



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Lietuvos sveikatos mokslų universitetas**

Farmacijos fakultetas

# **Doksorubicino ir jo pegiliuotos liposominės nanoformuluotės skvarbos į krūties vėžio ląstelių kultūras įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Elžbieta Maconko**

Projekto autorė

**Prof. Dr. Vilma Petrikaitė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas



**Lietuvos sveikatos mokslų universitetas**  
Farmacijos fakultetas

## **Doksorubicino ir jo pegiliuotos liposominės nanoformuluotės skvarbos į krūties vėžio ląstelių kultūras įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas  
Medicininė chemija (6281CX001)

---

**Elžbieta Maconko**

Projekto autorė

**Prof. Dr. Vilma Petrikaitė**

Vadovė

**Lekt. Dr. Modestas Žilius**

Recenzentas

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas



**Lietuvos sveikatos mokslų universitetas**  
Farmacijos fakultetas

Elžbieta Maconko

## **Doksorubicino ir jo pegiliuotos liposominės nanoformuluotės skvarbos į krūties vėžio ląstelių kultūras įvertinimas**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Elžbietos Maconko, baigiamasis projektas tema „Doksorubicino ir jo liposominės nanoformuluotės skvarbos į krūties vėžio ląstelių kultūras įvertinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

Maconko Elžbieta. Doksorubicino ir jo liposominės nanoformuluotės skvarbos į krūties vėžio ląstelių kultūras įvertinimas. Baigiamojo magistro projekto vadovė prof. dr. Vilma Petrikaitė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Farmacijos fakultetas.

Medicininė chemija TMMD-7 gr.: chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: doksorubicinas, skvarba, krūties vėžys, lansoprazolas, nanoformuluotė

Kaunas, 2019. 42 p.

## Santrauka

**Darbo tikslas** – įvertinti protonų siurblio inhibitoriaus lansoprazolo poveikį doksorubicino ir jo pegiliuotos liposominės formos (PLD) transportui krūties vėžio ląstelių kultūrose.

### Darbo uždaviniai:

1. Ištirti doksorubicino ir PLD patekimą į MCF-7 krūties vėžio ląsteles.
2. Įvertinti protonų siurblio inhibitoriaus lansoprazolo įtaką doksorubicino ir PLD skvarbai į MCF-7 krūties vėžio ląsteles.
3. Ištirti doksorubicino ir PLD skvarbą į krūties vėžio MCF-7 ląstelių sferoidus.
4. Ištirti doksorubicino ir PLD transportą į krūties vėžio MCF-7 ląstelių sferoidus po inkubacijos su lansoprazolu skirtingo pH terpėse.

**Tyrimo metodai:** Šiame darbe buvo vertinama lansoprazolo įtaka doksorubicino ir PLD skvarbai į krūties vėžio linijos MCF-7 ląsteles. Junginių citotoksiškumas nustatytas MTT redukcijos metodu. Doksorubicino ir PLD patekimas į ląsteles ir sferoidus silpnai bazinėje (pH 7,2) ir rūgštinėje (pH 6,0) terpėse įvertintas fluorescencinės mikroskopijos metodu. Vertinant lansoprazolo įtaką doksorubicino arba PLD skvarbai į ląsteles ar jų sferoidus, kultūros juo inkubuotos 2 val. prieš įpilant tiriamųjų medžiagų. Nuotraukos buvo analizuojamos ImageJ programa.

**Rezultatai:** Silpnai bazinėje terpėje (pH 7,2) doksorubicinas geriausiai prasiskverbė į ląstelių branduolius po 2 val. inkubacijos, o vėliau jo kiekis reikšmingai nekito. Rūgštinėje terpėje (pH 6,0) doksorubicino patekimas tiek į branduolį, tiek į ląstelę nuolat didėjo 4 val. inkubacijos laikotarpyje. Prieš inkubaciją su doksorubicinu ląsteles paveikus lansoprazolu, tiek silpnai bazinėje terpėje, tiek rūgštinėje terpėje doksorubicino kiekis po 4 val. ląstelėse ir branduoliuose buvo 4 kartus didesnis nei kontrolinėje grupėje. PLD į ląsteles taip pat geriau prasiskverbė silpnai bazinėje terpėje, tačiau lansoprazolas PLD patekimo į ląsteles nepadidino nei rūgštinėmis, nei silpnai bazinėmis sąlygomis, lyginant su kontroline grupe. Nustatyta, kad doksorubicino prasiskverbimas priklauso nuo inkubacijos laiko. Lansoprazolas pagerina doksorubicino skvarbą tiek silpnai bazinėje, tiek rūgštinėje terpėse. Lansoprazolas nepadidina PLD patekimo į sferoidus nei rūgštinėje, nei silpnai bazinėje terpėse.

Maconko Elžbieta. Evaluation of doxorubicin and its pegylated liposomal nanoformulation penetration into breast cancer cell cultures. Master's Final Degree Project supervisor prof. dr. Vilma Petrikaitė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Science.

Medicinal Chemistry TMMD-7 gr.: Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: doxorubicin, nanoformulation, breast cancer, lansoprazole, penetration

Kaunas, 2019. 42 pages.

### Summary

**Aim of work:** evaluate proton pump inhibitor lansoprazole effect on doxorubicin and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) transport into breast cancer cell cultures.

#### Objectives:

1. Investigate doxorubicin and PLD penetration into MCF-7 breast cancer cells.
2. Evaluate proton pump inhibitor lansoprazole effect on doxorubicin and PLD transport into MCF-7 breast cancer cells.
3. Examine doxorubicin and PLD transport into breast cancer MCF-7 cell spheroids.
4. Evaluate doxorubicin and PLD transport into breast cancer MCF-7 cell spheroids after incubation with lansoprazole at different pH values.

**Experimental methods:** In this work we have evaluated lansoprazole effect on doxorubicin and PLD penetration into breast cancer MCF-7 cell cultures. Toxicity of the compounds was evaluated by MTT assay. The penetration of doxorubicin and PLD into cells and spheroids in a slightly basic (pH 7.2) and acidic (pH 6.0) medium was evaluated by fluorescence microscopy. The penetration of doxorubicin or PLD transport into cells and spheroids was evaluated after lansoprazole pre-incubation for 2 hours before adding doxorubicin and PLD. Photos were analysed using ImageJ software.

**Results:** In a slightly basic environment (pH 7.2) doxorubicin penetration into the cell nuclei was better after 2 h of incubation. After longer periods of incubations, its penetration remained the same. In slightly acidic environment (pH 6.0) doxorubicin penetration into the cell nuclei and the whole cell increased constantly during the whole 4 h incubation. Before the incubation with doxorubicin, cells were pre-incubated with lansoprazole at both slightly basic and acidic media. Cellular uptake of doxorubicin after 4 h of incubation were 4 times greater than in the control group. PLD penetrated better into the cells at slightly basic environment, although lansoprazole has no influence on penetration of PLD at either slightly basic or acidic pH compared to the control group. The penetration of doxorubicin was dependant on the time of incubation. Lansoprazole enhances doxorubicin penetration at slightly basic and slightly acidic environment. Lansoprazole doesn't increase PLD cellular uptake into the tumor spheroids.

## Turinys

<b>Paveikslų sąrašas .....</b>	<b>7</b>
<b>Lentelių sąrašas .....</b>	<b>8</b>
<b>Santrumpų ir terminų sąrašas .....</b>	<b>9</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Literatūros apžvalga .....</b>	<b>12</b>
1.1. Krūties vėžio klasifikacija ir gydymo problematika .....	12
1.2. Doksorubicino ir jo pegiliuotos liposominės formos vaidmuo vėžio gydyme.....	14
1.3. Vėžio mikroaplinka .....	17
1.4. Protonų siurblio inhibitoriai ir jų pritaikymas acidozės mažinimui .....	19
1.5. Pasirinktų metodų principai.....	20
1.6. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas .....	23
<b>2. Medžiagos ir metodai .....</b>	<b>24</b>
2.1. Medžiagos ir aparatūra .....	24
2.1.1. Naudota įranga ir prietaisai: .....	24
2.1.2. Priemonės .....	24
2.1.3. Reagentai .....	24
2.1.4. Ląstelių linija .....	24
2.2. Tyrimo metodikos .....	25
2.2.1. Ląstelių kultivavimas.....	25
2.2.2. Ląstelių gyvybingumo nustatymas .....	25
2.2.3. Doksorubicino ir PLD skvarbos tyrimas ląstelių monosluoksnyje .....	25
2.2.4. Vėžio ląstelių sferoidų formavimas.....	26
2.2.5. Tiriamųjų junginių skvarbos tyrimas vėžio ląstelių sferoiduose.....	26
2.2.6. Duomenų statistinis apdorojimas .....	26
<b>3. Rezultatai ir jų aptarimas.....</b>	<b>27</b>
3.1. Doksorubicino ir lansoprazolo citotoksinis poveikis .....	27
3.2. Doksorubicino ir PLD patekimas į ląsteles .....	28
3.3. Doksorubicino ir PLD pasiskirstymas sferoiduose .....	30
<b>Išvados .....</b>	<b>34</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>35</b>
<b>Priedai.....</b>	<b>41</b>
1 Padėka.....	41
2 Darbo rezultatų pristatymas.....	42

## Paveikslų sąrašas

<b>1 pav.</b> Naviko formavimasis ir metastazavimas.....	12
<b>2 pav.</b> MCF-7 ląstelių linija. ....	14
<b>3 pav.</b> Doksorubicino struktūrinė formulė.. ....	15
<b>4 pav.</b> Pegiliuotos liposominės doksorubicino formos sandara. ....	16
<b>5 pav.</b> Pegiliuoto liposominio doksorubicino veikimo mechanizmas.....	17
<b>6 pav.</b> Acidozės sukeliama ląstelės pažaidos. ....	18
<b>7 pav.</b> V-ATPazės vaidmuo vėžinėse ląstelėse. ....	19
<b>8 pav.</b> MTT dažo redukcija. Adaptuota pagal.....	20
<b>9 pav.</b> Sferoidų formavimas trimatė <i>Bioprinting</i> metodu.. ....	21
<b>10 pav.</b> Ląstelių nuotraukos, gautos šviesinės ir fluorescencinės mikroskopijos būdu.. ....	22
<b>11 pav.</b> Sferoido nuotraukos, gautos šviesinės ir fluorescencinės mikroskopijos būdu.. ....	22
<b>12 pav.</b> Doksorubicino pasiskirstymo įvertinimas nuo sferoido pakraščio iki sferoido centro .....	23
<b>13 pav.</b> Lansoprazolo citotoksinis poveikis MCF-7 ląstelėms. ....	27
<b>14 pav.</b> Doksorubicino citotoksinis poveikis MCF-7 ląstelėms.....	28
<b>15 pav.</b> Doksorubicino patekimas į ląsteles ir branduolius priklausomai nuo pH.....	29
<b>16 pav.</b> Doksorubicino kiekis branduolyje ir visoje ląstelėje skirtingo pH terpėse.....	29
<b>17 pav.</b> PLD kiekis branduolyje ir visoje ląstelėje skirtinguose terpės pH kontrolinėje ir lansoprazolo grupėje.....	30
<b>18 pav.</b> Ląstelių sferoidų formavimasis priklausomai nuo laiko. ....	31
<b>19 pav.</b> Sferoidų dydžio pokyčiai priklausomai nuo sferoidų inkubavimo laiko su tiriamaisiais junginiais. ....	31
<b>20 pav.</b> Doksorubicino pasiskirstymo profiliai sferoiduose.....	32
<b>21 pav.</b> Doksorubicino pasiskirstymas ląstelėje po inkubacijos su lansoprazolu. ....	32
<b>22 pav.</b> PLD pasiskirstymo profiliai .....	33

## Lentelių sąrašas

- 1 lentelė.** Vėžio klasifikacija pagal molekulinis profilius..... 12
- 2 lentelė.** Siūlomas chemoterapinis gydymas pacientams, sergantiems ER/PR<sup>+</sup>, HER 2<sup>+</sup> vėžiu. .... 13



## Santrumpų ir terminų sąrašas

ATF6	6 transkripcijos veiksnio aktyvatorius
ATP	adenozino trifosfatas
b-SKS	bazinis spiralės-kilpos-spiralės baltymas
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindolo dihydrochloridas
DIC	diferencinis interferencijos kontrastas
DMEM	<i>Dulbecc 'o</i> modifikuota Eagle mitybinė terpė
DMSO	dimetilsulfoksidas
DNR	deoksiribonukleorūgštis
DOX	doksorubicinas
EC <sub>50</sub>	efektyvioji koncentracija, sukianti 50 proc. ląstelių biologinių ar biocheminių funkcijų netekimą
eIF2 $\alpha$	eukariotinių iniciacijos faktorių 2 $\alpha$
EMC	ekstraląstelinės matricos komponentas (angl. <i>extracellular matrix components</i> )
ER	estrogenų receptoriai
ER	estrogeno receptoriai
FBS	fetalinis veršiukų serumas (angl. <i>fetal bovine serum</i> )
FI	fluorescencijos intensyvumas
HER2	žmogaus epidermio augimo faktorius 2
HIF-1	hipoksijos indukuojamas faktorius
Ki – 67	branduolinis baltymas, pagal kurį nusakomas krūties vėžio metastazavimo greitis.
KV	krūties vėžys
MCT	monokarboksilatų nešikliai (angl. <i>monocarboxylate transporters</i> )
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas
NADPH	nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas
NK	ląstelės žudikai (angl. <i>natural killer cells</i> )
PBS	fosfatinis druskų tirpalas
PERK	R tipo baltymų kinazė
pH <sub>e</sub>	ekstraląstelinis pH
pH <sub>i</sub>	intraląstelinis pH
pK <sub>a</sub>	rūgšties disociacijos konstanta
PLD	pegiliuotas liposominis doksorubicinas
pO <sub>2</sub>	deguonies parcialinis (dalinis) slėgis
PR	progesterono receptoriai
PSI	protonų siurblio inhibitoriai
PSO	Pasaulio sveikatos organizacija
TNKV	trigubai neigiamas krūties vėžys
TRITC	tetrametilodaminas
V-ATP	vakuolinis adenosino trifosfatas
VPL	vakuolinio H <sup>+</sup> ATPazės proteolipidinis subvienetas

## Įvadas

Vėžys yra viena dažniausių mirtingumo priežastis pasaulyje. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, 2018 m. nuo vėžio pasaulyje mirė 9,6 mln. žmonių [1]. Sergamumas piktybiniais navikais, kaip ir mirtingumas, tolygiai didėja [2].

Krūties vėžys (KV) yra antra pagal dažnumą mirties nuo onkologinių susirgimų priežastis po plaučių vėžio. KV yra labiausiai paplitęs navikinis susirgimas tarp moterų. Jis sudaro 23 proc. visų vėžinių susirgimų [3]. Remiantis PSO statistika, 2018 m. pasaulyje užfiksuota 2,1 mln. naujų KV atvejų [1]. Išsivysčiusiose šalyse KV nustatomas vis ankstyvesnėse stadijose, didėja moterų išgyvenamumas. Svarbią įtaką išgyvenamumui turi estrogenų, progesteronų ir HER receptoriai. Nustačius trigubai neigiamą KV, tikimybė išgyventi 5 m.– 55 proc., ER/PR<sup>+</sup>, HER 2<sup>+</sup> atveju – 84 proc. [4]. Kadangi ER/PR<sup>+</sup>, HER 2<sup>+</sup> vėžio potipis pasižymi geresne prognoze, šiame darbe buvo pasirinkta MCF-7 ląstelių linija, kuri atitinka šiam vėžio potipiui.

50 proc. KV atvejų pradedami gydyti pašalinant piktybinį naviką chirurginiu būdu [4]. Norint sumažinti naviko atsinaujinimo riziką, po operacijos gali būti taikoma radioterapija. Kai ligos atsinaujinimo galimybė labai menka, kito gydymo gali ir nereikėti [5]. Norint sumažinti ligos atsinaujinimo tikimybę, daugumai pacienčių rekomenduojama chemoterapija arba kiti terapijos būdai [6].

Gydymas chemoterapiniais vaistais yra vienas pagrindinių gydymo būdų, skirtas moterims, sergančioms KV, arba esant navikui, kuris yra didesnis negu 1 cm [5]. Dažniausiai chemoterapijai vartojami citotoksiniai vaistai yra alkilinantys vaistai, antimetabolitai ir antraciklinų grupės vaistai, tokie kaip doksorubicinas [7].

