



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Sunitinibo analogų priešvėžinio aktyvumo krūties vėžio ląstelių kultūrose įvertinimas

Baigiamasis magistro projektas

Laura Škarnulytė

Projekto autorė

Prof. dr. Vilma Petrikaitė

Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Farmacijos fakultetas

Sunitinibo analogų priešvėžinio aktyvumo krūties vėžio ląstelių kultūrose įvertinimas

Baigiamasis magistro projektas

Medicininė chemija (6281CX001)

Laura Škarnulytė

Projekto autorė

Prof. dr. Vilma Petrikaitė

Vadovė

Prof. dr. Nijolė Savickienė

Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Laura Škarnulytė

Sunitinibo analogų priešvėžinio aktyvumo krūties vėžio ląstelių kultūrose įvertinimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Lauros Škarnulytės, baigiamasis projektas tema „Sunitinibo analogų priešvėžinio aktyvumo krūties vėžio ląstelių kultūrose 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)

Škarnulytė, Laura. Sunitinibo analogų priešvėžinio aktyvumo krūties vėžio ląstelių kultūrose įvertinimas. Baigiamasis magistro projektas / prof. dr., Vilma Petrikaitė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų kryptių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: krūties vėžys, MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, kinazių slopikliai, taikinių terapija, sunitinibas.

Kaunas, 2019. 51 p.

Santrauka

Darbo tikslas – įvertinti sunitinibo analogų priešvėžinį aktyvumą žmogaus krūties vėžio ląstelių kultūrose.

Darbo uždaviniai:

1. ištirti sunitinibo analogų poveikį žmogaus krūties vėžio ląstelių gyvybingumui,
2. išanalizuoti sunitinibo analogų poveikį žmogaus krūties vėžio ląstelių kamieniškumui,
3. nustatyti sunitinibo analogų sukeliama žmogaus krūties vėžio ląstelių žūties būdą,
4. ištirti sunitinibo analogų aktyvumą žmogaus krūties vėžio ląstelių trimatėse kultūrose (sferoiduose).

Tyrimo objektas – septyniolika naujų sunitinibo analogų, susintetintų Cagliari universitete (Italijoje) ir klinikinėje praktikoje vartojamas sunitinibas.

Metodai. Citotoksinis junginių aktyvumas buvo ištirtas trims krūties vėžio ląstelių linijoms: MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 ir nevėžinėms krūties epitelio ląstelėms – fibroblastams. Iš pradžių kiekvienai tiriamai ląstelių linijai buvo atrinkti tie junginiai, kurie labiausiai slopino ląstelių gyvybingumą. Sunitinibo analogų poveikis ląstelių gyvybingumui buvo nustatytas MTT redukcijos metodu. Vėliau buvo tiriamas aktyviausių junginių poveikis kamieniškumui, įvertinant, kaip ląstelės geba suformuoti kolonijas. Junginių sukeliamas ląstelių žūties būdas nustatytas fluorescencinės mikroskopijos metodu, taikant dvigubą dažymą propidžio jodidu ir Hoechst 33342. Ląstelių sferoidai (trimatės kultūros) buvo gaminami 3D *Bioprinting* metodu. Nuotraukos analizuotos ImageJ programa. Gauti duomenys apdoroti Microsoft Office Excel 2016 programa, apskaičiuojant trijų nepriklausomų eksperimentų metu gautų rezultatų vidurkius ir santykinius nuokrypius. Vidurkiai buvo palyginti naudojant Student'o *t* kriterijų, o skirtumai laikomu statistiškai patikimais, kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

Rezultatai. Sunitinibo analogai pasižymėjo didesniu priešvėžiniu aktyvumu nei šiuo metu praktikoje vartojamas vaistas sunitinibas. Didžiausiu priešvėžiniu aktyvumu visoms trims krūties vėžio ląstelių linijoms pasižymėjo junginys 1 (EC_{50} vertė MDA-MB-231, MCF-7 ir BT-474 ląstelių linijose atitinkamai lygi $69,3 \pm 7,6$; $73,3 \pm 9,9$; $94,3 \pm 5,1$ nM; $p < 0,05$). MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumą taip pat stipriai slopino junginys 6 ($258,3 \pm 23,2$ nM; $p < 0,05$). Junginiai fibroblastų gyvybingumui turėjo mažesnę poveikį nei vėžinėms ląstelėms, išskyrus junginį 7. Junginys 8 taip pat labiau veikė fibroblastus, nei MCF-7 ląstelių liniją.

Sunitinibo analogai slopino MCF-7 ir BT-474 ląstelių kolonijų formavimąsi. Didžiausią poveikį MCF-7 ląstelių kamieniškumui turėjo junginys 17 (kolonijų skaičius sumažėjo iki 32,2 proc., o plotas – 22,4 proc.), BT-474 kolonijų formavimąsi labiausiai mažino junginys 1 (iki 25,5 proc.).

MDA-MB-231 ląstelių linijai tik nedideliame skaičiui ląstelių sunitinibo analogai sukėlė ląstelių apoptozę bei nekrozę. MCF-7 ląstelių linijos nekrozei nepastebėtas reikšmingas poveikis, o apoptozę sukėlė junginiai 7 ir 8. BT-474 ląstelių apoptozę sukėlė tik junginio 1 didžiausia koncentracija (90 proc. nuo EC_{50} vertės), o nekrozę – junginio 1 ir 9 didžiausia naudota koncentracija.

MDA-MB-231 ir BT-474 ląstelių trimatės kultūros buvo mažiau jautrios SNT analogams nei dvimatės kultūros. MDA-MB-231 sferoidų augimą slopino junginiai 7 ir 17, o BT-474 – junginys 9.

Išvados. Šeši iš septyniolikos tirtų sunitinibo analogų pasižymi priešvėžiniu aktyvumu prieš MDA-MB-231, MCF-7 ir BT-474 krūties vėžio ląstelių linijas ir daugelis jų aktyvesni už sunitinibą. Junginiai slopina ląstelių gyvybingumą, kamieniškumą, sukelia apoptozę ir nekrozę, slopina sferoidų augimą, todėl yra perspektyvūs tolimesniems tyrimams.

Škarnulytė, Laura. Evaluation of Anticancer Activity of Sunitinib Analogues in Breast Cancer Cell Cultures. Master's Final Degree Project / prof. dr., Vilma Petrikaitė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Science.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: breast cancer, MDA-MB-231, MCF-7, BT-474, kinase inhibitors, target therapy, sunitinib.

Kaunas, 2019. 51 pages.

Summary

The aim of the study was to evaluate the anticancer activity of sunitinib analogues in human breast cancer cell cultures.

Work tasks:

1. To study the effect of sunitinib analogues on the viability of human breast cancer cells;
2. To analyse the effect of sunitinib analogues on the human breast cancer cell clonogenicity;
3. To determine the method of death of human breast cancer cells caused by sunitinib analogues;
4. To study the activity of sunitinib analogues in three-dimensional cultures (spheroids) of human breast cancer cells.

The object of the study is seventeen new analogues of sunitinib synthesized at Cagliari University (Italy) and sunitinib used in the clinical practice.

Methods. The cytotoxic activity of the compounds was investigated in three breast cancer cell lines: MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 and non-cancerous cells – fibroblasts. Initially, the compounds that most inhibited cell viability were selected for each cell line under investigation. The effect of sunitinib analogues on cell viability was determined by the MTT assay. Subsequently, the effect of the most active compounds on cell clonogenicity was investigated, assessing how cells are able to form colonies. The method of cell death caused by the compounds was determined by fluorescence microscopy using double staining with Propidium Iodide and Hoechst 33342. Cell spheroids (three-dimensional culture) were produced by 3D Bioprinting method. Photos were analysed by the ImageJ program. The data were processed by Microsoft Office Excel 2016 calculating the mean and standard deviations of the results obtained in three independent experiments. The averages were compared using Student's t criterion, and differences were considered statistically significant when the significance level $p < 0.05$.

Results. Sunitinib analogues possessed higher anticancer activity than the drug sunitinib that was used in clinics. Compound 1 showed the highest anticancer activity against all three breast cancer cell lines (EC_{50} value for MDA-MB-231, MCF-7 and BT-474 cell line was 69.3 ± 7.6 ; 73.3 ± 9.9 ; 94.3 ± 5.1 nM respectively; $p < 0.05$). The viability of MDA-MB-231 cells was also strongly inhibited by compound 6 (258.3 ± 23.2 nM; $p < 0.05$). The compounds possessed lower activity against fibroblasts compared to cancer cells, except compound 7. Compound 8 also had a greater effect on fibroblast viability than MCF-7 cell line.

Sunitinib analogues inhibited the formation of MCF-7 and BT-474 cell colonies. Compound 17 had the greatest effect on MCF-7 stem cell proliferation (the number of colonies decreased to 32.2 % and the area decreased by 22.4 %), the formation of BT-474 colonies was mostly reduced by compound 1 (up to 25.5 %).

For only a small number of cells of the MDA-MB-231 cell line, analogues of sunitinib induced cell apoptosis and necrosis. No significant effect was observed on the necrosis of the MCF-7 cell line and apoptosis was induced by compounds 7 and 8. The apoptosis of BT-474 cells was caused only by the maximum used concentration of compound 1 (90 % of the EC_{50} value) and necrosis by the maximum concentration of compound 1 and compound 9.

The three-dimensional cultures of MDA-MB-231 and BT-474 cells were less sensitive to SNT analogues than two-dimensional culture. The growth of MDA-MB-231 spheroids was inhibited by compounds 7 and 17, and BT-474 by compound 9.

Conclusion. Six of seventeen studied sunitinib analogues have the antitumor activity against MDA-MB-231, MCF-7 and BT-474 breast cancer cell lines and many of them are more active than sunitinib. The compounds inhibit the cell viability, colony formation and cause apoptosis and necrosis, also inhibit the spheroid growth, that is why they are perspective for a further research.

