

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Gintarė Jančiukė

**BIOLOGIŠKAI AKTYVIŲ AUGALINĖS
KILMĖS JUNGINIŲ POVEIKIS
PLYŠINĖMS JUNGTIMS IR NAVIKO
LĄSTELIŲ ONKOGENINĖMS SAVYBĖMS**

Daktaro disertacija
Gamtos mokslai,
biofizika (N 011)

Kaunas, 2026

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinė konsultantė

dr. Ieva Sarapinienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biofizikos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Rasa Banienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Nariai:

dr. Tadas Kraujalis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011);

doc. dr. Vilma Kisnierienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011);

dr. Paulius Ruzgys (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011);

doc. dr. Konstantins Logviss (Rygos Stradinio universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

Disertacija bus ginama viešame biofizikos mokslo krypties tarybos posėdyje 2026 m. rugsėjo 18 d. 11 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto posėdžių salėje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Sukilėlių pr. 15, LT-50162 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Gintarė Jančiukė

**THE IMPACT OF BIOLOGICALLY
ACTIVE SUBSTANCES FROM
PLANTS ON INTERCELLULAR
COMMUNICATION THROUGH GAP
JUNCTIONS AND CANCER CELL
ONCOGENIC PROPERTIES**

Doctoral Dissertation
Natural Sciences,
Biophysics (N 011)

Kaunas, 2026

The dissertation is defended extramurally.

Scientific Advisor

Dr. Ieva Sarapinienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biophysics – N 011).

The dissertation is defended at the Biophysics Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Rasa Baniienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Members:

Dr. Tadas Kraujalis (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biophysics – N 011);

Assoc. Prof. Dr. Vilma Kisnierienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011);

Dr. Paulius Ruzgys (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biophysics – N 011);

Assoc. Prof. Dr. Konstantins Logviss (Riga Stradins University, Medicine and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

Dissertation will be defended at the open session of the Biophysics Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on September 18, 2026, at 11 am in the Conference Hall of the Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių Ave. 15, 50162 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS IR SUTARTINIAI ŽYMĖJIMAI	7
ĮVADAS	9
DARBO TIKSLAS, MOKSLINIS NAUJUMAS.....	11
Darbo tikslas.....	11
Darbo uždaviniai	11
Darbo mokslinis naujumas	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. PJ struktūra, dinamika ir pasiskirstymas organizme	13
1.2. Cx43 PJ funkcija ir svarba.....	15
1.3. Cx45 PJ funkcija ir svarba.....	18
1.4. PJTR vaidmuo onkogenezeje	19
1.5. PJTR reguliacija	20
1.6. Augalinės kilmės PJTR moduliatorių paieška.....	24
2. TYRIMŲ METODAI.....	28
2.1. Ląstelių linijos ir auginimo sąlygos.....	28
2.2. NEO paruošimas.....	28
2.3. Spe ir ArE paruošimas.....	29
2.4. Kiekybinė resveratrolio analizė Spe UESC metodu.....	30
2.5. Molekulinis modeliavimas	31
2.6. Elektrofiziologiniai matavimai.....	31
2.7. Tėkmės citometrija	32
2.8. Ląstelių kolonijų formavimo testas	32
2.9. Imunoblotingas	33
2.10. Imunocitochemija.....	33
2.11. Gyvų ląstelių vaizdinimas	34
2.12. LY dažo sklidimo metodas	34
2.13. Statistinė duomenų analizė.....	35
3. REZULTATAI.....	36
3.1. NEO poveikio tyrimai	36
3.1.1. NEO poveikis Cx43 ir Cx45 PJTR.....	36
3.1.2. NEO poveikis Novikoff ląstelių gyvybingumui.....	38
3.2. Spe ir ArE poveikio tyrimai	41
3.2.1. Spe ir ArE poveikis kolorektalinio naviko ląstelių gyvybingumui ir PJTR....	41
3.2.2. Spe ir ArE tiesioginis poveikis Cx43 ir Cx45 PJ laidumui.....	45
3.2.3. Spe poveikis HeLa ląstelių egzogeninių Cx43 ir Cx45 baltymų ekspresijai, PJP dydžiui ir ląstelių gyvybingumui.....	46
3.2.4. Spe sudedamųjų dalių tyrimai.....	49
3.3. Resveratrolio įtaka PJTR ir ląstelių gyvybingumui	51
3.3.1. Resveratrolio poveikis Cx43 ir Cx45 plyšinių jungčių laidumui	51
3.3.2. Resveratrolio molekulinio dokimo vietos Cx43 ir Cx45 baltymuose	53
3.3.3. Resveratrolio poveikis Cx43 ir Cx45 ekspresijai ir PJP dydžiui.....	56
3.3.4. Resveratrolio poveikis ERK1/2 aktyvumui ir HeLa ląstelių gyvybingumui....	62

3.3.5. Resveratrolio įtaka ląstelių citoskeletui ir PJ degradacijai	65
3.3.6. Įjautrinantis ir apsaugantis resveratrolio poveikiai H ₂ O ₂ sukeltam stresui HeLa ląstelėse	70
3.3.7. Resveratrolio poveikis HCT116 ir DLD-1 PJ laidumui, ekspresijai ir gyvybingumui	72
4. APTARIMAS	77
IŠVADOS	84
SUMMARY	85
BIBLIOGRAFIJA	105
MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS	120
CURRICULUM VITAE	122
PADĖKA	123

SANTRUMPOS IR SUTARTINIAI ŽYMĖJIMAI

[Ca²⁺]_i	– viduląstelinė kalcio jonų koncentracija
7-AAD	– 7-aminoaktinomicinas D
Akt	– baltymų kinazė B
ArE	– juodųjų aronijų išspaudų ekstraktas
CAMKII	– nuo Ca ²⁺ /Kalmodulino priklausoma kinazė II
CDK5	– nuo ciklino priklausoma kinazė 5
CK1	– kazeino kinazė 1
Cx	– koneksinas (angl. <i>connexin</i>)
EGFP	– sustiprintos fluorescencijos žaliai fluorescuojantis baltymas (angl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ERK1/2	– ekstraląstelinio signalo reguliuojamos kinazės 1 ir 2 (angl. <i>extracellular signal regulated kinases 1 and 2</i>)
GAPDH	– gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazė
g_j	– plyšinių jungčių elektrinis laidumas
HeLa	– žmogaus gimdos kaklelio naviko ląstelės
MAPK	– mitogenų aktyvuota baltymų kinazė (angl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
NEO	– muskato eterinis aliejus (angl. <i>nutmeg essential oil</i>)
_pg_j	– pradinis plyšinių jungčių elektrinis laidumas
PI3K	– fosfatidilinozitolio 3-kinazė
PJ	– plyšinė jungtis
PJP	– plyšinių jungčių plokštelė
PJTR	– plyšinių jungčių tarpląstelinis ryšys
PKA	– baltymų kinazė A
PKC	– baltymų kinazė C
PKG	– baltymų kinazė G
PMSF	– fenilmetilsulfonilfluoridas (angl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PVDF	– poliviniliden difluoridas
ROS	– reaktyviosios deguonies formos (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
Rsv	– resveratrolis
SpE	– spanguolių išspaudų ekstraktas
SUMO	– mažas, į ubiquitiną panašus baltymas (angl. <i>small ubiquitin-like modifier</i>)
TM	– koneksiną sudarantys transmembraniniai domenai (angl. <i>transmembrane domains</i>)

- UESC** – ultraefektyvioji skysčių chromatografija
- v-Src** – nerecepterinė tirozino kinazė
- ZO-1** – viduląsteliniai sukabinimo baltymai 1 (angl. *zonula occludens-1*)
- žPJ** – žiedinės plyšinės jungtys (angl. *annular gap junctions*).

IVADAS

Pastaraisiais dešimtmečiais natūralių biologiškai aktyvių junginių tyrimai tapo svarbia biomedicininio tyrimų kryptimi, nes vis labiau pabrėžiamas jų terapinis potencialas ir reikšmė žmogaus sveikatai. Augalų ekstraktuose gausu įvairių biologiškai aktyvių junginių, tokių kaip polifenoliai, flavonoidai, taninai, terpenoidai, fenolinės rūgštys, saponinai, alkaloidai ir polisacharidai. Šiems natūraliems ekstraktams būdinga didelė struktūrinė įvairovė bei sudėtingi veikimo mechanizmai, o daugelis jų pasižymi antioksidacinėmis, širdies ir nervų sistemą apsaugančiomis funkcijomis, chemoprevecinėmis ir priešnavikinėmis savybėmis [1]. Natūraliems junginiams būdingas mažesnis citotoksiškumas ir juos geriau toleruoja normalios ląstelės, todėl jie laikomi perspektyviais kandidatais tiek fundamentiniuose, tiek taikomuosiuose biomedicininuose tyrimuose [2]. Atsižvelgiant į tarpląstelinio ryšio svarbą šiuose fiziologiniuose procesuose, šiame darbe ypatingas dėmesys yra skiriamas natūralių ekstraktų ir juose dažnai sutinkamo komponento resveratolio poveikio plyšinėms jungtims (PJ), sudarytoms iš koneksinų (Cx), tyrimams, nes jos užtikrina tiesioginį elektrinių, metabolinių ir genetinių signalų perdavimą ir yra svarbios palaikant normalią organų funkciją bei vystymąsi [3,4]. Sutrikęs tarpląstelinis ryšys per PJ (PJTR) gali lemti širdies ir kraujagyslių bei neurologinių ligų progresavimą ir navikų vystymąsi [5–7]. Vienas labiausiai ištirtų koneksinų yra Cx43, o tai glaudžiai susiję su jo plačiu paplitimu žmogaus organizme. Šis baltymas aptinkamas daugumoje audinių, įskaitant širdį, odą, smegenis, kepenis, inkstus ir kitus [8]. Širdies laidžiojoje sistemoje bei centrinėje nervų sistemoje taip pat aptinkamas Cx45 [9,10]. Tyrimai su Cx45 yra riboti, nes gyvūnai su išveiklintu genu dažniausiai neišgyvena iki gimimo – jie žūsta embriono stadijoje [11]. Nors apie natūralių ekstraktų bei jų sudėtinių dalių poveikį Cx43 ekspresijai yra duomenų [12], jų tiesioginis poveikis Cx43 PJ elektriniam laidumui ir pralaidumui įvairioms medžiagoms nėra pakankamai ištirtas. Šiuo metu literatūroje yra nedaug tiesioginių tyrimų, nagrinėjančių bioaktyvių junginių poveikį tarpląsteliniam ryšiui per Cx45 PJ, tačiau yra parodyta, kad natūralūs ekstraktai [13], gali turėti teigiamą poveikį širdies ir kraujagyslių bei galvos smegenų kraujotakos sistemoms, kuriose Cx45 atlieka svarbų vaidmenį.

Natūralūs ekstraktai yra sudaryti iš daugelio biologiškai aktyvių junginių, kurie gali veikti sinergiškai ir moduluoti PJ funkciją per kelis signalinius kelius vienu metu. Kuriant tikslingas įvairių ligų terapines strategijas svarbu nustatyti, kurios medžiagos pasižymi didžiausiu potencialu reguliuojant PJTR ir kitus ląstelėje vykstančius procesus. Bioaktyvių junginių poveikio Cx43 ir Cx45 funkcijų reguliavimo mechanizmams tyrimai yra svarbūs, siekiant

identifikuoti naujus potencialius PJ modulatorius, kartu įvertinant jų selektyvumą skirtingiems koneksinams ir galimą poveikį ląstelių gyvybingumui bei kitoms funkcijoms. Šiuo tikslu mes pirmą kartą atlikome palyginamąjį biologiškai aktyvių augalinės kilmės junginių (muskato eterinio aliejaus (NEO) bei spanguolių (SpE) ir aronijų (ArE) išspaudų ekstraktų) ir resveratrolio poveikio Cx43 ir Cx45 PJ tarpląstelinio ryšio savybėms tyrimą.

DARBO TIKSLAS, MOKSLINIS NAUJUMAS

Darbo tikslas

Nustatyti biologiškai aktyvių augalinės kilmės junginių poveikį Cx43 ir Cx45 plyšinių jungčių savybėms bei naviko ląstelių gyvybingumui.

Darbo uždaviniai

1. Įvertinti muskato eterinio aliejaus poveikį Novikoff ląstelių onkogeniškumui ir endogeninio Cx43 metabolinei komunikacijai ir palyginti jo poveikį Cx43 ir Cx45 plyšinių jungčių laidumui.
2. Ištirti spanguolių ir aronijų išspaudų ekstraktų sukeltus pokyčius koloirektalinio naviko (HCT116 ir DLD-1) ląstelių Cx43 plyšinių jungčių laidumui ir onkogeniškumui.
3. Įvertinti spanguolių išspaudų ekstrakto poveikį HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 plyšinių jungčių savybėms ir gyvybingumui.
4. Nustatyti resveratolio poveikį HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 plyšinių jungčių savybėms ir onkogeniškumui.
5. Nustatyti resveratolio poveikį HCT116 ir DLD-1 ląstelių plyšinių jungčių savybėms ir onkogeniškumui.

Darbo mokslinis naujumas

Šiame darbe pirmą kartą atliktas kelių biologiškai aktyvių augalinės kilmės junginių poveikio PJ, suformuotų iš Cx43 ir Cx45, savybėms palyginamasis tyrimas. Nustatyta, kad NEO slopina tiek Cx43, tiek Cx45 PJ laidumą. Pirmą kartą parodėme, jog SpE ir ArE pasižymi selektyviu, nuo koneksino tipo priklausančiu poveikiu: SpE stimuliuoja Cx45, bet neveikia Cx43, o ArE slopina Cx43, tačiau neveikia Cx45 PJ laidumo. Siekdami įvertinti PJTR įtaką navikiniam potencialui, tyrėme minėtų ekstraktų poveikį skirtingų tipų navikinių ląstelių gyvybingumui ir onkogeniškumui.

Išsamiau ištyrus vieną iš SpE biologiškai aktyvių komponentų – resveratrolį, nustatyta, kad jis slopina Cx43 PJ laidumą, o Cx45 PJ laidumui turėjo dvilypį poveikį – priklauso nuo koncentracijos pasireiškė tiek slopinantis, tiek stimuliuojantis resveratolio poveikis. Pasitelkus molekulinio modeliavimo metodą buvo išnagrinėtos priežastys, galėjusios lemti šį dvilypį resveratolio poveikį. Nustatėme, kad resveratrolis HeLa ląstelėse sukelia nuo laiko, koncentracijos ir koneksino tipo priklausančius pokyčius: didina koneksinų ekspresiją ir PJ plokštelių (PJP) dydį, aktyvina ERK1/2 signalinį kelią bei skatina Cx43 fosforilinimą, o tai siejasi su sumažėjusiu ląstelių gyvybingumu.

ir proliferacija. Ląstelės, ekspresuojančios Cx43 ar Cx45, buvo jautresnės resveratrolio poveikiui, nei laukinio tipo HeLa ląstelės.

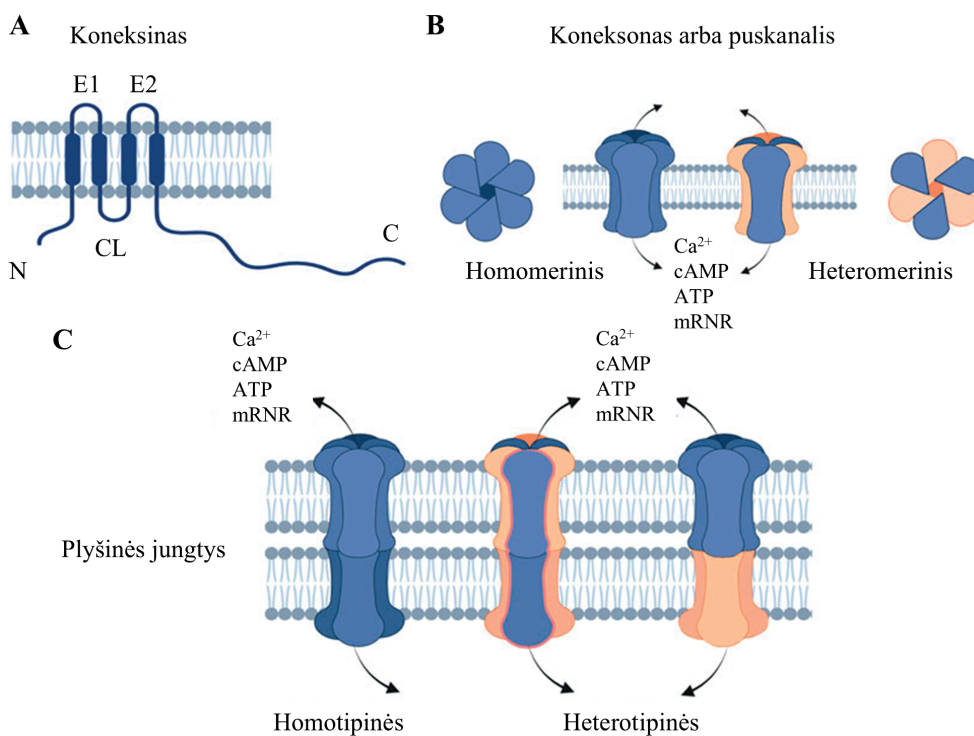
Svarbus šio darbo naujumo aspektas yra tai, kad biologiškai aktyvių augalinės kilmės junginių poveikis buvo vertinamas tiesioginiais elektrofiziologiniais matavimais, taikant dvigubą visos ląstelės fiksuotos įtampos metodą, leidžiantį kiekybiškai įvertinti PJ laidumo pokyčius, skirtingai nei dažniausiai literatūroje naudojami netiesioginiai molekuliniai metodai. Gauti rezultatai atskleidžia augalinės kilmės junginių, ypač resveratrolio, kaip selektyvių PJTR moduliatorių, potencialą ir sudaro pagrindą jų taikymui fundamentiniuose bei klinikiniuose tyrimuose, siekiant tikslingai reguliuoti ląstelių tarpusavio sąveiką.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. PJ struktūra, dinamika ir pasiskirstymas organizme

Tiesioginį elektrinį, metabolinį ir net genetinį tarpląstelinį ryšį užtikrina PJ, sudarytos iš koneksinų, kurių skirtingas izoformas ekspresuoja beveik visi organizmo audiniai. Koneksinų struktūrinės ir funkcinės savybės tiesiogiai lemia PJTR efektyvumą ir reguliaciją. PJTR leidžia tiesiogiai koordinuoti ląstelių veiklą audiniuose, o tai ypač svarbu širdies, smegenų, imuninės sistemos funkcijoms ir navikiniams procesams [14].

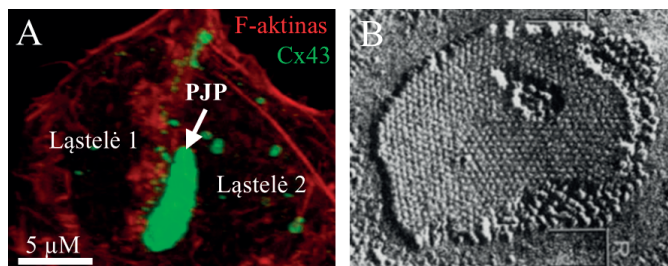
Koneksinų baltymai sudaro heksamerines struktūras, vadinamas koneksonais arba puskanalais. Koneksinai turi keturis membraną kertančius transmembraninius domenų (TM), dvi tarpląstelines kilpas (E), vieną viduląstelinę kilpą (CL) bei viduląstelinius N ir C galus (1 pav.) [15].



1 pav. Koneksino baltymo (A) ir puskanalių (B) bei plyšinių jungčių (C) struktūros

Adaptuota pagal Suheda Yasarbas ir kt. [16]

Koneksinų sintezė prasideda endoplazminiame tinkle (ER), o vėliau jie migruoja per Goldžio aparatą, kur jie oligomerizuojasi, sudarydami puskanalius. Puskanaliai gali būti homomeriniai, sudaryti iš identišκών koneksinų subvienetų, arba heteromeriniai, sudaryti iš skirtingų koneksinų subvienetų. Vėliau puskanaliai yra vezikulėmis transportuojami į ląstelės paviršių, kur jie gali veikti savarankiškai arba jungtis su kitų ląstelių puskanaliais ir formuoti PJ tarp ląstelių. PJ gali būti homotipinės, kai tarp dviejų sąveikaujančių ląstelių susijungia du identišķi puskanaliai, arba heterotipinės, kai susijungia du skirtingi puskanaliai (1C pav.). Tankios šimtų ar tūkstančių atskirų kanalų sankaupos sudaro labai organizuotas struktūras – PJP (2 pav.).



2 pav. Plyšinių jungčių plokštelės (PJP)

Cx43 PJP trimatis vaizdas HeLa Cx43 ląstelėse (A). Elektroninės mikroskopijos Cx PJP vaizdas (B), adaptuota pagal McNutt and Weinstein [17]

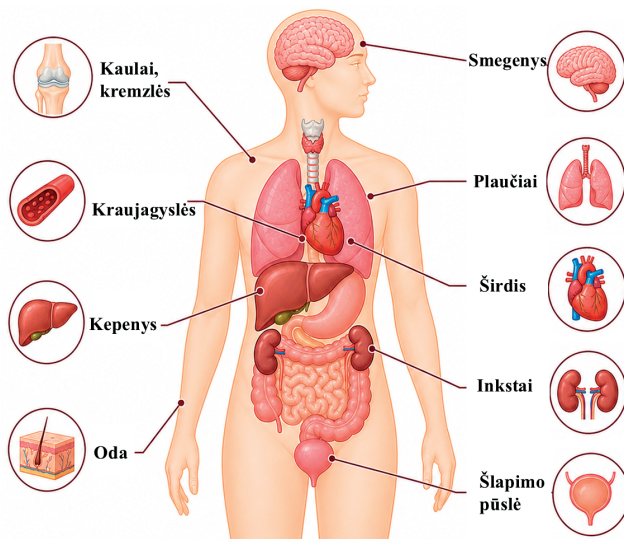
PJ gali būti internalizuojamos į ląstelę, kaip dvigubos membranos struktūros, vadinamos žiedinėmis PJ (žPJ). Viduje žPJ yra nukreipiamos į lizosomas ar proteasomas, kur koneksinų baltymai yra skaidomi ir degraduojami [18]. Daugumos PJ gyvavimo trukmė yra labai trumpa (apie 1,5–5 val.), todėl PJP nuolat formuojamos ir degraduojamos, taip leidžiant greitai moduluoti PJTR [19].

Pelėse žinoma 20 koneksinų tipų, o žmonėse 21, jie klasifikuojami pagal molekulinę masę ir pasiskirstymą audiniuose, pvz., Cx43 yra ~43 kDa baltymas. Reikia pažymėti, kad Cx43, Cx26 ir Cx32 yra trys plačiausiai paplitusios koneksino izoformos, randamos daugelyje žmogaus organų, o Cx43 yra labiausiai ištirtas [20]. Akies lęšyje daugiausia randami Cx23, Cx46, Cx50 ir Cx59, jie svarbūs akies lęšio skaidrumui ir funkcijos palaikymui, tuo tarpu tinklainėje randami Cx36, Cx57 ir Cx62. Odoje ekspresuojami Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx40, Cx43 ir Cx45, jie palaiko PJTR epidermyje. Smegenyse aptinkami Cx29, Cx30, Cx31.9, Cx39, Cx32, Cx37 ir Cx45, jie svarbūs centrinės nervų sistemos veiklai. Širdyje vyrauja Cx40, Cx43 ir Cx45, kurie yra esminiai elektrinio impulso sklidimui miokarde. Kraujagyslėse aptinkami Cx37 ir Cx47, o kvėpavimo sistemoje – Cx25 ir Cx31.1. Kepenys ekspresuoja Cx26, Cx30, Cx31.9 ir Cx32, sėklidės – Cx30.2 ir Cx33, o

kauluose randami Cx33 ir Cx43. Toks įvairialypis koneksinų pasiskirstymas pabrėžia jų funkcijų specifiskumą skirtinguose organuose ir audiniuose [21].

1.2. Cx43 PJ funkcija ir svarba

Cx43 PJ yra geriausiai ištirtos, jos būtinos audinių homeostazės koordinavimui normaliuose organuose ir yra susijusios su naviko vystymusi, progresavimu bei atsaku į gydymą [22]. Pagrindiniai žmogaus organai, kurie ekspresuoja Cx43 yra smegenys, plaučiai, širdis, inkstai, šlapimo pūslė, oda, kepenys, kraujagyslės ir kaulai (3 pav.) [23].



3 pav. Pagrindiniai žmogaus organai, ekspresuojantys Cx43

Cx43 yra gausiai ekspresuojamas širdyje, kur daugiausia lokalizuojasi darbiname miokarde ir atlieka esminį vaidmenį perduodant elektrinius signalus [24]. Žmogaus Cx43 turi 33 galimas fosforilinimo vietas C gale, kurios nulemia PJ laidumo, pralaidumo ir ekspresijos pokyčius. Fosforilinimas yra vienas iš svarbiausių fiziologinės būsenos audiniuose reguliavimo mechanizmų, o jo pokyčiai stebimi įvairių ligų atvejais [25,26]. Sveikoje širdyje Cx43 daugiausia randamas galais susijungusių kardiomiocitų įterptiniuose diskuose (angl. *intercalated discs*), kur fosforilinamos S365, S325, S328 ir S330 liekanos skatina PJ laidumo pokyčius ir signalo perdavimą. Po miokardo infarkto padidėjęs viduląstelinis Ca^{2+} sukelia S365 defosforilinimą. Tai sumažina tarpląstelinį ryšį ir perskirsto Cx43 į šonines ląstelių sritis, taip sutrikdant širdies signalų perdavimą ir prisidedant prie aritmijų. Didelių PJ plokštelių susidarymas įterptiniuose diskuose priklauso nuo Cx43 sąveikos su viduląs-

teliniu sukibimo baltymu ZO-1, o šią sąveiką reguliuoja baltymų kinazės C (PKC) sukeltas Cx43 S368 fosforilinimas. Šis fosforilinimas slopina ZO-1 sukeltą PJ išsiardymą ir gali padėti stabilizuoti Cx43 išeminės širdies ligos atveju [26,27].

Kraujagyslių sistemoje Cx43 randamas endotelio ląstelėse, kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelėse ir pericituose. Cx43 koordinuoja endotelio ir lygiųjų raumenų tarpusavio sąveiką bei kraujagyslių tonusą, o jo ekspresija yra reguliuojama skirtinguose kraujagyslių tipuose. Nustatyta, kad kraujagyslių ligų metu koneksinų fosforilinimas moduliuoja jų sąveiką su baltymais, tokiais kaip ZO-1, ir taip reguliuoja tarpląstelinį ryšį bei ligos būklę. Oksiduoti fosfolipidai, randami aterosklerozinėse plokštelėse, didina Cx43 fosforilinimą, kurį reguliuoja mitogenų aktyvuota baltymų kinazė (MAPK) ir PKC, o šis procesas siejamas su padidėjusiu uždegimu ir ląstelių proliferacija [28].

Cx43 taip pat randamas kauliniame audinyje. Cx43 yra pagrindinis koneksinas osteocituose, osteoblastuose ir osteoklastuose, kauluose ir kremzlėje. Normaliame kauliniame audinyje Cx43 PJ ir puskanaliai tarpininkauja mechaninių signalų perdavime, reguliuoja genų ekspresiją ir saugo nuo osteoporozės bei su amžiumi susijusio kaulų retėjimo [29].

Odoje Cx43 ekspresuoja keratinocitai, fibroblastai, melanocitai, endotelio, dermos papilės ir bazinės ląstelės. Cx43 ekspresija odoje yra reguliuojama ir būtina normaliam audinių vystymuisi bei efektyviam žaizdų gijimui. Fosforilinimas gali vaidinti svarbų vaidmenį žaizdos gijimo procese, koordinuojant tarpląstelinį ryšį ir koneksinų persikirstymą. Cx43 fosforilinimas kinta dinamiškai žaizdos gijimo metu. Netrukus po sužalojimo baltymų kinazės B (Akt) sukeltas S373 fosforilinimas sutrikdo Cx43 ir ZO-1 jungimąsi, laikinai stabilizuodamas Cx43 membranoje prieš jo internalizaciją. Vėliau PKC sąlygotas S368 fosforilinimas (24–72 val.) netoli žaizdos slopina PJTR. Kartu šie nuoseklūs fosforilinimo procesai reguliuoja signalo perdavimą per PJ žaizdos gijimo metu [27,30].

Plazminėje membranoje esantys iš Cx43 sudaryti puskanaliai formuoja tarpląstelinius kanalus, kurie itin svarbūs širdies ir kraujagyslių bei nervų sistemose, tačiau taip pat Cx43 randamas ir ląstelės branduolyje [31], mitochondrijose [32], ekstraląstelinėse vezikulėse [33] ir tuneliniuose nanovamzdeliuose [34]. Branduolyje esantis Cx43 dalyvauja genų transkripcijos reguliacijoje, citoskeleto formavime, ląstelių migracijoje ir adhezijoje. Cx43 mitochondrijose yra susijęs su mitochondrinio kvėpavimo funkcijomis, o ekstraląstelinėse vezikulėse ir tuneliniuose nanovamzdeliuose – dalyvauja tarpląstelinės informacijos apykaitoje. Tyrimai parodė, kad Cx43 puskanaliai lokalizuojasi vidinėje mitochondrijų membranoje ir dalyvauja K^+ jonų pernašoje, o Cx43 slopinimas mažina K^+ patekimą į mitochondrijas bei silpnina mitochondrinį kvėpavimą ir ATP gamybą. Mitochondrinis Cx43 taip pat

susijęs su reaktyviųjų deguonies formų (ROS) gamyba ir streso aktyvuotos baltymų kinazės (p38)/MAPK signaliniu keliu, sudarydamas teigiamo grįžtamojo ryšio reguliacinę sistemą. Mitochondrinis Cx43 atlieka reikšmingą apsauginį vaidmenį širdies ląstelėse, esant hipoksijai ir išemijai, sąveikauja su mitochondriniais ATP jautriais kalio kanalais (mKATP), reguliuoja jonų (K^+ , H^+) ir ATP pernašą bei prisideda prie oksidacinio streso kontrolės. Ši mitochondrijų Cx43-ROS oksidacinio streso sąveika gali būti svarbi įvairių ligų patogenezėje [35,36].

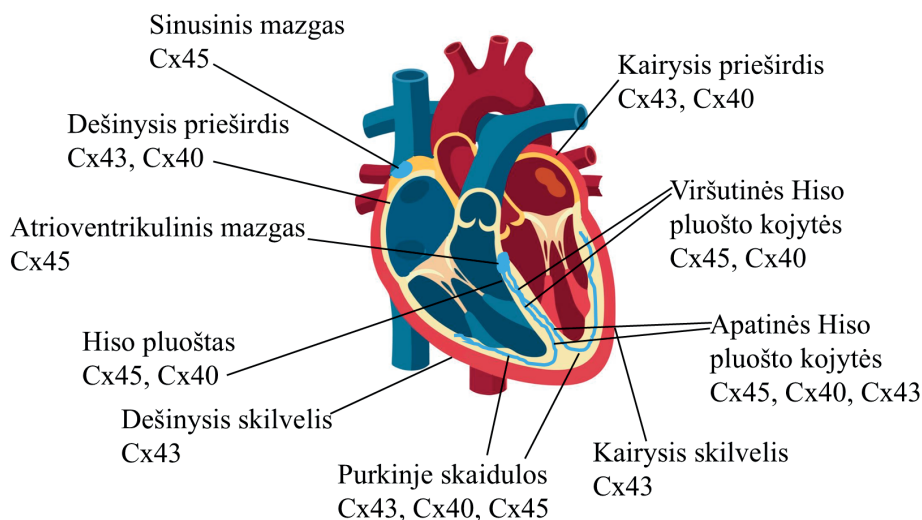
Cx43 ekstraląstelinėse vezikulėse gali dalyvauti navikinių ląstelių metastazavime. Nustatyta, kad Cx43 yra gausiai ekspresuojamas smegenų metastazėse, o sveikame smegenų audinyje jo ekspresija yra normali, tuo tarpu kasos navikuose – sumažėjusi. Šie duomenys patvirtina ryšį tarp Cx43 ir navikų. Ekstraląstelinės vezikulės ir ypač egzomosos gali turėti terapinį potencialą, nes gali pernešti bioaktyvias molekules į ląsteles-taikinius. Cx43 aptikimas egzomosose rodo, kad jis gali tarpininkauti egzosomų ir ląstelių-taikinių sąveikai per PJ, todėl gali tapti perspektyviu terapiniu taikiniu [37].

Cx43 taip pat dalyvauja tarpląstelinėje komunikacijoje per tunelinius nanovamzdelius, kurie leidžia ląstelėms keistis ne tik mažomis molekulėmis, bet ir organelėmis, tokiomis, kaip mitochondrijos, virusai ir net mikroRNR [4,34].

Naviko atveju Cx43 vaidmuo yra dviprasmiškas ir labai priklausomas nuo biologinio konteksto. Daugelyje pirminių navikų Cx43 ekspresijos sumažėjimas arba pasikeitusi lokalizacija sutrikdo tarpląstelinį ryšį per PJ, ir dėl to ląstelės pradeda nekontroliuojamai daugintis [38]. Pažengusiuose navikuose Cx43 gali paskatinti epitelinę-mezenchiminę tranziciją, ląstelių migraciją, invazyvumą, kamieniskumą ir metastazavimą glioblastomos, prostatos, krūties ir kitų navikų atvejais [22]. Šiuose procesuose svarbų vaidmenį atlieka Cx43 C galo fosforilinimas ir baltymų kinazės A (PKA)/MAPK/fosfatidilinozitolio 3-kinazės (PI3K) signaliniai keliai. Fosforilinimas taip pat vaidina svarbų vaidmenį koneksinų lokalizacijai ir funkcijai naviko atveju. Keletas onkogenų ir protoonkogenų (GTPazė HRAS ir nereceptorinė tirozino kinazė (c-Src)) stipriai slopina tarpląstelinį ryšį. Navikų promotoriai, tokie kaip forbolio esteriai, taip pat slopina Cx43 tarpląstelinį ryšį per PKC ir ekstraląstelinio signalo reguliuojamos kinazės 1 ir 2 (ERK1/2) kelius. Sumažėjusi Cx43 ekspresija ir jo fosforilinimas (S368, S279/282) stebimas kasos navikuose, o tai koreliuoja su prasta ligos prognoze. Tikslingas koneksinų fosforilinimo slopinimas, pvz., naudojant gefitinibą Src ir PKC slopinimui, gali atkurti tarpląstelinį ryšį, o Src sukeltas Cx43 fosforilinimas gali prisidėti prie naviko atsparumo chemoterapijai [20,25].

1.3. Cx45 PJ funkcija ir svarba

Cx45 yra ribotos ekspresijos, tačiau labai svarbus koneksinas, atliekantis esminį vaidmenį vystymosi procesuose [39], širdies [40], kraujagyslių fiziologijoje [41], inkstų funkcijoje [42] ir kai kuriuose nervų sistemos [43] bei regos vystymosi aspektuose [44]. Cx45 reikšmė dažnai tampa akivaizdi tuomet, kai jo ekspresija yra sutrikusi. Cx45 yra vienas ankstyviausiai embrioninio vystymosi metu ekspresuojamų koneksinų, jis pasireiškia, kai prasideda pirmieji širdies susitraukimai, todėl Cx45 yra būdingas visoms susiformavusios širdies laidžiosios sistemos dalims, priešingai, nei Cx43, kuris dominuoja darbiname miokarde [39] (4 pav.). Cx45 funkcijos vis dar nėra iki galo ištirtos, o jo tyrimus apsunkina tai, kad visiškas GJC1 (Cx45) geno išveiklinimas sustabdo vystymąsi.



4 pav. Cx40, Cx43 ir Cx45 pasiskirstymas širdyje

Centrinėje nervų sistemoje Cx45 ekspresija yra didžiausia embriono ir po-gimdyminiu laikotarpiu, tačiau vėliau sumažėja ir išlieka tik tam tikrose smegenų srityse, kaip talamas, hipokampo CA3 sritis ir smegenėlės. Suaugusiųjų smegenyse Cx45 aptinkamas piramidiniuose neuronuose, kurie dalyvauja elektriniame tarpląsteliniam ryšyje [45].

Limfinės sistemos endotelio Cx45 yra būtinas tinkamai limfinės sistemos morfologijai palaikyti [46]. Kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelėse Cx45 palaiko kalcio sklaidimą, renino sekreciją ir kraujospūdžio reguliavimą. Cx45 geno delecija inkstų jukstaklomerulinėse ląstelėse pelėms lemia padidėjusią renino koncentraciją ir padidėjusį sisteminį kraujospūdį [47].

Išsamūs tyrimai nustatė daug kinazių, fosforilinančių Cx43 [48]. Duomenų apie Cx45 fosforilinimą yra gerokai mažiau, tačiau esami tyrimai rodo, kad kinazės skirtingai veikia Cx43 ir Cx45. Pavyzdžiui, PKA didina Cx43 PJ laidumą, tačiau mažina Cx45 PJ laidumą. Panašiai PKC aktyvinimas, naudojant forbolio 12-miristato 13-acetata (PMA), mažina Cx43 PJ laidumą, o Cx45 atveju gauti prieštaringi rezultatai, tiek laidumo padidėjimas, tiek sumažėjimas. Be to, fosforilinimas mažina vienetinio Cx43 kanalo laidumą, tačiau neturi reikšmingo poveikio Cx45. Šie duomenys pabrėžia, kad koneksinų reguliacija kinazių pagalba yra specifinė koneksino tipui [49]. Cx45 C galas gali sąveikauti su specifiniais baltymais, kurie gali lemti jo lokalizaciją, stabilumą, fosforilinimą ir PJ funkciją. Tai patvirtina, jog skirtingai nei Cx43, Cx45 turi unikalų sąveikų profilį, todėl jo biologinis reguliavimas ir funkcija negali būti tiesiogiai tapatinami su kitų koneksinų modeliais [50]. Viename iš naujausių tyrimų teigiama, kad Cx45 reguliacija yra izoformai specifinė ir negali būti vertinama remiantis vien Cx43 modeliais [49]. Širdies nepakankamumo metu pakinta koneksinų balansas, mažėja Cx43, todėl Cx45 santykinė reikšmė padidėja. Tai keičia elektrinio impulso sklaidimą, laidumo greitį bei padidina aritmijų riziką. Cx45 formuoja mažesnio laidumo kanalus nei Cx43, todėl padidėjusi Cx45 ekspresija širdyje gali lėtinti elektrinį signalą, o tai savo ruožtu iššaukia tarpląstelinio ryšio susilpnėjimą, gali iššaukti aritmijas ir keičia bendrą širdies fiziologiją. Autoriai pabrėžia, kad ne tik Cx43 sumažėjimas, bet ir Cx45 santykinis padidėjimas gali būti kritinis veiksnys patologijoje [51,52].

Skirtingai nei Cx43, Cx45 sąveika su kitais baltymais iki šiol yra ištirta tik fragmentiškai. Yra duomenų apie Cx45 sąveiką su ZO-1 baltymu, jungiančiu koneksinus su citoskeletu [53,54], bei apie galimą ryšį su aktinu ir tubulynu [49], tačiau dauguma molekulinų sąveikų, lemiančių Cx45 lokalizaciją ir funkciją, vis dar lieka neaiškios.

1.4. PJTR vaidmuo onkogenezeje

Vienu iš pagrindinių mechanizmų, užtikrinančių audinių funkcijų palaikymą, laikomas PJTR. Per pastaruosius dešimtmečius daugybė mokslinių tyrimų parodė, kad PJ yra būtinos metaboliniam ir elektriniam tarpląsteliniam ryšiui užtikrinti visuose gyvybiškai svarbiuose organuose. Tai yra pagrindinis mechanizmas, leidžiantis tiesiogiai perduoti jonus, mažas signalines molekules ir metabolitus tarp gretimų ląstelių.

PJ ir jas sudarantys koneksinai atlieka sudėtingą vaidmenį naviko biologijoje. PJTR praradimas arba sutrikimas yra būdingas daugeliui navikų ir prisideda prie nekontroliuojamos proliferacijos, diferenciacijos praradimo, invazyvumo ir metastazių vystymosi. Koneksinų ekspresijos ir PJTR atkū-

rimas navikinėse ląstelėse gali slopinti jų dalijimąsi, bet skatina jų metastazavimą. PJ praradimas laikomas vienu iš mechanizmų, kuris prisideda prie ankstyvosios naviko vystymosi fazės, nes trūksta tiesioginės ląstelių tarpusavio signalizacijos, kuri fiziologinėse sąlygose riboja netinkamą ląstelių dalijimąsi. Nors tradiciškai PJTR yra siejamas su naviką slopinančiu poveikiu ankstyvose stadijose, vėlesniuose etapuose Cx43 [55], Cx26 [56] ir Cx32 [57] gali skatinti navikinių ląstelių migraciją, padėti sąveikauti su endotelium ar palaikyti naviko kamieninių ląstelių fenotipą. PJTR taip pat yra svarbus imuninio atsako moduliacijai prieš naviką – funkcionalios PJ leidžia perduoti signalus tarp imuninės ląstelės ir navikinės ląstelės, prisidedant prie efektyvesnio priešnavikinio atsako. Navikinės ląstelės, turinčios silpną PJTR, gali lengviau išlikti imuninės sistemos aplinkoje. Remiantis šiais mechanizmais, PJ nagrinėjamos, kaip potencialus terapinis taikynys. PJTR atkūrimas arba stimuliavimas ankstyvose naviko stadijose gali sustabdyti navikinių ląstelių dalijimąsi, pagerinti jautrumą chemoterapijai ar net sustiprinti radioterapijos poveikį [22,38,58].

1.5. PJTR reguliacija

PJ laidumas yra reguliuojamas procesas, o jo valdymą užtikrina sudėtinga tarpusavyje sąveikaujančių mechanizmų sistema, apimanti jautrumą įtampai, koneksinų potransliacines modifikacijas (ypač fosforilinimą), viduląstelių Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonų koncentraciją, viduląstelinį pH ir PJ slopiklius [23].

PJ kanalų atsidarymą reguliuoja jautrumas transmembraninei įtampai (V_m), kuri atspindi potencialų skirtumą tarp ląstelės vidaus ir išorės, bei jautrumas jungties įtampai (V_j), kuri nusako potencialų skirtumą tarp dviejų tarpusavyje sujungtų ląstelių citoplazmų. Laidumo priklausomybė nuo V_j yra viena svarbiausių PJ kanalų savybių. Kiekviename kanale veikia du įtampai jautrūs vartų mechanizmai: greitieji vartai, kurie riboja laidumą iki liekamosios būsenos, ir lėtieji vartai, galintys visiškai uždaryti PJ kanalą. PJ greitąjį varstymąsi ir jautrumą įtampos poliškumui lemia N-galo aminorūgščių liekanos. Skirtingų koneksinų kanalai užsidaro esant skirtingos krypties įtampai: pavyzdžiui, Cx26, Cx30 ir Cx50 jautrūs teigiamai, o Cx43, Cx45 ir Cx40 jautrūs neigiamai įtampai, tuo tarpu Cx46 gali užsidaryti abiem atvejais. Koneksinų jautrumas V_j labai skiriasi, Cx45 kanalai užsidaro, esant žymiai mažesnei V_j , negu Cx43. Kai kurios PJ yra jautrios ir V_m , tačiau šis jautrumas gali priklausyti nuo ląstelės tipo [59,60].

Viduląstelinis pH (pH_i) yra vienas esminių veiksnų, užtikrinančių ląstelės homeostazę, o jo svyravimai reikšmingai veikia PJ laidumą tiek normaliomis, tiek pataloginėmis sąlygomis. Daugumos koneksinų PJ laidumas sumažėja, kai citoplazminė terpė rūgštėja, tačiau šio poveikio stiprumas skiriasi priklaus-

somai nuo ląstelės tipo ir konkrečios koneksino izoformos. Eksperimentiniai tyrimai ląstelių kultūrose parodė, kad pH_i didinimas skatina Cx30.2 ir Cx45 kanalų laidumą, tačiau slopina Cx43 ir Cx36, o kai kurių kitų koneksinų veiklai reikšmingos įtakos neturi. Cx45 išsiskiria tuo, kad jo jautrumas kai kuriems slopikliams mažėja esant aukštesniam pH_i [61]. Tai siejama su tam tikrų Cx45 aminorūgščių, ypač histidinių, vaidmeniu, nes manoma, kad histidinas 204 gali būti svarbus nuo pH priklausomam laidumo reguliavimui. Labiausiai ištirtas yra Cx43 jautrumas pH_i pokyčiams, ypač širdies išemijos metu, kai terpės rūgštėjimas slopina PJTR. Viena vertus, tai gali būti laikoma apsauginiu mechanizmu, ribojančiu pažeidimo plitimą, tačiau kita vertus, pernelyg didelis PJ užsidarymas gali sutrikdyti elektrinio impulso sklaidimą ir prisidėti prie aritmijų. Tyrimai taip pat parodė, kad C galas yra būtinas Cx43 jautrumui pH_i , o jos pašalinimas ar tam tikrų aminorūgščių pakeitimas šį jautrumą reikšmingai sumažina [62–65]. Manoma, kad Cx43 kanalų užsidarymą rūgštinėje terpėje lemia tiek tiesioginė H^+ sąveika su Cx43 C galu, tiek netiesioginis poveikis per padidėjusią viduląstelinį Ca^{2+} jonų koncentraciją.

