LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
VAISTŲ CHEMIJOS KATEDRA

URTĖ ANDRIUŠKEVIČIŪTĖ

PELKINIŲ VINGIORYKŠČIŲ (*FILIPENDULA ULMARIA* L.) ŽOLĖS SKYSTŲJŲ EKSTRAKTŲ PRIEŠVĖŽINIO AKTYVUMO *IN VITRO* ĮVERTINIMAS

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovė
Doc. dr. Vilma Petrikaitė
Konsultantai
Lekt. Dr. Deividas Burdulis
Doc. Dr. Julius Liobikas

KAUNAS, 2016

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
FARMACIJOS FAKULTETAS
VAISTŲ CHEMIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Farmacijos fakulteto dekanas
Vitalis Briedis
Parašas
Data

PELKINIŲ VINGIORYKŠČIŲ (*FILIPENDULA ULMARIA* L.) ŽOLĖS SKYSTŲJŲ EKSTRAKTŲ PRIEŠVĖŽINIO AKTYVUMO *IN VITRO* ĮVERTINIMAS

Magistro baigiamasis darbas

Konsultantai
Dr. Deividas Burdulis
Doc. Dr. Julius Liobikas
Data

Darbo vadovė
Doc. dr. Vilma Petrikaitė
Parašas
Data

Recenzentas

Parašas
Data

Darbą atliko
Magistrantė
Urtė Andriuškevičiūtė
Parašas
Data

KAUNAS, 2016

TURINYS

SANTRAUKA 4
SUMMARY 5
PADĖKA 6
SANTRUMPOS 7
ĮVADAS 8
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI 9
1. LITERATŪROS APŽVALGA 10
1.1. Pelkinės vingiorykštės apibūdinimas 10
1.2. Pelkinių vingiorykščių žolės cheminė sudėtis 11
1.3. Pelkinių vingiorykščių preparatų pritaikymas medicinoje 12
1.4. Pelkinių vingiorykščių skystųjų ekstraktų biologinis aktyvumas 13
1.4.1. Priešvėžinis aktyvumas 13
1.4.2. Antioksidacinis aktyvumas 14
1.4.3. Antimikrobinis aktyvumas 14
1.4.4. Nootropinis aktyvumas 15
1.5. Pelkinės vingiorykštės cheminių komponentų priešvėžinis aktyvumas 16
2. TYRIMO METODIKA IR METODAI 22
2.1. Tyrimo objektas 22
2.2. Reagentai ir įranga 23
2.3. Tyrimo metodikos 24
2.3.1. Poveikio ląstelių proliferacijai nustatymas 24
2.3.2. Ląstelių žūties būdo nustatymas 25
2.3.3. Poveikio ląstelių migracijai nustatymas 25
2.4. Duomenų apdorojimas, statistinė analizė 26
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 27
3.1. Poveikis ląstelių proliferacijai 27
3.2. Ląstelių žūties būdo nustatymas 29
3.3. Poveikis ląstelių migracijai 33
3.4. Ekstraktų aktyvumo priklausomybės nuo pagrindinių komponentų kiekio įvertinimas 36
4. IŠVADOS 37
5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS 38
6. LITERATŪRA 39
7. DARBO PRISTATYMAS 47

SANTRAUKA

U. Andriuškevičiūtės baigiamasis darbas: Pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* L.) žolės skystųjų ekstraktų priešvėžinio aktyvumo *in vitro* įvertinimas. Mokslinė vadovė: doc. dr. Vilma Petrikaitė, konsultantai: doc. dr. Julius Liobikas, lekt. dr. Deividas Burdulis.

Tikslas: Įvertinti pelkinių vingiorykščių žolės skystųjų ekstraktų priešvėžinį aktyvumą.

Uždaviniai: 1) Ištirti pelkinių vingiorykščių žolės skystųjų ekstraktų poveikį vėžinių ląstelių gyvybingumui *in vitro* MTT metodu; 2) Ištirti pelkinių vingiorykščių žolės skystųjų ekstraktų poveikį vėžinių ląstelių migracijai *in vitro*; 3) Nustatyti skirtingais ekstraktais paveiktų vėžio ląstelių žūties būdą; 4) Įvertinti ekstraktų priešvėžinio aktyvumo priklausomybę nuo jų pagrindinių komponentų kiekio.

Tyrimo objektas: Pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* L.) žolės skystieji etanoliniai ekstraktai.

Tyrimo metodai: Ekstraktų poveikis žmogaus vėžio ląstelių proliferacijai įvertintas tiriant ląstelių gyvybingumo slopinimą MTT metodu. Ląstelių žūties būdas nustatytas panaudojant dvigubą dažymą Hoechst 33342 ir propidžio jodidu. Poveikis ląstelių migracijai *in vitro* nustatytas panaudojant „žaizdos gijimo“ metodą. Koreliacinis ryšys tarp ekstraktų priešvėžinio aktyvumo ir veikliųjų komponentų kiekio įvertintas apskaičiuojant *Pearson'o* koreliacijos koeficientą *r*.

Rezultatai: Iš dešimties pelkinių vingiorykščių žolės skystų etanolinių ekstraktų bent vieną ląstelių liniją veikė devyni ekstraktai. Aktyviausiai ekstraktai veikė A549 ląstelių proliferaciją ir visai neturėjo poveikio U87 ląstelių gyvybingumui. Didžiausiu aktyvumu A549 ląstelių gyvybingumui pasižymėjo ekstraktai V.2 ir V.3 (EC_{50} 3,27 ir 3,31 mg/ml), o ekstraktas V.5 geriausiai veikė IGR39 ląstelių liniją (EC_{50} = 5,52 mg/ml). Dauguma ekstraktai ląstelių žūtį sukėlė apoptozės būdu, tik du ekstraktai sukėlė ląstelių nekrozę. Ekstraktai veikė ir ląstelių migraciją: A549 ląstelių migraciją geriausiai slopino ekstraktai V.4 ir V.6 0,625 mg/ml koncentracijos, o IGR39 ląstelių migraciją – ekstraktas V.4 (2,5-5 mg/ml koncentracijos).

Išvados: Pelkinių vingiorykščių žolės etanoliniai ekstraktai pasižymi priešvėžiniu aktyvumu žmogaus melanomos ir plaučių karcinomos ląstelėms. Jie slopina ląstelių proliferaciją, migraciją bei sukelia ląstelių žūtį apoptozės būdu. Priešvėžiniam ekstraktų aktyvumui plaučių adenokarcinomos ląstelėse daugiausia įtakos galėtų turėti flavonoidų ir rauginių medžiagų koncentracijos.

SUMMARY

U. Andriuškevičiūtė Master Thesis: Evaluation of anticancer activity *in vitro* of Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.) herb liquid extracts. Scientific supervisor: Assoc. Prof. V. Petrikaitė, advisors: Lect. D. Burdulis, Assoc. Prof. J. Liobikas; Department of Drug chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical Academy of Lithuanian University of Health sciences. Kaunas, 2016.

The aim of research: To evaluate anticancer activity of *Filipendula ulmaria* liquid extracts.

Objectives: 1) To investigate the effects of Meadowsweet liquid extracts on cancer cell viability *in vitro* using MTT method; 2) To investigate the effect of Meadowsweet liquid extracts on cancer cell migration *in vitro*; 3) To identify the type of cancer cell death induced by different extracts; 4) To evaluate the correlation between the anticancer activity of Meadowsweet extracts and quantity of their main constituents.

The object of research: Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.) herb liquid ethanolic extracts.

Methods: The effect on human cancer cell proliferation was assessed by evaluation cell viability using MTT assay. The type of cancer cell death was identified by staining cells with Hoechst 33342 and propidium iodide. Antimigratory activity was tested using "wound healing" method. The correlation between the activity of extracts and concentration of the main constituents was evaluated by calculating Pearson's correlation coefficient *r*.

Results: Nine out of ten Meadowsweet ethanolic extracts possessed anticancer activity at least against one cancer cell line. Extracts were the most active against A549 cell line, they did not inhibit the growth of U87 cell line. The most active extracts against A549 cell line were V.2 and V.3 (EC_{50} were 3.27 ir 3.31 mg/mL, respectively); and V.5 was the most active against IGR39 cell line (EC_{50} = 5.52 mg/mL). Extracts mostly induced the cell death by apoptosis. Cell necrosis was induced at higher concetrations (2.5-5 mg/mL) and only by two extracts. Extracts also inhibited the cell migration: migration of A549 cells was inhibited by exract V.4 and V.6 at 0.625 mg/mL, and IGR39 – by extract V.4 at (2.5-5 mg/mL).

Conclusions: Meadowsweet herb ethanolic extracts have anticancer activity on human melanoma and lung adenocarcinoma cells. They inhibit cell proliferation, migration and cause the cell death by apoptosis. Anticancer effect of Meadowsweet extracts against lung adenocarcinoma cells could be mostly dependent on the amount of flavonoids and tannins.

PADĖKA

Reiškiama padėka mokslinio darbo vadovei doc. dr. V. Petrikaitei už intensyvų skatinimą gilintis į darbo tematiką, konstruktyvius patarimus ir įgytą patirtį rašant magistrinį tiriamąjį darbą. Taip pat dėkoju Lietuvos sveikatos mokslų universiteto farmakognozijos katedrai ir jos lektoriui Dr. D. Burduliui už darbui suteiktus augalinius ekstraktus. Ypatinga padėka Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Neuromokslų instituto mokslo darbuotojams, ypač doc. Dr. J. Liobikui, už galimybę atlikti tiriamąjį mokslinį darbą instituto laboratorijose, bei patarimus.

.

SANTRUMPOS

ATCC	Amerikos ląstelių kultūros kolekcija (angl. *American type culture collection*)
A549	žmogaus nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ląstelių linija
DMEM	Dulbecco's modifikuota Eagle terpė
DMSO	dimetilsulfoksidas;
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas
EVA	Europos vaistų agentūra
EC_{50}	koncentracija, kuri sukelia 50 proc. biologinių ar biocheminių funkcijų praradimą
FBS	fetalinis veršiukų serumas
IGR39	žmogaus melanomos ląstelių linija
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-)-2,5-difeniltetrazolio bromidas
NVNU	nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo
PBS	fosfatinis druskų tirpalas
PSO	Pasaulio sveikatos organizacija
U87	žmogaus glioblastomos ląstelių linija

ĮVADAS

Mirštamumas nuo vėžio yra viena didžiausių visuomenės sveikatos problemų JAV ir daugelyje kitų pasaulio šalių. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) 2015 m. duomenimis, vėžys yra antra pirmaujanti mirties priežastis išsivysčiusiose šalyse. Kasmet diagnozuojama vis daugiau naujų vėžio formų, ir manoma, kad ateityje naujai diagnozuotų vėžio atvejų skaičius gali didėti [1].

Dauguma šiuo metu vartojamų vaistų nuo vėžio yra gana toksiški žmogaus organizmui, dėl to ieškoma saugesnių alternatyvų, mažiau toksiškų veikliųjų medžiagų. Pastaruoju metu intensyviai tiriamas vaistinių augalų, jų preparatų ir atskirų komponentų priešvėžinis poveikis [2,3,4]. Natūralios medžiagos dažnai yra mažiau toksiškos, o mišiniuose gali veikti sinergistiškai [5].

Atlikta nemažai vingiorykštinių genties (*Filipendulae*) augalų biologinio aktyvumo tyrimų [6,7]. Nustatyta, kad šiuose augaluose kaupiamos medžiagos pasižymi priešvėžiniu aktyvumu, sukelia nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ir melanomos ląstelių apoptozę bei DNR pažaidas [8].

Vienas labiausiai tiriamų vingiorykštinių genties augalų yra pelkinė vingiorykštė (*Filipendula ulmaria* L.). Šis augalas savo sudėtyje turi salicino, kuris buvo panaudotas sintetinant aspiriną. Tai vienas iš žinomiausių erškėtinių šeimos augalų pritaikymų medicinos istorijoje [9]. Intensyviai tiriamas šio augalo antioksidacinis [10], antimikrobinis [11], priešuždegiminis [12] aktyvumas, tačiau atlikta nedaug jo priešvėžinio aktyvumo tyrimų [13, 14].

Pasaulyje yra vartojama daug augalinių preparatų, į kurių sudėtį įeina pelkinių vingiorykščių žolė ar jos preparatai. JAV registruotas preparatas nuo aknės su pelkinių vingiorykščių ekstraktu. Ekstraktai mišiniuose su kitomis augalinėmis žaliavomis vartojami ir po nudegimų susidariusiam odos uždegimui mažinti [15].

Pelkinių vingiorykščių žolės ekstraktai tyrimams pasirinkti dėl jų įvairaus biologinio poveikio. Priešvėžinis ekstraktų aktyvumas nėra detaliai ištirtas, todėl buvo nutarta įvertinti ekstraktų poveikį vėžinių ląstelių migracijai ir proliferacijai, o taip pat išsiaiškinti, kaip priešvėžinis aktyvumas priklauso nuo ekstraktuose esančių aktyviųjų komponentų (flavonoidų, rauginių medžiagų, askorbo rūgšties) kiekio.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Tikslas: Įvertinti pelkinių vingiorykščių žolės skystųjų ekstraktų priešvėžinį aktyvumą.

Uždaviniai:

1. Ištirti pelkinių vingiorykščių žolės skystųjų ekstraktų poveikį vėžinių ląstelių gyvybingumui *in vitro* MTT metodu.
2. Ištirti pelkinių vingiorykščių žolės skystųjų ekstraktų poveikį vėžinių ląstelių migracijai *in vitro*.
3. Nustatyti skirtingais ekstraktais paveiktų vėžio ląstelių žūties būdą.
4. Įvertinti ekstraktų priešvėžinio aktyvumo priklausomybę nuo jų pagrindinių komponentų kiekio.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pelkinės vingiorykštės apibūdinimas

Pelkinė vingiorykštė (lot. *Filipendula ulmaria*) – daugiametis erškėtinių šeimos vingiorykštinių genties augalas. Anksčiau vartotas pelkinės vingiorykštės pavadinimas lotynų kalba – *Spiraea ulmaria* [16]. Kitaip šis augalas Lietuvoje dar vadinamas ilgarykšte, ožkabarzdžiu, piepuolžole bei vingiru. Dažniausiai aptinkamas drėgnuose ir daug maisto medžiagų turinčiuose dirvožemiuose, ypač netoli pelkių bei ežerų.

Tai daugiametis žolinis augalas, užaugantis iki 60–150 cm aukščio, su šliaužiančiu šakniastiebiu ir plonomis pridėtinėmis šaknimis [17]. Stiebas - stačias, paprastas arba šakotas, gausiai lapuotas, plikas, viršutinė dalis šakota. Lapai plunksniški, viršutinėje pusėje žali, apatinėje – balsvi, gausiai pūkuoti. Žiedynas yra apie 20 cm ilgio, primena tankią viršūninę šluotelę. Augalas žydėjimo metu turi daug žiedų, jie maži, 6-8 mm skersmens. Visas augalas kvepia karčiais migdolais. Vaisius – sudėtinis lukštavaisis. Augalas žydi birželio – liepos mėnesiais. Dauginasi šakniastiebiais ir sėklomis [18].

Vaistams nuo seno yra naudojami žiedai bei antžeminė augalo dalis, surinkti augalo žydėjimo metu. Augalo žaliava paruošiama augalo dalis džiovinant gerai vėdinamoje patalpoje. Išdžiūvusi žaliava yra savotiško kvapo ir saldžiai sutraukiančio skonio [19].



1 pav. Pelkinė vingiorykštė [12]

1.2. Pelkinių vingiorykščių žolės cheminė sudėtis

Pelkinių vingiorykščių žolė kaupia daug įvairių cheminių medžiagų, kurių sudėtis priklauso nuo klimato sąlygų (šviesos, vėjo, drėgmės, šilumos), edafinių sąlygų (dirvožemio cheminės sudėties ir struktūros) bei augalo biotinių sąlygų (augalų tarpusavio santykių bei santykių su mikroorganizmais, esančiais dirvožemyje) [20].

