

## NADPH OKSIDAZĖS 4 (NOX4) RAIŠKA IR AKTYVUMAS – VIENA IŠ KASOS ADENOKARCINOMOS LĄSTELIŲ ATSPARUMO APOPTOZEI GRANDŽIŲ

Aurelija Maziukienė<sup>1</sup>, Aldona Jakštaitė<sup>1</sup>, Giedrė Šilkūnienė<sup>1</sup>, Kristina Kmieliūtė<sup>1</sup>,  
Antanas Gulbinas<sup>1,2</sup>, Žilvinas Dambrauskas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Virškinimo sistemos tyrimų institutas, <sup>2</sup>Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Chirurgijos klinika

**Raktažodžiai:** kasos adenokarcinoma, Nox4, ROS, apoptozė.

### Santrauka

Kasos vėžys yra vienas iš agresyviausių ir aukštą mirtingumo lygį turinčių navikinių ligų. Pagrindinės trumpo išgyvenamumo priežastys: liga dažniausiai diagnozuojama per vėlai ir pažengusios stadijos. Viena iš priežasčių, kodėl kasos vėžys toks agresyvus ir atsparus chemoterapijai yra nuo Nox4 priklausoma reaktyviųjų deguonies formų (ROS) gamyba, atsakinga už kasos vėžio ląstelių antiapoptozinį aktyvumą. Publikacijų apie Nox4 raišką kasos vėžyje nėra daug, tačiau Nox4 gali būti svarbus antiapoptozinis kasos vėžinių ląstelių faktorius.

Šiame tyrime nustatėme ir palyginome Nox4 raišką baltymų ir iRNR lygmenyje žmogaus kasos vėžiniame, sveikame aplinkiniame bei sveikame (donoriniame) kasos audiniuose. Nustatėme NADPH oksidazės slopiklių DPI ir apocianino poveikį reaktyviųjų deguonies formų susidarymui žmogaus kasos vėžinėse linijinėse ląstelėse MiaPaca-2 ir Capan-2. Tyrimai parodė, kad inhibuojant NADPH oksidazės mažėja ne tik ROS sintezė, bet ir šių ląstelių gyvybingumas bei aktyvuojama apoptozė. Tyrimai taip pat patvirtino, kad nuo NADPH oksidazės priklauso ROS gamyba atsakinga už žmogaus kasos vėžinių ląstelių antiapoptozinį aktyvumą. Atsižvelgus į šiuos rezultatus NADPH oksidazės galima laikyti potencialiais terapiniais vėžinių susirgimų taikimais.

### Įvadas

Pasaulinės statistikos duomenimis, kasos vėžys yra vienas iš agresyviausių ir aukštą mirtingumo lygį turinčių ligų.

Pacientų 5 metų išgyvenamumas po diagnozės nustatymo siekia vos 5%, po radikalių operacijų išgyvenamumas padidėja iki 10%-20% [1]. Pagrindinės tokio trumpo išgyvenamumo priežastys yra tai, kad liga dažniausiai diagnozuojama per vėlai. Efektyvių gydymo metodų nėra, nes ši vėžio forma yra labai atspari chemo- ir radioterapijai [2, 3].

Beveik visus navikinius susirgimus charakterizuoja padidinta reaktyviųjų deguonies formų (ROS) gamyba vėžinėse ląstelėse. Manoma, kad ROS hiperekspresija vėžinėse ląstelėse gali būti vienu iš faktorių, lemiančių šių ląstelių išgyvenamumą ir atsparumą priešvėžiniam gydymui [4, 5]. NADPH oksidazės (Nox) yra pagrindinis reaktyviųjų deguonies formų šaltinis ląstelėse. Jos atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant įvairius fiziologinius ir patofiziologinius procesus, tokius kaip ląstelių proliferacija, diferenciacija ir žūtis. Visos NADPH oksidazės sudarytos iš membranoje surišių subvienetų ir katalizuoja molekulinio deguonies surišimo procesus. NADPH oksidazės šeimą sudaro septynios izoformos (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 ir Duox2) [6]. Kiekviena Nox izoforma yra unikali audinių sklaidos, domeno struktūros, subvieneto sandaros ir aktyvacijos mechanizmų atžvilgiu. Patvirtinta, kad NADPH oksidazės siejamos ne tik su įvairiais susirgimais, bet ir su vėžio išsivystymu bei jo progresu [7].