Doksorubicinas yra pirmos eilės KV gydymui vartojamas chemoterapinis vaistas. [6]. Jo priešvėžinio gydymo veiksmingumą gali sumažinti ribotas patekimas į naviką [8]. To priežastis yra pakitusi navikinių ląstelių mikroaplinka. Naviko mikroaplinkai būdinga hipoksija ir acidozė, dažnai tai pablogina ypač silpnai bazinių vaistų (pvz. doksorubicino) patekimą į gilesnius navikinius audinius. Ribotas vaistų pasiskirstymas kietuose navikuose yra svarbi atsparumo vaistams priežastis [9-10].

Siekiant išlaikyti neutralią pHi, kuri yra būtina silpnai bazinių vaistų prasiskverbimui didinti, naudojami skirtingi jonų/protonų siurblio inhibitoriai (PSI). PSI gali padidinti ląstelių endosominį pH, ir tai gali padidinti vaisto pasiskirstymą kietuosiuose navikuose [11]. Tai sudaro prielaidas tyrinėti protonų siurblio inhibitorių poveikį doksorubicino ir jo pegiliuotos liposominės formos patekimui ir pasiskirstymui vėžio ląstelių dvimatėse kultūrose ir ląstelių sferoiduose.

Norėdami iširti, kaip skiriasi chemoterapinių vaistų patekimas į MCF-7 vėžines ląsteles, esant skirtingam pH, kaip modelines medžiagas pasirinkome doksorubiciną ir liposominę doksorubicino formą, kuri gali lengviau prasiskverbti per daugiasluoksnę ląstelės membraną. Taip pat kaip transporto moduliatorių nutarėme naudoti protonų siurblio inhibitorių lansoprazolą, kuris yra veiksmingesnis PSI lyginant su kitais šios grupės vaistais, išskyrus esomemprazolį [12].

**Darbo tikslas** – įvertinti protonų siurblio inhibitoriaus lansoprazolo poveikį doksorubicino ir jo pegiliuotos liposominės formos (PLD) transportui KV ląstelių kultūrose.

**Darbo uždaviniai:**

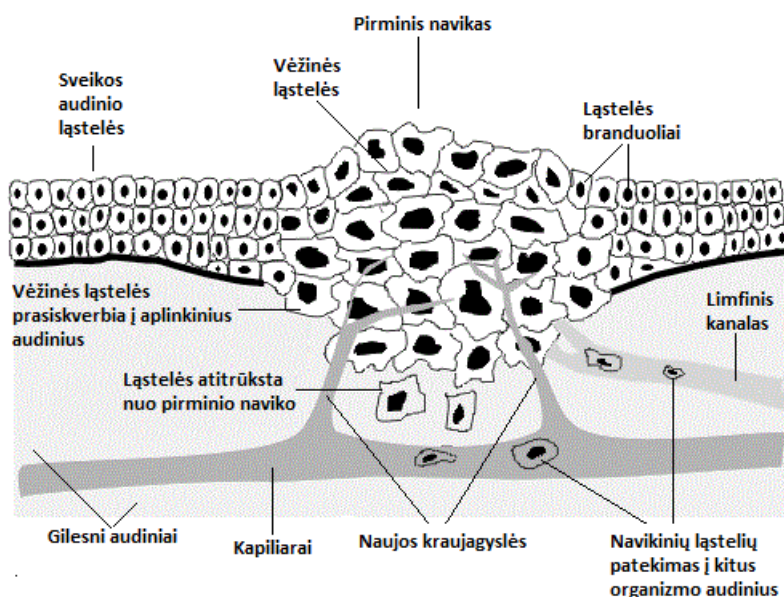
1. Ištirti doksorubicino ir PLD patekimą į MCF-7 krūties vėžio ląsteles.
2. Įvertinti protonų siurblio inhibitoriaus lansoprazolo įtaką doksorubicino ir PLD skvarbai į MCF-7 krūties vėžio ląsteles.
3. Ištirti doksorubicino ir PLD skvarbą į krūties vėžio MCF-7 ląstelių sferoidus.
4. Ištirti doksorubicino ir PLD transportą į krūties vėžio MCF-7 ląstelių sferoidus po inkubacijos su lansoprazolu skirtingo pH terpėse.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Krūties vėžio klasifikacija ir gydymo problematika

Sveikų ląstelių dauginimasis ir atsinaujinimas yra tvarkingas ir kontroliuojamas. Ląstelės pasensta ir žūva, jas pakeičia naujos ląstelės [13]. Veikiant kenksmingiems išoriniams veiksniams, įvyksta genų mutacijos, dėl kurių sutrinka ląstelių dauginimosi, diferenciacijos, apoptozės ir kitų procesų valdymas. Pažeistos ląstelės įgyja galimybę nevaldomai ir neribotai dalytis. Iš pradinės pakitusios ląstelės formuojasi ląstelių klonas, vadinamas augliu (naviku) [14].

Piktybiniai navikai geba įsiskverbti į šalimais esančius audinius ir organus, įaugti į juos, suardyti jų struktūrą bei sutrikdyti organų veiklą (1 pav.). Tokiu būdu, auglys, atsiradęs iš vienos mutavusios (piktybėjančios) ląstelės gali sutrikdyti viso organizmo veiklą [14].



1 pav. Naviko formavimasis ir metastazavimas. Adaptuota pagal [15].

KV – viena dažniausių moterų onkologinių ligų. Tai sudėtinga ir nevienalytė liga, kurią galima suskirstyti į mažiausiai keturis potipius: luminalinis A, luminalinis B, žmogaus epidermio augimo veiksnio 2 (HER2) ir trigubai neigiamas vėžys. Visi šie potipiai skiriasi turimais molekuliniais profiliais [16].

1 lentelė. Vėžio klasifikacija pagal molekulinis profilius. Adaptuota pagal [17].

Vėžio potipis	Imunoprofilis*	Ląstelių linijų pavyzdžiai
Luminalinis A	ER <sup>+</sup> , PR <sup>+/-</sup> , HER2 <sup>-</sup>	MCF-7, T47D, HCC150
Luminalinis B	ER <sup>+</sup> , PR <sup>+/-</sup> , HER2 <sup>+</sup>	BT474
HER2	ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>+</sup>	SKBR3
Trigubai neigiamas	ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>-</sup>	HCC1806, MDA-MB-231

\* ER<sup>+</sup> - turi estrogenų receptorių; PR<sup>+</sup> - turi progesterono receptorių; HER2<sup>+</sup> - turi žmogaus epidermio augimo veiksnio 2 receptorių.

Kiekvienas KV potipis pasižymi tik jam būdingomis charakteristikomis. Luminalinis A sudaro pusę visų invazinių KV. Šis tipas turi ER ir PR, o neturi HER2. Paprastai jis turi žemą mutacijos laipsnį, o tai reiškia, kad vėžinių ląstelių savybės panašios kaip ir normalių krūties ląstelių. Luminalinis A turi mažą Ki-67 proliferacijos indeksą, todėl jo vystymasis yra lėtas. Šiam vėžio potypiui gydyti pirmiausiai skiriama hormonų terapija, o po jos taikoma chemoterapija [18-20]. Kaip pavaizduota 2 lentelėje, pacientams sergantiems luminaliniu A vėžio potipiu chemoterapija gali būti skiriama antraciklinų grupės vaistais, pavyzdžiui, doksorubicinu, kuris priskiriamas pirmos eilės gydymui, arba jo pegiliuota liposomine forma, kuri priklauso antros eilės gydymui (2 lentelė) [6].

**2 lentelė.** Siūlomas chemoterapinis gydymas pacientams, sergantiems ER/PR<sup>+</sup>, HER 2<sup>+</sup> vėžiu [6].

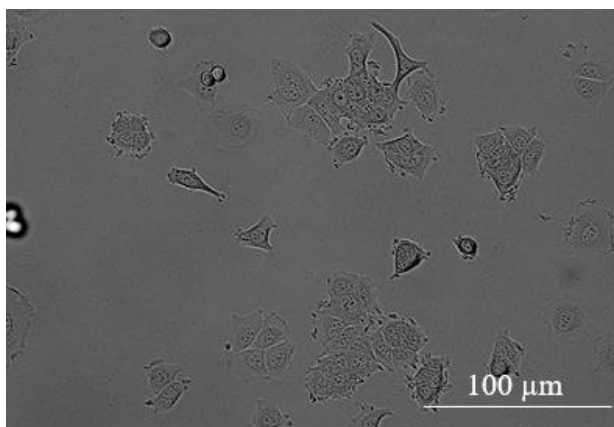
Gydymo tipas	Medikamentai
Pirmos eilės gydymas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paklitakselis ± Bevacizumabas</li> <li>• Antraciklinas + Paklitakselis</li> <li>• Vinorelbinas</li> <li>• Kapecitabinas</li> </ul>
Antros eilės gydymas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paklitakselis</li> <li>• Vinorelbinas</li> <li>• Kapecitabinas</li> <li>• Eribulinas</li> <li>• Liposominis antraciklinas</li> </ul>
Trečios eilės gydymas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paklitakselis</li> <li>• Vinorelbinas</li> <li>• Kapecitabinas</li> <li>• Eribulinas</li> <li>• Liposominis antraciklinas</li> <li>• Metronominis ciklofosfamidai</li> <li>• Metronominis vinorelbinas</li> </ul>

Luminalinis B yra ER<sup>+</sup>, PR<sup>-</sup> ir HER2<sup>-</sup>. B luminalinio Ki-67 proliferacijos indekso vertė yra didesnė nei luminalinio A tipo. Šis tipas turi kintamą atsaką į endokrininę terapiją ir chemoterapiją. Luminalinio B prognozė yra prastesnė nei luminalinio A [18-20].

HER2 KV paprastai yra ER/PR<sup>-</sup>, o HER2<sup>+</sup>. Ki-67 proliferacijos indekso vertė yra didelė. Augliai yra sunkiai gydomi ir gali paskatinti metastazes į limfmazgius. Šio tipo vėžys yra agresyvesnis už A,B luminalinius tipus. HER2 KV silpniau reaguoja į hormonų terapiją. Šio tipo vėžys jautriai reaguoja į trastuzumabo (herceptino) terapiją. Trastuzumabas blokuoja HER2 baltymo raišką ir sukelia vėžinių ląstelių mirtį [18-20].

Trigubai neigiamas KV (TNKV) paprastai yra ER/PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>. TNKV yra linkęs turėti aukštesnę mutacijos raišką, todėl šis tipas yra agresyviausias. TNKV nereaguoja į endokrininę terapiją, nes naviko ląstelės neturi reikiamų receptorių. Yra tikimybė, kad jį jautriai veikia chemoterapija platinos dariniais [18-20].

Šiame darbe aprašytiems tyrimams pasirinkta MCF-7 ląstelių linija, kuri pavaizduota 2 paveiksle. Ši ląstelių linija atitinka luminalinį A KV potipį.



**2 pav.** MCF-7 ląstelių linija.

MCF-7 yra viena dažniausiai naudojamų KV ląstelių linijų kaip pavyzdinis modelis KV tyrimams, įskaitant ir tuos tyrimus, kurie susiję su priešvėžiniu vaistų aktyvumu [21]. MCF-7 yra ER<sup>+</sup> ir PR<sup>+</sup> vėžio potipio pavyzdys. Ši ląstelių linija turi mažą metastazavimo indeksą [22,23]. MCF-7 ląstelės yra naudojamos atliekant ER<sup>+</sup> KV ląstelių eksperimentus, kurių tikslas yra iširti įgytą atsparumą priešvėžiniams vaistams ir atrasti kitus veiksmingus preparatus [24].

Ribotas vaistų sugebėjimas prasiskverbti į naviko audinį yra svarbi žmogaus navikų atsparumo priešvėžiniams vaistams priežastis. Kad pasiektų visas gyvybingas ląsteles navike, priešvėžiniai vaistai turi veiksmingai prasiskverbti per naviko kraujagysles, kirsti kraujagyslių sienelę ir patekti į gilesnius naviko audinius. Be to, heterogeniškumas naviko mikroaplinkoje lemia metabolizmo reakcijų pasikeitimus, kurie gali paveikti naviko ląstelių jautrumą gydomiems vaistams [25].

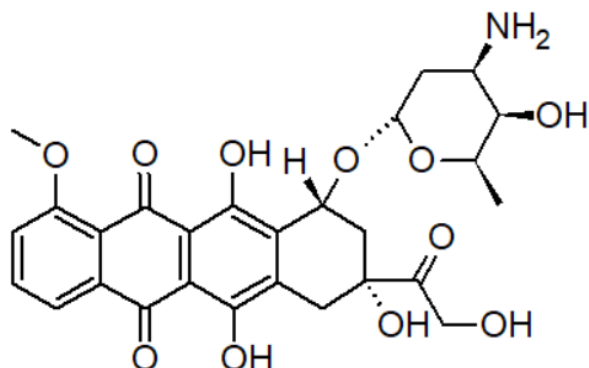
Silpnai rūgščių ir silpnai bazinių vaistų skvarba į ląsteles priklauso nuo naviko mikroaplinkos. Daroma prielaida, kad vaisto prasiskverbimas per membraną priklauso nuo vaisto gebėjimo jonizuotis rūgštinėje aplinkoje [26]. Silpnai bazinių chemoterapinių preparatų, kurių disociacijos konstanta yra 7,5–9,5, pvz., antraciklinų, antrachinonų ir alkaloidų efektyvumas sumažėja kietųjų navikų išorėje dėl susidariusio rūgštinio pH [27]. Krūties karcinoma paprastai gydoma doksorubicinu, paklitakseliu, ciklofosfamidu ir 5-fluorouracilu. Išskyrus paklitakselį, visi šie vartojami vaistai yra jonizuojami, todėl jų pasiskirstymas kietajame navike priklauso nuo pH<sub>e</sub> terpės [28].

*In vitro* ir *in vivo* metodai buvo naudojami siekiant nustatyti, kaip priešvėžiniai vaistai įsiskverbia į navikus. Nustatyta, kad doksorubicino skverbimasis, kuris buvo tiriamas fluorescencine mikroskopija, į vėžinių ląstelių sferoidus buvo pakankamai prastas [29]. Tyrimai su daugiasluoksnėmis ląstelių kultūromis patvirtino labai lėtą priešnavikinių vaistų, kurie jungiasi su DNR, pvz., doksorubicino ir mitoksantrono įsiskverbimą į audinius [30].

## **1.2. Doksorubicino ir jo pegiliuotos liposominės formos vaidmuo vėžio gydyme**

Dokсорubicinas, kurio struktūra pavaizduota 3 paveiksle, yra antraciklinų grupės antibiotikas, išskirtas iš *Streptomyces peucetius* [31]. Vartojamas gydyti karcinomas, sarkomas ir limfomas. Dokсорubicino molekulė sudaryta iš tetraciklinio antrachninono aglikono – dokсорubicinono, kuris yra sujungtas glikozidiniu ryšiu su piranoze [32].

Antrachinono dalis molekulėje yra lipofiliška, o cukraus dalis yra hidrofiliška. Doksorubicino molekulė yra sudaryta iš fenolių, kurie pasižymi rūgštinėmis savybėmis, ir amino grupės, suteikiančios vaistui bazines savybes. Doksorubicino molekulė yra amfifilinė ir amfoterinė, dėl to vaistas jungiasi prie ląstelių membranų ir baltymų [33].



**3 pav.** Doksorubicino struktūrinė formulė. Adaptuota pagal [33].

Antraciklinų citostatiniam ir citotoksiniam poveikiui paaiškinti buvo pasiūlyta daugybė mechanizmų. Išskiriami du pagrindiniai veikimo mechanizmai, pagal kuriuos doksorubicinas veikia vėžines ląsteles: pirmasis yra vaisto įsiterpimas į DNR, dėl ko sutrinka topoizomerazės-II raiška, ir antrasis, kurio metu susidaro laisvieji radikalai, sukeltys ląstelių, DNR ir baltymų pažeidimus [34]. Dėl šių pažeidimų DNR replikacija yra slopinama.

Siekiant įvertinti doksorubicino prasiskverbimą į vėžinių ląstelių dvimates ir trimates kultūras, išanalizuota daug *in vitro* ir *in vivo* sąlygomis atliktų tyrimų. Jų metu nustatyta, kad doksorubicino skvarba priklauso nuo terpės pH, inkubacijos laiko ir vaisto koncentracijos.