Padidėjusi viduląstelinė Ca^{2+} koncentracija skatina PJ kanalų užsidarymą – tai svarbus apsauginis mechanizmas, ribojantis pažaidos plitimą į gretimas ląsteles. Šis reiškinys ypač svarbus audinių pažaidos metu, kai Ca^{2+} pateikimas į sužalotą ląstelę sukelia PJ užsidarymą ir apsaugo aplinkines ląsteles nuo depoliarizacijos bei metabolitų netekimo. Ca^{2+} poveikis PJTR nustatytas įvairiuose audiniuose, o jo efektyvumas priklauso nuo ląstelės tipo ir koneksino izoformos. Manoma, kad Ca^{2+} poveikis PJ kanalams gali būti perduodamas per kalmoduliną, kuris, prisijungęs Ca^{2+} , keičia konformaciją ir sąveikauja su koneksiniais [66–69]. Be Ca^{2+} , PJ funkciją gali moduluoti ir kiti divalenčiai katijonai, ypač Mg^{2+} . Eksperimentiniai duomenys rodo, kad padidėjusi viduląstelinė Mg^{2+} koncentracija mažina PJ laidumą, o sumažėjusi – didina. Mg^{2+} koncentracija reikšmingai kinta tokių patologijų atvejais, kaip išemija, hipoksija ar neurodegeneracinės ligos, todėl gali prisidėti prie PJTR sutrikimų. Taip pat nustatyta, kad Cx36 kanalai yra jautrūs Mg^{2+} koncentracijai ir gali būti tiesiogiai pralaidūs šiam jonui [70–73].

Koneksinų potransliacinės modifikacijos yra labai svarbios PJ laidumo reguliacijai. Koneksinai daugiausia skiriasi savo C galo ilgiu, kur yra daugybė fosforilinimo vietų [20,74]. Cx fosforilinimas yra vienas pagrindinių puskanalių ir PJ kanalų ekspresijos ir funkcijos reguliatorių. Fosforilinimas buvo nustatytas daugelyje koneksinų: Cx26, Cx31, Cx32, Cx36, Cx37, Cx43, Cx45, Cx46 ir Cx50 (1 lentelė). Daugumoje koneksinų fosforilinimas vyksta C gale, išskyrus Cx26, kuris nėra fosforilinamas dėl per trumpos C-galo sekos. Masių spektrometrijos tyrimai parodė kelias galimas Cx26 fosforilinimo vietas N gale, kurios yra skirtingai reguliuojamos hidroksilinimo būdu, taip pat nustatytos galimos vietos citoplazminėje kilpoje, nors šių Cx26 fosfo-

rilinimo vietų funkcijos dar nėra žinomos. Yra duomenų apie tarpląstelinės kilpos fosforilinimą Cx56 ir Cx35, bet kitiems koneksinams tai nebūdinga. Koneksinų C galui yra būdingi netvarkingi baltymų regionai, turintys didelį serino, treonino ir tirozino kiekį, kaip aprašyta Cx32, Cx40, Cx43, Cx45 ir Cx50 atvejais [20,75].

1 lentelė. Koneksinų potransliacinės modifikacijos ir jų poveikis laidumui ir ekspresijai [20]

Koneksinas	Liekana	Potransliacinės modifikacijos	PJ laidumas	Ekspresija
Cx26	M1/K15/K102/K103/K105/ K108/K112/K116	Acetilinimas	ND	ND
	N14/N113/ N170/N176	Hidroksilinimas	ND	ND
	E42/E47/E114	Karboksilinimas	ND	ND
	K61/R75/ K221/K223	Metilinimas	ND	ND
	T123/T177/S183/T186/ (Y233 arba Y235 arba Y240)	Fosforilinimas	ND	ND
Cx31	263	CK1	Nekinta	Nekinta
	261	CK1	Nekinta	Nekinta
Cx32	S229	PKC	↑/↓	↑/↓
	S233	PKC/PKA	↑/↓	↑/↓
	S240	ND	ND	ND
	Y7, Y243	EGF tirozino kinazė	ND	ND
Cx35/ Cx36	S110	PKA/PKG	Nekinta	↓
	S276/293	PKA/PKG	Nekinta	↓
	S289	PKG	ND	↓
Cx37	S275/S285/ S302/S319/S321/ S325/S329	PKC	↑	↓
Cx43	S5	ND	ND	ND
	K144	SUMO	↑	↑
	K237	SUMO	↑	↑
	S244	CAMKII	ND	ND
	Y247	Src	↓	↓
	S255	CAMKII	ND	ND
		P34cdc2	↓	↓
		MAPK	Nekinta/↓	Nekinta
	S257	PKG/CAMKII	ND	ND
	S262	P34cdc2	↓	↓
		MAPK	↓	↓/Nekinta
		PKCε	↓	↓

1 lentelės tęsinys

Koneksinas	Liekana	Potransliacinės modifikacijos	PJ laidumas	Ekspresija
Cx43	Y265	Src	↓	↓
	C271	Nitrozilimas	↑	Nekinta
	S279	MAPK	↓	↓/Nekinta
		CDK5		↓
	S282	MAPK	↓	↓/Nekinta
		CDK5	↓	↓
	S296	CAMKII	ND	Nekinta
	S297	CAMKII/ PKCε	ND	Nekinta
	S306	CAMKII	↓	↓
	S314	CAMKII	ND	ND
	S325	CAMKII	ND	ND
		CK1	↑	↑
	S328	CAMKII	ND	ND
		CK1	↑	↑
	S330	CAMKII	ND	ND
		CK1	↑	↑
	S364	CAMKII	ND	ND
		PKA	↑	↑
	S365	CAMKII	ND	ND
		PKA	↑	↑
		PKC	↓	↓
	S368	PKCα	↑	↑
		PKCε	↓	↓
	S369	CAMKII	ND	ND
		PKA	↑	Nekinta
		PKC	↑	↑
	S372	CAMKII	ND	ND
		PKC	↓	↓
	S373	Akt	↑	↑
		CAMKII	ND	ND
		PKC	↓	↓
		PKA	↑	↑
Cx45	S326/Y337/S381/S382/S384/S385/S387/S393	CAMKII	ND	ND
	S326/S382/S384/S387/S393	CK1	ND	ND
Cx46	S118	PKC	ND	↓
Cx50	S363	CK1	↑	↑

Pastaba: ND – nėra duomenų, ↑ – didėja, ↓ – mažėja.

Koneksinų baltymų fosforilinimas keliuose vietose yra žinomas kaip procesas, galintis pakeisti koneksinų gyvavimo laiką, prisijungimą ir lokalizaciją, o tai taip pat gali turėti įtakos PJ veiklai [75].

Tam tikros cheminės medžiagos gali moduluoti PJ laidumą, todėl šio mechanizmo reguliavimas laikomas perspektyviu terapiniu taikiniu. Specifinių koneksinams selektyvių slopiklių beveik nėra, o dauguma žinomų junginių taip pat moduluoja kitus jonų kanalus bei receptorius. Tarp plačiausiai naudojamų PJ slopiklių yra karbenoksolonas, kuris efektyviai slopina Cx43 ir gali veikti puskanalius, tačiau taip pat veikia Ca^{2+} kanalus ir kitus receptorius [76]. Meflokinas pasižymi santykinio selektyvumu neuroniniams koneksinams, iš kurių pagrindiniai yra Cx36 ir Cx45, tačiau didesnėmis koncentracijomis slopina ir Cx43 [77–79]. Heptanolis ir oktanolis yra klasikiniai, tačiau visiškai neselektyvūs PJ slopikliai [80,81]. Fenamatai (pvz., flufenamo ir niflumo rūgštis) taip pat greitai ir grįžtamai slopina visų koneksinų PJ, tačiau veikia ir daugelį kitų kanalų [82,83]. Atsižvelgiant į ribotą cheminių PJ moduliatorių selektyvumą, vis daugiau dėmesio skiriama natūraliems junginiams, galintiems moduluoti PJ laidumą, o ypač perspektyviais laikomi tie, kurie selektyviai veikia tam tikras koneksinų izoformas. Sparčiai daugėja mokslinių duomenų, kad specifiniai peptidai gali moduluoti PJTR: antiaritminiai peptidai gerina PJ laidumą, o tokie peptidai kaip angiotenzinas bei iš ekstraląstelių kilpų kilusios sekos blogina PJTR. Be to, peptidiniai hormonai, tokie kaip angiotenzinas II ir endotelinas-1, gali veikti koneksinų ekspresiją, taip darydami įtaką PJTR [84].

1.6. Augalinės kilmės PJTR moduliatorių paieška

Augalinės kilmės PJTR modulatoriai dažnai pranašesni už sintetinius, nes jų kompleksinė sudėtis leidžia veikti keliais signaliniais keliais ir moduluoti skirtingus koneksinus, o mažesnis citotoksiškumas bei papildomas antioksidacinis ir/ar priešuždegiminis poveikis dar labiau sustiprina PJTR reguliaciją, todėl jie yra saugesni ir universalesni eksperimentuose bei potencialiai terapiniuose tyrimuose. Biologiškai aktyvūs augalinės kilmės junginiai gali apsaugoti ir moduluoti ląstelėse vykstančius procesus, tačiau jų poveikis priklauso nuo koncentracijos ir ląstelių tipo bei ne visada yra palankus. Daugelis polifenoliais ir karotenoidais turtingų ekstraktų pasižymi antioksidaciniu poveikiu, jie mažina ROS kiekį, skatina antioksidacinių genų ekspresiją ir gali apsaugoti ląsteles nuo oksidacinio streso bei DNR pažeidimo [85,86].

Eteriniai aliejai yra kompleksinės medžiagos, turinčios antioksidacinių, priešuždegiminių ir antimikrobinių savybių, kurios gali turėti įtakos ląstelių funkcinėms savybėms [87,88]. Įrodyta, kad iš natūralių produktų kilę terpenoidai slopina navikinių ląstelių augimą [89]. Kiti tyrimai rodo, kad PJTR

pagerinimas taip pat gali turėti naviką slopinantį poveikį [38]. NEO yra sudarytas iš įvairių terpenų, tokių kaip α tujenas, α pinenas, β pinenas, sabinenas, d limonenas, α kopaenas ir kt. [90]. Šie junginiai yra atsakingi už muskato unikalų aromatą ir savybes. Muskato eterinis aliejus pasižymi mažu citotoksiškumu normalioms inkstų epitelinėms Vero ląstelėms, tačiau turi antiparazitinį poveikį *Toxoplasma gondii* [91]. Šis eterinis aliejus pasižymi citotoksiniu veikimu prieš krūties naviko T47D [92], kolorektalinio naviko HCT116 ir krūties naviko MCF-7 ląsteles [93], o tai rodo, kad muskato eterinis aliejus veikia selektyviai. Duomenų apie šio eterinio aliejaus poveikį PJTR šiuo metu trūksta.

Juodųjų aronijų ekstraktai yra turtingi fenoliniais junginiais ir antocianinais, kurie lemia jų stiprų antioksidacinį ir antiproliferacinį poveikį įvairioms navikinių ląstelių linijoms, įskaitant krūties ir kolorektalinio naviko ląsteles [94,95]. Juodųjų aronijų ekstrakto įterpimas į mezoporines silicio matricas sustiprina jo antioksidacinį, antibakterinį ir antiproliferacinį poveikį melanomos ląstelėms, tuo pačiu pasižymint mažesniu toksiškumu normalioms keratinocitų ląstelėms [96]. Juodųjų aronijų ekstraktuose esantis antocianinas cianidino-3-O-galaktozidas pasižymi stipriu gebėjimu neutralizuoti laisvuosius radikalus ir turi imunomoduliacinį poveikį, kuris gali padėti apsaugoti ląsteles nuo oksidacinės pažaidos [97]. Tiesioginių įrodymų, kad aronijų ekstraktai veikia PJTR literatūroje nėra.

Spanguolių ekstraktai yra turtingi polifenoliniais junginiais, įskaitant proantocianidinus, flavonoidus, antocianinus ir ursolio rūgštį, kurie laikomi pagrindiniais bioaktyviais komponentais, atsakingais už jų antioksidacines ir priešnavikines savybes [98]. Epidemiologinių tyrimų duomenys rodo, kad mityba, turtinga vaisiais ir daržovėmis, yra siejama su geresne pacientų prognoze sergant įvairių tipų navikais, o šį poveikį iš dalies lemia fitocheminės medžiagos, veikiančios navikinių ląstelių žūties ir proliferacijos kelius [99]. *In vitro* tyrimai rodo, kad daugelis spanguolių ekstrakto frakcijų reikšmingai slopina įvairių naviko ląstelių linijų gyvybingumą ir proliferaciją [100]. Ypač efektyvūs yra proantocianidiniais ir ursolio rūgštimi turtingi ekstraktai, kurie mažina ląstelių augimą ir metabolinį aktyvumą, dažniausiai veikdami koncentracijomis nuo kelių iki kelių dešimčių $\mu\text{g/ml}$, priklausomai nuo ląstelių tipo [101]. Be to, nustatyta, kad spanguolių ekstraktai slopina ornitino dekarboksilazės aktyvumą ir pasižymi priešnavikiniu poveikiu *in vitro* modeliuose, nors šių poveikių molekuliniai mechanizmai dar nėra iki galo išaiškinti [102]. Spanguolių ekstraktai gali slopinti MCF-7 ląstelių proliferaciją ir sukelti ląstelių ciklo sustabdymą [103]. DU145 žmogaus prostatos adenokarcinomos ląstelėse spanguolių ekstraktas sukelia apoptozę per kaspazės-8 aktyvumą Bid baltymo skaidymą ir vėlesnį citochromo C išsiskyrimą iš mitochondrijų [104]. Taip pat nustatyta, kad ekstraktai gali sukelti ląstelių žūtį priklausomai

nuo koncentracijos ir ląstelių tipo, dažnai dalyvaujant PI3K/Akt/mTOR signaliniam keliui [105]. Be to, yra žinoma, kad spanguolių ekstraktai slopina navikinių ląstelių adheziją, migraciją ir kolonijų formavimą, o šis poveikis dažnai siejamas su matrikso metaloproteazių aktyvumo sumažėjimu [106].

Be poveikio proliferacijai ir ląstelių gyvybingumui, spanguolių ekstraktai moduliuoja ir kitus ląstelinius procesus. Jų polifenolinės frakcijos gali mažinti ROS kiekį, lipidų peroksidaciją ir didinti glutationo koncentraciją, taip reguliuodamos oksidacinį stresą [107–109]. Tačiau šiuo metu literatūroje nėra duomenų apie spanguolių ekstraktų tiesioginį poveikį PJTR.

Vienas iš biologiškai aktyvių spanguolių ekstraktų komponentų yra resveratrolis. Nors didžiausi resveratrolio kiekiai aptinkami vynuogėse ir raudonajame vyne, mokslinėje literatūroje spanguolės taip pat aprašomos, kaip reikšmingas šio polifenolio šaltinis [110]. Resveratrolis yra biologiškai aktyvus fenolinis junginys, priklausantis stilbenoidinių polifenolių grupei, kurio molekulinę struktūrą sudaro du fenolio žiedai, sujungti etileno tilteliu. Gamtoje jis aptinkamas dviejų izomerinių formų, *cis* ir *trans* pavidalu, tačiau būtent *trans*-resveratrolis laikomas biologiškai aktyviausia forma [111]. Šis junginys yra plačiai žinomas dėl įvairiapusio biologinio veikimo, įskaitant antioksidacinį [112], kardioprotekcinį [113], neuroprotekcinį [114], priešuždegiminį [115], senėjimą lėtinantį [116] ir kitus poveikius. Resveratrolis siejamas su ląstelių ciklo slopinimu, diferenciacijos skatinimu ir apoptozės sukėlimu navikinėse ląstelėse [117–119]. Kai kuriuose vaistiniuose augaluose resveratrolis veikia kaip fitoaleksinas ir atlieka apsauginę funkciją – jo sintezė suaktyvėja augalui patiriant stresą, pavyzdžiui, mechaninius pažeidimus, UV spinduliuotės poveikį ar grybelines infekcijas [120,121].

Vienas iš svarbiausių resveratrolio vaidmenų – antioksidacinis aktyvumas. Nustatyta, kad jis tiesiogiai neutralizuoja reaktyviasias deguonies ir azoto formas, įskaitant hidroksilo radikalus ir peroksinitritą [122], taip apsaugodamas ląstelių makromolekules, ypač DNR, nuo oksidacinės pažeidos, kuri siejama su navikinių procesų vystymusi. Be tiesioginio radikalų surišimo, resveratrolis pasižymi ir netiesioginiu poveikiu – jis moduliuoja antioksidacinių fermentų ekspresiją ir slopina fermentų, dalyvaujančių ROS generacijoje, tokių kaip ksantino oksidazė, aktyvumą [123].

Resveratrolis sukelia apoptozę daugelyje navikinių ląstelių tipų, daugiausia per mitochondrijų, su naviko baltymu p53 susijusius ir redoksui jautrius signalinius kelius, dažnai nepaveikdamas normalių ląstelių [124]. Jis padidina p53 ir jo taikinių ekspresiją, sustabdo S arba G0/G1 ląstelės ciklo fazę, taip sukeldamas apoptozę kolorektalinio, plaučių, melanomos, skrandžio ir krūties naviko ląstelėse. Resveratrolis skatina citochromo c išsiskyrimą, apoptosomos susidarymą, kaspazės-3 aktyvaciją ir ADP-ribozės polimerazės skilimą krūties, kiaušidžių, chondrosarkomos bei kitų naviko tipų ląstelėse [125].

Resveratrolis padidina ROS kiekį ir endoplazminio tinklo stresą, aktyvina p38, MAPK ir C/EBP homologinį baltymą, kurie sukelia apoptozę melanomos, kiaušidžių ir kitų naviko tipų ląstelėse [126]. Nustatyta, kad resveratrolis tiesiogiai jungiasi prie mitochondrijų išorinės membranos baltymo VDAC1 ir skatina jo oligomerizaciją [127]. Resveratrolis moduluoja proapoptotines mikroRNR ir slopina riebalų rūgščių sintazę, taip sumažindamas proliferaciją ir gyvybingumą įvairiuose krūties naviko tipuose [117].

Resveratrolis stipriai veikia PJTR, kuris yra svarbus audinių homeostazės ir navikų vystymosi procesuose. Dauguma *in vitro* tyrimų rodo, kad esant mažoms arba vidutinėms mikromolinėms resveratolio koncentracijoms, jis pagerina arba palaiko PJTR, tuo tarpu didelės koncentracijos ir tam tikros sąlygos jį slopina. Žiurkių kepenų epitelio ląstelėse WB-F344 17–50 μ M resveratolio pagerino PJTR ir panaikino naviko promotorių TPA ir DDT sukeltą PJTR slopinimą [129]. Resveratrolis apsaugo PJTR nuo neigiamo galio rūgšties sukkelto poveikio [130]. HaCaT keratinocituose ir tinklainės pigmentinio epitelio ląstelėse resveratrolis užkirto kelią oksidacinio streso ar hiperglikemijos sukeltam PJTR praradimui ir išsaugojo Cx43 ekspresiją bei tarpląstelinę ryšį [131,132]. Pelių sėklidžių Leydig TM3 ląstelėse mažos 5–10 μ M resveratolio koncentracijos stimuliavo PJTR, o 100 μ M sukėlė oksidacinį stresą ir mažino PJTR [133]. Resveratrolis padidino Cx26 ir Cx43 ekspresiją bei pagerino PJTR hepatomos ląstelėse [134] ir padidino Cx43 ekspresiją melanomos ląstelėse [12]. HepG2 kepenų naviko ląstelėse resveratrolis stipriai pagerino PJTR, o tai prisidėjo prie jo antiproliferacinio poveikio [135].

Apibendrinant, resveratolio PJTR moduliavimas priklauso nuo konteksto ir koncentracijos. Dažniausiai jis pagerina arba palaiko tarpląstelinę ryšį ir koneksinų funkciją, ypač oksidacinio streso sąlygomis, taip prisidedamas prie chemopreventinio poveikio. Būtina pabrėžti, kad visi iki šiol atlikti resveratolio ir tarpląstelinio ryšio tyrimai yra netiesioginiai, t.y. tiriami dažo sklaidimo per žaizdą metodu, kuris nėra toks tikslus kaip tiesioginiai elektrofiziologiniai matavimai dvigubu visos ląstelės fiksuotos įtampos metodu.

2. TYRIMŲ METODAI

2.1. Ląstelių linijos ir auginimo sąlygos

Ekspperimentai buvo atliekami su žmogaus gimdos kaklelio navikinėmis ląstelėmis HeLa (ATCC CCL2), stabiliai transfekuotomis pelės arba žiurkės laukinio tipo Cx45 ir Cx43 arba pažymėtu žaliu fluorescuojančiu baltymu (EGFP) ir Novikoff žiurkės hepatomos ląstelėmis, ekspresuojančiomis endogeninę Cx43. Šias ląstelių linijas suteikė velionis dr. F. Bukauskas (Albert Einstein College of Medicine, Niujorkas, JAV). Ląstelės buvo auginamos DMEM terpėje, papildytoje 10 % fetaliniu veršelio serumu (FBS) ir 100 U/ml penicilino/100 µg/ml streptomicino mišiniu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija). DLD-1 ir HCT116 kolorektalinės karcinomos ląstelės (ATCC CCL221 ir CCL247) buvo auginamos RPMI terpėje, papildytoje 10 % FBS ir 100 U/ml penicilino/100 µg/ml streptomicino mišiniu. Visos ląstelių linijos buvo kultivuojamos 37 °C temperatūroje drėgnoje aplinkoje su 5 % CO₂. SpE ir ArE buvo ištirpinti RPMI terpėje ir išfiltruoti per 0,22 µm sterilų filtrą. NEO buvo tirpinamas DMSO, o jo poveikis tirtas skiedimo faktoriais (s.f.) 1×10³, 1×10⁴, 1×10⁵ ir 1×10⁶, kurie atitinka 794, 79,4, 7,94 ir 0,794 µg/ml koncentracijas. *trans*-resveratrolio (kat. nr. R5010) pradinis tirpalas buvo paruoštas DMSO (100 mM). Nustatyta, kad tirpiklis tiriamiesiems rodikliams poveikio neturėjo. Visi reagentai įsigyti iš Sigma-Aldrich, nebent nurodyta kitaip.

2.2. NEO paruošimas

NEO išskyrimą ir jo sudėties tyrimus atliko LSMU Farmacijos fakulteto Vaistų technologijos ir socialinės farmacijos katedros tyrėjai. NEO buvo išgautas iš *Myristica fragrans* sėklų, surinktų Grenadoje birželio – rugpjūčio mėnesiais. Eterinis aliejus buvo išgautas hidrodistiliacijos metodu, naudojant modifikuoto Clevenger tipo aparatą. Muskato riešuto miltelių, distiliuoto vandens ir magnio aliuminiometasilikato santykis 5:100:1 buvo pasirinktas optimalioms ekstrakcijos išeigos ir junginių identifikavimo sąlygoms užtikrinti. Mišinys buvo kaitinamas apvaliadugnėje kolboje 120 °C temperatūroje glicerolio vonelėje. Hidrodistiliacija vykdyta 4 valandas, po kurios surinktas bespalvis eterinis aliejus. Aliejus iki naudojimo buvo laikomas sandariame inde 4 °C temperatūroje. Atlikus NEO sudėties analizę, buvo nustatyti pagrindiniai jo komponentai, kurie pateikiami 2 lentelėje.

2 lentelė. NEO sudėtiniai komponentai

Junginys	Formulė	Molekulinė masė	% NEO
α pinenas	$C_{10}H_{16}$	136	15,1
α tujenas	$C_{10}H_{16}$	136	0,93
sabinenas	$C_{10}H_{16}$	136	61,4
β pinenas	$C_{10}H_{16}$	136	4,32
miristinas	$C_{11}H_{12}O_3$	192	2,15
kamfenas	$C_{10}H_{16}$	136	0,11
α terpenilo acetatas	$C_{10}H_{20}O_2$	196	0,49
γ terpinenas	$C_{10}H_{16}$	136	0,68
α terpinenas	$C_{10}H_{16}$	136	0,94
d limonenas	$C_{10}H_{16}$	136	4,2
cis-p-ment-2-en-1-olis	$C_{10}H_{18}O$	154	0,37
izoterpinolenas	$C_{10}H_{16}$	136	1,18
3,7,7-trimetil-1,3,5- cikloheptatrienas	$C_{10}H_{14}$	134	0,33
cis-sabineno hidratas	$C_{10}H_{18}$	138	0,3
α -terpinolenas	$C_{10}H_{16}$	136	0,38
γ terpineolis	$C_{10}H_{18}O$	154	0,04
γ asaronas	$C_{11}H_{16}O_3$	208	1,22
terpinen-4-olis	$C_{10}H_{18}O$	154	0,03
γ amorfenas	$C_{15}H_{24}$	204	0,03
α kopaenas	$C_{15}H_{24}$	204	0,01
cis- α bergamotenas	$C_{15}H_{24}$	204	0,08
d izogermakrenas	$C_{15}H_{24}$	204	0,01
trans-4-tujanolis	$C_{10}H_{18}O$	154	0,01

2.3. Spe ir ArE paruošimas

Spanguolių ir aronijų išspaudų paruošimo ir sudėties tyrimus atliko KTU Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedros tyrėjai. Tyrimams naudotos šviežios mechanškai išspaustos juodųjų aronijų (*Aronia melanocarpa* L.) išspaudos, gautos iš įmonės „Obuolių namai“ (Kaunas, Lietuva), ir šaldytos spanguolės (*Vaccinium oxycoccos* L.), kurias suteikė įmonė „Fudo“ (Kaunas, Lietuva). Spanguolių ir aronijų išspaudos buvo užšaldytos $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ir liofilizuotos naudojant Sublimator 40 sistemą (Zirbus Technology, Vokietija) esant $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai ir 0,5 mbar slėgiui. Išdžiovintos išspaudos buvo sumaltos ir nuriebalintos superkritine ekstrakcija

anglies dvideginio, naudojant 10 l ekstraktorių (Applied Separations, JAV). Vėliau mėginiai buvo supilstyti į 50 ml talpos ekstrakcines kasetes ir atlikta pagreitinta ekstrakcija suslėgtu etanolio, naudojant ASE350 (Dionex, JAV) aparatūrą, taikant 10,3 MPa slėgį ir 83 °C temperatūrą. Ekstrakcija vykdyta trimis 15 min. trukmės ciklais. Etanolis iš ekstrakto pašalintas rotaciniu garintuvu, o gautas ekstraktas laikytas –20 °C temperatūroje. Sudėtiniai SpE ir ArE komponentai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Išspaudų ekstraktų sudėtiniai komponentai

Junginys	Formulė	Molekulinė masė	SpE	ArE
Obuolių rūgštis	$C_4H_6O_5$	133	+	–
Chininė rūgštis	$C_7H_{11}O_6$	191	+	+
Citrinų rūgštis	$C_6H_8O_7$	191	+	+
Procianidinas B3	$C_{30}H_{25}O_{12}$	577	+	–
Chlorogeninė rūgštis	$C_{16}H_{17}O_9$	353	+	–
Katechinas	$C_{15}H_{13}O_6$	290	+	–
Miricetino galaktozidas	$C_{20}H_{29}O_{13}$	479	+	–
Kvercetino pentozidas	$C_{20}H_{17}O_{11}$	433	+	–
Kvercetino heksozidas	$C_{21}H_{19}O_{12}$	463	+	–
Kvercetino diheksozidas	$C_{27}H_{29}O_{17}$	625	–	+
Kumaroilo heksozidas	$C_{21}H_{35}O_9$	431	+	–
Sorbitolis	$C_6H_{13}O_6$	181	–	+
Dideoksisacharozė	$C_{12}H_{21}O_9$	309	–	+
1-kafeoilchino rūgštis	$C_{16}H_{17}O_9$	353	–	+
3-kafeoilchino rūgštis	$C_{16}H_{17}O_9$	353	–	+
5-kafeoilchino rūgštis	$C_{16}H_{17}O_9$	353	–	+
Liuteolino darinys	$C_{20}H_{17}O_{10}$	417	–	+
Rutinas	$C_{27}H_{29}O_{16}$	609	–	+
Hiperozidas	$C_{21}H_{19}O_{12}$	463	–	+

2.4. Kiekybinė resveratolio analizė SpE UESC metodu

Kiekybinė resveratolio analizė SpE atlikta UESC metodu. Naudotas Acquity H-class (Waters, Milfordas, MA, JAV) skysčių chromatografas su Xevo TQD masių spektrometru (Waters, Milfordas, MA, JAV). Chromatografiniam skirstymui taikyta YMC Triart C18 (100 Å, 1,9 µm 100 × 2,0 mm) (YMC, Kiotas, Japonija) kolonėlė su prieškolonėle. Kolonėlė laikoma termostate, kuriame palaikoma pastovi 40 °C temperatūra. Metodikos mobi-

li fazė sudaryta eliuento A (0,1 % vandeninis skruzdžių rūgšties tirpalas) ir eliuento B (acetonitrilas). Pradinės eliuacijos sąlygos: 0–1 min. 95 % A (5 % B); 1–5 min. nuo 95 % iki 70 % A; 5–7 min. nuo 70 % iki 50 % A; 7–8 min. išlaikoma 0 % A tirpiklio; nuo 8,1 min. grįžtama į pradinės sąlygas. Bendra gradientinės eliuacijos trukmė 10 min., eliuento tėkmės greitis 0,5 ml/min., injekcijos tūris 1 µl. Masių spektrometro parametrai: neigiama elektropurkštuvinė jonizacija, kapiliaro įtampa 2500 V, jonų šaltinio temperatūra 150 °C, eliuento išgarinimo temperatūra 500 °C, eliuento išgarinimo dujų tėkmės greitis 800 l/val. Fenolinių junginių smailės buvo analizuojamos MRM režimu. Kiekybinis resveratrolio įvertinimas atliktas remiantis analitės smailės ploto priklausomybe nuo jos koncentracijos tiriamajame tirpale pagal sudarytą kalibracijos lygtį.

2.5. Molekulinis modeliavimas

Žmogaus hCx43 struktūra (PDB ID 7F94) [136], turinti I164V mutaciją, buvo pridėta naudojant ChimeraX programinę įrangą (v. 1.6.1) [137], ir pritaikyta, kad atspindėtų žiurkės Cx43 (rCx43) struktūrą molekulinio dokavimo tikslais. Gautas Cx43 modelis buvo patvirtintas naudojant ProSA [138] ir Procheck (v. 3.5.4) [139]. Pelės Cx45 (mCx45) struktūra buvo modeliuojama naudojant AlphaFold 2 ir patvirtinta vidinės validacijos balu [140]. Trimatis resveratrolio molekulinis modelis buvo gautas iš PubChem duomenų bazės [141]. Naudojant Smina dokavimo programinę įrangą [142] kartu su pritaikyta Vina vertinimo funkcija [143], buvo atliktas molekulinis dokavimas. Siekiant išvengti simetrinių dokavimo konformacijų išdėstymo kaimyniniuose subvienetuose, dokingo režimas buvo sukonfigūruotas taip, kad apimtų du gretimus Cx43 puskanalio subvienetus. Atsitiktinis pradmens skaičius buvo nuosekliai nustatytas kaip 1. Buvo užregistruotos devynios palankiausios dokavimo konformacijos. Dvimatės dokavimo vizualizacijos buvo sukurtos naudojant LigPlot+ (v. 2.2.9) programinę įrangą [144].

2.6. Elektrofiziologiniai matavimai

Elektrofiziologiniams matavimams atlikti, ant objektinių stiklelių išaugintos ląstelės buvo perkeltos į eksperimentinę kamerą su nuolatine perfuzija, sumontuotą ant invertuoto mikroskopo Olympus IX81 (Olympus Europa holding GmbH, Hamburgas, Vokietija) platformos, įrengtos Orca-R2 aušinama skaitmeninė kamera (Hamamatsu Photonics K.K., Japonija). PJ laidumas tarp gretimų ląstelių buvo matuojamas naudojant dvigubą visos ląstelės fiksuotos įtampos metodą (angl. *patch-clamp*) [61]. Ląstelių poros ląstelė 1 ir ląstelė 2 buvo nepriklausomai fiksuojamos įtampa naudojant fiksuotos įtam-

pos stiprintuvą MultiClamp 700B (Molecular Devices, Inc., JAV) tuo pačiu laikymo potencialu $V_1 = V_2$. Įtampa ir srovė buvo registruojamos naudojant Digidata 1440A duomenų surinkimo sistemą (Molecular Devices, Inc., JAV), surinktos bei analizuotos naudojant pClamp 10 programinę įrangą (Molecular Devices, Inc., JAV). Keičiant įtampą ląstelėje 1 (ΔV_1), o kitoje išlaikant pastovią, PJ srovė buvo matuojama kaip srovės pokytis ląstelėje 2, kurioje įtampa nebuvo keičiama $I_j = \Delta I_2$. Taigi g_j buvo gautas iš santykio $-I_j/\Delta V_1$, kur ΔV_1 yra lygus jungties įtampai (V_j), o neigiamas ženklas rodo, kad jungties srovė, išmatuota ląstelėje 2, yra priešinga nei išmatuota ląstelėje 1. Siekiant sumažinti elektrodo vidaus varžos įtaką g_j matavimams, pipetės pasipriešinimas buvo išlaikytas žemiau 3 M Ω . Mikroelektrodai buvo gaminami iš borosilikatinio kapiliarinio vamzdelio. Eksperimentai buvo atliekami kambario temperatūroje modifikuotame Krebs-Ringer tirpale (mM): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; gliukozė, 5; natrio piruvatas, 2; HEPES, 5 (pH 7,4). Registruojančiosios pipetės buvo pripildytos fiziologiniu tirpalu, kurio sudėtis (mM): KCl, 130; natrio aspartatas, 10; MgATP, 1; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0,2; EGTA, 2; HEPES, 5 (pH = 7,3). Prieš matuojant pradinį g_j ląstelės, kurios buvo inkubuojamos su tiriamaisiais tirpalais 24 valandas, perfuzuojamos 30 minučių kontroliniu tirpalu.

2.7. Tėkmės citometrija

Pradiniame etape 5×10^4 ląstelių buvo užsėtos pilnoje terpėje 12-os šulinėlių plokštelėse. Ląstelės buvo paveiktos tiriamosiomis medžiagomis 24 val., tada du kartus nuplautos PBS, tripsinizuotos ir surinktos centrifugavimo būdu. Vėliau ląstelės buvo inkubuojamos su Guava Nexin® Reagent (Millipore, JAV) 20 min. kambario temperatūroje, laikantis gamintojo instrukcijų. Mėginiai buvo analizuojami Guava® easyCyte™ HT tėkmės citometru (Millipore, JAV), o duomenys apdoroti GuavaSoft 2.2.3 InCyte programine įranga.

2.8. Ląstelių kolonijų formavimo testas

1×10^2 ląstelių/ml buvo užsėtos 12-os šulinėlių plokštelėse. Ląstelės buvo apdorotos NEO (5 d.), SpE ir ArE bei resveratroliu (7 d.). Kolonijos buvo fiksuotos 4 % paraformaldehido tirpalu ir nudažytos 0,5 % kristalo violeto tirpalu. Mėginiai buvo vaizdinami naudojant Syngene G:Box (Kembridžas, Jungtinė Karalystė) ir analizuojami GeneTools analizavimo programine įranga.

2.9. Imunoblotingas

Ląstelės buvo lizuojamos lediniame ląstelių ekstrahavimo buferyje (Invitrogen, JAV), papildytame 1 mM PMSF (Abcam, Kembridžas, Jungtinė Karalystė), 20 µl/ml proteazės inhibitorių kokteiliu ir 10 µl/ml fosfatazės inhibitorių kokteiliu (abu iš Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija) 30 min. Lizatai buvo centrifuguojami 13000 rpm 10 min. 4 °C temperatūroje. Bendro baltymo koncentracija buvo nustatyta naudojant Qubit® baltymų tyrimo rinkinį ir Qubit 3.0 fluorometrą (Invitrogen, JAV). Baltymai buvo išskirstyti naudojant Bolt™ 4–12 % Bis-Tris plus gelį (Invitrogen, JAV) ir perkelti ant PVDF membranų (Millipore, JAV). Membranos buvo inkubuojamos 1 valandą su pirminiais antikūnais (prieš Cx45 (40-7000; Invitrogen, JAV), prieš Cx43 (C6219; Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija), prieš fosfo-Cx43 (S368) (PA5-118544; Invitrogen, JAV), prieš fosfo-Cx43 (S282) (PA5-64641; Invitrogen, JAV), prieš fosfo-Cx43 (S279) (PA5-64640; Invitrogen, JAV), prieš fosfo-Cx43 (S373) (PA5-64670; Invitrogen, JAV), prieš ERK1/2 (MA5-15134; Invitrogen, JAV), prieš fosfo-ERK1/2 (MA5-15173; Invitrogen, JAV) ir prieš GAPDH (AM4300; Invitrogen, JAV)). Baltymai buvo aptikti naudojant WesternBreeze® chemiluminescencinį rinkinį (Invitrogen, JAV) pagal gamintojo instrukcijas. Baltymų juostos vizualizuotos naudojant G:Box Chemi Gel Documentation sistemą (Syngene, JAV).

2.10. Imunocitochemija

Ląstelės buvo auginamos ant sterilių objektinių stiklelių ir fiksuojamos 4 % paraformaldehidu 15 minučių kambario temperatūroje. Po plovimo ląstelės permeabilizuotos 0,2 % Triton X-100 PBS tirpalu 3 minutes. Tada mėginiai buvo inkubuojami 1 valandą 37 °C temperatūroje 1 % BSA/PBS tirpale su šiais pirminiais antikūnais: triušio prieš Cx43 1:50 (C6219; Sigma-Aldrich, Steinheim, Vokietija), pelės prieš Cx43 1:50 (610061, BD Biosciences, JAV), triušio prieš Cx45 1:50 (40-7000; Invitrogen, JAV) ir triušio prieš fosfo-Cx43 (S373) 1:50 (PA5-64670; Invitrogen, JAV). Po plovimo 1 % BSA/PBS, ląstelės buvo inkubuojamos 30 min. 37 °C temperatūroje tamsoje su antriniais antikūnais, konjuguotais su skirtingais fluoroforais: asilo antikūnu prieš triušio IgG H&L, sujungtu su fluoresceinu; ožkos antikūnu prieš pelės IgG H&L, sujungtu su fluoresceinu; asilo antikūnu prieš triušio IgG H&L, sujungtu su Cy5 (visi antriniai antikūnai naudoti santykiu 1:125, Life technologies, Carlsbad, CA, JAV). F aktinas buvo pažymėtas 30 min. inkubuoiant ląsteles su Alexa Fluor™ 594 faloidinu (A12381; Invitrogen, JAV). Stikleliai pritvirtinti naudojant Vectashield Mounting Medium su DAPI (Vector Laboratories, CA, JAV). Mėginių analizė buvo atlikta naudojant

Olympus IX83 invertuotą konfokalinį mikroskopą (Olympus Europa holding GmbH, Hamburgas, Vokietija). PJP dydžiui įvertinti trimačiai vaizdai buvo sudaryti registruojant Z-plokštumas kas 0,25 μm intervalais. PJP paviršiaus plotas (μm^2) buvo įvertintas naudojant Fiji/ImageJ 3D Object Counter programinę įrangą, analizuotos mažiausiai 3 zonos iš 3 biologinių pakartojimų, kiekvienoje sąlygoje buvo analizuota ne mažiau kaip 100 PJP.

2.11. Gyvų ląstelių vaizdinimas

Gyvos ląstelės buvo vaizdinamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO_2 koncentracijai, naudojant inkubacijos sistemą INUBG2E-ONICS (Tokai Hit, Shizuoka-ken, Japonija) su inkubatoriumi, sumontuotu ant Olympus IX83 invertuoto konfokalinio mikroskopo (Olympus Europa holding GmbH, Hamburgas, Vokietija) platformos. HeLa ląstelės buvo užsėtos ant plonadugnių lėkštelių ir laikomos papildytoje DMEM terpėje. Koneksinų/lizosomų kolokalizacijos tyrimui HeLa Cx45 EGFP ir HeLa Cx43 EGFP ląstelės buvo pažymėtos SiR-Lyso dažu 1 valandą prieš vaizdinimą. Duomenys buvo įvertinti iš 3 biologinių pakartojimų. Lizosomų/žPJ kiekybinis įvertinimas buvo atliktas analizuojant 20 žPJ kiekviename pakartojime. Cx45/lizosomų kolokalizacija buvo įvertinta taikant Pearson`o koreliacijos koeficientą analizuojant 20 ląstelių kiekviename pakartojime. Analizė buvo atlikta naudojant Fiji/ImageJ kolokalizacijos programinę įrangą. Citoskeleto vaizdinimui HeLa WT, HeLa Cx43, HeLa Cx45 ir HeLa Cx43 EGFP ląstelės buvo pažymėtos SiR-Actin (F aktinas) ir 4-580CP-LTX (α tubulinas) fluorescenciniais žymenimis. PJP internalizacijos ilgalaikio registravimo vaizdai buvo automatiškai fiksuojami 10 minučių intervalais. Trimačiai vaizdai buvo gauti kaip Z-plokštumos 0,5–1 μm intervalais. Duomenys buvo įvertinti iš 4 biologinių pakartojimų.

2.12. LY dažo sklidimo metodas

Metabolinė komunikacija tarp ląstelių buvo tiriama naudojant fluorescencinį žymenį liuciferio geltonąjį (Lucifer yellow, LY, 2 mM). LY buvo įvedamas į donoro ląstelę gretimų ląstelių grupėje per mikropipetę, naudojant visos ląstelės įtampos fiksavimo metodą. Dažiklio pernaša į kaimynines ląsteles buvo analizuojama naudojant fluorescencijos sužadinimo sistemą MT10 (Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburgas, Vokietija) ir fluorescencijos vaizdinimo sistemą XCELLENCE (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Miunchenas, Vokietija).

2.13. Statistinė duomenų analizė

Prieš atliekant statistinę analizę, duomenų pasiskirstymo normalumas buvo vertintas taikant Shapiro-Wilko testą. Atsižvelgiant į duomenų pasiskirstymą, grupių palyginimui buvo taikomas dvipusis Stjudento t-testas arba Mann-Whitney U testas. Parametrinių duomenų rezultatai pateikiami kaip aritmetiniai vidurkiai $\pm$ standartinė paklaida (SEM), o neparametrinių – kaip mediana (25–75 procentiliai). Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$. Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant SigmaPlot 12.0 programinę įrangą.