NADPH oksidazė 4 (Nox4) ekspresuojama inkstuose, aptinkamas visose vaskuliarinėse ląstelėse, fibroblastuose, osteoklastuose ir neuronuose. Pirmiausia aptinkamas viduląstelinėse organelėse (endoplazminiame tinkle, ląstelės branduolio membranoje ir galimai mitochondrijose). Nox4 skiriasi nuo kitų NADPH oksidazių izoformų tuo, kad yra nuolat ekspresuojamas ląstelėse ir jo aktyvumas priklauso nuo ekspresijos lygio. Pirminis Nox4 produktas yra vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ), bet galimai pirminiu produktu gali būti ir superoksidas ( $O_2^-$ ), kuris greitai virsta į vandenilio peroksidą [6].

Yra duomenų, kad nuo Nox4 priklausoma ROS gamyba yra atsakinga už kasos vėžio ląstelių antiapoptozinį aktyvumą [8]. Tai gali būti viena iš priežasčių, kodėl kasos vėžys yra toks agresyvus ir atsparus standartinei chemoterapijai. Publikacijų, kuriose būtų tirta Nox4 raiška kasos vėžyje, nėra daug. Tačiau Nox4 vaidmuo kasos vėžio patogenezėje galimai yra svarbus, nes gali didinti kasos vėžinių ląstelių išgyvenamumą bei nulemti šio vėžio antiapoptozines savybes.

**Darbo tikslas** – įvertinti Nox4 baltymo raišką kasos adenokarcinomos audiniuose bei nustatyti NADPH oksidazės slopiklių įtaką reaktyviųjų deguonies formų kiekiui kasos vėžio ląstelėse MiaPaca-2 ir Capan-2 bei jų poveikį šių ląstelių gyvybingumui ir apoptoziniam aktyvumui.

### Tyrimo medžiaga ir metodai

**Žmogaus kasos adenokarcinomos audiniai.** Žmogaus kasos adenokarcinomos mėginiai (n=28) buvo gauti iš operacijos metu pašalintų kasos audinių. Taip pat buvo ištirti sveiki aplinkiniai kasos audiniai (n=34), kurie buvo paimti iš kasos adenokarcinomos nepažeistų to paties paciento kasos audinio vietų. Sveikos (donorinės) kasos audiniai (n=8) buvo gauti vykdant multiorganinį organų paėmimą iš organų donorų, kurie nesirgo kasos ligomis. Visų eksperimentų metu vėžiniai, sveiki aplinkiniai ir sveiki donoriniai kasos mėginiai buvo apdorojami tuo pačiu metu, norint užtikrinti rezultatų palyginamumą. Šviežiai paimti mėginiai iš karto buvo talpinami į skystą azotą ir vėliau laikomi -80°C šaldiklyje. Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas pritarė biomedicininis tyrimų vykdymui (Bioetikos leidimo nr. BE-2-10 ir BE-2-17).

**RNR išskyrimas iš audinių ir tikro laiko polimerazinės grandininės reakcijos analizė (TL-PGR).** Visas RNR kiekis buvo išskirtas iš audinių naudojant PureLink RNA easy rinkinį (*Ambion*) ir TRI reagentą (*Zymo*), taikant gamintojo protokolus. Išgrynintos RNR koncentracija nustatyta spektrofotometriiniu metodu (*NanoDrop*) ir 1 µg RNR kiekio buvo konvertuojama į cDNR, naudojant Super Script Vilo Master Mix rinkinį (*Invitrogen*). TL-PGR analizei buvo naudojama 2 µl cDNR, 1X TaqMan Master Mix ir Nox4 pradmuo (*Invitrogen*).

**Baltymų analizė.** Audiniams lizuoti naudotas audinių lizės buferis (*Invitrogen*) su proteazių inhibitoriais (*Roche*). Lizatai buvo centrifuguojami 35 min. esant 19000 aps./min. greičiui. Supernatantai surinkti, o baltymų koncentracija juose buvo nustatoma naudojant BCA baltymų nustatymo rinkinį (*Thermo Scientific*). Kiekvienam mėginiui paruošti buvo naudojama 50 µg baltymų. Forezei naudotas 4-12% natrio dodecyl sulfat-poliakrilamidinis gelis (SDS-PAGE),

o perkėlimui naudota PVDF membrana. Membrana po perkėlimo buvo blokuojama 30 min. komerciniu blokavimo buferiu (*Invitrogen*) kambario temperatūroje. Su pirminiu antikūnu membrana inkubuota per naktį 4°C temperatūroje, o su antriniu antikūnu – 30 min. ir vėliau inkubuota su chemiliuminescenciniu substratu (*Invitrogen*). Buvo naudojami šie pirminiai antikūnai: triušio polikloninis anti Nox4 (*Abcam*) ir pelės monokloninis anti GAPDH (*Ambion*). Rezultatai buvo analizuojami naudojant gelių dokumentavimo sistemą (UVP).