Turinys

Lentelių sąrašas	7
Paveikslų sąrašas	8
Santrumpų ir terminų sąrašas	9
Įvadas.....	10
Darbo tikslas ir uždaviniai.....	11
1. Literatūros apžvalga.....	12
1.1. Sergamumas ir mirtingumas nuo krūties vėžio	12
1.2. Krūties vėžio potipiai ir gydymo problematika.....	13
1.3. Naujų priešvėžinių vaistų poreikis	16
1.4. Kinazių apibūdinimas ir jų rūšys.....	17
1.5. Kinazių slopiklių veikimo principas.....	19
1.6. Kinazių slopiklių priešvėžinis aktyvumas ir pritaikymas klinikinėje praktikoje	20
1.7. Pasirinktų metodų apibūdinimas	23
2. Tyrimo metodika	26
2.1. Tyrimo objektas.....	26
2.2. Reagentai, priemonės ir aparatūra	26
2.3. Tyrimo metodikos	27
2.3.1. Ląstelių kultūrų auginimas	27
2.3.2. Poveikio ląstelių gyvybingumui nustatymas	27
2.3.3. Poveikio ląstelių kamieniškumui nustatymas.....	28
2.3.4. Ląstelių žūties būdo nustatymas.....	28
2.3.5. Poveikio ląstelių sferoidams tyrimas.....	29
2.3.6. Statistinis duomenų įvertinimas	29
3. Rezultatai ir jų aptarimas	30
3.1. Sunitinibo analogų poveikis krūties vėžio ląstelių gyvybingumui.....	30
3.2. Sunitinibo analogų poveikis krūties vėžio ląstelių kamieniškumui	34
3.3. Sunitinibo analogų sukeltas ląstelių žūties būdas.....	36
3.4. Sunitinibo analogų poveikis vėžio ląstelių sferoidams	39
Išvados.....	43
Literatūros sąrašas	44
Priedai.....	48
1 priedas. Sertifikatas ir diplomas, patvirtinantis dalyvavimą tarptautinėje konferencijoje „Science and Practice 2018“	48
2 priedas. Sertifikatas, patvirtinantis dalyvavimą Jaunųjų mokslininkų ir tyrėjų konferencijoje	50
3 priedas. Straipsnis „Investigating the Anticancer Activity of Isarin/Dihydropyrazole Hybrids“	51

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Krūties vėžinių ląstelių molekulinė klasifikacija.....	14
---	----

Paveikslų sąrašas

1 pav. Diagnozuotų vėžio atvejų skaičius moterims Jungtinėse Amerikos Valstijose.....	12
2 pav. Mirčių pasiskirstymas tarp 10 dažniausiai pasitaikančių vėžių moterims 2018 m. pasaulyje.13	
3 pav. Tirtos vėžio ląstelių linijos.....	15
4 pav. Tradicinės chemoterapijos mechanizmas	16
5 pav. Taikinių terapijos molekuliniai taikiniai.....	17
6 pav. Kinazės katalizinio domeno struktūra	18
7 pav. Epidermio augimo faktoriaus receptorių signalo perdavimo būdai.....	20
8 pav. Patvirtinti kinazių slopikliai.....	21
9 pav. SNT veikimo mechanizmas endotelio ląstelėse, išreiškiančiose VEGFR.....	22
10 pav. MTT redukcija	23
11 pav. Sferoidų formavimas 3D <i>Bioprinting</i> metodu	24
12 pav. Šiame darbe tirtų SNT analogų struktūrinės formulės.....	26
13 pav. SNT struktūrinė formulė.....	26
14 pav. Junginių aktyvumas MDA-MB-231 ląstelių linijai	30
15 pav. Junginių aktyvumas MCF-7 ląstelių linijai.....	30
16 pav. Junginių aktyvumas BT-474 ląstelių linijai	31
17 pav. Junginių aktyvumas HF ląstelių linijai	31
18 pav. Junginių selektyvumas vėžinėms ląstelėms, lyginant su poveikiu HF	32
19 pav. Aktyviausių junginių ir SNT EC_{50} verčių palyginimas tarp tirtų vėžinių ląstelių linijų.....	33
20 pav. SNT analogų ir SNT poveikis MDA-MB-231 kolonijų formavimui	34
21 pav. SNT analogų ir SNT poveikis MCF-7 kolonijų formavimui.....	34
22 pav. SNT analogų ir SNT poveikis BT-474 kolonijų formavimui.....	35
23 pav. Junginio 1 gebėjimas slopinti MCF-7 ląstelių linijos kamieniškumą.....	35
24 pav. Apoptozinių ir nekrozinių MDA-MB-231 ląstelių kiekis paveikus SNT analogais ir SNT ..	36
25 pav. Apoptozinių ir nekrozinių MCF-7 ląstelių kiekis paveikus SNT analogais ir SNT	37
26 pav. Apoptozinių ir nekrozinių BT-474 ląstelių kiekis paveikus SNT analogais ir SNT	38
27 pav. MDA-MB-231 sferoidų dydžio kitimas inkubuojant su SNT analogais ir SNT	39
28 pav. MDA-MB-231 ląstelių linijos sferoidai prieš ir po inkubacijos su junginiu 7	39
29 pav. MCF-7 sferoidų dydžio kitimas inkubuojant su SNT analogais ir SNT.....	42
30 pav. BT-474 sferoidų dydžio kitimas inkubuojant su SNT analogais ir	42

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

ABL – Abelsono pelių leukemijos virusinio onkogeno homologas;

ALK – anaplastinės limfomos kinazė;

ATCC – Amerikos ląstelių kultūrų kolekcija (angl. *American Type Culture Collection*);

ATP – adenozin-5'-trifosfatas;

BCR – lūžio taško klasterio regionas;

CDK – nuo ciklinų priklausomos kinazės;

DMEM – *Dulbecco'o* modifikuota *Eagle* mitybinė terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*);

DMSO – dimetilsulfoksidas;

EC₅₀ – efektyvioji koncentracija (tai yra koncentracija, sukianti 50 proc. laukiamo atsako);

EGFR – epidermio augimo faktoriaus receptorius;

EML4 – echinoderminės mikrotubulės su panašiu baltymu 4;

ER – estrogeno receptorius;

FBS – fetalinis veršiukų serumas (angl. *fetal bovine serum*);

HER2 - žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2;

HF – žmogaus fibroblastai;

HSP – šiluminio šoko baltymas;

MEK – mitogeno aktyvuota baltymų kinazė;

MMP – matrikso metaloproteinkinazė;

mTOR – žinduolių rapamicino taikiny;

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas;

PBS – fosfatinis druskų tirpalas (angl. *phosphate-buffered saline*);

PDGFR – trombocitų augimo faktoriaus receptorius;

PFA – paraformaldehido vandeninis tirpalas;

PR – progesterono receptorius;

RAF – sparčiai pagreitinta fibrosarkomos kinazės;

SNT – sunitinibas;

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo faktorius;

VEGFR – kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus receptorius.

Įvadas

Krūties vėžys yra dažniausiai diagnozuojama moterų piktybinė liga. Apskaičiuota, kad kiekvienais metais krūties vėžys bus diagnozuotas daugiau nei 250 000 moterų Jungtinėse Amerikos Valstijose ir daugiau kaip 40 500 mirs. Šios rūšies vėžiu gali sirgti ir vyrai, bet jų susirgimo atvejai retesni [1].

Plačiai taikomas vėžio gydymo būdas yra chemoterapija, tačiau ji turi mažą terapinį efektyvumą ir dažnai pacientų organizmo atsakas į gydymą yra nenuspėjamas. Todėl pradėta ieškoti alternatyvų ir atrastas tikslinis gydymas, kitaip dar vadinama taikinių terapija, kuri yra nukreipta prieš specifines signalines molekules. Tai gali būti išskirtinai vėžinių ląstelių išskiriamos molekulės. Tokiu būdu mažinamas toksiškumas visam žmogaus organizmui, nes veikiamos tik tos ląstelės, kurios pasižymi tam tikrų receptorių raiška. Tokiai taikinių terapijai tinkami fermentų kinazių slopikliai, nes kinazės atlieka svarbų vaidmenį žmogaus organizmo ląstelių augimo procese, įvairių signalinių molekulių išskyrimo [2].

Baltymų kinazės katalizuoja baltymų fosforilinimą, o grįžtamas baltymų fosforilinimas yra pagrindinis mechanizmas, kuriuo kontroliuojami įvairūs ląstelių procesai [3]. Žmogaus genome yra mažiausiai 518 kinazių. Ląstelių siunčiami signalai, kurie naudojami fosforilinimui, yra svarbūs visoms ląstelių funkcijoms. O vėžiniame audinyje vyksta nenormalus baltymų fosforilinimo aktyvavimas, kuris dažnai yra ligos pagrindas arba jos tiesioginė pasekmė. Išsiaiškinus, kokios svarbios organizme vykstančių procesų reguliavimui yra kinazės, galima sakyti, kad jų slopiklius būtų tikslinga pritaikyti vėžiui gydyti [4].

Krūties vėžys yra svarbi visuomenės sveikatos problema, ir šiuo metu taikomo gydymo efektyvumas dažnai yra nepakankamas. Šią ligą reikia toliau tirti molekulinio lygiu, kad būtų galima greičiau ją nustatyti bei pritaikyti specialų gydymą, kai yra slopinami tam tikri receptoriai. Norint įvykdyti šią užduotį, reikia atlikti tyrimus su ląstelių linijomis, kurios plačiai naudojamos įvairiuose laboratoriniuose *in vitro* vėžio tyrimų modeliuose. Nusprendėme įvertinti praktikoje vartojamo vaisto sunitinibo (kinazių slopiklio) analogų priešvėžinį poveikį. Juos susintetino Italijos mokslininkai tikėdamiesi, kad analogai bus aktyvesni ir slopins krūties vėžio ląstelių gyvybingumą. Kad lengviau būtų numatomas naujų kinazių slopiklių poveikis žmogaus organizmui, taikyti ne tik dvimačiai gyvybingumo, kamieniškumo, žūties būdo nustatymo metodai, bet ir trimačiai, leidžiantys tiksliau nuspėti būsimą junginių poveikį žmogaus organizme.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas – įvertinti sunitinibo analogų priešvėžinį aktyvumą žmogaus krūties vėžio ląstelių kultūrose.

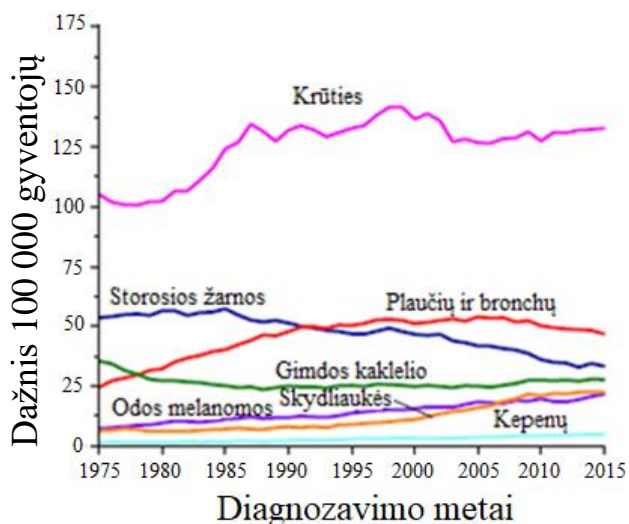
Darbo uždaviniai:

1. ištirti sunitinibo analogų poveikį žmogaus krūties vėžio ląstelių gyvybingumui,
2. išanalizuoti sunitinibo analogų poveikį žmogaus krūties vėžio ląstelių kamieniškumui,
3. nustatyti sunitinibo analogų sukiamą žmogaus krūties vėžio ląstelių žūties būdą,
4. ištirti sunitinibo analogų aktyvumą žmogaus krūties vėžio ląstelių trimatėse kultūrose (sferoiduose).