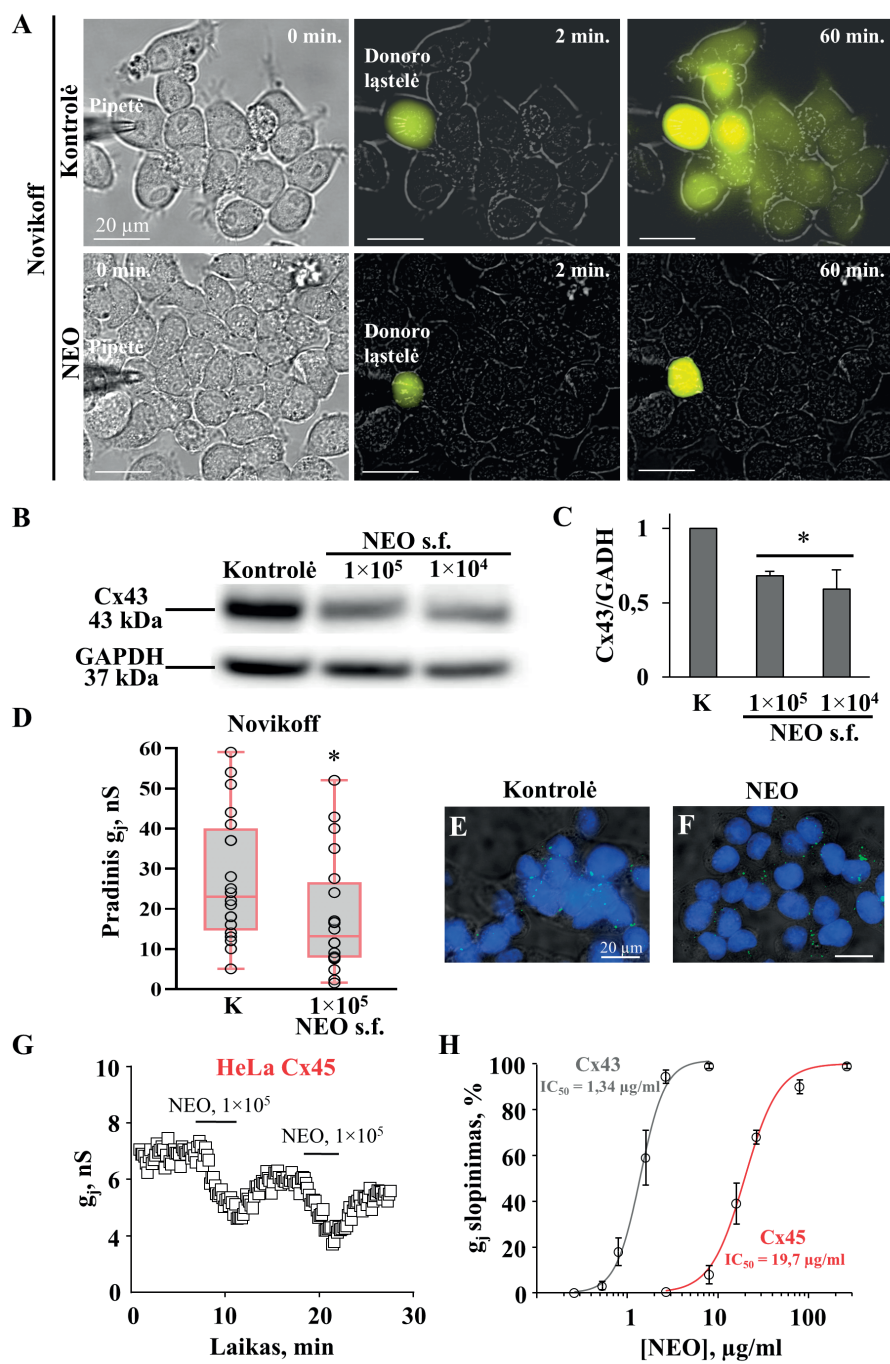
3. REZULTATAI

3.1. NEO poveikio tyrimai

3.1.1. NEO poveikis Cx43 ir Cx45 PJTR

Bendradarbiaujant su prof. J. Bernatienės vadovaujama tyrėjų grupe (LSMU, Farmacijos fakulteto Vaistų technologijos ir socialinės farmacijos katedra), buvo pradėti NEO biologinio poveikio tyrimai. Buvo ištirtas NEO poveikis Cx43 PJ laidumui, bei įvertinta šio poveikio koreliacija su Novikoff ląstelių gyvybingumu, proliferacija ir kolonijų formavimosi potencialu [90]. Tiesioginiai elektrofiziologiniai matavimai parodė slopinantį NEO poveikį Cx43 PJ elektriniam laidumui (eksperimentus atliko Ląstelių kultūrų laboratorijos kolegos: R. Mickus, V. Raškevičius ir V. A. Skeberdis). Šiuos rezultatus papildomai patvirtinome metabolinio ryšio tyrimais, atliktais taikant dažo sklaidimo metodą, t.y., matuojant PJ pralaidumą tam tikros molekulinės masės ir krūvio medžiagai (5 A pav.). Kontrolinėmis sąlygomis, praėjus valandai po injekcijos į donorinę ląstelę, fluorescuojančio dažo LY (pagal angl. *lucifer yellow*; molekulinė masė 443; krūvis –2) pernaša iš donorinės ląstelės buvo stebima 14 gretimų ląstelių. Priešingai, po 10 min. Novikoff ląstelių preinkubacijos su 1×10^5 s.f. NEO, LY dažas nesklido ir liko lokalizuotas tik donorinėje ląstelėje (5A pav.).

PJ laidumo slopinimas dažnai siejamas su sumažėjusia koneksinų ekspresija [38]. Iš tikrųjų, ilgalaikis PJTR slopinimas gali sumažinti koneksinų PJ stabilumą ir paskatinti jų degradavimą. Vis dėlto kai kuriais atvejais gali būti aktyvuojami kompensaciniai mechanizmai, kuomet PJTR slopinimas sukelia Cx ekspresijos padidėjimą. Kitų autorių duomenys rodo, kad terpenai, kurių gausus kiekis buvo nustatytas ir NEO [90], navikinėse ląstelėse gali sukelti koneksinų ekspresijos pokyčius. Pavyzdžiui, likopenas ir β -karotenas padidino bendrą Cx43 baltymo ekspresiją ir pagerino tarpląstelinį ryšį KB-1 ir MCF-7 navikinių ląstelių linijose [145,146]. Mes atlikome kiekybinę Cx43 ekspresijos analizę po poveikio NEO (5B,C pav.). Novikoff ląsteles paveikus 24 val. su 1×10^5 ir 1×10^4 s.f. NEO, Cx43 baltymo ekspresija atitinkamai sumažėjo 30 % ir 36 % (5B,C pav.).



5 pav. NEO slopina metabolinę komunikaciją per Cx43 PJ ir Cx43 ekspresiją Novikoff ląstelėse

Fluorescuojančio dažo LY (2 mM) sklidimas tarp endogeninių Cx43 ekspresuojančių Novikoff ląstelių kontrolinėse sąlygose ir esant NEO (1×10^5 s.f.) (A). LY buvo įvestas į donori-

nę ląstelę per „patch“ pipetę, o jo kaupimasis kaimyninėse ląstelėse buvo stebimas 1 val. Tipiniai imunoblotingo vaizdai, rodantys NEO poveikį bendrai Cx43 ekspresijai Novikoff ląstelėse (B). NEO poveikio bendrai Cx43 ekspresijai apibendrinimas (C), $n = 3$. Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. Pradinis PJ laidumas (D), išmatuotas atsitiktinai atrinktose kontrolinėse ir NEO paveiktose Novikoff ląstelių porose. Reikšmių skirstinių palyginimui tarp grupių taikytas Mann-Whitney U kriterijus. Cx43 imunofluorescencija (žalia) kontrolinėse (E) ir paveiktose NEO (F) Novikoff ląstelėse, branduoliai nudažyti DAPI (mėlyna). NEO poveikis Cx45 laidumui (G) HeLa ląstelėse. NEO slopinamojo poveikio Cx43 ir Cx45 atsako kreivės (H). * $p < 0,05$ lyginant su kontrole.

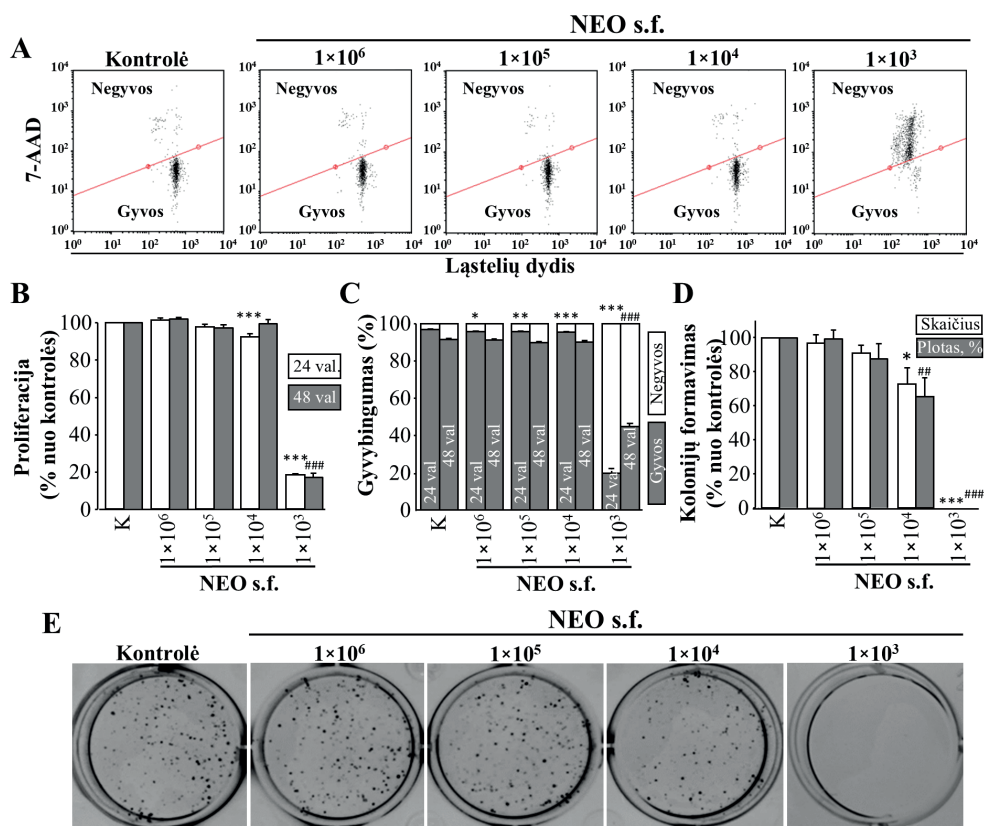
Siekdami įvertinti, ar Cx43 ekspresijos pokyčiai siejasi su Cx43 PJ laidumo pokyčiais, dvigubu visos ląstelės fiksuotos įtampos metodu matavome Cx43 pradinį PJ laidumą (g_j) kontrolėje ir ląsteles paveikus NEO (1×10^5 s.f.) 24 val. Ši koncentracija buvo pasirinkta todėl, kad neturėjo reikšmingo poveikio ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui (žr. skyriuje 3.1.2.). Nustatėme, kad 1×10^5 s.f. NEO 1,5 karto sumažino vidutinį Cx43 PJ g_j (5D pav.). Šie rezultatai siejasi su Cx43 ekspresijos ir imunocitocheminiais PJ tyrimais. Po 24 val. NEO (1×10^4 s.f.) poveikio sumažėjo bendra Cx43 baltymo ekspresija (5B,C pav.). Kadangi bendras Cx43 kiekis neparodo funkcinių membraninių puskanalių ir PJ skaičiaus, imunofluorescencine mikroskopija bandėme įvertinti jų dydį ir kiekį fiksuotų Novikoff ląstelių pavyzdžiuose (5E,F pav.). Tačiau šiuo metodu nebuvo galima patikimai atskirti žPJ, puskanalių ir PJP, nes jie atrodė labai panašiai. Nors elektrofiziologiniai ir dažo sklidimo tyrimai parodė, kad dauguma Novikoff ląstelių porų gerai komunikuoja tarpusavyje, imunofluorescenciniuose vaizduose PJP nebuvo aiškiai matomos. Manoma, kad taip yra dėl difuzinio PJ kanalų pasiskirstymo arba jų panašumo į puskanalių sankaupas.

Taip pat siekdami įvertinti ar NEO poveikis priklauso nuo Cx tipo, atlikome eksperimentus su HeLa ląstelėmis, ekspresuojančiomis egzogeninį Cx45 (5G pav.). Nustatėme, kad NEO slopinamasis poveikis Cx45 yra silpnesnis, palyginti su jo poveikiu Cx43. NEO poveikio g_j priklausomybės nuo koncentracijos parodytos 5G ir H pav. Apskaičiuotas IC_{50} Cx43 ir Cx45 PJ g_j slopinimui buvo atitinkamai $1,36 \mu\text{g/ml}$ [90] ir $19,7 \mu\text{g/ml}$.

3.1.2. NEO poveikis Novikoff ląstelių gyvybingumui

Geras tarpląstelinis ryšys dažniausiai laikomas navikus slopinančiu veiksnium, tačiau yra duomenų, kad tam tikrais atvejais naviko progresavimo metu vykstant epitelinei–mezenchiminei tranzicijai, padidėjusi koneksinų ekspresija ir atkurtas PJTR siejami su ląstelių judrumu ir metastazavimu. Prostatos naviko PC3 ir krūties naviko MCF-7 ląstelių linijose padidėjusi koneksinų ekspresija epitelinio-mezenchiminio virsmo metu skatina navikinių ląstelių migraciją ir metastazavimą [55,147]. Atsižvelgiant į tai, vienas iš tyrimo tiks-

lų buvo įvertinti, ar PJ slopinimas keičia jų proliferacines savybes, žinant, kad Novikoff ląstelės intensyviai proliferuoja nepaisant efektyvaus PJTR. Nustatė, kad NEO yra efektyvus Cx43 PJ slopiklis, ištyrė jo poveikį navikinių ląstelių proliferacijai, gyvybingumui ir kolonijų formavimo potencialui. Tik didžiausia naudota NEO koncentracija (1×10^3 s.f.) po 24 ir 48 val. poveikio sukėlė reikšmingus Novikoff ląstelių proliferacijos ir gyvybingumo pokyčius: ląstelių kiekis sumažėjo atitinkamai 81 % ir 83 %, o apoptotinių ląstelių skaičius padidėjo atitinkamai 78 % ir 47 % (6B,C pav.).

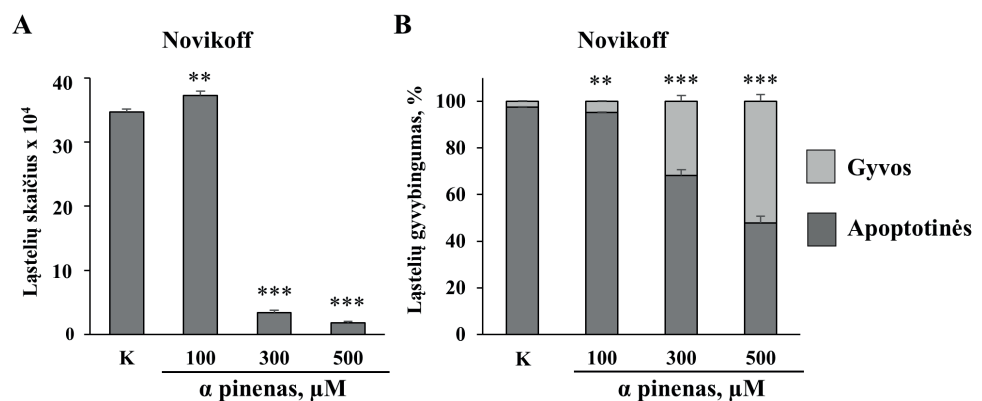


6 pav. NEO poveikis Novikoff ląstelių proliferacijai, gyvybingumui ir kolonijų formavimuisi

Tipiniai tėkmės citometrijos taškiniai vaizdai (A) rodo ląstelių atsaką į NEO nurodytomis koncentracijomis po 24 val. poveikio. Negyvos ląstelės buvo identifikuojamos naudojant 7-AAD dažiklį. NEO poveikio Novikoff ląstelių proliferacijai (B) ir gyvybingumui (C) apibendrinimas ($n = 9$). NEO poveikio (5 d.) ląstelių kolonijų skaičiui ir plotui (D) apibendrinimas ($n = 9$). Tipiniai kolonijų formavimosi vaizdai kontrolinėmis sąlygomis ir ląsteles paveikus NEO nurodytomis koncentracijomis (E). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$ lyginant su kontrole.

Taip pat ištyrėme NEO poveikį vienos Novikoff ląstelės gebėjimui formuoti kolonijas. Šis metodas panaikina galimą tarpląstelinės komunikacijos apsauginį vaidmenį citotoksiniams junginiams dėl mažo pasėtų ląstelių skaičiaus. Klonogeninis tyrimas pagrįstas vienos ląstelės gebėjimu formuoti identišku ląstelių koloniją ir įvardijamas kaip standartas tiriant navikinių ląstelių kamieniškumą [148]. Šiuo metodu ląstelės buvo veikiamos ilgesnį laiką (5 dienas) nei tėkmės citometrijos tyrimuose (24 ir 48 val.). Lyginant su gyvybingumo tyrimais (6B,C pav.), ląstelės buvo jautresnės mažesnių NEO koncentracijų poveikiui. Reikšmingas kolonijų skaičiaus ir ploto sumažėjimas (apie 27 % ir 34 %, atitinkamai) buvo pastebėtas jau su NEO 1×10^4 s.f., o kolonijų formavimasis buvo visiškai sustabdytas esant NEO 1×10^3 s.f. (6D,E pav.).

Tyrimai su Novikoff ląstelėmis nepatvirtino hipotezės, kad blogėjantis PJTR skatina navikinių ląstelių proliferaciją. Buvo nustatyta, kad NEO 1×10^5 s.f., kuris pilnai slopino PJTR, Novikoff ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui poveikio neturėjo. NEO poveikis ląstelėms galėjo būti kompleksinis, todėl papildomai nustatėme vienos iš pagrindinių jo sudedamųjų dalių, kuri taip pat slopino PJTR, poveikį Novikoff ląstelėms. Ištyrėme α pineno poveikį Novikoff ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui. Po 100 μ M α pineno poveikio (48 val.), stebėtas ~ 7 % Novikoff ląstelių proliferacijos padidėjimas ir šie rezultatai atitinka nuostatą, kad blogėjantis PJTR skatina ląstelių proliferaciją. Po poveikio 300 ir 500 μ M α pinenu nustatytas ryškus Novikoff ląstelių proliferacijos sumažėjimas – atitinkamai ~ 90 ir ~ 95 %. Novikoff ląstelių gyvybingumas po poveikio 100, 300 ir 500 μ M α pinenu sumažėjo atitinkamai 2, 29 ir 50 % (7 pav.).



7 pav. *Pineno poveikis Novikoff ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui*

Pineno poveikis ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui buvo matuojamas tėkmės citometrijos metodu po 48 valandų poveikio. Pineno poveikio Novikoff ląstelių proliferacijai (A) ir gyvybingumui (B) apibendrinimas ($n = 3$). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole.

3.2. SpE ir ArE poveikio tyrimai

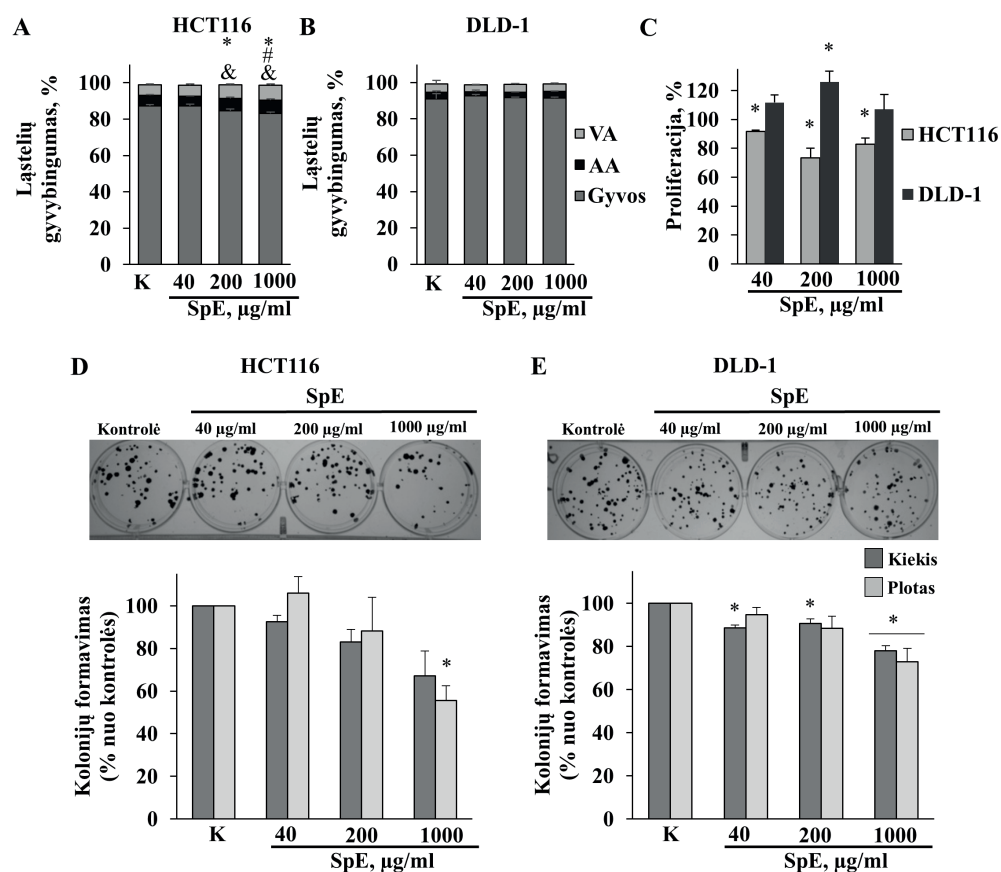
3.2.1. SpE ir ArE poveikis kolorektalinio naviko ląstelių gyvybingumui ir PJTR

Bendradarbiaujant su prof. P.R.Venskutonio vadovaujama tyrėjų grupe (KTU, Cheminės technologijos fakultetas, Maisto mokslo ir technologijos katedra), tyrėme SpE ir ArE poveikį žmogaus kolorektalinio naviko HCT116 ir DLD-1 ląstelių linijų gyvybingumui. Šios plačiai tyrimuose naudojamos ląstelių linijos mūsų tyrimams buvo pasirinktos kaip *in vitro* modeliai, nes kolorektalinio naviko epitelis yra tiesiogiai veikiamas su maistu gaunamų bioaktyvių junginių. Be to, HCT116 ir DLD-1 ląstelės pasižymi skirtingu genotipu, leidžiančiu įvertinti SpE ir ArE poveikį skirtingiems kolorektalinio naviko potipiems. SpE ir ArE šiems tyrimams buvo pasirinkti dėl didelės biologiškai aktyvių polifenolių koncentracijos ir skirtingos šių ekstraktų sudėties [149] (3 lentelė).

Taip pat, tiek spanguolės, tiek aronijos yra plačiai vartojamos žmogaus mityboje, todėl jų bioaktyviųjų junginių poveikio tyrimai turi potencialią praktinę reikšmę. Gauti rezultatai sudaro pagrindą tolimesnei biologiškai aktyvių augalinės kilmės junginių priešnavikinio potencialo analizei bei jų galimų veikimo mechanizmų identifikavimui.

SpE poveikis HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumui ir proliferacijai buvo matuojamas naudojant tėkmės citometrijos metodą. SpE (200 ir 1000 µg/ml) nežymiai mažino HCT116 ląstelių gyvybingumą, o DLD-1 ląstelių gyvybingumo neveikė. SpE (40–1000 µg/ml) sukėlė nedidelį (9–17 %) HCT116 ląstelių proliferacijos sumažėjimą, o DLD-1 ląstelių dalijimuisi reikšmingą poveikį turėjo tik 200 µg/ml SpE, kuris paskatino jų proliferaciją apie 22 % (8C pav.).

HCT116 ląsteles paveikus didžiausia SpE koncentracija (1000 µg/ml), jų kolonijų plotas žymiai sumažėjo, o kolonijų skaičius nekito, tuo tarpu DLD-1 ląstelių kolonijų skaičių mažino visos SpE koncentracijos, o plotą mažino tik 1000 µg/ml SpE (8D,E pav.). Įdomu tai, kad reikšmingas poveikis DLD-1 ląstelių kolonijų skaičiui buvo pasiektas naudojant ir 40, ir 200 µg/ml SpE, nors šiomis koncentracijomis jis nesukėlė jokių pokyčių ląstelių gyvybingumui, vertintam tėkmės citometrijos metodu (8B pav.). Šie skirtumai galėjo atsirasti dėl pagrindinių klonogeninio ir tėkmės citometrijos tyrimų skirtumų – mažas pasėtų ląstelių skaičius bei ilgesnis poveikio laikas.

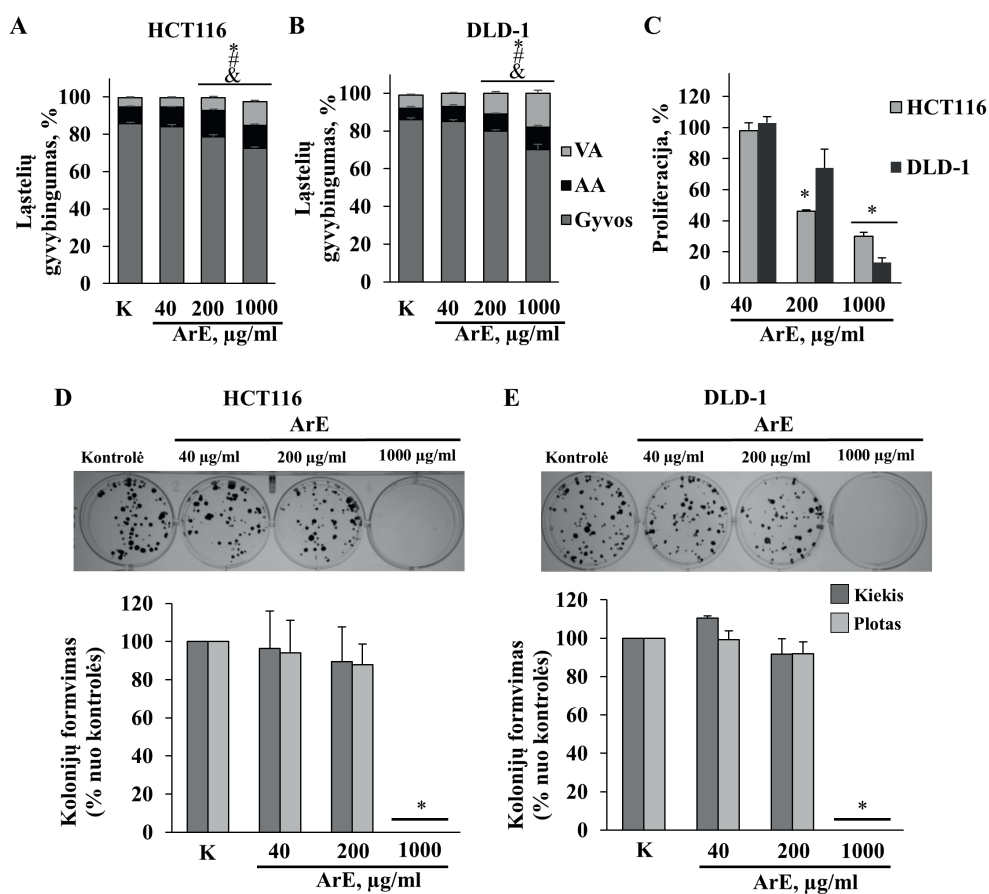


8 pav. *SpE poveikis HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumui, proliferacijai ir kolonijų formavimui*

SpE poveikis ląstelių gyvybingumui ir proliferacijai buvo matuojamas tėkmės citometrijos metodu po 24 valandų poveikio. SpE poveikio HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumui (A, B) ir proliferacijai (C) apibendrinimas ($n = 3$). SpE poveikio HCT116 (D) ir DLD-1 (E) ląstelių kolonijų skaičiui ir plotui apibendrinimas. Tipiniai kolonijų susidarymo vaizdai kontrolinėje grupėje ir su SpE po 7 dienų poveikio pateikti virš kolonijų formavimo diagramų. Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. *, #, & $p < 0,05$ lyginant su kontrole. * – gyvos ląstelės, # – ankstyvoji apoptozė (AA), & – vėlyvoji apoptozė (VA).

Toliau buvo ištirtas ArE poveikis kolorektalinio naviko ląstelių gyvybingumui. Paveikus ląsteles 24 val. 200 ir 1000 $\mu\text{g/ml}$ ArE, stebėjome padidėjusias ankstyvosios ir vėlyvosios apoptozės ląstelių frakcijas abiejose ląstelių linijose (9A,B pav.). Ląstelių proliferacijos slopinimas po veikimo 1000 $\mu\text{g/mL}$ ArE buvo stebėtas abiejose ląstelių linijose, o 200 $\mu\text{g/mL}$ mažino tik HCT116 ląstelių proliferaciją (9C pav.). Inkubacija su 1000 $\mu\text{g/mL}$

ArE visiškai sustabdė tiek HCT116, tiek DLD-1 ląstelių kolonijų formavimąsi, o mažesnės ArE koncentracijos poveikio nesukėlė (9D,E pav.).

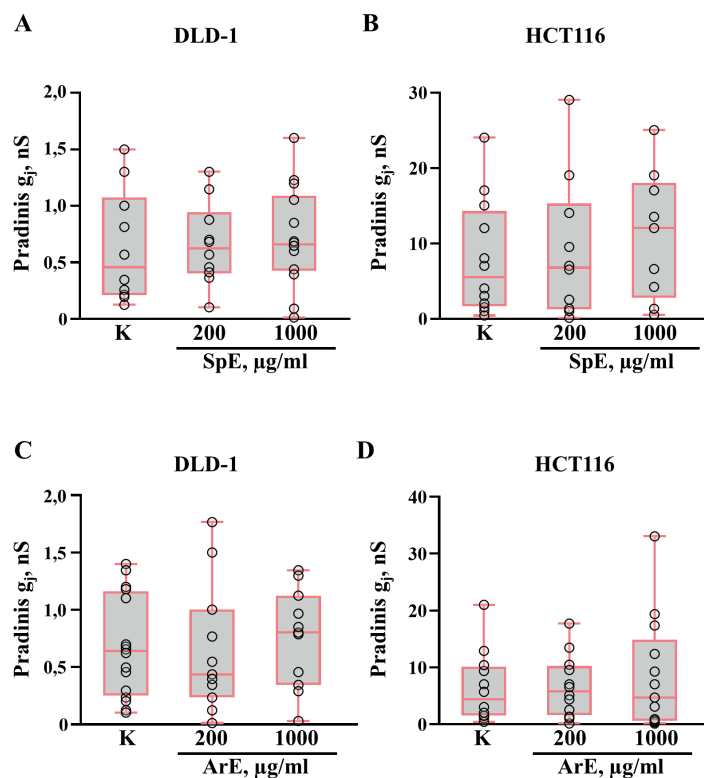


9 pav. ArE poveikis HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumui, proliferacijai ir kolonijų formavimui

ArE poveikis ląstelių gyvybingumui ir proliferacijai buvo matuojamas tėkmės citometrijos metodu po 24 valandų poveikio. ArE poveikio HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumui (A, B) ir proliferacijai (C) apibendrinimas ($n = 3$). ArE poveikio HCT116 (D) ir DLD-1 (E) ląstelių kolonijų skaičiui ir plotui apibendrinimas. Tipiniai kolonijų susidarymo vaizdai kontrolinėje grupėje ir su ArE po 7 dienų poveikio pateikti virš kolonijų formavimo diagramų. Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. *, #, & $p < 0,05$ lyginant su kontrole. * – gyvos ląstelės, # – ankstyvoji apoptozė (AA), & – vėlyvoji apoptozė (VA).

Gauti rezultatai atitinka literatūroje aprašytus duomenis ir rodo, kad ekstraktai mažina navikinių ląstelių gyvybingumą bei proliferaciją, tikėtina, dėl jų polifenoliais, antocianinais ir kitais bioaktyviais junginiais turtingos sudėties.

Literatūroje yra duomenų, kad ląstelės, pasižyminčios labai mažu koneksinų kiekiu, veikiamos tam tikromis bioaktyviomis medžiagomis gali aktyvuoti konkesinų sintezę ir net formuoti funkcionalias PJ [150,151]. Pavyzdžiui, tyrimais su MCF-7 ląstelėmis nustatyta, kad vynuogių sėklų ekstraktas skatina Cx43 ekspresiją ir PJTR atsiradimą, kurio kontrolinėmis sąlygomis nebuvo [151]. HCT116 ir DLD-1 ląstelės taip pat pasižymi labai maža Cx43 ekspresija ir neformuoja funkcionalių PJ [153,154], tai patvirtino ir mūsų tyrimai (žr. žemiau 32 pav.). Imunocitocheminė analizė parodė, kad HCT116 ląstelės tik retais atvejais formuoja ypatingai mažas PJP (žr. žemiau 31 pav.). Siekdami įvertinti galimą SpE ir ArE įtaką PJ dydžiui ar funkcionalumui (PJ laidumas nebūtinai tiesiogiai priklauso nuo PJP dydžio, nes tik nedidelė dalis kanalų, esančių PJP, būna funkcionalūs) [23], atlikome ilgalaikio (24 val.) poveikio tyrimus, matuodami Cx43 PJ_pg_j. Mūsų gauti rezultatai parodė, kad SpE ir ArE nesukėlė reikšmingų pokyčių HCT116 ir DLD-1_pg_j (10 pav.).

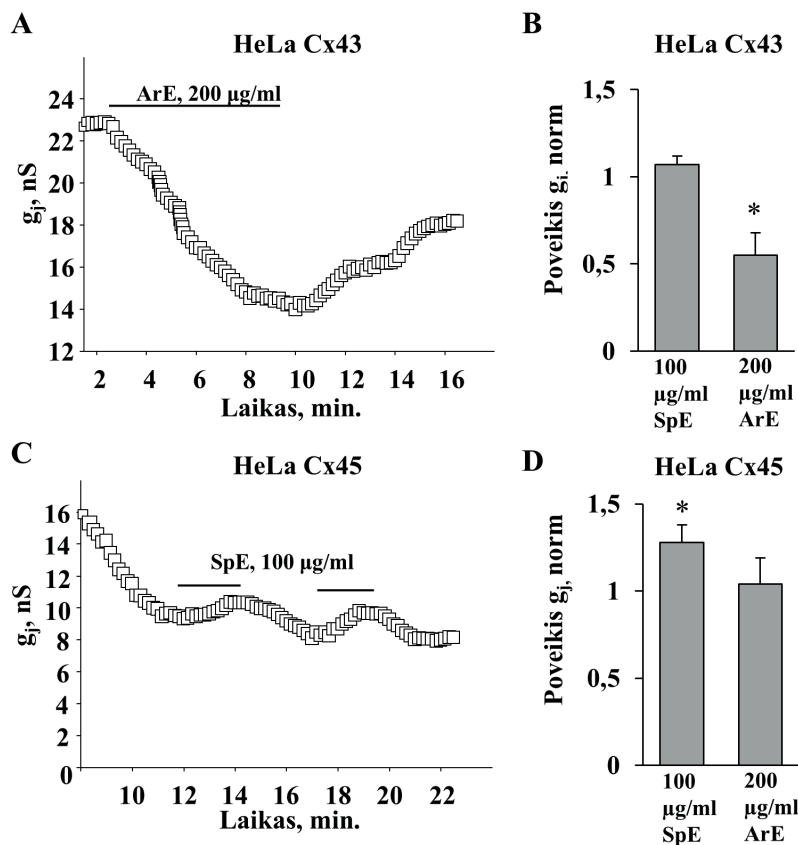


10 pav. Pradinis PJ laidumas, išmatuotos atsitiktinai atrinktose DLD-1 ir HCT116 ląstelių porose

DLD-1 (A) ir HCT116 (B) ląstelių PJ_pg_j, paveikus jas SpE. DLD-1 (C) ir HCT116 (D) ląstelių PJ_pg_j, paveikus jas ArE. Reikšmių skirstinių palyginimui tarp grupių taikytas Mann-Whitney U kriterijus.

3.2.2. SpE ir ArE tiesioginis poveikis Cx43 ir Cx45 PJ laidumui

Remiantis prieš tai gautais rezultatais nusprendėme, kad tolimesnius tyrimus su SpE ir ArE būtų tikslinga atlikti su modelinėmis HeLa ląstelių linijomis, ekspresuojančiomis egzogeninius Cx43 ir Cx45. Priešingai nei kolo-rektalinio naviko ląstelėse, SpE ir ArE pasižymėjo skirtingu poveikiu Cx43 ir Cx45 PJ g_j . Nustatėme, kad ArE slopino Cx43 g_j (11A,B pav.), bet neturėjo įtakos Cx45 laidumui, o SpE stimuliuo Cx45 g_j (11C,D pav.), bet neturėjo įtakos Cx43 laidumui HeLa ląstelėse.

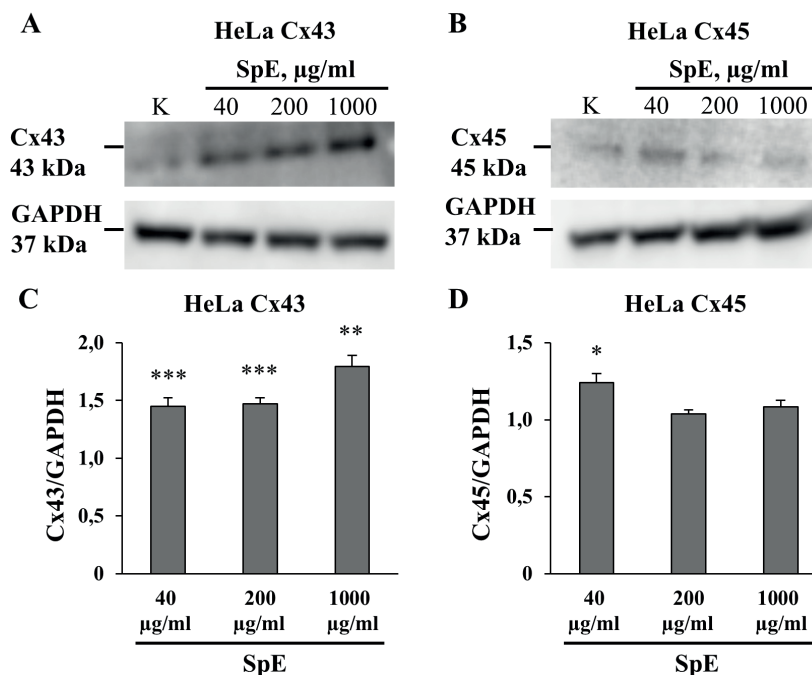


11 pav. ArE ir SpE poveikis Cx43 ir Cx45 PJ laidumui

ArE poveikis Cx43 g_j HeLa Cx43 (A,B) ir SpE poveikis Cx45 g_j (C,D) HeLa ląstelėse, $n = 3$. Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. * $p < 0,05$ lyginant su kontrole.

3.2.3. SpE poveikis HeLa ląstelių egzogeninių Cx43 ir Cx45 baltymų ekspresijai, PJP dydžiui ir ląstelių gyvybingumui

Mūsų rezultatai parodė, kad SpE ir ArE moduliavo PJ laidumą, priklausomai nuo koneksino tipo. Atsižvelgiant į tai, kad, skirtingai nei ArE, SpE mažomis koncentracijomis stimuliuo Cx45 PJ g_j, o stimuliuojantis biologiškai aktyvių medžiagų poveikis literatūroje sutinkamas žymiai rečiau, nei slopinantis, tolimesni tyrimai buvo atlikti būtent su šiuo ekstraktu. Tyrėme SpE poveikį koneksinų ekspresijai ir PJP dydžiui.

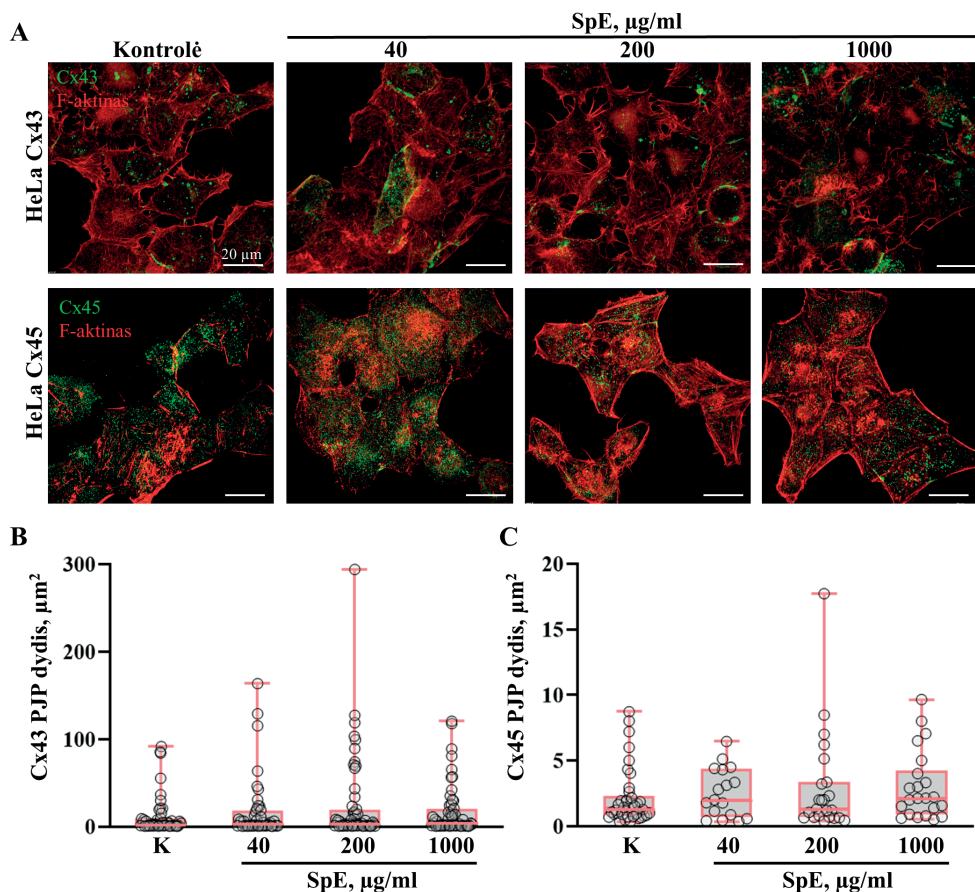


12 pav. SpE poveikis Cx43 ir Cx45 baltymų ekspresijai

Tipiniai imunobloto vaizdai, rodantys bendrą Cx43 (A) ir Cx45 (B) baltymų lygį kontrolėje ir po 24 val. poveikio SpE nurodytomis koncentracijomis. Stulpelinėse diagramose pavaizduoti Cx43 (C) ir Cx45 (D) baltymų kiekio pokyčiai (n = 3). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 lyginant su kontrole.

Gauti rezultatai parodė, kad tik 40 µg/ml SpE sukėlė Cx45 ekspresijos padidėjimą, o Cx43 ekspresiją reikšmingai didino visos tirtos SpE koncentracijos (12 pav.). PJTR reguliavimas dažnai siejamas su Cx ekspresijos ir PJP dydžio pokyčiais [14]. Tarpusavyje PJ g_j ir PJP dydis yra glaudžiai susiję, nes PJP dydis atspindi struktūrinį individualių funkcinį kanalų susitelkimą, kuris gali tiesiogiai lemti elektrinį ir metabolinį ryšį. Įprastai stebima stipri teigiama koreliacija: didesnės PJP, turinčios didesnes funkcionalių Cx kanalų

sankaupas, lemia didesnę PJ g_j. Tačiau šis ryšys yra sudėtingas, nes bendras laidumas priklauso ne tik nuo PJP dydžio, bet ir nuo kanalų atviros būsenos tikimybės, ir funkcionalių kanalų skaičiaus – mūsų ankstesni tyrimai parodė, kad tik nedidelė kanalų, esančių PJP, dalis yra funkcionalūs [64,65,156,157]. Siekiant nustatyti SpE įtaką Cx43 bei Cx45 PJP dydžiui, atlikome PJP vaizdų analizę.

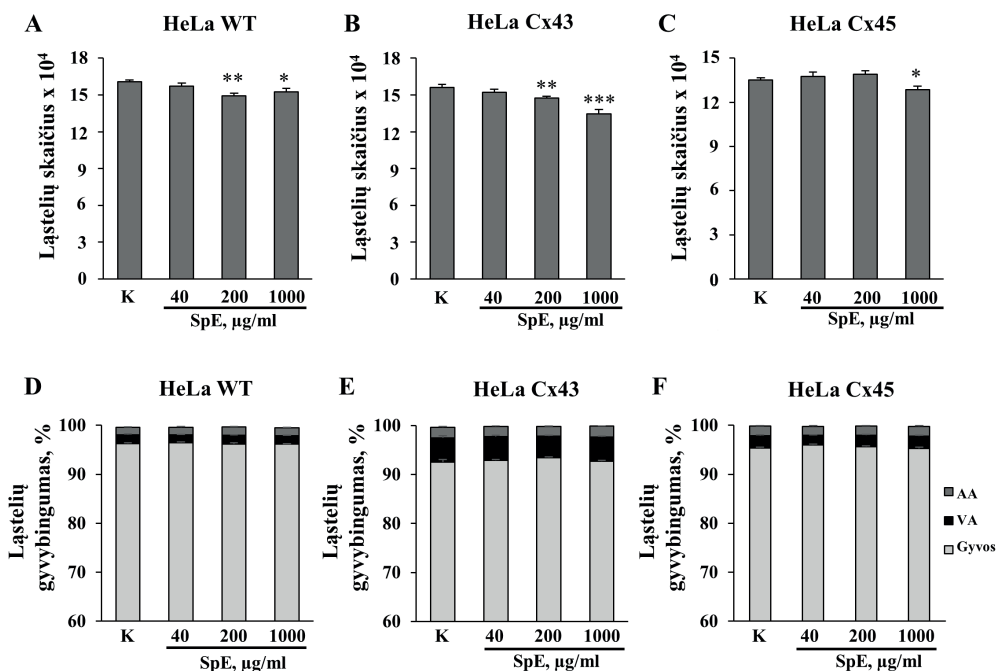


13 pav. SpE poveikis Cx43 ir Cx45 PJP dydžiui HeLa ląstelėse

Tipiniai PJP imunofluorescencijos vaizdai tarp HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių kontrolinėmis sąlygomis ir po 24 valandų SpE poveikio nurodytomis koncentracijomis (A). SpE poveikio Cx43 (B) ir Cx45 (C) PJP dydžiui apibendrinimas. Raudonos horizontalios juostos rodo vidutines vertes. Reikšmių skirstinių palyginimui tarp grupių taikytas Mann-Whitney U kriterijus.