Pirmieji doksorubicino skvarbos tyrimai buvo atlikti 1974 metais. Jau tada pastebėta, kad doksorubicino prasiskverbimas į audinius priklauso nuo vaisto dozės ir inkubacijos laiko. Wilkinson ir kolegos, tirdami doksorubicino pasiskirstymą žmogaus audiniuose, pastebėjo, kad po doksorubicino injekcijos, kurios dozė yra 30 mg/m<sup>2</sup>, teigiamas vaisto poveikis matomas jau po 1 val. Praėjus 24 val. po intraveninio įleidimo, vaisto kiekis audiniuose pradeda mažėti. Toks staigus doksorubicino kiekio sumažėjimas sukėlė šalutinį poveikį paciento sveikatai [35]. Šis doksorubicino trūkumas paskatino vykdyti minėto priešvėžinio vaisto tolimesnius tyrimus.

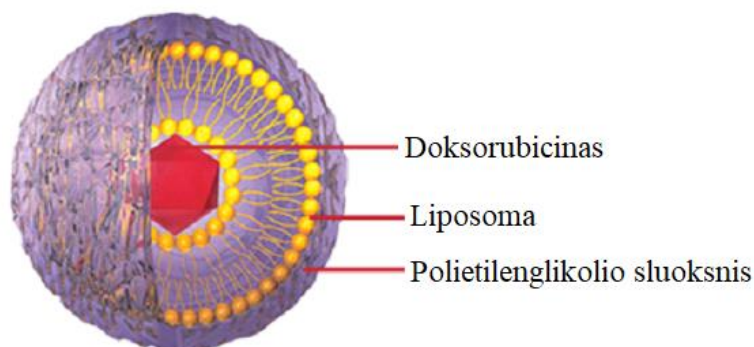
Nuo dozės priklausomas kardiotoksiškumas yra vienas pagrindinių doksorubicino šalutinis poveikis. Vienas būdų išvengti antraciklino sukeltą šalutinį poveikį, yra tiksliai nustatyti mažiausiai citotoksišką vaisto koncentraciją. Saeed S. ir kitų kolegų aprašytuose tyrimuose nustatyta, kad 10 μM doksorubicino koncentracija neslopina ląstelių gyvybingumo statistiškai reikšmingai po 4 val. inkubacijos, tačiau po 24 val. ląstelių gyvybingumas sumažėjo pusiau. Mokslininkai taip pat pastebėjo, kad priešvėžinio vaisto toksinis poveikis priklauso nuo inkubacijos laiko, tačiau tyrimo metu nebuvo išnagrinėtas vaisto patekimas į vėžines ląsteles [36].

Pradiniai įrodymai dėl riboto vaisto nuo vėžio doksorubicino prasiskverbimo per audinius, buvo gauti, tiriant jo fluorescencijos pasiskirstymą ląstelių kultūrose. Wojtkowiak ir kolegos nustatė pH įtaką silpnai bazinių vaistų patekimui į navikus. Gauti tyrimo rezultatai parodė, kad dauguma chemoterapinių vaistų, įskaitant doksorubiciną, rūgštinėje terpėje jonizuojasi, o tai trukdo jų

gebėjimui praeiti membranos barjerą. Vis dėlto, šis tyrimas nepateikia duomenų apie dokсорubicino pasiskirstymą, priklausomai nuo inkubacijos laiko [37]. Seaheave ir kitų mokslininkų tyrimai parodė, kad didžiausia dokсорubicino koncentracija ląstelės branduolyje yra pasiekama po 2 val. inkubacijos silpnai bazinėje terpėje [38].

Remiantis Tannock ir kitų kolegų farmakokinetinių analizių duomenis, susijusiais su dokсорubicino patekimu į navikus, pastebėta, kad vidutinė priešvėžinio vaisto koncentracija tam tikrame audinyje priklauso nuo inkubacijos laiko. Nors vaisto pasiskirstymas didėja 8 val. inkubacijos laikotarpyje, vis tiek tik nedidelis kiekis patenka į periferinius audinius nuo kraujagyslių. Todėl padaryta išvada, kad dokсорubicino koncentracija mažėja didėjant atstumui nuo kraujagyslių. Dėl šios priežasties daugelis gyvybingų navikų ląstelių auglio centre nėra veikiamos aptinkamų vaisto koncentracijų po vienos injekcijos [39].

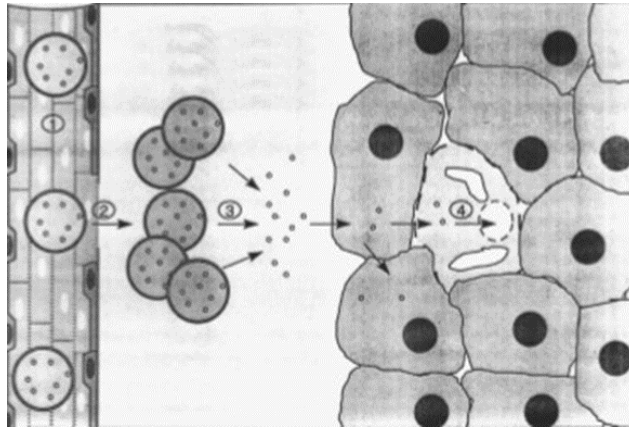
Klinikiniai ir eksperimentiniai tyrimai patvirtina, kad dokсорubicinas yra vienas veiksmingiausių vaistų, gydant KV sergančius pacientus [40]. Deja, ribotas vaisto pasiskirstymas kietuosiuose navikuose ir jo sukeliama šalutiniai poveikiai yra sėkmingo gydymo kliūtys. Siekiant sumažinti dokсорubicino šalutinius poveikius ir patekimą per ląstelės membraną, vienas iš sprendimų būdų buvo sukurti citotoksinį vaistą liposomoje, kurioje dokсорubicinas yra įterptas į metoksi polietilenglikolio sluoksnį [41]. Taigi, buvo sukurta pegiliuota liposominė dokсорubicino forma (PLD). 4 paveiksle pavaizduota PLD sandara. Ši formuliuotė pasižymi tokiais savybėmis: silpnai anijoninė, hidrofilinė polimerinė danga veikia kaip erdvinis barjeras, suteikiantis apsaugą pūslelėms nuo opsonizacijos ir laisvųjų radikalų poveikio; didelė dokсорubicino koncentracija liposomos vandeninėje fazėje, , apytiksliai lygi 15000 dokсорubicino molekulių vienoje pūslelėje; mažas liposominių dalelių dydis [42]. Pagal M. Markman ir kt. iškeltą teoriją, mažesnis liposominio preparato dydis leidžia lengviau vaistui patekti į vėžines ląsteles.



**4 pav.** Pegiliuotos liposominės dokсорubicino formos sandara.

Terapinio junginio prasiskverbimas į naviko audinius ir jo veikimo mechanizmas dar nėra tiksliai išaiškintas. Pagal A. Gabizon ir kt. siūlomą nanoformuluotės veikimo mechanizmo modelį, liposomos, kurių sudėtyje yra dokсорubicino, cirkuliuoja kraujyje šalia augančių navikų 2-3 savaites. Per šį laikotarpį beveik visas vaistas lieka liposomoje (5 pav. 1). Nepažeistos liposomos prasiskverbia per tarpus, esančius navikų kraujagyslėse, ir patenka į auglio audinius (5 pav. 2). Tada vaisto molekulės išsiskiria iš prasiskverbusių liposomų (5 pav. 3). Laisvos dokсорubicino molekulės prasiskverbia giliai į naviką ir naikina naviko ląsteles (5 pav. 4) [43].





**5 pav.** Pegiliuoto liposominio doksorubicino veikimo mechanizmas. Adaptuota pagal [43].

PLD poveikis labai skiriasi nuo doksorubicino. Tai rodo atlikti tyrimai su gyvūnais, bei I ir II fazės klinikiniai tyrimai atlikti su pacientais, sergančiais vėžiu [43]. Sukaupti duomenys rodo, kad PLD turi mažesnę toksišką poveikį širdžiai negu doksorubicinas. Tikriausiai PLD farmakokinetinės savybės lemia minėto kardiotoksiškumo rizikos sumažėjimą. Tai pagrįsta dviem galimais mechanizmais: didžiausios laisvo vaisto koncentracijos sumažėjimas plazmoje dėl vaisto molekulių stabilumo ir ilgalaikis vaisto išlikimas liposomoje. Nustatyta, kad pacientams, vartojantiems PLD, nepasireiškia toksiškas poveikis širdžiai [44].

Keliuose ikiklinikiniuose KV modeliuose ir gyvūnų limfomos variante, PLD pasižymėjo didesniu priešūždegiminiu aktyvumu nei įprastas doksorubicinas [43]. Aprašytuose tyrimuose PLD greičiau slopino auglio augimo greitį, daugelių atvejų padidino tiriamųjų išgyvenamumą. Skirtingai nei įprastas doksorubicinas, PLD forma, turėjo panašų veiksmingumą tiek mažų, tiek didelių navikų augimui pelės krūties karcinomos modelyje [41].

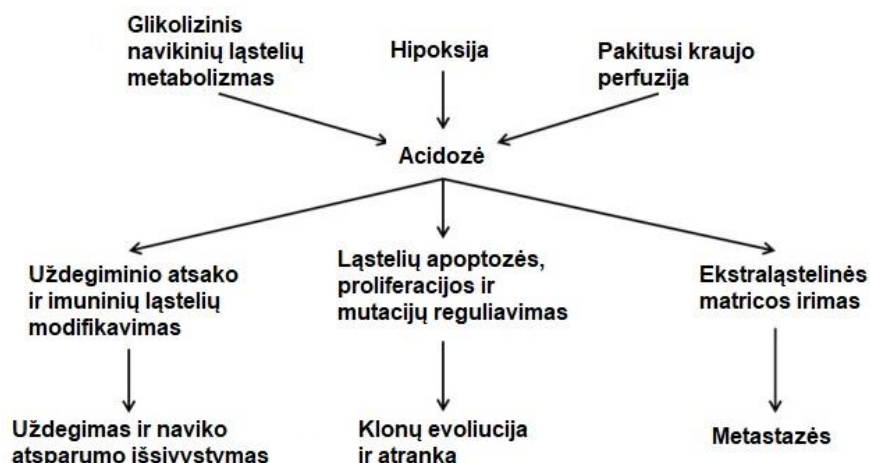
Apibendrinant galima teigti, kad PLD turi daugiau privalumų, palyginti su įprastiniu doksorubicinu, įskaitant palankesnes farmakokinetines ir tolerancijos savybes. Vis dėlto, didelę įtaką šių preparatų prasiskverbimui į naviko audinius turi pakitusi auglio mikroaplinka.

### 1.3. Vėžio mikroaplinka

Didėjant augliui, proliferuojančios ląstelės vis labiau nutolsta nuo kraujagyslių. Dėl to sutrinka difuzijos procesas, o tai lemia didesnius  $H^+$ , gliukozės,  $pO_2$  ir kitų maistinių medžiagų koncentracijų pokyčius [45]. Hipoksija yra viena iš pagrindinių veiksnių, kuris prisideda prie riboto vaistų pasiskirstymo naviko audinyje ir prisideda prie lokalaus, bei sisteminio naviko augimo. Pastaroji sumažina radioterapijos ir chemoterapijos gydymo efektyvumą, dėl šios priežasties piktybinis navikas turi padidintą galimybę atsinaujinti. Vėžinėse ląstelėse hipoksija atsiranda 100-200  $\mu m$  atstumu nuo kraujagyslių, ir ląstelės, kurioms nepavyksta prisitaikyti prie deguonies nepakankamumo, nekrozuoja. HIF-1 transkripcijos faktorius – pagrindinis reguliatorius, kuris leidžia navikui prisitaikyti prie hipoksinio streso, stimuliuodamas genų, kurie leidžia ląstelei ilgiau išgyventi, raišką. HIF-1 faktoriaus išskirti produktai dalyvauja naviko augimo stadijose, tokiose kaip proliferacija, gliukozės metabolizmas, pH acidozė, angiogenezė ir galiausiai metastazė [47].

Tikslus pH homeostazės reguliavimas yra esminis normalios fiziologinės būklės faktorius. Patologinių sąlygų, tokių kaip protonų perteklius, atsiradimas, skatina acidozės formavimąsi

audinio mikroaplinkoje. Kietos būsenos navikai stabdo aerobinę glikolizę (Warburgo efektas), dėl kurios susidaro dideli pieno rūgšties kiekiai, be to šie rūgštiniai produktai negali būti pašalinti, nes vėžinių ląstelių kraujagyslės yra pakitusios, ir dėl to naviko mikroaplinka tampa rūgštinė, ypač silpnai perfuzuotuose regionuose [48]. Reikėtų paminėti, jog acidozė egzistuoja ir išeminiuose, bei uždegiminiuose audiniuose, kuriuose glikolizinis metabolizmas, hipoksija ir silpna kraujo perfuzija gali lemti protonų kiekio padidėjimą ir mikroaplinkos pokyčius. Kietose naviko formose, išeminiuose ir uždegiminiuose audiniuose mikroaplinkos pH yra tarp 6-7. Acidozė yra susijusi su daugybe procesų: ląstelių apoptoze, uždegimu, angiogeneze ir imuniniu atsaku (6 pav.) [47].



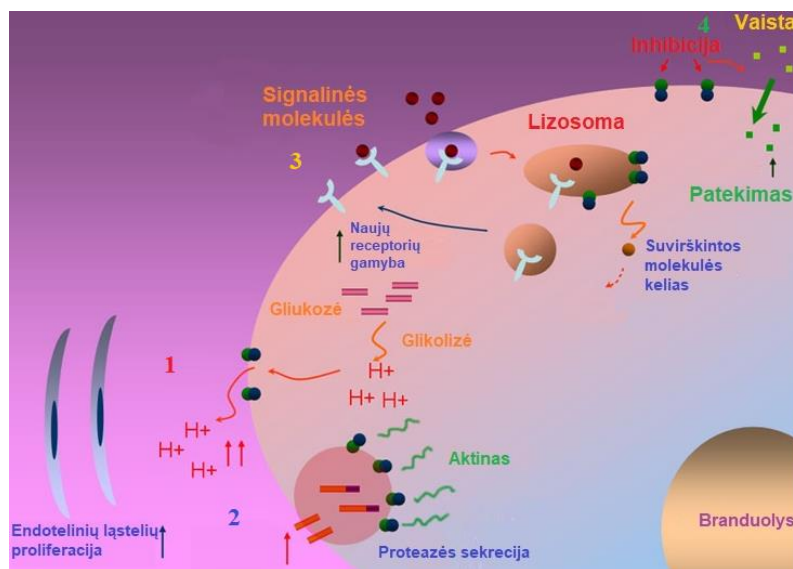
**6 pav.** Acidozės sukeltos ląstelės pažeidimai [49].

Yra duomenų, jog acidozė stimuliuoja endoplazminio tinklo stresą ir nesulankstytų baltymų atsaką astrocitų, mezotelinių, vėžinių, kraujagyslių endotelio ląstelių tipuose. Nesulankstytų baltymų atsakas yra reguliuojamas trimis keliais, t.y. aktyvuojant tris endoplazminio tinklo transmembraninius jutiklius PERK (R tipo baltymų kinazė) ir ATF6 (6 transkripcijos veiksnio aktyvatorius). PERK aktyvavimas leidžia fosforilinti eukariotinį iniciacijos faktorių 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), kuris sustabdo baltymų translaciją sumažindamas baltymų transportavimą į endoplazminį tinklą. ATF6 nukreipia baltymus į Goldžio aparatą kur šie yra sukarpomi į aktyvuotą p50 formą, kuri toliau nukreipiama į branduolį ir reguliuoja endoplazminio tinklą šaperonų genų ekspresiją. Tai sukelia didelį intraląstelinio pH sumažėjimą [50].

Ekstraląstelinis rūgštingumas yra piktybinių navikų bruožas, darantis įtaką invazijai, metastazėms, atsparumui vaistams ir agresyvesnių ląstelių fenotipų atsiradimui, linkusioms išgyventi esant labai nepalankioms mikroaplinkos sąlygoms [51]. Pagrindinė naviko rūgštingumo priežastis yra cukrų fermentacija, kuri skatina pieno rūgšties gamybą [52]. Be to, kai kurie SLC16A genų šeimos monokarboksilato transporterio potipiai padeda reguliuoti naviko rūgštingumą per monokarboksilatą (pvz., pieno rūgštį) [52].