Pelkinių vingiorykščių žolėje aptinkami flavonoidai, rauginės medžiagos, vitaminai, salicilatai, eteriniai aliejai, pektinai, protopektinai, saponinai, angliavandeniai.

Literatūros duomenimis, pelkinių vingiorykščių žieduose flavonoidų kiekis svyruoja nuo 8,3 iki 12,9 proc. Pagrindiniai penki flavonoidai: spireozidas (0,09-0,56 mg/ml), kvercetinas (0,05-0,29 mg/ml), hiperozidas (0,07–0,43 mg/ml), rutinas (0,07–0,41 mg/ml) ir kemferolis (0,06-0,327 mg/ml) [21]. Bendras flavonoidų kiekis pelkinių vingiorykščių lapuose svyruoja nuo 3,9 iki 5,5 proc. [22].

Bendras rauginių medžiagų kiekis skirtingose augalo dalyse skiriasi. Žieduose augalas kaupia nuo 43,2 iki 56,8 proc., o lapuose – nuo 22 iki 28 proc. raugų [23]. Literatūroje kai kurie autoriai išskiria hidrolizuotus ir kondensuotus taninus. Žieduose ir šaknyse augalas kaupia 8–15 proc. kondensuotų rauginių medžiagų (proantocianidinų), o hidrolizuotų rauginių medžiagų augale aptinkama nuo 34 iki 37 proc. Taip pat žolėje aptinkama daug elagotaninų hidrolizės produkto – elago rūgšties (0,03–0,09 proc.) [24].

Skirtingose augalo dalyse yra kaupiami skirtingi kiekiai polifenolinių darinių – tai telimagrandinas I ir II bei rugozinas A, B, C ir D. Pavyzdžiui, augalo sėklose yra aptinkama nuo 55,53 iki 124,8 mg/g aktyvių junginių, o augalo žieduose jų yra 83,88–165,68 mg/g [25].

Literatūros duomenimis, pelkinių vingiorykščių žolėje yra dideli kiekiai vitaminų. Jos žolėje kaupiami α, β, γ, δ tokoferoliai (497–483 μg/g), askorbo rūgštis (0,01–0,02 mg/g) [26]. Karotenoidų kiekis skirtingose augalo dalyse svyruoja. Augalo lapuose karotenoidų aptinkama 121,2–140,1 mg/g, o žieduose – tik 13,9-23,4 mg/g [22].

Salicilo rūgšties lapuose aptinkama 0,295–0,487 proc., o salicino (jis oksiduojamas iki salicilo rūgšties) – nuo 0,199 iki 0,315 proc. [27].

Pelkinių vingiorykščių eteriniame aliejuje yra 68,6 proc. salicilo aldehido, 2,4 proc. metilsalicilatų, 2,3 proc. benzaldehidų, 4,2 proc. (*E*)-2-heksenalio, 6,0 proc. (*E*)-2-heksen-1-olio, 1,2 proc. heksanolio, 1,8 proc. linalolio, 1,0 proc. 2-feniletanolio ir riebiųjų rūgščių [28].

1.3. Pelkinių vingiorykščių preparatų pritaikymas medicinoje

Pelkinių vingiorykščių preparatai tradiciškai buvo vartojami kaip priemonė nuo skausmo ir uždegimo, ypač skrandžio uždegimui ir reumatiniams skausmams malšinti, taip pat – kaip diuretikai, inkstų akmenis tirpdanti priemonė [29].

Augalo žolės preparatai buvo vartojami sergant peršalimo ligomis, esant karščiavimui ar intensyviam trumpalaikiam skausmui. Šį poveikį lemia salicilo rūgštis. Ši medžiaga, kaip ir jos darinys aspirinas, turi priešuždegiminių savybių [9, 37] - ji slopina prostaglandinų sintezėje dalyvaujantį fermentą ciklooksigenazę [31].

Literatūros duomenimis, pelkinių vingiorykščių preparatų praktinis pritaikymas galėtų būti žymiai platesnis. Augalo sudėtyje esantys flavonoidai, salicilatai, rauginės medžiagos, askorbo rūgštis ir kiti vitaminai bei eteriniai aliejai gali turėti imunomoduliacinį poveikį, kuris yra aiškinamas reaktyviųjų deguonies formų slopinimu [32]. Šis augalas turi ir antimikrobinį [11], antioksidacinį [33], priešvėžinį [34], kraujo krešėjimą slopinantį poveikį [22].

Šis augalas tinka gydyti infekcijas, sukeltas *Helicobacter pylori, Campylobacter jejuni* ir kitų mikroorganizmų [35]. Literatūroje nurodoma, kad pelkinių vingiorykščių preparatai turi ne tik antimikrobinį poveikį, tačiau ir apsaugo skrandžio gleivinę, todėl yra tinkami vartoti žmonėms, kurie pastoviai vartoja didelius kiekius nesteroidinių vaistų nuo uždegimo (NVNU) [36]. Šis poveikis patvirtintas žiurkėms, dvi dienas prieš indometacino skyrimą žiurkes girdant pelkinių vingiorykščių tinktūromis. Jų skrandžio gleivinės bendrasis antioksidacinis aktyvumas padidėjo iki 36 proc., sumažėjo audinių katalazinis aktyvumas [37].

Pelkinių vingiorykščių ekstraktai gali būti vartojami ne tik į vidų, bet ir išoriškai, gydyti tam tikras odos ligas. Šio augalo veikliosios medžiagos 2-metoksi-*p*-krezolis ir eugenolis yra veiksmingi esant odos uždegimams [38]. Dėl savo priešuždegiminių, antioksidacinių ir antimikrobinių savybių, kurias lemia dideli rauginių medžiagų ir flavonoidų kiekiai žaliavoje, augalas vartojamas gydyti aknės sukeltus pažeidimus. Be to, manoma, kad augalas turi antioksidacinį poveikį, lėtina odos ląstelių senėjimo procesus [15].

Literatūros duomenimis, pelkinių vingiorykščių žiedų ir lapų tinktūros gali sumažinti osteoartrito sukeliamus skausmus ir patinimus. Peles, kurioms chirurginiu ir biocheminiu būdu buvo sukeltas osteoartritas, girdant augalo tinktūromis, sumažėjo uždegiminiai simptomai ir pagerėjo sąnarių būklė [39]. Šios žolės ekstraktai malšino artropatijos simptomus ožkoms. Nustatyta, kad ekstraktuose esančios veikliosios medžiagos gali paskatinti šlapimo rūgšties, kuri sukelia šiuos pažeidimus, pašalinimą iš organizmo [40].

Naujausių tyrimų duomenimis, pelkinių vingiorykščių žolės skystieji etanoliniai ekstraktai turi ir nootropinį poveikį, todėl jie galbūt galėtų pakeisti tokius cheminius vaistus kaip piracetamas, pramiracetamas, vinpocetinas ir kt. [41].

Pelkinių vingiorykščių žolės sudėtiniai komponentai laisvi ar kompleksuose su baltymais, hidrolizuoti ir kondensuoti raugai yra aktyvesni už paprastuosius fenolius. Yra ištirta, kad jų kompleksinis veikimas sustiprina antioksidacinį augalo aktyvumą [42].

1.4. Pelkinių vingiorykščių skystųjų ekstraktų biologinis aktyvumas

Pelkinių vingiorykščių ekstraktai pasižymi įvairiu biologiniu aktyvumu, jie turi antimikrobinį, antioksidacinį, priešvėžinį ir kitokį poveikį gyviesiems organizmams.

1.4.1. Priešvėžinis aktyvumas

Pelkinių vingiorykščių ekstraktai ir jų aktyvieji komponentai pasižymi priešvėžiniu aktyvumu, slopina vėžio ląstelių proliferaciją. Literatūros duomenimis, pagrindinis mechanizmas, galėtų būti ciklooksigenazių COX–1 ir COX–2) slopinimas, jame dalyvauja ekstraktuose esanti salicilo rūgštis ir jos dariniai, fenolinės karboksi rūgštys [4].

Pelkinių vingiorykščių etanoliniai skystieji ekstraktai pasižymi priešvėžiniu aktyvumu prieš įvairias žmogaus vėžio ląstelių linijas. Ekstraktai slopino NCI-H460 (nesmulkialąstelinio plaučių vėžio), A375-C5 (melanomos) ir MCF7 (krūties adenokarcinomos) ląstelių proliferaciją, migraciją, sukelė ląstelių mirtį. Vienas iš tirtų ekstraktų šių ląstelių proliferaciją slopino atitinkamai 70 μg/ml, 96 μg/ml ir 63,3 μg/ml koncentracijomis [43].

Nustatytas pelkinių vingorykščių chloroforminių ir heksaninių ekstraktų poveikis pelės melanomos B16 ląstelėms. Ekstraktai šios kultūros augimą slopino 10 ir 50 μg/ml koncentracijomis [44]. Priešvėžinis aktyvumas taip pat buvo įvertintas panaudojant pelkinių vingiorykščių ir kitų penkiolikos augalų etanolinius ekstraktus, nustatant jų citotoksinį poveikį pelių B16 melanomos ląstelėms. Pelkinių vingiorykščių ekstraktai pasižymėjo citotoksiškumu prieš B16 melanomos ląsteles net 0,25 mg/ml koncentracijos [45].

Tyrimų, kuriuose būtų tirtas poveikis A549, IGR39 ir U87 ląstelių linijoms, nepavyko aptikti, todėl būtų svarbu išsiaiškinti, kokį poveikį sukelia pelkinių vingiorykščių žolės skystieji ekstraktai minėtoms ląstelių linijoms.

1.4.2. Antioksidacinis aktyvumas

Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas labai priklauso nuo augale kaupiamų fenolinių junginių kiekio. Šių junginių yra kaupiama dideliais kiekiais pelkinės vingiorykštės žaliavoje.

Pelkinių vingiorykščių skystieji etanoliniai ekstraktai, pagaminti naudojant 70 proc. etanolį, stipriai slopino acetilcholinesterazės aktyvumą 3 mg/ml koncentracijomis (98,3 proc.) [46].

Antioksidacinis augalų nuovirų ir užpilų poveikis tirtas pacientams turintiems lėtinę smegenų išemiją. Pelkinių pūkelių, paprastojo saldynmedžio, pelkinių vingiorykščių žiedų bei lapų ir kvapiojo mairūno ekstraktai pasižymėjo aktyvumu prieš hipobarinės hipoksijos metu sukeliamus lipidų peroksidacijos procesus. Rezultatai lyginti su rinkoje esančiu standartizuotu ginkmedžio preparatu – *Tanakan.* Pelkinių vingioryščių ekstraktai lipidų peroksidaciją mažino labiau nei *Tanakan* [47].

DPPH radikalų surišimo metodu nustatyta, kad iš keturiolikos naudotų etanolinių įvairių augalų ekstraktų, siauralapio gauromedžio, gluosnialapio debesylo, pontinio kiečio, pelkinės vingiorykštės, tautorinio sausmedžio ir apskritalapės kriaušlapės ekstraktai pasižymėjo stipriu antioksidaciniu veikimu. DPPH radikalų surišimo aktyvumas šiuose ekstraktuose svyravo 73–83 proc. [48].

Nustatyta, kad pelkinių vingiorykščių žolės vandeniniai ekstraktai turi didesnį antioksidantinį aktyvumą nei aronijų ir avietės lapų ekstraktai, jie slopina lipidų peroksidacijos procesus. Kaip teigia tyrimo autoriai, šis augalas savo sudėtyje kaupė didžiausius kiekius polifenolinių junginių (145,96 mg/g), kurie galėjo lemti didelį šio augalo ektraktų antioksidacinį aktyvumą [49].

Katanic ir kiti nustatė, kad augalo antžeminės dalies ekstraktų antioksidantinis aktyvumas (IC_{50} =16,41 mg/ml) yra didesnis nei augalo atskirų aktyvių junginių (elago ir askorbo rūgščių, kvercetino, tokoferolio) aktyvumas [10].

Taip pat pelkinių vingiorykščių žolės ekstraktų antioksidacinį poveikį patvirtino Neagua ir kitų mokslininkų atliktas tyrimas. Jo metu nustatyta, kad pelkinių vingiorykščių skystieji etanoliniai ekstraktai, pagaminti naudojant 70 proc. etanolį, be stipraus antioksidacinio poveikio turėjo ir anticholinesterazės bei tirozino išsiskyrimą slopinantį veikimą [46].

1.4.3. Antimikrobinis aktyvumas

Pelkinių vingiorykščių žolės antimikrobinis poveikis tirtas jau nuo seno. Nustatyta, kad šios žolės ekstraktai veikia bakterijų dauginimąsi ir slopina jų išskiriamų medžiagų aktyvumą.

Mokslinių tyrimų duomenimis, didžiausią antimikrobinį aktyvumą turi ekstraktai, pagaminti ekstrakciją atliekant su 70 proc. ir 96 proc. etanoliu. Nustatyta, kad šiuose mėginiuose būna didžiausias kiekis antimikrobiniu aktyvumu pasižyminčių junginių, tarp jų – ir eterinio aliejaus komponentas salicilaldehidas. Šis junginys net labai mažomis koncentracijomis slopina *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, S. enteritidis, S. aureus, A. niger, C. albicans* mikroorganizmų augimą [28].

Etanoliniuose ekstraktuose identifikuotos antimikrobiniu aktyvumu pasižyminčios medžiagos ir jų kiekiai: hidroksitirozolis (78 mg/l), galo rūgštis (49 mg/l), kofeino rūgštis (135 mg/l), p-kumarino rūgštis (139 mg/l), vanilino rūgštis (185 mg/l), ferulo rūgštis (169 mg/l), katechinas (19 mg/l). Kaip teigiama šaltinyje, šios medžiagos turi antimikrobinį aktyvumą prieš *L. monocitogenes, Pseudomonas* rūšis, *S. aureus, E. coli* bakterijas [50].

Aktyvumas prieš *E. coli, P. aeruginosa, C. albicans* mikroorganizmus buvo tirtas naudojant 2–6 mg/ml ekstraktų koncentracijas. Manoma, kad šiam poveikiui įtakos turėjo ekstraktų aktyvūs komponentai: galo rūgštis, chlorogeninė rūgštis, kavos rūgštis, *p*-kumarino rūgštis, ferulo rūgštis, elago rūgštis, rutinas, kvercetinas ir naringeninas [49].

Pelkinių vingiorykščių žolės ekstraktas, pagamintas naudojant 60 proc. etanolį, turėjo antimikrobinį poveikį prieš *H. pylori*ir *C. jejuni* [51], etanoliniai ekstraktai slopino bakterijų *E. coli* ir *S. aureus* mikroorganizmų augimą [52].

Nustatytas etanolinių ekstraktų antimikrobinis poveikis *E. coli, E. faecalis* bakterijoms ir grybeliams *P. cyclopium,* ir *F. oxsporum*. Aktyviausi buvo ekstraktai pagaminti iš augalo antžeminės dalies. Minėtas bakterijas jie veikė 0,156–0,625 mg/ml koncentracijomis, grybelius 2,5–5 mg/ml koncentracijomis [10].

Nustatytas pelkinių vingiorykščių priešgrybelinis aktyvumas prieš *Aureobasidium pullulans.* Tai grybelis, kenkiantis raudonųjų pipirų išvaizdai, padengia juos pelėsio sluoksniu. Ekstraktai slopino šio sluoksnio susidarymą ir jo plitimą, ir galėtų būti pritaikomi kaip naujasis augalinės kilmės fungicidas [53].

1.4.4. Nootropinis aktyvumas

Nootropinių preparatų funkcija – tiesiogiai veikti ir aktyvuoti mokymosi procesą, gerinti atmintį ir protinę veiklą. Nootropiniai preparatai dalyvauja ląstelės medžiagų apykaitoje, neuromediatorių gamyboje. Jų veikimo taikiniai – neuronų ląstelėse vykstantys bioenergetiniai ir metaboliniai procesai.

Nootropinis pelkinių vingiorykščių vandeninių ir etanolinių ekstraktų poveikis ištirtas stebint jų poveikį pelių atsparumui hipoksijai. Etanoliniai ekstraktai pagerino orientaciją, suaktyvino žvalgymosi veiklą ir padidino fizinį efektyvumą po sukeltos hipoksinės traumos [54].

