effect of photosensitizers on cell metabolism *in vitro*. Polish Journal of Environmental Studies. 1998, v. 7, p. 368. (*CAB Abstracts*).
5. L. Prasmickaitė, V. Kirveliėne, J. Kadziauskas, B. Juodka, J. Didžiapetriėne. Photosensitized lipid peroxidation in MH22 cells *in vitro* and *in vivo*. Biologija, 1995, Nr. 1-2, p. 109-110. (*CAB Abstracts*).

Straipsniai

recenzuojamuose periodiniuose, tęstinuose arba vienkartinuose mokslo leidiniuose

1. V. Kirvelienė, A. Sadauskaitė, I. Mickuvienė, J. Kadziauskas ir B. Juodka, Fotosensibilizuotų hepatomos ląstelių žūties tyrimai *in vitro*. Medicina. Lietuvos medikų asociacija, 1999, t. 35, Nr. 3, p. 196-200.
2. Я. И. Диджяпетрите, Ю. П. Кадзяускас, Р. Ю. Даугелавичюс, Л. Л. Гринюс. Исследование механизма экспорта белков у *Escherichia coli*. I. Взаимодействие гибридных белков LamB-LacZ с клеткой-продуцентом. Биологические мембраны. 1988, т 5, No 6, p. 573-579.

3. Я. И. Диджяпетрите, Э. В. Ионайтис, Ю. П. Кадзюскас, Я. Г. Балтрунайге, Л. Л. Гринюс. Исследование механизма экспорта белков у *Escherichia coli*. II. Роль продуктов *secA* и *secY* в связывании гибридных белков LamB-LacZ везикулами мембран. Биологические мембраны. 1988, т 5, No 6, p. 580-585.
4. Я. И. Диджяпетрите, Э. В. Ионайтис, Ю. П. Кадзюскас, Я. Г. Балтрунайге, Л. Л. Гринюс. Исследование механизма экспорта белков у *Escherichia coli*. III. Расчет физико-химических свойств гибридных белков LamB-LacZ на основании их аминокислотных последовательностей. Биологические мембраны. 1988, т 5, No 6, p. 586-593.

Kitos publikacijos

1. J. Kadziauskas Biochemijos pagrindai. Bendrasis vadovėlis. Vilniaus universitetas. 2008, 647 p.

Literatūros sąrašas

- Adam-Vizi V., Chinopoulos C., Trends Pharmacol. Sci. 2006, 27, 639-645.
- Akerman K.E., Wikstrom M.. FEBS letters, 1976, 68, 191-197.
- Alvare M. G., Principe F., Milanese M.E. et al Int J Biochem Cell Biol 2005, 37, 2504-2512.
- Atlante A., Passarella S., Moreno G. et al. Photochem Photobiol 1992, 56, 4, 471-478.
- Benson S. A., Bremer E., Silhavy T. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984, 81, 3830-3834.
- Benson S. A., Silhavy T. J. Cell. 1983, 32, 1325-1335.
- Berenbaum M.C., Akande S.L., Bonnett R. et al. Br J Cancer 1986, 54, 5, 717-725.
- Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Biochim Biophys Acta 2007, 1776, 1, 86-107.
- Bunting J.R. Photochem. Photobiol. 1992, 55, 81-87.
- Chen L. B. Annu. Rev. Cell Biol. 1988, 4, 155-81.
- Chernyak B.V., Izyumov D. S., Lyamzaev A. P. et al Biochim. Biophys. Acta 2006, 1757, 525-534.
- Chow A., Kennedy J., Pottier R. et al. Photobiochem Photobiophys 1986, 11, 139-48.
- de Keyzer J., van der Does C., Driessen A. J. Cell. Mol. Life Sci. 2003,60, 10,2034-2052.
- Fekkes P, de Wit J.G., van der Wolk J. P., et al. Microbiol. 1998, 29, 5, 1179-1190.
- Goldberg A. L., St. John A. C. Annu. Rev. Biochem. 1978, 45, 747-803.
- Green D.R., Kroemer G. Science 2004, 305, 5684, 626-629.
- Hall M., Schwartz M., Silhavy T., J. J. Mol. Biol. 1982, 156, 93-112.
- Hershko A., Ciechanover A. Annu. Rev. Biochem. 1982, 51, 335-364.
- Ito K., Bassford P. J., Beckwith J. Cell. 1981, 24, 707-717.
- Johnson L.V., Walsh M.L., Chen L.B. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1980, 77, 2, 990-994.
- Kessel D., Reiners J. J. Jr Photochem. Photobiol. 2007, 83, 1024-1028.
- Liss L. Oliver D. B. J. Biol. Chem. 1986, 261, 2299-2303.
- Ma L., Moan J., Berg K. Int. J. Cancer, 1994, 57, 883-888.
- Manna SK, Zhang HJ, Yan T et al. J Biol Chem 1998, 273, 21, 13245-13254.

Moan J., Berg K. *Photochem Photobiol.* 1991, 53, 549-553.

Modica-Napolitano J.S., Weiss M.J., Chen L.B. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 118, 3, 717-723.

Modica-Napolitano J.S., Aprille J. R. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, 49, 1-2, 63-70.

Moreno F., Fowler A. V., Hall M., et al M. *Nature*, 1980, 286, 356-359.

Murphy K. M, Ranganathan V, Farnsworth M. L., et al *Cell Death Differ.* 2000, 7, 1, 102–111.

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S et al. *Apoptosis* 2007, 12, 5, 913-922.

Palmeira C. M., Moreno A. J., Madeira V. M. et al. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1996, 35, 1, 35-43.

Richmond R.C., O'Hara J.A. *Photochem Photobiol* 1993, 57, 2, 291-297.

Silhavy T. J., Benson S. A., Emr S.D. *Microbiol. Rev.* 1983, 47, 313-344.

Teiten M. H., Bezdetnaya L., Morliere P. Et al *Br. J. Cancer* 2003, 88, 146-152.