Vienas iš svarbiausių būdų, leidžiančių auglio ląstelėms išgyventi rūgštinėje terpėje, yra kai kurių protonų siurblių, pavyzdžiui vakuolinės ATPazės (V-ATPazės) reikšmingas padidėjimas. Kaip parodyta 7 paveiksle, glikolizės būdu sukurti protonai išsiurbiami plazminės membranos V-ATPazės, kuri apsaugo ląstelę nuo acidozės sukeltos apoptozės, taip pakeisdama citozolinį pH į silpnai bazinį. Sekretinių pūslelių rūgštingumo padidėjimas, kuris atsiranda dėl ląstelių V-ATPazės, yra būtinas elementas proteazės sekrecijai ir aktyvacijai. Sąveika tarp V-ATPazės ir aktino gali prisidėti prie V-

ATPazės kiekio atkūrimo plazminėje membranoje. V-ATPazės kaupimasis plazminėje membranoje, rūgštinė ekstraląstelinė mikroaplinka ir aktyvuota proteazė sudaro galimybes greičiau vykti ląstelių invazijai ir plisti metazstazėms. V-ATPazė gali reguliuoti signalo kelią, kontroliuojant prisijungiančias signalines molekules, gaminant naujus receptorius ir apdorojant signalines molekules. Naviko ląstelės dėka protonų siurblio išvengia lizės fermentų aktyvinimo kaskados, kuri galėtų sukelti ląstelių žūtį. Nustatyta, kad antacidinis poveikis, susijęs su buferinių molekulių arba protonų mainų slopiklių pritaikymu, gali padidinti chemoterapinių medžiagų veiksmingumą [53].



7 pav. V-ATPazės vaidmuo vėžinėse ląstelėse [54].

Siekiant sumažinti V-ATPazės sukeltą pažeidimą ir padidinti priešvėžinių vaistų prasiskverbimą į vėžines ląsteles, klinikinėje praktikoje yra naudojami protonų siurblio inhibitoriai (PSI), kurie padidina endosominį pH, o tai gali padidinti vaistų patekimą į gilesnius naviko audinius [54].

#### 1.4. Protonų siurblio inhibitoriai ir jų pritaikymas acidozės mažinimui

Slopinant protonų siurblius yra atkuriamas pH gradientas, kuris yra palankesnis įvairių priešvėžinių vaistų skvarbai į vėžines ląsteles. Šis veikimas buvo įrodytas V-ATPazės inhibitoriaus bafilomicino ir cisplatinos pritaikymo atveju [54]. PSI, kuriems priklauso esomeprazolas, omeprazolis, lansoprazolas, pantoprazolas ir rabeprazolis, šiuo metu vartojami gydyti virškinamojo trakto ligas. Šie vaistai gali būti panaudoti ir vėžio atveju.

Lansoprazolas priklauso antisekrecinių vaistų grupei, jis blokuoja paskutinį skrandžio rūgšties gamybos etapą [55]. Lansoprazolas nėra toksiškas vėžinėms ląstelėms, bet sustiprina doksorubicino citotoksiškumą ir padidina jo prasiskverbimą per daugiasluoksnes ląstelių membranas. Kietuosiuose navikuose lansoprazolas pagerina doksorubicino pasiskirstymą bei padidina vaisto aktyvumą [56]. Atliktų tyrimų rezultatai patvirtina koncepciją, kad išankstinė PSI profilaktika gali būti veiksminga didinant chemoterapijos terapinį veiksmingumą kai kuriuose kietuose navikuose. Šiuo metu vyksta daugybė klinikinių tyrimų, siekiant pateikti klinikinių įrodymų apie galimą PSI pritaikymą gydant vėžinius susirgimus [56].

Nors PSI yra specifiniai skrandžio  $H^+ - K^+$  ATPazių blokatoriai, jie taip pat gali slopinti V-ATPazės aktyvumą [54]. Kadangi PSI yra silpnos bazės, kurių jonizacijos konstanta (pKa) yra apie 4

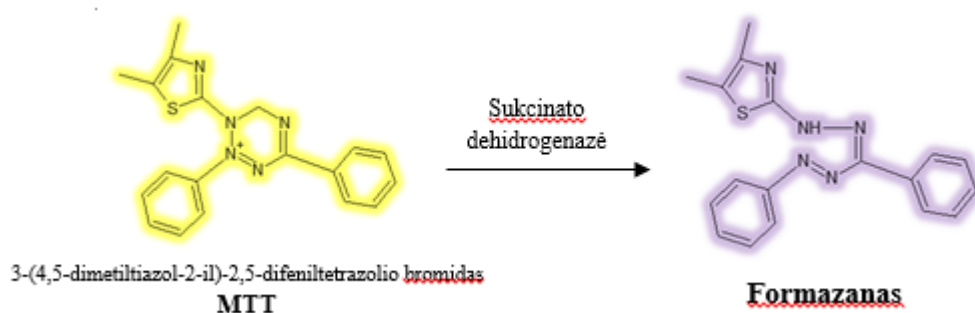
(rabeprazolio  $pK_a = 5$ ), PSI lengvai protonizuojasi ir selektyviai kaupiasi stipriai rūgštinėse terpėse [54]. Todėl galima teigti, jog PSI vartojimas padidina terpės pH.

Remiantis šiomis savybėmis, PSI buvo plačiai ištirti dėl jų gebėjimo mažinti naviko rūgštingumą ir sumažinti su acidoze susijusį vaistų atsparumą. Be to, PSI gali turėti tiesioginį poveikį naviko ląstelių toksiškumui, blokuojant pagrindinį šių ląstelių mechanizmą, kuris leidžia išlikti joms gyvybingoms rūgštinėje terpėje [55].

### 1.5. Pasirinktų metodų principai

Siekiant įvertinti doksorubicino ir PLD toksiškumą ir skvarbą į MCF-7 krūties vėžio ląstelių kultūras, pasirinkti toliau aprašyti tyrimų metodai.

Doksorubicino ir lansoprazolo citotoksiškumui nustatyti pritaikėme MTT redukcijos metodą [56]. Tai yra saugus ir plačiai naudojamas metodas norint, įvertinti ląstelių gyvybingumą ir junginių citotoksiškumą. MTT redukcijos testas yra kolorimetrinis metodas ląstelių apykaitos aktyvumui įvertinti. Nuo NADPH priklausomų ląstelių oksireduktazės fermentų aktyvumas gali būti siejamas su ląstelių gyvybingumu. Šie fermentai, kaip pavaizduota 8 paveiksle, gali redukuoti geltoną tetrazolio dažą 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidą (MTT) iki jo netirpių violetinių formazano kristalų, kurie vėliau ištirpinami dimetilsulfoksido (DMSO) [57]. Šio spalvoto tirpalo absorbcija matuojama spektrofotometriškai 570 ir 630 nm bangos ilgiuose [56].



8 pav. MTT dažo redukcija. Adaptuota pagal [57].

Ląstelių gyvybingumo nustatymui tai pat gali būti naudojami kiti metodai: kitų reagentų (XTT, MTS, LDH), naudojamų kolorimetriniuose tyrimuose redukcija; fluorimetriniai ląstelių gyvybingumo ir citotoksiškumo nustatymo metodai, kurie yra pagrįsti ląstelių dažymu fluorescuojančia medžiaga (pavyzdžiui, resazurinu). Šis junginys yra mėlynos spalvos, tačiau nėra fluorescuojantis. Ląstelių kultūrose resazurinas yra redukuojamas iki resorufino. Resorufinas yra raudonos spalvos fluorescuojantis junginys. Jo kiekis yra proporcingas gyvybingų ląstelių skaičiui ir gali būti kiekybiškai įvertintas, išmatuojant fluorescencijos intensyvumą. Šio metodo pagrindinis trūkumas yra tas, kad jis netinka tirti fluorescuojančių junginių poveikiui dėl galimų fluorescencijos trukdžių [57].

Junginių skvarbos tyrimai dažniausiai atliekami ląstelių monosluoksnyje, tačiau norint labiau imituoti naviko mikroapliką, svarbu parinkti tinkamą trimačių ląstelių kultūrų formavimo metodą. Palyginus su dvimatėmis monosluoksnių ląstelių kultūromis, naviko ląstelės, kultivuojamos trimatėje mikroaplinkoje, elgiasi skirtingai: pasižymi skirtinga morfologija, skiriasi signalų transdukcija, histono acetilinimas, genų raiška, baltymų raiška, vaistų metabolizmas, ląstelių

gyvybingumas [58]. Dvimačiuose ir trimačiuose naviko ląstelių kultūrų modeliuose gali būti skirtingas autrumas priešvėžinių vaistų poveikiui [59]. Taigi *in vitro* trimatė ląstelių kultūra yra tinkamesnis modelis vėžinių vaistų skvarbai įvertinti [60].

Neseniai pasiekta ląstelių biologijos, mikro-gamybos metodų ir audinių inžinerijos pažanga leido sukurti daugybę trimatės ląstelių kultūros technologijų. Taikant kabančio lašo metodą, ląstelės yra patalpinamos į kabantį lašą, kol suformuojama trimatė kultūra – sferoidas, kuriame ląstelės ne tik kontaktuoja tarpusavyje, bet ir su ekstraląstelinio matriksu komponentais. *Forced floating* metodas – atliekamas naudojant nepadengtas lėkšteles arba padengtas hidrofiliu polimeru, kuris fiksuoja ląstelės – substrato sąveiką ir neleidžia ląstelėms prisijungti prie paviršiaus. Ekstraląstelinio matriksų ir dangų metodas sudaro galimybę atsirasti geresnei ląstelės – ląstelės sąveikai. Ši sąveika yra svarbi ląstelėje vykstantiems procesams [61-63].

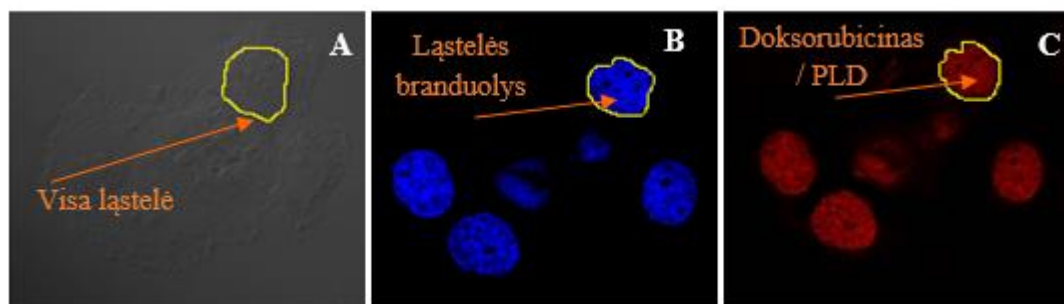
Šiame darbe sferoidai buvo formuojami 3D *Bioprinting* metodu, pagal 9 paveiksle pateiktą schemą. Šis metodas pasižymi technologijos paprastumu, didelių suformuotų sferoidų skaičiumi (gaunami iš karto 96 sferoidai) bei artimesniu *in vivo* mikroaplinkos atkūrimu, lyginant su ląstelių monosluksniumi. Šiuo metu metodas naudojamas audiniams ir organams gauti, siekiant iširti vaistų veiksmingumą [64].



**9 pav.** Sferoidų formavimas trimatė *Bioprinting* metodu. A - Vėžinių ląstelių inkubacija su magnetinėmis nanodalelėmis; B - ląstelių atkabinimas, suskaičiavimas ir suspendavimas; C - ląstelių perkėlimas į mažo prilipimo plokštelę. Plokštelės patalpinimas ant magnetinės plokštelės; D - plokštelės nuėmimas su gautais sferoidais. Adaptuota pagal [65].

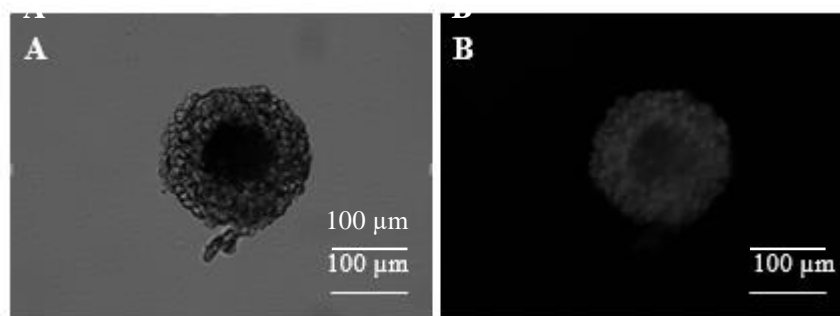
Dėl doksorubicino fluorescencinių savybių, pastarojo vaisto ir PLD skvarbai ląstelių monosluksnyje ir trimatėje ląstelių kultūroje nustatyti pasirinkome fluorescencinės mikroskopijos metodą, prieš tai inkubuojant ląsteles su minėtais tiriamaisiais junginiais. Fluorescencinės mikroskopijos metodu galima tirti medžiagas, kurios natūraliai fluorescuoja (pirminė arba automatinė fluorescencija) arba medžiagas, kurios yra papildomai apdorojamos cheminėmis medžiagomis ir tuomet fluorescuoja (antrinė fluorescencija) [66-69].

Pagrindinis šio metodo principas yra leisti sužadavimo šviesai švitinti mėginį ir tada atskirti daug silpnesnę spinduliuojančią fluorescencinę šviesą nuo šviesesnės sužadavimo šviesos. Apšvietimo šviesa atskiriama nuo daug silpnesnės skleidžiamosios fluorescencijos naudojant dichroinį veidrodį. [70-72]. Filtrai ir dichroikai yra parinkti taip, kad atitiktų spektrofotografinius ir fluoroforo, naudojamo mėginio ženklinius, charakteristikas. Šiame darbe vertinant doksorubicino skvarbą monosluksniumi auginamoje ląstelių kultūroje, naudoti filtrai TRITC ir DAPI. Ląstelių nuotraukų skirtumai, naudojant skirtingus filtrus, pateikti 10 paveiksle.



**10 pav.** Ląstelių nuotraukos, gautos šviesinės ir fluorescencinės mikroskopijos būdu. A – naudojant DIC filtrą matomos visos ląstelės kontūrai; B – naudojant DAPI filtrą matomas ląstelės branduolys, C – naudojant TRITC filtrą matomas doksorubicinas patekęs į ląstelės branduolį.

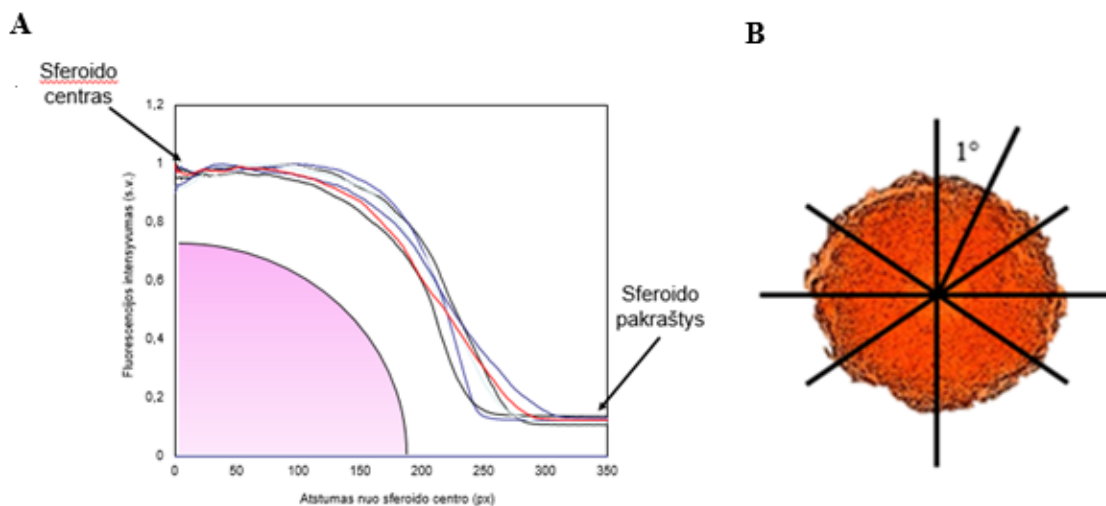
Tiriant doksorubicino patekimą į ląstelių sferoidus, buvo naudojamas tik TRITC filtras, kuris parodo doksorubiciną pasiskirstymą sferoide. Tai pavaizduota 11 paveiksle.