Skirtingai nei buvo tikėtasi, nei Cx43, nei Cx45 ekspresijos padidėjimas (12 pav.) ir g_j stimuliavimas (11 pav.) nesukėlė PJP dydžio pokyčių HeLa ląstelėse (13 pav.).

Tolimesniais tyrimais mes siekėme išsiaiškinti, kaip SpE veikia HeLa ląstelių dalijimąsi ir gyvybingumą, priklausomai nuo koneksino ekspresijos (ekspresuojančios koneksiną vs. neekspresuojančios) ir koneksino tipo (Cx43 vs. Cx45).



14 pav. SpE poveikis HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui

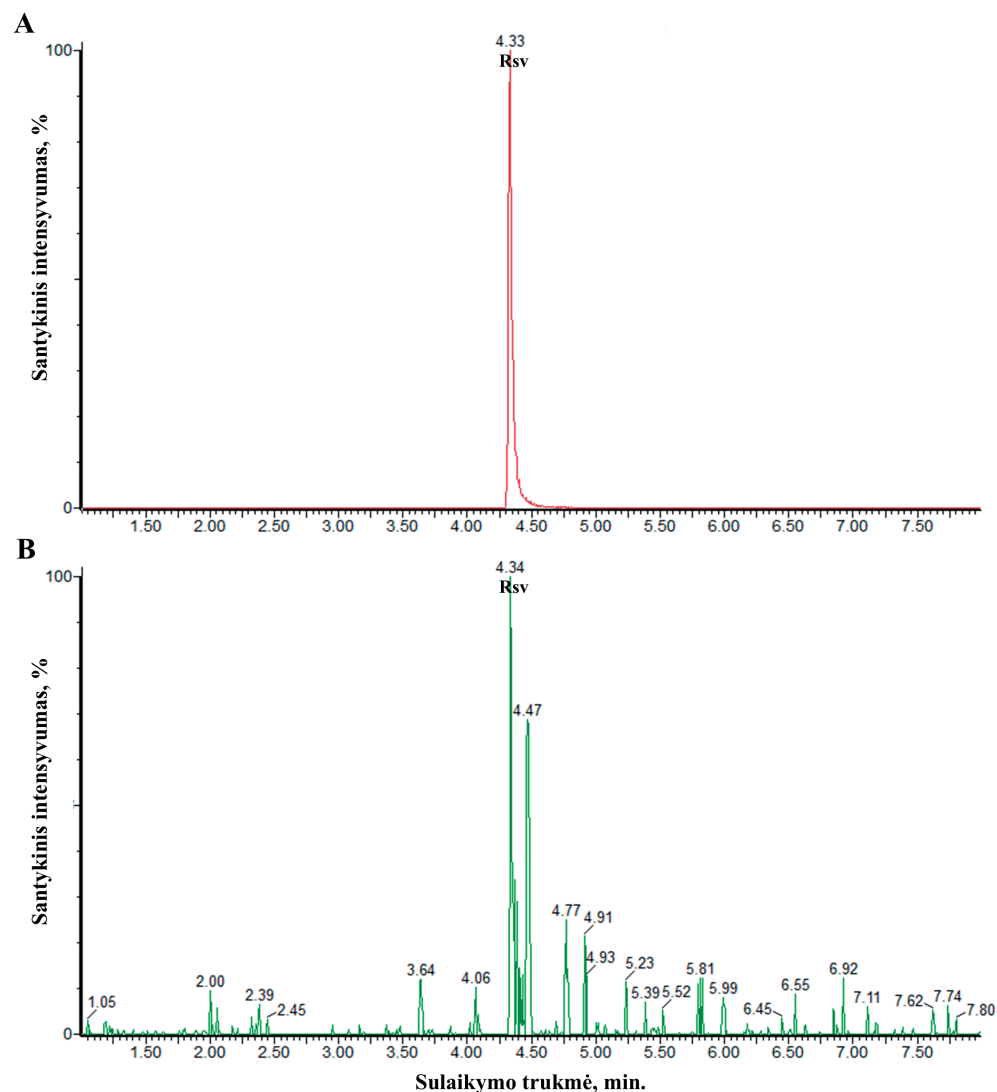
SpE sukelti pokyčiai HeLa WT (A), HeLa Cx43 (B) ir HeLa Cx45 (C) ląstelių proliferacijai po 24 val. poveikio. SpE poveikis HeLa WT (D), HeLa Cx43 (E) ir HeLa Cx45 (F) ląstelių gyvybingumui, lyginant su kontrole (n = 3). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 lyginant su kontrole. AA – ankstyva apoptozė, VA – vėlyva apoptozė.

Tyrėme SpE poveikį HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui tėkmės citometrijos metodu ir nustatėme, kad 200 μg/ml SpE sulėtino HeLa WT ir HeLa Cx43 ląstelių proliferaciją, o 1000 μg/ml SpE sumažino visų tirtų ląstelių proliferaciją (14A–C pav.). Tačiau SpE neturėjo įtakos nei HeLa WT, nei HeLa Cx43 ar HeLa Cx45 ląstelių gyvybingumui (14D–F pav.).

3.2.4. SpE sudedamųjų dalių tyrimai

Tyrimuose su augaliniais ekstraktais (NEO, ArE ir SpE), tikėtina, kad buvo stebimas kelių junginių suminis ar sinerginis poveikis ląstelių funkcijoms (sk. 3.1.1–3.2.3). Kelių atskirų NEO sudedamųjų dalių (α pineno, sabineno, α kopaeno) analizę atliko laboratorijos kolegos [90,158,159]. Šiame darbe PJ laidumo, Cx ekspresijos, ląstelių gyvybingumo ir kiti tyrimai buvo tęsiami su viena iš ypač dideliu biologiniu aktyvumu pasižyminčia ir SpE sudėtyje esančia bioaktyviąja medžiaga – polifenoliu resveratroliu. Resveratrolis pastaruoju metu yra itin populiarius tyrimų objektas dėl plataus spektro naudingų biologinių savybių, ypač antioksidacinio ir priešuždegiminio poveikio, tačiau jo veikimo mechanizmai nėra pilnai ištirti.

KTU mokslininkai atliko SpE sudėtinių dalių analizę [160] (3 lentelė), daugiausia dėmesio skirdami antocianinų klasės junginių nustatymui, taip pat SpE aptinkamos fenolinės ir organinės rūgštys bei kt., tačiau dalis sudedamųjų komponentų liko neidentifikuoti. Tokius rezultatus galėjo lemti tai, kad ekstraktų sudėties identifikavimas tiesiogiai priklauso nuo taikyto ekstrakcijos metodo ir masės spektrometrijos (MS) analizės sąlygų. Mes papildomai atlikome UESC analizę (15 pav.) ir nustatėme, kad resveratrolio koncentracija SpE siekė 309,615 ng/g, o ši reikšmė atitinka literatūroje pateikiamas kitų autorių nustatytas koncentracijas [161].



15 pav. Kiekybinė resveratrolio (*Rsv*) MS analizė SpE

(A) Resveratrolio standartas, sulaikymo laikas 4.33. (B) MS spektras resveratroliui SpE.
Resveratrolio sulaikymo laikas 4.34

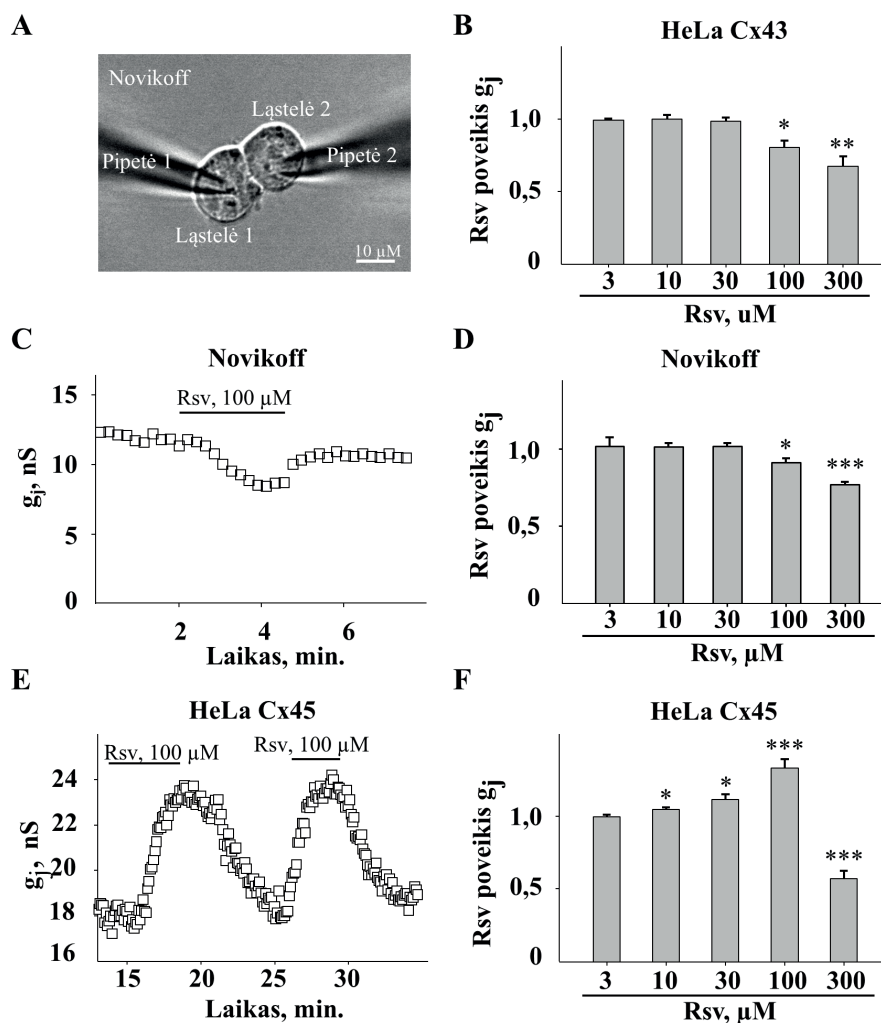
Svarbu pabrėžti, kad spanguolės nėra pagrindinis resveratrolio šaltinis (palyginti su vynuogėmis ar raudonuoju vynu), todėl nustatomi kiekiai paprastai yra ng/g lygmens, o ne µg/g. Nors resveratrolio koncentracija SpE nėra didelė, tačiau ir nedidelės šio junginio koncentracijos gali turėti esminį poveikį ląstelių savybėms, priklausomai nuo IC_{50} ar EC_{50} , kurias padeda nustatyti molekulinio modeliavimo tyrimai.

3.3. Resveratrolio įtaka PJTR ir ląstelių gyvybingumui

3.3.1. Resveratrolio poveikis Cx43 ir Cx45 plyšinių jungčių laidumui

Resveratrolio poveikiui PJ laidumui įvertinti buvo pasitelktas dvigubas visos ląstelės fiksuotos įtampos metodas. Yra žinoma, kad resveratrolis gali moduluoti PJTR [162]. Svarbu paminėti, kad ankstesni kitų autorių tyrimai resveratrolio poveikio tarpląstelinio ryšio nustatymui apsiribojo molekuliniais arba dažo sklidimo per žaizdą metodais ir PJ laidumas nebuvo tirtas tiesioginiu elektrofiziologiniu metodu.

Gauti rezultatai parodė, kad tiek Novikoff tiek HeLa Cx43 ląstelėse resveratrolis neturėjo jokio poveikio Cx43 PJ g_j mažomis koncentracijomis (3, 10, 30 μM) ir slopino laidumą didesnėmis koncentracijomis (100 ir 300 μM). HeLa ląstelėse, ekspresuojančiose Cx45, buvo gautas priešingas efektas – resveratrolis stimuliavo g_j esant 10–100 μM , bet jį slopino veikiant 300 μM resveratroliu (16 pav.).



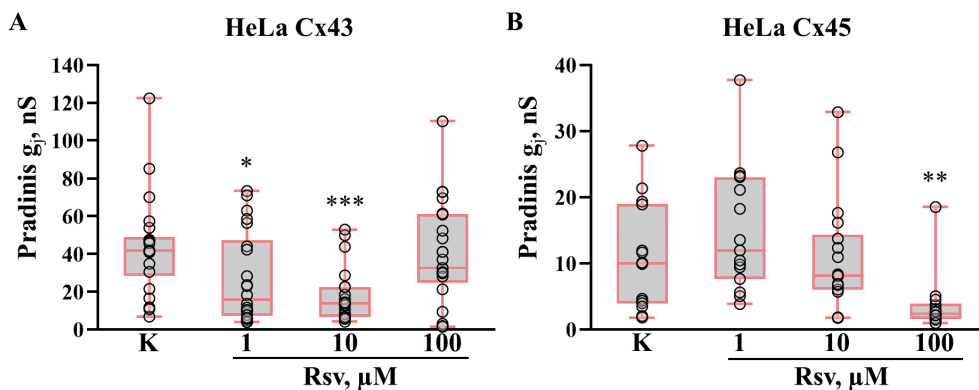
16 pav. Resveratrolio poveikis Cx43 ir Cx45 PJ laidumui

(A) PJ laidumas (g_j) tarp gretimų ląstelių buvo išmatuotas, naudojant dvigubą visos ląstelės fiksuotos įtampos metodą. Resveratrolio poveikis Cx43 g_j HeLa Cx43 (B) ir Novikoff (C, D) ląstelėse. Resveratrolio poveikis Cx45 g_j (E, F) ($n = 4$). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole.

Svarbu pabrėžti, kad resveratrolis naudotomis mažesnėmis (10–100 μ M) koncentracijomis stimuliuoja Cx45 PJ laidumą. Tokį pat poveikį Cx45 PJ g_j sukėlė ir SpE, todėl galime daryti prielaidą, jog šis poveikis gali būti susijęs su ta pačia veikliąja medžiaga.

Resveratrolio poveikis PJTR priklausė nuo veikimo trukmės, koncentracijos ir koneksino tipo. Pavyzdžiui, nustatyti skirtingi trumpalaikiai ir ilgai-

kiai resveratrolio poveikiai: mažų resveratrolio koncentracijų 15 min. poveikis tiesiogiai Cx43 PJ laidumo nekeitė, tačiau po 24 val. ląstelių inkubavimo su šia resveratrolio koncentracija išmatuotas PJ g_j buvo sumažėjęs. Tačiau 100 μ M resveratrolio tiesioginis 15 min. poveikis laidumą slopino, bet 24 val. inkubavimas Cx43 PJ g_j nepakeitė. Tuo tarpu, 15 min. veikimas su 10–100 μ M resveratrolio Cx45 PJ g_j didino, tačiau tik po 24 val. inkubavimo su 100 μ M resveratrolio Cx45 PJ g_j buvo sumažėjęs (16 pav., 17 pav.).



17 pav. Pradinis Cx43 (A) ir Cx45 (B) PJ laidumas po 24 val. preinkubavimo su resveratroliu

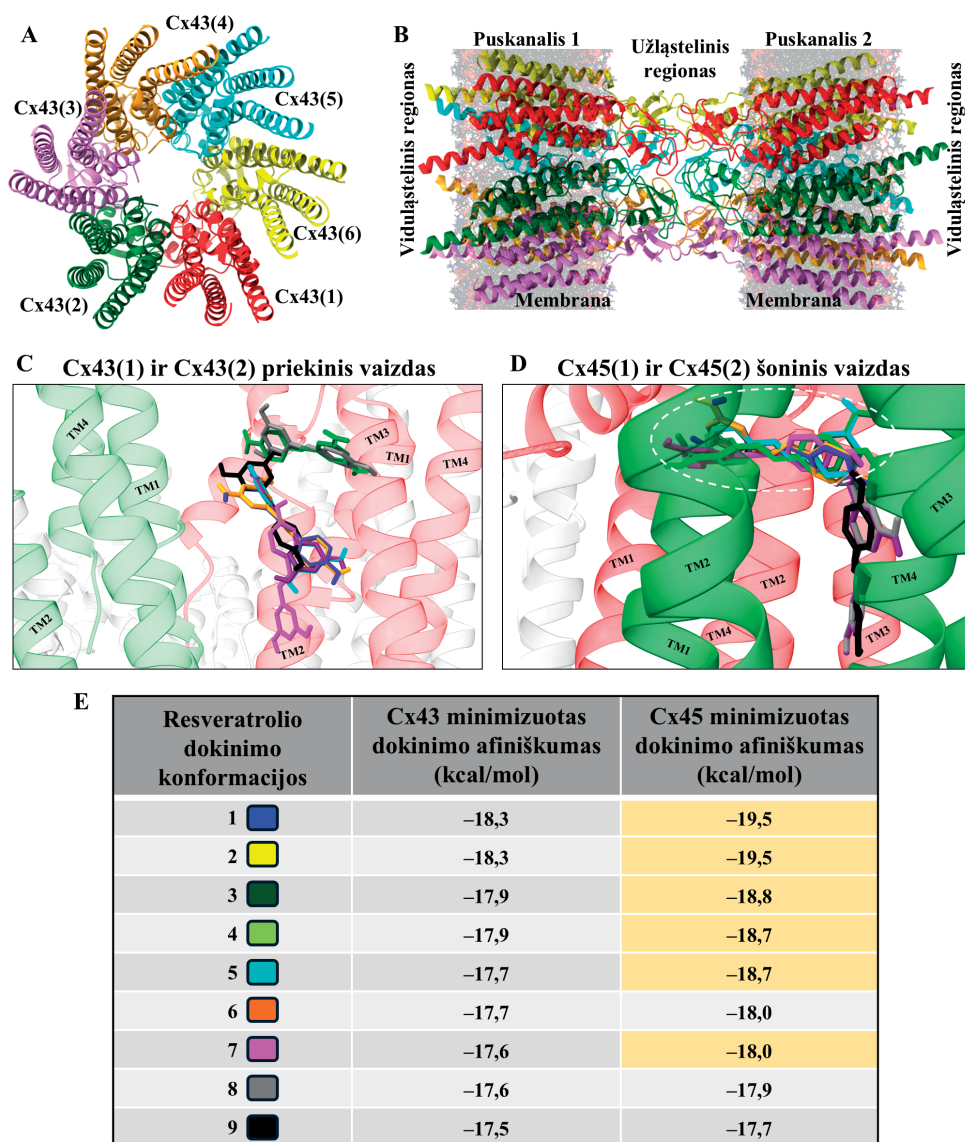
Duomenys surinkti iš mažiausiai trijų biologinių pakartojimų. Reikšmių skirstinių palyginimui tarp grupių taikytas Mann-Whitney U kriterijus. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole.

300 μ M resveratrolio turėjo neigiamą poveikį ląstelių gyvybingumui, todėl ilgalaikio (24 val.) poveikio tyrimų su šia resveratrolio koncentracija netęsėme.

3.3.2. Resveratrolio molekulinio dokininimo vietos Cx43 ir Cx45 baltymuose

Kaip parodyta 16 pav., resveratrolis turėjo skirtingą poveikį Cx43 ir Cx45 PJ g_j . Mažomis koncentracijomis resveratrolis stimuliavo tik Cx45 PJ g_j , bet didesnėmis koncentracijomis slopino tiek Cx45, tiek Cx43 PJ laidumą. Padarėme prielaidą, kad Cx45 turėtų pasižymėti dviem skirtingais dokininimo profiliiais: pirmasis – didelio giminingumo dokininimosi vietos, atsakingos už g_j stimuliavimą, ir antrasis – mažo giminingumo dokininimosi vietos, atsakingos už g_j slopinimą. Norėdami patikrinti šią hipotezę, atlikome molekulinio dokininimo eksperimentus. 18A pav. pateiktas PJ puskanalio, sudaryto iš šešių Cx43 subvienetų (subvienetų skaičius nurodytas skliaustuose), vaizdas iš viršaus, o 18B pav. pateiktas PJ kanalo, sudaryto iš dviejų greta esančių puskanalių,

vaizdas iš šono. Buvo išanalizuotos devynios palankiausios jungimosi prie Cx43 ir Cx45 konformacijos. Nustatėme, kad Cx43 jos visos lokalizuojasi viename subvienete ant TM2 ir TM3 membranos (ne kanalo poros) pusėje (18C pav.) su dokinimosi energija nuo $-17,5$ iki $-18,3$ kcal/mol (18E pav., kuo labiau neigiama reikšmė, tuo stipresnė resveratrolio ir koneksino sąveika). Tuo tarpu, Cx45 buvo aiškiai matomi du skirtingi dokinimosi klasteriai, kurių pirmąjį sudarė trys žemos energijos vietos nuo $-17,7$ iki $-18,0$ kcal/mol, esančios PJ membranos pusėje (18D pav.), panašiai, kaip ir Cx43, o antrąjį – šešios didelės energijos vietos, iš kurių penkių dokinimosi energija yra nuo $-18,7$ iki $-19,5$ kcal/mol, įsiterpusios tarp TM2 ir TM3 nišoje link kanalo poros (18D pav. apvesta punktyrine linija), jos 18E pav. pažymėtos geltona spalva. Tai rodo, kad didesnio giminingumo dokinimosi vietos Cx45 nišoje, kurių nėra Cx43, galėtų būti atsakingos už Cx45 PJ g_j stimuliavimą, naudojant mažesnes resveratrolio koncentracijas, kaip parodyta 16E,F pav., o mažesnio giminingumo dokinimosi vietos, kurios yra panašios abiejuose koneksinuose, yra atsakingos už g_j slopinimą. Palankiausios aminorūgščių liekanos resveratrolio dokinimui nišoje yra Ile82 ir Thr86 Cx45(1) TM2 ir Val27 Cx45(2) TM1 (18C,D pav.).



18 pav. Resveratrolio sąveika su Cx43 ir Cx45 subvienetais

Cx43 PJ vaizdas iš viršaus (A) ir iš priekio (B), pateiktas be koneksinų viduląstelinio N ir C galo (Cx43 subvieneto numeris nurodytas skliaustuose). Devynios geriausios resveratrolio dokinimo konformacijos su Cx43 (C) ir Cx45 (D) subvienetais (TM1–TM4 yra koneksinų transmembraniniai domenai). Minimalizuotos resveratrolio dokinimosi energijos prie kiekvienos iš devynių prisijungimo vietų ant Cx43 ir Cx45 (E). Labiau neigiama vertė rodo stipresnę resveratrolio ir koneksino sąveiką. Dokinimosi vietos, esančios nišoje tarp Cx45 subvienetų (apibrėžtos balta punktyrine linija D), pasižymi didesniu giminingumu resveratroliui (pažymėtos geltona spalva E).

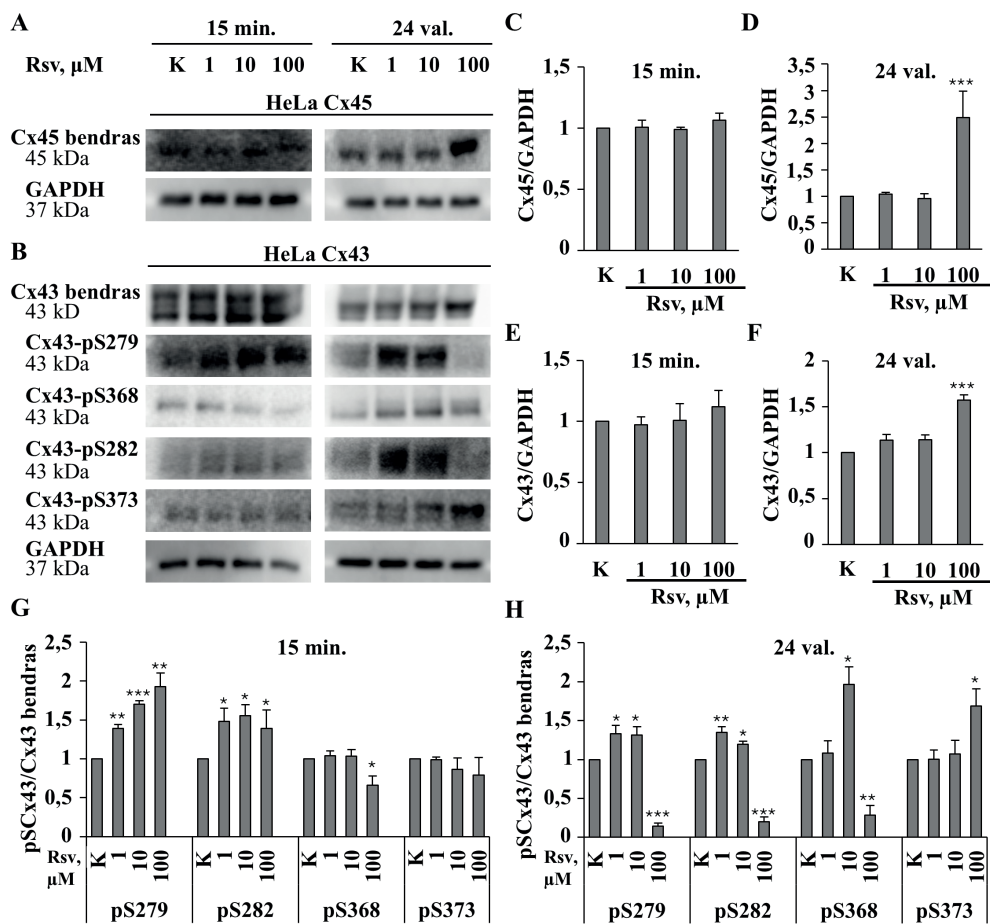
3.3.3. Resveratrolio poveikis Cx43 ir Cx45 ekspresijai ir PJP dydžiui

Atliktų tyrimų duomenys leidžia teigti, kad resveratrolis sukėlė nuo koneksino tipo priklausomus pokyčius g_j (16 pav.) ir p_j slopinimą (17 pav.). Toliau tyrėme resveratrolio poveikį Cx43 ir Cx45 ekspresijai ir PJP dydžiui.

Kiekybinis koneksinų baltymų vertinimas imunoblotingo metodu buvo atliktas po 15 min. (laikas, reikalingas pasiekti nusistovėjusią būseną, atliekant fiksuotos įtampos matavimus) ir po 24 val. inkubacijos su resveratroliu. Resveratrolio 15 min. poveikis neturėjo įtakos bendram Cx43 ir Cx45 baltymų ekspresijos lygiui, nepriklausomai nuo taikytos koncentracijos. Po 24 val. 1 ir 10 μ M resveratrolio poveikis bendram Cx43 ir Cx45 baltymų kiekiui nebuvo nustatytas, tačiau 100 μ M resveratrolio didino abiejų baltymų kiekį atitinkamai ~1,6 ir ~2,5 karto (19A,D,B,F pav.).

Žinoma, kad PJ sintezę, ekspresiją, apykaitą ir funkciją reguliuoja koneksinų specifinių aminorūgščių liekanų fosforilinimas [158]. Atsižvelgiant į tai, tyrėme Cx43 fosforilinimo pokyčius S279, S282, S368 ir S373 liekanose, siejamose su PJ ekspresijos ir funkcijos reguliavimu [20]. Gauti rezultatai sutapo su elektrofiziologiniais ir imunocitochemijos metodais gautais duomenimis. Žinoma, jog Cx43 fosforilinimas S279 ir S282 liekanose slopina PJ laidumą, o S373 fosforilinimas siejamas su padidėjusiomis PJP [48]. Mūsų tyrime stebėtas Cx43 PJ g_j sumažėjimas, remiantis literatūros duomenimis, gali būti susijęs su padidėjusia fosforilintų Cx43 formų, pS279 ir pS282, ekspresija abiem laiko periodais. Be to, pS373 fosforilinimo padidėjimas koreliuoja su didesnių Cx43 PJP susidarymu po 24 valandų veikimo 100 μ M resveratroliu. Kita gerai žinoma fosforilinimo vieta, susijusi su PJTR reguliavimu, yra S368 liekana [163]. Šios liekanos fosforilinimas veikia PJ laidumą ir mažina PJTR tarp kardiomiocitų dėl PJ internalizacijos [164]. Mes nustatėme, kad S368 fosforilinimas sumažėjo po 15 min. ir 24 val. poveikio 100 μ M resveratroliu, o po 24 val. poveikio 10 μ M resveratroliu buvo pastebėtas du kartus padidėjęs S368 fosforilinimas (19B,G,H pav.). Priešingai nei Cx43, yra nustatyta tik keletas Cx45 fosforilinimo vietų [20] ir iki šiol nebuvo įrodyta jokių nuo fosforilinimo priklausančių pokyčių Cx45 PJ g_j .

Šie duomenys rodo, kad atsakas į poveikį priklauso nuo koneksino tipo, veikimo stiprumo ir trukmės. Be to, PJ laidumas ir (arba) koneksinų transportavimas gali būti reguliuojami per antrinių mediatorių kelius ir kelių kinazių bendrą veikimą bei Cx43 C galo fosforilinimo procesus [48].

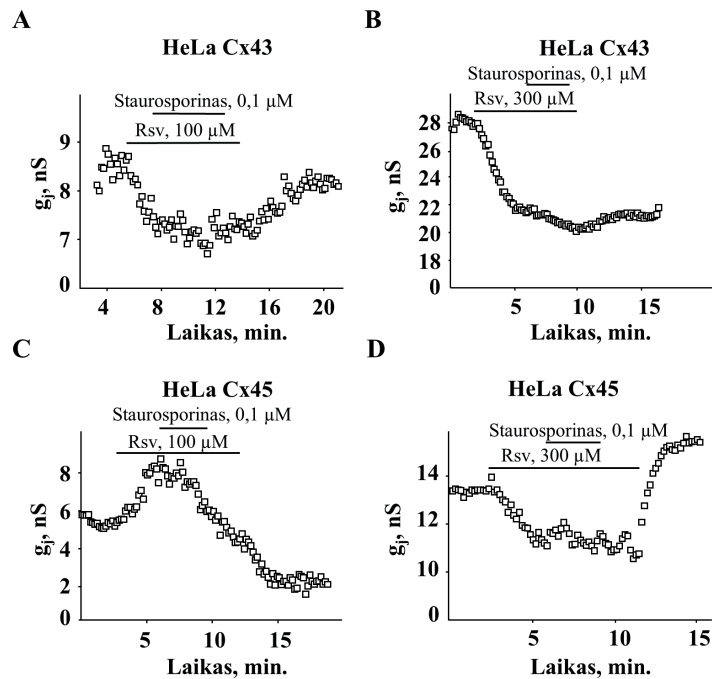


19 pav. Resveratrolio poveikis Cx43 ir Cx45 baltymų ekspresijai

Tipiniai imunobloto vaizdai, rodantys bendrą Cx45 (A) ir Cx43 baltymų lygį kartu su fosforilintų Cx43/bendro Cx43 santykiu (B) po 15 min. ir 24 val. poveikio resveratroliu nurodytomis koncentracijomis. Stulpelinėse diagramose pavaizduoti Cx45 (C, D), Cx43 (E, F) ir Cx43 fosforilintų formų (G, H) baltymų kiekių pokyčiai. Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole.

Sąsaja tarp Cx45 fosforilinimo ir Cx45 PJ savybių iš esmės nėra pakankamai ištirta dėl specifinių antikūnų trūkumo. Šiame tyrime buvo nagrinėtas resveratrolio poveikis tik bendrai Cx45 ekspresijai (19A,C,D pav.), tačiau bendrą baltymų kinazių aktyvumo poveikį PJ laidumui galima tirti naudojant kinazių inhibitorius. Laboratorijos kolegos anksčiau parodė, kad tam tikrų junginių potencija gali būti alosteriškai moduluojama, nuo Ca^{2+} priklausančioms kinazėms fosforilinant Cx43 C-galą [158]. Kadangi nustatėme, jog resveratrolis sukelia Cx43 C galo vietų fosforilinimo pokyčius (19B,G,H pav.),

tolimesniais tyrimais siekėme įvertinti resveratolio potencijos priklausomybę nuo Cx fosforilinimo. Staurosporinas, neselektyvus kinazių inhibitorius, neturėjo įtakos nei slopinančiam resveratolio poveikiui Cx43 PJ g_j (20A,B pav.), nei jo stimuliuojančiam bei slopinančiam poveikiui Cx45 PJ g_j (20C,D pav.).

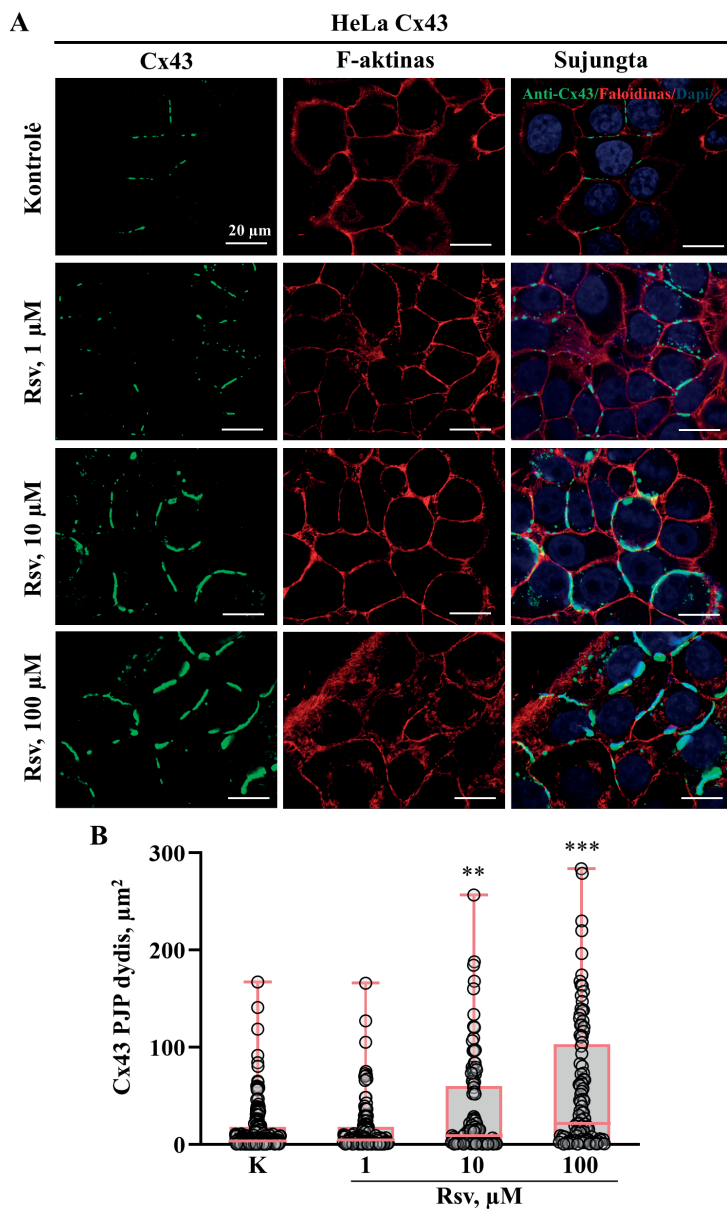


20 pav. Resveratolio poveikis Cx43 ir Cx45 PJ laidumui nepriklauso nuo kinazių aktyvumo

Staurosporinas nmoduliuoja resveratolio poveikio Cx43 (A, B) ir Cx45 (C, D) PJ g_j ($n = 4$ kiekvienai eksperimentų serijai).

Sekančiame tyrimų etape įvertinome, ar resveratrolis gali sukelti PJP dydžio pokyčius. Nors koneksinų ekspresijos pokyčiai buvo pastebėti tik po 24 val. poveikio 100 μ M resveratoliu tiek HeLa Cx43, tiek HeLa Cx45 ląstelėse (19 pav.), g_{PJ} pasikeitė net po 1 ir 10 μ M naudojimo HeLa Cx43 (17A pav.). HeLa Cx43 ląstelių 24 val. inkubacija su 10 ir 100 μ M resveratoliu lėmė išskirtinai didelių PJP susiformavimą (21 pav.). Cx43 PJP dydis po poveikio 10 ir 100 μ M resveratoliu padidėjo atitinkamai 1,5 ir 4,5 karto. Pažymėtina, kad pradinis Cx43 PJ g_j po 24 val. veikimo 1 ir 10 μ M resveratoliu sumažėjo (17A pav.), bet 10 μ M padidino, tačiau 1 μ M neturėjo jokio poveikio PJP dydžiui. Atsižvelgiant į ankstesnius tyrimus, buvo tikėtasi PJP sumažėjimo, tačiau šiuos rezultatus iš dalies galima paaiškinti padidėjusiu S279 ir

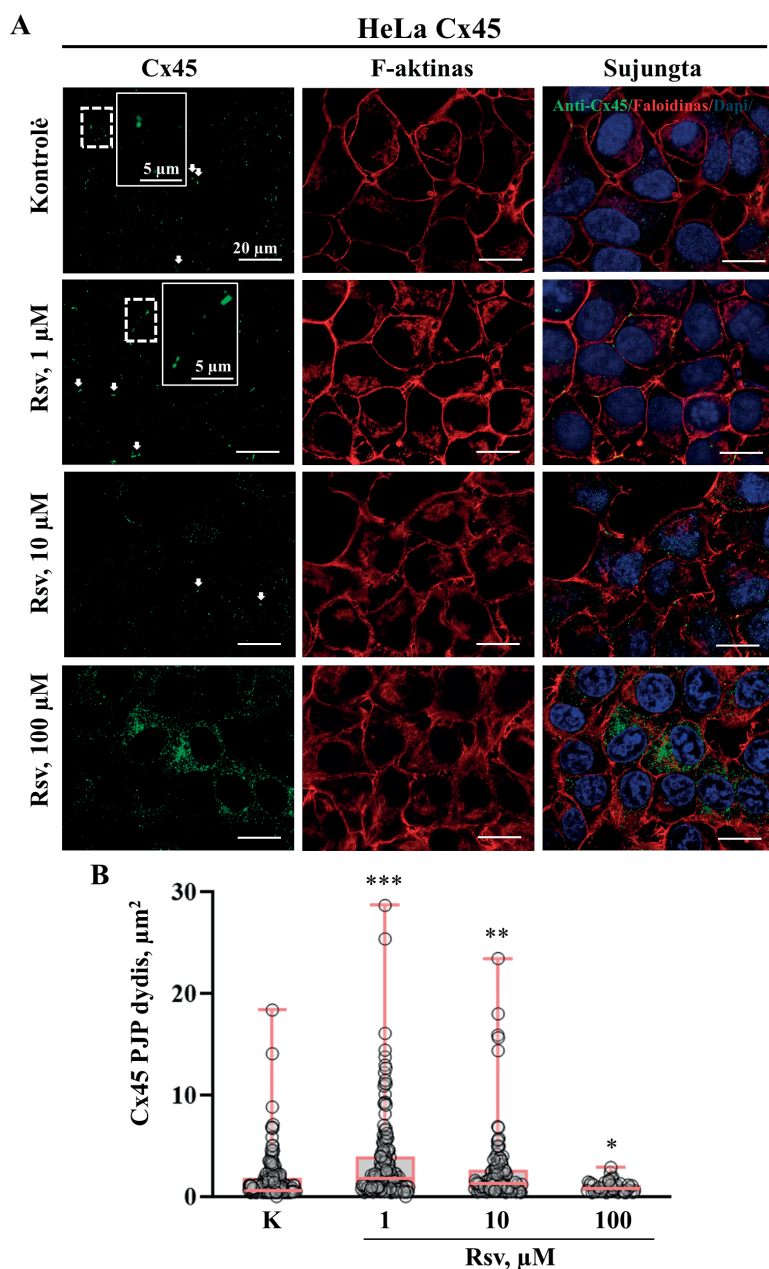
S282 fosforiliniu (19 pav.), kuris galėjo būti atsakingas už sumažėjusį Cx43 PJ g_i (17 pav.).



21 pav. Resveratrolio poveikis Cx43 PJP dydžiui HeLa ląstelėse

Tipiniai PJP imunofluorescencijos vaizdai HeLa Cx43 (A) ląstelėse kontrolinėmis sąlygomis ir po 24 valandų resveratrolio poveikio nurodytomis koncentracijomis. Resveratrolio poveikio Cx43 (B) PJP dydžiui apibendrinimas. Reikšmių skirstinių palyginimui tarp grupių taikytas Mann-Whitney U kriterijus. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole. Raudonos horizontalios juostos rodo medianą.

Cx45 PJP padidėjo paveikus 24 val. HeLa ląsteles 1 ir 10 μ M resveratroliu, bet sumažėjo po poveikio 100 μ M resveratroliu. Cx45 formuoja daug mažesnes PJP, lyginant su Cx43. Cx45 PJP dydis po poveikio 1 ir 10 μ M resveratroliu padidėjo atitinkamai 1,8 ir 1,4 karto, o po poveikio 100 μ M sumažėjo 1,3 karto pagal medianą (22 pav.). Imunofluorescencinės mikroskopijos tyrimai parodė, kad po 24 val. poveikio 100 μ M resveratroliu Cx45 suformavo mažesnes PJP ir padidėjo jo lokalizacija citoplazmoje. Šie rezultatai galėtų paaiškinti elektrinio laidumo sumažėjimą, kaip parodyta aukščiau (17B pav.).



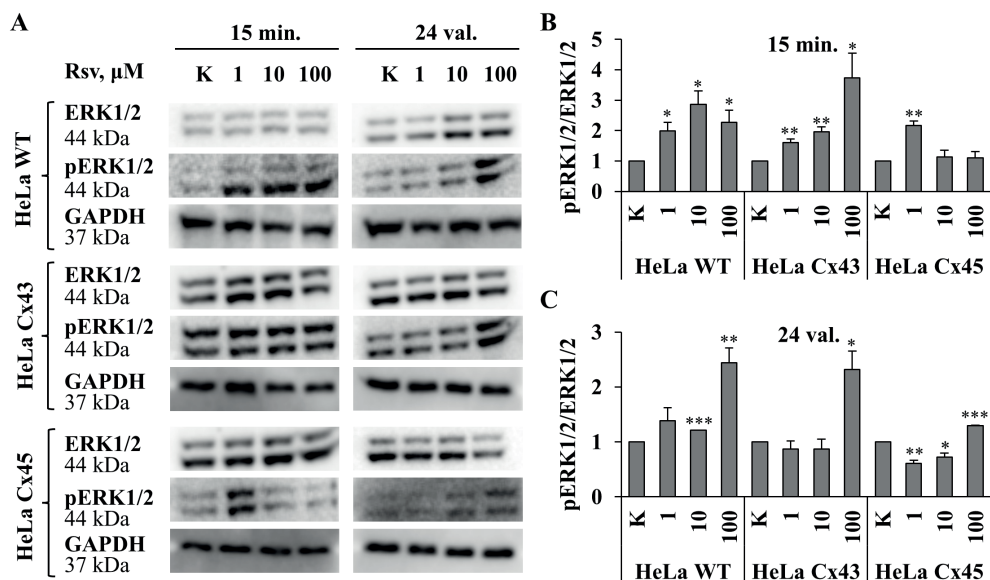
22 pav. Resveratrolio poveikis Cx45 PJP dydžiui HeLa ląstelėse

Tipiniai PJP imunofluorescencijos vaizdai HeLa Cx45 (A) ląstelėse kontrolinėmis sąlygomis ir po 24 val. resveratrolio poveikio nurodytomis koncentracijomis. Resveratrolio poveikio Cx45 (B) PJP dydžiui apibendrinimas. Reikšmių skirstinių palyginimui tarp grupių taikytas Mann-Whitney U kriterijus. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole. Raudonos horizontalios juostos rodo medianą.

3.3.4. Resveratrolio poveikis ERK1/2 aktyvumui ir HeLa ląstelių gyvybingumui

ERK1/2 fosforilinimas yra pagrindinis MAPK signalinio kelio procesas, reguliuojantis ląstelių proliferaciją ir žūtį [165,166]. Resveratrolio poveikis gali būti aktyvuojantis arba slopinantis, priklausomai nuo ligos ar ląstelių tipo [167,168]. Yra duomenų, kad resveratrolis sukelia Cx43 ekspresijos ir PJTR pagerėjimą yra susijęs su MAPK ir ERK1/2 signaliniais keliais [12,130]. Resveratrolis gali slopinti ERK1/2 fosforilinimą ir silpninti HeLa ląstelių adheziją [169]. Kai kuriose navikinėse ląstelėse, pvz., pelių melanomoje ir žmogaus inkstų ląstelių karcinomoje, resveratrolis veikia ERK1/2 kelią ir turi antiproliferacinį, antimigracinį arba proapoptotinį poveikį, moduluodamas kitus reguliatorius, tokius kaip Bcl-2, Bax, kaspazė-3, ciklinas D1, p21/p27 bei MMP-2 ir MMP-9 [170,171]. Tarpląstelinio ryšio ir ERK1/2 sąveikos tyrimai labiausiai orientuoti į Cx43, pabrėžiant, kad ERK1/2 mediatorių fosforilinimas moduluoja Cx43 PJ laidumą, formavimąsi ir apykaitą. Cx43 C galo S279 ir S282 fosforilinimas yra priklausomas nuo ERK1/2 [20,27,48]. Kaip parodyta 19 pav., resveratrolis veikia kelių Cx43 liekanų, įskaitant S279 ir S282, fosforilinimą. Baltymų pERK1/2/ERK1/2 ekspresijos pokyčiai buvo pastebėti po 15 min. ir 24 val. poveikio resveratroliu (23 pav.). Taip pat, ištyrėme resveratrolio poveikį HeLa WT ląstelių (neturinčių koneksinų) bei HeLa ląstelių, ekspresuojančių egzogeninį Cx43 ir Cx45, gyvybingumui (24 pav.), tačiau gyvybingumo tyrimo rezultatai pateikiami tik po 24 val. poveikio, nes 15 min. resveratrolio poveikis nesukėlė jokių gyvybingumo pokyčių.