1. Literatūros apžvalga

1.1. Sergamumas ir mirtingumas nuo krūties vėžio

Vėžys yra svarbi visuomenės sveikatos problema visame pasaulyje ir yra antra pagrindinė mirties priežastis išsivysčiusiose pasaulio šalyse [5]. Krūties vėžys nėra retas, Jungtinėse Amerikos Valstijose 2019 m. naujų moterų krūties karcinomos atvejų *in situ* buvo registruota virš 60 tūkst. Vien tik krūties vėžys sudaro 30 proc. visų naujų vėžio diagnozių moterims [6].



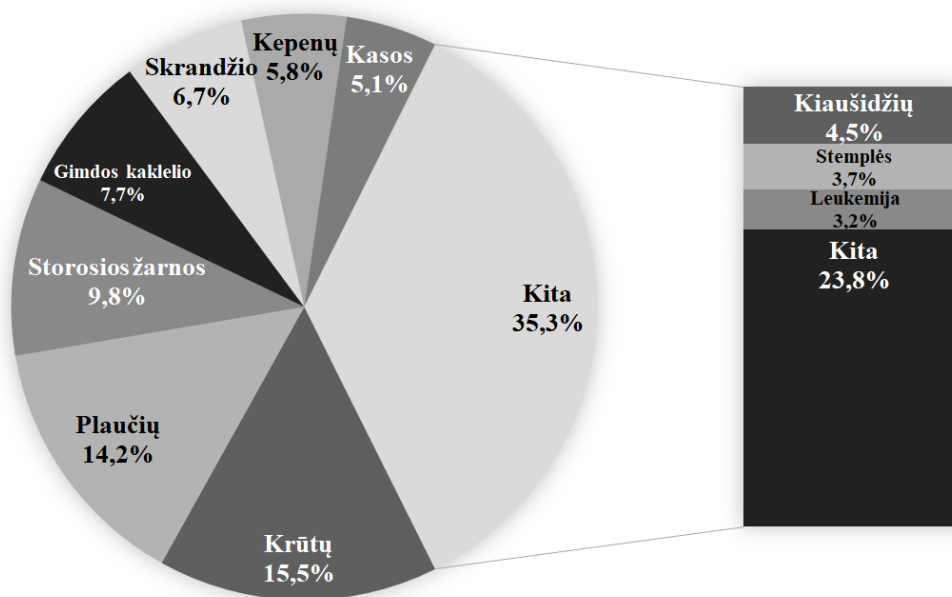
1 pav. Diagnozuotų vėžio atvejų skaičius moterims Jungtinėse Amerikos Valstijose (adaptuota pagal [6])

Ilgesnės gyvenimo trukmės tikimybė, kai diagnozuojamas invazinis vėžys, yra šiek tiek didesnė vyrams (39,3 proc.) nei moterims (37,7 proc.). Didžiausias mirčių skaičius moterims yra nuo krūties ir storosios žarnos vėžio [6]. Manoma, kad vyrams 2019 m. bus diagnozuota apie 2 670 naujų invazinių krūties vėžio atvejų. Svarbiausi krūties vėžio rizikos veiksniai yra lytis (moteris) ir amžius (vyresnis). Apie 5-10 proc. krūties vėžio atvejų gali būti siejami su genų mutacijomis, kurios paveldimos iš motinos ar tėvo. BRCA1 ir BRCA2 genų mutacijos yra dažniausios. Vidutiniškai BRCA1 mutaciją turinčioms moterims rizika, kad joms išsivystys krūties vėžys yra iki 72 proc., o moterims, turinčioms BRCA2 mutaciją – 69 proc. [1].

Didelis sergamumo vėžiu bei jo gydymo problematika taip pat yra ir Lietuvoje. 2018 m. duomenimis, diagnozuojama beveik 18 tūkst. naujų vėžio atvejų kasmet. Nacionalinio vėžio instituto direktorius prof. Feliksas Jankevičius pripažino, jog epidemiologinė situacija Lietuvoje yra prasta, nors naudojami visi svarbiausi vėžio diagnostikos ir gydymo būdais, įskaitant precizinę mediciną ir kamieninių ląstelių transplantaciją. Nepaisant gyvenimo trukmės, mirtingumo vidurkis yra žemiausias Europos Sąjungoje. Lietuvoje trečdali anksstyvos mirties priežasčių sudaro vėžinės ligos. Dažniausia onkologinė liga tarp moterų mūsų šalyje, kaip ir kitose Europos šalyse bei visame pasaulyje, išlieka krūties vėžys [7].

2018 m. tarp dešimties dažniausių vėžio tipų, kurie užregistruoti visame pasaulyje, abiejų lyčių atveju dažniausiai diagnozuotas yra plaučių vėžys ir pagrindinė mirties priežastis, po jo seka krūties vėžys (11,6 proc. visų atvejų). Moterims krūties vėžys yra dažniausiai diagnozuotas vėžys ir pagrindinė mirties nuo vėžio priežastis. Visame pasaulyje 2018 m. maždaug 2,1 mln. naujai diagnozuotų krūties vėžio atvejų, tai sudaro beveik 1 iš 4 vėžio atvejų tarp moterų. Žinomi apsauginiai veiksniai yra žindymas ir fizinis aktyvumas [8].

Mirtingumas



2 pav. Mirčių pasiskirstymas tarp 10 dažniausiai pasitaikančių vėžių moterims 2018 m. pasaulyje. Diagramos plotas atspindi visų mirčių skaičių procentais (adaptuota pagal [8])

Jungtinėje Karalystėje 2014-2016 m. vyrų ir moterų mirtingumas nuo krūties vėžio sumažėjo 22 proc. Moterų mirtingumo rodikliai sumažėjo 19 proc. [9]. Vidutinis penkerių metų išgyvenimas moterims, sergančioms invaziniu krūties vėžiu, yra 90 proc. (penkerių metų išgyvenimas nurodo, kiek procentų žmonių gyvena mažiausiai penkerius metus po vėžio nustatymo). Vidutinis dešimties metų išgyvenimas yra 83 proc. Jei vėžys yra tik krūtinėje, penkerių metų moterų, sergančių krūties vėžiu, išgyvenimas yra 99 proc. Šiame etape diagnozuojama 60 proc. atvejų. Jei vėžys išplitęs į artimus limfmazgius, penkerių metų išgyvenimas yra 85 proc. Jei vėžys išplitęs į tolimesnes kūno dalį, penkerių metų išgyvenimas yra 27 proc. Apie 6 proc. moterų turi metastazavusį vėžį, kai pirmą kartą diagnozuojamas krūties vėžys. Net jei vėžys yra pažengusiame etape, nauji gydymo būdai padeda daugeliui sergančiųjų krūties vėžiu išlaikyti gerą gyvenimo kokybę, bent jau kurį laiką. Praktikoje pritaikomi nauji gydymo metodai yra viena iš pagrindinių priežasčių, kodėl mirtingumas mažėja [10]. Bet krūties vėžys vis dar išlieka populiariausiu mirčių priežasčių sąraše.

Vienas iš veiksnių, kuris numato mirtingumą nuo krūties vėžio, yra ne tik naviko dydis ar laipsnis, bet ir ER (estrogeno receptoriaus) buvimas. Taip pat kiti įvairūs vėžinių ląstelių išskiriami receptoriai svarbūs parenkant tinkamą gydymą [11]. Siekiant efektyvaus gydymo, svarbu įvertinti vėžio biologinį tipą. Pagal vėžinių ląstelių išskiriamus receptorius pritaikyti vaistiniai preparatai, gali paspartinti gydymo eigą [12].

1.2. Krūties vėžio potipiai ir gydymo problematika

Krūties vėžys pradeda formuotis, kai krūtų ląstelės ima augti nekontroliuojamai. Šios ląstelės paprastai sudaro naviką, kuris dažnai gali būti matomas rentgeno spinduliuotėje arba jaučiamas kaip guzelis. Vėžys yra piktybinis, jei ląstelės auga ir įsiveržia į aplinkinius audinius arba išplinta (metastazuoja) tolimesiose kūno vietose. Krūties vėžys gali susiformuoti nuo skirtingų krūties dalių. Dauguma krūties vėžio atvejų prasideda kanaluose, pro kuriuos link spenelio prateka pienas. Kai kurie prasideda liaukose, kurios gamina motinos pieną. Taip pat yra kitų krūties vėžio tipų, kurie

mažiau paplitę. Nedaugelis vėžinių susirgimų prasideda kituose krūties audiniuose. Šios vėžio rūšys vadinamos sarkomomis ir limfomomis, o ne krūties vėžiu [13].

Kadangi vėžio tipų yra daug, naudinga žinoti, kaip jie skirstomi. Krūties vėžio ląstelių klasifikacija gali būti pagal: histologinį tipą, naviko laipsnį, limfmazgių būklę ir išskiriamų žymenų, tokių kaip ER ar žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2 (HER2) buvimą ir kita (1 lentelė) [14]. Šiame darbe aprašytiems eksperimentams pasirinktos trys skirtingos žmogaus krūties vėžio ląstelių linijos: MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 bei nevėžinė žmogaus fibroblastų (HF) ląstelių linija palyginimui. Šios ląstelių linijos priklauso skirtingai klasei, išskiria skirtingus receptorius arba jų visai neišskiria. Taip pasirinkta todėl, nes norėjome eksperimentiškai įvertinti sunitinib0 (SNT) analogų poveikį skirtingoms ląstelių linijoms, skirtingiems vėžio tipams.