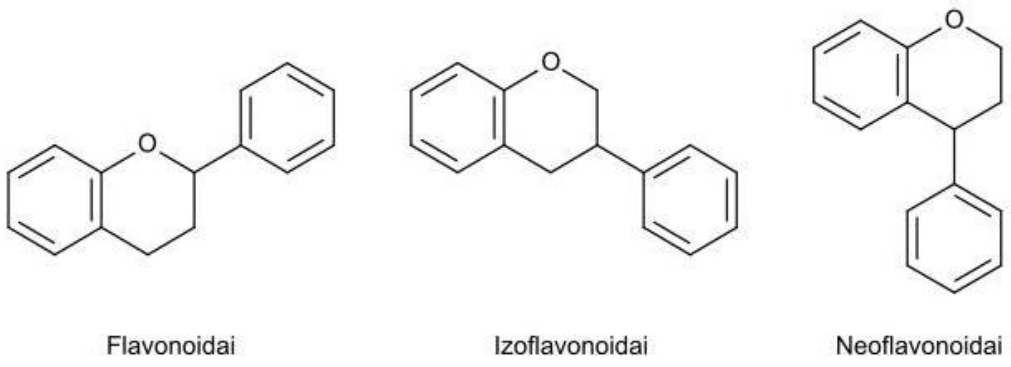
Kito tyrimo duomenimis, pelkinių vingiorykščių ekstraktai ir jų sudėtinės medžiagos (rutinas, kvercetinas ir kt.) gali padidinti gyvūnų išgyvenamumo trukmę 20–30 proc. hipobarinės hipoksijos sąlygomis. Panaudota žaliava padidino pelių natūralų išgyvenamumą. Ekstraktų poveikis buvo labai panašus kaip ir vaistinio augalinio preparato, savo sudėtyje turinčio standartizuoto ginkmedžių ekstrakto [47].

Pelkinių vingiorykščių ekstraktai, dėka aktyvių junginių rutino ir kvercetino, gali pakeisti cheminius nootropinius vaistus ir pagerinti deguonies patekimą į smegenis, taip sumažinant hipoksinį poveikį smegenims. Nootropinis pelkinės vingiorykštės aktyvumas pradėtas tirti neseniai, ir literatūros šaltinių šia tema nėra daug.

1.5. Pelkinės vingiorykštės cheminių komponentų priešvėžinis aktyvumas

Vieni iš didžiausiu priešvėžiniu aktyvumu pasižyminčių pelkinių vingiorykščių veikliųjų medžiagų yra flavonoidai, rauginės medžiagos, askorbo rūgštis. Kaip buvo minėta anksčiau, pelkinės vingiorykštės sudėtyje yra flavonoidų, kurių kiekis svyruoja nuo 8,3 iki 12,9 proc., rauginių medžiagų (žieduose – nuo 43,2 iki 56,8 proc., o lapuose – nuo 22 iki 28 proc.), vitaminų: α, β, γ, δ tokoferolių (497–483 μg/g), askorbo rūgšties (0,01–0,02 mg/g); karotenoidų (lapuose 121,2–140,1 mg/g, žieduose – 13,9-23,4 mg/g), salicilo rūgšties (0,295–0,487 proc.) ir kitų junginių. Literatūros šaltinių duomenimis, priešvėžiniam aktyvumui didžiausią įtaką galėtų turėti flavonoidai, raugai ir askorbo rūgštis, todėl jie toliau ir bus aptarti.

Flavonoidai – tai cheminiai junginiai, natūraliai kaupiami augaluose. Jų bendroji struktūra yra $C_6–C_3–C_6$. Priklausomai nuo ryšių išsidėstymo molekulėje, jie gali būti skirstomi į klases: 1) favonoidus, 2) izoflavonoidus, 3) neoflavonoidus (2 pav.)



2 pav. Flavonoidų bendrosios struktūrinės formulės

Remiantis flavonoidų oksidacijos ir įsisotinimo laipsniu, flavonoidai yra skirstomi į flavanonus, flavonus, flavonolius, dihidroflavonolius, flavon-3-olius, flavon-4-olius ir flavon-3,4-diolius [55]. Flavonoidai yra vieni iš pagrindinių pelkinių vingiorykščių ekstraktų komponentų. Didžioji dalis ekstraktuose esančių flavonoidų yra sujungtų su cukraus molekulėmis: galaktoze, gliukoze. Tai aktyvūs cheminiai junginiai, kurių poveikis žmogaus organizmui yra nuolat intensyviai tiriamas.

Kinų mokslininkai ištyrė flavonų priešvėžinį poveikį skrandžio vėžinėms SGC–7901 ląstelėms. Flavonai sukėlė ląstelių apoptozę, veikdami per skrandžio ląstelių mitochondrijų kelią. Rezultatai parodė, kad flavonai 30 μg/l koncentracijomis turėjo stiprų vėžinių ląstelių proliferaciją slopinantį aktyvumą [56].

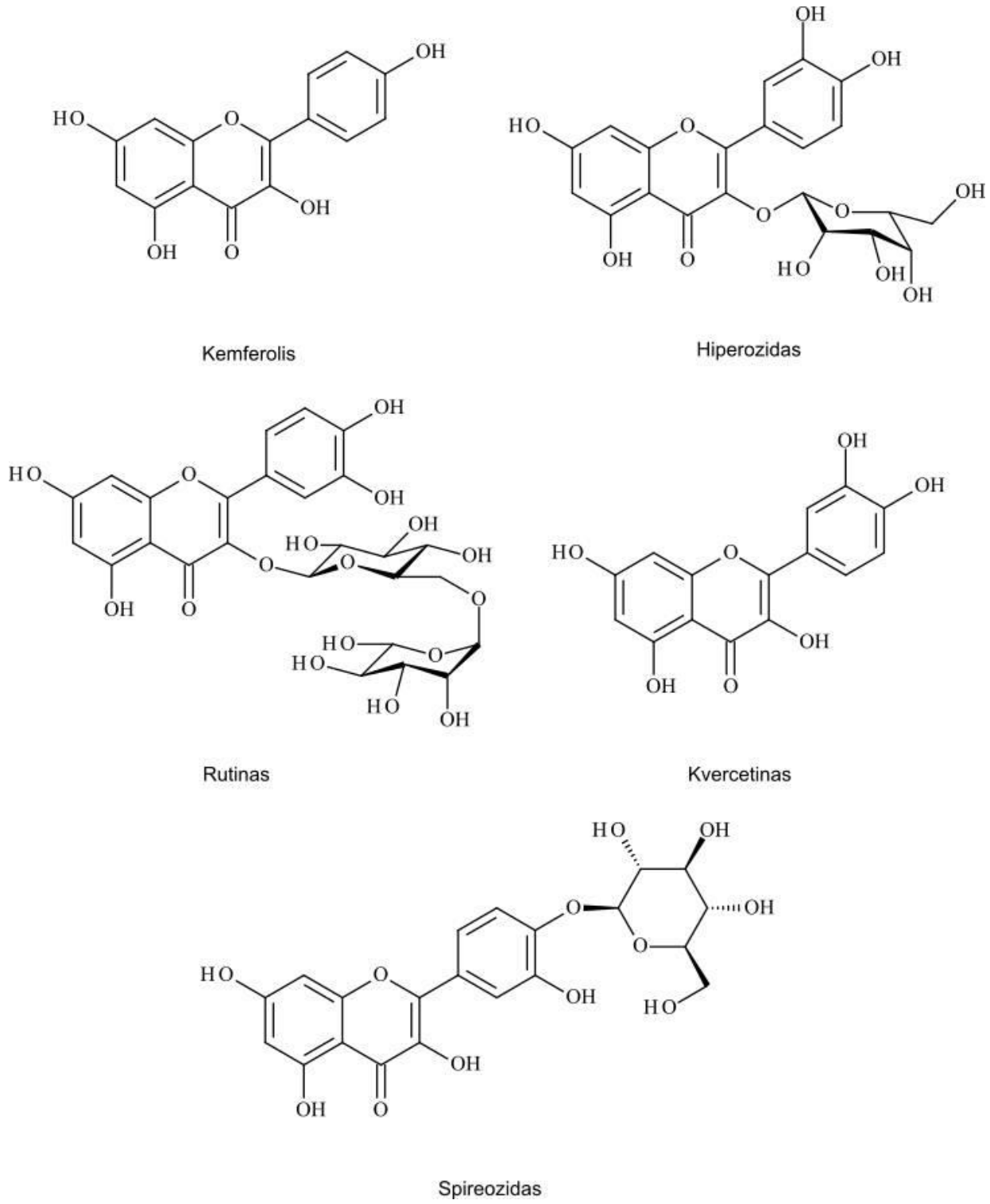
Literatūros duomenimis, pelkinių vingiorykščių etanoliniuose ekstraktuose daugiausia aptinkama tokių flavonoidų, kaip kvercetinas, hiperozidas, kemferolis, rutinas, spireozidas ir kiti (3 pav). Šie junginiai didelėmis koncentracijomis gali apsaugoti sveikas ląsteles nuo ląstelių pažaidos, slopinti vėžinių ląstelių augimą [57].

Kvercetinas slopina kasos vėžio ląstelių (MIA PaCa-2, BxPC-3) proliferaciją 10 μM koncentracijos [58], o derinyje su hiperozidu (1:1) turi priešvėžinį aktyvumą inkstų 786-O ląstelių linijai (60 μg/ml koncentracijos kvercetino ir hiperozido mišinys sumažino inkstų ląstelių proliferaciją 73 proc.) [59].

Chemoprevencinis rutino poveikis prieš melanomos vėžį patvirtintas tyrime su pelėmis. Peles šešiolika savaičių šeriant rutino 200 mg/kg ir 400 mg/kg dozėmis, ženkliai sulėtėjo karcinogenezės procesai. Rutinas labai sumažino serumo glutamato oksalato transaminazės, šarminės fosfatazės ir bilirubino aktyvumą, lyginant su kontrole [60].

Flavonoidas kemferolis gali slopinti A549 ląstelių migraciją, tai aiškinama stipriu kemferolio auglių nekrozės veiksnį slopinančiu poveikiu [61]. Jo ir kt. [62]taip pat nustatė, kad kemferolio 20 mg/ml koncentracija slopina A549 ląstelių migraciją, slopinant ląstelių augimo faktorių β1.

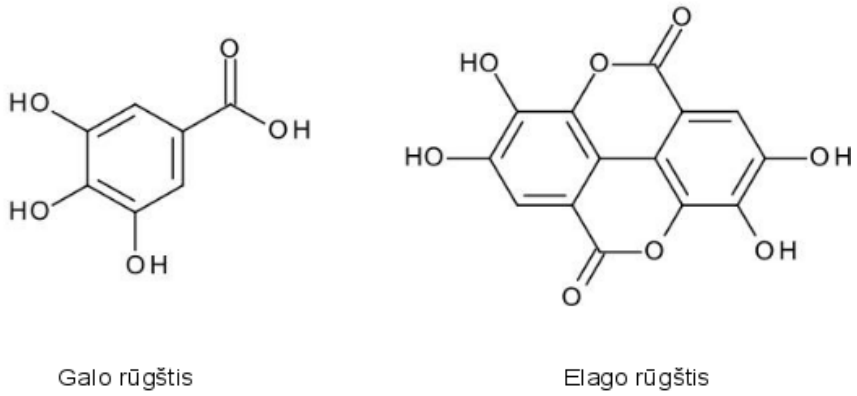
Flavonoidų priešvėžinis poveikis patvirtintas, ištyrus įvairių Indijoje augančių augalų (bananų, citrinų, papajos, guavos ir apelsinų) vaisių žievelių etanolinius-vandeninius ekstraktų aktyvumą vėžinėms kepenų ląstelėms HepG2. Pasak autorių, visi tirti vaisiai, kurie pasižymėjo priešvėžiniu aktyvumu, kaupė didelius kiekius flavonoidų. Didžiausią aktyvumą turėjo ekstraktai, pagaminti iš papajos vaisių (juose buvo 70,25 proc. flavonoidų) [63].



3 pav. Pelkinių vingiorykščių žolėje kaupiamų flavonoidų struktūrinės formulės

Rauginės medžiagos – tai vandenyje tirpūs polifenoliniai komponentai, galintys nusodinti alkaloidus, baltymus ir angliavandenius. Rauginės medžiagos pagal savo struktūrą gali būti skirstomi į dvi grupes – kondensuotus raugus ir hidrolizuotus raugus. Hidrolizuoti raugai – galo rūgšties dariniai, savo struktūroje turintys cukraus molekulių. Fermentų veikiami jie hidrolizuojasi į

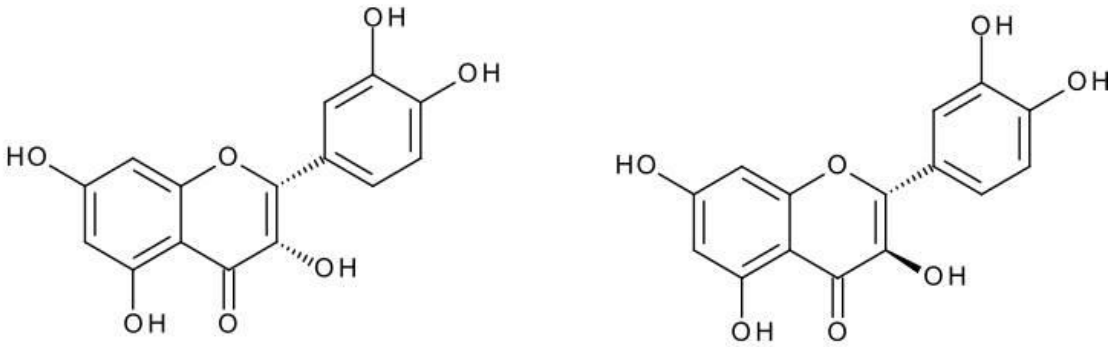
angliavandenio ir galo arba elago rūgšties molekules. Hidrolizuotiems raugams priklauso galotaninai ir elagotaninai (4 pav.).



Galo rūgštis Elago rūgštis

4 pav. Hidrolizuotų raugų komponentai

Kondensuoti raugai – polimeriniai flavonoidai, kitaip dar vadinami proantocianidinais. Iš šių junginių geriausiai ištyrinėti kondensuoti raugai, jų pagrindą sudaro flavon-3-ol(-)- epikatechino ir (+)-katechino struktūra (5 pav.) [42]. Kondensuoti raugai savo struktūroje neturi angliavandenilio liekanos, todėl vykstant hidrolizei jie kondensuojasi, veikiami rūgščių ar fermentų [34].



Epikatechinas Katechinas

5 pav. Flavon-3-olių struktūrinės formulės

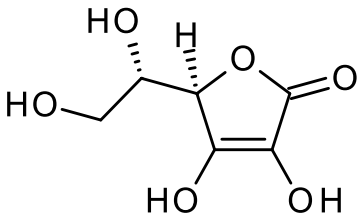
Hidrolizuotų raugų biologinis aktyvumas tiriamas jau nuo 1995 metų. Pirmiausia buvo tiriamas pelkinių vingiorykščių žolėje kaupiamų telimagrandino I priešuždegiminis poveikis. Nustatyta, kad telimagrandinas I pasižymi aktyvumu prieš THP–1 (monocitinės leukemijos) ląstelių metabolitus, slopina jų aktyvumą [30].

Taip pat buvo ištirtas proantocianidinų poveikis melanomos A375 ląstelėms. Ląsteles veikiant proantocianidinų 10–40 μg/ml koncentracijomis, buvo slopinama ciklooksigenazės COX–2 ekspresija, slopinama ląstelių migracija [64].

Nustatyta, kad raugai slopina vėžio ląstelių proliferaciją ir apsaugo ląsteles nuo DNR pažaidų. Pastaraisiais metais tiriamas elagotaninų galimas pritaikymas žmonių ligoms gydyti. *Rosaceae* šeimos augalai paprastai kaupia nemažus kiekius elago rūgšties, kuri efektyviai slopina bakterijų ir vėžio ląstelių augimą. Jos poveikio mechanizmas aiškinamas citochromo P450 fermento slopinimu, atsakingu už vėžinių ląstelių metabolizmą, bei kancerogeno ir DNR sąveikos slopinimu [65].