**Ląstelių kultivavimas.** Žmogaus kasos vėžio ląstelinės MiaPaca-2 ir Capan-2 buvo auginamos monosluksniu steriliuose flakonuose, turinčiuose 75 cm<sup>2</sup> augimo paviršiaus plotą (TPP) su 10 ml augimo terpės. Flakonai laikomi inkubatoriuje, kuriame palaikoma drėgna 37°C temperatūros aplinka, prisotinta 5% CO<sub>2</sub>. Ląstelėms auginti naudota RPMI mitybinė terpė (*Gibco*), papildyta 1% 10000U/ml Penicilino/Streptomicino tirpalo (*Gibco*) bei 10% FBS (*Gibco*). Capan-2 ląstelėms mitybinė terpė ruošta su 20% FBS. Eksperimentuose ląstelės naudotos tarp 3 ir 20 pasažų.

**ROS kiekio įvertinimas ląstelėse.** Ląstelės buvo užsėtos į 24 šulinėlių plokšteles (TPP), po 50000 ląstelių į kiekvieną šulinėlį naudojant DMEM FluoroBrite terpę (*Gibco*). Po 24 h ląstelės paveiktos NADPH oksidazės slopikliu 1µM DPI (*Sigma*). Su DPI ląstelės veiktos 6 h. Praėjus veikimo laikui, terpė atsargiai nusiurbama, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kiekis terpėje įvertinamas naudojant Amplex Red vandenilio peroksido/peroksidazės nustatymo rinkinį (*Invitrogen*) bei taikant gamintojo protokolą. Rezultatas įvertintas fluorimetriškai, bei išreikštas santykiniais fluorescencijos vienetais (RFU).

**Ląstelių gyvybingumo nustatymas (MTT testas).** Ląstelės buvo užsėtos į 96 šulinėlių plokšteles (TPP), po 3000 ląstelių į kiekvieną šulinėlį. Po 24 h ląstelės paveiktos NADPH oksidazės slopikliais: 1µM difenilenjodonio chloridu (DPI) (*Sigma*) ir 1mM apocianinu (*Sigma*). Su DPI ląstelės veiktos 6 h, o su apocianinu – 24 h. Praėjus numatytam laiko tarpui, į kiekvieną šulinėlį buvo pilama po 20 µl MTT dažo, plokštelės talpinamos į inkubatorių ir laikomos 37°C temperatūroje 4 h. Vėliau terpė atsargiai nusiurbama, o šulinėliuose susidariusios druskos ištirpinamos su 200 µl DMSO (*Roth*). Rezultatas įvertinamas spektrofotometriškai.

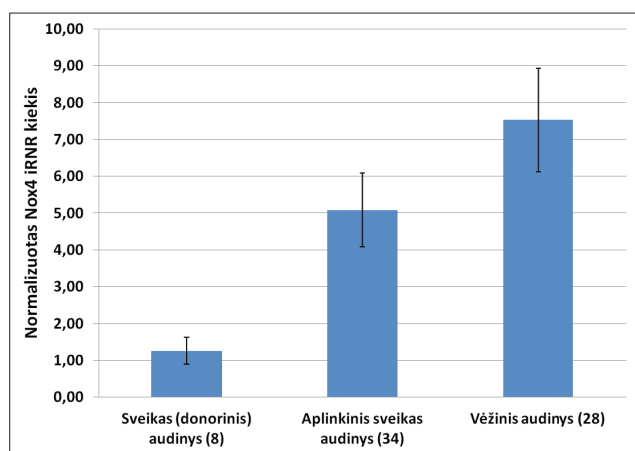
**Ląstelių apoptozės tyrimas.** Ląstelės buvo užsėtos į 24 šulinėlių plokšteles (TPP), po 50000 ląstelių į kiekvieną šulinėlį naudojant DMEM FluoroBrite terpę (*Gibco*). Po 24 h ląstelės paveiktos NADPH oksidazės slopikliais: 1µM difenilenjodonio chloridu (DPI) (*Sigma*) ir 1mM apocianinu (*Sigma*). Su DPI ląstelės veiktos 6 h, o su apocianinu – 24 h.