1 lentelė. Krūties vėžinių ląstelių molekulinė klasifikacija (adaptuota pagal [14])

Klasifikacija	Imunoprofilis	Kitos charakteristikos	Ląstelių linijų pvz.
Luminalinis A	ER ⁺ , PR [±] , HER2 ⁻	Ki67 mažas, endokrininis atsakas, dažnas atsakas chemoterapijai	MCF-7, T47D, SUM185
Luminalinis B	ER ⁺ , PR [±] , HER2 ⁺	Ki67 aukštas, paprastai endokrininis atsakas, kintamasis chemoterapijai, HER2 ⁺ atsakas trastuzumabui	BT474, ZR-75
Bazalinis	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	EGFR ⁺ ir/arba citokeratinas 5/6 ⁺ , Ki67 aukšti, nėra endokrininio atsako, dažnas atsakas chemoterapijai	MDA-MB-468, SUM190
Žemas kaudinas	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	Ki67, E-kadherinas, kaudinas-3, kaudinas-4 ir kaudinas-7 žemi. Vidutinis atsakas chemoterapijai	BT549, MDA-MB-231, HsS78T, SUM1315
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	Ki67 aukštas, atsakas trastuzumabui, atsakas chemoterapijai	SKBR3, MDA-MB-453

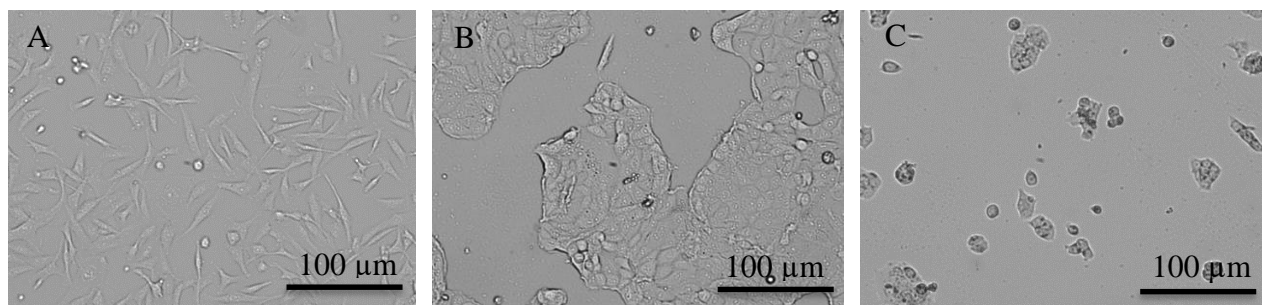
EGFR – epidermio augimo faktoriaus receptoriaus; ER – estrogenų receptoriaus; HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2; PR – progesterono receptoriaus; Ki67 – proliferacijos indeksas.

Kiekvienas krūties vėžio potipis turi skirtingą vystymosi prognozę ir atsaką į gydymą. MCF-7 yra dažniausiai eksperimentams naudojama krūties vėžio ląstelių linija. Ji yra ER-teigiama (turi estrogeno receptorių) ir PR-teigiama (turi progesterono receptorių). MCF-7 silpnai agresyvi ir neinvazinė ląstelių linija, kuri paprastai laikoma turinčia mažą metastazių potencialą. Šiose ląstelėse yra kamieninių ląstelių, galinčių sukelti klonų kintamumą. Tai buvo pasiūlyta kaip šios ląstelių linijos heterogeniškumo bei kaip krūties vėžio heterogeniškumo modelio paaiškinimas. Skirtingi MCF-7 variantai skiriasi ir genomu, ir RNR raiškos lygiais. MCF-7 ląstelės yra visuotinai naudojamos ER-teigiamo krūties vėžio ląstelių eksperimentuose. Jos tinkamos antihormonų terapijos tyrimams, nes šios ląstelės lengvai kultivuojamos ir išlaiko ER raišką [15].

Kita, BT-474 ląstelių linija, išskirta iš kietos, invazinės krūties vėžinės karcinomos [16]. Ji pagal 1 lentelę yra ER-teigiama, PR-teigiama arba neigiama, HER2-teigiama (žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2). Ši linija pasižymi visų trijų aprašytų receptorių raiška, todėl pagal tokį imunoprofilį būtų galima teigti, kad ją turėtų būti lengviausia paveikti tiriamais SNT analogais.

Ir trečioji – MDA-MB-231 – žmogaus krūties epitelio vėžinė ląstelių linija. MDA-MB-231 yra labai agresyvi, invazinė ir blogai diferencijuota trigubai neigiamo krūties vėžio ląstelių linija, nes ji neišskiria ER ir PR, taip pat nevyksta HER2 amplifikacija [17]. Pagal tai galima manyti, kad šią liniją

bus sunku efektyviai paveikti tiriamaisiais SNT analogais, nes ji neturi čia aprašomų receptorių taikinių. Ypač reikšmingi eksperimentai, ieškant naujų gydymo būdų yra su šia MDA-MB-231 ląstelių linija, kuri yra trigubai neigiama, nes trys dažniausiai pasitaikantys receptorių tipai, kurie, kaip žinoma, skatina krūties vėžio augimą (ER, PR, HER-2) nėra išskiriami ir tai sąlygoja sunkesni šio vėžio tipo išgydymą. Kadangi naviko ląstelėse trūksta būtinų receptorių, dažnai gydymas, pavyzdžiui, hormonų terapija ir vaistais, kurie nukreipti į ER, PR ir HER-2, yra neveiksmingi [18]. Žinant pagrindines vėžinių ląstelių savybes, galima kryptinga priešvėžinių medžiagų paieška.



3 pav. Tirtos vėžio ląstelių linijos. A – MDA-MB-231, B – MCF-7, C – BT-474 (nuotraukos iš asmeninio archyvo)

Šios trys krūties vėžio ląstelių linijos pagal aprašymus yra dažnai naudojamos kitų mokslininkų *in vitro* tyrimams. Ieškant naujų gydymo būdų svarbu ištirti tiriamų SNT analogų poveikį skirtingomis savybėmis pasižyminčioms ląstelių linijoms, ypač trigubai neigiamo krūties vėžio linijai, nes šio tipo vėžys sunkiausiai išgydomas ir lemia didelį mirštamumą [19]. Kadangi yra daug skirtingų vėžio potipių, tai ir gydymas turėtų skirtis.

Ne metastazavusio krūties vėžio gydymo tikslai yra išnaikinti naviką nuo krūties ir aplinkinių limfmazgių bei užkirsti kelią metastazių atsiradimui. Tam dažniausiai taikomas vietinis gydymas chirurgiškai pašalinant piktybinį naviką operacijos metu arba radioterapija. Kai chirurginis gydymas netinkamas, skiriamas sisteminis gydymas vaistais atsižvelgiant į krūties vėžio potipį. Taip pat jis gali būti taikomas prieš operaciją ar po jos arba abiem atvejais. Metastazavusiam krūties vėžiui yra naudojamos tos pačios pagrindinės sisteminės terapijos kategorijos [20].

Lietuvoje be chirurginio gydymo dar dažnai skiriama krūties vėžio chemoterapija, kuriai yra daug įvairių skirtų vaistų bei šių vaistų derinių. Bet šie vaistai sukelia šalutinius poveikius. Ligos atsinaujinimo galimybei sumažinti skiriama hormonoterapija. Ji veiksminga tada, kai krūties vėžio ląstelės savo paviršiuje turi ER ir PR receptorių [21].

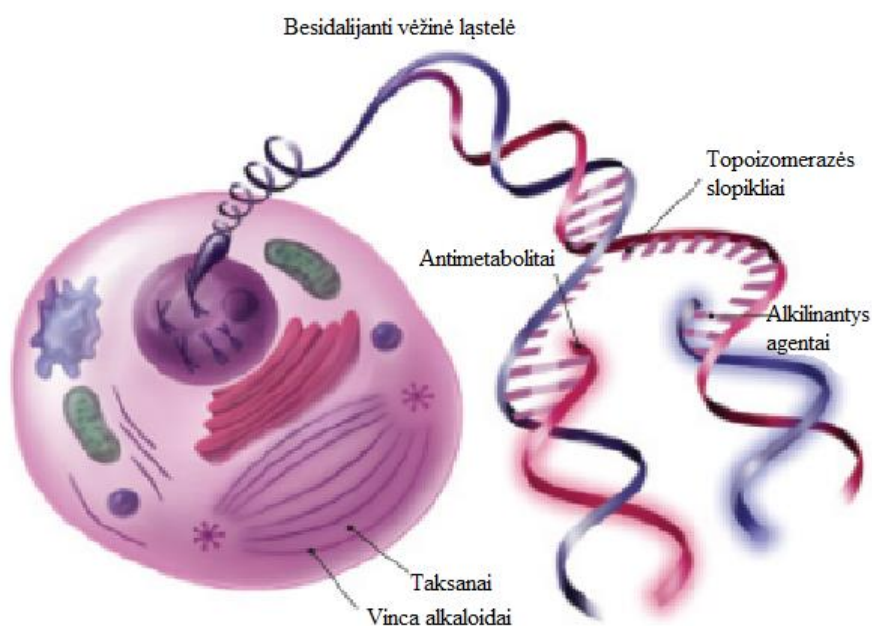
Kitas šiuolaikiškesnis Lietuvoje siūlomas gydymo būdas yra biologinė terapija skiriant trastuzumabą, bet ji efektyvi tik kai kuriais krūties vėžio atvejais, kai šio vėžio ląstelių paviršiuje yra daug HER2 receptorių (HER2 teigiamas krūties vėžys). Šie vaistai, priklausantys monokloniniams antikūnams, susijungia su HER2 receptoriais, taip sumažindami krūties vėžio augimo stimuliaciją [21]. Siekiant silpnesnių šalutinių poveikių Lietuvoje nuo 2018 m. pacientėms, sergančioms HER2 teigiamu išplitusiu krūties vėžiu, prieinamas gydymas taikant taikinių terapiją. Šis pažangus gydymo būdas prailgina sergančių moterų išgyvenimo trukmę. Pagal LR Sveikatos apsaugos ministro įsakymą, taikinių terapija vaistu trastuzumabu emtansinu skiriama pacientėms, sergančioms teigiamą HER2 rodmenį turinčiu, lokaliai progresavusiu ar metastazavusiu krūties vėžiu, kurioms liga atsinaujino po ankstesnio gydymo [22].

Nepaisant dabar taikomo gydymo, vis tiek išlieka didelis mirtingumas nuo krūties vėžio ir pacientams pasireiškia citotoksinis poveikis. Todėl reikalingas kitoks gydymas, kuris sumažintų žalingą gydymo poveikį ir mirčių skaičių.

1.3. Naujų priešvėžinių vaistų poreikis

Nors tradicinė citotoksinė chemoterapija ir išlieka viena iš pagrindinių vėžio gydymo būdų, tačiau taikinių terapijos teikiama privaloma paskatino platesnį šios gydymo metodikos pritaikymą [23]. Toks gydymas yra taikomas krūties, plaučių, gaubtinės ir tiesiosios žarnos, kasos, limfomos, leukemijos ir kitoms vėžio formoms gydyti. Dvi pagrindinės taikinių terapijos: monokloniniai antikūnai ir mažos molekulinės masės slopikliai. Taikinių terapija paskatino individualios gydymo koncepcijos atsiradimą, nes šis gydymo metodas gali būti veiksmingas ir selektyvus pacientams, kurių vėžinės ląstelės turi specifinį molekulinį taikinį, bet nežalingas šio taikinio neturinčioms ląstelėms [24].