Mokslininkai Okuda ir kiti patvirtino, kad elago rūgštis ir kiti elagotaninai slopina vėžio nekrozės veiksnį [66]. Augalai, kaupiantys 1,22–8,17 proc. raugų, turėjo didelį antiproliferacinį aktyvumą gerklų vėžio (HEp-2) ir plaučių vėžio (NCI-H292) ląstelėms[67].

Askorbo rūgštis (6 pav.) yra būtina normaliam augimui ir vystymuisi. Tai antioksidantas, gebantis palaikyti baltymo kolageno kiekį audinyje, apsaugantis nuo infekcijų ir padedantis įsisavinti geležį [68].



6 pav. Askorbo rūgštis (vitaminas C)

Vitaminas C dalyvauja hormonų sintezėje ir tam tikrų aminorūgščių bei vitaminų metabolizme. Be to, askorbo rūgštis ypač vertinama dėl savo antioksidacinių savybių. Dėl antioksidacinio askorbo rūgšties poveikio gali būti reguliuojamas kraujo spaudimas, šlapimo pasišalinimas. Nustatytas ir jos priešvėžinis aktyvumas [69].

Vitamino C antioksidacinis poveikis yra svarbus aiškinant jo priešvėžinį aktyvumą. Askorbo rūgštis, o tiksliau – jos oksidacijos/skilimo produktai – γ-kaprolaktonas ir 3-hidroksi-2-pironas – dalyvauja vėžinių ląstelių mitozėje. Be to, dideli askorbo rūgšties kiekiai gali sumažinti organizmo skysčiuose esančių aminorūgščių kiekius ir dviejų amino rūgščių (glutamino ir cisteino), atsakingų už navikų augimą, kiekius [70].

Tiriant poveikį ląstelių kultūrose, nustatyta, kad askorbo rūgštis 25–500 μM koncentracijos neturėjo tokio stipraus priešvėžinio aktyvumo, kaip derinyje su vitaminu B_{12}. Šis derinys turėjo stiprų antikancerogeninį poveikį ir slopino netinkamą DNR sintezę [71].

Kitame tyrime buvo išaiškinta, kad pomidoruose kaupiami askorbo rūgštis ir fenoliniai junginiai tiek kartu, tiek atskirai turi poveikį vėžio ląstelėms. Askorbo rūgštis deriniuose su flavonoidais ir fenolinėmis rūgštimis turi didesnį priešvėžinį aktyvumą [72]. Taip pat atrasta, kad

askorbo rūgštis derinyje su polifenoliniais junginiais, aptinkamais žaliojoje arbatoje, stipriai veikia plaučių adenokarcinomos ląstelų (SPC-A-1) proliferaciją, sukeldama apoptozę [73].

Apibendrinant literatūroje pateiktus duomenis, galima teigti, kad vienos pagrindinių augalo veikliųjų medžiagų – flavonoidai, elagotaninai ir askorbo rūgštis – gali būti veiksmingi vėžinių susirgimų gydymui. Priešvėžinio aktyvumo tyrimams pasirinktos trys skirtingos ląstelių linijos. Tai skirtingą fenotipą turinčios žmogaus vėžio ląstelės, kurioms ekstraktų ir jų aktyviųjų medžiagų poveikis dar nebuvo nustatytas: A549 – žmogaus nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ląstelės, IGR39 – žmogaus melanomos ląstelės ir U87 – žmogaus glioblastomos ląstelės.

2. TYRIMO METODIKA IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Tiriamojo darbo objektas – dešimt pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* L.) žolės ekstraktų, pagamintų magistrantės Vidos Morkūnaitės (darbo vadovas – dr. Deividas Burdulis). Vaistinė augalinė žaliava buvo surinkta skirtinguose Lietuvos regionuose, ekstraktų gamyba naudotos skirtingos augalo antžeminės dalys (1 lentelė). Ekstraktai buvo ruošiami iš kiekvieno vaistinės augalinės žaliavos mėginio santykiu 1:10. 2 g (±0,01) žaliavos užpilta 20 ml (±0,01) 70 proc. V/V etanoliu ir ekstrahuota ultragarsu 10 min. užkimštuose rudo stiklo buteliukuose, kambario temperatūroje. Ekstraktai nufiltruoti per popierinius filtrus, sudrėkintus ekstrahentu.

Tyrime naudoti ekstraktai, laikomi šaltoje vietoje, apsaugoti nuo šviesos poveikio, sandariuose mėgintuvėliuose.

1 lentelė. Žaliavos dalys, naudotos ekstraktų gamybai, bei regionai, kuriose žaliava surinkta (parengta pagal [74]***)***

Ekstraktai	**Miestas**	**Augalo dalis**
V1	Panevėžys	Lapai
V2	Šiauliai	Žiedai
V3	Kauno botanikos sodas	Stiebai
V4	Panevėžys	Stiebai
V5	Kaišiadorių raj., Pyplių kaimas	Žiedai
V6	Kauno botanikos sodas	Stiebai
V7	Rokiškio raj. Sakališkių kaimas	Žiedai
V8	Baltakiai, Tauragės raj.	Stiebai
V9	Panevėžys	Lapai
V10	Rokiškio raj. Sakališkių kaimas	Lapai

Ekstraktų atskirų komponentų kiekis buvo nustatytas magistrantės Vidos Morkūnaitės [74]. Savo darbe magistrantė Vida Morkūnaitė išskyrė dvi pagrindines klases aktyvių junginių: flavonoidus ir raugines medžiagas. Šalia šio tyrimo buvo nagrinėtas ir magistrantės Rūtelės Žemaitytės darbas, kuriame buvo tiriamas askorbo rūgšties kiekis pelkinių vingiorykščių žolės skystuosiuose ekstraktuose [75].

2 lentelė. Tirtų pelkinių vingiorykščių ekstraktų cheminė sudėtis

Ekstraktai	Flavonoidai (proc.)	Rauginės medžiagos (proc.)	Askorbo rūgštis (proc.)
V.1	0,79	6,81	0,018
V.2	4,14	20,88	0,033
V.3	0,39	0,62	0,032
V.4	0,39	1,48	0,028
V.5	3,46	15,06	0,033
V.6	0,47	0,93	0,033
V.7	3,46	15,6	0,033
V.8	0,4	1,94	0,031
V.9	1,85	9,09	0,033
V.10	1,85	9,09	0,033

2.2. Reagentai ir įranga

Reagentai

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-)-2,5-difeniltetrazolio bromidas (MTT) ≥ 97 proc., Sigma-Aldrich

Antibiotikų tirpalas 1 proc. (10000 vienetų/ml penicilino ir 10 mg/ml streptomicino), Gibco

Dimetilsulfoksidas (DMSO) ≥ 99,5 proc., Sigma-Aldrich

Dulbecc‘o modifikuota Eagle ląstelių mitybinė terpė (DMEM), Gibco

Etanolis 96 proc., Vilniaus degtinė

Fetalinis veršiukų serumas (FBS), Gibco

Fosfatinis druskų tirpalas, pH 7,4 (PBS), Gibco

Hoechst 33342 10 mg/ml, Life technologies

Propidžio jodidas 1 mg/ml, Life technologies

Tripsino tirpalas TrypLE™ Express, Gibco

Vėžio ląstelių linijos

Žmogaus nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ląstelių linija (A549), Amerikos ląstelių kultūrų kolekcija (angl. *American Type Culture Collection*, ATCC)

Žmogaus melanomos ląstelių linija (IGR39), ATCC

Žmogaus glioblastomos ląstelių linija (U87), ATCC

Įranga

Mikroplokštelių spektrofotometras Multiskan go, Thermo Scientific

Fluorescencinis mikroskopas IX71, Olympus

Centrifūga 5810 R, Eppendorf

Inkubatorius HERAcell 150i, Thermo Scientific

2.3. Tyrimo metodikos

2.3.1. Poveikio ląstelių proliferacijai nustatymas

Ląstelės A549, IGR39 ir U87 auginamos DMEM terpėje, praturtintoje 10 proc. FBS ir 1 proc. antibiotikų, inkubuojamos 5 proc. CO_2 atmosferoje, 37 °C temperatūroje.

Ląstelėms padengus monosluoksniu 70-80 proc. lėkštelės dugno ploto, jų terpė nusiurbiama praplaunama PBS, ir įpylus tripsino tirpalo, ląstelės pakeliamos nuo dugno. Suspenduojama mitybinėje terpėje, skaičiuojamas ląstelių skaičius. Paruoštos suspensijos pilamos į 96 šulinėlių plokšteles po 100 µl taip, kad kiekviename jų būtų atitinkamai po 2000 (A549 ir IGR39) ląstelių ir 3000 (U87) ląstelių. Plokštelės su ląstelėmis inkubuojamos 24 val. 5 proc. CO_2 atmosferoje, 37 °C temperatūroje.

Tiriamieji etanoliniai ekstraktai praskiedžiami ląstelių auginimo terpe nuo 100 iki 1600 kartų. Tokiu būdu gaunami praskiesti ekstraktų tirpalai, turintys nuo 0,3125 mg/ml iki 10 mg/ml pradinio ekstrakto mitybinėje terpėje. Paruošti tirpalai po 100 µl pilami į plokšteles su ląstelėmis, kiekvienas tirpalas pilamas į tris plokštelės šulinėlius. Kaip teigiama kontrolė naudojamas 50% DMSO tirpalas (tokia koncentracija nužudo visas tirtas ląsteles), neigiama kontrolė – ląstelių augimo terpė su 0,2 mg/ml etanolio koncentracija, kuri buvo visuose šulinėliuose su tiriamaisiais ekstraktais. Inkubuojama 72 val. 5 proc. CO_2 atmosferoje, 37 °C temperatūroje.

Ekstraktų poveikis ląstelių proliferacijai nustatomas MTT metodu. Į šulinėlius pilama po 20 µl MTT ir inkubuojama 2-3 val. 5 proc. CO_2 atmosferoje, 37 °C temperatūroje. Tuo metu ląstelės redukuoja MTT iki netirpaus formazano, ir jo kiekis atitinka šulinėliuose esančių metaboliškai aktyvių ląstelių skaičių. Skystis iš šulinėlių išpilamas, susidarę kristalai tirpinami 100 µl DMSO.

Absorbcija matuojama spektrofotometriškai 490 nm bangos ilgyje, panaudojant daugybinės detekcijos mikroplokštelių skaitytuvą. Kiekvienas bandymas kartojamas tris kartus.

2.3.2. Ląstelių žūties būdo nustatymas

A549, IGR39 ir U87 ląstelių linijų suspensijos sėjamos į 24 šulinėlių plokšteles taip, kad viename šulinėlyje būtų atitinkamai 4000 (A549 ir IGR39) bei 12 000 (U87) ląstelių. Po 24 val. inkubavimo 37°C temperatūroje 5 proc. CO_2 atmosferoje, šulinėliuose esančios ląstelės paveikiamos skirtingų koncentracijų ekstraktų skiediniais. Tyrimui yra naudojami pelkinių vingiorykščių ekstraktai, kurie buvo naudoti nustatant poveikį ląstelių proliferacijai. Naudojamos ekstraktų koncentracijos, kurios turėjo poveikį ląstelių proliferacijai: 0,625 mg/ml, 1,25 mg/ml ir 2,5 mg/ml. Kiekvienai ekstrakto koncentracijai buvo naudojami du plokštelės šulinėliai.

Ląstelės su tiriamaisiais ekstraktais inkubuojamos 72 val. 5 proc. CO_2 atmosferoje, 37 °C temperatūroje. Tuomet skystis nuo ląstelių nupilamas, ląstelės praplaunamos PBS tirpalu. Ant ląstelių pilama po 200 µl šviežios ląstelių augimo terpės. Į kiekvieną šulinėlį pilama po 1 µl propidžio jodido (1 mg/ml koncentracijos tirpalo) ir 4 µl Hoechst 33342 (1 mg/ml koncentracijos tirpalo). Inkubuojama 10 min. 5 proc. CO_2atmosferoje, 37 °C temperatūroje.

Ląstelės fotografuojamos invertuotu fluorescensiniu mikroskopu naudojant 40× didinimą Vertinamas ląstelių branduolių spalvų pokytis ir švytėjimas. Nekrozavusios ląstelės 750 nm fluorescuoja raudona spalva, o apoptotinės ląstelės branduoliai 450 nm švyti mėlyna spalva. Nekrozavusios ląstelės nusidažo raudona spalva, apoptotinės ląstelės turi ryškiai švytintį mėlyną branduolį. Kiekviename šulinėlyje penkiuose regionuose rankiniu būdu apskaičiuojamas apoptozinių ir nekrozinių ląstelių skaičius procentais.

2.3.3. Poveikio ląstelių migracijai nustatymas

Pelkinių vingiorykščių žolės ekstraktų poveikis ląstelių migracijai *in vitro* nustatytas dviems vėžinių ląstelių linijoms (A549 ir IGR39), panaudojant „žaizdos“ gijimo metodą.

Ląstelės sėjamos į 24 šulinėlių plokštelę taip, kad viename šulinėlyje jų būtų 8000, ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO_2 atmosferoje. Po 24 val. ląstelės sudaro monosluoksnį. Šulinėliuose 20 µl pipetės antgaliu padaromos „žaizdos“ (švelniai nugramdomas ląstelių monosluoksnis, antgaliu braukiant išilgai per vidinį šulinėlio paviršių). Ląstelių terpė nusiurbiama, perplaunama PBS ir į šulinėlius pilama po 400 µl skirtingų koncentracijų (1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml ir 5 mg/ml) pelkinių vingiorykščių ekstraktų skiedinių, panaudojant du šulinėlius atitinkamai kiekvienam skiedimui. Kaip neigiama kontrolė naudojama terpė su 0,2 mg/ml etanolio koncentracija (be ekstrakto), kuri yra ir šulinėliuose su tiriamaisias ekstraktais. Ląstelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO_2 atmosferoje.

„Žaizdos“ pokyčiai yra stebimi eksperimento pradžioje ir atitinkamai po 24, 48 ir 72 val. nuo eksperimento pradžios. Fazinio kontrasto elektroniniu mikroskopu fotografuojamos „žaizdos“ (didinimas 40×), gauti vaizdai analizuojami, įvertinamas ekstraktų poveikis ląstelių migracijai stebint „žaizdos“ ploto pokytį.

2.4. Duomenų apdorojimas, statistinė analizė

Duomenys apdoroti „MS Excel 2013“ paketu, įvertinant trijų nepriklausomų eksperimentų rezultatų matavimų vidurkį ir santykinį standartinį nuokrypį. Vidrukių palyginimui naudotas Stjudento t testas, reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

Ekstraktų poveikis ląstelių proliferacijai įvertintas, apskaičiuojant koncentraciją, kuri ląstelių metabolizmo greitį sumažino 50 proc. (EC_{50}). Absorbcijos vertės normalizuotos nuo 0 (teigiamos kontrolės absorbcija) iki 1 (neigiamos kontrolės absorbcija).

Procentinis apoptinių ir nekrozavusių ląstelių skaičius nustatomas atliekant rankinį skaičiavimą trijuose skirtinguose to paties šulinėlio regionuose, apskaičiuojamas penkių atliktų skaičiavimų matematinius vidurkius.

Poveikis ląstelių migracijai įvertintas, apskaičiuojant „žaizdos“ dydį procentais (plotą, kuriame nėra ląstelių). Skaičiavimams panaudota programa „*Tscratch*“ (MATLAB, 2008).