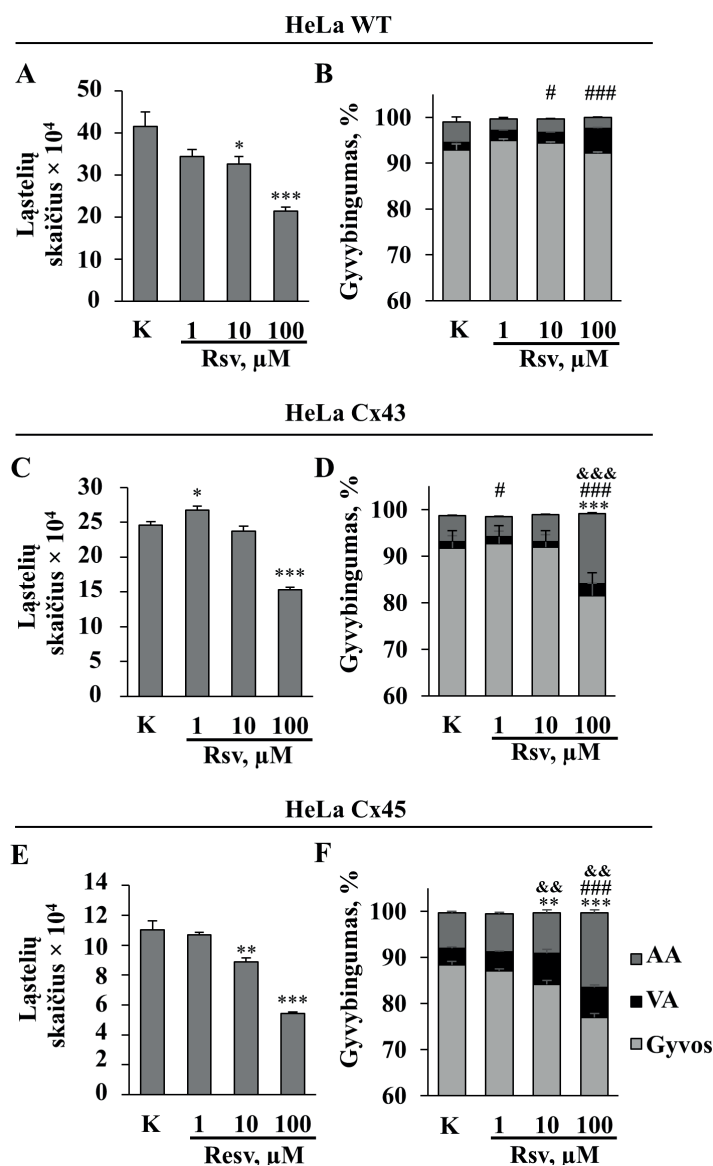
HeLa WT ir HeLa Cx43 ląstelėse visos resveratrolio koncentracijos padidino pERK1/2 lygį po 15 min. poveikio, o HeLa Cx45 ląstelėse tik 1 μ M padidino pERK1/2 lygį. Poveikis 1 μ M resveratroliu 24 val. sumažino pERK1/2 lygį tik HeLa Cx45 ląstelėse, o 10 μ M resveratrolis padidino pERK1/2 ekspresiją tik HeLa WT ląstelėse, tačiau sumažino ją HeLa Cx45 ląstelėse ir neturėjo jokio poveikio HeLa Cx43. Veikimas 100 μ M resveratroliu 24 val. padidino pERK1/2 aktyvumą visose HeLa ląstelių linijose, tuo pačiu slopinamas ląstelių proliferaciją ir gyvybingumą.



23 pav. Resveratrolio poveikis ERK1/2 ir fosforilinto ERK1/2 baltymų ekspresijai HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelėse

(A) Tipiniai imunoblotingo vaizdai, rodantys ERK1/2 ekspresiją kartu su jo fosforilinta forma po 15 min. ir 24 val. resveratrolio poveikio. (B, C) Apibendrintas resveratrolio poveikis ERK1/2 ir pERK1/2 ekspresijai. $n = 3$. Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole.

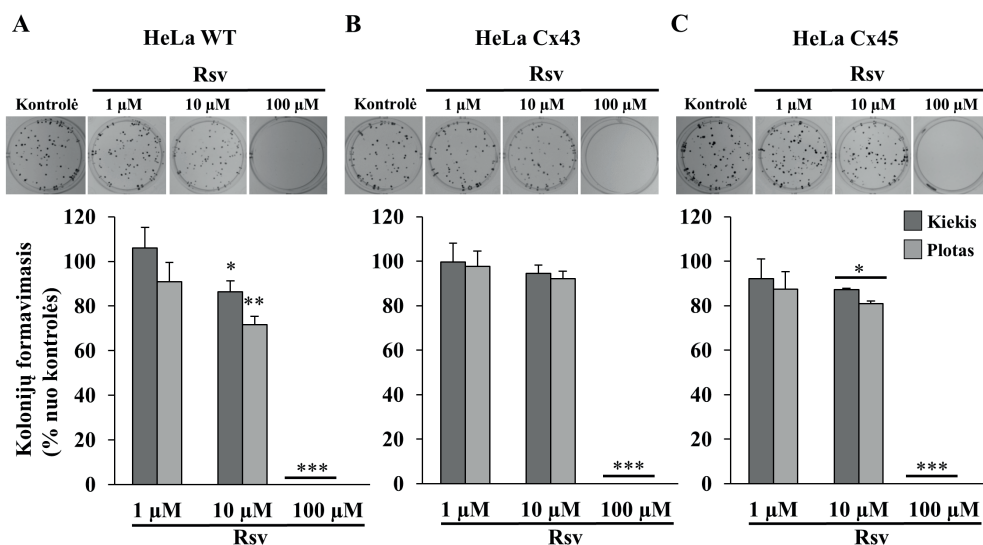
Resveratrolis (100 μ M) slopino proliferaciją atitinkamai 48 %, 38 % ir 51 % HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelėse (24A,C,E pav.). HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelės buvo jautresnės 100 μ M resveratrolio poveikiui, nes jų gyvybingumas sumažėjo atitinkamai iki 81 % ir 76 %, o HeLa WT ląstelių gyvybingumas išliko netoli kontrolinio lygio (24B,D,F pav.). Dauguma negyvybingų HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių, paveikus jas resveratroliu, buvo vėlyvos apoptozės būsenos.



24 pav. Resveratrolio poveikis HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui

Resveratrolio poveikis HeLa WT (A), HeLa Cx43 (C) ir HeLa Cx45 (E) ląstelių proliferacijai po 24 val. poveikio. Resveratrolio poveikis HeLa WT (B), HeLa Cx43 (D) ir HeLa Cx45 (F) ląstelių gyvybingumui ($n = 3$). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. *, # $p < 0,05$; **, & $p < 0,01$; ***, ###, &&& $p < 0,001$ lyginant su kontrole. * – gyvos ląstelės, # – ankstyvoji apoptozė (AA), & – vėlyvoji apoptozė (VA).

HeLa ląstelių gyvybingumui įvertinti buvo pasitelktas ir kolonijų formavimosi metodas. Veikiant 1 μ M resveratroliu, nepastebėti jokie HeLa ląstelių kolonijų formavimosi pokyčiai, o 10 μ M sumažino HeLa WT ir HeLa Cx45 ląstelių kolonijų skaičių ir jų plotą (25 pav.). Visos tirtos HeLa ląstelių linijos neformavo kolonijų, paveikus jas 100 μ M resveratroliu.



25 pav. Resveratrolio poveikis HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių kolonijų formavimuisi

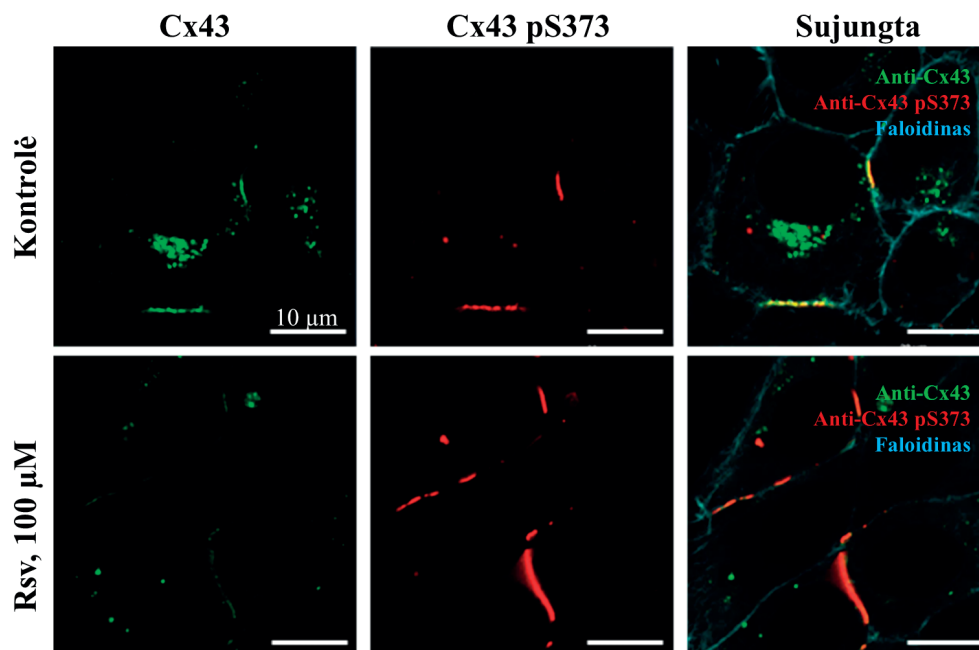
Tipiniai HeLa WT(A), HeLa Cx43 (B) ir HeLa Cx45 (C) ląstelių kolonijų formavimosi vaizdai kontrolės sąlygose ir po 7 dienų poveikio resveratroliu nurodytomis koncentracijomis (viršutinė dalis) bei poveikio kolonijų skaičiui ir plotui apibendrinimas (apatinė dalis) (n = 3). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 lyginant su kontrole.

Apibendrinant, mūsų rezultatai rodo, kad pERK1/2 aktyvumas, veikiant resveratroliu, koreliuoja su ląstelių gyvybingumo ir proliferacijos sumažėjimu.

3.3.5. Resveratrolio įtaka ląstelių citoskeletui ir PJ degradacijai

Ankstesniuose skyriuose aprašyti rezultatai rodo, kad PJP padidėjo po 24 val. poveikio 1 ar 10 μ M resveratroliu HeLa Cx45 ląstelėse (22 pav.), o Cx43 ir Cx45 bendros ekspresijos padidėjimas buvo stebėtas tik po poveikio 100 μ M resveratroliu (19 pav.). Svarbu paminėti, kad Cx43 pS373 padidėjimas, kuris koreliuoja su Cx43 PJP padidėjimu [48], buvo pastebėtas imunoblotingo ir imunofluorescencijos tyrimais tik po 24 val. poveikio 100 μ M resveratroliu (19 pav.; 26 pav.). Tai leidžia manyti, kad šį poveikį lemia kitos

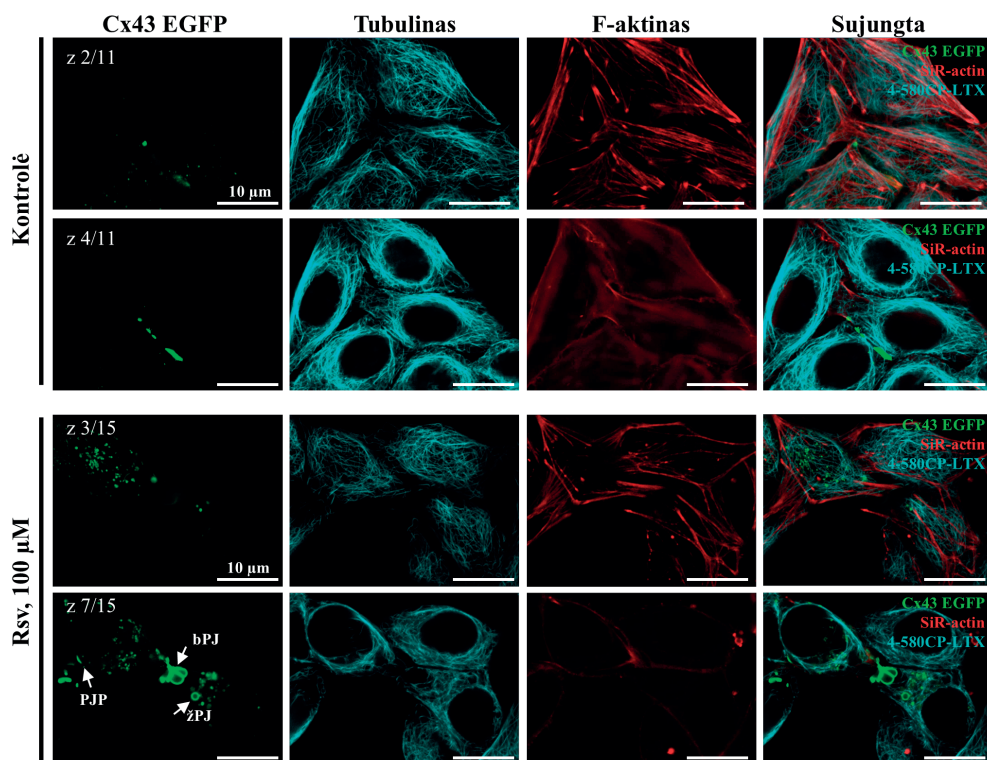
Cx43 fosforilavimo vietas ir (arba) tarpiniai signaliniai keliai. PJP padidėjimą gali lemti ne tik koneksinų sintezė ar oligomerizacija, o ir jų apykaitos pokyčiai – didesnis pristatymas į membraną ar lėtesnė internalizacija, kurią veikia F aktino ir α tubulino integralumas bei įvairūs transportiniai baltymai.



26 pav. Cx43 ir Cx43 pS373 imunofluorescencijos vaizdai

Po resveratrolio poveikio padidėjusiose Cx43 PJP stebima padidėjusi pS373 ekspresija.

Toliau tyrėme, ar resveratrolio poveikis PJ apykaitai yra susijęs su jo poveikiu citoskeleto integralumui. Gerai žinoma, kad ląstelių citoskeletas užtikrina puskanalių transportą į membraną, PJ stabilumą ir jų funkcinę reguliavimą [172]. Atlikome HeLa WT, HeLa Cx43, HeLa Cx43 EGFP ir HeLa Cx45 gyvų ląstelių, pažymėtų F aktino ir α tubulino fluorescenciniais žymenimis vaizdinimą. Kaip parodyta 27 pav. HeLa Cx43 EGFP ląstelėse resveratrolio poveikis nesukėlė pastebimų aktino citoskeleto ir mikrotubulių tinklo pažeidimų. Resveratrolis nesukėlė F aktino ir α tubulino integralumo pokyčių ir kitose tirtose ląstelių linijose [173], todėl manėme, kad reguliarius PJP internalizavimas ir žiedinių plyšinių jungčių (žPJ) formavimasis turėtų išlikti nepakitęs. PJP dinamikai stebėti buvo pasitelktos ir HeLa ląstelės, ekspresuojančios egzogeninį Cx43 su prijungtu žaliai fluorescuojančiu baltymu (Cx43 EGFP).

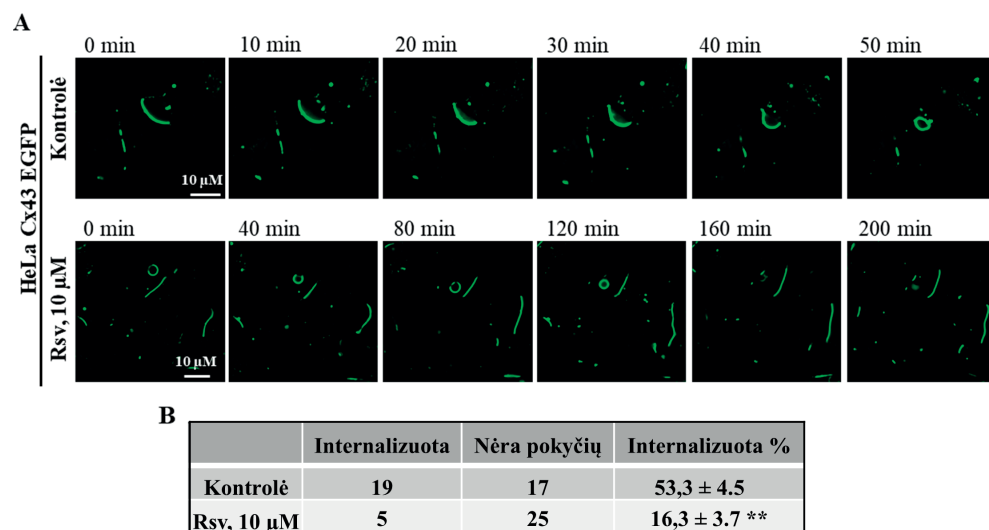


27 pav. Resveratrolio poveikis HeLa Cx43 EGFP ląstelių F aktino ir α tubulino tinklui

Gyvos Hela Cx43 EGFP ląstelės, pažymėtos F aktino (SiR-actin) ir α tubulino (4-580CP-LTX) žymenimis, skirtingose z plokštumose. Vizualiai nepastebėta resveratrolio poveikio sukeltų pokyčių PJ internalizacijai, nes tebematomos PJP skirtingose internalizacijos stadijose (nepažeistos PJP, išsiskleidusios ir bepradedančios internalizuotis PJP (bPJ) ir visiškai internalizuotos PJP – žiedinės jungtys (zPJ)).

Siekdami įvertinti, ar resveratrolis turi įtakos Cx43 PJP internalizacijai, atlikome ląstelių ilgalaikio vaizdinimo tyrimą (angl. *time-lapse*). Anot literatūros šaltinių, stresas gali sulėtinti Cx43 PJP internalizaciją [174]. Yra žinoma, kad PJP gyvavimas plazminėje membranoje trunka iki 5 valandų [175]. Kadangi praktiškai neįmanoma stebėti viso PJP gyvavimo laiko nuo tikslaus jų susidarymo momento iki visiško žPJ susidarymo, mes rėmėmės statistika ir atlikome atsitiktinai atrinktų ląstelių porų su PJP ilgalaikio vaizdinimo tyrimą ir išmatavome internalizuotų PJP skaičių per 210 min. kontrolinėmis sąlygomis ir po 24 val. poveikio 10 μ M resveratroliu (28A pav.). Tokia ląstelių stebėjimo laike eksperimentų trukmė buvo pasirinkta, atsižvelgiant į tai, kad kontrolinėmis sąlygomis Cx43 PJP išsiardė per vidutiniškai 191 ± 20 min. ($n = 30$). Mūsų tyrimų rezultatai rodo, kad resveratrolis stabilizavo Cx43 PJP,

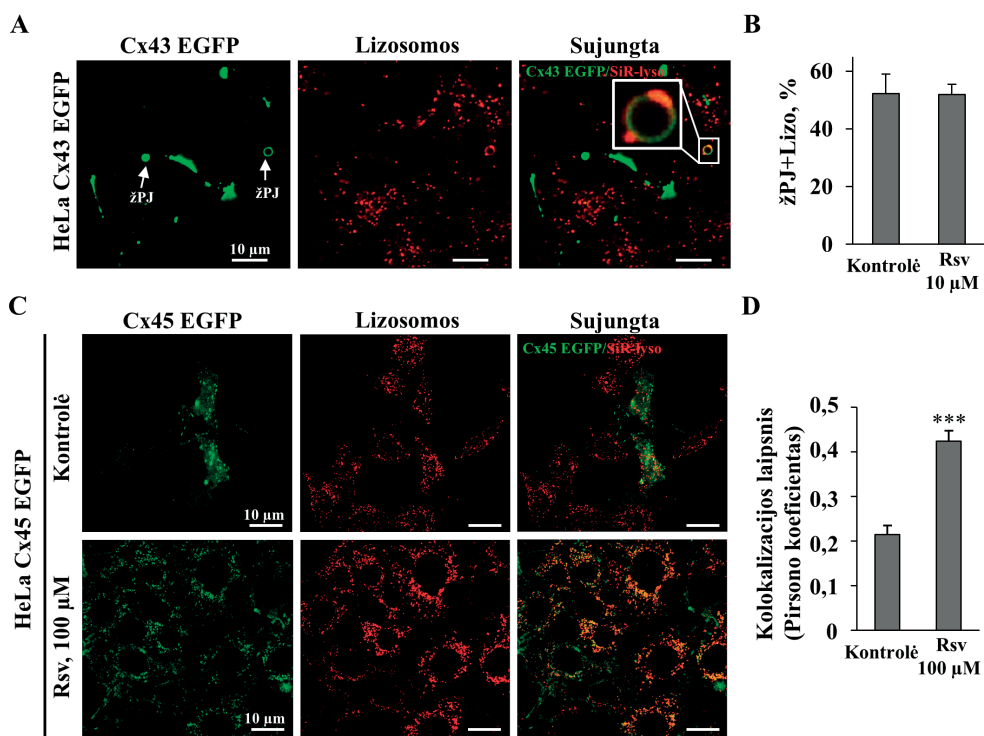
nes internalizacijos greitis sumažėjo 3 kartus (28B pav.). Šiems eksperimentams buvo pasirinkta mažesnė resveratolio koncentracija (10 μ M), nes ji neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui ir proliferacijai, lyginant su 100 μ M (24 pav.).



28 pav. Resveratolio poveikis Cx43 PJ internalizacijai

(A) Tipiniai HeLa Cx43 EGFP ilgalaikio registravimo vaizdai kontrolinėmis sąlygomis ir paveikus resveratoliu (10 μ M, 24 val.). (B) Cx43 EGFP PJ internalizacijos matavimų apibendrinimas. ** $p < 0,01$ lyginant su kontrole.

Siekiant geriau suprasti, kodėl sulėtėja Cx43 PJ išsiardymas, tyrėme, ar nėra sutrikęs lizosominės degradacijos mechanizmas. Koneksinai reguliariai internalizuojami iš plazminės membranos ir nukreipiami degradacijai daugiausia per endosominį-lizosominį kelią. Šio proceso metu PJ internalizuojamos bei susidaro žPJ, kurios transportuojamos lizosominei degradacijai [176]. Mes įvertinome žPJ, susijungusių su lizosomomis skaičių (29 A pav.) kontrolinėse ir resveratoliu paveiktose HeLa Cx43 EGFP ląstelėse, tačiau reikšmingų Cx43 lizosominės degradacijos pokyčių nenustatėme.



29 pav. Resveratolio poveikis Cx43 ir Cx45 degradacijai

(A) Tipinis Cx43 žPJ kolokalizacijos su lizosomomis vaizdas. (B) žPJ kolokalizacijos su lizosomomis kontrolinėse ir resveratoliu paveiktose HeLa Cx43 EGFP ląstelėse apibendrinimas. (C) Tipiniai Cx45 kolokalizacijos su lizosomomis vaizdai. (D) Cx45 kolokalizacijos su lizosomomis kontrolinėse ir resveratoliu paveiktose HeLa Cx45 EGFP apibendrinimas. Duomenys pateikiami, remiantis mažiausiai 3 nepriklausomais eksperimentais. Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole.

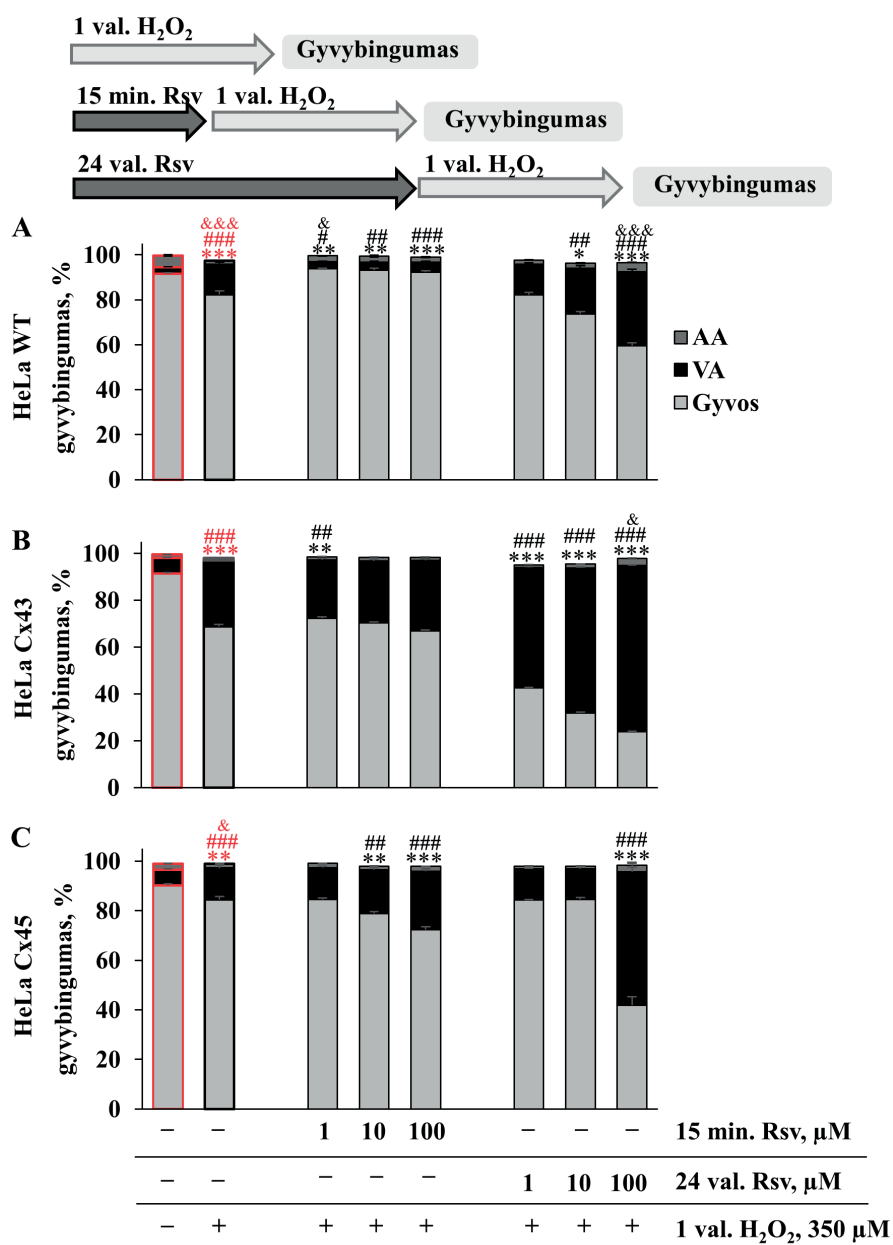
Resveratrolis (10 ir 100 μM) po 24 valandų poveikio padidino Cx43 PJP (21 pav.), o bendro Cx43 baltymo ekspresijos padidėjimas buvo stebėtas tik esant 100 μM resveratolio (19 pav.). Priešingas efektas buvo gautas su Cx45 – PJP jau buvo žymiai padidėję po poveikio 1 μM resveratoliu, tačiau, priešingai nei Cx43, 100 μM resveratolio žymiai sumažino Cx45 PJP dydį, nors bendra Cx45 ekspresija padidėjo 2,5 karto. Svarbu atkreipti dėmesį, kad Cx45 PJP dydžio (22 pav.) ir g. sumažėjimą (17 pav.) sekė padidėjusi Cx45 degradacija, įvertinta pagal Cx45 ir lizosomų kolokalizaciją, kuri padidėjo ~2 kartus (29C,D pav.). Kadangi Cx45 formuoja labai mažas Cx45 PJP (22 pav.), ir nėra galimybės įvertinti žPJ struktūrų, Cx45 ir lizosomų kolokalizacijos laipsniui kiekybiškai nustatyti buvo pasitelktas Pirsono koreliacijos koeficientas. Tačiau mechanizmai, lemiantys padidėjusią Cx45 baltymo ekspresiją

ir kartu suaktyvėjusią jo degradaciją, kol kas nėra visiškai aiškūs. Galime tik spėlioti, kad stresinėmis sąlygomis, kai Cx45 PJP internalizacija ir degradacija suaktyvėja, aktyvuojami ir tam tikri kompensaciniai mechanizmai, skatinantys Cx45 sintezę, bet ne naujų PJP formavimąsi, o tai yra sudėtingas procesas, apimantis koneksino oligomerizaciją, puskanalių transportavimą į membraną ir priešingų puskanalių susijungimą.

3.3.6. Įjautrinantis ir apsaugantis resveratrolio poveikiai H_2O_2 sukeltam stresui HeLa ląstelėse

Daugeliu patologinių būklių, įskaitant širdies ir kraujagyslių, neurodegeneracines, uždegimines, autoimunines bei kvėpavimo sistemos ligas ir navikus, nustatomas padidėjęs ROS kiekis, lemiantis oksidacinį stresą, audinių pažeidimą ir ligų progresavimą. PJTR yra svarbus daugelyje patologinių būsenų, o jo padidėjimas arba sumažėjimas tam tikrais atvejais gali būti susijęs su ligos vystymusi ir progresavimu. Mūsų tyrimai parodė, kad resveratroliu moduluojama PJ savybės priklausomai nuo Cx tipo. Taip pat nustatyta, kad resveratrolio sukeltas Cx43 ekspresijos padidėjimas jautrina kolorektalinio naviko ir melanomos ląsteles chemoterapiniams preparatams [12,177]. Įrodymų, kad resveratroliu moduluotų Cx45 arba padidintų jautrumą stresui per Cx45 reguliaciją, nėra. Atsižvelgiant į pateiktus duomenis, buvo siekiama ištyrėti, ar preinkubacija su resveratroliu (15 min. arba 24 val.) keičia HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių gyvybingumą H_2O_2 sukeltos streso sąlygomis. H_2O_2 dažnai naudojamas ląstelių tyrimuose oksidaciniam stresui sukelti, nes tai yra viena pagrindinių ROS formų, natūraliai susidaranti ląstelėse.

Aukščiau pateikti rezultatai (24 pav.), veikiant ląsteles vien resveratroliu, parodė, kad didžiausią poveikį HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių gyvybingumui (apie 11 % abiem atvejais) turėjo tik 100 μ M resveratrolio, o HeLa WT ląstelių gyvybingumo neveikė nei viena tirta resveratrolio koncentracija. Sukeliant ląstelėms stresą H_2O_2 1 val., buvo gautas panašus efektas ląstelių gyvybingumui visose tirtose ląstelių linijose: gyvybingumas sumažėjo atitinkamai 10, 23 ir 8 %. Trumpalaikis (15 min) ląstelių preinkubavimas su resveratroliu, net ir su 1 μ M, turėjo apsaugantį poveikį HeLa WT ląstelėms, o paveikus šias ląsteles 24 val. 10 ir 100 μ M resveratroliu, sustiprėjo H_2O_2 citotoksinis poveikis (apie 8 ir 22 %) (30 pav.).



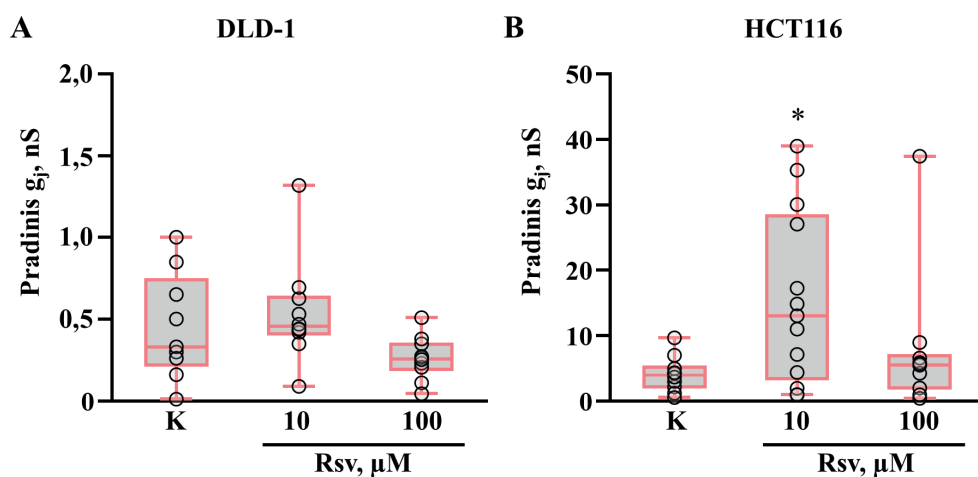
30 pav. H_2O_2 sukkelto streso poveikis HeLa ląstelių gyvybingumui, preinkubavus resveratroliu

HeLa WT (A), HeLa Cx43 (B) ir HeLa Cx45 (C) ląstelės buvo preinkubuotos resveratroliu (1, 10, 100 μM) 15 min. arba 24 val., o po to 1 val. veikiamos 350 μM H_2O_2 . Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. *, #, & p < 0,05; **, ##, && p < 0,01; ***, ###, &&& p < 0,001; raudonos žymos – lyginant su kontrole, juodos – lyginant su ląstelėmis, veiktomis tik H_2O_2 . * – gyvų ląstelių grupė, # – ankstyva apoptozė (AA), & – vėlyva apoptozė (VA).

Nei viena resveratrolio koncentracija, preinkubuojant 15 min., nekeitė HeLa Cx43 ląstelių jautrumo H_2O_2 , tačiau preinkubavus ląsteles 24 val. su resveratroliu, H_2O_2 mažino HeLa Cx43 gyvybingumą, priklausomai nuo koncentracijos (atitinkamai 26, 37 ir 45 %, lyginant tik su H_2O_2 poveikiu). Tuo tarpu HeLa Cx45 ląstelių preinkubavimas 15 min. su 10 ir 100 μM resveratrolio sustiprino H_2O_2 poveikį (atitinkamai 5 ir 12 % daugiau, lyginant vien tik su H_2O_2). Šiuos rezultatus iš dalies galima paaiškinti priešingu resveratrolio poveikiu Cx43 ir Cx45 PJ g_j (16 pav.). Preinkubavimas 24 val. su 100 μM resveratroliu sustiprino H_2O_2 citotoksiinį poveikį 42 %, o mažesnės koncentracijos poveikio neturėjo (30 pav.).

3.3.7. Resveratrolio poveikis HCT116 ir DLD-1 PJ laidumui, ekspresijai ir gyvybingumui

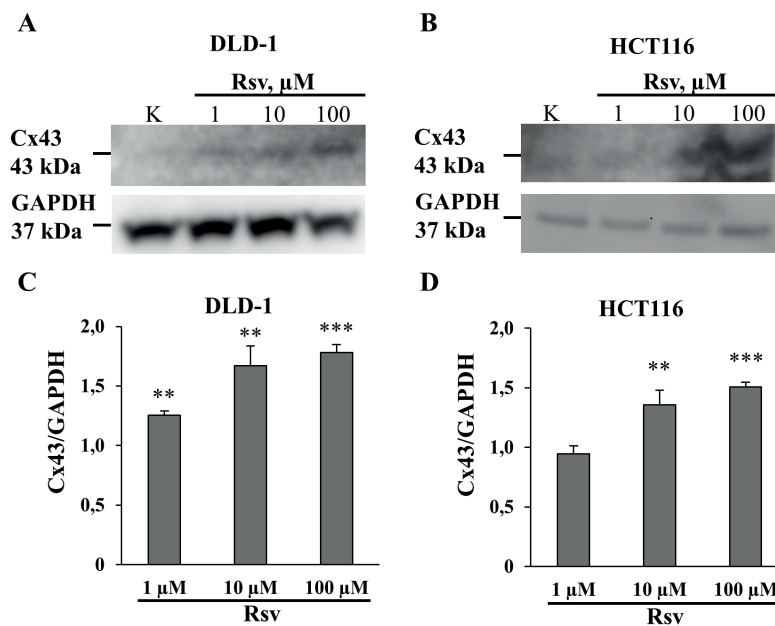
HeLa ląstelių preinkubavimas 24 val. su resveratroliu sukėlė nuo koncentracijos ir egzogeninio koneksino tipo priklausančius pradinio PJ laidumo pokyčius (17 pav.). Todėl tyrėme, kokį poveikį p_{g_j} resveratrolis turi endogeninį Cx43 ekspresuojančiose kolorektalinio naviko (HCT116 ir DLD-1) ląstelėse. Naudotos resveratrolio koncentracijos nesukėlė p_{g_j} pokyčių DLD-1 ląstelėse, tačiau HCT116 ląsteles preinkubavus su 10 μM resveratrolio, p_{g_j} padidėjo (31 pav.). Šie duomenys parodė, kad resveratrolio poveikis PJTR gali priklausyti ir nuo ląstelių tipo. Tokius rezultatus galėjo lemti tai, kad PJTR gali būti reguliuojamas per skirtingus signalinius kelius. Pavyzdžiui, yra žinoma, kad PKA aktyvacija dažniausiai gerina Cx43 PJTR, o MAPK aktyvavimas slopina Cx43 PJTR [178]. Svarbu pabrėžti, kad šie signaliniai keliai nėra aktyvuojami atsitiktinai, nes jų aktyvacija priklauso nuo ląstelių diferenciacijos būsenos, receptorių ekspresijos ir nuo skirtingų kinazių aktyvumo, kurios lemia koneksinų fosforilinimo pobūdį ir jų funkciją. Dėl to ta pati medžiaga vienose ląstelėse gali skatinti PJTR, o kitose – jį slopinti, nors abiem atvejais tiriamos Cx43 PJ.



31 pav. Pradins PJ laidumas, išmatuotos atsitiktinai atrinktose DLD-1 ir HCT116 ląstelių porose

DLD-1 (A) ir HCT116 (B) ląstelių g_j , paveikus jas resveratroliu. Reikšmių skirstinių palyginimui tarp grupių taikytas Mann-Whitney U kriterijus. * $p < 0,05$ lyginant su kontrole.

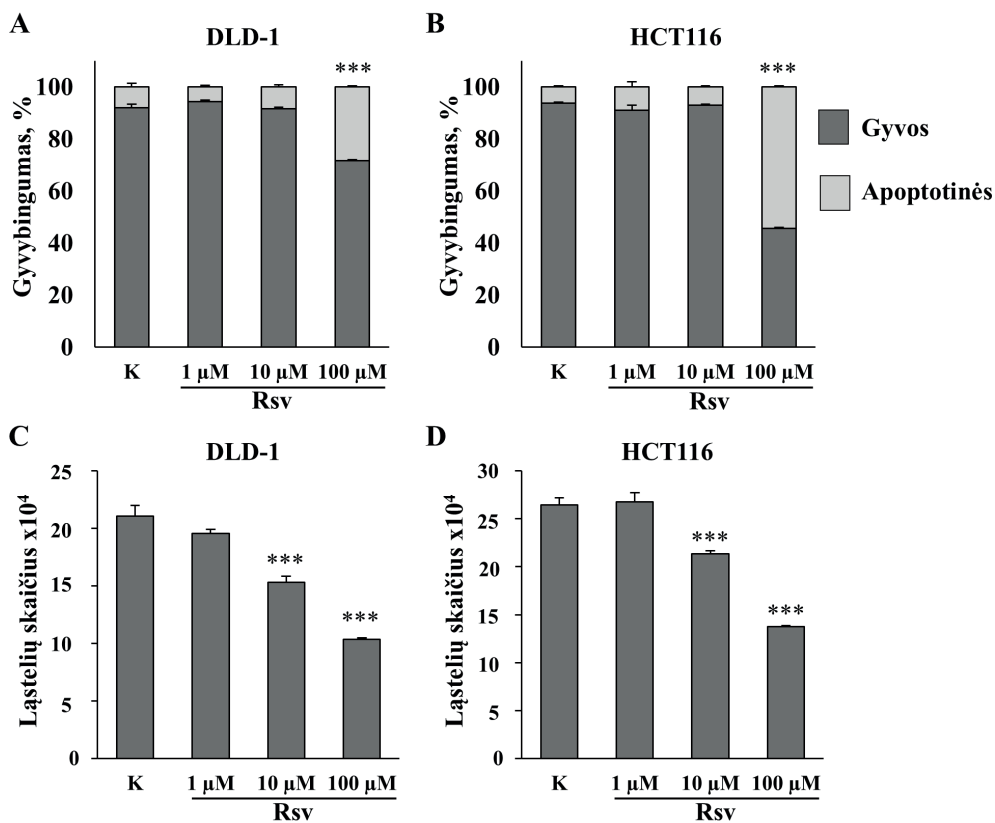
Toliau tyrėme resveratrolio poveikį Cx43 ekspresijai HCT116 ir DLD-1 ląstelėse. Nustatėme, kad 24 val. preinkubavimas su resveratroliu (1, 10 ir 100 μM) didino Cx43 baltymo ekspresiją DLD-1 ląstelėse atitinkamai 25, 61 ir 73 %, o HCT116 ląstelėse poveikį turėjo tik didesnės (10 ir 100 μM) resveratrolio koncentracijos, padidinusios Cx43 ekspresiją atitinkamai 39 ir 51 %, lyginant su kontrole (32 pav.). Šie rezultatai atitinka kitų tyrėjų duomenis su HCT116 ląstelėmis [177].



32 pav. Resveratrolio poveikis bendrai endogeninio Cx43 ekspresijai DLD-1 ir HCT116 ląstelėse

Tipiniai imunobloto vaizdai, rodantys DLD-1 Cx43 (A) ir HCT116 Cx43 (B) baltymų lygį po 24 val resveratrolio poveikio nurodytomis koncentracijomis. Stulpelinėse diagramose pateikti apibendrinti Cx43 baltymo kiekio pokyčiai DLD-1 (C) ir HCT116 (D) ląstelėse ($n = 3$). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole.

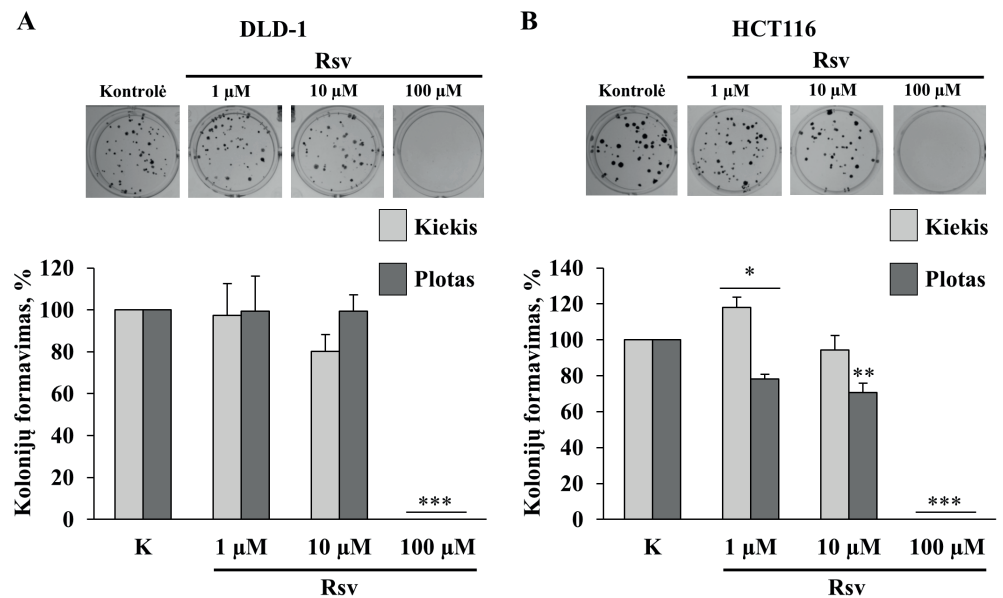
Toliau tyrėme skirtingų resveratrolio koncentracijų poveikį HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumui. Literatūroje pateikiami duomenys rodo, kad resveratrolis pasižymi antiproliferaciniu ir citotoksiniu poveikiu kolorektalinio naviko ląstelėms, įskaitant HCT116 ir DLD-1 ląstelių linijas [119,179]. Mūsų rezultatai atitiko anksčiau publikuotus duomenis. Nustatėme, kad 100 μM resveratrolio reikšmingai sumažino abiejų tirtų kolorektalinio naviko ląstelių linijų gyvybingumą. Be to, 10 ir 100 μM resveratrolio koncentracijos slopino HCT116 ir DLD-1 ląstelių proliferaciją (33 pav.).



33 pav. Resveratrolio poveikis DLD-1 ir HCT116 ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui

Resveratrolio sukelti pokyčiai DLD-1 (A) ir HCT116 (B) ląstelių gyvybingumui po 24 val. poveikio. Resveratrolio poveikis DLD-1 (C) ir HCT116 (D) ląstelių proliferacijai, lyginant su kontrole ($n = 3$). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole.