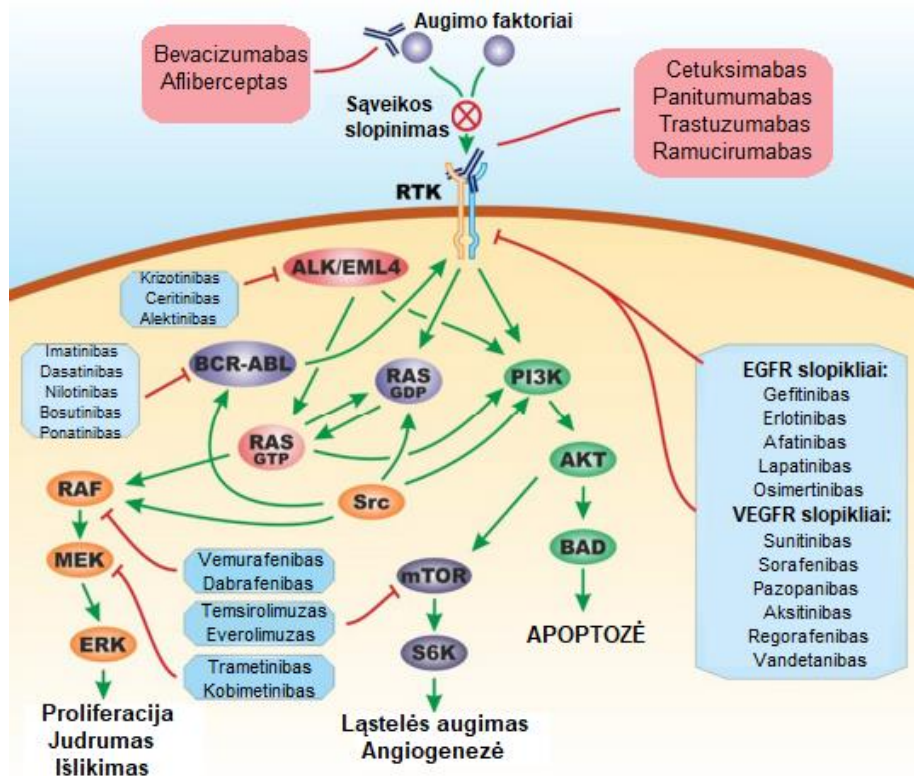
Tradicinės chemoterapijos atveju vaistai veikia greitai besidalijančias ląsteles, tokiuose audiniuose kaip virškinamojo trakto epitelis, plaukai, kaulų čiulpai, įskaitant ir vėžines ląsteles. Alkilinantys vaistai įsiterpia į DNR bazių poras, o tai sukelia grandinės trūkius ir DNR replikacija sustoja. Topoizomerazės slopikliai apsaugo DNR grandinę nuo išsivyniojimo. Taksanai ir Vinca alkaloidai trikdo mikrotubulių funkcijas, kurios reikalingos ląstelių mitozei. Antimetabolitai blokuoja nukleino rūgščių, reikalingų DNR replikacijai, formavimąsi ir panaudojimą [24]. Iš to matome, kad ši chemoterapijos rūšis žalinga organizmo ląstelėms ir deja veikia ne tik piktybinius navikus.



4 pav. Tradicinės chemoterapijos mechanizmas (adaptuota pagal [24])

Taikinių terapija stabdo vėžinių ląstelių dalijimąsi, trukdydama specifinėms molekulėms, kurios reikalingos vėžio vystymuisi ir augimui. Vėžio gydymas šia terapija yra pagrįstas tirozino ir serino / treonino baltymų kinazių slopiklių ir monokloninių antikūnų vartojimu. Baltymų kinazės slopikliai skirstomi į EGFR (epidermio augimo faktoriaus receptoriaus), VEGFR (kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus receptoriaus), BCR (lūžio taško klasterio regionas) / ABL (Abelsono pelių leukemijos virusinio onkogeno homologas), ALK (anaplastinės limfomos kinazės) / EML4

(echinoderminės mikrotubulės su panašiu baltymu 4), RAF (sparčiai pagreitinta fibrosarkomos kinazės), MEK (mitogeno aktyvuota baltymų kinazės) ir mTOR (žinduolių rapamicino taikinio) slopiklius. Monokloniniai antikūnai yra nukreipti į ekstraląstelinius augimo faktorius arba ekstraląstelinio receptoriaus tirozino kinazę [25].



5 pav. Taikinių terapijos molekuliniai taikiniai. AKT – baltymų kinazė B, ALK – anaplastinė limfomos kinazė, BAD – su Bcl-2 susietas mirties promotorių, BCR – lūžio taško klasterio regionas, EGFR – epidermio augimo faktoriaus receptorių, EML4 – echinoderminiai mikrotubuliniai su panašius baltymu 4, ERK – ekstraląstelių signalų reguliuojamos kinazės, MEK – mitogeno aktyvuota baltymų kinazė, mTOR – žinduolių rapamicino taikiny, PI3K – fosfoinozito 3-kinazė, RAF – sparčiai pagreitinta fibrosarkomos kinazė, RAS – RAS proto-onkogeno GTPazė, RTK – receptoriaus tirozino kinazė, S6K – S6 kinazė, Src – proto-onkogeno tirozino baltymo kinazė, VEGFR – kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus receptorių. (adaptuota pagal [25])

Šiandien sukurti jau ne tik cheminiai vaistai. Taikinių terapija reiškia gydymą nukreiptą į tam tikrus molekulinis taikinius. Tam naudojamos mažos molekulės, gautos cheminiu sintezės būdu arba biologiniai vaistai (dar vadinami biotechnologiniais), t. y. rekombinantiniai baltymai, daugiausia monokloniniai antikūnai, nukreipti į konkrečius ląstelių receptorių ir baltymus [25]. Ši terapija dar nėra plačiai naudojama pasaulyje, bet matant efektyvesnio gydymo perspektyvą, kuriami nauji vaistiniai preparatai. Norint ją pritaikyti, būtina gerai suprasti žmogaus organizme vykstančius biocheminius procesus.

1.4. Kinazių apibūdinimas ir jų rūšys

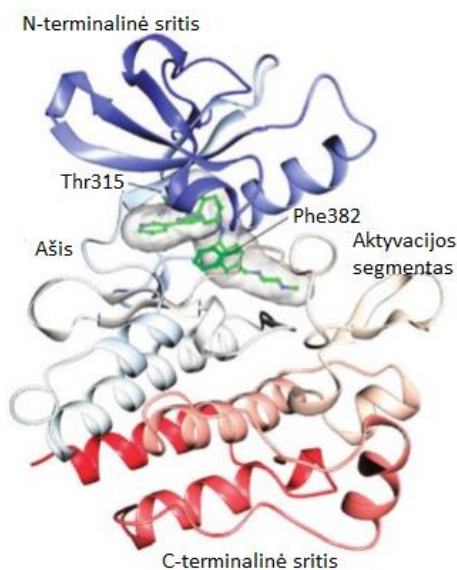
Beveik visi ląstelių gyvavimo aspektai yra kontroliuojami grįžtamu baltymų fosforiliniu. Apie trečdalis žinduolių baltymų turi kovalentiškai prijungtą fosfatą ir manoma, kad žmogaus genome yra

užkoduota 1000 baltymų kinazių. Daugelis baltymų yra fosforilinami dviem ar daugiau baltymų kinazėmis. Labai svarbus žingsnis, norint panaudoti kinazių slopiklius yra nustatyti fiziologinius kiekvienos baltymo kinazės substratus [26]. Įrodyta, kad kinazių valdomi žmogaus organizme vykstantys biocheminiai procesai skatina daugelį tipišku auglio biologinių požymių atsiradimą, įskaitant proliferaciją, išgyvenimą, judrumą, metabolizmą, angiogenezę ir priešvėžinių imuninių atsakų sumažėjimą [4].

Žinduolių ląstelių ciklas yra valdomas sudėtinga ciklinų ir su jais susijusia nuo ciklinų priklausomos kinazės (CDK) partnerių sąveika. Šio proceso disreguliacija yra vienas iš vėžio požymių. Yra žinoma bent 12 atskirų genetinių lokusų, koduojančių CDK ir priklausančių serino / treonino baltymų kinazių šeimai. Ši šeima apima tris tarpfazinius CDK (CDK2, CDK4, CDK6), vieną mitozinį CDK (CDK1), daugelį reguliuojančių CDK, tokių kaip CDK7, CDK aktyvuojančio komplekso komponentų ir transkripcijos CDK (CDK8, CDK9). Nepaisant didelio CDK ir ciklinų kiekio, tik keli iš jų susiję su krūties vėžio patogeneze [27]. Pagrįstas tik CDK1 slopinimas kaip galimas gydymo būdas nuo MYC priklausomam krūties vėžiui. MYC yra pagrindinis krūties vėžio ląstelių augimo reguliatorius. O CDK4/6 slopinimas veikia kaip terapinė krūties vėžio strategija, ypač per ER (estrogeno receptorių) pasireiškiančiam krūties vėžiui [28].

Žmogaus krūties vėžinių ląstelių augimą ir diferenciaciją reguliuoja signalus perduodantis tinklas iš keturių 1 tipo receptorių tirozino kinazės šeimos narių, kurie apima epidermio augimo faktoriaus receptorių (EGFR, HER-1), HER-2, HER-3 ir HER-4. HER-2 yra tik HER šeimos receptorių rūšis, kuri nesprisijungia ligandų, jo pagrindinis biologinis vaidmuo yra kaip signalo keitiklio, sąlygojant heterometrinio receptoriaus komplekso su HER-1, HER-3 arba HER-4 sudarymą. HER valdomo signalų perdavimo disreguliavimo tinklas yra susijęs su krūties vėžiu [29]. Nustatyta, kad skirtingus receptorių turinčius vėžius, tikslinga gydyti skirtingais kinazių slopikliais.

Žmogaus genomą koduoja apie 518 baltymų kinazių, kurios dalijasi katalizinio domeno nustatyta seka ir struktūra, bet labai skiriasi pagal reguliuojamą katalizę. ATP (adenozin 5' trifosfatas ($C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$)) – privaloma kišenė yra tarp dviejų kinazės klosčių sričių. Ši sritis kartu su mažiau konservuotomis aplinkinėmis kišenėmis svarbi slopiklių kūrimui, atsižvelgiant į kinazės struktūros skirtumus siekiant selektyvumo [30].