**11 pav.** Sferoido nuotraukos, gautos šviesinės ir fluorescencinės mikroskopijos būdu. A - nenaudojant filtro. B - naudojant TRITC filtrą, per kurį galime matyti fluorescuojanti doksorubiciną.

Tolimesnė analizė atliekama panaudojant mokslininko dr. A. Žiemo sukurtą programą, kuri automatizuotai nuotraukose suranda sferoido centrą ir matematiškai įvertina fluorescencijos intensyvumą kas 1 laipsnį visame sferoido plote ir paskaičiuoja fluorescencijos intensyvumo vidurkius. Ši darbo metodika yra pateikta 12 paveiksle. Tokiu būdu galima įvertinti doksorubicino pasiskirstymą nuo sferoido pakraščio iki sferoido centro.





**12 pav.** Doksorubicino pasiskirstymo įvertinimas ląstelių. A - fluorescencijos intensyvumas sferoido pakraštyje ir sferoido centre; B – fluorescencijos intensyvumo matavimas kas 1 laipsnį visame sferoido plote.

Doksorubicino pasiskirstymui ląstelėje matuoti gali būti taikomi ir tėkmės citometrija, kurios metu matuojamas intraląstelinis doksorubicino įsisavinamumas. Tačiau tai yra brangus ir ilgai trunkantis metodas [73]

### 1.6. Projekto temos ir uždavinių pagrindimas

Išanalizavus mokslinę literatūrą, susijusią su doksorubicino ir jo liposominės nanoformuluotės skvarbos į KV ląstelių kultūras įvertinimu, kilo idėja išsamiau ištirti ir įvertinti protonų siurblio inhibitoriaus lansoprazolo poveikį doksorubicino ir PLD transportui. Tam tikslui pasiekti pirmiausiai vertinama doksorubicino ir PLD skvarba į krūties vėžio MCF-7 ląsteles, panaudojant fluorescencinės mikroskopijos metodą. Remiantis prielaida, kad PSI padidina priešvėžinių vaistų prasiskverbimą į vėžines ląsteles, buvo įvertintas protonų siurblio inhibitoriaus (lansoprazolo) įtaka doksorubicino ir PLD patekimui į MCF-7 krūties vėžio ląsteles. Siekiant įvertinti kaip tiriamieji junginiai prasiskverbia į naviko audinius, svarbu buvo ištirti doksorubicino ir PLD skvarbą į krūties vėžio MCF-7 sferoidus, kurie geriau imituoja sąlygas, esančias žmogaus organizme.

## 2. Medžiagos ir metodai

### 2.1. Medžiagos ir aparatūra

#### 2.1.1. Naudota įranga ir prietaisai:

- Centrifuga Eppendorf 5702 R (Eppendorf)
- Mikroplokštelių skaitytuvas Multiscan™ FC (Thermo Scientific)
- Fluorescencinis mikroskopas Olympus IX73 (Olympus)
- Konfokalinis mikroskopas Axio Imager Z1 (Zeiss) su kamera AxioCam MRm (Zeiss)
- Neubauerio hemocitometras Blaubrand (Sigma-Aldrich)
- pH-metras SevenCompact™ S220 (Mettler Toledo)

#### 2.1.2. Priemonės

- 96 šulinėlių laibai mažo prilipimo plokštelės (Corning)
- 12 šulinėlių plokštelės (Corning)
- Dengiamieji stikleliai, 22×22 mm, Nr. 1 (Fisher Scientific)
- Dengiamieji stikleliai, 13 mm (Avantor)
- Magnetinė plokštelė (Nanotrimatė Biosciences)

#### 2.1.3. Reagentai

- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas (MTT) (Sigma-Aldrich, ≥ 97 proc.)
- 4'-6-diamidino-2-fenilindolo dihydrochloridas (DAPI) (Thermo Scientific)
- Nuo šviesos apsaugantis aliejus ProLong™ Gold antifade reagent (Invitrogen)
- Antibiotikų tirpalas, 1 proc. (10000 vienetų/ml penicilino ir 10 mg/ml streptomicino) (Gibco)
- Dimetilsulfoksidas (DMSO), (Sigma-Aldrich Co, ≥ 99,5 proc.)
- Doksorubicino hidrochloridas (Abcam, > 98 proc.)
- *Dulbecco* 'o modifikuota Eagle ląstelių mitybinė terpė (DMEM GlutaMAX, Gibco)
- Fetalinis veršiukų serumas (FBS) (Gibco)
- Formaldehido 16 proc. tirpalas, be metanolio (Thermo Scientific)
- Fosfatinis druskų tirpalas (PBS) pH 7,4 (Gibco)
- Kolagenas, 5 mg/ml (Gibco)
- Lansoprazolas (Active Pharma)
- Nanodalelės NanoShuttle™ (Nano3D Biosciences)
- Pegiliuotas liposominis doksorubicinas (PLD), 4,0 mg/ml (FormuMax)
- Tripsino tirpalas TrypLE™ Express (Gibco)
- Etanolis (96 proc., Vilniaus degtinė)

#### 2.1.4. Ląstelių linija

- MCF-7 – luminalinis A žmogaus KV (ATCC)
- Žmogaus fibroblastai (HF, įsigyti iš prof. Helder A. Santos, Helsinkio universitetas, Suomija).



## **2.2. Tyrimo metodikos**

### **2.2.1. Ląstelių kultivavimas**

MCF-7 ląstelių linija auginama monosluoksniu mitybineje terpėje, kuri susideda iš DMEM, 10 proc. FBS ir 1 proc. antibiotikų tirpalo. Ląstelės auginamos inkubatoriuje 37°C temperatūroje, 5 proc. CO<sub>2</sub> aplinkoje. Auginama tol, kol ląstelės užpildo 80 proc. Petri lėkštelės dugno, tada persėjama.

Ląstelių persėjimas atliekamas pagal toliau pateikiama darbo eigą: pirmiausiai yra nusiurbama mitybinė terpė, praplaunama PBS tirpalu, įpilama 1 ml tripsino analogo tirpalo ir inkubuojama apie 5 min. 37°C, 5 proc. CO<sub>2</sub> aplinkoje. Praėjus nurodytam laikui, lėkštelės turinys perpilamas į 15 ml centrifuginį mėgintuvėlį, paliekant apie 200 μl ląstelių suspensijos. Į ląsteles pilama 9 ml mitybinės terpės ir lėkštelė dedama į inkubatorių.

### **2.2.2. Ląstelių gyvybingumo nustatymas**

Citotoksinis doksorubicino poveikis MCF-7 KV ląstelėms buvo tiriamas MTT redukcijos metodu. Į 96 šulinėlių plokšteles pilama po 100 μl paruoštos ląstelių suspensijos taip, kad kiekviename šulinėlyje būtų 10000 ląstelių. Plokštelė inkubuojama 24 val. 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO<sub>2</sub> turinčioje aplinkoje.

Tiriamųjų medžiagų tirpalai ruošiami DMSO. Šie tirpalai skiedžiami mitybine terpe, gaminant serijinius praskiedimus, ir pilami po 100 μl į 96 šulinėlių plokšteles su ląstelėmis. Kiekvienai junginio koncentracijai naudojama po tris šulinėlius. Neigiama kontrolė yra mitybinė terpė su 0,5 proc. DMSO, o teigiama kontrolė – mitybinė terpė be ląstelių.

Įvertinamas junginių poveikis MCF-7 vėžio ląstelėms po 4, 8, 24 ir 48 val.. Praėjus inkubacijos laikui, į 96 šulinėlius pilama po 20 μl MTT tirpalo 5 mg/ml koncentracijos. Dedama į inkubatorių 3 val.. Vėliau skystis nupilamas, susidariusius kristalus ištirpinama pridėjus 100 μl DMSO tirpalo. Susidariusių formazano kristalų koncentracija, kuri atitinka gyvybingų ląstelių skaičių, nustatoma spektrofotometriškai, absorbciją matuojant 560 nm ir 630 nm bangos ilgiuose. Pagal gautus duomenys nustatoma koncentracija, kuri slopina 50 proc. ląstelių gyvybingumą (EC<sub>50</sub>). Tyrimas kartojamas 2-3 kartus.

Išmatuotos absorbcijos vertės normalizuojamos nuo 0 iki 1, kur 0 atitinka neigiamą, o 1 – teigiamą kontrolę. Duomenys analizuojami *Excel 2016* (Microsoft) programa, nustatomos koncentracijos, kurios slopina 50 proc. ląstelių gyvybingumą (EC<sub>50</sub>).

### **2.2.3. Doksorubicino ir PLD skvarbos tyrimas ląstelių monosluoksnyje**

Ant 12 šulinėlių plokštelės dugno sudedami dengiamieji stikleliai, kurie iš anksto buvo padengti kolagenu. Į kiekvieną šulinėlį pilama po 2 ml 50000 ląstelių/ml suspensijos. Plokštelė inkubuojama 48 val. 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO<sub>2</sub> aplinkoje. Praėjus nurodytam laikui, mitybinė terpė yra nusiurbama ir pakeičiama nauja terpe su 100 μM lansoprazolo tirpalu, kurios pH 6,0 arba 7,2. Kaip neigiama kontrolė naudojama pH 6,0 arba 7,2 mitybinė terpė su 0,1 proc. DMSO. Po 2 val. inkubacijos kambario temperatūroje terpė keičiama 2 ml nauja mitybine terpe, kurios pH 6,0 arba 7,2 su 10 μM doksorubicino arba PLD koncentracija, kuri atitinka 10 μM doksorubicino tirpalo.

Kaip neigiama kontrolė naudojama mitybinė terpė su 0,1 proc. DMSO. Inkubuojama kambario temperatūroje, apsaugant nuo šviesos poveikio.

Įvertinamas junginių patekimas į MCF-7 vėžines ląsteles po 30 min. ir 1; 2; 4 val. Praėjus inkubacijos laikui, terpė yra nusiurbama ir šulinėliai perplaunami PBS du kartus, fiksuojami 4 proc. paraformaldehido tirpalu 30 min. Po to vėl perplaunama du kartus PBS, pilama 2 µg/ml DAPI tirpalo ir inkubuojama 30 min. Vėl perplaunama PBS. Ant objektyvio stiklelio užlašinama nuo šviesos apsaugančio aliejaus ir ant jo uždedamas dengiamasis stiklelis su ląstelėmis.

Ląstelės mikroskopuojamos AxioImage Z1 mikroskopu ir fotografuojamos 40× didinimu, naudojant DAPI ir TRITC filtrus bei diferencinį interferencijos kontrastą (DIC). Nuotraukų analizė atliekama panaudojant ImageJ (National Institute of Health) programą. Rankiniu būdu pirmiausiai apibrėžiami ląstelių kontūrai, vėliau ląstelių branduoliai. Išmatuojamas fluorescencijos intensyvumas ląstelių branduolyje ir visoje ląstelėje. Gauti duomenys toliau analizuojami *Excel 2016* (Microsoft) programa.

#### **2.2.4. Vėžio ląstelių sferoidų formavimas**

Vėžio ląstelių sferoidai formuojami 3D *Bioprinting* metodu iš MCF-7 ląstelių ir žmogaus fibroblastų. Ląstelės inkubuojamos 8–10 val. su 20 µl nanodalelių *NanoShuttle* 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO<sub>2</sub> aplinkoje 6 šulinėlių plokštelėje. Tada ruošama ląstelių suspensija mitybinėje terpėje ir išpilstoma į labai mažo prilipimo 96 šulinėlių plokštes taip, kad 1 šulinėlyje būtų po 2000 MCF-7 ir 2000 fibroblastų ląstelių. Vienoje grupėje yra 8 sferoidai. Plokštelė uždedama ant specialios magnetinės plokštelės ir inkubuojama 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO<sub>2</sub> aplinkoje 3 dienas, kol susformuoja sferoidai.

#### **2.2.5. Tiriamųjų junginių skvarbos tyrimas vėžio ląstelių sferoiduose**

Sferoidai formuojami 2.2.4 skirsnyje aprašytu būdu. Mitybinė terpė yra nusiurbama ir pakeičiama 100 µl naujos terpės su lansoprazolo tirpalu, kurios pH yra 6,0 arba 7,2. Kaip neigiama kontrolė naudojama pH 6,0 arba 7,2 mitybinė terpė su 0,1 proc. DMSO be lansoprazolo.

Po 2 val. inkubacijos kambario temperatūroje terpė keičiama nauja mitybine terpe, kurios pH 6,0 arba 7,2 su 20 µM doksorubicino arba PLD koncentracija, kuri atitinka 20 µM doksorubicino tirpalo. Kaip neigiama kontrolė naudojama mitybinė terpė su 0,1 proc. DMSO. Inkubuojama kambario temperatūroje, apsaugant nuo šviesos poveikio. Po 30 min. ir 1; 2; 4 val. terpė yra nusiurbama, šulinėliai perplaunami PBS ir fiksuojama 4 proc. paraformaldehido tirpalu.

Sferoidai fotografuojami Olympus IX73 mikroskopu 10× didinimu, naudojant TRITC filtrą. Nuotraukų analizė atliekama panaudojant dr. A. Žiemio (JAV) sukurtą programą. Gauti duomenys toliau analizuojami *Excel 2016* (Microsoft) programa.

#### **2.2.6. Duomenų statistinis apdorojimas**

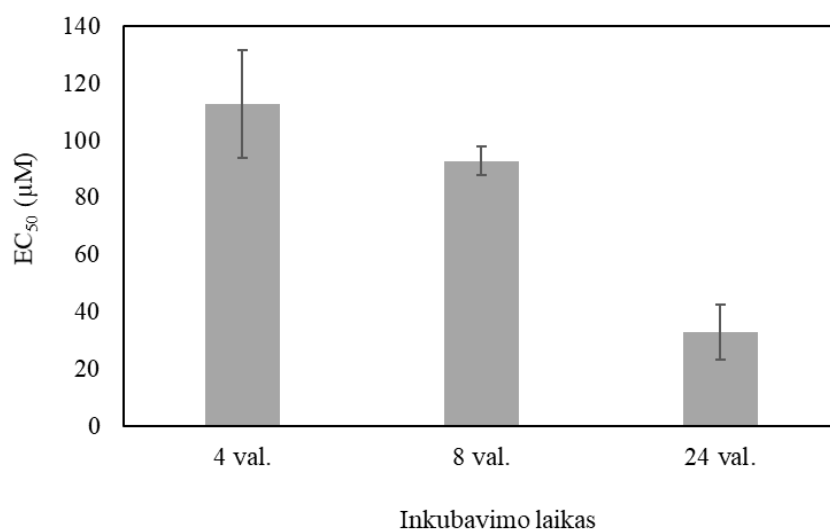
Duomenys apdoroti naudojant *Excel 2016* (MS) paketą įvertinant matavimų vidurkius ir santykinus nuokrypius. Vidurkiai buvo palyginti naudojant Student'o *t* kriterijų, o skirtumai laikomu statistiškai patikimais, kai reikšmingumo lygmuo  $p < 0,05$ .

### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Doksorubicino ir lansoprazolo citotoksinis poveikis

Siekiant pasirinkti tiriamų medžiagų koncentracijas skvarbos ląstelių dvimatėje ir trimatėje kultūrose tyrimams, buvo svarbu nustatyti jų toksiškumą. Šiam tikslui pasirinktas MTT redukcijos tyrimas.

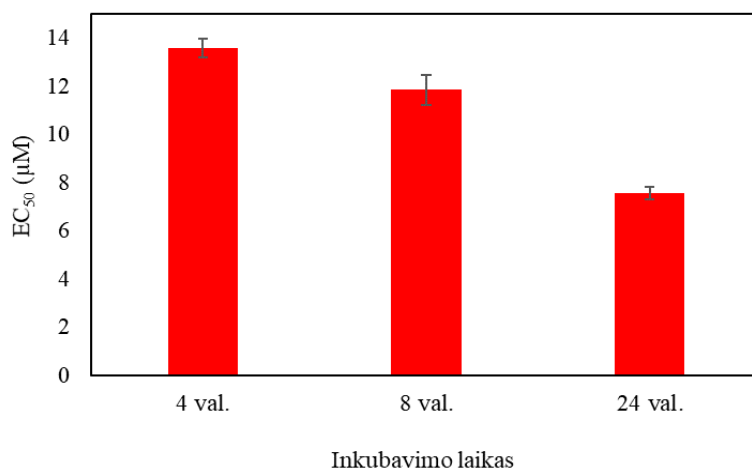
Lansoprazolas tirtomis koncentracijomis neslopino MCF-7 ląstelių gyvybingumo po 4 val. inkubavimo. Po 24 val. lansoprazolo citotoksinis poveikis buvo 3 kartus didesnis nei po 4 val. ( $EC_{50}$  po 24 val. lygi  $30,74 \pm 0,94 \mu\text{M}$ ; po 4 val. lygi  $110,67 \pm 1,86 \mu\text{M}$ ) (13 pav.). Po 48 val. lansoprazolas sumažino ląstelių gyvybingumą iki 10 proc.