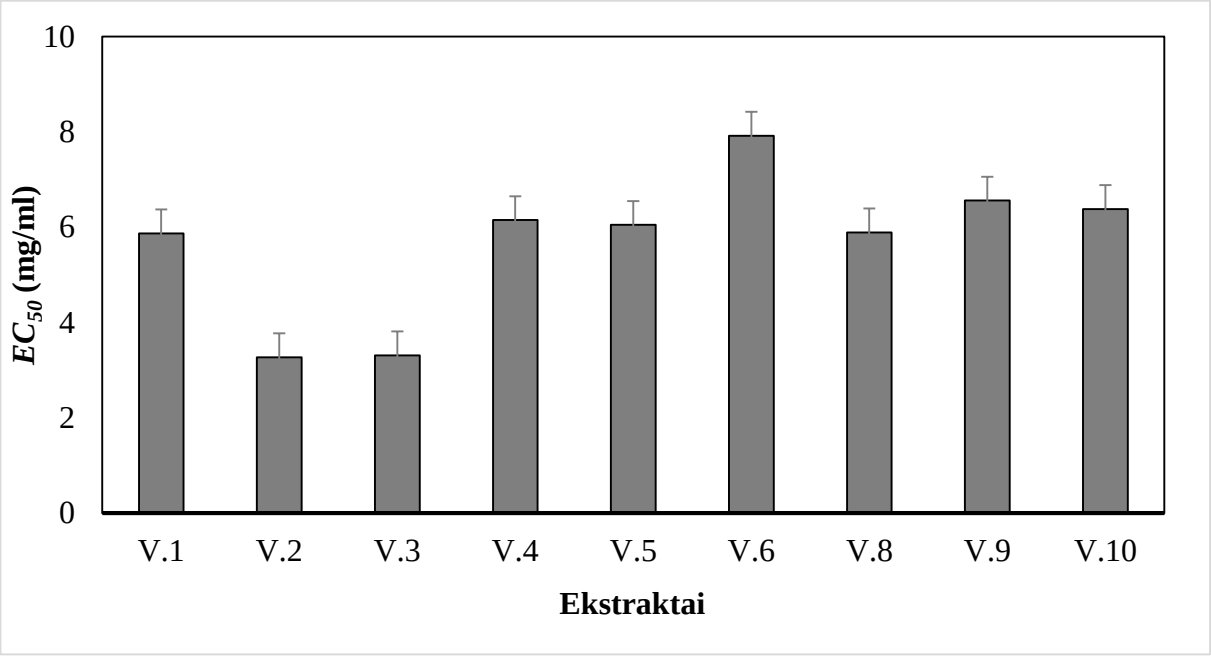
Koreliacija tarp ekstraktų aktyvumo ir askorbo rūgšties, flavonoidų bei raugų suminio kiekio įvertinta apskaičiuojant Pearson‘o koreliacijos koeficientą *r*. Koreliacija laikoma labai stipri, kuomet *r* yra 0,90 – 0,99 (teigiama) arba -0,99 – (-0,90) (neigiama); stipri, kai *r* yra 0,70 – 0,89 (teigiama) arba -0,89 – (- 0,70) (neigiama); vidutinė, kai *r* yra 0,40 – 0,69 (teigiama) arba -0,69 – (-0,40) (neigiama).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Poveikis ląstelių proliferacijai

Atlikus dešimties pelkinės vingiorykštės žolės skystųjų etanolinių ekstraktų poveikio ląstelių proliferacijai tyrimą, nustatyta, kad devyni iš jų veikė nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ląstelių liniją, o keturi – žmogaus melanomos vėžio ląstelių liniją. Ekstraktas V.7 neslopino nei vienos tirtos ląstelių linijos gyvybingumo. Be to, nei vienas iš tirtų ekstraktų neturėjo poveikio U87 ląstelių proliferacijai. Literatūroje nepavyko rasti duomenų apie pelkinių vingiorykščių ekstraktų poveikį žmogaus glioblastomos ląstelių linijoms. Vis dėlto, vaistai dažnai smegenų vėžio ląsteles veikia daug silpniau nei kitas, pvz., plaučių adenokarcinomos.

Ekstraktai labiausiai slopino A549 ląstelių proliferaciją, jų EC_{50} vertės buvo nuo 3 iki 8 mg/ml. Didžiausiu antiproliferaciniu aktyvumu A549 ląstelių linijai pasižymėjo du ekstraktai (V.2 ir V.3), jie veikė mažesne nei 3 mg/ml koncentracija (7 pav.).

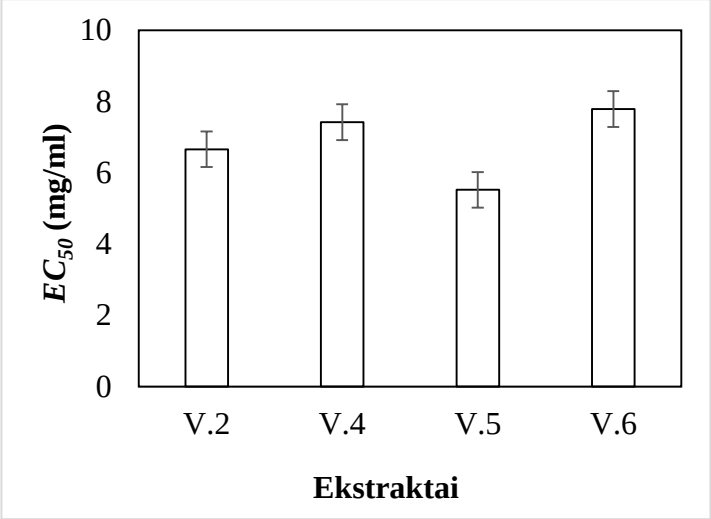


7 pav. Ekstraktų EC_{50} A549 ląstelių linijai

Lima ir kt. atliktame tyrime nustatytas pelkinių vingiorykščių ekstraktų poveikis trims ląstelių linijoms: nesmulkialąsteliniam plaučių vėžio ląstelėms (NCI-H460), melanomos ląstelėms (A375-C5) ir krūties adenokarcinomos ląstelėms (MCF-7). Visi tirti etanoliniai ekstraktai koncentracijomis nuo 25 µg/ml iki 400 µg/ml slopino šių ląstelių gyvybingumą. [43]. Šiame tyrime buvo naudotos didesnės ekstraktų koncentracijos (0,625-10 mg/ml), ir beveik visos jos slopino A549 ląstelių gyvybinumą, išskyrus ekstraktą V.7.

Lyginant žaliavos dalis iš kurių buvo gaminti ekstraktai, stipriausiu poveikiu pasižymėjo ekstraktai, pagaminti iš stiebų. Matyti tendencija, kad ekstraktai, kurių žaliava buvo surinkta masinio žydėjimo metu (V.2) ir kaupė didelius flavonoidų bei raugų kiekius (atitinkamai 4,14 proc, ir 20,88 proc.), labiausiai mažino A549 ląstelių gyvybingumą.

Ląstelių linijos IGR39 proliferaciją slopino keturi ekstraktai, visų jų EC_{50} vertės buvo didesnės nei 5 mg/ml (8 pav.). Pelkinių vingiorykščių ekstraktų poveikis melanomos ląstelėms buvo patvirtintas ir kitų mokslininkų. Jie nustatė, kad šio augalo etanoliniai ekstraktai slopina kitos melanomos ląstelių linijos (A375–CS) proliferaciją (EC_{50} = 63,3 µg/ml) [76].



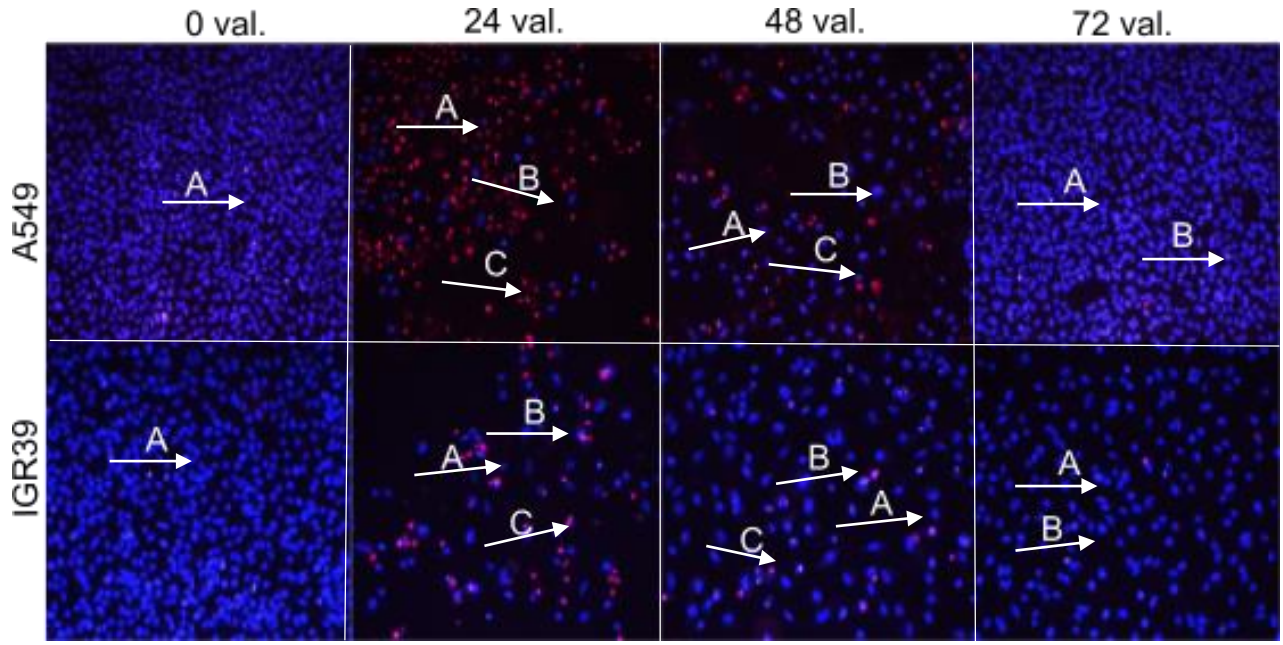
8 pav. Ekstraktų EC_{50} IGR39 ląstelių linijai

Lyginant gautus rezultatus matyti, kad stipriausiai IGR39 ląstelių liniją veikė tie ekstraktai, kurių žaliava buvo surinkta augalo žydėjimo pabaigoje ir kaupė taip pat didelius aktyvių junginių kiekius. Buvo ištirta, kad flavonoidų ir raugų kiekis pelkinių vingiorykščių žolės ekstrakte V.5, kuris geriausiai veikė ląstelių proliferaciją, buvo atitinkamai 3,46 proc. ir 15,6 proc.

Ekstraktų priešvėžinis aktyvumas prieš tirtas ląstelių linijas galėtų priklausyti nuo fenolinių junginių suminio kiekio ekstraktuose. Ląstelių gyvybingumą slopinantį poveikį galėjo turėti flavonoidų koncentracija, pvz. kvercetino ir hiperozido. Šių veikliųjų medžiagų aktyvumą inkstų 786-O ląstelėms patvirtino kiti mokslininkai [59]. Taip pat aktyvumą galėjo nulemti askorbo rūgšties kiekis ekstraktuose, ši medžiaga turi stiprų poveikį plaučių vėžio SPC–A–1 ląstelėms, slopina jų proliferaciją (EC_{50} = 30,6 µg/ml) [73].

3.2. Ląstelių žūties būdo nustatymas

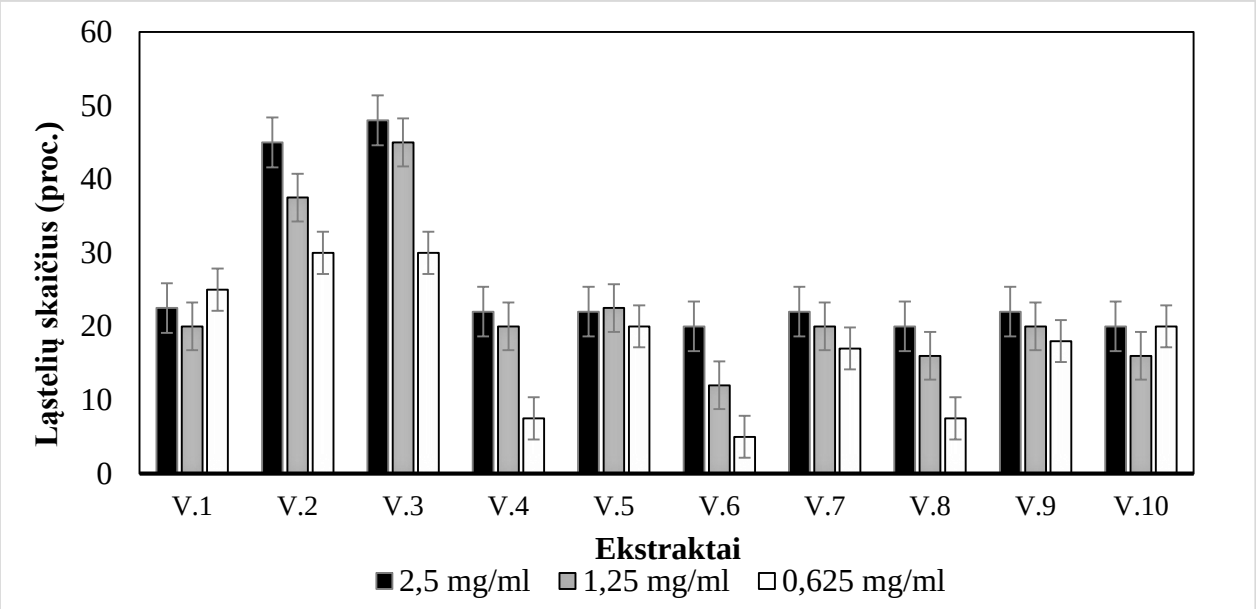
Ląstelių žūties būdas svarbus, kuriant naujus chemoterapinius vaistus. Jei ląstelėse yra sukeliama apoptozė, jose vyksta natūralūs savaiminio susinaikinimo procesai. Apoptozės proceso sukeliami morfologiniai pokyčiai: ląstelė susitraukia, branduolio chromatinas sutankėja ir ląstelė suskyla į mikrofragmentus, vadinamus apoptoziniais kūneliais. Kadangi apoptozinių kūnelių membrana nėra pažeista, jos vidinis turinys neišsilieja ir nesukelia uždegimo, o tai yra naudingas reiškinys [77]. Nekrozė – ląstelės brinkimas ir žūtis, plyštant plazminei ir organoidų membranoms bei išsiliejant ląstelių organizmo turiniui. Tokiu atveju yra sukeliamas uždegimas, kuris yra nelaukiamas reiškinys atliekant ląstelių žūties būdo nustatymus [78] . Ląstelių žūties būdų – apoptozės ir nekrozės – iliustracijos pavyzdys pateiktas 9 pav. Jame pavaizduota, kaip atrodo gyvos, nekrotinės ir apoptozės paveiktos ląstelės, jas paveikus ekstraktu V.4 – vienu iš didžiausią poveikį ląstelių gyvybingumui turinčiu ekstraktu.