6 pav. Kinazės katalizinio domeno struktūra (adaptuota pagal [30])

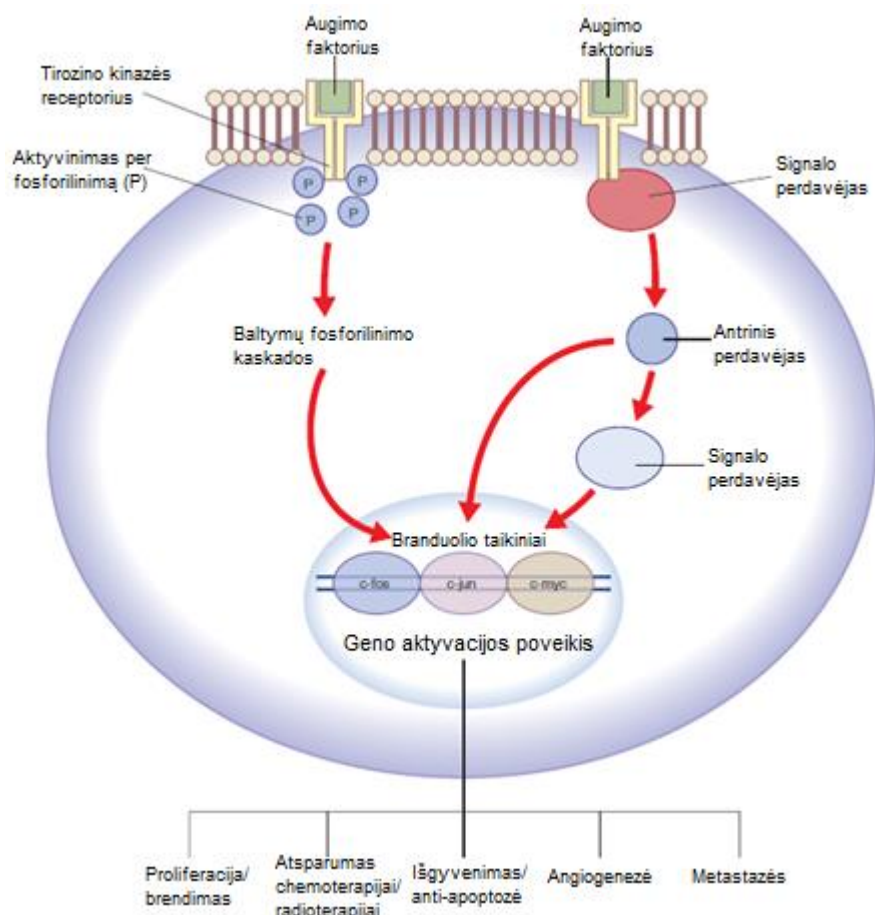
Fermentų slopinimas slopikliais – vienas iš gydymo metodų. Galima sukurti specifinį fermento slopiklį, kurio veikimas sąlygotų organizmo pasveikimą, tačiau fermentai – patogūs taikiniai, nes dažnai konkretaus fermento katalizinis aktyvumas yra esminis veiksnys ligos patofiziologijoje, natūralių substrato jungimosi sritys fermentuose dažnai yra labai tinkamos mažoms per virškinamąjį traktą įvedamoms vaistų molekulėms. O slopiklis – cheminis junginys, kuris, sąveikaudamas su fermentu, mažina fermentinės reakcijos greitį arba visai ją sustabdo [28].

Dauguma baltymų kinazių susijusios su onkogeneze. Genetiškai paveldėtos specifinės kinazės yra glaudžiai susiję su vėžio inicijavimu, skatinimu, progresavimu ir pasikartojimu. Nustatyta, kad daugelio žmonių piktybiniai navikai yra susiję su baltymų ir lipidų kinazių moduliavimu ir disfunkcija. Be onkologinių problemų, daugeliui žmonių kinazės reguliuoja ir kitus sutrikimus, įskaitant imuninius, neurologinius ir infekcines ligas. Tačiau tikriausiai kinazių pagrindinė klinikinė niša – vaistų nuo vėžio terapija [31].

1.5. Kinazių slopiklių veikimo principas

Mažos molekulinės masės junginiai – veiksmingi slopikliai vartojami geriamosiomis formomis, dėl savo mažos molekulinės masės lengvai gebantys praeiti pro ląstelių plazminę membraną. Jie naudojami norint pasiekti ląstelės paviršiuje esančius ligandus, prisijungiančius receptorius, viduląstelinius baltymus. Molekuliniai slopikliai slopina serino, treonino ir tirozino kinazes, matrikso metaloproteinkinazes (MMP), šiluminio šoko baltymus (HSP), proteosomas ir kitus baltymus, signalizuojančius transdukcinius procesus bei dalyvaujančius juose [32]. Kinazių slopikliai mažai toksiški normalioms ląstelėms. Tai sąlygoja jų veikimo mechanizmas nukreiptas tik prieš vėžinių ląstelių išskiriamas molekules. Slopikliai veikia tik tam tikrus receptorius, tai gali būti EGFR. Būtent šio receptoriaus didelė raiška nustatoma daugeliu vėžinių susirgimų atveju.

Manoma, kad EGFR raiška susijusi su ląstelių dalijimusi ir metastazių sudarymu. Nustatyta, jog EGFR slopinimas mažina piktybinių ląstelių proliferaciją, angiogenezę, ląstelių judrumą. EGFR yra 170 kDa transmembraninis baltymas, sudarytas iš ekstraląstelinio ligandą rišančio domeno, transmembraninio lipofilinio regionas ir intraląstelinio baltymo tirozino kinazės domeno. Kai substratas susilieja su receptoriumi, dimerizuoja ligando-receptoriaus kompleksą ir yra internalizuojamas ląstelės šeimininkės. Tai aktyvina intraląstelinę baltymų kinazę, kuri aktyvina signalo perdavimo takus, kurie daro įtaką ląstelių funkcijai. Keletas tyrėjų aprašė EGFR geną daugumai žmogaus vėžio atveju. Įrodyta, kad EGFR blokados procesai slopina gliukozės proliferaciją piktybinėse ląstelėse ir taip pat veikia angiogenezę, ląstelių judrumą ir invaziją [33].



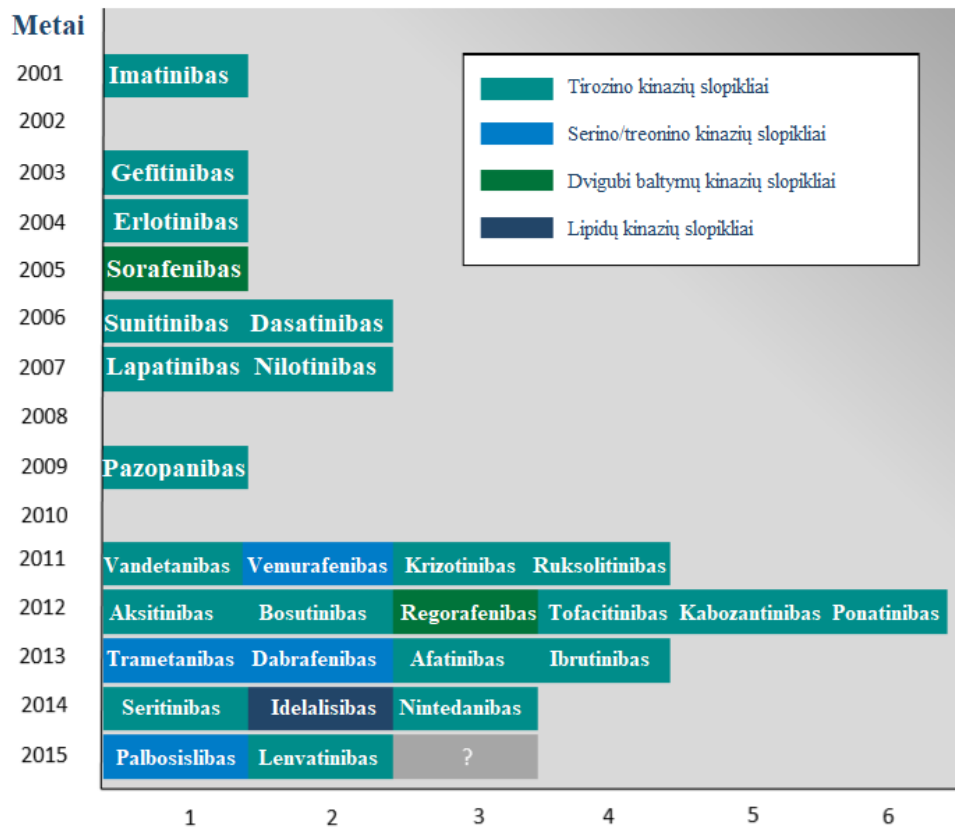
7 pav. Epidermio augimo faktoriaus receptorių signalo perdavimo būdai. c-fos, c-jun ir c-myc – branduolio taikiniai, dalyvaujantys genų transkripcijoje / ląstelių ciklo progresavime; P – fosfatas (adaptuota pagal [30])

EGFR yra daugelyje navikų tipų, jis prisideda prie vėžinių ląstelių dauginimosi, invazijos, migracijos. Bet EGFR taip pat randamas epitelio audinyje (pvz. odos, raumenų), todėl jo slopinimas gali lemti ryškius dermatologinius ir virškinamojo trakto sutrikimus. Tad, siekiant pritaikyti šią gydymo metodiką praktikoje, yra svarbu įvertinti terapijos toksiškumą ir potencialų vaistų veikimą [24].

Receptorinės tirozino kinazės taip pat gali būti vaistų taikiniai. Neįprastas šių kinazių aktyvinimas baigiasi signalu, kuriuo aktyvuojamos serino / treonino kinazės. Nereguliuojant jų aktyvavimą, padidėja ląstelių augimas ir išgyvenimo tikimybė, todėl dažnai vėžys progresuoja. Pavyzdžiui, HER2 esant krūties vėžiui, progresuoja [32]. Žinant tokius ir kitus mažos molekulinės masės junginių veikimo principus, jie buvo pritaikyti vėžio gydymui praktikoje.

1.6. Kinazių slopiklių priešvėžinis aktyvumas ir pritaikymas klinikinėje praktikoje

Iki 2015 metų JAV Maisto ir vaistų valdyba (FDA) patvirtino 28 mažos molekulinės masės kinazių slopiklius. Šių molekulių klinikiniai duomenys yra žinomi ir ištirtas kiekvienos iš jų struktūros – aktyvumo ryšys (SAR). Pirmasis patvirtintas kinazių slopiklis – imatinibas [34].