Ląstelių gyvybingumą papildomai įvertinome kolonijų formavimo metodu. Nustatytėme, kad HCT116 ir DLD-1 ląstelės, paveiktos 100 μM resveratroliu, kolonijų neformavo. Tuo tarpu, 1 ir 10 μM koncentracijos neturėjo poveikio DLD-1 kolonijų skaičiui ir jų plotui, tačiau HCT116 ląsteles veikė skirtingai – 10 μM resveratrolio sumažino HCT116 ląstelių suformuotų kolonijų plotą, tačiau nekeitė jų skaičiaus, o 1 μM resveratrolio padidino kolonijų skaičių, tačiau bendras kolonijų plotas išliko nepakitęs (34 pav.).



34 pav. Resveratrolio poveikis DLD-1 ir HCT116 ląstelių kolonijų formavimuisi

DLD-1 (A) ir HCT116 (B) ląstelių kolonijų tipiniai vaizdai po 7 dienų auginimo kontrolinėse sąlygose ir esant resveratrolio nurodytomis koncentracijomis. Diagramose pateiktas resveratrolio poveikio kolonijų skaičiui ir plotui apibendrinimas ($n = 3$). Vidurkių palyginimui tarp grupių buvo naudojamas Stjudento t-testas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ lyginant su kontrole.

4. APTARIMAS

Šiame tyrime gauti rezultatai atskleidžia biologiškai aktyvių augalinių medžiagų (NEO, SpE ir ArE bei resveratolio) poveikį Cx43 ir Cx45 PJTR, pasireiškiantį baltymų ekspresijos ir PJ laidumo pokyčiais. Taip pat, taikant skirtingus eksperimentinius metodus, buvo analizuotas tiriamų junginių poveikis ląstelių gyvybingumui, proliferacijai ir onkogeniškumui.

Tyrimai su NEO parodė, kad NEO slopina Cx43 ir Cx45 PJ laidumą ir sumažina Cx43 baltymo ekspresiją (5 pav.). PJ laidumo ir koneksinų ekspresijos pokyčiai gali neigiamai paveikti sveikų nervinių ir širdies ląstelių funkciją [24,180]. Be to, yra duomenų, kad NEO sudedamosios dalys gali sukelti neurologinius bei kardiovaskulinius sutrikimus, kurie priklauso nuo PJTR [182]. PJTR užtikrina normalų audinių struktūrinį vientisumą ir ląstelių tarpusavio komunikaciją. Tačiau navikinėse ląstelėse PJTR dažnai pakinta arba susilpnėja. Naviko vystymosi metu taip pat sumažėja adhezinių baltymų, ypač E-kadherino, ekspresija, dėl to ląstelės praranda tarpusavio sukibimą ir tampa labiau judrios ir gali migruoti į kitus audinius ir formuoti metastazes. Dėl šios priežasties PJTR pažeidimas yra vienas svarbiausių naviko progresavimo veiksnių. Sutrikęs PJTR siejamas su nekontroliuojamu navikinių ląstelių augimu, o pagerėjusi PJTR funkcija yra siejama su naviko augimo slopinimu. Vėlesnėse naviko stadijose PJTR gali skatinti epitelinę mezenchiminę tranziciją, didinti ląstelių migraciją ir invazyvumą [38]. NEO, slopindamas PJ laidumą, teoriškai galėtų net skatinti naviko ląstelių augimą, jei šie procesai būtų tarpusavyje susiję, bet mūsų rezultatai parodė priešingą efektą. Novikoff ląstelės pasižymi puikiomis proliferacinėmis savybėmis, tačiau ir itin geru PJTR, kas nebūdinga pirminio naviko ląstelėms. Pasinaudojome šia savybe, siekdami patikrinti plačiai priimtą nuostatą, kad blogas PJTR tiesiogiai susijęs su navikinių ląstelių proliferacijos didėjimu. Nustatėme, kad, nors NEO pasižymėjo kaip didelės potencijos PJ g_i inhibitorius, jis mažino Novikoff ląstelių kolonijų kiekį bei jų plotą ir slopino gyvybingumą (6 pav.). Tai reiškia, kad PJTR slopinimas neturėjo proonkogeninio poveikio Novikoff ląstelėms, o tai prieštarauja minėtai nuostatai ar bent jau jos generalizavimui [183,184].

Siekiant palyginti skirtingos kilmės natūralių junginių biologinį aktyvumą, ištyrėme SpE ir ArE poveikį kolorektalinio naviko linijų HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumui, onkogeniškumui ir PJ laidumui. Taip pat buvo atlikti tyrimai su žmogaus gimdos kaklelio naviko HeLa ląstelėmis, stabiliai ekspresuojančiomis egzogeninius Cx43 ir Cx45; šiose ląstelėse buvo vertinamas gyvybingumas, koneksinų ekspresija ir PJ laidumas. Literatūroje aprašomas spanguolių ir aronijų ekstraktų poveikis burnos, prostatos ir kolorektalinio naviko ląstelių linijoms, tačiau pabrėžiama, kad jų biologinis aktyvumas

reikšmingai priklauso nuo paruošimo būdo. Kitų autorių tyrimai parodė, kad polifenoliais ir flavonoidais praturtintos spanguolių ekstrakto frakcijos slopina navikinių ląstelių proliferaciją tiek *in vitro*, tiek *in vivo* modeliuose [102,185]. Taip pat nustatyta, kad spanguolių ekstraktai gali sukelti navikinių ląstelių žūtį per skirtingus mechanizmus, įskaitant kaspazių aktyvinimą, mitochondrijų funkcijos sutrikdymą, autofagijos sukėlimą ir oksidacinio streso moduliavimą [102,103,108,109]. Spanguolių ekstraktai, kuriuose gausu pro-antocianidinų, sukėlė apoptozę stemplės, plaučių ir kiaušidžių naviko ląstelių linijose, o sėklų bei sulčių ekstraktai slopino proliferaciją nuo koncentracijos priklausomu būdu [99,186]. Kai kurios spanguolių frakcijos mažina ROS kiekį ir aktyvuoja antioksidacinius fermentus, prisidedamos prie ląstelių apsaugos nuo oksidacinio streso [107,188]. Tuo tarpu juodųjų aronijų ekstraktas pasižymi silpnesniu citotoksiniu poveikiu, tačiau reikšmingai slopina prouždegiminių genų COX-2, iNOS ir IL-8 ekspresiją [190]. Iš skirtingų *Aronia* rūšių tik *A. melanocarpa* ekstraktas reikšmingai slopina kolorektalinio naviko HT-29 ląstelių augimą, o šie poveikiai koreliuoja su ekstraktų antioksidaciniu aktyvumu ir fenolinių junginių kiekiu [95]. Be to, navikinių ląstelių augimo slopinimas siejamas su didesniu polifenolių ir flavonoidų kiekiu ekstraktuose [191]. Nors spanguolių ekstraktų biologinio aktyvumo mechanizmai naviko ląstelėse yra plačiai tiriami, duomenų apie aronijų bioaktyviųjų junginių veikimo mechanizmus trūksta. Nustatyta, kad aronijų ekstraktai ir jų sudedamosios dalys gali slopinti kolorektalinio ir kepenų navikinių ląstelių proliferaciją, įtakoti ląstelių ciklą ir sukelti apoptozę [94,192]. Atsižvelgiant į tai, kad tiek spanguolių, tiek aronijų ekstraktai yra antocianinų ir kitų polifenolių šaltiniai, tikėtina, jog šie junginiai reikšmingai prisideda prie jų biologinio aktyvumo. Iki šiol nėra tiesioginių mokslinių duomenų apie spanguolių ar aronijų ekstraktų poveikį PJTR ar koneksinų ekspresijai, tačiau literatūroje aprašyta, kad polifenoliais, ypač resveratroliu, turtingas vynuogių sėklų ekstraktas pagerino tarpląstelinę ryšį MCF-7 ląstelėse, padidino Cx43 ekspresiją ir skatino koneksinų persiskirstymą iš citoplazmos į plazminę membraną [151]. Mūsų tyrimai parodė, kad SpE stimuliuoja HeLa Cx45 PJ g_j, bet neturi įtakos HeLa Cx43 PJ g_j, o ArE slopina HeLa Cx43 PJ g_j, bet neturi įtakos HeLa Cx45 PJ g_j (11 pav.). Taip pat SpE (40 µg/ml) sukėlė Cx45 ekspresijos padidėjimą, tuo tarpu Cx43 ekspresija buvo reikšmingai padidinta su visomis tirtomis SpE koncentracijomis (12 pav.), tačiau nenustatėme Cx43 ir Cx45 PJP padidėjimo (13 pav.). SpE ir ArE nesukėlė PJ laidumo pokyčių HCT116 ir DLD-1 ląstelių linijose (10 pav.), tačiau didelėmis koncentracijomis pasižymėjo citotoksiniu poveikiu. HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių linijose SpE slopino proliferaciją nepriklausomai nuo Cx ekspresijos ir tipo (14 pav.).

Siekiant giliau suprasti bioaktyviųjų junginių poveikio mechanizmus, tolimesni tyrimai buvo vykdomi analizuojant vieno iš dažnai sutinkamo auga-

linių ekstraktų ir eterinių aliejų sudėtinių junginių polifenolio resveratrolio poveikį. Nustatėme, kad resveratrolis sukėlė nuo laiko ir koncentracijos priklausančius Cx43 ir Cx45 ekspresijos, fosforilinimo, PJP dydžio, laidumo bei HeLa ląstelių gyvybingumo pokyčius. Lyginamoji Cx43 ir Cx45 analizė parodė, kad resveratrolis slopina PJTR Cx43 ekspresuojančiose ląstelėse, tačiau jį stimuliuoja Cx45 ekspresuojančiose ląstelėse (16 pav.). Šį dvilypį poveikį bent iš dalies galima paaiškinti molekulinio modeliavimo duomenimis, atskleidusiais, kad Cx45 pasižymi dviem skirtingais, didesnio ir mažesnio giminingumo, resveratrolio dokininimo profiliais, tuo tarpu Cx43 atveju nustatytas tik mažesnio giminingumo dokininimo profilis (18 pav.). Tarpląstelinio ryšio pokyčiai dažnai siejami su koneksinų ekspresijos lygio ir PJP dydžio pokyčiais [194]. Paprastai tik nedidelė dalis PJ, sudarančių PJP, yra funkciškai aktyvios, kaip tai buvo parodyta Cx43 [156], Cx45 [65], Cx57 [64,195] ir Cx36 [157] atvejais. PJP padidėjimas nebūtinai garantuoja bendro jų laidumo padidėjimą. Veikimas resveratroliu 24 val. sumažino pradinį PJ laidumą (17A pav.), tačiau netikėtai šį poveikį lydėjo PJP padidėjimas HeLa Cx43 ląstelėse (21 pav.), o tai leidžia manyti, kad galėjo sumažėti PJP funkcinis efektyvumas. HeLa Cx45 ląstelėse pradinis g_j išliko nepakitęs (17B pav.), o PJP didėjo (22 pav.). PJ laidumo pokyčiai kartu su koneksinų ekspresijos, PJP dydžio ir koneksinų apykaitos moduliavimu yra sudėtingas procesas, kuriame fosforilinimas yra vienas svarbiausių reguliacinių mechanizmų. Pavyzdžiui, S279/282 liekanos fosforilinimas siejamas su sumažėjusiu laidumu, pS373 didina Cx43 kiekį plazminėje membranoje ir skatina PJP didėjimą, o S368 fosforilinimas dalyvauja PJ apykaitos dinamikoje, veikdamas jų susidarymą, internalizaciją ir degradavimą [48]. Mūsų gauti rezultatai iš esmės atitinka anksčiau publikuotus duomenis: Cx43 PJ laidumo sumažėjimą (16 pav.) lydėjo padidėję Cx43 pS282 ir pS279 lygiai (19 pav.), o S373 fosforilinimas (19 pav.) lėmė didesnių Cx43 PJP susidarymą (21 pav.).

PJTR efektyvumas gali priklausyti nuo Cx43 fosforilinimo, kuris veikia PJ susidarymą, agregaciją į PJP ir jų apykaitą [48,178]. Dauguma koneksinų yra fosforilinami specifinėse vietose įvairių kinazių, o skirtingų kinazių tarpusavio sąveika gali lemti galutinį ląstelės atsaką [158,196]. Yra žinoma, kad resveratrolis moduliuoja Cx43 fosforilinimą aktyvindamas MAPK ir PI3K/Akt signalinius kelius [197–199]. ERK1/2 fosforilinimas yra esminė MAPK signalinės kaskados dalis, reguliuojantis ląstelių išgyvenamumą, proliferaciją ir žūtį. Resveratrolis šį signalinį kelią moduliuoja priklausomai nuo konteksto – jis gali būti tiek aktyvinamas, tiek slopinamas, atsižvelgiant į ligos pobūdį ar ląstelių tipą [171,200]. Mes nustatėme, kad ERK1/2 aktyvacija yra susijusi su ląstelių gyvybingumu, nes po veikimo didžiausia naudota resveratrolio koncentracija (24 val., 100 μM) pERK1/2 lygis pasiekė piką (23 pav.), tuo tarpu ląstelių gyvybingumas sumažėjo (24 pav.). Resveratrolis

labiau slopino Cx43 ir Cx45 ekspresuojančių HeLa ląstelių gyvybingumą, palyginti su HeLa WT ląstelėmis, kurios neekspresuoja PJ. Šie rezultatai yra panašūs į kitų tyrimų duomenis, kuriuose, pasitelkiant HeLa ląsteles, ekspresuojančias egzogeninius Cx37, Cx40 ir Cx43, buvo parodyta, kad tarpląstelinio ryšio proapoptotinis poveikis priklauso nuo koneksino tipo, o HeLa Cx43 ląstelės buvo jautriausios streptonigrino veikimui. Be to, autoriai nurodo, kad proapoptotiniai signalai, perduodami per PJ nuo IP3 priklausomu mechanizmu, padidina Cx43 ir Cx40 koneksinų ekspresiją, tačiau neturi poveikio Cx37 [201]. Vienas iš reikšmingų mūsų tyrimo rezultatų yra tai, kad 1 μ M resveratolio paskatino HeLa Cx43 ląstelių proliferaciją (24C pav.). Šis rezultatas leidžia manyti, kad resveratolis gali pasižymėti nuo koncentracijos priklausomu dvilypiu poveikiu: mažesnės koncentracijos gali skatinti ląstelių proliferaciją, o didesnės gali ją slopinti. Daugelis polifenolinių ekstraktų ir grynųjų polifenolių, tokių kaip kvercetas ar kurkuminas, nuo koncentracijos priklausomu būdu sukelia apoptozę ir mažina navikinių ląstelių gyvybingumą, tuo tarpu pasižymi menku poveikiu normalioms ląstelėms arba visai jų neveikia [202–204]. Resveratolis taip pat pasižymi dvilypiu veikimu – sveikose ląstelėse jis apsaugo nuo apoptozės, o navikinėse ląstelėse veikia citotoksiškai [205,206]. Pažymėtina, kad proliferaciją skatinantis resveratolio poveikis buvo parodytas T47D žmogaus krūties naviko ląstelėse, nes tam tikrais atvejais resveratolis gali veikti kaip fitoestrogenas [207]. Paprastai resveratolis veikia kaip navikų augimą slopinanti medžiaga, tačiau tam tikrose estrogenams jautriose žmogaus krūties naviko ląstelėse, priklausomai nuo estrogenų receptorių izoformų, jis gali veikti kaip estrogenų agonistas ir taip skatinti ląstelių augimą.

Be jau anksčiau aprašytų mechanizmų, yra duomenų, kad resveratolis gali suardyti tubulino tinklą, slopindamas tubulino polimerizaciją [208–210]. Priklausomai nuo koncentracijos, resveratolis gali paveikti aktino citoskeletą. Yra nustatyta, kad aktinas gali būti suardomas MDA-MB-231 krūties naviko ląstelėse [211], taip pat resveratolis gali skatinti aktino kaupimąsi pažeistose vietose pelių C2C12 mioblastuose [212]. Mikrotubulių ir aktino citoskeletas yra svarbus puskanalių transportavimui į plazminę membraną, tinkamai jų lokalizacijai ir PJP stabilizavimui [213]. Mūsų duomenys rodo, kad resveratolis nesuardė nei aktino citoskeleto, nei tubulino tinklo HeLa ląstelėse, nepriklausomai nuo koneksino buvimo ar jo tipo (27 pav.). Vis dėlto negalime atmesti galimybės, kad resveratolis galėjo paveikti kitų su koneksinų pernaša susijusių veiksnių, tokių kaip karkasinis baltymas ZO-1 [214], motoriniai baltymai, pavyzdžiui, dineinas [215], GTPazė dinaminas 2 [216], E-kadherinas ar N-kadherinas [217].

Ląstelių ilgalaikio vaizdinimo tyrimai parodė, kad resveratolis stabilizavo HeLa Cx43 PJP, todėl jų internalizacijos greitis, lyginant su kontrole, su-

mažėjo tris kartus (28 pav.). Šis rezultatas sutampa su ankstesniais tyrimais, rodančiais, kad genotoksinis stresas sulėtina Cx43 PJP internalizaciją pirminėse galvijų ragenos endotelio ląstelėse, kurios buvo transfekuotos Cx43 GFP [174]. PJP dydis ir jų gyvavimo trukmė yra glaudžiai susiję su lizosominės degradacijos keliu, o jo sutrikdymas gali paveikti PJP stabilumą [176]. Mes išskėlėme hipotezę, kad resveratrolis galėtų aktyvuoti Cx43 PJ lizosominę degradaciją, tačiau statistiškai reikšmingų pokyčių nenustatėme (29A,B pav.). Be to, tikėjomės, kad PJP padidėjimas lems sustiprėjusį PJTR, vis dėlto po 24 val. poveikio 10 μ M resveratroliu Cx43 laidumas sumažėjo (17A pav.). Šį reiškinį galima paaiškinti mūsų ankstesniais stebėjimais, jog didelis bendras PJ skaičius PJP nėra susijęs su PJP funkciniu efektyvumu, nes tik nedidelė dalis PJP sudarančių PJ yra funkcionalios, o per didelis PJP „apkrovimas“ PJ kanalais gali netgi pabloginti jų PJP funkcinį efektyvumą.

Resveratrolis nesukėlė reikšmingų pokyčių DLD-1 ląstelių PJTR, tačiau 10 μ M resveratrolio padidino PJ laidumą HCT116 ląstelėse (31 pav.). Resveratrolis priklausomai nuo koncentracijos didino Cx43 baltymo ekspresiją abiejose kolorektalinio naviko ląstelių linijose, tačiau tik didesnės koncentracijos (10 ir 100 μ M) slopino ląstelių proliferaciją ir mažino gyvybingumą (33 pav.), o 100 μ M visiškai sustabdė kolonijų formavimąsi (34 pav.). Gauti rezultatai atitinka kitų autorių duomenis, rodančius, kad didesnės resveratrolio koncentracijos reikšmingai mažina HCT116 ląstelių proliferaciją ir gyvybingumą [123]. Be to, literatūroje nurodoma, kad resveratrolis gali moduluoti PJ funkciją ir didinti Cx43 ekspresiją HCT116 ląstelėse, prisidedamas prie šių ląstelių augimo slopinimo [177].

Daugelio pataloginių būklių metu, tokių kaip širdies ir kraujagyslių, neurodegeneracinės, uždegiminės, autoimuninės bei kvėpavimo sistemos ligos ir navikai, stebimas padidėjęs ROS kiekis, kuris sukelia oksidacinį stresą, pažeidžia audinius ir skatina ligų progresavimą. Atsižvelgiant į tai, kad resveratrolis skirtingai veikia Cx43 ir Cx45 PJ g_j, siekėme ištirti, ar preinkubacija su resveratroliu keičia ląstelių gyvybingumą H₂O₂ sukulto oksidacinio streso sąlygomis. Tokiu būdu ištyrėme, kaip pataloginėmis sąlygomis resveratrolis galėtų paveikti skirtingų tipų koneksinus ekspresuojančias ląsteles. Trumpalaikė preinkubacija resveratroliu nekeitė HeLa WT ir HeLa Cx43 ląstelių gyvybingumo po H₂O₂ poveikio, lyginant su vien H₂O₂ paveiktomis ląstelėmis, tačiau didino HeLa Cx45 ląstelių jautrumą H₂O₂ sukeltam stresui (30 pav.). Šiuos rezultatus galima paaiškinti remiantis PJ laidumo tyrimų duomenimis, nes resveratrolis priešingai moduluoja Cx43 ir Cx45 PJ laidumą – slopina Cx43 PJ g_j ir stimuliuoja Cx45 PJ g_j (16 pav.). Dėl resveratrolio stimuliuojančio poveikio Cx45 PJ, proapoptotiniai signalai galėjo būti perduodami efektyviau. Ilgalaikė preinkubacija su 1 ir 10 μ M resveratroliu neveikė HeLa Cx45 ląstelių gyvybingumo, tačiau preinkubacija su 100 μ M resveratrolio

sukėlė didesnę ląstelių apoptozę, nei vien su H_2O_2 paveiktomis ląstelėmis. HeLa Cx43 ląstelėse preinkubacija su visomis tirtomis resveratrolio koncentracijomis mažino ląstelių gyvybingumą. Šie ląstelių gyvybingumo pokyčiai galėjo būti sukelti nepriklausomai nuo tiesioginės PJTR reguliacijos, nes nekoreliuoja su PJ laidumo tyrimų duomenimis. Šiuos rezultatus galėjo lemti tai, kad resveratrolio poveikis yra priklausomas nuo trukmės – poveikio trukmė gali aktyvuoti skirtingus signalinius kelius ir lemti nevienodą ląstelių atsaką [219]. Gauti duomenys rodo, kad resveratrolio veikia kaip nuo Cx tipo priklausantis modulatorius, o oksidacinio streso sąlygomis gali veikti skirtingai, nuo apsaugančio iki ląsteles jautrinančio poveikio, priklausomai nuo koncentracijos ir poveikio trukmės.

Nors resveratrolio pasišyrimas reikšmingu biologiniu aktyvumu *in vitro* esant santykinai didelėms koncentracijoms ($\geq 100 \mu M$), keli tyrimai, įskaitant ir mūsų pačių, parodė biologinį poveikį ir esant mažesnėms koncentracijoms [220–222]. Pažymėtina, kad mūsų tyrime resveratrolio poveikis buvo stebimas, net esant $1\text{--}10 \mu M$ koncentracijoms. Vis dėlto šios koncentracijos yra gerokai didesnės nei lygis plazmoje, paprastai pasiekiamas po geriamojo resveratrolio papildų ar resveratrolio turinčių produktų, tokių kaip raudonasis vynas, vartojimo, kuris dažniausiai neviršija $0,02 \mu M$ resveratrolio [223,224]. Šie farmakokinetiniai apribojimai atspindi greitą resveratrolio metabolizmą (pusinio pašalinimo laikas ~ 9 val.) ir pašalinimą iš organizmo, dėl ko fiziškai aktyvios koncentracijos kraujotakoje išlieka trumpą laiką. Remiantis ankstesniais duomenimis, intensyvus resveratrolio metabolizmas žarnyne ir kepenyse lemia tai, kad pirminio junginio biologinis prieinamumas siekia tik apie 1 % [225]. Tačiau negalima atmesti didesnių resveratrolio koncentracijų susikaupimo ląstelių citoplazmoje, kas iki šiol nėra pilnai ištirta. Pvz., dėl savo lipofiliškumo resveratrolio koncentracijos audiniuose gali viršyti plazmoje nustatomas koncentracijas [226]. Šis reiškinys taip pat buvo parodytas pacientuose, sergančiuose kolorektaliniu naviku, o tai reiškia, kad storos žarnos gali būti perspektyvus chemopreventijos taikinyje vartojant geriamąjį resveratrolių [227]. Įdomu tai, kad kai kurie tyrimai rodo, jog resveratrolio biologinį prieinamumą galima padidinti naudojant aktyvesnius jo analogus, pavyzdžiui, SRT501 [228], arba taikant pažangias tiekimo sistemas, tokias kaip liposominė inkapsuliacija [229], nanodalelės ir nanoemulsijos. Šios strategijos pagerina junginio tirpumą, stabilumą ir sisteminį pasiskirstymą organizme, taip didindamos jo terapinį potencialą [230,231].

Augalinių ekstraktų sudėtį ir aktyvumą lemia pasirinktas ekstrakcijos metodas, naudojamas tirpiklis, ekstrakcijos trukmė ir temperatūra, taip pat augalinės žaliavos kilmė, augimo sąlygos bei surinkimo laikas [232]. Dėl šių priežasčių net to paties augalo ekstraktai gali reikšmingai skirtis savo biologiniu poveikiu. Svarbu pažymėti, kad ekstraktų poveikis dažnai yra bendras,

kompleksinis, nulemtas ne vienos pavienės veikliosios medžiagos, o kelių ar daugelio komponentų tarpusavio sąveikos. Atskiros ekstrakto esančios medžiagos gali veikti sinergiškai, sustiprindamos bendrą biologinį efektą, arba antagonistškai, silpnindamos viena kitos poveikį. Todėl ekstrakto aktyvumas neatspindi pavienių junginių poveikio, o tyrimų rezultatus gali būti sudėtinga tiesiogiai interpretuoti. Taip pat, skirtingos ekstrakto frakcijos gali pasižymėti nevienodu biologiniu aktyvumu ar net priešingu poveikiu tiriamiems ląsteliniams procesams. Augalinių ekstraktų naudojimas suteikia vertingos informacijos apie jų galimą biologinį poveikį, bet rezultatų interpretacija turėtų būti atliekama atsižvelgiant į ekstraktų sudėties kintamumą ir kompleksinį veikimo pobūdį.

Atsižvelgiant į augantį susidomėjimą biologiškai aktyviais augalinės kilmės junginiais ir antioksidaciniais polifenoliais, tiek kaip mitybos komponentais, tiek kaip vertingais maisto pramonės šalutiniais produktais, mūsų gauti rezultatai gali būti reikšmingi. Tinkamas tarpląstelinis ryšys yra būtinas palaikant audinių vientisumą ir išvengiant pataloginių procesų. Mūsų duomenys prisideda prie geresnio supratimo, kaip biologiškai aktyvios augalinės kilmės medžiagos gali palaikyti ląstelių funkcijas moduluodamos PJTR.

IŠVADOS

1. Muskato eterinis aliejus slopina metabolinę komunikaciją tarp Novikoff ląstelių ir sumažina jų gyvybingumą, proliferaciją bei kolonijų formavimosi potencialą. Palyginti su Cx43, muskato eterinis aliejus turi silpnesnį poveikį Cx45 plyšinių jungčių laidumui.
2. Spanguolių ir aronijų išspaudų ekstraktai didelėmis koncentracijomis pasižymi citotoksiniu poveikiu HCT116 ir DLD-1 ląstelėms bei slopina jų kolonijų formavimąsi. Spanguolių ir aronijų išspaudų ekstraktai neturi poveikio HCT116 ir DLD-1 ląstelių Cx43 plyšinių jungčių pradiniam laidumui.
3. Aronijų išspaudų ekstraktas slopina Cx43 plyšinių jungčių laidumą, bet neturi įtakos Cx45 PJ laidumui, o spanguolių išspaudų ekstraktas stimuliuoja Cx45 plyšinių jungčių laidumą, bet neturi įtakos Cx43 plyšinių jungčių laidumui. Spanguolių išspaudų ekstraktas sukelia Cx43 ir Cx45 baltymų ekspresijos padidėjimą, bet nekeičia Cx43 ir Cx45 plyšinių jungčių plokštelių dydžio.
4. Resveratrolio poveikis priklauso nuo poveikio trukmės, koncentracijos ir ekspresuojamo koneksino tipo HeLa ląstelėse. Resveratrolis slopina Cx43 plyšinių jungčių laidumą, tačiau Cx45 plyšinių jungčių laidumui turi dvilypį poveikį, kuris gali būti siejamas su skirtingomis resveratrolio dokinimosi prie koneksinų charakteristikomis. Resveratrolis sukelia Cx43 fosforilinimo pokyčius, Cx43 ir Cx45 baltymų ekspresijos ir plyšinių jungčių plokštelių padidėjimą, aktyvuoja ERK1/2 signalinį kelią ir slopina HeLa WT, HeLa Cx43 ir HeLa Cx45 ląstelių gyvybingumą ir proliferaciją.
5. Resveratrolis nekeičia DLD-1 plyšinių jungčių pradinio laidumo, tačiau didina HCT116 plyšinių jungčių pradinį laidumą bei sukelia Cx43 ekspresijos padidėjimą abiejose kolorektalinio naviko ląstelių linijose. Resveratrolis mažina HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumą ir proliferaciją, taip pat slopina kolonijų formavimosi potencialą.

SUMMARY

ABBREVIATIONS

[Ca²⁺]_i	– intracellular calcium levels
7-AAD	– 7-aminoactinomycin D
AGJ	– annular gap junction
Akt	– protein kinase B
CAMKII	– Ca ²⁺ /calmodulin protein kinase II
CDK5	– cyclin-dependent kinase 5
ChE	– chokeberry pomace extract
CK1	– casein kinase 1
CrE	– cranberry pomace extract
Cx	– connexin
DMSO	– dimethyl sulfoxide
EGFP	– green fluorescent protein
ERK1/2	– extracellular signal-regulated kinases 1 and 2
GAPDH	– glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GJ	– gap junction
g_j	– junctional conductance
GJIC	– gap junction intercellular communication
GJP	– gap junction plaque
HeLa	– human cervical cancer cells
MAPK	– mitogen activated protein kinase
NEO	– nutmeg essential oil
PI3K	– phosphoinositide 3-kinase
PKA	– protein kinase A
PKC	– protein kinase C
PKG	– protein kinase G
PMSF	– phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	– polyvinylidene difluoride
ROS	– reactive oxygen species
Rsv	– resveratrol
SUMO protein	– small ubiquitin-like modulator
v-Src	– tyrosine kinase
ZO-1	– zonula occludens-1

INTRODUCTION

Natural biologically active substances are increasingly recognized in biomedical research for their potential therapeutic effects and significance for human health. Plant extracts contain a wide range of biologically active compounds, such as polyphenols, flavonoids, tannins, terpenoids, phenolic acids, saponins, alkaloids, and polysaccharides. Plant extracts are characterized by high structural diversity and complex mechanisms of action, and many of them exhibit antioxidant, cardioprotective, and neuroprotective functions, as well as chemopreventive and anticancer properties [1]. Biologically active substances from plants are generally associated with lower cytotoxicity and are better tolerated by normal cells; therefore, they are considered promising candidates for both fundamental and applied biomedical research [2].

Considering the importance of intercellular communication in these physiological processes, this study focuses on the effects of plant extracts and one of their commonly occurring components, resveratrol, on gap junctions (GJs), which are formed by connexins (Cx). These structures enable the direct transfer of electrical, metabolic, and genetic signals between cells and play an essential role in maintaining normal organ function and development [3,4]. Impaired intercellular communication through GJ (GJIC) can contribute to the progression of cardiovascular and neurological diseases as well as tumor development [5–7].

One of the most extensively studied connexins is Cx43, which is closely related to its widespread distribution in the human body. This protein is found in most tissues, including the heart, skin, brain, liver, kidneys, and others [8]. Cx45 is also present in the cardiac conduction system and the central nervous system [9,10]. However, studies on Cx45 are limited because animals with a knocked-out gene usually do not survive until birth and die during the embryonic stage [11]. Although there is evidence regarding the effects of plant extracts and their components on Cx43 expression [12], their direct effects on the electrical conductance and permeability of Cx43 GJs to various molecules have not been sufficiently investigated. Currently, the literature contains only a limited number of direct studies examining the effects of bioactive compounds on intercellular communication through Cx45 GJs. Nevertheless, it has been shown that plant extracts [13] may have beneficial effects on the cardiovascular system and cerebral circulation, in which Cx45 plays an important role.

Plant extracts consist of numerous biologically active substances that may act synergistically and modulate GJ function through multiple signaling pathways simultaneously. In the development of targeted therapeutic strategies for various diseases, it is important to determine which substances

have the greatest potential to regulate GJIC and other cellular processes. Studies investigating the mechanisms by which bioactive substances regulate the functions of Cx43 and Cx45 are essential for identifying new potential modulators of GJs, while also evaluating their selectivity for different Cxs and their possible effects on cell viability and other cellular functions.

For this purpose, we carried out the first comparative study of biologically active substances from plants (nutmeg essential oil (NEO), as well as cranberry (CrE) and chokeberry (ChE) pomace extracts) and resveratrol on the properties of GJIC mediated by Cx43 and Cx45 GJs.

Aim of the study

To investigate the effects of biologically active substances from plants on the properties of Cx43 and Cx45 gap junctions and cancer cell viability.

Objectives of the study

1. To examine the effect of nutmeg essential oil on Novikoff cell oncogenicity and metabolic communication through endogenous Cx43 gap junctions and compare its effect on Cx43 and Cx45 gap junction conductance.
2. To investigate the effects of cranberry and chokeberry pomace extracts on Cx43 gap junction conductance and the oncogenicity of colorectal cancer cells (HCT116 and DLD-1).
3. To assess the effect of cranberry pomace extract on HeLa WT, HeLa Cx43, and HeLa Cx45 cell gap junctions and viability.
4. To determine the effect of resveratrol on the HeLa WT, HeLa Cx43, and HeLa Cx45 cell gap junctions and oncogenicity.
5. To determine the effect of resveratrol on HCT116 and DLD-1 cell gap junctions and oncogenicity.

Scientific novelty of the study

In this study, a comparative analysis of the effects of several biologically active substances from plants and a commonly occurring compound within them, resveratrol, on the properties of GJs formed by Cx43 and Cx45 was performed for the first time. It was found that NEO inhibits the conductance of both Cx43 and Cx45 GJs. For the first time, we demonstrated that CrE and ChE exhibit a selective, connexin-type dependent effect: CrE stimulates Cx45 GJs but does not affect Cx43 GJs, whereas ChE inhibits Cx43 GJs but does not affect Cx45 GJ conductance. To evaluate the impact of GJIC

on tumorigenic potential, we investigated the effects of these extracts on the viability and oncogenicity of different types of cancer cells.

The study of one of the biologically active components of CrE, resveratrol, was performed, revealing that it inhibited Cx43 GJ conductance (g_j), while exerting a biphasic effect on Cx45 GJ g_j : depending on the concentration, resveratrol displayed both inhibitory and stimulatory effects. The potential mechanisms underlying this effect of resveratrol were elucidated using molecular modeling approaches. We found that in HeLa cells, resveratrol induced time-, dose-, and Cx-type dependent changes: it increased Cx expression and GJ plaque (GJP) size, activated the ERK1/2 signaling pathway, and promoted Cx43 phosphorylation, which is associated with reduced cell viability and proliferation. Cells expressing Cx43 or Cx45 were more sensitive to the effects of resveratrol than wild-type HeLa cells.

A key novel aspect of this study is the assessment of the effects of biologically active substances were evaluated using direct electrophysiological measurements, specifically the dual whole-cell patch-clamp technique, which allows quantitative assessment of changes in GJ g_j . This approach differs from the indirect molecular methods most commonly used in literature. The obtained results reveal the potential of biologically active substances from plants, particularly resveratrol, as selective modulators of GJIC and provide a basis for their application in both fundamental and clinical studies aimed at targeted regulation of cell-cell interactions.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture conditions. Experiments were conducted on HeLa cells (ATCC CCL-2) stably transfected with either mouse or rat wild-type Cx45 and Cx43, or with tagged enhanced green fluorescent protein (EGFP). Additionally, Novikoff rat hepatoma cells expressing endogenous Cx43 were used. All cell lines were generously provided by the late Dr. F. Bukauskas (Albert Einstein College of Medicine, New York, NY, USA). Cells were cultured in DMEM containing 10 % fetal bovine serum (FBS) and a mixture of 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). DLD-1 and HCT116 colorectal carcinoma cells (ATCC CCL221 and CCL247) were cultured in RPMI medium supplemented with 10 % FBS and 100 U/mL penicillin/100 μ g/mL streptomycin. All cell lines were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂. CrE and ChE were dissolved in RPMI medium and filtered through a 0.22 μ m filter. NEO was diluted in DMSO, and its effects were investigated using dilution factors (d.f.) 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 and 1×10^6 , which were equivalent to 794, 79.4, 7.94 and 0.794 μ g/ml. *trans*-resveratrol (Cat no. R5010) stock

solution was prepared in DMSO (100 mM). The solvent was found to have no effect on the evaluated parameters. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise stated.

Preparation of NEO. The extraction and chemical composition analysis of NEO were carried out by researchers at the Department of Drug Technology and Social Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences. NEO was extracted from seeds of *Myristica fragrans* collected in Grenada during the period from June to August. The essential oil was obtained by hydrodistillation using a modified Clevenger-type apparatus. A ratio of nutmeg powder, distilled water, and magnesium aluminometasilicate (5:100:1) was selected to ensure optimal extraction yield and compound identification conditions. The mixture was heated in a round-bottom flask at 120 °C in a glycerol bath. Hydrodistillation was carried out for 4 h, after which the colorless essential oil was collected. The oil was stored in an airtight container at 4 °C until use. The composition of NEO is presented in Table 2.

Preparation of CrE and ChE. The preparation and composition analysis of cranberry and chokeberry pomace extracts were carried out by researchers at the Department of Food Science and Technology, Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology. Freshly mechanically pressed pomace of black chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.) was obtained from the company Obuolių namai (Kaunas, Lithuania), frozen cranberries (*Vaccinium oxycoccos* L.) were kindly donated by the company Fudo (Kaunas, Lithuania). Cranberry and chokeberry pomaces were frozen at –40 °C and freeze-dried using a “Sublimator 40” system (Zirbus Technology, Germany) at –50 °C and 0.5 mbar pressure. The dried pomace was ground and defatted by supercritical CO₂ extraction using a 10 L extractor (Applied Separations, USA). Subsequently, the samples were loaded into 50 mL extraction cells and extracted with pressurized ethanol using an ASE350 accelerated solvent extraction system (Dionex, USA) at 10.3 MPa pressure and 83 °C. Extraction was performed in three 15 min cycles. Ethanol was removed from the extract using a rotary evaporator, and the obtained extract was stored at –20 °C. The composition of cranberry and chokeberry pomace extracts is presented in Table 3.

Quantitative analysis of resveratrol in CrE by HPLC. Quantitative analysis of resveratrol in CrE was performed using the UHPLC-ESI-MS/MS method. An Acquity H-class liquid chromatograph (Waters, Milford, MA, USA) coupled with a Xevo TQD mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) was used. Chromatographic separation was carried out on a YMC Triart C18 column (100 Å, 1.9 µm, 100 × 2.0 mm) (YMC, Kyoto, Japan) equipped with a pre-column. The column was maintained at a constant temperature of 40 °C. The mobile phase consisted of eluent A (0.1 % aqueous formic

acid solution) and eluent B (acetonitrile). Initial elution conditions of 95 % A and 5 % B were maintained for 1 min. Up to 5 min, the composition was changed to 70 % A, and by 7 min to 50 % A. From 7.5 to 8 min, 0 % A was maintained, and at 8.1 min the system was returned to the initial conditions. The total run time of gradient elution was 10 min. The flow rate was 0.5 mL/min, and the injection volume was 1 μ L. Mass spectrometric conditions were as follows: negative electrospray ionization mode, capillary voltage 2500 V, source temperature 150 $^{\circ}$ C, desolvation temperature 500 $^{\circ}$ C, and desolvation gas flow rate 800 L/h. Phenolic compound peaks were analyzed in multiple reaction monitoring mode. Quantification of resveratrol was performed based on the relationship between the analyte peak area and its concentration in the test solution using a calibration equation.

Molecular docking. Molecular docking was carried out as described previously. The human Cx43 structure (PDB ID 7F94), featuring the I164V mutation incorporated using ChimeraX software (v. 1.6.1), was adapted to represent the rat Cx43 (rCx43) structure for molecular docking. The resultant Cx43 model underwent validation by ProSA and Procheck (v. 3.5.4). The mouse Cx45 (mCx45) structure was modeled with AlphaFold 2 and validated with an internal validation score. The 3D molecular structure of resveratrol was downloaded from the PubChem database. Molecular docking was performed using Utilizing Smina software (v. Oct 15, 2019) alongside a customized Vina scoring function. To prevent the placement of symmetric docking conformations within neighboring subunits, the docking software was configured to use two adjacent Cx43 hemichannel subunits. The random seed was steadily set to one. The most favorable nine docking conformations were recorded. Two-dimensional docking images were created with LigPlot+ (v. 2.2.9) software.

Electrophysiological measurements. For electrophysiological recordings, the cells grown onto glass coverslips were transferred to an experimental chamber with constant flow-through perfusion mounted on the stage of the inverted microscope Olympus IX81 (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany) equipped with the Orca-R2 cooled digital camera (Hamamatsu Photonics K.K., Japan). Junctional conductance (g_j) between contiguous cells was measured using the dual whole-cell patch-clamp technique. Cell-1 and Cell-2 of a cell pair were voltage clamped independently with the patch-clamp amplifier MultiClamp 700B (Molecular Devices, Inc., USA) at the same holding potential, $V_1 = V_2$. Voltages and currents were digitized using the Digidata 1440A data acquisition system (Molecular Devices, Inc., USA) and acquired and analyzed using pClamp 10 software (Molecular Devices, Inc., USA). By stepping the voltage in the Cell-1 (ΔV_1) and keeping the other constant, junctional current was measured

as the change in current in the unstepped Cell-2, $I_j = \Delta I_2$. Thus, g_j was obtained from the ratio $-I_j/\Delta V_1$, where ΔV_1 is equal to transjunctional voltage (V_j), and a negative sign indicates that the junctional current measured in the Cell-2 is oppositely oriented to the one measured in the Cell-1. To minimize the effect of series resistance on the measurements of g_j , we maintained pipette resistance below 3 Ω M. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes with filaments. Experiments were performed at room temperature in a modified Krebs-Ringer solution (in mM): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl_2 , 2; MgCl_2 , 1; glucose, 5; sodium pyruvate, 2; HEPES, 5 (pH 7.4). Patch pipettes were filled with saline containing (in mM): KCl, 130; sodium aspartate, 10; MgATP, 1; MgCl_2 , 1; CaCl_2 , 0.2; EGTA, 2; HEPES, 5 (pH = 7.3). Before measuring the initial g_j , cells that were incubated with resveratrol for 24 h were perfused 30 min with control solution.

Flow cytometry. Initially, 5×10^4 cells were seeded in a 12-well plate per well in 1 mL of complete medium. Cells were treated with test compounds for 15 min or 24 h, then washed twice with PBS, trypsinized, and collected by centrifugation. Subsequently, cells were maintained with Guava Nexin® Reagent (Millipore, Burlington, MA, USA) at room temperature for 20 min according to the manufacturer's instructions. Analysis of the samples was performed using a Guava® easyCyte™ HT flow cytometer (Millipore, USA), and the data were analyzed by GuavaSoft 2.2.3 InCyte software.

Colony formation assay. Cells were seeded in triplicates at a density of 1×10^2 cells/mL in 12-well plates. Cells were treated with NEO for 5 days, and CrE, ChE, and resveratrol treatments were applied for 7 days. The cell colonies were fixed with 96 % of ethanol and stained with 0.5 % of crystal violet solution [37]. Samples were documented with Syngene G:Box (Cambridge, UK) and analyzed using GeneTools from Syngene software.

Western blot analysis. Cells were lysed in ice-cold cell extraction buffer (Invitrogen, USA) supplemented with 1 mM PMSF (Abcam, Cambridge, UK), 20 μ l/mL protease inhibitor cocktail, and 10 μ l/mL phosphatase inhibitor cocktail (both from Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 30 min. Lysates were centrifuged at 13000 rpm for 10 min at 4 °C. Total protein concentration was determined using a Qubit® protein assay kit and a Qubit 3.0 fluorometer (Invitrogen, USA). Proteins were separated by Bolt™ 4 %–12 % Bis-Tris plus gels (Invitrogen, USA) and transferred onto PVDF membranes (Millipore, USA). Membranes were incubated for 1 h with primary antibodies against Cx45 (40–7000; Invitrogen, USA), Cx43 (C6219; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), phospho-Cx43 (S368) (PA5–118544; Invitrogen, USA), phospho-Cx43 (S282) (PA5–64641; Invitrogen, USA), phospho-Cx43 (S279) (PA5–64640; Invitrogen, USA), phospho-Cx43 (S373) (PA5–64670; Invitrogen, USA), ERK1/2 (MA5-15134; Invitrogen, USA), phospho-ERK1/2

(MA5-15173; Invitrogen, USA), and GAPDH (AM4300; Invitrogen, USA). Protein detection was performed using a WesternBreeze® chemiluminescent kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. Bands were visualized using the G:Box Chemi Gel Documentation system (Syngene, USA).