Ląstelių apoptozės įvertinimui naudotas CellEvent Caspase-3/7 Green reagentas (*Invitrogen*), taikant gamintojo protokolą. Rezultatas įvertintas fluorescenciniu mikroskopu.

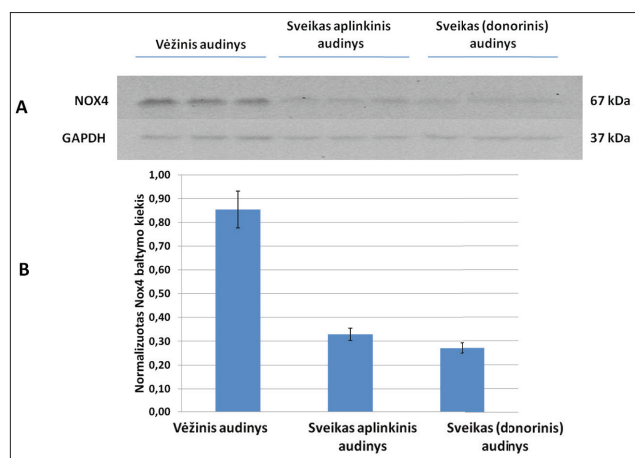
**Statistinė analizė.** Rezultatų statistinė analizė buvo atlikta naudojant SPSS v. 16.0 programą. Nesant normaliam skirstiniui rezultatų palyginimui tarp imčių pasirinktas Mann–Whitney testas. Vizualiniai duomenys pateikti nurodant vidutines reikšmes su standartine paklaida. Reikšmingumo lygmuo buvo pasirinktas, kai  $p < 0.05$ .

## Rezultatai

Atlikus TL-PGR analizę paaiškėjo, kad kasos vėžiuose audiniuose, lyginant su sveiku (donoriniu) kasos audiniu, Nox4 iRNR kiekis 7,5 karto didesnis ( $p < 0,05$ ), o



**1 pav.** Normalizuotas Nox4 iRNR ekspresijos lygis sveikame, sveikame aplinkiniame bei vėžiniame žmogaus kasos audinyje

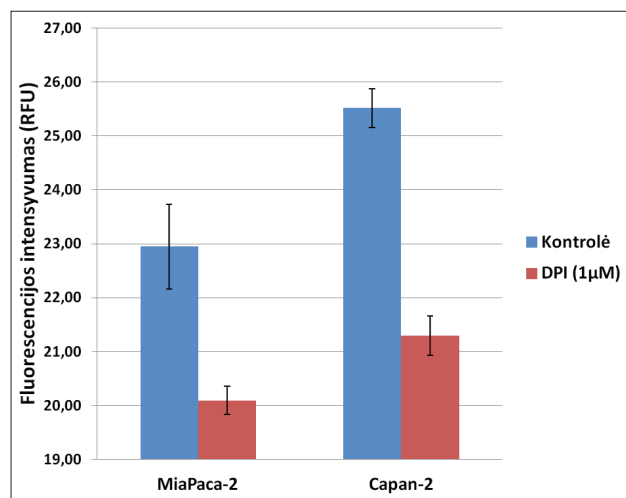


**2 pav.** A) Western blot - Nox4 baltymo kiekis sveikame (donoriniame), sveikame aplinkiniame ir vėžiniame kasos audinyje. B) Įvertintas normalizuotas baltymų kiekis, naudojant Image Studio Lite programą

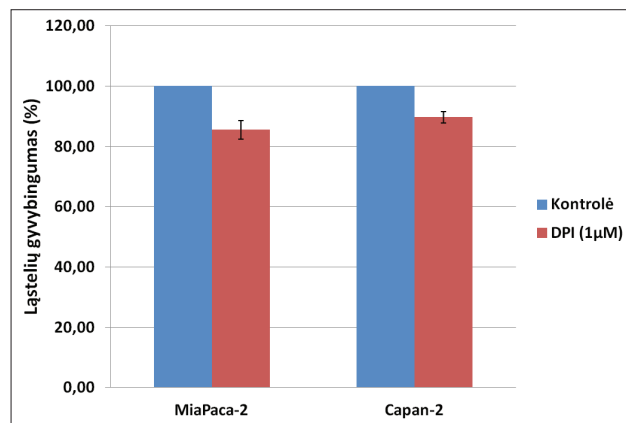
aplinkiniame sveikame audinyje iRNR kiekis buvo 5 kartus didesnis ( $p < 0,05$ ) lyginant su sveiku (donoriniu) kasos audiniu (1 pav.).