**13 pav.** Lansoprazolo citotoksinis poveikis MCF-7 ląstelėms.

Remiantis gautais duomenimis, tyrimams buvo pasirinkta  $100 \mu\text{M}$  lansoprazolo koncentracija, kuri nemažina ląstelių gyvybingumo 8 val. laikotarpyje (mūsų suplanuotų eksperimentų laikotarpiu).. Shangrong Zhang *et al.*, tirdami protonų siurblio inhibitorių citotoksinį poveikį MCF-7 ląstelėms, taip pat tyrimams pasirinko mažiau toksišką protonų siurblio inhibitorių koncentraciją [17].

Norint pasirinkti doksorubicino koncentracijas tolimesniems tyrimams, buvo nustatytas jo toksiškumas MCF-7 ląstelių linijai (14 pav.). Po 4 ir 8 val. inkubacijos su doksorubicinu, nenustatytas reikšmingas ląstelių gyvybingumo sumažėjimas,  $EC_{50}$  vertė išliko panaši (apie  $14 \mu\text{M}$ ), panašius rezultatus gavo ir kiti mokslininkai:  $12,90 \pm 1,90 \mu\text{M}$  [57]. Po 24 val. inkubacijos, ląstelių gyvybingumas sumažėjo 53,91 proc.  $EC_{50}$  atitinkamai yra  $7,50 \pm 0,35 \mu\text{M}$ , o po 48 val. koncentracija, reikalinga pusei maksimalaus atsako pasiekti, neviršijo  $0,50 \mu\text{M}$ . Kitų autorių duomenimis, doksorubicino  $EC_{50}$  po 48 val. svyruoja nuo  $0,50$  iki  $0,72 \mu\text{M}$  [17].



**14 pav.** Doksorubicino citotoksinis poveikis MCF-7 ląstelėms.

Apibendrinant galima teigti, kad doksorubicino ląstelių gyvybingumo slopinantis poveikis priklauso nuo inkubavimo laiko ir vaisto dozės, todėl atsižvelgiant į gautus tyrimų rezultatus, skvarbos tyrimams buvo pasirinkta 10 µM doksorubicino koncentracija. Kadangi naviko mikroaplinka yra sudėtinga sistema ir vaistas sunkiau prasiskverbia į naviko centrą, skvarbos tyrimams sferoiduose buvo pasirinkta 20 µM.

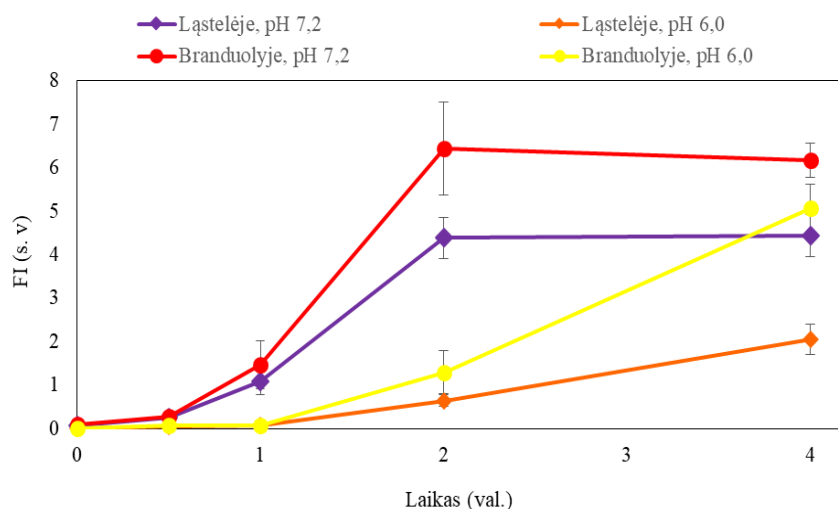
### 3.2. Doksorubicino ir PLD patekimas į ląsteles

Darydami prielaidą, kad PSI sustiprina doksorubicino citotoksiškumą ir padidina jo prasiskverbimą per daugiasluoksnes ląstelių membranas, pirmiausiai norėjome ištirti kaip skiriasi priešvėžinio vaisto patekimas į vėžines ląsteles skirtinguose pH be papildomų prasiskverbimą padidinančių junginių.

Atlikus tyrimus, nustatyta, kad didesnis doksorubicino kiekis patenka į MCF-7 ląstelės, kai mitybinės terpės pH yra 7,4, nei kuomet ląstelės yra kultivuojamos pH 6,0 (15 pav.). Gauti rezultatai atitinka teorines prielaidas, kad dauguma chemoterapinių vaistų, įskaitant doksorubiciną, rūgštinėje terpėje jonizuojasi, o tai trukdo jų gebėjimui praeiti membranos barjerą [74]. Remiantis Gerweck ir kitų mokslininkų tyrimų rezultatais, nedidelis intraląstelinio pH gradiento padidėjimas padidina silpnai bazinių vaistų pralaidumą [75].

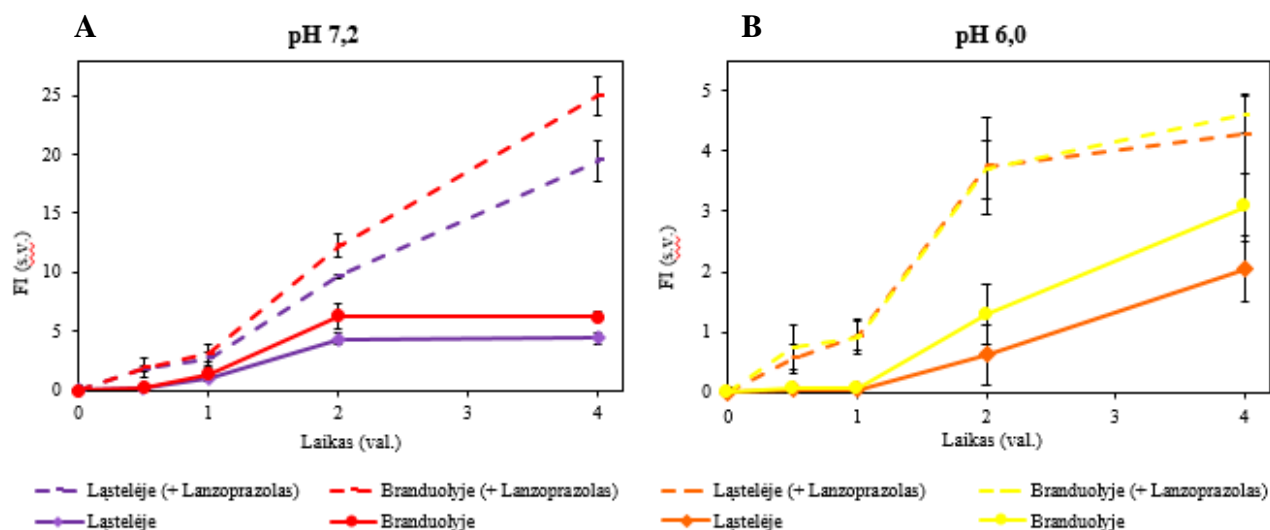
Svarbu ištirti tiriamojo junginio patekimą į MCF-7 krūties vėžio ląsteles priklausomai nuo laiko. Silpnai bazinėje terpėje (pH 7,2) doksorubicinas pasiekia didžiausią koncentraciją branduolyje per 2 val. (15 pav.), o vėliau jo kiekis reikšmingai nebekinta. Lee *et al.* tyrimai taip pat parodė, kad doksorubicinas pasižymėjo greitu įsiskverbimu per daugiasluoksnę ląstelių membraną ir po 2 valandų vaistas pasiekė plato fazę [10]. Tuo tarpu rūgštinėje terpėje (pH 6,0) doksorubicino patekimas tiek į branduolį, tiek į ląstelę reikšmingai didėja 4 val. inkubacijos laikotarpyje. Literatūros duomenimis, doksorubicinas lėčiau patenka į MCF-7 ląsteles rūgštinėje terpėje dėl to, kad pH intervale nuo 0 iki 6 doksorubicino amino grupė jonizuojasi, o tai slopina šio junginio prasiskverbimą tiek į ląstelės branduolį, tiek į visą ląstelę. Tai paaiškina, kodėl doksorubicino patekimas į ląsteles silpnai rūgštinėje terpėje yra prastesnis, lyginant su vaisto patekimu silpnai bazinėje terpėje. Vertinant doksorubicino pasiskirstymą ląstelėje ir branduolyje, vidutinė junginio koncentracija branduolyje yra didesnė, nei visoje ląstelėje. Inkubacijos metu doksorubicino kiekis branduolyje nuolat didėjo, o citoplazmoje nuolat mažėjo. Gauti rezultatai patvirtina literatūroje

pateiktą hipotezę, kad dokсорubicino pagrindinis taikynys ląstelėje – branduolys, dėl to fluorescencijos intensyvumas branduolyje kinta greičiau lyginant su fluorescencijos intensyvumo pokyčiu visoje ląstelėje.



15 pav. Dokсорubicino pateikimas į ląsteles ir branduolius priklausomai nuo pH.

Siekiant iširti lansoprazolas poveikį dokсорubicino skvarbai, prieš inkubaciją su dokсорubicinu MCF-7 ląstelės buvo inkubuotos 2 val su minėtu PSI. Tyrimo rezultatai parodė, kad tiek silpnai bazinėje terpėje (14 pav. A), tiek rūgštinėje terpėje (14 pav. B) dokсорubicino kiekis po 4 val. ląstelėse ir branduoliuose buvo 5 kartus didesnis nei kontrolinėje grupėje.

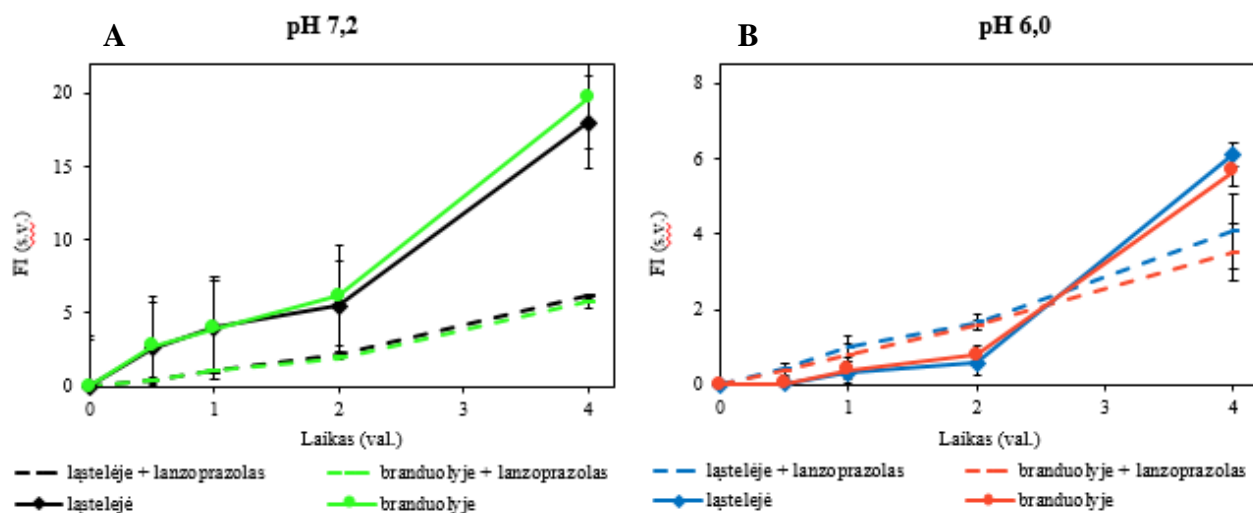


16 pav. Dokсорubicino kiekis branduolyje ir visoje ląstelėje skirtingo pH terpėse. A – tiriamųjų junginių skvarbos tyrimas pH 7,2; B – tiriamųjų junginių skvarbos tyrimas pH 6,0.

Panašius rezultatus gavo ir Yu M. ir kiti mokslininkai. Jie teigia, kad PSI, kuriems priklauso ir mūsų tiriamasis junginys lansoprazolas, gali padidinti endosominį pH, tokiu būdu pagerindami silpnai bazinių vaistų pasiskirstymą kietuosiuose navikuose ir veiksmingumą. Jų atliktų tyrimų metu buvo nustatyta, kad išankstinė inkubacija lansoprazolu žymiai padidina dokсорubicino patekimą į MCF-7 ląsteles, palyginus su ląstelėmis, kurios veikiamos tik dokсорubicinu. Mokslininkų gauti tyrimo

rezultatai sutapo su mūsų rezultatais, todėl galime daryti išvadą, kad lansoprazolas padidina doksorubicino skvarbą į MCF-7 ląsteles.

Tiriant PLD patekimą į ląsteles taip pat pastebėta, kad preparatas labiau prasiskverbė silpnai bazinėje terpėje (pH 7,2) (17 pav. A), tačiau lansoprazolas PLD patekimo į ląsteles nepadidino nei rūgštinėmis, nei silpnai bazinėmis sąlygomis, lyginant su kontroline grupe (17 pav.).



**17 pav.** PLD kiekis branduolyje ir visoje ląstelėje skirtinguose terpės pH kontrolinėje ir lansoprazolo grupėje. A – tiriamųjų junginių skvarbos tyrimas pH 7,2; B – tiriamųjų junginių skvarbos tyrimas pH 6,0.

Mokslininkų atliktų tyrimų duomenimis, mažos polietilenglikolio pagrindu pagamintos amfifilinės medžiagos padidina membranos paviršiaus hidrofiliškumą, sumažina opsonizaciją ir prailgina liposomų cirkuliacijos laiką, kuris padidina vaisto koncentraciją naviko viduje. Atsižvelgiant į mūsų gautus rezultatus, galima pateikti panašias išvadas: PLD svarba į MCF-7 ląsteles yra didesnė lyginant su laisvu doksorubicinu. Vertinant lansoprazolo įtaką PLD skvarbai į ląsteles, duomenų apie kitų mokslininkų atliktus panašius tyrimus nepavyko rasti. Tačiau remiantis išanalizuota literatūra, galima iškelti hipotezę, kad lansoprazolas nepadidina PLD skvarbos, dėl unikalių PLD savybių, kurios buvo paminėtos 1.2 skyriuje.

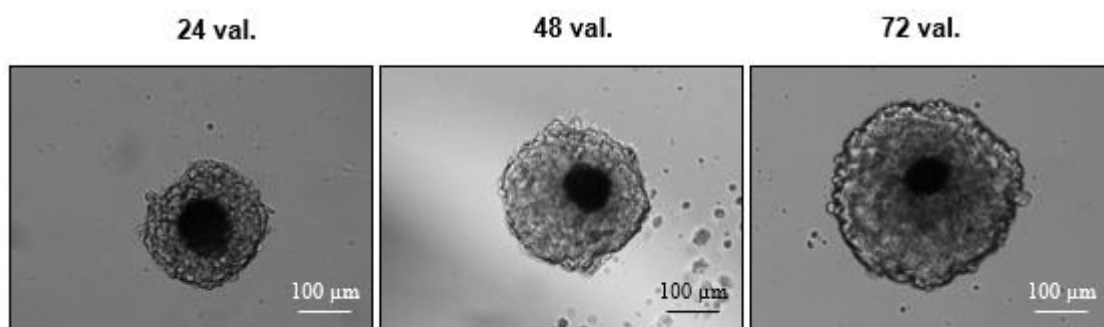
Apibendrinant galima teigti, kad protonų siurblio slopiklis lansoprazolas padidina doksorubicino patekimą į krūties vėžio linijos MCF-7 ląsteles ir rūgštinėje, ir silpnai bazinėje terpėje. Tačiau, lansoprazolas neturi įtakos doksorubicino pegiliuotos formos skvarbai į šias ląsteles.