Immunocytochemistry. Cells were cultured on sterile glass coverslips and fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 min at room temperature. After washing, cells were permeabilized with 0.2 % Triton X-100 in PBS for 3 min. Samples then were incubated for 1 h at 37 °C with the following primary antibodies, diluted in 1 % BSA/PBS: rabbit anti-Cx43 (1:50; C6219, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), mouse anti-Cx43 (1:50; 610061, BD Biosciences, USA), rabbit anti-Cx45 (1:50; 40-7000, Invitrogen, USA), and rabbit anti-phospho-Cx43 (S373) (1:50; PA5-64670, Invitrogen, USA). After washing with 1 % BSA in PBS, the cells were incubated for 30 min at 37°C in the dark with fluorophore-conjugated secondary antibodies: donkey anti-rabbit IgG (H&L) conjugated to fluorescein, goat anti-mouse IgG (H&L) conjugated to fluorescein, and donkey anti-rabbit IgG (H&L) conjugated to Cy5 (all secondary antibodies were used at a dilution of 1:125; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). F-actin was labeled by incubating cells with Alexa Fluor™ 594 phalloidin (A12381, Invitrogen, USA) for 30 min. Coverslips were attached with a Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, CA, USA). The analysis was performed with an Olympus IX83 inverted confocal microscope (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany). For the estimation of GJ plaque size, 3D images were obtained as Z-stacks at 0.25 µm intervals. The estimation of GJ plaque surface area (µm²) was performed using Fiji/ImageJ 3D Object Counter software, where at least 3 zones were analyzed from 3 biological replicates, and no less than 100 GJ plaques were analyzed for each condition.

Live cell and time-lapse imaging. Live cell imaging was carried at 37 °C with 5 % CO₂ using an incubation system INUBG2E-ONICS (Tokai Hit, Shizuoka-ken, Japan) with an incubator, mounted on the stage of Olympus IX83 inverted confocal microscope (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany). HeLa cells were seeded onto glass-bottom dishes and maintained in full DMEM. For connexin/lysosome colocalization assay, HeLa Cx45-EGFP and HeLa Cx43-EGFP cells were labeled with SiR-Lyso 1 h prior to imaging. Data was assessed from 3 biological replicates. AGJ-lysosome quantification was performed by analyzing 20 AGJs per replicate. Cx45/lysosome colocalization was assessed by analyzing 20 cells per replicate. Analysis was performed using Fiji/ImageJ Colocalization software. For cytoskeletal images HeLa Cx43-EGFP cells were labeled with SiR-Actin and 4-580CP-LTX fluorescent probes. Time-lapse imaging for GJ plaque

internalization was automatically taken and set to take at 10-min intervals. Images were acquired as Z-stacks with a step size of 0.5–1 μm . Data were assessed from 4 biological replicates.

LY dye transfer assay. Metabolic communication between cells was examined using a fluorescent dye Lucifer yellow (LY, 2 mM). LY was introduced into the donor cell of a contiguous cell group through a patch pipette in the whole-cell voltage-clamp mode. The analysis of dye transfer to the neighboring cells was performed using the fluorescence excitation system MT10 (Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany) and the fluorescence imaging system XCELLENCE (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, München, Germany).

Statistical analysis. Prior to statistical analysis, the normality of the data distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. Depending on the distribution of the data, comparisons between groups were performed using either the two-tailed Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U* test. Parametric data are presented as mean $\pm$ standard error (SEM), whereas non-parametric data are expressed as median (interquartile range, 25th–75th percentiles). Results were considered statistically significant at $p < 0.05$. Data analysis was carried out using SigmaPlot version 12.0 (Systat Software Inc., USA).

RESULTS

Effect of NEO on Cx43 and Cx45 GJIC. The impact of NEO on Cx43 GJ conductance was examined, and its correlation with Novikoff cell viability, proliferation, and colony formation was evaluated. Direct electrophysiological measurements (performed by colleagues) revealed that NEO inhibits Cx43 GJ g_j . We confirmed those results by metabolic coupling assay using the dye transfer method. Under control conditions, LY dye spread from the donor cell to 14 neighboring cells, whereas after 10 min preincubation with 1×10^5 d.f. NEO, LY dye transfer was completely inhibited (Fig. 5A). NEO treatment altered Cx43 expression and GJ function in Novikoff cells. After 24 h exposure to NEO (1×10^5 and 1×10^4 d.f.), Cx43 protein expression decreased by 30 % and 36 %, respectively (Fig. 5B,C). Consistently, dual whole-cell patch-clamp recordings showed that 1×10^5 d.f. NEO reduced Cx43 initial GJ g_j (Fig. 5D). Immunofluorescence analysis was performed to assess the distribution of Cx43 GJ channels (Fig. 5E,F). However, GJP could not be reliably distinguished from hemichannels, likely due to the diffuse distribution of junctional channels. Experiments in HeLa cells expressing exogenous Cx45 revealed that the inhibitory effect of NEO on Cx45 GJ is weaker compared to its effect on Cx43 GJ (Fig. 5H).

Effect of NEO and α -pinene on Novikoff cell viability. Although efficient GJIC is generally considered tumor-suppressive, Cxs have also been reported to promote tumor progression under certain conditions. After identifying NEO as an effective inhibitor of Cx43 GJs, we examined its effects on Novikoff cell proliferation, viability, and colony formation. Only the highest NEO concentration (1×10^3 d.f.) significantly affected Novikoff cells after 24–48 h, reducing cell number by 81–83 % and increasing apoptotic cells by 47–78 % (Fig. 6A–C). In contrast, the minimal concentration required to completely block GJIC had no effect on cell proliferation or viability, which does not support the hypothesis that reduced GJIC promotes cell proliferation. Colony formation assay revealed higher sensitivity to NEO. A significant reduction in colony number and area (~27 % and ~34 %, respectively) was observed at 1×10^4 d.f., while colony formation was completely inhibited at 1×10^3 d.f. (Fig. 6D,E). Studies with NEO did not confirm the assumption that impaired GJIC promotes tumor cell proliferation. Therefore, the effect of one of NEO main components, α -pinene, which also inhibits Cx43 GJIC, was additionally evaluated in Novikoff cells. Treatment with 100 μ M α -pinene for 48 h resulted in an approximately 7 % increase in cell proliferation, supporting the assumption that GJIC impairment may stimulate proliferation. In contrast, exposure to 300 and 500 μ M α -pinene led to a decrease in proliferation, by approximately 90 % and 95 %, respectively (Fig. 7).

Effect of CrE and ChE on colorectal cancer cell viability and GJIC. The effects of CrE and ChE on the viability of colorectal cancer cell lines HCT116 and DLD-1 were investigated. These extracts were selected due to their high polyphenol content and distinct chemical composition. CrE slightly reduced HCT116 cell viability at 200–1000 μ g/mL but had no effect on DLD-1 cells. HCT116 proliferation decreased modestly (9–17 %), whereas DLD-1 proliferation increased by ~22 % at 200 μ g/mL (Fig. 8A–C). Colony formation assays showed reduced HCT116 colony area at 1000 μ g/mL, while in DLD-1 cells colony number decreased at all CrE concentrations and colony area at 1000 μ g/mL (Fig. 8D,E). ChE (200–1000 μ g/mL) induced early and late apoptosis and inhibited proliferation in both cell lines, with stronger effects at 1000 μ g/mL (Fig. 9A–C). At this concentration, colony formation was completely suppressed (Fig. 9D,E). Overall, these findings are consistent with previous reports showing that polyphenol-rich extracts reduce cancer cell viability and proliferation. However, neither CrE nor ChE significantly affected initial GJ g_j in HCT116 or DLD-1 cells (Fig. 10A–D).

Effects of CrE and ChE on Cx43 and Cx45 GJ conductance. Based on the previous results, further experiments with CrE and ChE were performed using HeLa cells, expressing exogenous Cx43 or Cx45. In contrast to colorectal cancer cells, CrE and ChE showed differential effects on Cx43 and

Cx45 GJ g_j . ChE inhibited Cx43 GJ g_j but had no effect on Cx45, whereas CrE stimulated Cx45 GJ g_j without affecting Cx43 GJ (Fig. 11).

Effect of CrE on the expression of exogenous Cx43 and Cx45, GJP size, and HeLa cell viability. Our results showed that CrE and ChE modulate GJ conductance in a Cx-type dependent manner. Unlike ChE, CrE stimulated Cx45 GJ g_j at low concentrations. Because stimulatory effects of bioactive compounds are less frequently reported than inhibitory ones, further experiments focused on CrE. We therefore examined the effects of CrE on Cx expression and GJP size. Only 40 $\mu\text{g/mL}$ CrE increased Cx45 expression, whereas all tested CrE concentrations significantly increased Cx43 expression (Fig. 12). Since regulation of GJIC is often associated with changes in Cx expression and GJP size, plaque size was further analyzed. However, despite the observed increase in Cx expression and stimulation of g_j , no changes in Cx43 or Cx45 GJP size were detected in HeLa cells (Fig. 13). Finally, we investigated whether CrE affects HeLa cell proliferation and viability depending on Cx expression and type. CrE at 200 $\mu\text{g/mL}$ slowed proliferation of HeLa WT and HeLa Cx43 cells, while 1000 $\mu\text{g/mL}$ reduced proliferation in all tested cell lines (Fig. 14A–C). However, CrE had no significant effect on cell viability (Fig. 14D–F).

Resveratrol differently modulates Cx43 and Cx45 GJ conductance. Previous studies investigating the effects of resveratrol on GJIC relied mainly on molecular or wound-healing dye transfer assays, whereas GJ conductance had not been assessed using direct electrophysiological methods. Our results showed that in Novikoff and HeLa Cx43 cells, resveratrol had no effect on Cx43 GJ g_j at low concentrations (3–30 μM) but inhibited it at higher concentrations (100–300 μM) (Fig. 16B–D). In contrast, in HeLa cells expressing Cx45, resveratrol stimulated GJ g_j at 10–100 μM and inhibited it at 300 μM (Fig. 16E,F). A similar stimulatory effect on Cx45 GJ g_j was also observed with CrE, suggesting that this activity may be associated with the same bioactive compound. Resveratrol also produced distinct short- and long-term effects. Short-term exposure (15 min) to low concentrations did not affect Cx43 GJ g_j , whereas 24 h incubation reduced initial g_j . Conversely, 100 μM resveratrol inhibited Cx43 GJ conductance after 15 min but did not alter initial g_j after 24 h (Fig. 17A). In Cx45-expressing cells, short-term exposure to 10–100 μM resveratrol increased GJ g_j , while prolonged incubation (24 h) with 100 μM reduced initial Cx45 GJ conductance (Fig. 17B).

Docking of resveratrol to Cx43 and Cx45. As shown in Fig. 18, resveratrol exerted different effects on Cx43 and Cx45 GJ conductance. We analyzed nine favorable docking conformations. In Cx43, all sites are localized on the outer surface between TM2 and TM3 (Fig. 18C) with docking affinities of –18.3 to –17.5 kcal/mol (Fig. 18E). In Cx45, three sites were located on

the outer surface (−18.0 to −17.7 kcal/mol) (Fig. 18D), while six additional sites were found in a niche between adjacent subunits toward the channel pore, five of which showed higher affinities (−19.5 to −18.7 kcal/mol). These higher-affinity sites unique to Cx45 may explain the stimulation of Cx45 GJ g_j at low resveratrol concentrations, whereas the lower-affinity sites common to both Cxs may account for g_j inhibition.

Effect of resveratrol on Cx43 and Cx45 expression and GJP size. Cx protein expression in HeLa Cx43 and HeLa Cx45 cells was quantified by immunoblotting after 15 min and 24 h incubation with resveratrol. Short-term exposure (15 min) had no effect on total Cx43 or Cx45 levels. After 24 h, 1 and 10 μ M resveratrol did not alter Cx expression, whereas 100 μ M increased Cx43 and Cx45 levels by ~1.6- and ~2.5-fold, respectively (Fig. 19A,B,D,F). Since GJ function is regulated by Cx phosphorylation, changes in Cx43 phosphorylation at S279, S282, S368, and S373 were analyzed. Resveratrol (100 μ M) reduced pS368 levels after both 15 min and 24 h, while 10 μ M resveratrol increased pS368 expression approximately 2-fold after 24 h (Fig. 19B,G,H). Resveratrol also altered GJP size. In HeLa Cx43 cells, 24 h exposure to 10 and 100 μ M resveratrol markedly increased Cx43 GJP size from $14.7 \pm 1.8 \mu\text{m}^2$ (control) to $30.4 \pm 5.1 \mu\text{m}^2$ and $56.0 \pm 6.5 \mu\text{m}^2$, respectively (Fig. 21). We expected decrease in GJP size; however, these results may be partly explained by increased phosphorylation at S279 and S282 (Fig. 19), which may have contributed to the reduced Cx43 GJ g_j . In contrast, Cx45 formed much smaller GJP. Cx45 GJP size increased after 1–10 μ M resveratrol but decreased at 100 μ M, accompanied by increased cytoplasmic localization (Fig. 22), which may explain the reduction in GJ g_j observed under these conditions.

Effect of resveratrol on ERK1/2 activity and HeLa cell viability. Resveratrol modulated ERK1/2 activity in a concentration- and Cx-type dependent manner. After 15 min exposure, all tested concentrations increased pERK1/2 levels in HeLa WT and HeLa Cx43 cells, whereas only 1 μ M increased pERK1/2 in HeLa Cx45 cells (Fig. 23). After 24 h, 100 μ M resveratrol increased pERK1/2 activity in all HeLa cell lines and significantly reduced proliferation (Fig. 24). At this concentration, proliferation decreased by 48 %, 38 %, and 51 % in HeLa WT, HeLa Cx43, and HeLa Cx45 cells, respectively. HeLa Cx43 and HeLa Cx45 cells were more sensitive to resveratrol, showing reduced viability (81 % and 76 %), while HeLa WT viability remained close to control levels. Most non-viable cells were in late apoptotic state. Cell viability was additionally evaluated using a colony formation assay. Treatment with 1 μ M resveratrol did not affect colony formation in HeLa cells. In contrast, 10 μ M resveratrol reduced both the number and area of colonies in HeLa WT and HeLa Cx45 cells (Fig. 25). Exposure to 100 μ M resveratrol completely

inhibited colony formation in all tested HeLa cell lines. Overall, these results indicate that resveratrol-induced activation of pERK1/2 is associated with reduced HeLa cell proliferation and viability.

Effect of resveratrol on the cytoskeleton and GJ degradation. Further we investigated whether the effects of resveratrol on GJ turnover are associated with changes in cytoskeletal integrity. Since the cytoskeleton is essential for hemichannel trafficking, GJ stability, and functional regulation, live-cell imaging of HeLa WT, HeLa Cx43, and HeLa Cx45 cells labeled with fluorescent markers for F-actin and α -tubulin was performed. Resveratrol treatment did not cause an obvious disarrangement of actin cytoskeleton and microtubule network (Fig. 27), suggesting that normal GJP internalization and annular GJ (AGJ) formation were likely preserved. To assess whether resveratrol affects Cx43 GJP internalization, time-lapse imaging was performed. Resveratrol (10 μ M) stabilized Cx43 GJPs, reducing the internalization rate by approximately 3-fold (Fig. 28). To determine whether this effect was related to altered lysosomal degradation, the number of AGJs colocalizing with lysosomes was analyzed in control and resveratrol-treated HeLa Cx43-EGFP cells. No significant changes in Cx43 lysosomal degradation were observed (Fig. 29A,B). In contrast, Cx45 degradation increased, as indicated by an approximately 2-fold increase in Cx45/lysosome colocalization (Fig. 29C,D).

Sensitizing and protective effects of resveratrol on H₂O₂-induced stress in HeLa cells. Elevated levels of ROS, contributing to oxidative stress, tissue damage, and disease progression, are observed in numerous pathological conditions, including cardiovascular, neurodegenerative, inflammatory, autoimmune, respiratory diseases, and cancer. Alterations in GJIC may also play a significant role in development and progression of these pathological conditions. Therefore, we investigated whether preincubation with resveratrol (15 min or 24 h) modulates the viability of HeLa WT, HeLa Cx43, and HeLa Cx45 cells under H₂O₂-induced stress conditions. The major impact on HeLa Cx43 and HeLa Cx45 viability was achieved with 100 μ M resveratrol, while it had no effect on HeLa WT cells at any of the tested concentrations. Solely H₂O₂ exposure (1 h) decreased viability in all cell lines (Fig. 30). Short-term (15 min) resveratrol preincubation was protective in HeLa WT cells, whereas 24 h exposure (10–100 μ M) enhanced H₂O₂-induced cytotoxicity (Fig. 30A). Short-term (15 min) resveratrol preincubation did not alter H₂O₂ sensitivity in HeLa Cx43 cells, whereas 24 h preincubation increased H₂O₂-induced cytotoxicity in a concentration-dependent manner (Fig. 30B). In HeLa Cx45 cells, 15 min preincubation with 10–100 μ M resveratrol enhanced H₂O₂ effects, while 24 h exposure to 100 μ M further increased cytotoxicity

(Fig. 30C). These differences may partly reflect opposing effects of resveratrol on Cx43 and Cx45 GJs.

Effect of resveratrol on Cx43 GJ conductance, expression, and viability in colorectal cancer cells. Resveratrol did not alter initial g_j in DLD-1 cells; however, preincubation with 10 μ M resveratrol increased initial g_j in HCT116 cells (Fig. 31). Further analysis showed that 24 h treatment with resveratrol increased Cx43 expression in both cell lines. In DLD-1 cells, Cx43 levels increased by 25 %, 61 %, and 73 % after exposure to 1, 10, and 100 μ M resveratrol, respectively (Fig. 32A,C). In HCT116 cells, significant increases were observed only at 10 and 100 μ M (39 % and 51 %, respectively) (Fig. 32B,D). Resveratrol at 100 μ M significantly reduced the viability of both colorectal cancer cell lines, while 10 and 100 μ M inhibited their proliferation (Fig. 33). Colony formation assay showed that 100 μ M resveratrol completely suppressed colony formation in both cell lines. Lower concentrations (1–10 μ M) did not affect colony number or area in DLD-1 cells, whereas in HCT116 cells 10 μ M reduced colony area without affecting colony number, and 1 μ M increased colony number without changing total colony area (Fig. 34).

DISCUSSION

The results of this study reveal the effects of bioactive plant products and compounds (NEO, CrE and ChE, and resveratrol) on Cx43 and Cx45 GJIC, reflected by changes in protein expression and GJ g_j . In addition, the effects of these compounds on cell viability, proliferation, and oncogenicity were evaluated using various experimental approaches.

Our results showed that NEO inhibits Cx43 and Cx45 GJ g_j and reduces Cx43 expression (Fig. 5). Changes in GJ conductance and Cx expression may negatively affect the function of healthy neuronal and cardiac cells [24,180], and components of NEO have been associated with neurological and cardiovascular disturbances related to GJIC [182]. GJs maintain tissue integrity and GJIC; however, GJIC is often reduced or altered in cancer cells. Impaired GJIC has been linked to uncontrolled tumor cell growth, whereas restoration of GJIC is often associated with suppression of tumor progression and invasiveness [38]. Therefore, inhibition of GJ conductance by NEO could theoretically promote tumor growth. However, our results demonstrated the opposite effect. Although Novikoff cells exhibit strong proliferative capacity together with efficient GJIC, NEO significantly reduced colony number and area, and decreased cell viability (Fig. 6). These findings indicate that inhibition of GJIC did not exert a pro-oncogenic effect in Novikoff cells, challenging the widely accepted view that reduced GJIC directly promotes tumor cell proliferation.

To compare the biological activity of natural compounds from different sources, we examined the effects of cranberry and chokeberry pomace extracts on cell viability, oncogenic potential, and GJ conductance in the colorectal cancer cell lines HCT116 and DLD-1. Additional experiments were performed in HeLa cells stably expressing exogenous Cx43 or Cx45 to evaluate cell viability, Cx expression, and GJ conductance. Previous studies have reported the effects of cranberry and chokeberry extracts on oral, prostate, and colorectal cancer cell lines, although their biological activity strongly depends on the extraction and preparation methods. Polyphenol- and flavonoid-enriched cranberry extract fractions have been shown to inhibit tumor cell proliferation in both *in vitro* and *in vivo* models ([102,185]. Moreover, cranberry extracts can induce cancer cell death through multiple mechanisms, including caspase activation, mitochondrial dysfunction, induction of autophagy, and modulation of oxidative stress [102,103,108,109]. Cranberry extracts rich in proanthocyanidins have been shown to induce apoptosis in esophageal, lung, and ovarian cancer cell lines, while seed and juice extracts inhibit proliferation in a concentration-dependent manner [100,186,187,189]. Some cranberry fractions also reduce ROS levels and activate antioxidant enzymes, thereby protecting cells from oxidative stress [107]. In contrast, black chokeberry extract exhibits weaker cytotoxic effects but significantly suppresses the expression of pro-inflammatory genes such as COX-2, iNOS, and IL-8 [190]. Among different *Aronia* species, only *Aronia melanocarpa* extract significantly inhibits the growth of colorectal cancer HT-29 cells, and these effects correlate with antioxidant activity and phenolic content [95,192]. Tumor growth inhibition has also been associated with higher levels of polyphenols and flavonoids in plant extracts [191]. Although the biological activity of cranberry extracts in cancer cells has been extensively studied, information on the mechanisms of action of chokeberry bioactive compounds remains limited. Available data indicate that chokeberry extracts and their components can inhibit proliferation of colorectal and liver cancer cells, affect cell cycle progression, and induce apoptosis [94,192]. Since both cranberry and chokeberry extracts are rich in anthocyanins and other polyphenols, these compounds likely contribute significantly to their biological activity. To date, no direct studies have examined the effects of cranberry or chokeberry extracts on GJIC or Cx expression. However, polyphenol-rich grape seed extract, particularly containing resveratrol, has been reported to enhance intercellular communication in MCF-7 cells by increasing Cx43 expression and promoting Cx redistribution from the cytoplasm to the plasma membrane [151]. Our results showed that CrE stimulated Cx45 GJ g_j in HeLa cells but had no effect on Cx43, whereas ChE inhibited Cx43 GJ g_j without affecting Cx45 (Fig. 11). CrE (40 μ g/mL)

increased Cx45 expression, while Cx43 expression increased at all tested CrE concentrations (Fig. 12), although no changes in Cx43 or Cx45 GJP size were detected (Fig. 13). Neither CrE nor ChE altered GJ g_j in HCT116 or DLD-1 cells (Fig. 10), but both extracts exhibited cytotoxic effects at higher concentrations. In HeLa WT, HeLa Cx43, and HeLa Cx45 cells, CrE inhibited proliferation independently of Cx expression and type (Fig. 13).

To better understand the mechanisms of bioactive compounds, further studies focused on the polyphenol resveratrol, a common component of many plant extracts and essential oils. We found that resveratrol induced time- and concentration-dependent changes in Cx43 and Cx45 expression, phosphorylation, GJP size, conductance, and HeLa cell viability. Comparative analysis revealed that resveratrol inhibited GJIC in Cx43-expressing cells but stimulated it in Cx45-expressing cells (Fig. 16). This biphasic effect may partly be explained by molecular modeling results showing two distinct docking profiles with different affinities in Cx45, whereas only a lower-affinity docking profile was identified for Cx43 (Fig. 18). Changes in GJIC are often associated with alterations in Cx expression and GJP size [194]. However, only a small fraction of GJ channels within plaques is functionally active, as previously shown for Cx43 [156], Cx45 [65], Cx57 [64], and Cx36 [157]. Therefore, an increase in GJP size does not necessarily correspond to increased conductance. In our experiments, 24 h treatment with resveratrol reduced initial Cx43 GJ g_j (Fig. 17A), unexpectedly accompanied by an increase in GJP size in HeLa Cx43 cells (Fig. 21), suggesting reduced functional efficiency of the GJP. In contrast, initial conductance remained unchanged in HeLa Cx45 cells (Fig. 17B), despite an increase in GJP size (Fig. 22). Regulation of GJ g_j , together with modulation of Cx expression, GJP size, and turnover, is a complex process in which phosphorylation plays a key role. For example, phosphorylation of residues S279/282 is associated with reduced conductance, phosphorylation at S373 increases Cx43 levels at the plasma membrane and promotes plaque growth, while S368 phosphorylation regulates GJ turnover by affecting channel assembly, internalization, and degradation [48]. Consistent with previous studies, the decrease in Cx43 conductance observed here (Fig. 16) was accompanied by increased phosphorylation at S279 and S282 (Fig. 19), whereas phosphorylation at S373 was associated with the formation of larger Cx43 GJPs (Fig. 21).

The efficiency of GJIC may depend on Cx43 phosphorylation, which regulates GJ assembly, plaque formation, and turnover [48,178]. Cxs are phosphorylated at specific sites by various kinases, and interactions between these signaling pathways may determine the final cellular response [158,196]. Resveratrol has been reported to modulate Cx43 phosphorylation through activation of MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [197–199]. ERK1/2

phosphorylation is a key component of the MAPK cascade that regulates cell survival, proliferation, and apoptosis. Depending on the cellular context, resveratrol can either activate or inhibit this pathway [171,200]. Our results indicate that ERK1/2 activation is associated with reduced cell viability. After treatment with the highest resveratrol concentration (100 μ M, 24 h), pERK1/2 levels reached a peak, while cell viability decreased. Resveratrol reduced the viability to a greater extent in HeLa Cx43 and HeLa Cx45 cells than in HeLa WT cells lacking GJs, suggesting that GJIC may influence the proapoptotic response. Interestingly, 1 μ M resveratrol stimulated proliferation of HeLa Cx43 cells, indicating a concentration-dependent dual effect of resveratrol: low concentrations may promote cell proliferation, whereas higher concentrations inhibit it. Similar biphasic effects have been reported for other polyphenols, such as quercetin and curcumin, which induce apoptosis and reduce tumor cell viability at higher concentrations while having minimal effects on normal cells [202–204]. Resveratrol also exhibits context-dependent activity: it protects normal cells from apoptosis but exerts cytotoxic effects in cancer cells [205,206]. In estrogen-sensitive breast cancer cells, resveratrol may even stimulate proliferation by acting as a phytoestrogen and activating estrogen receptors [207].

In addition to previously described mechanisms, resveratrol has been reported to disrupt the tubulin network by inhibiting tubulin polymerization [208–210]. Depending on its concentration, resveratrol may also affect the actin cytoskeleton, for example by disrupting actin structures in MDA-MB-231 breast cancer cells or promoting actin accumulation at damaged sites in C2C12 myoblasts [211,212]. Since the microtubule and actin cytoskeletons are essential for hemichannel trafficking, membrane localization, and stabilization of GJP [213], their integrity is critical for GJ function. Our data indicate that resveratrol did not disrupt either the actin cytoskeleton or the tubulin network in HeLa cells, regardless of Cx expression or type (*Fig. 27*). However, we cannot exclude the possibility that resveratrol may affect other factors involved in Cx trafficking, such as the scaffold protein ZO-1, motor proteins like dynein, the GTPase dynamin-2, or adhesion proteins including E-cadherin and N-cadherin [214–217].

Time-lapse imaging showed that resveratrol stabilized Cx43 GJPs in HeLa cells, reducing their internalization rate approximately threefold compared with control (*Fig. 28*). This observation is consistent with previous studies reporting that genotoxic stress slows Cx43 GJP internalization in bovine corneal endothelial cells expressing Cx43-GFP [174]. Since plaque size and lifetime are closely linked to lysosomal degradation pathways [176], we hypothesized that resveratrol might affect Cx43 lysosomal degradation. However, no statistically significant changes were observed (*Fig. 29A,B*).

Although increased plaque size might be expected to enhance GJIC, 24 h treatment with 10 μ M resveratrol reduced Cx43 GJ g_j (Fig. 17A). This finding may reflect the limited functional efficiency of GJPs, as only a fraction of channels within a GJP are active, and excessive plaque loading with channels may even reduce their functional efficiency.

Resveratrol did not significantly affect GJIC in DLD-1 cells; however, 10 μ M resveratrol increased GJ g_j in HCT116 cells (Fig. 31). In both colorectal cancer cell lines, resveratrol increased Cx43 expression in a concentration-dependent manner. Nevertheless, only higher concentrations (10 and 100 μ M) inhibited cell proliferation and reduced viability (Fig. 33), while 100 μ M completely suppressed colony formation (Fig. 34). These findings are consistent with previous reports showing that higher concentrations of resveratrol significantly reduce HCT116 cell proliferation and viability and may modulate GJ function by increasing Cx43 expression [124,177,218].

Given the complexity of the results, we further investigated the effects of resveratrol under oxidative stress conditions. Short-term exposure to resveratrol produced Cx-dependent effects: it protected HeLa WT and HeLa Cx43 cells but increased the sensitivity of HeLa Cx45 cells to H₂O₂-induced stress (Fig. 30). This effect may be related to the opposite influence of low resveratrol concentrations on Cx43 and Cx45 GJ g_j. Overall, these findings suggest that resveratrol acts as a Cx-dependent modulator and, under oxidative stress, may exert either protective or sensitizing effects depending on concentration and exposure duration.

Although resveratrol shows significant biological activity *in vitro* at relatively high concentrations (≥ 100 μ M), several studies, including ours, have reported effects even at lower concentrations [220–222]. In our experiments, resveratrol-induced changes were observed at 1–10 μ M. However, these levels are much higher than typical plasma concentrations achieved after oral intake of resveratrol supplements or resveratrol-containing products such as red wine, which usually do not exceed ~ 0.02 μ M [223,224]. These pharmacokinetic limitations reflect the rapid metabolism and elimination of resveratrol, with an estimated half-life of ~ 9 h and bioavailability of only about 1 % due to extensive intestinal and hepatic metabolism [225]. Nevertheless, higher intracellular accumulation cannot be excluded. Because of its lipophilic nature, resveratrol may reach higher concentrations in tissues than in plasma [226]. This phenomenon has also been observed in colorectal cancer patients, suggesting that the colon may be a promising target for chemoprevention with orally administered resveratrol [227]. Furthermore, resveratrol bioavailability may be improved using more active analogs, such as SRT501, or advanced delivery systems including liposomes, nanoparticles, and nanoemulsions,

which enhance solubility, stability, and systemic distribution, thereby increasing therapeutic potential [228–231].

The composition and activity of plant extracts depend on several factors, including the extraction method, solvent, extraction time and temperature, as well as the origin, growth conditions, and harvesting time of the plant material [232]. As a result, extracts obtained from the same plant may exhibit significant differences in biological activity. Importantly, the biological effects of plant extracts are often complex and result from interactions among multiple components rather than a single active compound. These components may act synergistically, enhancing the overall effect, or antagonistically, reducing each other's activity. Consequently, the biological activity of an extract does not necessarily reflect the effects of individual compounds, and different extract fractions may display varying or even opposing biological effects. Therefore, while plant extracts provide valuable insights into potential biological activity, their effects should be interpreted with consideration of their compositional variability and complex mechanisms of action.

Given the growing interest in natural plant extracts and antioxidant polyphenols as dietary components and valuable by-products of the food industry, our findings may have important implications. Proper GJIC is essential for maintaining tissue integrity and preventing pathological processes. Our results contribute to a better understanding of how natural compounds may support cellular function through modulation of GJIC.

CONCLUSIONS

1. NEO inhibits metabolic communication between Novikoff cells and decreases their viability, proliferation, and colony formation. Compared with Cx43, NEO has a weaker effect on Cx45 GJ g_j.
2. CrE and ChE exhibit cytotoxic effects on HCT116 and DLD-1 cells at higher concentrations and inhibits their colony formation. Neither CrE nor ChE affects Cx43 GJ g_j in HCT116 or DLD-1 cells.
3. ChE inhibits Cx43 but has no effect on Cx45 GJ g_j, whereas CrE stimulates Cx45 without affecting Cx43 GJ g_j. CrE increases Cx43 and Cx45 expressions but do not alter the size of Cx43 or Cx45 GJ plaques. CrE does not affect the viability of HeLa WT, HeLa Cx43, and HeLa Cx45 cells, but at higher concentrations it reduces their proliferation rate.
4. The effects of resveratrol in HeLa cells depend on treatment duration, concentration, and the connexin type. Resveratrol inhibits Cx43 GJ g_j but exerts a biphasic effect on Cx45 GJ g_j, which may be explained by

different molecular docking profiles. Resveratrol also induces multiple changes in Cx43 phosphorylation and increases Cx43 and Cx45 expressions and GJ plaque size. In addition, resveratrol activates the ERK1/2 signaling pathway, which correlates with reduced viability and proliferation in HeLa WT, HeLa Cx43, and HeLa Cx45 cells.

5. Resveratrol does not affect initial GJ g_j in DLD-1 cells but increases it in HCT116 cells and enhances Cx43 expression in both colorectal cancer cell lines. Resveratrol also reduces the viability and proliferation of HCT116 and DLD-1 cells and inhibits their colony formation.

BIBLIOGRAFIJA

- [1] Abdelmaksoud TG, Younis MI, Altemimi AB, Tlay RH, Ali Hassan N. Bioactive Compounds of Plant-Based Food: Extraction, Isolation, Identification, Characteristics, and Emerging Applications. *Food Sci Nutr* 2025;13:e70351. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70351>.
- [2] Rao YK, Geethangili M, Fang S-H, Tzeng Y-M. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1770–6. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.012>.
- [3] Ngezahayo A, Ruhe FA. Connexins in the development and physiology of stem cells. *Tissue Barriers* n.d.;9:1949242. <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1949242>.
- [4] Antanavičiūtė I, Rysevaitė K, Liutkevičius V, Marandykina A, Rimkutė L, Sveikatiene R, et al. Long-Distance Communication between Laryngeal Carcinoma Cells. *PLoS ONE* 2014;9:e99196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099196>.
- [5] Ebrahim T, Ebrahim AS, Kandouz M. Diversity of Intercellular Communication Modes: A Cancer Biology Perspective. *Cells* 2024;13. <https://doi.org/10.3390/cells13060495>.
- [6] Zheng Y, Huang R, Pan J. Dynamic Intercellular Networks in the CNS: Mechanisms of Crosstalk from Homeostasis to Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2025;26. <https://doi.org/10.3390/ijms26178155>.
- [7] Martins-Marques T. Connecting different heart diseases through intercellular communication. *Biol Open* 2021;10:bio058777. <https://doi.org/10.1242/bio.058777>.
- [8] Martins-Marques T, Ribeiro-Rodrigues T, Batista-Almeida D, Aasen T, Kwak BR, Girao H. Biological Functions of Connexin43 Beyond Intercellular Communication. *Trends Cell Biol* 2019;29:835–47. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.07.001>.
- [9] Frank M, Wirth A, Andrié RP, Kreuzberg MM, Dobrowolski R, Seifert G, et al. Connexin45 Provides Optimal Atrioventricular Nodal Conduction in the Adult Mouse Heart. *Circ Res* 2012;111:1528–38. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.270561>.
- [10] Chapman RJ, Lall VK, Maxeiner S, Willecke K, Deuchars J, King AE. Localization of neurones expressing the gap junction protein Connexin45 within the adult spinal dorsal horn: a study using Cx45-eGFP reporter mice. *Brain Struct Funct* 2013;218:751–65. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0426-1>.
- [11] Nishii K, Kumai M, Egashira K, Miwa T, Hashizume K, Miyano Y, et al. Mice lacking connexin45 conditionally in cardiac myocytes display embryonic lethality similar to that of germline knockout mice without endocardial cushion defect. *Cell Commun Adhes* 2003;10:365–9. <https://doi.org/10.1080/cac.10.4-6.365.369>.
- [12] Cheng Y-J, Chang M-Y, Chang W-W, Wang W-K, Liu C-F, Lin S-T, et al. Resveratrol Enhances Chemosensitivity in Mouse Melanoma Model Through Connexin 43 Upregulation. *Environ Toxicol* 2015;30:877–86. <https://doi.org/10.1002/tox.21952>.
- [13] Chen Z, Zhang C, Gao F, Fu Q, Fu C, He Y, et al. A systematic review on the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* Hort. (Chuanxiong). *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 2018;119:309–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.050>.
- [14] Su V, Lau AF. Connexins: Mechanisms regulating protein levels and intercellular communication. *FEBS Lett* 2014;588:1212–20. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.013>.
- [15] Yeager M, Harris AL. Gap Junction Channel Structure in the Early 21st Century: Facts and Fantasies. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:521. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.09.001>.
- [16] Yasarbas SS, Inal E, Yildirim MA, Dubrac S, Lamartine J, Mese G. Connexins in epidermal health and diseases: insights into their mutations, implications,

- and therapeutic solutions. *Front Physiol* 2024;15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1346971>.
- [17] McNutt NS, Weinstein RS. THE ULTRASTRUCTURE OF THE NEXUS : A Correlated Thin-Section and Freeze-Cleave Study. *J Cell Biol* 1970;47:666–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.47.3.666>.
 - [18] Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal CCS* 2009;7:4. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-7-4>.
 - [19] Musil LS, Le A-CN, VanSlyke JK, Roberts LM. Regulation of Connexin Degradation as a Mechanism to Increase Gap Junction Assembly and Function *. *J Biol Chem* 2000;275:25207–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.33.25207>.
 - [20] Aasen T, Johnstone S, Vidal-Brime L, Lynn KS, Koval M. Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19051296>.
 - [21] Lukowicz-Bedford RM, Farnsworth DR, Miller AC. Connexinplexity: the spatial and temporal expression of connexin genes during vertebrate organogenesis. *G3 GenesGenomesGenetics* 2022;12:jkac062. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac062>.
 - [22] Paunekar S, Tamagnone L. Connexin-43 in Cancer: Above and Beyond Gap Junctions! *Cancers* 2024;16. <https://doi.org/10.3390/cancers16244191>.
 - [23] Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou N-H. Gap Junctions. *Compr Physiol* 2012;2:10.1002/cphy.c110051. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110051>.
 - [24] Rodríguez-Sinovas A, Sánchez JA, Valls-Lacalle L, Consegal M, Ferreira-González I. Connexins in the Heart: Regulation, Function and Involvement in Cardiac Disease. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22094413>.
 - [25] Zhang M, Wang Z-Z, Chen N-H. Connexin 43 Phosphorylation: Implications in Multiple Diseases. *Molecules* 2023;28. <https://doi.org/10.3390/molecules28134914>.
 - [26] Solan JL, Lampe PD. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 2009;419:261–72. <https://doi.org/10.1042/BJ20082319>.
 - [27] Solan JL, Lampe PD. Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membr Biol* 2007;217:35–41. <https://doi.org/10.1007/s00232-007-9035-y>.
 - [28] Figueroa XF, Duling BR. Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:251–66. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2117>.
 - [29] Plotkin LI. CONNEXIN 43 AND BONE: NOT JUST A GAP JUNCTION PROTEIN. *Actual En Osteol* 2011;7:79–90.
 - [30] Martin PEM, van Steensel M. Connexins and skin disease: insights into the role of beta connexins in skin homeostasis. *Cell Tissue Res* 2015;360:645–58. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2094-3>.
 - [31] Martins-Marques T, Witschas K, Ribeiro I, Zuzarte M, Catarino S, Ribeiro-Rodrigues T, et al. Cx43 can form functional channels at the nuclear envelope and modulate gene expression in cardiac cells. *Open Biol* n.d.;13:230258. <https://doi.org/10.1098/rsob.230258>.
 - [32] Boengler K, Leybaert L, Ruiz-Meana M, Schulz R. Connexin 43 in Mitochondria: What Do We Really Know About Its Function? *Front Physiol* 2022;13:928934. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.928934>.
 - [33] Soares AR, Martins-Marques T, Ribeiro-Rodrigues T, Ferreira JV, Catarino S, Pinho MJ, et al. Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells. *Sci Rep* 2015;5:13243. <https://doi.org/10.1038/srep13243>.

- [34] Gerdes H-H, Rustom A, Wang X. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mech Dev* 2013;130:381–7. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.11.006>.
- [35] Gervasi A, D'Aprile S, Denaro S, Amorini MA, Vicario N, Parenti R. Connexin 43 Role in Mitochondrial Transfer and Homeostasis in the Central Nervous System. *J Cell Physiol* 2025;240:e70086. <https://doi.org/10.1002/jcp.70086>.
- [36] Boengler K, Ruiz-Meana M, Gent S, Ungefug E, Soetkamp D, Miro-Casas E, et al. Mitochondrial connexin 43 impacts on respiratory complex I activity and mitochondrial oxygen consumption. *J Cell Mol Med* 2012;16:1649–55. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01516.x>.
- [37] Bonsergent E, Grisard E, Buchrieser J, Schwartz O, Théry C, Lavieu G. Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat Commun* 2021;12:1864. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22126-y>.
- [38] Aasen T, Mesnil M, Naus CC, Lampe PD, Laird DW. Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nat Rev Cancer* 2016;16:775–88. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.105>.
- [39] Krüger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, et al. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 2000;127:4179–93. <https://doi.org/10.1242/dev.127.19.4179>.
- [40] Coppen SR, Gourdie RG, Severs NJ. Connexin45 is the first connexin to be expressed in the central conduction system of the mouse heart. *Exp Clin Cardiol* 2001;6:17–23.
- [41] Fang JS, Dai C, Kurjiaka DT, Burt JM, Hirschi KK. Cx45 Regulates Endothelial-induced Mesenchymal Cell Differentiation Toward a Mural Cell Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:362–8. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.255950>.
- [42] Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou N-H, Peti-Peterdi J. Connexins and the kidney. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 2010;298:R1143–55. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00808.2009>.
- [43] Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:191–200. <https://doi.org/10.1038/nrn1627>.
- [44] Pacwa A, Mroz K, Liu X, Smedowski A. The structure, function, and distribution of gap junctions in the retina: Life cycle in health and disease. *J Cell Commun Signal* 2025;19:e70036. <https://doi.org/10.1002/ccs3.70036>.
- [45] Kirichenko EYu, Skatchkov SN, Ermakov AM. Structure and Functions of Gap Junctions and Their Constituent Connexins in the Mammalian CNS. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol* 2021;15:107–19. <https://doi.org/10.1134/S1990747821020069>.
- [46] Davis MJ, Castorena-Gonzalez JA, Li M, Zawieja SD, Simon AM, Geng X, et al. Connexin-45 is expressed in mouse lymphatic endothelium and required for lymphatic valve function. *JCI Insight* n.d.;9:e169931. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.169931>.
- [47] Hanner F, von Maltzahn J, Maxeiner S, Toma I, Sipos A, Krüger O, et al. Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R371–80. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00468.2007>.
- [48] Solan JL, Lampe PD. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett* 2014;588:1423–9. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.049>.
- [49] Spagnol G, Trease A, Zheng L, Sobota S, Schmidt M, Cheku S, et al. Cx45 regulation by kinases and impact of expression in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2025;203:91–105. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2025.04.011>.