Potransliacinės ekspresijos baltymų analizės (*Western blot*) tyrimas parodė, kad vėžiniame kasos audinyje Nox4 baltymo sintezė yra padidėjusi lyginant su sveiku (donoriniu) bei sveiku aplinkiniu kasos audiniu (2 pav.).

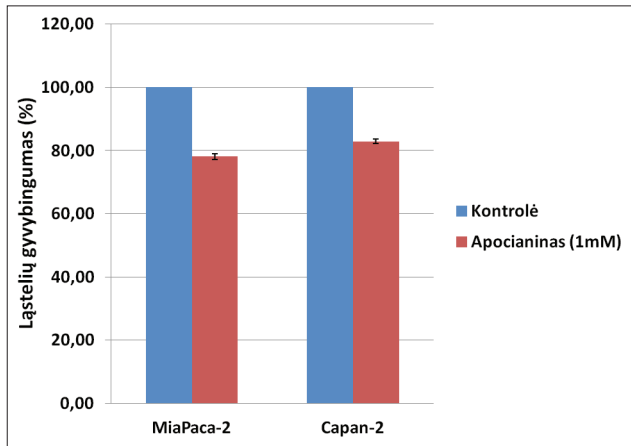
Kasos vėžio linijinėse ląstelėse tyrėme Nox4 aktyvumą, vertindami reaktyviųjų deguonies formų (ROS) kiekį. ROS pokyčius žmogaus kasos vėžinėse linijinėse ląstelėse MiaPaca-2 ir Capan-2 vertinome matuodami vandenilio peroksido kiekio pokytį terpėje, kai ląstelės veikiamos NADPH oksidazės slopikliu DPI.  $H_2O_2$  kiekis yra tiesiogiai propor-



**3 pav.**  $H_2O_2$  kiekio pokyčio įvertinimas žmogaus kasos vėžinėse linijinėse ląstelėse MiaPaca-2 ir Capan-2, kai ląstelės veikiamos DPI. Rezultatas išreikštas santykiniais fluorescencijos vienetais (RFU)



**4 pav.** Žmogaus kasos vėžinių linijinių ląstelių gyvybingumo (%) įvertinimas, po ląstelių paveikimo 1 μM DPI



**5 pav.** Žmogaus kasos vėžinių linijinių ląstelių gyvybingumo (%) įvertinimas, po ląstelių paveikimo NADPH oksidazės slopikliu apocianinu (1mM)

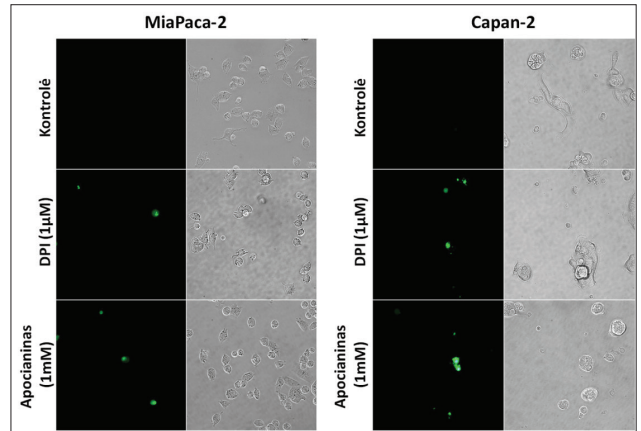
cingas fluorescencijos intensyvumui, išreikštam santykiniais fluorescencijos vienetais (RFU). Paveikus MiaPaca-2 ląsteles DPI, fluorescencijos intensyvumas sumažėjo nuo 23 RFU iki 20 RFU (atitinkamai 13%), o Capan-2 ląstelėse fluorescencijos intensyvumas sumažėjo nuo 25,5 RFU iki 21 RFU (atitinkamai 17%). Nustatėme, kad po DPI poveikio kasos vėžio linijinėse ląstelėse reikšmingai sumažėja ROS kiekis, nes užslopinamos šiuos junginius generuojančios NADPH oksidazės (3 pav.).

Tikrindami hipotezę, kad dėl NADPH oksidazės padidėjusi ROS raiška nulemia kasos vėžinių ląstelių gyvybingumą, įvertinome šių ląstelių gyvybingumą paveikus jas DPI. Nustatėme, kad paveikus MiaPaca-2 ląsteles DPI, jų gyvybingumas sumažėja 14,5%. Paveikus Capan-2 ląsteles DPI, jų gyvybingumas sumažėja 8% ( $p < 0,05$ ) (4 pav.).