9 pav. IGR39 ir A549 ląstelės, paveiktos ekstraktu V.4 (A – gyvos ląstelės su normaliais branduoliais, B – apoptotinės ląstelės, C – nekrotinės ląstelės)

Visi tirti pelkinių vingiorykščių ekstraktai sukėlė bent minimalią ląstelių programuotą mirtį – apoptozę. Didžiausiam ląstelių skaičių paveikė ekstraktai V.2 ir V.3, šis poveikis galimai priklausė nuo ekstrakto koncentracijos (10 pav.). Ekstrakto V.2 sudėtyje buvo dideli kiekiai rauginių medžiagų (20,88 proc.) ir flavonoidų (4,14 proc.), todėl galima manyti, kad šie junginiai galėjo nulemti ir ląstelių apoptozę. Tyrimuose, kuriuos apžvelgė Romagnolo ir kt. [79], teigiama, kad prievėžinis

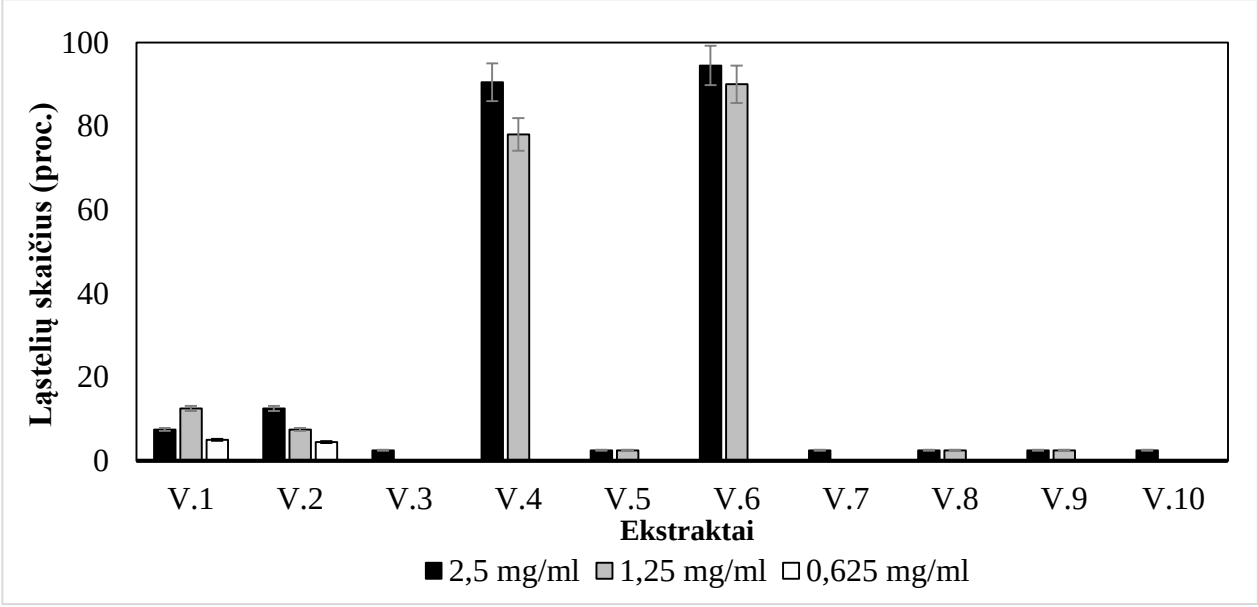
aktyvumas prieš gaubtinės ir tiesiosios žarnos, gerklų bei plaučių vėžį buvo nulemtas didelio bendro flavonoidų kiekio.



10 pav. Ekstraktų poveikis A549 ląstelių apoptozei

Tyrime naudoti ekstraktai V.1, V.5 ir V.10 programuotą A549 ląstelių žūtį sukėlė nepriklausomai nuo ekstrakto koncentracijos. Ir mažiausios (0,625 mg/ml), ir didžiausios (1,25 mg/ml) koncentracijos ekstraktai apoptozę sukėlė panašiam ląstelių skaičiui ($p > 0,05$).

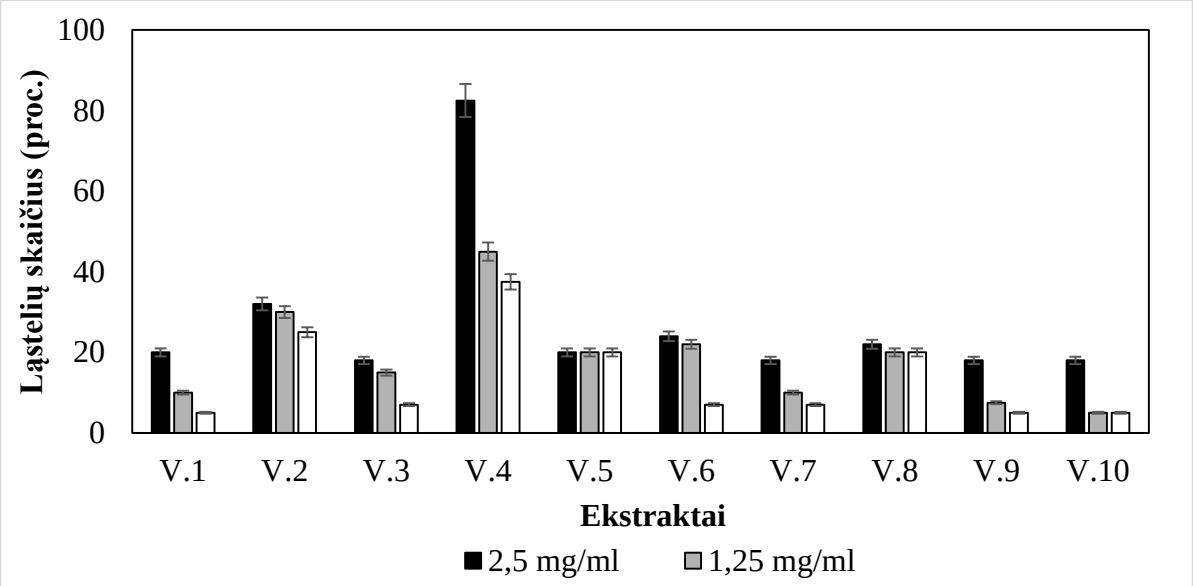
Kaip matyti 11 pav., ekstraktai V.4 ir V.6 sukėlė A549 ląstelių nekrozę. 1,25 ir 2,5 mg/ml koncentracijomis jie sukėlė daugiau nei 80 proc. ląstelių žūtį.



11 pav. Ekstraktų poveikis A549 ląstelių nekrozei

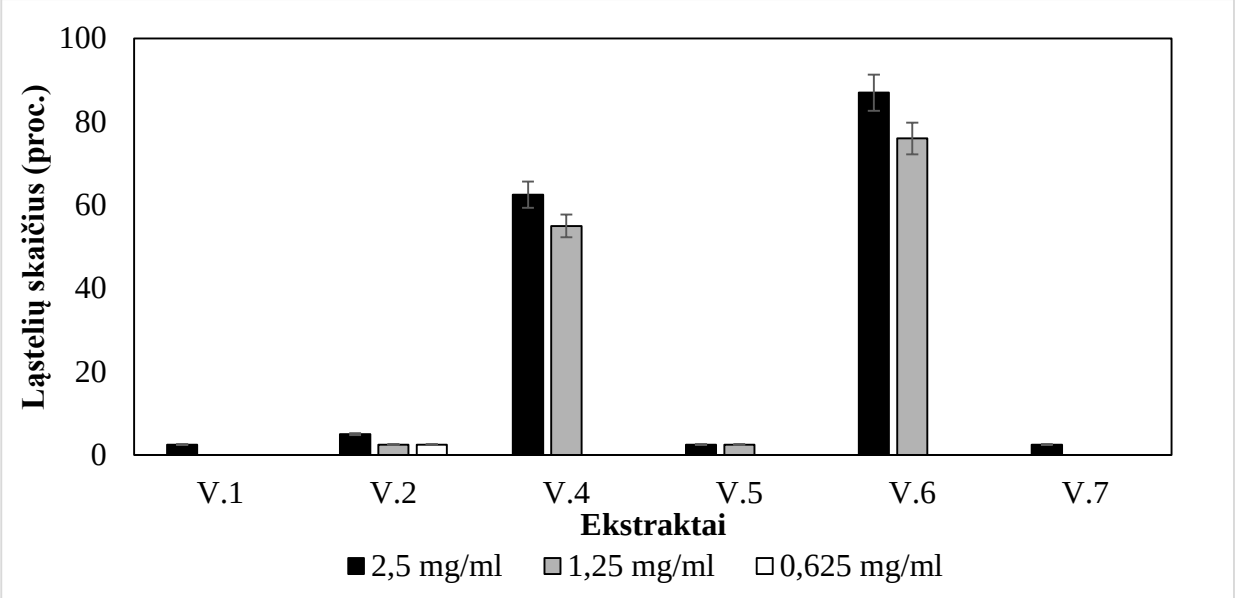
Šių ekstraktų antiproliferacinis aktyvumas nebuvo didelis (jų EC_{50} buvo atitinkamai 5,89 mg/ml ir 5,82 mg/ml). Galima manyti, kad šiuose ekstraktuose esančios aktyvios medžiagos veikė stipriai citotoksiškai. Tuo tarpu labiausiai proliferaciją slopinę ekstraktai V.2 ir V.3 didelio poveikio ląstelių nekrozei neturėjo, sukėlė tik ląstelių apoptozę.

Etanoliniai ekstraktai sukėlė IGR39 ląstelių apoptozę, tačiau šis poveikis buvo panašus kaip ir A549 ląstelių atveju ($p > 0,05$). Šuo atveju didžiausią apoptozę sukeliantį poveikį turėjo ekstraktas V.4 (12 pav.), kuris neišsiskyrė iš kitų tirtų ekstraktų pagal savo poveikį A549 ląstelių proliferacijai. Šis ekstraktas net mažiausios koncentracijos (0,625 mg/ml) sukėlė apoptozę 40 proc. IGR39 ląstelių. Kita vertus, ekstraktai V.2 ir V.3 naudotomis didžiausiomis koncentracijomis (2,5 mg/ml) sukėlė apoptozę tik 20–30 proc. IGR39 ląstelių. Šis poveikis galėjo būti nulemtas aktyvių junginių kiekio (pvz. tokoferolių, β-karotenoidų), kurie tyrimo metu nebuvo analizuoti.



12 pav. Ekstraktų poveikis IRG39 ląstelių apoptozei

Kaip ir A549 ląstelių linijoje, taip ir IGR39 ląstelių linijoje, stipriausią nekrozę sukeliantį poveikį turėjo ekstraktai V.4 ir V.6 (13 pav.). Ekstraktas V.4 sukėlė nekrozę mažesniam IGR39 ląstelių skaičiui, nei A549 ląstelių atveju, tačiau V.6 ekstrakto poveikis abiems ląstelių linijoms buvo labai panašus. Didžiausios naudotos koncentracijos ekstraktas V.6 (2,5 mg/ml) sukėlė nekrozę daugiau nei 85 proc. ląstelių, o esant 1,25 mg/ml koncentracijai šis ekstraktas veikė daugiau nei 75 proc. ląstelių.



13 pav. Ekstraktų poveikis IRG39 ląstelių nekrozei

Galima teigti, kad pelkinių vingiorykščių ekstraktai mutavusias ląsteles (įvairias vėžines ląsteles) veikia, slopindami jų proliferaciją ir sukeldami ląstelių apoptozę bei nekrozę. Galikin ir kt. atliktame tyrime buvo bandoma išiaiškinti augalų ekstraktų, tarp jų – ir pelkinių vingiorykščių, aktyvių junginių poveikį programuotai ląstelių mirčiai. Nustatyta, kad aktyvūs junginiai – kvercetinas, kemferolis ir apigeninas – 20 μM, 60 μM ir 100 μM koncentracijomis sukėlė HL-60 ląstelių apoptozę [81]. Kitame tyrime išsiaiškinta, kad 20 μg/ml koncentracijos apigeninas aktyvuoja naviko nekrozės faktorių ir sukelia ląstelių apoptozę [82]. Minėtų pavienių aktyvių medžiagų kiekiai šiame tyrime naudotuose ekstraktuose nebuvo nustatyti.

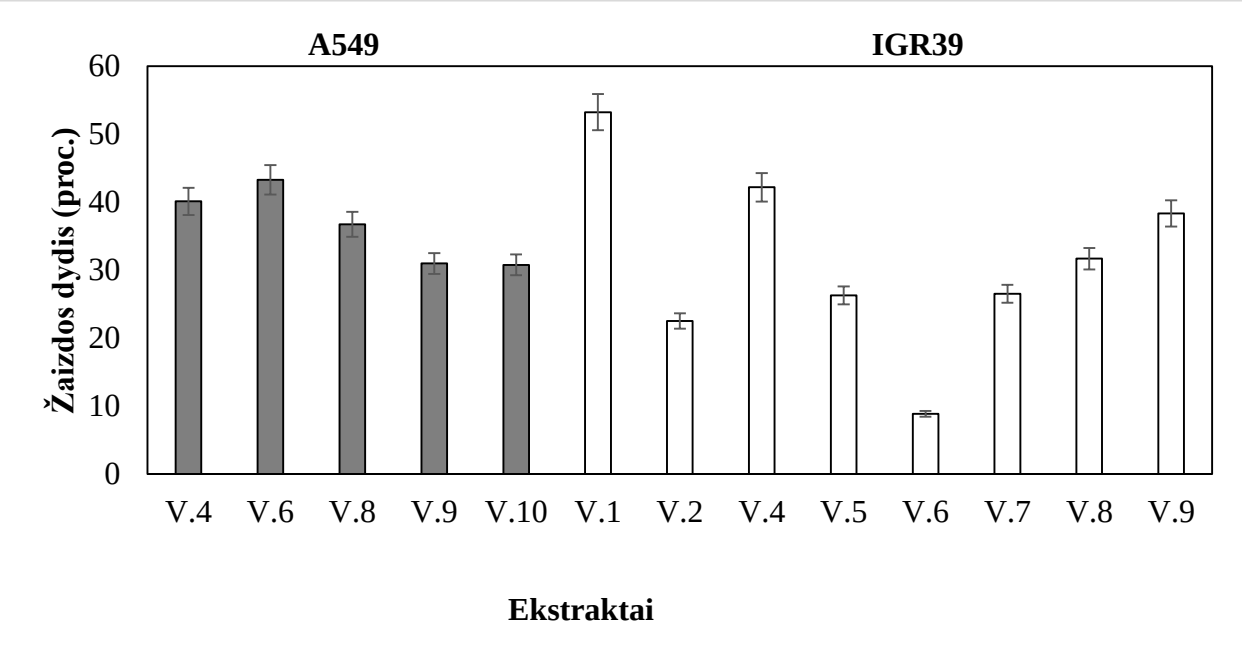
Tyrime, kuriame naudota askorbo rūgštis su epigalokatechino galatu mišinyje, nustatyta, kad šis derinys stipriai veikia ląstelių gyvybingumą ir sukelia apoptozę, veikdami ląstelių ciklo G_0/G_1 fazę. Šis junginys SPC-A-1 ląstelių gyvybingumą sumažino 53,9-60 proc. [73]. Remiantis aptartu tyrimu, galima būtų paaiškinti ekstraktų V.2 ir V.3 A549 bei V.4 ekstrakto poveikį IGR39 ląstelėms. Galimai, šie ekstraktai taip pat veikė ląstelių ciklo fazę G_0/G_1, slopindami ląstelių gyvybingumą ir sukeldami ląstelių apoptozę.

Pelkinių vingiorykščių ekstraktai, sukeldami ląstelių apoptozę, negrįžtamai aktyvuoja protealizinių baltymų kaspazių kaskadą, kuri yra svarbi vėžinių ląstelių branduolio bei tarpląstelinių jungčių sunaikinimui, o tai gali padėti sumažinti vėžinių ląstelių plitimą.

3.3. Poveikis ląstelių migracijai

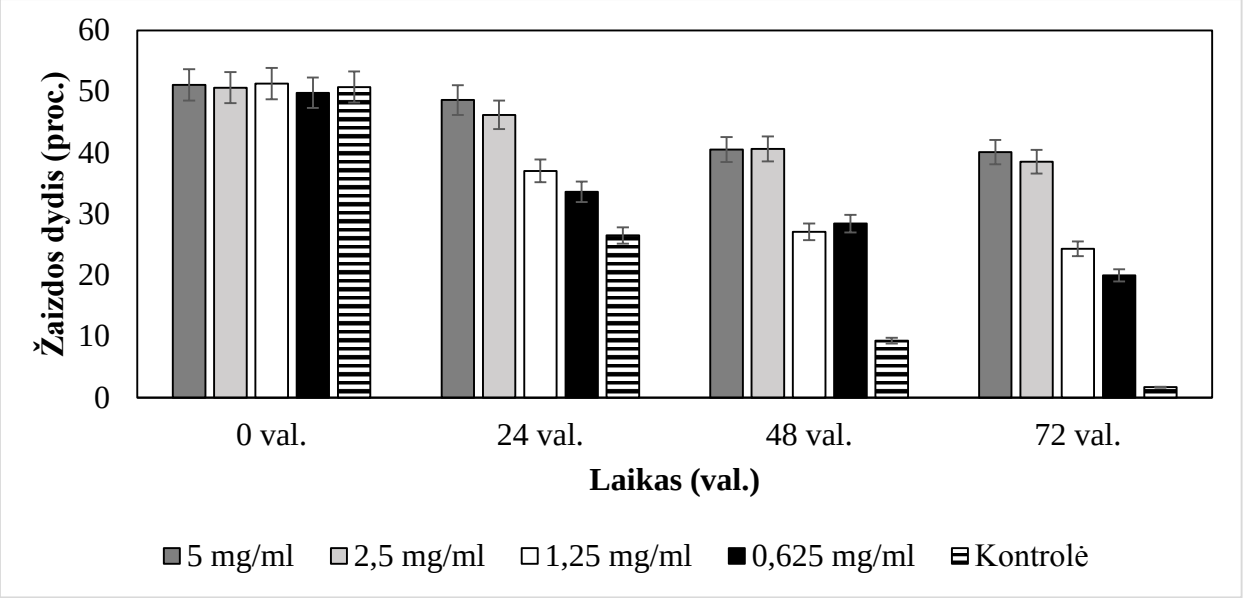
Pelkinių vingiorykščių etanolinių ekstraktų poveikis ląstelių migracijai buvo tirtas panaudojant „žaizdos“ gijimo metodą. Padarius monosluoksnyje žaizdą ir paveikus ląsteles ekstraktais buvo matomas laikas per kurį laiką ląstelės migruoja į žaizdos vidų ir ją užpildo.