### 3.3. Doksorubicino ir PLD pasiskirstymas sferoiduose

Dauguma vėžio biologijos tyrimų grindžiama eksperimentais, kuriuose naudojamos *in vitro* dvimatės ląstelių kultūros. Tačiau dvimačiame modelyje neaptinkama ląstelių ir ekstraląstelinės aplinkos sąveika. Dėl šio trūkumo atsiranda būtinybė atlikti tyrimus modelinėse sistemose, kurios labiau imituoja *in vivo* sąlygas. Vienas iš tokių modelių yra trimatė ląstelių kultūra – sferoidai [77]. Trimatis *in vitro* modelis yra tinkama priemonė įvertinti priešvėžinių vaistų patekimą į vėžines ląsteles [78]. Palyginus su monosluoksne kultūra, daugelio ląstelių sferoidų ląstelės yra panašios į ląsteles *in vivo* sąlygomis. Pastebėta, kad dideliuose ląstelių sferoiduose (> 200 μm skersmens) gali susiformuoti 3 skirtingi regionai iš heterogeninių ląstelių, pvz.: proliferuojančio periferinio regiono, gyvybingo, bet ramiojo tarpinio regiono, ir nekrozinio regiono. Taip pat įrodyta, kad trimačiai

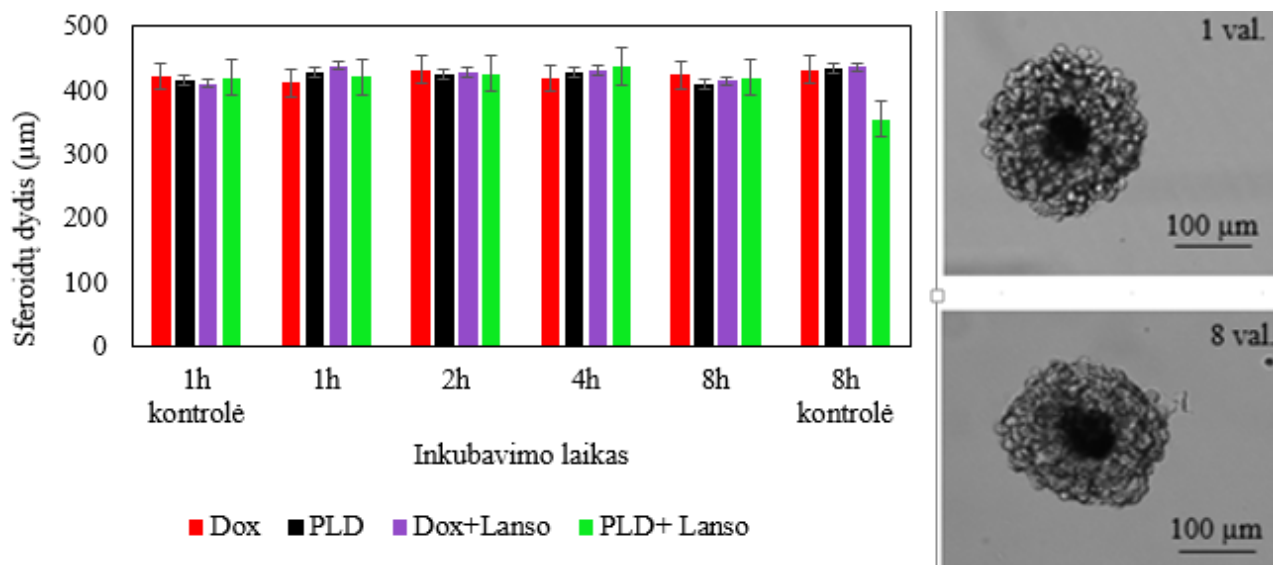
sferoidai yra paprastas ir lengvai atkuriamas modelis, kuris yra tinkamas tirti vaistų transportą [79]. Atsižvelgiant į visus trimačio modelio privalumus, buvo nuspręsta formuoti sferoidus 3D *Bioprinting* metodu, KV ląsteles maišant su žmogaus fibroblastais santykiu 1:1.

Tyrimams pasirinkome MCF-7 ląstelių sferoidus, kurie susiformuoja per 3 dienas nuo eksperimento pradžios. Jų skersmuo yra ~ 360 μm (18 pav.), todėl juose yra hipoksinės sąlygos, būdingos ir navikams. Praėjus ilgesniam inkubavimo laikotarpiui, stebimi sferoidų formos pokyčiai, dėl šios priežasties jie nebėra tinkami tyrimams.



**18 pav.** Ląstelių sferoidų formavimasis priklausomai nuo laiko.

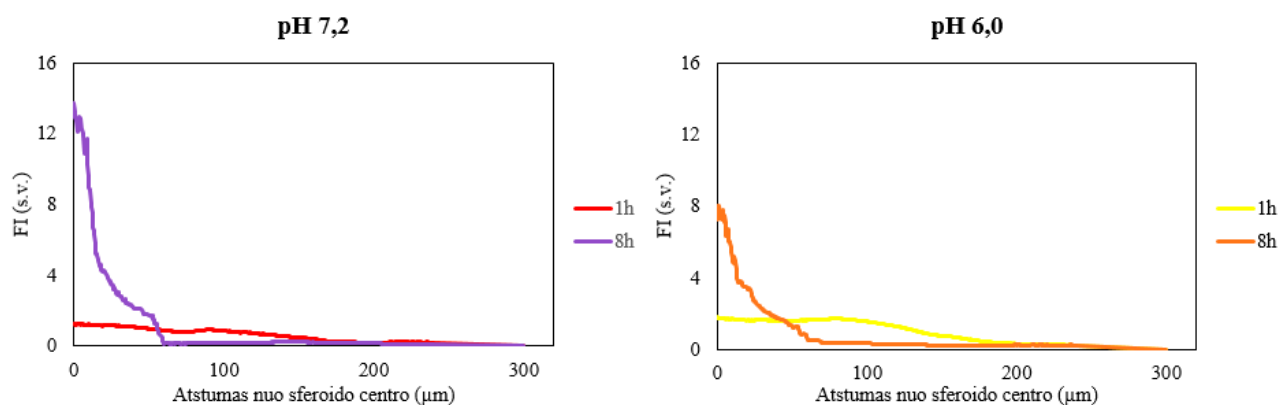
Siekiant įvertinti, ar tirtos medžiagos neturi toksinio poveikio sferoidams ir nekeičia jų dydžio, kas galėtų iškreipti medžiagų skvarbos tyrimo rezultatus, buvo įvertintas sferoidų dydis po inkubavimo su tirtomis medžiagomis skirtingais inkubavimo laikotarpiais (19 pav.). Nustatyta, kad skvarbos tyrimams naudojami tiriamieji junginiai neturėjo poveikio ląstelių sferoido dydžiui. Tai atitiko Baek N. *et al.* mokslininkų paskelbtus tyrimo rezultatus [78].



**19 pav.** Sferoidų dydžio pokyčiai priklausomai nuo sferoidų inkubavimo laiko su tiriamaisiais junginiais.  
n = 4

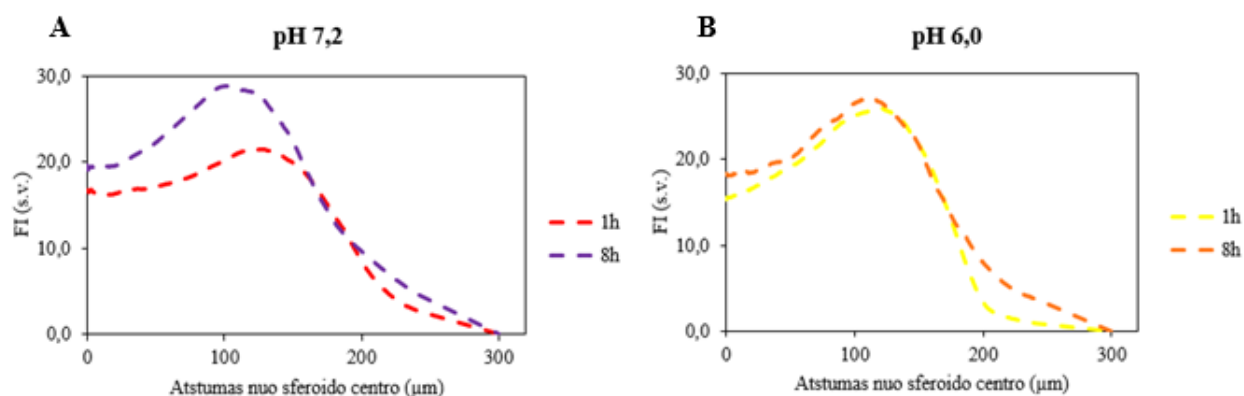
Vėžio fenotipinės zonos turi didelį poveikį naviko atsakui į gydymą. Gydymo atsparumas doksorubicinui dažnai yra siejamas su acidoze. Be to, pasikeitęs ląstelių metabolizmas (pastovūs deguonies ir maistinių medžiagų apribojimas) veikia terapinių junginių jautrumą, todėl tik tam tikros naviko zonos gali reaguoti į gydymą [79]. Panaši tendencija buvo pastebėta atlikus tyrimus

silpnai bazinėje ir rūgštinėse terpėse (atitinkamai pH 7,2 ir 6,0), kurios atitinka normalias sąlygas ir acidozę. Doksorubicino kiekis ląstelėje iš pradžių yra mažas ir vaistas labiau kaupiasi ląstelių pakraščiuose, o inkubuojant ilgiau jo kiekis ląstelėje didėja, vaistas labiau pradeda kauptis centrinėje sferoidų zonoje (20 pav.). Tannock *et al.* nustatė, kad doksorubicino pagrindu veikiančios chemoterapijos ciklai lemia nuoseklų ląstelių žudymą didėjančiais atstumais nuo naviko kraujagyslių link naviko centro [80]. Panaši tendencija pastebėta ir mūsų atliktuose tyrimuose.



20 pav. Doksorubicino pasiskirstymo profiliai sferoiduose.

Prieš inkubaciją su doksorubicinu ląsteles paveikus lansoprazolu, matomas didesnis fluorescencijos intensyvumas, o tai patvirtina dvimatėje kultūroje atliktų tyrimų rezultatus, kad PSI lansoprazolas sustiprina doksorubicino poveikį. Lansoprazolas tiek silpnai bazinėje, tiek rūgštinėje terpėje padidino doksorubicino patekimą į ląstelių sferoidus (20 pav.) Pagal gautus duomenis nustatyta, kad didžiausias fluorescencijos intensyvumas, kai pH 6,0, buvo pasiekiamas po 8 val. doksorubicinui nutolus 100 μm nuo sferoido centro (20 pav. B). Kitu atveju, kai terpės pH 7,0, didžiausias fluorescencijos intensyvumas stebimas po 8 val. doksorubicinui nutolus 80 μm nuo sferoido centro (21 pav. A).



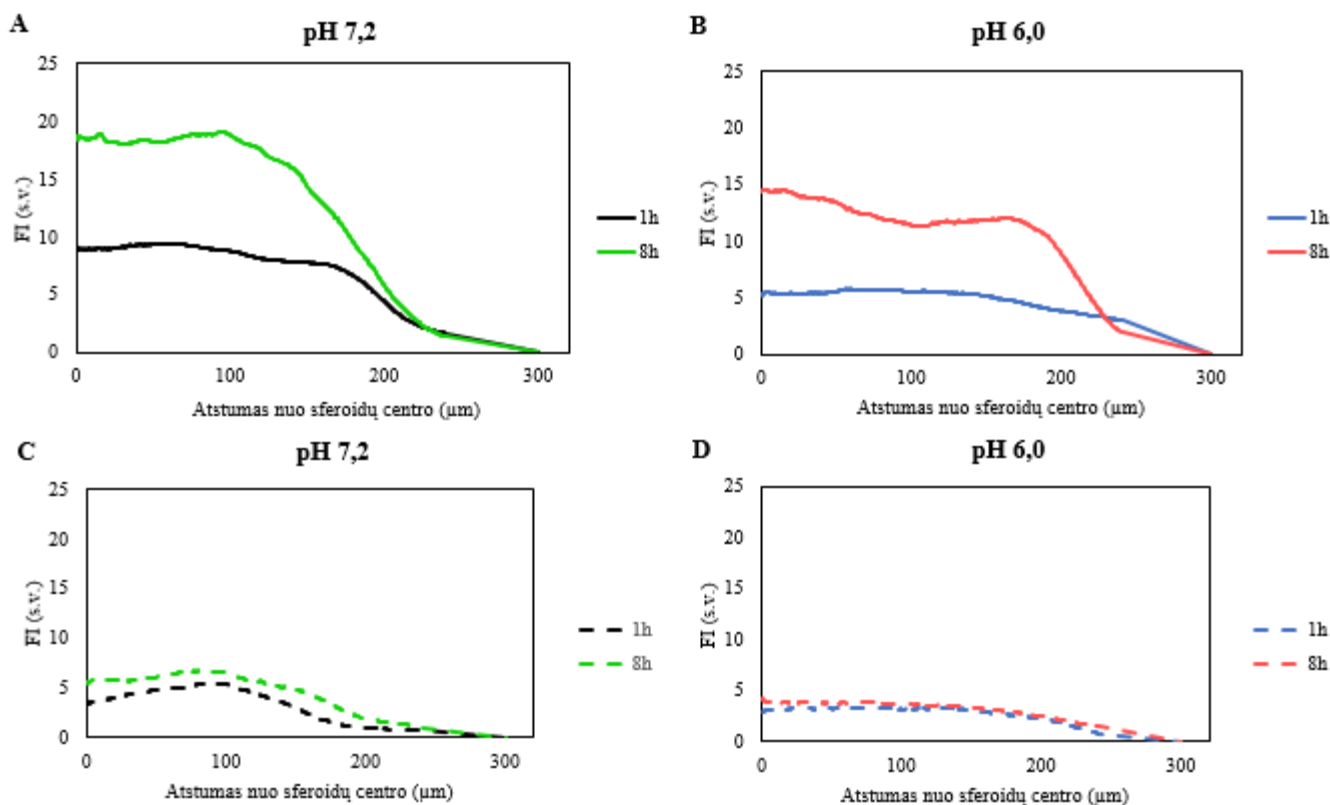
21 pav. Doksorubicino pasiskirstymas ląstelėje po inkubacijos su lansoprazolu. A – doksorubicino skvarbos tyrimas silpnai bazinėje terpėje po inkubacijos su lansoprazolu. B – doksorubicino skvarbos tyrimas silpnai rūgštinėje terpėje po inkubacijos su lansoprazolu.

Yu *et al.* plačiai tyrinėjo PSI poveikį silpnai bazinių vaistų patekimui į naviką. Jų rezultatai patvirtina koncepciją, kad išankstinis gydymas su lansoprazolu gali būti veiksminga strategija



siekiant padidinti kai kurių kietųjų navikų chemoterapijos efektyvumą [11]. Mūsų atlikti tyrimai taip pat patvirtina šią prielaidą, kad PSI padidina dokсорubicino prasiskverbimą ląstelių sferoiduose.

Įvertinus PLD fluorescencijos intensyvumą sferoido centre, nustatyta, kad po 8 val. inkubacijos PLD prasiskverbimas yra didžiausias silpnai bazinėje terpėje (22 pav. C). Atlikus tyrimus su PLD ir lansoprazolu, pastebėta sekanti tendencija, kad po inkubacijos su lansoprazolu PLD skvarba sumažėja tiek silpnai bazinėje, tiek rūgštinėje terpėse (22 pav. A, B) lyginant su kontroline grupe.



**22 pav.** PLD pasiskirstymo profiliai. A - kontrolė, pH 7,2; B - kontrolė, pH 6,0; C - PLD inkubuotas su lansoprazolu, pH 6,0; D - PLD inkubuotas su lansoprazolu, pH 7,2.

Apibendrinant galima teigti, kad dokсорubicino prasiskverbimas priklauso nuo inkubacijos laiko. Pirmiausiai jis kaupiasi ląstelių pakraščiuose, vėliau patenka į vėžinių ląstelių / naviko centrą. Lansoprazolas padidina dokсорubicino skvarbą tiek silpnai bazinėje, tiek rūgštinėje terpėse. Tuo tarpu PLD skvarba kietuosiuose navikuose yra stipresnė lyginant su įprastu dokсорubicinu. Lansoprazolas nepadidina PLD patekimo į sferoidus.