DPI gali slopinti ROS gamybą ir ląstelių gyvybingumą ne tik per NADPH oksidazę, bet ir per kitus mechanizmus, tokius kaip azoto oksido sintazės, ksantino oksidazės, pirmojo mitochondrijų kvėpavimo komplekso bei citochromo p-450 reduktazės inhibicija. Todėl pakartotinai patikrinome hipotezę apie ROS nulemtą kasos vėžinių ląstelių atsparumą apoptozei, atlikdami MTT tyrimą su apocianinu, kuris yra selektyvus NADPH oksidazės inhibitorius. Paaiškėjo, kad MiaPaca-2 ląstelių gyvybingumas sumažėjo 22%. Paveikus Capan-2 ląsteles apocianinu jų gyvybingumas sumažėjo 17% ( $p < 0,05$ ) (5 pav.).

Ištyrėme apoptozinį NADPH oksidazės slopiklių DPI ir apocianino poveikį kasos vėžinėms linijinėms ląstelėms MiaPaca-2 ir Capan-2. Ląstelių apoptozė buvo įvertinta stebint kaspazės 3 ir kaspazės 7 raišką, taikant fluorescencinės mikroskopijos metodą.

Apoptuojančiose kasos vėžinėse linijinėse ląstelėse



**6 pav.** Žmogaus kasos vėžinių linijinių ląstelių apoptozės įvertinimas, po ląstelių paveikimo NADPH oksidazės slopikliais DPI (1µM) ir apocianinu (1mM). Naudotas 20X objektyvo didinimas

stebima fluorescencija, atsirandanti dėl kaspazių 3 ir 7 aktyvacijos. Fluorescencija stebima tik ląstelėse, paveiktose DPI ir apocianinu. Nustatėme, kad paveikus ląsteles DPI ir apocianinu, aktyvuojama kasos vėžinių ląstelių apoptozė (6 pav.).

## Diskusija

Literatūroje aprašoma, kad kasos vėžinėse ląstelėse Nox4 baltymo ekspresija aptinkama tiek iRNR lygmenyje, tiek ir baltymo lygmenyje [8], tačiau tokių straipsnių, kurie nagrinėtų Nox4 raišką kasos vėžinėse ląstelėse nėra daug. Šiame tyrime atliktas NADPH oksidazės šeimos baltymo Nox4 izoformos raiškos įvertinimas žmogaus kasos adenokarcinomos audiniuose tiek iRNR tiek ir baltymų lygmenyje. Buvo palyginta Nox4 baltymo raiška kasos vėžiniame, sveikame aplinkiniame bei sveikame (donoriniame) audiniuose. Taip pat įvertinome nuo NADPH oksidazės priklausomų reaktyviųjų deguonies formų (vandenilio peroksido) kiekį kasos vėžinėse linijinėse ląstelėse bei NADPH oksidazės slopiklių poveikį šių ląstelių gyvybingumui ir apoptoziniam aktyvumui.

A.S. Gukovskaya su kolegomis 2005m. savo tyrimuose [9] vertino kasos vėžiu sirgusių pacientų audinius ir patvirtino, kad Nox4 ekspresuojamas baltymų lygmenyje šiuose audiniuose. Rezultatus patvirtino tiek baltymų analizės, tiek ir imunohistocheminiai tyrimai. Tačiau tyrimo autoriai nepateikia Nox4 raiškos palyginimo tarp sveiko ir vėžinio kasos audinio nei baltymų, nei iRNR lygmenyje. Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad Nox4 baltymo kiekis yra padidėjęs vėžiniame žmogaus kasos audinyje baltymų ir iRNR lygmenyje, lyginant su sveiku aplinkiniu ir sveiku (donoriniu) kasos audiniu. Mes įrodėme, kad Nox4 yra reikš-

mingai hiperekspresuojamas tiek transkripciniame, tiek ir transliaciniame lygmenyje.

Kitų autorių tyrimais [8, 10, 11] nustatyta, kad Nox4 baltymas ekspresuojamas žmogaus kasos vėžinėse linijinėse ląstelėse. Kadangi Nox4 atsakingas už reaktyviųjų deguonies formų susidarymą šiose ląstelėse, kituose tyrimuose mes slopinome šias deguonies formas naudodami DPI, kuris yra dažniausiai naudojamas daugelio Nox izoformų inhibitorius. Nustatėme, kad DPI geba reikšmingai mažinti reaktyviųjų deguonies formų (šiuo atveju vandenilio peroksido) formavimąsi žmogaus kasos vėžinėse linijinėse ląstelėse MiaPaca-2 ir Capan-2.