8 pav. Patvirtinti kinazių slopikliai (2015 m. duomenimis) (adaptuota pagal [35])

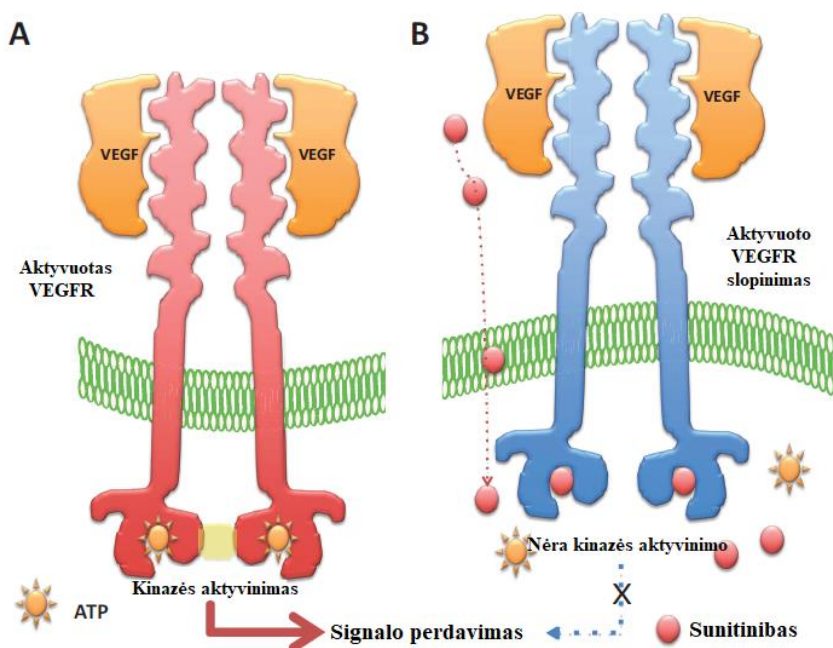
Slopiklių pagrindą sudaro kristalo gardelės struktūra [36]. Tad, tiriami kinazių slopikliai išlaiko tam tikras struktūras. Dalį jų galima priskirti tiofeno dariniams, kitus tiazolo ar naftaleno junginiams. Mažos molekulinės masės slopikliai paprastai slopina tirozino kinazę. Šis fermentas perneša fosfato grupę nuo ATP ir prijungia prie baltymuose esančių tirozino liekanų. Proceso eigoje tiek normaliuose, tiek navikiniuose audiniuose gali pasireikšti nekontroliuojamas ląstelių augimas, proliferacija, migracija bei prasidėti angiogenezė. Epidermio augimo veiksnio (EGFR) ir kraujagyslių endotelio augimo veiksnio (VEGF) receptoriai yra tirozino kinazės. Jų padidėjęs aktyvumas nustatomas, esant įvairiems navikams. Taip pat verta paminėti, jog mažų molekulių slopikliai metabolizuojami citochromo P450. Taigi, susidarę metabolitai gali sąveikauti su įvairiais vaistais, pavyzdžiui: makrolidais, antibiotikais, varfarinu ir kitais [24].

Iširta, jog tokios terapijos vaistinių preparatų atstovas imatinibas turi ryškų poveikį lėtinės mieloidinės leukemijos ligai. Rituksimabas, SNT, kuris šiame tiriamajame darbe bus naudojamas kaip palyginamasis vaistas, ir trastuzumabas sukėlė revoliuciją gydant limfomą, inkstų ląstelių karcinomą ir krūties vėžį [24]. Tiriami epidermio augimo faktoriaus receptorių tirozino kinazės slopikliai (EGFR-TKI) tokie kaip gefitinibas ir erlotinibas, kurie blokuoja EGFR signalizacijos kaskadą, taip slopindami daugelio kietųjų navikų augimą, proliferaciją ir išgyvenimą [33].

Kinazių slopikliai suskirstyti pagal veikimo mechanizmą – gebėjimą katalizuoti ATP fosfato perdavimą į substratus, kuriuose paprastai yra serino, treonino arba tirozino liekanos. I tipo kinazių slopikliai yra ATP konkurentai, kurie imituoja ATP adenino fragmento purino žiedą. Jie sąveikauja su konformacine fosforilinta aktyvia katalizatoriaus vieta. I tipo kinazės inhibitoriai, skirti vėžio gydymui: bosutinibas, krizotinibas, dasatinibas, erlotinibas, gefitinibas, lapatinibas, pazopanibas, SNT ir vemurafenibas. II tipo kinazių slopikliai veikia nukreipdami inaktyvią kinazių konformaciją

ir sąveikauja su katalizine nefosforilinta inaktyvia kinazių konformacija. II tipo kinazių slopikliai, tokie kaip imatinibas, sorafenibas ir kiti turi panašų farmakoforą ir vandenilį. Jie selektyvesni kinazės slopinimo atžvilgiu, lyginant su I tipo kinazių slopikliais, pasižymi reikšmingu poveikiu ląstelių aktyvumui. III tipo arba allosteriniai slopikliai jungiasi prie katalitinio domeno / ATP surišimo vietos ir moduliuoja kinazės aktyvumą alosteriniu būdu. III tipo slopikliai turi didžiausią selektyvumą, nes jie jungiasi prie konkrečios kinazės vietos. ATP atveju šie vaistai yra nekonkurenciniai slopikliai, nes ATP negali užblokuoti procesų reikalingų jų sąveikai su kinazėmis. Keli šiam tipui priskiriami pavyzdžiai: C11040, GnF2, RO0281675 ir analogai. IV tipo kinazių slopikliai, taip pat vadinami į substratą nukreipti slopikliai, nekonkuruoja su ATP ir turi didesnę selektyvumą prieš tikslines kinazes (pvz.: ON012380). V tipo arba kovalentiniai slopikliai sudaro negrįžtamą kovalentinį ryšį su kinazės aktyvia vieta. Komplexas (pvz.: afatinibas, ibrutinibas) [31,37]. Be anksčiau minėto Lietuvoje naudojamo trastuzumabo, konkrečiai krūties vėžio gydymui vartojamas kitas slopiklis – lapatinibas [38].

Tiriamasis junginys – SNT – slopina ne mažiau kaip aštuonias receptorines baltymų tirozino kinazes, įskaitant VEGFR1 – VEGFR3, trombocitų augimo faktoriaus receptorius (PDGFRa ir PDGFRb), kamieninių ląstelių faktoriaus receptorius, kolonijas stimuliuojančio faktoriaus 1 receptorių ir kitus. VEGFR1 ir VEGFR2 vaidina pagrindinius vaidmenis naujų kraujagyslių susidarymo procese, o SNT slopina angiogenezę. Metastazavęs arba išplitęs iš pirminio naviko inkstų ląstelių vėžys pasižymi dideliu kraujagyslių skaičiumi ir SNT yra patvirtintas vaistas šiam vėžiui gydyti. SNT skiriamas gydyti tiems navikams, kurie yra atsparūs imatinibui. SNT grįžtamai prisijungia prie ATP surišimo vietos kinazėje taip slopindamas jų fermentinį aktyvumą [39].



9 pav. SNT veikimo mechanizmas endotelio ląstelėse, išreiškiančiose VEGFR (A). SNT įsiskverbia į ląstelių citoplazmą ir konkuruoja su ATP užimdamas VEGFR ATP reikalingą kišenę (B) (adaptuota pagal [40])

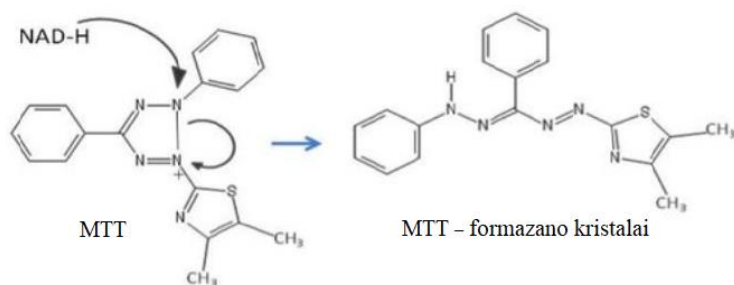
Kraujagyslių endotelio augimo faktorių (VEGF) prijungimas prie VEGFR sukelia VEGFR dimerizaciją ir VEGFR kinazės domeno aktyvinimą. VEGFR aktyvinimui reikalingas ATP. SNT įsiskverbęs į ląstelių citoplazmą ir konkuruojant su ATP užimama VEGFR ATP reikalinga kišenė. Tokiu atveju, aktyvuota VEGFR nebegali aktyvuoti savo ląstelėje esančio kinazės domeno ir

užkertamas kelias tolesniam ląstelių signalizavimui [40]. Šis praktikoje taikomas vaistas SNT pasiteisino kaip efektyvus vaistas inkstų vėžio gydymui ir tai įrodo, kad ateityje nebūtinai šios formos vėžiu sergančius pacientus galima būtų rekomenduoti gydyti taikinių terapijos vaistais, tokiais kaip tirozino-kinazės slopikliais [41].

1.7. Pasirinktų metodų apibūdinimas

Kad naujas vaistinis preparatas patektų į rinką, reikalingos įvairios procedūros. Vienas iš svarbesnių etapų yra ikiklininiai tyrimai *in vitro*. Junginių aktyvumui ląstelių kultūrose patikrinti galima pritaikyti daugelį metodų.

Vienas dažniausiai naudojamų metodų tyrimuose su ląstelių kultūromis yra junginio poveikio ląstelių gyvybingumui nustatymas. Taikant šį metodą, yra apskaičiuojama pusinė efektyvioji koncentracija (EC_{50}), kuri 50 proc. sumažina ląstelių gyvybingumą. Šiame darbe ląstelių gyvybingumas nustatytas, naudojant 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido (MTT) redukcijos reakciją. MTT redukcijos testas pagrįstas gyvybingų ląstelių viduląstelinių metabolinių procesų įvertinimu. MTT (geltonos spalvos) patekęs į gyvybingų ląstelių mitochondrijas, vykstant redukcijos reakcijai, katalizuojant sukcinato dehidrogenazei, virsta violetinės spalvos formazano kristalais. Ištirpinus juos dimetilsulfokside (DMSO), spektrofotometriškai matuojamas optinis tankis. Ląstelių gyvybingumą taip pat galima tirti ir kitais metodais [42]. Praktikoje taikomi daugelis metodų, vieni iš jų: kitų tetrazolių (MTS, XTT, WST-1) redukcija, resazurino redukcija, proteazių gyvybingumo žymeklių testas, adenosintrifofato (ATP) aptikimo metodas ir tėkmės citometrija, tačiau vieni iš jų veikia patikimiau ir turi daugiau privalumų. Mes pasirinkom MTT redukcijos metodą, nes jis greitai ir lengvai atliekamas, gan patikimas, nereikia daug skirtingų reagentų [43].