- [50] Kopanic JL, Al-mugotir MH, Kieken F, Zach S, Trease AJ, Sorgen PL. Characterization of the connexin45 carboxyl-terminal domain structure and interactions with molecular partners. *Biophys J* 2014;106:2184–95. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.03.045>.
- [51] Kanter HL, Laing JG, Beyer EC, Green KG, Saffitz JE. Multiple connexins colocalize in canine ventricular myocyte gap junctions. *Circ Res* 1993;73:344–50. <https://doi.org/10.1161/01.res.73.2.344>.
- [52] Davis LM, Kanter HL, Beyer EC, Saffitz JE. Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissues with disparate conduction properties. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1124–32. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)90879-6](https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)90879-6).
- [53] Kausalya PJ, Reichert M, Hunziker W. Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett* 2001;505:92–6. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02786-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02786-7).
- [54] Laing JG, Manley-Markowski RN, Koval M, Civitelli R, Steinberg TH. Connexin45 Interacts with Zonula Occludens-1 and Connexin43 in Osteoblastic Cells*. *J Biol Chem* 2001;276:23051–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100303200>.
- [55] Zhang A, Hitomi M, Bar-Shain N, Dalimov Z, Ellis L, Velpula KK, et al. Connexin 43 expression is associated with increased malignancy in prostate cancer cell lines and functions to promote migration. *Oncotarget* 2015;6:11640–51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3449>.
- [56] Thiagarajan PS, Sinyuk M, Turaga SM, Mulkearns-Hubert EE, Hale JS, Rao V, et al. Cx26 drives self-renewal in triple-negative breast cancer via interaction with NANOG and focal adhesion kinase. *Nat Commun* 2018;9:578. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02938-1>.
- [57] Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, et al. Correlations of Differentially Expressed Gap Junction Connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with Breast Cancer Progression and Prognosis. *PLOS ONE* 2014;9:e112541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112541>.
- [58] Ruch R. Gap Junctions and Connexins in Cancer Formation, Progression, and Therapy. *Cancers* 2020;12:3307. <https://doi.org/10.3390/cancers12113307>.
- [59] Bukauskas FF, Verselis VK. Gap junction channel gating. *Biochim Biophys Acta* 2004;1662:42–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.01.008>.
- [60] Harris AL, Spray DC, Bennett MV. Kinetic properties of a voltage-dependent junctional conductance. *J Gen Physiol* 1981;77:95–117. <https://doi.org/10.1085/jgp.77.1.95>.
- [61] Skeberdis VA, Rimkute L, Skeberdyte A, Paulauskas N, Bukauskas FF. pH-dependent modulation of connexin-based gap junctional uncouplers. *J Physiol* 2011;589:3495–506. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.209072>.
- [62] Bevans CG, Harris AL. Regulation of Connexin Channels by pH: DIRECT ACTION OF THE PROTONATED FORM OF TAURINE AND OTHER AMINOSULFONATES *. *J Biol Chem* 1999;274:3711–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3711>.
- [63] Liu S, Taffet S, Stoner L, Delmar M, Vallano ML, Jalife J. A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length. *Biophys J* 1993;64:1422–33. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81508-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81508-X).
- [64] Palacios-Prado N, Sonntag S, Skeberdis VA, Willecke K, Bukauskas FF. Gating, permselectivity and pH-dependent modulation of channels formed by connexin57, a major connexin of horizontal cells in the mouse retina. *J Physiol* 2009;587:3251–69. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171496>.
- [65] Palacios-Prado N, Briggs SW, Skeberdis VA, Pranevicius M, Bennett MVL, Bukauskas FF. pH-dependent modulation of voltage gating in connexin45 homotypic

- and connexin45/connexin43 heterotypic gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:9897–902. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004552107>.
- [66] Parys JB, Bultynck G. Calcium signaling in health, disease and therapy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018;1865:1657–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.019>.
- [67] Proudfoot D. Calcium Signaling and Tissue Calcification. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2019;11:a035303. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035303>.
- [68] Burr GS, Mitchell CK, Keflemariam YJ, Heidelberger R, O'Brien J. Calcium-dependent binding of calmodulin to neuronal gap junction proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:1191–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.007>.
- [69] Peracchia C, Sotkis A, Wang XG, Peracchia LL, Persechini A. Calmodulin Directly Gates Gap Junction Channels*. *J Biol Chem* 2000;275:26220–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004007200>.
- [70] He LY, Zhang XM, Liu B, Tian Y, Ma WH. Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. *Braz J Med Biol Res* 2016;49:e5257. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165257>.
- [71] Shipman RD, Jost J, Pollet D, Waldmann P. Modulation of gap junctional intercellular communication in HaCaT cells by xenobiotics. *FASEB J* 2019;33:lb229–lb229. https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.lb229.
- [72] Palacios-Prado N, Hoge G, Marandykina A, Rimkute L, Chapuis S, Paulauskas N, et al. Intracellular magnesium-dependent modulation of gap junction channels formed by neuronal connexin36. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2013;33:4741–53. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2825-12.2013>.
- [73] Rimkute L, Kraujalis T, Snipas M, Palacios-Prado N, Jotautis V, Skeberdis VA, et al. Modulation of Connexin-36 Gap Junction Channels by Intracellular pH and Magnesium Ions. *Front Physiol* 2018;9:362. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00362>.
- [74] Leithe E, Mesnil M, Aasen T. The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2018;1860:48–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.008>.
- [75] Lampe PD, Lau AF. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1171–86. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00264-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00264-4).
- [76] Carbenoxolone Inhibition of Voltage-Gated Ca Channels and Synaptic Transmission in the Retina | *Journal of Neurophysiology* | American Physiological Society n.d. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/jn.00148.2004> (accessed February 5, 2026).
- [77] Lavriha P, Han Y, Ding X, Schuster D, Qi C, Vaithia A, et al. Mechanism of connexin channel inhibition by mefloquine and 2-aminoethoxydiphenyl borate. *PloS One* 2024;19:e0315510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0315510>.
- [78] Cho H-J, Chung DK, Lee HH. Mefloquine-induced conformational shift in Cx36 N-terminal helix leading to channel closure mediated by lipid bilayer. *Nat Commun* 2024;15:9223. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53587-6>.
- [79] Seemann N, Welling A, Rustenbeck I. The inhibitor of connexin Cx36 channels, mefloquine, inhibits voltage-dependent Ca²⁺ channels and insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 2018;472:97–106. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.11.024>.
- [80] Raškevičius V, Jotautis V, Rimkutė L, Marandykina A, Kazokaitė M, Kairys V, et al. Molecular basis for potentiation of Cx36 gap junction channel conductance by n-alcohols and general anesthetics. *Biosci Rep* 2018;38:BSR20171323. <https://doi.org/10.1042/BSR20171323>.

- [81] Spray DC, Rozental R, Srinivas M. Prospects for rational development of pharmacological gap junction channel blockers. *Curr Drug Targets* 2002;3:455–64. <https://doi.org/10.2174/1389450023347353>.
- [82] Harks EG, de Roos AD, Peters PH, de Haan LH, Brouwer A, Ypey DL, et al. Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:1033–41.
- [83] Srinivas M, Spray DC. Closure of Gap Junction Channels by Arylamino benzoates. *Mol Pharmacol* 2003;63:1389–97. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1389>.
- [84] Dhein S. Peptides acting at gap junctions. *Peptides* 2002;23:1701–9. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(02\)00113-4](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(02)00113-4).
- [85] Leone A, Longo C, Trosko JE. The chemopreventive role of dietary phytochemicals through gap junctional intercellular communication. *Phytochem Rev* 2012;11:285–307. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9235-7>.
- [86] Manach C, Hubert J, Llorach R, Scalbert A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:1303–15. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800516>.
- [87] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* 2008;46:446–75. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- [88] Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res PTR* 2007;21:308–23. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>.
- [89] Huang M, Lu J-J, Huang M-Q, Bao J-L, Chen X-P, Wang Y-T. Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21:1801–18. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.727395>.
- [90] Mickus R, Jančiukė G, Raškevičius V, Mikalayeva V, Matulytė I, Marksa M, et al. The effect of nutmeg essential oil constituents on Novikoff hepatoma cell viability and communication through Cx43 gap junctions. *Biomed Pharmacother* 2021;135:111229. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111229>.
- [91] Pillai S, Mahmud R, Lee WC, Perumal S. Anti-Parasitic Activity of *Myristica Fragrans* Houtt. Essential Oil Against *Toxoplasma Gondii* Parasite. *APCBEE Procedia* 2012;2:92–6. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.017>.
- [92] Rastuti U, Diastuti H, Widyarningsih S, Chasani M, Sheiliyani C, Rahmasari A, et al. Toxicity Test of Nanoemulsions of Nutmeg Fruits and Leaves Essential Oil against *Artemia salina* Leach and Its Cytotoxicity Test against Breast Cancer Cells T47D. *Indones J Chem* 2024;24:1309–18. <https://doi.org/10.22146/ijc.91077>.
- [93] Piaru SP, Mahmud R, Abdul Majid AMS, Ismail S, Man CN. Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. *J Sci Food Agric* 2012;92:593–7. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4613>.
- [94] Wenzel J, Wang L, Horcasitas S, Warburton A, Constine S, Kjellson A, et al. Influence of supercritical fluid extraction parameters in preparation of black chokeberry extracts on total phenolic content and cellular viability. *Food Sci Nutr* 2020;8:3626–37. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1645>.
- [95] Gill NK, Rios D, Osorio-Camacena E, Mojica BE, Kaur B, Soderstrom MA, et al. Anticancer Effects of Extracts from Three Different Chokeberry Species. *Nutr Cancer* 2021;73:1168–74. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1789679>.
- [96] Buda V, Brezoiu A-M, Berger D, Pavel IZ, Muntean D, Minda D, et al. Biological Evaluation of Black Chokeberry Extract Free and Embedded in Two Mesoporous Silica-Type Matrices. *Pharmaceutics* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090838>.

- [97] Bushmeleva K, Vyshtakalyuk A, Terenzhev D, Belov T, Nikitin E, Zobov V. Antioxidative and Immunomodulating Properties of Aronia melanocarpa Extract Rich in Anthocyanins. *Plants* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/plants11233333>.
- [98] Blumberg JB, Camesano TA, Cassidy A, Kris-Etherton P, Howell A, Manach C, et al. Cranberries and Their Bioactive Constituents in Human Health. *Adv Nutr* 2013;4:618–32. <https://doi.org/10.3945/an.113.004473>.
- [99] Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003;3:768–80. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>.
- [100] Kresty LA, Howell AB, Baird M. Cranberry proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit acid-induced proliferation of human esophageal adenocarcinoma cells. *J Agric Food Chem* 2008;56:676–80. <https://doi.org/10.1021/jf071997t>.
- [101] Kashyap D, Tuli HS, Sharma AK. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci* 2016;146:201–13. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.017>.
- [102] Ferguson PJ, Kurowska EM, Freeman DJ, Chambers AF, Koropatnick J. In vivo inhibition of growth of human tumor lines by flavonoid fractions from cranberry extract. *Nutr Cancer* 2006;56:86–94. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5601_12.
- [103] Sun J, Hai Liu R. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett* 2006;241:124–34. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.10.027>.
- [104] MacLean MA, Scott BE, Deziel BA, Nunnelley MC, Liberty AM, Gottschall-Pass KT, et al. North American Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*) Stimulates Apoptotic Pathways in DU145 Human Prostate Cancer Cells In Vitro. *Nutr Cancer* 2011;63:109–20. <https://doi.org/10.1080/01635581.2010.516876>.
- [105] Kresty LA, Weh KM, Zeyzus-Johns B, Perez LN, Howell AB. Cranberry proanthocyanidins inhibit esophageal adenocarcinoma in vitro and in vivo through pleiotropic cell death induction and PI3K/AKT/mTOR inactivation. *Oncotarget* 2015;6:33438–55. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5586>.
- [106] Neto CC, Amoroso JW, Liberty AM. Anticancer activities of cranberry phytochemicals: An update. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:S18–27. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700433>.
- [107] Balawejder M, Piechowiak T, Kapusta I, Chęciek A, Matłok N. In Vitro Analysis of Selected Antioxidant and Biological Properties of the Extract from Large-Fruited Cranberry Fruits. *Molecules* 2023;28:7895. <https://doi.org/10.3390/molecules28237895>.
- [108] Denis M-C, Desjardins Y, Furtos A, Marcil V, Dudonné S, Montoudis A, et al. Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. *Clin Sci* 2014;128:197–212. <https://doi.org/10.1042/CS20140210>.
- [109] Caldas APS, Coelho OGL, Bressan J. Cranberry antioxidant power on oxidative stress, inflammation and mitochondrial damage. *Int J Food Prop* 2018;21:582–92. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1409758>.
- [110] Sharifi-Rad J, Quispe C, Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Santini A, et al. Resveratrol' biotechnological applications: Enlightening its antimicrobial and antioxidant properties. *J Herb Med* 2022;32:100550. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100550>.
- [111] Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J* 2003;17:1975–85. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0168rev>.
- [112] Truong V-L, Jun M, Jeong W-S. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *BioFactors* 2018;44:36–49. <https://doi.org/10.1002/biof.1399>.

- [113] Cheng CK, Luo J-Y, Lau CW, Chen Z-Y, Tian XY, Huang Y. Pharmacological basis and new insights of resveratrol action in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2020;177:1258–77. <https://doi.org/10.1111/bph.14801>.
- [114] Griñán-Ferré C, Bellver-Sanchis A, Izquierdo V, Corpas R, Roig-Soriano J, Chillón M, et al. The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: From antioxidant to epigenetic therapy. *Ageing Res Rev* 2021;67:101271. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101271>.
- [115] Santos MA, Franco FN, Caldeira CA, de Araújo GR, Vieira A, Chaves MM. Resveratrol has its antioxidant and anti-inflammatory protective mechanisms decreased in aging. *Arch Gerontol Geriatr* 2023;107:104895. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2022.104895>.
- [116] Zhou D-D, Luo M, Huang S-Y, Saimaiti A, Shang A, Gan R-Y, et al. Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2021;2021:9932218. <https://doi.org/10.1155/2021/9932218>.
- [117] Wu H, Chen L, Zhu F, Han X, Sun L, Chen K. The Cytotoxicity Effect of Resveratrol: Cell Cycle Arrest and Induced Apoptosis of Breast Cancer 4T1 Cells. *Toxins* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/toxins11120731>.
- [118] Venkatadri R, Muni T, Iyer AKV, Yakisich JS, Azad N. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death Dis* 2016;7:e2104–e2104. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.6>.
- [119] Qin X, Luo H, Deng Y, Yao X, Zhang J, He B. Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis via the Hippo/YAP pathway in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2022;636:197–204. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.077>.
- [120] Hanzouli F, Zemni H, Gargouri M, Boubakri H, Mliki A, Vincenzi S, et al. Evidence of an active role of resveratrol derivatives in the tolerance of wild grapevines (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) to salinity. *J Plant Res* 2024;137:265–77. <https://doi.org/10.1007/s10265-023-01515-y>.
- [121] Chung I-M, Park MR, Chun JC, Yun SJ. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Sci* 2003;164:103–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00341-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00341-2).
- [122] Xia N, Daiber A, Förstermann U, Li H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2017;174:1633–46. <https://doi.org/10.1111/bph.13492>.
- [123] Gerszon J, Rodacka A, Puchała M. Antioxidant Properties of Resveratrol and its Protective Effects in Neurodegenerative Diseases. *Med J Cell Biol* 2014;4:97–117. <https://doi.org/10.2478/acb-2014-0006>.
- [124] Brockmueller A, Buhrmann C, Shayan P, Shakibaei M. Resveratrol induces apoptosis by modulating the reciprocal crosstalk between p53 and Sirt-1 in the CRC tumor microenvironment. *Front Immunol* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1225530>.
- [125] Mondal A, Bennett LL. Resveratrol enhances the efficacy of sorafenib mediated apoptosis in human breast cancer MCF7 cells through ROS, cell cycle inhibition, caspase 3 and PARP cleavage. *Biomed Pharmacother* 2016;84:1906–14. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.096>.
- [126] Heo J-R, Kim S-M, Hwang K-A, Kang J-H, Choi K-C. Resveratrol induced reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, and cell cycle arrest in the A375SM malignant melanoma cell line. *Int J Mol Med* 2018;42:1427–35. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3732>.
- [127] Raviv T, Shteinfer-Kuzmine A, Moyal MM, Shoshan-Barmatz V. Resveratrol's Pro-Apoptotic Effects in Cancer Are Mediated Through the Interaction and

- Oligomerization of the Mitochondrial VDAC1. *Int J Mol Sci* 2025;26. <https://doi.org/10.3390/ijms26093963>.
- [128] Venkatadri R, Muni T, Iyer AKV, Yakisich JS, Azad N. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death Dis* 2016;7:e2104–e2104. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.6>.
 - [129] Nielsen M, Ruch RJ, Vang O. Resveratrol Reverses Tumor-Promoter-Induced Inhibition of Gap-Junctional Intercellular Communication. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:804–9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3378>.
 - [130] Kim JH, Lee BK, Lee KW, Lee HJ. Resveratrol counteracts gallic acid-induced down-regulation of gap-junction intercellular communication. *J Nutr Biochem* 2009;20:149–54. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.01.008>.
 - [131] Lee J-C, Lee S-M, Kim J, Ahn S, Lee B, Chang I. Protective Effect of Resveratrol on the Oxidative Stress-Induced Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication in HaCaT Keratinocytes. *Biomol Ther* 2003.
 - [132] Losso JN, Truax RE, Richard G. trans-Resveratrol Inhibits Hyperglycemia-Induced Inflammation and Connexin Downregulation in Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Agric Food Chem* 2010;58:8246–52. <https://doi.org/10.1021/jf1012067>.
 - [133] Greifová H, Jambor T, Tokárová K, Knížatová N, Lukáč N. In Vitro Effect of Resveratrol Supplementation on Oxidative Balance and Intercellular Communication of Leydig Cells Subjected to Induced Oxidative Stress. *Folia Biol (Praha)* 2022;70:19–32. https://doi.org/10.3409/fb_70-1.03.
 - [134] Xiao J, Wang X, Wu Y, Zhao Q, Liu X, Zhang G, et al. Synergistic effect of resveratrol and HSV-TK/GCV therapy on murine hepatoma cells. *Cancer Biol Ther* 2019;20:183–91. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1523094>.
 - [135] Yan F, Tian X, Ma X. [Effects of resveratrol on growth inhibition and gap-junctional intercellular communication of HepG2 cells]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006;26:963–6.
 - [136] Lee H-J, Cha HJ, Jeong H, Lee S-N, Lee C-W, Kim M, et al. Conformational changes in the human Cx43/GJA1 gap junction channel visualized using cryo-EM. *Nat Commun* 2023;14:931. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36593-y>.
 - [137] Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, et al. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci Publ Protein Soc* 2018;27:14–25. <https://doi.org/10.1002/pro.3235>.
 - [138] Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 2007;35:W407–410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.
 - [139] Laskowski RA, MacArthur MW, Thornton JM. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. *Int. Tables Crystallogr.*, John Wiley & Sons, Ltd; 2012, p. 684–7. <https://doi.org/10.1107/97809553602060000882>.
 - [140] Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021;596:583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
 - [141] Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D1102–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>.
 - [142] Koes DR, Baumgartner MP, Camacho CJ. Lessons Learned in Empirical Scoring with smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise. *J Chem Inf Model* 2013;53:1893–904. <https://doi.org/10.1021/ci300604z>.
 - [143] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010;31:455–61. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

- [144] Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model* 2011;51:2778–86. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>.
- [145] Fornelli F, Leone A, Verdesca I, Minervini F, Zacheo G. The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicol In Vitro* 2007;21:217–23. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.09.024>.
- [146] Livny O, Reifen R, Madar Z, Schwartz B, Kaplan I, Polak-Charcon S. Lycopene Inhibits Proliferation and Enhances Gap-Junction Communication of KB-1 Human Oral Tumor Cells. *J Nutr* 2002;132:3754–9. <https://doi.org/10.1093/jn/132.12.3754>.
- [147] Acuña RA, Varas-Godoy M, Herrera-Sepulveda D, Retamal MA. Connexin46 Expression Enhances Cancer Stem Cell and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Characteristics of Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Int J Mol Sci* 2021;22:12604. <https://doi.org/10.3390/ijms222212604>.
- [148] Esquer H, Zhou Q, Abraham AD, LaBarbera DV. Advanced High-Content-Screening Applications of Clonogenicity in Cancer. *SLAS Discov* 2020;25:734–43. <https://doi.org/10.1177/2472555220926921>.
- [149] Tamkutė L, Gil BM, Carballido JR, Pukalskienė M, Venskutonis PR. Effect of cranberry pomace extracts isolated by pressurized ethanol and water on the inhibition of food pathogenic/spoilage bacteria and the quality of pork products. *Food Res Int* 2019;120:38–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.025>.
- [150] Lee DE, Shin BJ, Hur HJ, Kim JH, Kim J, Kang NJ, et al. Quercetin, the active phenolic component in kiwifruit, prevents hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junction intercellular communication. *Br J Nutr* 2010;104:164–70. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000346>.
- [151] Hix LM, Lockwood SF, Bertram JS. Upregulation of connexin 43 protein expression and increased gap junctional communication by water soluble disodium disuccinate astaxanthin derivatives. *Cancer Lett* 2004;211:25–37. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.01.036>.
- [152] Leone A, Longo C, Gerardi C, Trosko JE. Pro-Apoptotic Effect of Grape Seed Extract on MCF-7 Involves Transient Increase of Gap Junction Intercellular Communication and Cx43 Up-Regulation: A Mechanism of Chemoprevention. *Int J Mol Sci* 2019;20:3244. <https://doi.org/10.3390/ijms20133244>.
- [153] Wang SQ, Zhang SW, Zhang CZ, Zhao ZY, Wang YJ. Connexin 43 enhances oxaliplatin cytotoxicity in colorectal cancer cell lines. *Cell Mol Biol* 2017;63:53–8. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.4.9>.
- [154] Sirnes S, Bruun J, Kolberg M, Kjenseth A, Lind GE, Svindland A, et al. Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. *Int J Cancer* 2012;131:570–81. <https://doi.org/10.1002/ijc.26392>.
- [155] Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou N-H. Gap junctions. *Compr Physiol* 2012;2:1981–2035. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110051>.
- [156] Su V, Lau AF. Connexins: Mechanisms regulating protein levels and intercellular communication. *FEBS Lett* 2014;588:1212–20. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.013>.
- [157] Bukauskas FF, Jordan K, Bukauskiene A, Bennett MVL, Lampe PD, Laird DW, et al. Clustering of connexin 43–enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:2556–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.050588497>.
- [158] Marandykina A, Palacios-Prado N, Rimkutė L, Skeberdis VA, Bukauskas FF. Regulation of connexin36 gap junction channels by n-alkanols and arachidonic acid. *J Physiol* 2013;591:2087–101. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.250910>.

- [159] Mickus R, Raškevičius V, Sarapinienė I, Mikalayeva V, Prekeris R, Skeberdis VA. Phosphorylation-dependent allosteric regulation of Cx43 gap junction inhibitor potency. *Biomed Pharmacother* 2024;174:116550. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116550>.
- [160] Matusevičiūtė R, Ignatavičiūtė E, Mickus R, Bordel S, Skeberdis VA, Raškevičius V. Evaluation of Cx43 Gap Junction Inhibitors Using a Quantitative Structure-Activity Relationship Model. *Biomedicines* 2023;11:1972. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071972>.
- [161] Mazur B, Kopciuch RG, Buszewski B, Borowska EJ. Polyphenol, Anthocyanin and Resveratrol Mass Fractions and Antioxidant Properties of Cranberry Cultivars. *Food Technol Biotechnol* 2009;47:56–61.
- [162] Buhrmann C, Shayan P, Kraehe P, Popper B, Goel A, Shakibaei M. Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through up-regulation of intercellular junctions, Epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer. *Biochem Pharmacol* 2015;98:51–68. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.105>.
- [163] Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* 2000;149:1503–12. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1503>.
- [164] Pun R, Kim MH, North BJ. Role of Connexin 43 phosphorylation on Serine-368 by PKC in cardiac function and disease. *Front Cardiovasc Med* 2023;9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.1080131>.
- [165] Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2018;8:552–62. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.008>.
- [166] Gagliardi PA, Pertz O. The mitogen-activated protein kinase network, wired to dynamically function at multiple scales. *Curr Opin Cell Biol* 2024;88:102368. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2024.102368>.
- [167] Chang W-S, Tsai C-W, Yang J-S, Hsu Y-M, Shih L-C, Chiu H-Y, et al. Resveratrol inhibited the metastatic behaviors of cisplatin-resistant human oral cancer cells via phosphorylation of ERK/p-38 and suppression of MMP-2/9. *J Food Biochem* 2021;45:e13666. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13666>.
- [168] Yan H, Shao M, Lin X, Peng T, Chen C, Yang M, et al. Resveratrol stimulates brown of white adipose via regulating ERK/DRP1-mediated mitochondrial fission and improves systemic glucose homeostasis. *Endocrine* 2025;87:144–58. <https://doi.org/10.1007/s12020-024-04008-7>.
- [169] Chen X, Hu X, Li Y, Zhu C, Dong X, Zhang R, et al. Resveratrol inhibits Erk1/2-mediated adhesion of cancer cells via activating PP2A-PTEN signaling network. *J Cell Physiol* 2019;234:2822–36. <https://doi.org/10.1002/jcp.27100>.
- [170] Zhao Y, Tang H, Zeng X, Ye D, Liu J. Resveratrol inhibits proliferation, migration and invasion via Akt and ERK1/2 signaling pathways in renal cell carcinoma cells. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2018;98:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.029>.
- [171] Yu X, Sun Z, Nie S, Zhang T, Lu H. Effects of Resveratrol on Mouse B16 Melanoma Cell Proliferation through the SHCBP1-ERK1/2 Signaling Pathway. *Mol Basel Switz* 2023;28:7614. <https://doi.org/10.3390/molecules28227614>.
- [172] Olk S, Zoidl G, Dermietzel R. Connexins, cell motility, and the cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009;66:1000–16. <https://doi.org/10.1002/cm.20404>.
- [173] Jančiukė G, Mickus R, Raškevičius V, Skeberdis VA, Sarapinienė I. Dose- and Time-Dependent Modulation of Cx43 and Cx45 Expression and Gap Junction Conductance by Resveratrol. *Antioxidants* 2026;15. <https://doi.org/10.3390/antiox15010088>.

- [174] Roh DS, Funderburgh JL. Rapid changes in connexin-43 in response to genotoxic stress stabilize cell-cell communication in corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:5174–82. <https://doi.org/10.1167/iov.11-7272>.
- [175] Laird DW. The life cycle of a connexin: Gap junction formation, removal, and degradation. *J Bioenerg Biomembr* 1996;28:311–8. <https://doi.org/10.1007/BF02110107>.
- [176] Falk MM, Kells RM, Berthoud VM. Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Lett* 2014;588:1221–9. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.031>.
- [177] Wang Y, Wang W, Wu X, Li C, Huang Y, Zhou H, et al. Resveratrol Sensitizes Colorectal Cancer Cells to Cetuximab by Connexin 43 Upregulation-Induced Akt Inhibition. *Front Oncol* 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00383>.
- [178] Pogoda K, Kameritsch P, Retamal MA, Vega JL. Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes: a revision. *BMC Cell Biol* 2016;17:11. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0099-3>.
- [179] Li D, Wang G, Jin G, Yao K, Zhao Z, Bie L, et al. Resveratrol suppresses colon cancer growth by targeting the AKT/STAT3 signaling pathway. *Int J Mol Med* 2019;43:630–40. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3969>.
- [180] Rodríguez-Sinovas A, Sánchez JA, Valls-Lacalle L, Consegal M, Ferreira-González I. Connexins in the Heart: Regulation, Function and Involvement in Cardiac Disease. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22094413>.
- [181] Leybaert L, Lampe PD, Dhein S, Kwak BR, Ferdinandy P, Beyer EC, et al. Connexins in Cardiovascular and Neurovascular Health and Disease: Pharmacological Implications. *Pharmacol Rev* 2017;69:396–478. <https://doi.org/10.1124/pr.115.012062>.
- [182] Warsito MF. A Review on Chemical Composition, Bioactivity, and Toxicity of *Myristica fragrans* Houtt. Essential Oil. *Indones J Pharm* 2021;304–13. <https://doi.org/10.22146/ijp.1271>.
- [183] Abdoul-Latif FM, Ainane A, Aboubaker IH, Mohamed J, Ainane T. Exploring the Potent Anticancer Activity of Essential Oils and Their Bioactive Compounds: Mechanisms and Prospects for Future Cancer Therapy. *Pharmaceuticals* 2023;16. <https://doi.org/10.3390/ph16081086>.
- [184] Machado TQ, da Fonseca ACC, Duarte ABS, Robbs BK, de Sousa DP. A Narrative Review of the Antitumor Activity of Monoterpenes from Essential Oils: An Update. *BioMed Res Int* 2022;2022:6317201. <https://doi.org/10.1155/2022/6317201>.
- [185] Seeram NP, Adams LS, Hardy ML, Heber D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J Agric Food Chem* 2004;52:2512–7. <https://doi.org/10.1021/jf0352778>.
- [186] Singh AP, Singh RK, Kim KK, Satyan KS, Nussbaum R, Torres M, et al. Cranberry proanthocyanidins are cytotoxic to human cancer cells and sensitize platinum-resistant ovarian cancer cells to paraptatin. *Phytother Res* 2009;23:1066–74. <https://doi.org/10.1002/ptr.2667>.
- [187] Kresty LA, Howell AB, Baird M. Cranberry Proanthocyanidins Mediate Growth Arrest of Lung Cancer Cells through Modulation of Gene Expression and Rapid Induction of Apoptosis. *Molecules* 2011;16:2375–90. <https://doi.org/10.3390/molecules16032375>.
- [188] Denis M-C, Desjardins Y, Furtos A, Marcil V, Dudonné S, Montoudis A, et al. Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. *Clin Sci* 2014;128:197–212. <https://doi.org/10.1042/CS20140210>.

- [189] Kresty LA, Howell AB, Baird M. Cranberry Proanthocyanidins Induce Apoptosis and Inhibit Acid-Induced Proliferation of Human Esophageal Adenocarcinoma Cells. *J Agric Food Chem* 2008;56:676–80. <https://doi.org/10.1021/jf071997t>.
- [190] Lee KP, Choi NH, Kim H-S, Ahn S, Park I-S, Lee DW. Anti-neuroinflammatory effects of ethanolic extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) in lipopolysaccharide-stimulated BV2 cells and ICR mice. *Nutr Res Pract* 2018;12:13–9. <https://doi.org/10.4162/nrp.2018.12.1.13>.
- [191] Flis S, Jastrzebski Z, Namiesnik J, Arancibia-Avila P, Toledo F, Leontowicz H, et al. Evaluation of inhibition of cancer cell proliferation in vitro with different berries and correlation with their antioxidant levels by advanced analytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 2012;62:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.005>.
- [192] Gill NK, Rios D, Osorio-Camarena E, Mojica BE, Kaur B, Soderstrom MA, et al. Anticancer Effects of Extracts from Three Different Chokeberry Species. *Nutr Cancer* 2021;73:1168–74. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1789679>.
- [193] Thi ND, Hwang E-S. Effects of black chokeberry extracts on metastasis and cell-cycle arrest in SK-Hep1 human liver cancer cell line. *Asian Pac J Trop Biomed* 2018;8:285. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.235313>.
- [194] Johnson AM, Roach JP, Hu A, Stamatovic SM, Zochowski MR, Keep RF, et al. Connexin 43 gap junctions contribute to brain endothelial barrier hyperpermeability in familial cerebral cavernous malformations type III by modulating tight junction structure. *FASEB J* 2018;32:2615–29. <https://doi.org/10.1096/fj.201700699R>.
- [195] Palacios-Prado N, Sonntag S, Skeberdis VA, Willecke K, Bukauskas FF. Gating, permselectivity and pH-dependent modulation of channels formed by connexin57, a major connexin of horizontal cells in the mouse retina. *J Physiol* 2009;587:3251–69. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171496>.
- [196] Solan JL, Lampe PD. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2005;1711:154–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.09.013>.
- [197] Shi Y, Hou X, Zhang X, Wang Y, Chen Y, Zou J. Inhibition of Oxidized-Phospholipid-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Resveratrol Is Associated with Reducing Cx43 Phosphorylation. *J Agric Food Chem* 2013;61:10534–41. <https://doi.org/10.1021/jf4036723>.
- [198] Kim JH, Choi SH, Kim J, Lee BK, Lee KW, Lee HJ. Differential regulation of the hydrogen-peroxide-induced inhibition of gap-junction intercellular communication by resveratrol and butylated hydroxyanisole. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2009;671:40–4. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.08.011>.
- [199] Xie D, Zheng G-Z, Xie P, Zhang Q-H, Lin F-X, Chang B, et al. Antitumor activity of resveratrol against human osteosarcoma cells: a key role of Cx43 and Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget* 2017;8:111419–32. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22810>.
- [200] Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. trans-Resveratrol inhibits H₂O₂-induced adenocarcinoma gastric cells proliferation via inactivation of MEK1/2-ERK1/2-c-Jun signalling axis. *Biochem Pharmacol* 2009;77:337–47. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.10.034>.
- [201] Kameritsch P, Khandoga N, Pohl U, Pogoda K. Gap junctional communication promotes apoptosis in a connexin-type-dependent manner. *Cell Death Dis* 2013;4:e584–e584. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.105>.
- [202] Ramos S, Alia M, Bravo L, Goya L. Comparative Effects of Food-Derived Polyphenols on the Viability and Apoptosis of a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). *J Agric Food Chem* 2005;53:1271–80. <https://doi.org/10.1021/jf0490798>.

- [203] Vizzotto M, Porter W, Byrne D, Cisneros-Zevallos L. Polyphenols of selected peach and plum genotypes reduce cell viability and inhibit proliferation of breast cancer cells while not affecting normal cells. *Food Chem* 2014;164:363–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.060>.
- [204] Oprea D, Crisan D, Enache A. Polyphenolic Extracts From Green Vegetables as Promoters of Fibroblast Viability and Reducers of Oxidative Stress. *Food Sci Nutr* 2025;13:e70230. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70230>.
- [205] Du L, Chen E, Wu T, Ruan Y, Wu S. <p>Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced aging through upregulation of autophagy in human umbilical vein endothelial cells</p>. *Drug Des Devel Ther* 2019;13:747–55. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S179894>.
- [206] Sahin E. RESVERATROL SUPPRESSES CELL VIABILITY AND INVASION IN PANCREATIC CANCER CELLS. *Eskisehir Med J Eskisehir City Hosp* 2025;1. <https://doi.org/10.48176/esmj.2025.176>.
- [207] Gehm BD, McAndrews JM, Chien P-Y, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:14138–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14138>.
- [208] Vargas-Villanueva JR, Gutiérrez-Gutiérrez F, Garza-Ontiveros M, Nery-Flores SD, Campos-Múzquiz LG, Vazquez-Obregón D, et al. Tubulin as a potential molecular target for resveratrol in *Giardia lamblia* trophozoites, *in vitro* and *in silico* approaches. *Acta Trop* 2023;248:107026. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107026>.
- [209] Schneider Y, Chabert P, Stutzmann J, Coelho D, Fougèrouse A, Gossé F, et al. Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. *Int J Cancer* 2003;107:189–96. <https://doi.org/10.1002/ijc.11344>.
- [210] Thomas E, Gopalakrishnan V, Hegde M, Kumar S, Karki SS, Raghavan SC, et al. A Novel Resveratrol Based Tubulin Inhibitor Induces Mitotic Arrest and Activates Apoptosis in Cancer Cells. *Sci Rep* 2016;6:34653. <https://doi.org/10.1038/srep34653>.
- [211] Azios NG, Krishnamoorthy L, Harris M, Cubano LA, Cammer M, Dharmawardhane SF. Estrogen and Resveratrol Regulate Rac and Cdc42 Signaling to the Actin Cytoskeleton of Metastatic Breast Cancer Cells. *Neoplasia* 2007;9:147–58. <https://doi.org/10.1593/neo.06778>.
- [212] Iwahara N, Azekami K, Hosoda R, Nojima I, Hisahara S, Kuno A. Activation of SIRT1 promotes membrane resealing via cortactin. *Sci Rep* 2022;12:15328. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19136-1>.
- [213] Martin PEM, Evans WH. Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovasc Res* 2004;62:378–87. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.01.016>.
- [214] Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M. Direct Association of the Gap Junction Protein Connexin-43 with ZO-1 in Cardiac Myocytes *. *J Biol Chem* 1998;273:12725–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12725>.
- [215] Shaw RM, Fay AJ, Puthenveedu MA, Zastrow M von, Jan Y-N, Jan LY. Microtubule Plus-End-Tracking Proteins Target Gap Junctions Directly from the Cell Interior to Adherens Junctions. *Cell* 2007;128:547–60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.037>.
- [216] Xiao D, Chen S, Shao Q, Chen J, Bijian K, Laird DW, et al. Dynamin 2 interacts with connexin 26 to regulate its degradation and function in gap junction formation. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;55:288–97. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.09.021>.
- [217] Assembly of Connexin43 into Gap Junctions Is Regulated Differentially by E-Cadherin and N-Cadherin in Rat Liver Epithelial Cells | *Molecular Biology of the Cell* n.d.

<https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e10-05-0403> (accessed February 7, 2026).

- [218] Brockmueller A, Buhrmann C, Shayan P, Shakibaei M. Resveratrol induces apoptosis by modulating the reciprocal crosstalk between p53 and Sirt-1 in the CRC tumor microenvironment. *Front Immunol* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1225530>.
- [219] Gramatyka M. Time Does Matter: The Cellular Response to Resveratrol Varies Depending on the Exposure Duration. *Int J Mol Sci* 2025;26. <https://doi.org/10.3390/ijms26125542>.
- [220] Silva G a. L, Monte APO, França ATV, Mota IM, Junior JLO, Andrade KO, et al. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced toxicity during in vitro culture of mouse-isolated preantral follicles. *Zygote* 2024;32:294–302. <https://doi.org/10.1017/S0967199424000315>.
- [221] Moreira-Pinto B, Costa L, Felgueira E, Fonseca BM, Rebelo I. Low Doses of Resveratrol Protect Human Granulosa Cells from Induced-Oxidative Stress. *Antioxidants* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/antiox10040561>.
- [222] Salzano A, Albero G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, et al. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Anim Reprod Sci* 2014;151:91–6. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.018>.
- [223] Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, et al. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol* 2013;61:215–26. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.021>.
- [224] Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. HIGH ABSORPTION BUT VERY LOW BIOAVAILABILITY OF ORAL RESVERATROL IN HUMANS. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1377–82. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>.
- [225] Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1215:9–15. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x>.
- [226] Timmers S, Auwerx J, Schrauwen P. The journey of resveratrol from yeast to human. *Aging* 2012;4:146–58. <https://doi.org/10.18632/aging.100445>.
- [227] Patel KR, Brown VA, Jones DJL, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, et al. Clinical Pharmacology of Resveratrol and Its Metabolites in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Res* 2010;70:7392–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2027>.
- [228] Howells LM, Berry DP, Elliott PJ, Jacobson EW, Hoffmann E, Hegarty B, et al. Phase I Randomized, Double-Blind Pilot Study of Micronized Resveratrol (SRT501) in Patients with Hepatic Metastases—Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 2011;4:1419–25. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0148>.
- [229] Narayanan NK, Nargi D, Randolph C, Narayanan BA. Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. *Int J Cancer* 2009;125:1–8. <https://doi.org/10.1002/ijc.24336>.
- [230] Zein-Based Nanoparticles Improve the Oral Bioavailability of Resveratrol and Its Anti-inflammatory Effects in a Mouse Model of Endotoxic Shock | *Journal of Agricultural and Food Chemistry* n.d. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf505694e> (accessed February 7, 2026).
- [231] Vries K de, Strydom M, Steenkamp V. A Brief Updated Review of Advances to Enhance Resveratrol's Bioavailability. *Molecules* 2021;26. <https://doi.org/10.3390/molecules26144367>.
- [232] Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants* 2017;6:42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>.

MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS

Publikacijos, kuriose paskelbti disertacijos rezultatai:

1. Mickus R, **Jančiukė G**, Raškevičius V, Mikalayeva V, Matulytė I, Marksa M, Maciūnas K, Bernatoniene J, Skeberdis VA. The effect of nutmeg essential oil constituents on Novikoff hepatoma cell viability and communication through Cx43 gap junctions. *Biomed Pharmacother.* 2021 Mar;135:111229.
2. Tamkutė L, **Jančiukė G**, Pukalskienė M, Sarapinienė I, Arvydas Skeberdis V, Rimantas Venskutonis P. Cranberry and black chokeberry extracts isolated with pressurized ethanol from defatted by supercritical CO₂ pomace inhibit colorectal carcinoma cells and increase global antioxidant response of meat products during in vitro digestion. *Food Res Int.* 2022 Nov;161:111803.
3. **Jančiukė G**, Mickus R, Raškevičius V, Skeberdis V.A, Sarapinienė I. Dose- and Time-Dependent Modulation of Cx43 and Cx45 Expression and Gap Junction Conductance by Resveratrol. *Antioxidants* 2026, 15: 88.

Dalyvavimas konferencijose

1. Mickus, Rokas; **Jančiukė, Gintarė**; Raškevičius, Vytautas; Mikalayeva, Valeryia; Matulytė, Inga; Marksa, Mindaugas; Maciūnas, Kęstutis; Bernatoniene, Jurga; Skeberdis, Vytenis Arvydas. Nutmeg essential oil constituents are potent Cx43 gap junction inhibitors // FEBS Open Bio : Supplement: 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana, Slovenia, July 3-8, 2021 / Federation of European Biochemical Societies (FEBS). West Sussex : John Wiley & Sons Ltd., 2021, vol. 11, suppl. 1., 2021, p. 219-219., ISSN 2211-5463, 211-5463.
2. Mickus, Rokas; Raškevičius, Vytautas; **Jančiukė, Gintarė**; Skeberdis, Vytenis Arvydas. Baltymų kinazių įtaka plyšinių jungčių jautrumui farmakologinėmis medžiagomis = Regulation of gap junction chemical gating by protein kinases // 44-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija : 2021 m. spalio 6-8 d., Vilnius : programa ir pranešimų tezės / Fizinių ir technologijos mokslų centras. Vilniaus universitetas. Kauno technologijų universitetas. [et.al.] Vilnius : Fizinių ir technologijos mokslų centras, 2021. ISBN 9786099551180., 2021, p. 122-122.
3. **Gintarė Jančiukė**, Rokas Mickus, Vytenis Arvydas Skeberdis, Ieva Sarapinienė. Resveratrol exerts distinct effects on intercellular communication through Cx43 and Cx45 gap junctions. 4th Baltic Biophysics

Conference (BBC) : Abstract Book : 2024 October 3-4th, Kaunas, Lithuania. ISBN 978-609-96492-0-7, psl. 89.

4. **Gintarė Milašiūtė**. Aronijų ir spanguolių išspaudų ekstraktų poveikis navikinių ląstelių gyvybingumui ir tarpląsteliniam ryšiui. 12-oji jaunųjų mokslininkų konferencija BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos : programa ir pranešimų santraukos : 2019 m. gruodžio 11 d., Kaunas / Lietuvos mokslų akademijos Biologijos, medicinos ir geomokslų skyrius ; [Leidinį sudarė Vaidutis Kučinskas, Jadvyga Olechovičienė]. Vilnius : Lietuvos mokslų akademija, 2019. (LSMU ALMA)990001001700107106, psl. 22.
5. Kęstutis Gabrielius Šaulys, **Gintarė Jančiukė**, Ieva Sarapinienė. The Effect of cranberry and chokeberry pomace extracts on cancer cell viability, clonogenic activity and cell-to-cell coupling. 3rd Meeting of the Baltic Physiological Societies : December 9–10, 2019 Kaunas : abstracts / Lithuanian, Latvian and Estonian Physiological Societies. Lithuanian University of Health Sciences. [Kaunas] : Lietuvos fiziologų draugija, 2019. ISBN 9789955156369, psl. 20.
6. Laura Tamkutė, **Gintarė Milašiūtė**, Ieva Sarapinienė, Vytenis Arvydas Skeberdis, Milda Pukalskienė, Petras Rimantas Venskutonis. May phytochemical rich chokeberry pomace extract mitigate health hazards of processed meat? ICoFF/ISNFF: Food factor science from molecular to human studies: ICoFF2019: 7th international conference on food factors. ISNFF2019: 12th international conference and exhibition on nutraceuticals and functional foods: December 1-5, 2019, Kobe, Japan. Kobe : Japanese Society for Food Factors (JSoFF), 2019.
7. **Gintarė Milašiūtė**, Kęstutis Gabrielius Šaulys, Ieva Serapinienė, Laura Tamkutė, Petras Rimantas Venskutonis, Vytenis Arvydas Skeberdis. The Effect of cranberry and chokeberry extracts on cancer cell viability, clonogenic activity and cell-to-cell coupling. FEBS3+ conference of Latvian, Lithuanian and Estonian biochemical societies : abstract book : riga, Latvia, 17-19 June 2019 / Organizers: Kaspars Tārs, Tiit Lukk, Daumantas Matulis, Zane Kalniņa, Nils Rostoks. Riga : University of Latvia Press, 2019. ISBN 9789934184505, psl. 82-83.

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Gintarė Jančiukė
e-mail: gintare.janciuke@lsmu.lt
Born: July 6, 1991, Telšiai, Lithuania

Education:
2016–2021 PhD studies in Biophysics, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania
2014–2016 Master's degree in Biochemistry, Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania
2010–2013 Bachelor's degree in Chemistry Engineering, University of Applied Sciences, Vilnius, Lithuania

Work experience:
2019–now Junior researcher, Laboratory of Cell Culture, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences
2014–2019 Scientific laboratory technician, Laboratory of Cell Culture, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences

Projects:
2016–2018 Laboratory assistant in „Open Partnership Project“ supported by Research Council of Lithuania (project number: APP-7/2016)

Internships:
2020.10–2020.12 Internship in Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany

PADĖKA

Esu be galo dėkinga savo nepakartojamai mokslinei konsultantei, dr. Ievai Sarapinienei, už įkvepiančias idėjas, vertingas žinias, prasmingas diskusijas ir nuolatinį palaikymą. Jos entuziazmas mokslui, kantrybė ir gebėjimas išvelgti galimybes net sudėtingiausiose situacijose buvo neįkainojami planuojant eksperimentus, juos atliekant ir rengiant šią disertaciją.

Nuoširdžiai dėkoju Ląstelių kultūrų laboratorijos vadovui prof. dr. Vyteniui Arvydui Skeberdžiui už vertingas mokslines išvalgas, išmintingus patarimus ir suteiktą galimybę augti, mokytis bei tobulėti Ląstelių kultūrų laboratorijoje.

Už kasdienę pagalbą, palaikymą, gerą nuotaiką ir komandinę dvasią esu dėkinga Ląstelių kultūrų laboratorijos kolegoms: M. Pankevičiūtei-Bukauskienei, V. Ambrulaitienei, R. Mickui, V. Mikalayevai, R. Sampath ir D. Urbšaitei. Jūsų indėlis ir bendrystė šį mokslinį kelią pavertė ne tik produktyviu, bet ir džiugiu.

Didžiausia padėka tenka mano šeimai – už kantrybę, supratingumą ir tikėjimą manimi viso šio nelengvo, bet prasmingo kelio metu. Ypatingai dėkoju savo vyrui už begalinį palaikymą, stiprybę sunkiausiais momentais ir rūpestį mūsų vaikais, kai aš pasinėriau į mokslą. Be jūsų ši disertacija būtų likusi tik idėja.

Tėčio atminimui. Nors gyvenimas jam neleido išvysti šios kelionės pabaišos, jo stiprybė lydėjo mane kiekviename žingsnyje.