Kadangi literatūroje minima, kad dėl NADPH oksidazių padidėjusi reaktyviųjų deguonies junginių raiška lemia kasos vėžinių ląstelių atsparumą apoptozei [8-12], savo tyrimuose mes atlikome vėžinių linijinių ląstelių MiaPaca-2 ir Capan-2 gyvybingumo vertinimą, paveikus šias ląsteles NADPH oksidazės slopikliu DPI. Nustatėme, kad paveikus ląsteles DPI, jų gyvybingumas mažėja. Tačiau negalime tiksliai įvertinti, ar DPI tiksliai veikia per NADPH oksidazių slopinimą, nes DPI taip pat yra daugelio elektronų nešiklių slopiklis. Jis taip pat gali inhibuoti azoto oksido sintazes, ksantino oksidazes, pirmą mitochondrijų kvėpavimo kompleksą bei citochromo p-450 reduktazę [6]. Todėl ląstelių gyvybingumą pakartotinai įvertinome naudodami kitą slopiklį apocianiną, kuris yra selektyvus Nox inhibitorius, nes inhibuoja NADPH oksidazių citoplazminių subvienetų translokaciją ir taip mažina ROS produkciją [6]. Nustatėme, kad apocianinas, kaip ir DPI, mažina vėžinių ląstelių gyvybingumą.

Ankstesni autorių tyrimai taip pat parodė [8, 9], kad šie slopikliai mažina linijinių kasos vėžinių ląstelių gyvybingumą, didindami jų DNR fragmentaciją. Atlikti Mochizuki ir jo kolegų tyrimai [12] parodė, kad NADPH oksidazės inhibicija naudojant DPI ir siNox4 Panc-1 ląstelėse sustabdė Akt kinazės, kuri atsakinga už ląstelių išgyvenamumą, aktyvumą ir taip buvo sukelta šių vėžinių žmogaus kasos ląstelių apoptozė. Tyrimai patvirtino, kad Nox4 bent jau iš dalies veikia antiapoptozėms. Mes nustatėme, kad paveikus kasos vėžines linijines ląsteles MiaPaca-2 ir Capan-2 Nox inhibitoriais DPI ir apocianinu, sumažėja ne tik ROS kiekis, bet aktyvuojama ir šių ląstelių apoptozė.

Atliekant tolimesnius funkcinius tyrimus, planuojama slopinant NADPH oksidazės aktyvumą, įvertinti kasos vėžinių ląstelių atsaką į chemoterapinį gydymą.

## Išvados

Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad Nox4 raiška yra reikšmingai padidėjusi žmogaus vėžiniame kasos audinyje baltymų ir iRNR lygmenyje. Slopinant NADPH oksidazę DPI

ir apocianinu, slopinamas ne tik šių reaktyviųjų deguonies formų kiekis, bet mažėja ir žmogaus kasos vėžinių linijinių ląstelių MiaPaca-2 ir Capan-2 gyvybingumas, aktyvuojama apoptozė.

## Padėka

*Mokslinis tyrimas finansuotas Europos socialinio fondo lėšomis pagal visuotinės dotacijos priemonę.*