A549 ląstelių proliferaciją slopinantį poveikį turėjo penki iš dešimties tirtų ekstraktų. Ekstraktai V.1, V.2, V.3, V.5 ir V.7 A549 ląstelių migracijos neslopino. Ląstelių migraciją slopinantis poveikis IGR39 ląstelių linijoje buvo ryškesnis, šių ląstelių migraciją slopino aštuoni iš dešimties tirtų ekstraktų (14 pav.).



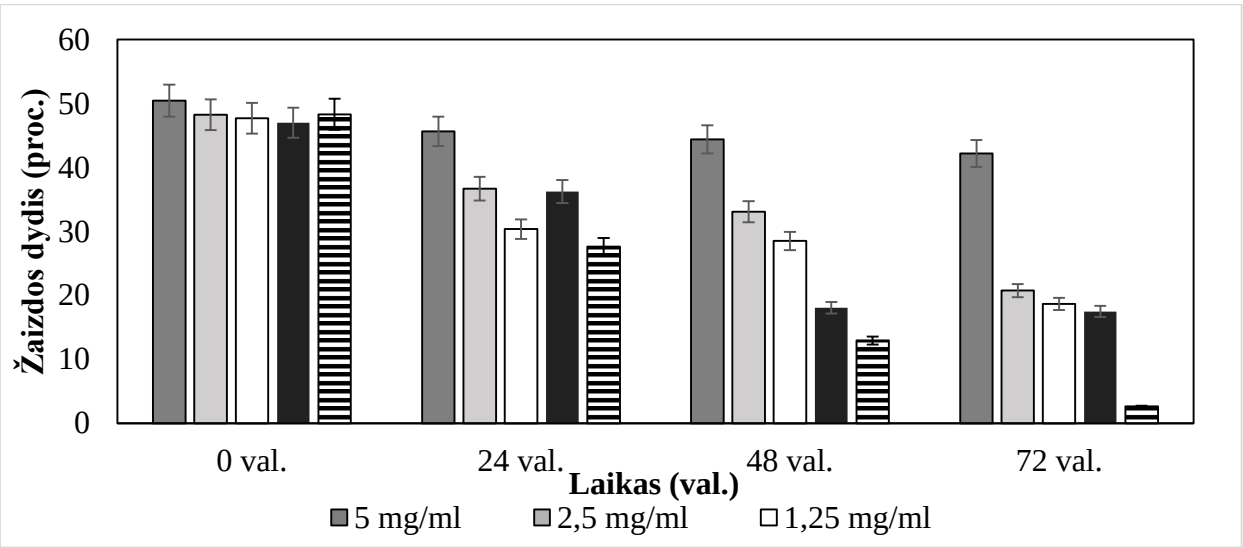
14 pav. Žaizdos dydis po 72 val., paveikus ekstraktais A549 ir IGR39 ląsteles

Tirtas visų dešimties ekstraktų poveikis, tačiau detaliau analizuotas V.4 ir V.6 ekstraktų migraciją slopinantis aktyvumas – šie ekstraktai turėjo didžiausią ląstelių nekrozę sukeliantį poveikį. Ekstraktas V.4 slopinančiai veikė A549 ląstelių migraciją, ypač 5 ir 2,5 mg/ml koncentracijomis (15 pav.) – po 72 valandų žaizdos plotas vis dar buvo apie 40 proc. Šio ekstrakto migraciją slopinantis aktyvumas pasireiškė netgi ląstelėse, paveiktose 0,625 mg/ml ekstrakto koncentracija (po 72 val. „žaizdos“ plotas buvo 20 proc.).



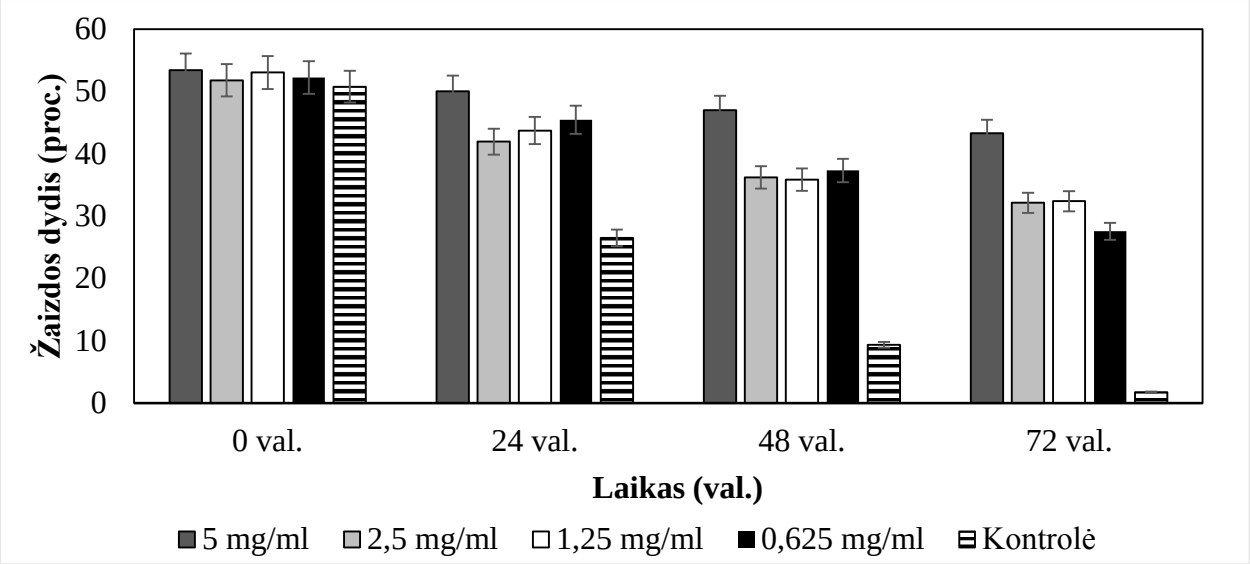
15 pav. A549 ląstelių migracijos priklausomybė nuo ekstrakto V.4 koncentracijos

Ekstraktas V.4 turėjo ir IGR39 ląstelių migraciją slopinantį aktyvumą (17 pav.), jis net mažiausios koncentracijos (0,625 mg/ml) slopino ląstelių migraciją (po 72 valandų 17 proc. žaizdos buvo neužsitraukusi). Šis ekstraktas IGR39 ląstelių migraciją panašiai, kaip ir A549 ląstelių migraciją ($p > 0,05$).



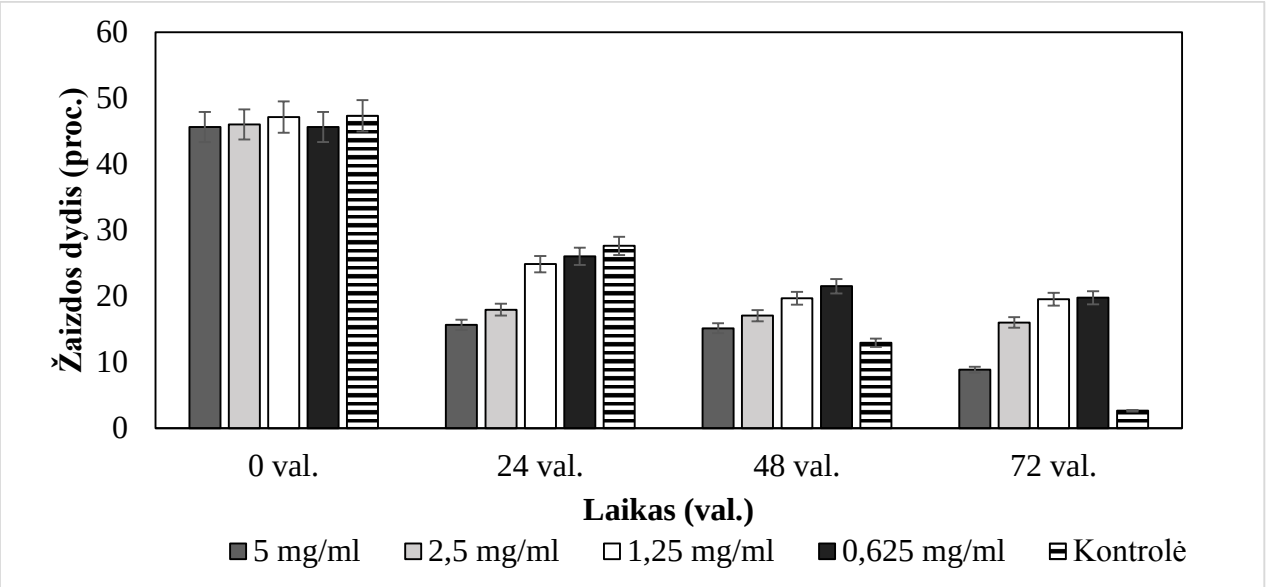
16 pav. IGR39 ląstelių migracijos priklausomybė nuo ekstrakto V.4 koncentracijos

Ekstraktas V.6 labiausiai slopino A549 ląstelių migraciją. Kaip matyti 19 pav., po 72 valandų 2,5 mg/ml ir 5 mg/ml koncentracijos ekstraktas sumažino ląstelių migraciją, žaizdos plotas sumažėjo tik iki 28 proc. (kontrolėje buvo 3 proc.)



17 pav. A549 ląstelių migracijos priklausomybė nuo ekstrakto V.6 koncentracijos

Skirtingai nei A549 ląstelių linijoje, IGR39 ląstelių migraciją slopinantis V.6 ekstrakto poveikis buvo matomas panaudojus jo 1,25 mg/ml koncentraciją (20 pav.).



18 pav. IGR39 ląstelių migracijos priklausomybė nuo ekstrakto V.6

Literatūroje nepavyko aptikti duomenų apie pelkinių vingiorykščių ekstraktų vėžio ląstelių migraciją slopinantį aktyvumą, ir tai patvirtina šių tyrimų naujumą.

3.4. Ekstraktų aktyvumo priklausomybės nuo pagrindinių komponentų kiekio įvertinimas

Remiantis ekstraktuose nustatytais medžiagų kiekiais, įvertinta, kaip nuo jų galėtų priklausyti ekstraktų poveikis ląstelių proliferacijai.

3 lentelė. Etanolinių ekstraktų EC_{50} ir migracijos priklausomybė nuo veikliųjų medžiagų koncentracijos ekstraktuose

	***Pearson*'o koreliacijos koeficientas (*r*)**	
Veikliosios medžiagos	**A549**	**IGR39**
Askorbo rūgštis	0,169	-0,191
Flavonoidai	0,407	-0,233
Raugai	0,353	-0,185

Vidutinė koreliacija buvo nustatyta tarp A549 ląstelių proliferacijos ir ekstraktuose kaupiamų flavonoidų kiekių (r = 0,407). Raugų kiekis ekstraktuose silpnai koreliavo su ekstraktų poveikiu A549 ląstelių proliferacijai (r = 0,353). Mažiausia koreliacija buvo nustatyta tarp ekstraktuose esančio askorbo rūgšties kiekio ir priešvėžinio ekstraktų aktyvumo. Reikia paminėti, kad A549 ląstelių linijoje buvo glaudus ryšys tarp proliferacinio aktyvumo ir flavonoidų koncentracijos.

Augalo ekstraktai, kurie buvo naudoti tyrime, pasižymėjo dideliu priešvėžiniu poveikiu galimai dėl didelio flavonoidų kiekio, priklausančio nuo augalo žydėjimo meto, kuomet flavonoidų kiekis augalo masinio žydėjimo metu siekia 4,14 ± 0,25 proc.

IGR39 ląstelių gyvybingumą slopinantis poveikis ir veikliųjų medžiagų kiekis ekstraktuose koreliavo silpnai. Koreliacija tarp flavonoidų kiekio ir nustatyto priešvėžinio aktyvumo buvo silpna (r = -0,233). Vis dėl to, manoma, kad kompleksinis aktyvių junginių poveikis, pvz. flavonoidų ir salicilo rūgšties darinių, galėtų būti tas veiksnys, kuris lėmė ląstelių proliferacijos slopinimą, migraciją slopinantį ir ląstelių apoptozę bei nekrozę sukeliantį aktyvumą.

4. IŠVADOS

1. Pelkinių vingiorykščių skystieji etanoliniai ekstraktai labiausiai slopina plaučių karcinomos, mažiau – melanomos ląstelių gyvybingumą, neturi poveikio glioblastomos ląstelių gyvybingumui.
2. Dauguma ekstraktų sukėlė plaučių karcinomos ir melanomos ląstelių apoptozę, tik du ekstraktai (V.4 ir V.6) sukėlė ląstelių žūtį nekrozės būdu 1,25 mg/ml ir 2,5 mg/ml koncentracijomis.
3. Pelkinių vingiorykščių ekstraktai labiau slopino melanomos ląstelių migraciją, tačiau didesnėmis koncentracijomis nei plaučių adenokarcinomos ląstelių migraciją. Ekstraktai neturėjo glioblastomos ląstelių migraciją slopinančio poveikio.
4. Priešvėžiniam ekstraktų aktyvumui plaučių adenokarcinomos ląstelėse daugiausia įtakos galėtų turėti flavonoidų (r = 0,407) ir rauginių medžiagų koncentracijos (r = 0,353).

5. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Pelkinių vingiorykščių žolės skystieji etanoliniai ekstraktai galėtų būti pritaikomi kaip pagalbinė natūrali priemonė gydyti vėžinius susirgimus, tokius kaip plaučių adenokarcinoma ir melanoma.

Būtų vertinga atlikti atskirų aktyviųjų junginių priešvėžinio aktyvumo tyrimus skirtingose vėžinių ląstelių linijose. Taip pat būtų naudinga ištirti ir kitų pagrindinių pelkinių vingiorykščių aktyvių junginių (proantocianidinų, tokoferolių, salicilatų) kiekius, įvertinti veikliųjų medžiagų sinergistinį aktyvumą.

6. LITERATŪRA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin [Internet].2015;65(1):5–29. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21254/pdf

2. McCulloch M, Ly H, Broffman M, See C, Clemons J, Chang R. Chinese herbal medicine and fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer: A quality-adjusted meta-analysis of randomized controlled trials. Integr Cancer Ther [Internet].2016;(1):1–23. Available from: http://ict.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1534735416638738

3. Zhao Y, Chen R, Wang Y, Qing C, Wang W, Yang Y. *In vitro* and *in vivo* efficacy studies of *Lavender angustifolia* essential oil and its active constituents on the proliferation of human prostate cancer. Integr Cancer Ther [Internet].2016;(1):1–12. Available from: http://ict.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1534735416645408

4. Tao L, Wang S, Zhao Y, Sheng X, Wang A, Zheng S, et al. Phenolcarboxylic acids from medicinal herbs exert anticancer effects through disruption of COX-2 activity. Phytomed [Internet].2014;21(11):1473–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.05.001

5. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J Nutr 2004;134(12):3479 – 85.