## Išvados

1. Doksorubicinas ir PLD į ląsteles patenka geriau silpnai bazinėje (pH 7,2) nei rūgštinėje (pH 6,0) terpėje ( $p < 0,05$ ).
2. Protonų siurblio slopiklis lansoprazolas padidina doksorubicino patekimą į krūties vėžio MCF-7 ląsteles ir rūgštinėje, ir silpnai bazinėje terpėje ( $p < 0,05$ ). Lansoprazolas neturi įtakos doksorubicino pegiliuotos formos skvarbai į šias ląsteles.
3. Doksorubicino ir PLD skvarba į sferoidus yra mažesnė rūgštinėje nei silpnai bazinėje terpėje ( $p < 0,05$ ).
4. Lansoprazolas padidina doksorubicino skvarbą ląstelių sferoiduose tiek silpnai bazinėje, tiek rūgštinėje terpėse, tačiau nepadidina PLD patekimo į sferoidus.

## Literatūros sąrašas

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. 2018: 236.
2. JASIONIENĖ G. ir ŠULČIŪTĖ R. Vėžys ir jo profilaktika. 2010. 1-4 p.
3. GUDAVIČIENĖ D., STEPONAVIČIENĖ L., LACHEJ N. Krūties vėžys Lietuvoje. 2015. 22:3. doi prieiga: 10.6001/actamedica.v22i3.3198
4. CANCER TRENDS PROGRESS REPORT NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer Trends Progress Report. 2018.
5. NADISAUSKIENE R., CIGRIEJIENE V. M., KAJENAS S. Chirurginis isplitusio epitelinio kiausidziu vezio gydymas. 2004. 1-11 p.
6. ŠUKYS R. Lietuvos respublikos sveikatos apsaugos ministras įsakymas dėl krūties piktybinio naviko ambulatorinio gydymo kompensuojamaisiais vaistais tvarkos aprašo patvirtinimo. 2011.
7. KAKLAMANI V. G., GRADISHAR W. J. Adjuvant Therapy of Breast Cancer. 2005. 548–560 p. doi prieiga:10.1080/07357900500202937
8. BY P. World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher Anticancer Drug Metabolism : Chemotherapy Resistance and New Therapeutic Approaches.
9. HORTOBAGYI G. N., Treatment of Breast Cancer. *NEJM*. 1998. 1-11 p.
10. PATEL K. J., LEE C., TAN Q. & TANNOCK I. F. Use of the proton pump inhibitor pantoprazole to modify the distribution and activity of doxorubicin : a potential strategy to improve the therapy of solid tumors. 2013. doi prieiga:10.1158/1078-0432.ccr-13-0128
11. YU M., LEE C., WANG M. & TANNOCK, I. F. Influence of the proton pump inhibitor lansoprazole on distribution and activity of doxorubicin in solid tumors. *Cancer Sci*. 2015. 106: 1438–1447 p.
12. JANCZEWSKA I & SAGER M. Comparison of the effect of lansoprazole and omeprazole on intragastric acidity and gastroesophageal reflux in patients with gastroesophageal reflux disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1999. 33. 1239-43 p.
13. CROCE C. M. Oncogenes and Cancer. 2008.
14. HANAHAN D., WEINBERG R. A. & FRANCISCO S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. 2000. 100: 57–70 p.
15. CANCER RESEARCH UK. Stages of Cancer. 2014. 1–4 p.
16. HOLLIDAY D.L, SPEIRS V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011.13: 215. PMID:21884641
17. LIU L.L, ZHAO H, MA T-F, GE F, CHEN C-S, ZHANG Y-P. Identification of Valid Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Expression Studies in Human Breast Cancer Cell Lines Treated with and without Transient Transfection. 2015. 10.
18. MULLUR R. LIU Y. BRENT GREGORY A. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiological Reviews*. 2014. 94: 355–382 p. doi prieiga:10.1152/physrev.00030.2013.

19. SHOMAF M, MASAD J. & NAJJAR S. Distribution of breast cancer subtypes among Jordanian women and correlation with histopathological grade: molecular subclassification study. *JRSM short reports*. 2013. doi prieveiga: 10.1177/2042533313490516.
20. DAI X, LI T, BAI Z, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015. 5(10):2929–2943.
21. SHIRAZI FH. Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds. In: Breast Cancer – Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells and Metastasis. *InTech*. 2011. 85-102.
22. GEST C, JOIMEL U, HUANG L, PRITCHARD LL, PETIT A, DULONG C, BUQUET C, HU CQ, MIRSHAHI P, LAUREN M, FAUVEL-LAFÈVE F, CAZIN L, VANNIER JP, LU H, SORIA J, LI H, VARIN R, SORIA C. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2013;13: 63.
23. HADDAD, TUFIA & J. MOYNIHAN TIMOTHY. Breast Cancer. 2016.
24. LUCIANI F, SPADA M, DE MILITO A, MOLINARI A, RIVOLTINI L, MONTINARO A, ET AL. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst*. 2004. 96:1702–13.
25. AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS. Lansoprazole Monograph for Professionals.
26. YU M, LEE C, WANG M, TANNOCK IF. Influence of the proton pump inhibitor lansoprazole on distribution and activity of doxorubicin in solid tumors. *Cancer Sci*. 2015;106(10):1438-47.
27. RAGHUNAND N, GILLIES RJ. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updates* 2002. 3:39–47.
28. AU JL, JANG SH, WIENTJES MG. Clinical aspects of drug delivery to tumors. *J Control Release*. 2002. 81-95.
29. GRANTAB R, SIVANANTHAN S, TANNOCK IF. The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells, *Cancer Res* , 2006, vol. 66 (pg. 1033-9)
30. KYLE AH, HUXHAM LA, CHIAM AS, SIM DH, MINCHINTON AI. Direct assessment of drug penetration into tissue using a novel application of three-dimensional cell culture, *Cancer Res* , 2004, vol. 64 (pg. 6304-9)
31. KIM JJ, TANNOCK IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure, *Nat Rev Cancer* , 2005, vol. 5 (pg. 516-25)
32. ARCAMONE F, FRANCESCHI G, PENCO S, SELVIA A. Adriamycin 14hydroxydaunomycin: a novel antitumor antibiotic. *Tetrahedron Lett* 1969;13:1007–16.
33. LOMOVSKAYA N, OTTEN SL, DOI-KATAYAMA Y, et al. (1999). "Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the dnrU ketoreductase and dnrV genes and the doxA cytochrome P-450 hydroxylase gene". *J. Bacteriol*. 181 (1): 305–18. PMC 103563. PMID 9864344.

34. MOHAN P, RAPOPORT N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. *Mol Pharm*. 2010;7(6):1959–1973. doi:10.1021/mp100269f
35. THORN CF, OSHIRO C, MARSH S, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011. 21(7):440–446.
36. CIGREMIS Y, PARLAKPINAR H, POLAT A, COLAC C, OZTURK F, SAHNA E, et al. Beneficial role of aminoguanidine on acute cardiomyopathyrelated to doxorubicin-treatment. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 10: 1007–11010.
37. WILKINSON, P. and MAWER, G. The persistence of adriamycin in man and rat. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1974. 1: 241-247.
38. SAEED S. AL-GHAMDI, Time and Dose Dependent Study of Doxorubicin Induced DU-145 Cytotoxicity. *Drug Metabolism Letters* (2008) 2: 47.
39. OLIVIER TRÉDAN, CARLOS M. GALMARINI, KRUPA PATEL, IAN F. TANNOCK, Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 99, Issue 19, 3 October 2007, Pages 1441–1454
40. WOJTKOWIAK JW, VERDUZCO D, SCHRAMM KJ, GILLIES RJ. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol Pharm*. 2011;8(6):2032–2038. doi:10.1021/mp200292c
41. ANN L.B. SEYNHAEVE, BILYANA M. DICHEVA, SASKE HOVING, GERBEN A. KONING, TIMO L.M. Intact Doxil is taken up intracellularly and released doxorubicin sequesters in the lysosome: Evaluated by in vitro/in vivo live cell imaging, *Journal of Controlled Release*, Volume 172, Issue 1, 2013, Pages 330-340, ISSN 0168-3659.
42. HORTOBDGYI, G. N. Anthracyclines in the Treatment of Cancer An Overview. *Drugs* 54, 1–7 (1997).
43. GABIZON, A. A. Pegylated Liposomal Doxorubicin : Metamorphosis of an Old Drug into a New Form of Chemotherapy. 19, 424–436 (2001).
44. O'BRIEN ME, WIGLER N, INBAR M et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (Caelyx/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2004; 15 (3): 440-9
45. PLACE, A. E., JIN HUH, S. & POLYAK, K. The microenvironment in breast cancer progression: Biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res*. 13, (2011).
46. FANG, J. S., GILLIES, R. D. & GATENBY, R. A. Seminars in Cancer Biology Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. 18, 330–337 (2008).
47. M.S. O'REILLY, L. HOLMGREN, C. CHEN, J. FOLKMAN, Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice, *Nat. Med*. 2 (1996) 689–692.
48. SEAGROVES, T. N. ET AL. Transcription Factor HIF-1 Is a Necessary Mediator of the Pasteur Effect in Mammalian Cells. 21, 3436–3444 (2001).
49. SEMENZA, G. L. Tumor metabolism : cancer cells give and take lactate Find the latest version : Tumor metabolism : cancer cells give and take lactate. 118, 3835–3837 (2008).

50. FAIS S, DE MILITO A, YOU H, QIN W. Targeting vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Res.* 2007;67:10627–30.
51. OLIVIER TRÉDAN, CARLOS M. GALMARINI, KRUPA PATEL, IAN F. TANNOCK, Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 99, Issue 19, 3 October 2007, Pages 1441–1454
52. KENNEDY KM, DEWHIRST MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol.* 2010;6:127–48.
53. HINTON A, BOND S, FORGAC M. V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflugers Arch.* 2009;457:589–98.
54. YU M, LEE C, WANG M, TANNOCK IF. Influence of the proton pump inhibitor lansoprazole on distribution and activity of doxorubicin in solid tumors. *Cancer Sci.* 2015;106(10):1438–47.
55. M.MARKMAN. Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of cancers of the breast and ovary. 2006 m.. 1469–1474.
56. GABIZON, A.; MARTIN, F. Polyethylene-Glycol-Coated(Pegylated) Liposomal Doxorubicin- Rationale for Use in Solid Tumors. *Drugs* 1997, 54 (suppl 4), 15–21.
57. ÖZLEM S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World. *IntechOpen*. 2017. doi prieiga: 10.5772/intechopen.71923
58. MOSMANN, TIM. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods*. 65 (1–2): 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4. ISSN 0022-1759. PMID 6606682.
59. VOLZ P, BOREHAM A, WOLF A, ET AL. Application of single molecule fluorescence microscopy to characterize the penetration of a large amphiphilic molecule in the stratum corneum of human skin. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):6960–6977. Published 2015 Mar 27. doi:10.3390/ijms16046960
60. CHANDLER, J. G., BRANDON, R. L. & FRIHART, C. R. Examination Of Adhesive Penetration In Modified Wood Using.
61. SPRING KR, DAVIDSON MW. "Introduction to Fluorescence Microscopy". Nikon MicroscopyU. Retrieved 28 September 2008.
62. COLE M. What Are the Advantages & Disadvantages of Flow Cytometry?. 2018.
63. BAKER B, CHEN CS. Deconstructing the third dimension: how trimaté culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci.* 2012;125:3015–3024.
64. FRIEDRICH J, SEIDEL C, EBNER R, KUNZ-SCHUGHART LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols.* 2009;4:309–324.
65. WANG C, TANG Z, ZHAO Y, YAO R, LI L, SUN W. Three-dimensional in vitro cancer models: a short review. *Biofabrication.* 2014;6

66. FANG Y, EGLIN RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov.* 2017;22(5):456–472. doi:10.1177/1087057117696795
67. EKERT J, JOHNSON K, STRAKE B, PARDINAS J, JARANTOW S, PERKINSON R, COLTER DC. Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro—implication for drug development. *PLoS One.* 2014;9
68. STOCKERT JC, HOROBIN RW, COLOMBO LL, AND BLÁZQUEZ-CASTRO A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica* 120: 159-167 (2018).doi:10.1016/j.acthis.2018.02.005
69. CHAIKOMON K, CHATTONG S, CHAIYA T, ET AL. Doxorubicin-conjugated dexamethasone induced MCF-7 apoptosis without entering the nucleus and able to overcome MDR-1-induced resistance. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:2361–2369. Published 2018 Aug 1. doi:10.2147/DDDT.S168588
70. BIRGERSDOTTER A., SANDBERG R., ERNBERG I. Gene Expression Perturbation In Vitro: A Growing Case for Three-Dimensional (trimatè) Culture Systems. *Semin. Cancer Biol.* 2005, 15, 405–412.
71. KHADEMHOSEINI A., LANGER R., BORENSTEIN J., et al. Microscale Technologies for Tissue Engineering and Biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103, 2480–2487.
72. HUH D., HAMILTON G. A., INGBER D. E. From trimatè Cell Culture to Organs-on-Chips. *Trends Cell Biol.* 2011, 21, 745–754.
73. WENZEL C, RIEFKE B, GRÜNDEMANN S, KREBS A, CHRISTIAN S, PRINZ F, OSTERLAND M, GOLFIER S RÄSE S, ANSARI N, ESNER M, BICKLE M, PAMPALONI F, MATTHEYER C, STELZER EH, PARCZYK K, PRECHTL S, STEIGEMANN P. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res.* 2014;323:131–143.
74. YIP D, CHO CH. A multicellular trimatè heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;433:327–332.
75. TSENG, H., GAGE, J.A., DESAI, P.K., HAISLER, W.L., SHAH, J., LI, W., AND SOUZA, G.R. Luminescent Viability Assays in Magnetically Bioprinted 3D Cultures. Tannock I. Cell kinetics and chemotherapy: a critical review, *Cancer Treat Rep*, 1978, vol. 62 (pg. 1117-33)
76. SINGH, DEEPTI; THOMAS, DANIEL (2018-05-18). "Advances in medical polymer technology towards the panacea of complex trimatè tissue and organ manufacture". *American Journal of Surgery.* 217 (4): 807–808.
77. HINTON TJ, JALLERAT Q, PALCHESKO RN, PARK JH, GRODZICKI MS, SHUE HJ, RAMADAN MH, HUDSON AR, FEINBERG AW (23 October 2015). "Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels". *Science Advances.* 1 (9): e1500758. doi:10.1126/sciadv.1500758. PMC 4646826. PMID 26601312.
78. BAEK N, SEO OW, KIM M, HULME J, AN SS. Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time. *Onco Targets Ther.* 2016;9:7207–7218. Published 2016 Nov 22. doi:10.2147/OTT.S112566

79. LEE, J., NA, K., SONG, S., LEE, J., & KUH, H. (2012). The distribution and retention of paclitaxel and doxorubicin in multicellular layer cultures. *Oncology Reports*, 27, 995-1002. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1650>
80. MINCHINTON AI, TANNOCK IF. Drug penetration in solid tumours, *Nat Rev Cancer* , 2006, vol. 6 (pg. 583-92)



## **Priedai**

### **1 Padėka**

Dėkoju mokslinei vadovei prof. dr. Vilmai Petrikaitei už suteiktas darbo sąlygas, kantrybę, neišsekančias žinias bei pagalbą vykdant eksperimentus ir rašant baigiamąjį darbą. Taip pat dėkoju prof. Arvydui Ūsui už galimybę naudotis reikiama įranga bei dokt. Miglei Paškevičiūtei ir dokt. Indrei Januškevičienei už suteiktą pagalbą tyrimuose.

## 2 Darbo rezultatų pristatymas

1. Šio darbo pagrindiniai rezultatai pristatyti tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „Science and Practice 2018“, vykusioje 2018 m. lapkričio 9 d. Pristatytas žodinis pranešimas: Elžbieta Maconko, Vilma Petrikaitė „*Effect of different pH on doxorubicin penetration into MCF-7 breast cancer cells*“.
2. Darbo rezultatai pristatyti „Mokslo ir inovacijų savaitės 2019: Sveikata visiems“ metu vykusioje jaunųjų mokslininkų ir tyrėjų konferencijoje fundamentalieji mokslai sekcijoje. Pristatytas žodinis pranešimas: Elžbieta Maconko, Vilma Petrikaitė „*Protonų siurblio slopiklio lansoprazoo įtaka doksorubicino ir jo pegiliuotos formos skvarbai į krūties vėžio ląsteles*“.