## Literatūra

1. Thota R, Pauff J M, Berlin J D. Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review. *Oncology* 2014; 28(1):70-4.
2. Souček J J, Baine M J, Lin C, Rachagani S, Gupta S, Kaur S, Lester K, Zheng D, Chen S, Smith L, Lazenby A, Johansson S L, Jain M, Batra S K. Unbiased analysis of pancreatic cancer radiation resistance reveals cholesterol biosynthesis as a novel target for radiosensitisation. *Br J Cancer* 2014; 111(6):1139-49.
3. Zhou J, Du Y. Acquisition of resistance of pancreatic cancer cells to 2-methoxyestradiol is associated with the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Mol Cancer Res.* 2012; 10(6):768-77.
4. Behrend L, Henderson G, Zwacka R M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 2003; 31 (Pt 6): 1441-1444.
5. Afanas'ev I. Reactive oxygen species signaling in cancer: Comparison with aging and disease. 2011; 2(1):219-230.
6. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* 2007; 87(1):245-313.
7. Altenhofer S, Kleikers PWM, Radermacher KA, Scheurer P, Hermans JJR, Schiffers P, Heidi Ho, Wingler K, Harald H. H. W. Schmidt. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell. Mol. Life Sci* 2012; 69:2327-2343.
8. Vaquero C E, Edderkaoui M, Pandol S J, Gukovsky I, Gukovskaya A S. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 34643 - 54.
9. Edderkaoui M, Hong P, Eva C. Vaquero C E, Lee K J, Fischer L, Friess H, Buchler M W, Lerch M M, Pandol S J, and Gukovskaya A S. Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G1137-G1147.
10. Edderkaoui M, Nitsche C, Zheng L, Pandol S J, Gukovsky I and Gukovskaya A S. NADPH Oxidase activation in pancreatic cancer cells is mediated through Akt-dependent up-regulation of p22phox. *J Biol Chemistry* 2010; 286(10): 7779-7787.
11. Lee JK, Edderkaoui M, Truong P, Ohno I, Jang KT, Berti A, Pandol SJ, Gukovskaya AS. NADPH oxidase promotes pancreatic cancer cell survival via inhibiting JAK2 dephosphorylation by tyrosine phosphatases. *Gastroenterology* 2007; 133: 1637-48.

12. Mochizuki N, Furuta S, Mitsushita J, Shang WH, Ito M, Yokoo Y, Yamaura M, Ishizone S, Nakayagai J, Konagai A, Hirose K, Kiyosawa K, Kamata T. Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene* 2006; 25: 3699-707.

**EXPRESSION AND ACTIVITY OF NADPH OXIDASE 4 (NOX4) IS RELATED TO ANTIAPOPTOTIC ACTIVITY OF HUMAN PANCREATIC ADENOCARCINOMA CELLS**

**A. Maziukienė, A. Jakštaitė, G. Šilkūnienė, K. Kmieliūtė, A. Gulbinas, Ž. Dambrauskas**

Key words: pancreatic adenocarcinoma, NOX4, ROS, apoptosis.

**Summary**

Pancreatic adenocarcinoma is one of the most aggressive human malignancies with high mortality rates. Low survival rates are due to late diagnosis at advanced stages of the disease. High invasiveness and chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma at least partially could be related to the antiapoptotic activity of intracellular ROS generated by Nox4. There are only few studies

about Nox4 expression in pancreatic cancer, yet Nox4 is believed to be relevant antiapoptotic factor in pancreatic cancer cells.

In this study we have determined the expression of Nox4 in human pancreatic tissue at both protein and mRNA levels. We compared how Nox4 is overexpressed in pancreatic cancer in comparison to human healthy adjacent and healthy donor pancreatic tissue. We have also identified the effect of ROS formation in MiaPaca-2 and Capan-2 cells under treatment with NADPH oxidase inhibitors DPI and apocynin. Our results showed that DPI and apocynin inhibited ROS formation. Moreover, it decreased viability of pancreatic cancer cells and induced apoptosis as well. Result confirms ROS being responsible for antiapoptotic activity of pancreatic cancer cells. These findings point out to NADPH oxidases being a potential therapeutic targets in treatment of cancer.

Correspondence to: aurelija.maziukiene@gmail.com

Gauta 2015-01-21

**KVIEČIAME PRENUMERUOTI “SVEIKATOS MOKSLŲ” ŽURNALĄ 2015 METAIS!**

Žurnalas “Sveikatos mokslai” (Index Copernicus, EBSCO host (Academic Search Complete), Gale (Academic OneFile), ProQuest (Ulrich's, Summon), Australia (ERA) 2012 Journal List (ERA ID 34962) skirtas visų specialybių gydytojams, slaugytojams ir kitiems specialistams, spausdina mokslinius straipsnius lietuvių, anglų ir rusų kalbomis. Reikalavimai straipsniams atitinka mokslo leidiniams keliamus reikalavimus.

**Žurnalas kioskuose neparduodamas.**

**Žurnalą, kuris leidžiamas kartą per du mėnesius, galima užsiprenumeruoti visuose Lietuvos pašto skyriuose, taip pat internetu: [www.post.lt](http://www.post.lt)**

**Prenumeratos kaina nesikeičia: visiems metams – 34,75 EUR (120 Lt), šešiams mėnesiams – 17,37 EUR (60 Lt), keturiems mėnesiams – 11,58 EUR (40 Lt), dviem mėnesiams – 5,79 EUR (20 Lt).**

**Prenumeratos kodas: 5348.**

Žurnalo autoriams straipsnių spausdinimas mokamas.

Redakcija