6. Katani J, Mihailovi V, Stankovi N, Boroja T, Mladenovi M, Soluji S, et al. Dropwort (*Filipendula hexapetala* Gilib.) potential role as antioxidant and antimicrobial agent. Exicli J 2015;14:1–20.

7. Costa LS, Telles CBS, Oliveira RM, Nobre LT, Santos ND, Camara RB et al. Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells. Mar Drugs 2011;9(4):603–14.

8. Ari F, Aztopal N, Oran S, Bozdemir S, Celikler S, Ozturk S, et al. *Parmelia sulcata* Taylor and *Usnea filipendula* Stirt induce apoptosis-like cell death and DNA damage in cancer cells. Cell Prolif 2014;47(5):457–64.

9. Jones AW. Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry. Drug Test Anal 2011;3(6):337–44.

10. Katanic J, Boroja T, Stankovic N, Mihailovic V, Mladenovi M, Kreft S et al. Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. Food Funct [Internet].2015;6:1164–75. Available from: http://xlink.rsc.org/?DOI=C4FO01208A

11. Gniewosz M, Synowiec A, Krasniewska K, Przybyl JL, Baczek K, Weglarz Z. The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae* flos) on postharvest quality of apples. Food Control 2014;37(1):351–61.

12. Lesniewska DMR, Rozewska ES, Demokow U, Jozwiak J, Sobiecka M, Balan BJ. A natural herbal remedy modulates angiogenic activity of bronchoalveolar lavage cells from sarcoidosis patients. Exper immun 2016;41(1):25–30.

13. Hua X, Yu L, You R, Yang Y, Liao J, Chen D et al. Association among dietary flavonoids, flavonoid subclasses and ovarian cancer risk: a meta-analysis. Plos One [Internet]. 2016;11(3):1–15. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0151134

14. Mazzio EA, Soliman KF. In vitro screening of tumoricidal properties of international medicinal herbs. Phyther Res 2009;23(3):385–98.

15. Larmo P, Yang B, Perugni P. Natural skin care activity from the arctic. 2nd ed. Finland: Aromatech Ltd; 2012. p. 137–39. [Internet] Available form: https://aston-chemicals.com/.../Publication%20-%20Aromtech%20-%

16. Yildirim AB, Turker AU. In vitro adventitious shoot regeneration of the medicinal plant meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim). Vitr Cell Dev Biol 2009;45(2):135–44.

17. Castleman M. The new healing herbs: The essential guide to more than 125 of nature's most potent herbal remedies. Rodale:Rodale Books; 2010. p. 305-306. [Internet] Available from: https://books.google.com/books?id=mlyszsVFQ1kC&pgis=1

18. Discussion F, Party W, Products HM, July K. Community herbal monograph on *Filipendula ulmaria* (L .) Maxim ., flos. Reproduction 2011;44(6):1–5.

19. Bone K, Mills S. Principles and practice of phytotherapy. Texas: Churchill Livingstone; 2013. p. 1-56. [Internet] Available from: https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Ca3QAQAAQBAJ&pgis=1

20. Barker FW. Medicinal plants with possibilities of profit for new hampshire farmers. New Hampshire: New Hampshire emergency relief administration; 1999. p. 1-3. [Internet] Available from: http://desu.edu/faculty/atucker/medicinal_Plants.pdf

21. Pemp E, Reznicek G, Krenn L. Fast quantification of flavonoids in *Filipendulae ulmariae* flos by HPLC / ESI-MS using a nonporous stationary phase 1. J Anal Chem 2007;62(7):669–73.

22. Siberian C, Garden B, Garden B. Biologically Active Substances in *Filipendula ulmaria* (L .)

Maxim. growing in the middle urals. Chem for Sustain Devel 2013;21:369–74.

23. Harbourne N, Marete E, Jacquier JC, Riordan D. Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). Food Sci Technol 2009;42(9):1468–73. [Internet] Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.005

24. Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E, Swiader K. Antioxidant tannins from *Rosaceae* plant roots. Food Chem 2007;100(2):579–83.

25. Fecka I. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. Phytochem Anal 2009;20(3):177–90.

26. Barros L, Cabrita L, Boas MV, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. Food Chem [Internet]. 2011;127(4):1600–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.024

27. Toiu A, Vlase L, Oniga I, Benedec D, Tamas M. HPLC analysis of salicylic derivatives from natural products. Farmacia 2011;59(1):106–12.

28. Radulovic N, Misic M, Aleksic J, Dokovic D, Palic R, Stojanovic G. Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* essential oil. Fitoterapia 2007;78(7-8):565–70.

29. Matic S, Katanic J, Stanic S, Mladenovic M, Stankovic N, Mihailovic V et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts. J Ethnopharmacol 2015;174:287–92.

30. Piwowarski JP, Granica S, Zwierzynska M, Stefanska J, Schopohl P, Melzig MF et al. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. J Ethnopharmacol 2014;155(1):801–9.

31. Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. Medicines [Internet]. 2015;2(3):251–86. Available from: http://www.mdpi.com/2305-6320/2/3/251/htm

32. Mukherjee PK, Nema NK, Bhadra S, Mukherjee D, Braga FC, Matsabisa MG. Immunomodulatory leads from medicinal plants. Indian J 2014;13(2):235–56.

33. Krasnov EA, Raldugin VA, Avdeeva EY. Filimarin, a new flavanol glycoside from *Filipendula ulmaria* and its antioxidant activity. Pharm Chem J 2009;43(11):613–4.

34. Okuda T, Ito H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. Molecules 2011;16(3):2191–217.

35. Abachi S, Khademi F, Fatemi H, Malekzadeh F. Study of antibacterial activity of selected Iranian plant extracts on *Helicobacter pylori*. Journal of Dental and Medical Sciences 2013;5(1):55–9.

36. Braun L, Cohen M. Herbs and natural supplements. 2nd ed. Australia: Elsevier; 2007. p. 856-59. [Internet] Available from: http:// liveprayer.net/downloads/.../herbs/Herbs%20and%20Natural%20Supplements

37. Vasiliauskas A, Keturkienė A, Leonavicienė L. Influence of herb *Filipendula ulmaria* (L .) Maxim tincture on pro- / antioxidant status in gastric tissue with indomethacin-induced gastric ulcer in rats. Medica Lituani 2004;11(1):31-36.

38. Smagulova FM, Tuleuov BI, Suleimenov YM. Composition of resin volatile fraction from *Filipendula ulmaria* (L .) Maxim. Natural prod 2004;2(1):1-4.

39. Leonavičienė L, Vaitkienė D, Keturkienė A, Bradūnaitė R, Vasiliauskas A. Eksperimentinis osteoartritas ir jo gydymas augaliniais preparatais. Gerontologija 2008;9(1):34-48.

40. Corp N, Pendry B. The role of Western herbal medicine in the treatment of gout. J Herb Med 2013;3(4):157–70. [Internet]. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2013.08.002

41. Shilova IV, Suslov NI. Nootropic ffect of Meadowsweet (*Filipendula vulgari*s) extracts. Bull Exp Biol Med [Internet]. 2015;158(5):659–63. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10517-015-2841-9

42. Hagerman A. Tannin chemistry handbook. 2nd ed. Maiami: Oxford university; 2002. p. 1–6.

43. Lima MJ, Sousa D, Lima RT, Carvalho AM, Ferreira IC, Vasconcelos MH. Flower extracts of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim inhibit the proliferation of the NCI-H460 tumour cell line. Ind Crops Prod [Internet]. 2014;59:149–53. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.009

44. Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Simon A, Duroux JL. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. J Agric Food Chem 2001;49(7):3321–7.

45. Trouillas P, Calliste CA, Allais DP, Simon A, Marfak A, Delage C, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. Food Chem 2003;80(3):399–407.

46. Neagu E, Paun G, Albu C, Radu GL. Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. J Taiwan Inst Chem Eng [Internet]. 2014;52:1–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2015.01.026

47. Pospelova ML, Barnaulov OD. The antihypoxant and antioxidant effects of medicinal plants as the basis for their use in destructive diseases of the brain. Human phys 2000;26(1):86–91.

48. Smirnova GV, Vysochina GI, Muzyka NG, Samoylova ZY, Kukushkina TA, Oktyabrsky ON. Evaluation of antioxidant properties of medical plants using microbial test systems. World J Microbiol Biotechnol 2010;26(12):2269–76.

49. Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek A, Vasicek O, Blazheva D et al. Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts. Acta Biochim Pol 2014;61(2):359–67.

50. Boziaris IS, Proestos C, Kapsokefalou M, Komaitis M. Antimicrobial effect of *Filipendula ulmaria* plant extract against selected foodborne pathogenic and spoilage bacteria in laboratory media, fish flesh and fish roe product. Biotechnol 2011;49(2):263–70.

51. Vega DC, Star MJ, Gonzalez NRS, Hernandez BR, Garcia IE, Aragon PM et al. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza radix and its bioactive compounds. Phytotherapy res 2009;22(2008):557–9.

52. Nybond S, Karp M, Yrjönen T, Tammela P. Bioluminescent whole-cell reporter gene assays as screening tools in the identification of antimicrobial natural product extracts. J Microbiol Methods [Internet]. 2015;114:54–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.04.014

53. Synowiec A, Gniewosz M, Krasniewska K, Smigiel AC, Przybyl JL, Baczek K et al. Effect of meadowsweet flower extract-pullulan coatings on rhizopus rot development and postharvest quality of cold-stored red peppers. Molecules 2014;19(9):12925–39.

54. Shilova IV, Semenov AA, Suslov NI, Korotkova EI, Vtorushina AN, Belyakova V V. Medicinal plants chemical composition and biological activity of a fraction of meadowsweet extract. Pharm Chem J. 2009;43(4):4–9.

55. Marais JP, Deavours B, Dixon RA. The stereochemistry of flavonoids.The Science of Flavonoids. Columbus, Ohio:Springer; 2006. p. 1-20. [Internet] Available from: http:// http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-28822-2_1#page

56. Mu J, Liu T, Jiang L, Wu X, Cao Y, Li M, et al. The traditional chinese medicine baicalein potently inhibits gastric cancer cells. J Cancer [Internet]. 2016;7(4):453–61. Available from: http://www.jcancer.org/v07p0453.htm

57. Pukalskienė M, Venskutonis PR, Pukalskas A. Phytochemical composition and antioxidant properties of *Filipendula vulgaris* as a source of healthy functional ingredients. J Funct Foods 2015;15:233–42.

58. Angst E, Park JL, Moro A, Lu Q, Li G, King J et al. The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. Pancreas 2014;42(2):223–9.

59. Li W, Liu M, Xu YF, Feng Y, Che JP, Wang GC, et al. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. Oncol Rep 2014;31(1):117–24.

60. Dixit S. Anticancer effect of rutin isolated from the methanolic extract of *Triticum aestivum* straw in mice. Med Sci [Internet]. 2014;2(4):153–60. Available from: http://www.mdpi.com/2076-3271/2/4/153/

61. Drummond EM, Harbourne N, Marete E, Martyn D, Jacquier JC, O'Riordan D, et al. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. Phyther Res 2013;27(4):588–94.

62. Jo E, Park SJ, Choi YS, Jeon WK, Kim BC. Kaempferol suppresses transforming growth factor-β1-induced epithelial to mesenchymal transition and migration of A549 lung cancer cells by inhibiting Akt1-mediated phosphorylation of Smad3 at Threonine-179. Neoplasia [Internet]. 2015;17(7):525–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26297431

63. Garg M, Lata K, Satija S. Cytotoxic potential of few Indian fruit peels through 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay on HepG2 cells. Indian Journal of Pharmacology 2016;2(1):64–8. [Internet] Available from: http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lah&AN=20163072402&site=ehost-live

64. Vaid M, Singh T, Prasad R, Kappes JC, Katiyar SK. Therapeutic intervention of proanthocyanidins on the migration capacity of melanoma cells is mediated through PGE 2 receptors and β-catenin signaling molecules. Am J Cancer Res 2015;5(11):3325–38.

65. Nepka C, Asprodini E, Kouretas D. Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 1999;24(2):183–

9.

66. Quideau S. Chemistry and Biology of Ellagitannins. Pharmaceutical Sciences [Internet]. 2009. p. 320-374. Available from: http://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/6795

67. Melo JG, Araújo TA, Castro VTN, Cabral DL, Do Rodrigues MD, Nascimento SC et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. Molecules 2010;15(12):8534–42.

68. Rochelle L, Janc J, Szent A. Vitamin C. 2nd ed. North Dakota:Analytical chemical acta; 2007. p. 1-2. [Internet] Available from: http:// und.edu/student-life/dining/_files/docs/fact.../vitamin-c.pdf

69. Barrita J, Sánchez M. Antioxidant role of ascorbic acid and his protective effects on chronic diseases. InTech [Internet] 2013; Available from: http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/antioxidant-role-of-ascorbic-acid-and-his-protective-effects-on-chronic-diseases

70. Gonzalez MJ, Massari JRM. Anticancer mechanisms of vitamin C. Puerto rico:Springer; 2014. p. 17–26. [Internet]. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1890-4

71. Medvedev AI, Akatov VS, Kreshchenko ND, Solov'eva ME, Leshchenko VV, Lezhnev EI et al. Combined treatment with vitamin B12 and ascorbic acid causes in vitro DNA degradation in tumor cells. Bull Exp Biol Med [Internet]. 2001;131(4):364–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1155002

72. Raiola A, Giudice R, Monti DM, Tenore GC, Barone A, Rigano MM. Bioactive compound content and cytotoxic effect on human cancer cells of fresh and processed yellow tomatoes. Molecules [Internet]. 2015;21(1):33. Available from: http://www.mdpi.com/1420-3049/21/1/33/htm

73. Li W, Wu J, Tu Y. Synergistic effects of tea polyphenols and ascorbic acid on human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells. J Zhejiang Univ Sci B [Internet]. 2010;11(6):458–64. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2880360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

74. Morkūnaitė V. Pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria L.*) augalinių žaliavų flavonoidų ir raugų kiekinės sudėties bei antiradikalinio aktyvumo tyrimas. Kaunas; 2015. p. 31 - 41.

75. Žemaitytė R. Pelkinių vingiorykščių (*Filipendula ulmaria* L.) augalinės žaliavos cheminės sudėties, antiradikalinio ir antimikrobinio poveikių įvertinimas. Kaunas; 2014. p. 48-49.

76. Lima MJ, Diana Sousa, Raquel T. Flower extracts of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim inhibit cell growth of human tumour cell lines. Industrial Crops and Products 2014;59:149-53.

77. Lesauskaitė V, Ivanovienė L. Programuota ląstelių mirtis: molekuliniai mechanizmai ir jų nustatymo metodai. Medicina 2002;38(9):869–75.

78. Tobergte DR, Curtis S. Tissue damage and cell death molecular mechanisms. J Chem Inf Model 2013;53(9):66–9.

79. Romagnolo D, Selmina O. Flavoniods and cancer prevention: a review of the evidence. J of Nutr in Geront and Geriatr 2012; 31(3):206-38.

80. Tsui KC, Chiang TH, Wang JS, Lin LJ, Chao WC, Chen BH et al. Flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* exhibit differential induction of cell cycle arrest in H460 and A549 cancer cells. Molecules 2014;19(11):17663–81.

81. Galkin A. Evaluation of natural products in apoptosis, protein kinase C activation and caco-2 cell permeability. Helsinki: University of Helsinki; 2008. p. 11-22. [Internet] Available from: helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/evaluati.pdf

82. Sun Q, Jiang S, Yang K, Zheng J, Zhang L, Xu W. Apigenin enhances the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. Mol Biol Rep [Internet]. 2011;39(5):5529–35. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-1356-3

7. DARBO PRISTATYMAS

Urtė Andriuškevičiūtė, Vida Morkūnaitė, Deividas Burdulis, Julius Liobikas, Vilma Petrikaitė. „Anticancer activity of *Filipendula ulmaria* liquid extracts“. The 6th International Pharmaceutical conference 2015. Kaunas, 2015 lapkričio 5-6 dienos. (Stendinis pranešimas)