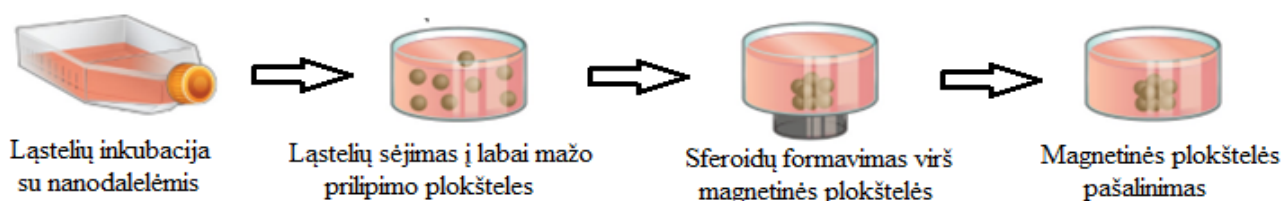
10 pav. MTT redukcija. Reakciją katalizuoja sukcinato dehidrogenazė (adaptuota pagal [42])

Svarbu nustatyti ir SNT analogų poveikį ląstelių gebėjimui formuoti kolonijas, tam taikomas kamieniškumo tyrimas. Kiekviena ląstelė daugybę kartų dalijasi ir taip suformuoja koloniją. Kai jų suformuojama pakankamai, kolonijos fiksuojamos ir dažomos. Paveikus ląsteles tiriamu junginiu, jis galimai sumažina besiformuojančių kolonijų skaičių ir / arba plotą [44]. Šis metodas leidžia nuspėti junginio poveikį auglio formavimo procesui gyvame organizme.

Svarbu įvertinti ir SNT analogų sukeltą ląstelių žūtį būdą. Nustatyta, kad žūtis būdas – apoptozė – kaip apsauginis mechanizmas prieš vėžio vystymąsi. Jei apoptozė mažai aktyvi, didėja tikimybė, kad išsivystys auglys, jis didės ar bus neatsparus gydymui [45]. Tuo tarpu nekrozė gali būti siejama su procesais, kurie sukelia uždegimą ir gali paskatinti auglio vystymąsi [46]. Apoptozės ir nekrozės nustatymas paremtas chromatino pakitimo įvertinimu fluorescenciniu būdu. Naudojami skirtingi dažai, paveikus ląsteles Hoechst 33342, jis jungsis prie kondensuoto chromatino, todėl apoptozinės ląstelės švytės ryškesne mėlyna spalva nei gyvos ląstelės su normaliu chromatiniu, o propidžio jodidas

prasiskverbia tik į negyvas ląsteles ir švyti raudona spalva [47]. Kiti ląstelių žūtis būdo nustatymo metodai, gali būti paremti ląstelių membranos pokyčiais, kaspazių aktyvacija, mitochondrijų membranų pokyčiais, pasitelkiant srauto citometrinių analizę ir kita [48]. Kultivuojant ląstelių kultūras dviejų dimensijų (dvimatėje) erdvėje, taikomi tyrimo metodai paprastesni, bet sunkiau numatomas poveikis žmogaus organizmui. Manoma, kad ląstelių metabolizmas ir elgesys skiriasi dvimatėse kultūrose ir *in vivo*. Todėl pradėti taikyti neinvaziniai, kiekybiniai, prilygstantys *in vivo*, trijų dimensijų (trimačiai) metodai [49].

Iš trimačių ląstelių struktūrų galima sukurti audinių modelius, kuriais greitai atkartojamas naviko bioaplinka [50]. Šiame darbe sferoidai buvo formuojami 3D *Bioprinting* metodu. Praktikoje formuoti trimatės kultūras yra naudojami ir kiti metodai. Pavyzdžiui, pagal Vokiečių mokslininko Valeh Rustamov ir kitų autorių straipsnį, sferoidams formuoti buvo pasitelktos kelios technikos, tokios kaip kabančio lašo, inkrustacinis, viršūnės ir sumuštinio [51]. Dar trimatėms kultūroms formuoti gali būti pasitelkiama perdangos technika naudojant agarą, sėjant ląsteles į 96 šulinėlių mažo prilipimo agaro plokšteles, kad būtų išvengta ląstelių prisitvirtinimo. Ląstelių kaupimas atliekamas centrifuguojant plokštelę ir ją inkubuojant kelias dienas [52]. Tyrimams iš visų šitų galimų metodų pasirinktas 3D *Bioprinting*, nes šiuo būdu vienu metu galima gauti daug sferoidų ir galima apjungti kelias ląstelių linijas. Pagal metodiką ląstelės inkubuojamos su nanodalelėmis, sėjamos į mažo prilipimo plokšteles ir sferoidai formuojami virš magnetinių plokštelių.



11 pav. Sferoidų formavimas 3D *Bioprinting* metodu (adaptuota pagal [53])

Sferoidų kultūrų auginimas yra būdas leidžiantis auginti vėžio ląsteles trimatėje konformacijoje *in vitro*. Šie trimačiai modeliai nusistovėjo vėžio tyrimuose dėl to, kad taip auginant ląstelių kultūras susidaro į kietuosius auglius *in vivo* labai panašūs modeliai [52]. Tokiu būdu galima tiksliau nei dvimačiais metodais nustatyti tiriamų preparatų poveikį žmogaus organizme. Įrodyta, kad trimatės ląstelių kultūros elgesiu yra panašesnės su *in vivo* sistemomis, tai yra perspektyvus ir patikimesnis įrankis naujų vaistų kūrimui [49].

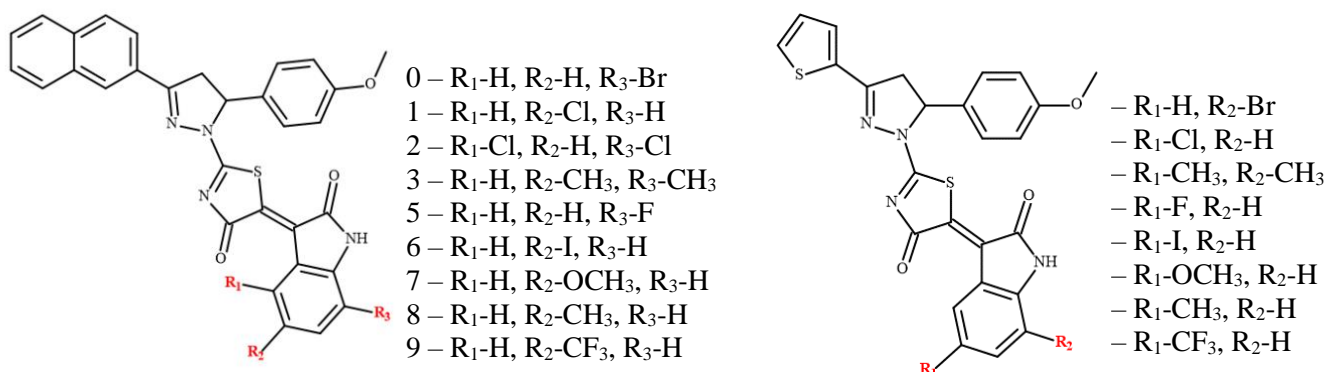
Apžvelgus literatūrą matyti, kad visame pasaulyje, taip pat ir Lietuvoje, nepaisant pažangių tyrimų metodų bei taikomo gydymo, išlieka didelio sergamumo ir mirštamumo nuo krūties vėžio problematika. Kai kuriais vėžio atvejais rinkoje esantys vaistiniai preparatai yra neveiksmingi, dėl to būtina kurti ir tirti naujus junginius. Kinazijų slopikliai gali būti naudojami taikinių terapijai, jie veikia tik vėžines ląsteles, tokiu atveju reikalinga mažesnė vaistinės medžiagos koncentracija. Šiame darbe aprašytiems tyrimams pasirinktos trys krūties vėžio ląstelių linijos, kurios tarpusavyje skiriasi receptorių raiška, nes norėjome įvertinti naujai susintetintų SNT analogų poveikį skirtingiems krūties vėžio atvejams. Taip pat tyrimams buvo naudojama ir nevėžinė ląstelių linija, kad būtų galima nustatyti junginių selektyvumą. Palyginimui tirtas klinikinėje praktikoje vartojamas SNT. Naujų junginių ir SNT priešvėžinio aktyvumo įvertinimui pasirinkome dažniausiai *in vitro* tyrimams naudojamus metodus. Buvo siekiama įvertinti junginių poveikį vėžinių ląstelių gyvybingumui,

kamieniškumui bei nustatyti sukeliama ląstelių žūties būdą. Kad lengviau būtų prognozuoti slopiklių aktyvumą žmogaus organizme, nutarėme įvertinti SNT analogų poveikį trimatėse vėžio ląstelių kultūrose. Žinant šių junginių poveikį *in vitro*, galima jų pagrindu sintetinti kitus junginius, galimai pasižymintius didesniu priešvėžiniu aktyvumu. Atrinkus pačius selektyviausius vėžinėms ląstelėms ir aktyvesnius už SNT junginius, juos būtų galima toliau tirti ir tolimesniuose ikiklinikiniuose tyrimuose gyvūnų modeliuose.

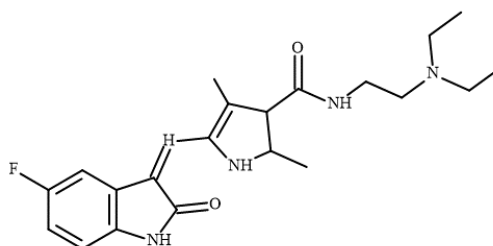
2. Tyrimo metodika

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimo objektai: septyniolika skirtingų SNT analogų ir SNT.



12 pav. Šiame darbe tirtų SNT analogų struktūrinės formulės



13 pav. SNT struktūrinė formulė

2.2. Reagentai, priemonės ir aparatūra

Tyrimuose naudotos žmogaus krūties vėžio ląstelių linijos:

- MDA-MB-231 (Amerikos ląstelių kultūrų kolekcija (ATCC)),
- MCF-7 (Amerikos ląstelių kultūrų kolekcija (ATCC)),
- BT-474 (Amerikos ląstelių kultūrų kolekcija (ATCC)).

Ir nevēžinė linija:

- žmogaus fibroblastai (HF; gauti iš prof. Helder A. Santos, Helsinkio universitetas, Suomija).

Reagentai:

- 16 proc. paraformaldehidas be metanolio (Thermo Scientific),
- 16 proc. paraformaldehido vandeninis tirpalas (PFA) (Thermo Scientific),
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas (MTT, Sigma-Aldrich ≥ 97 proc.),
- 96 proc. etanolis (Stumbras),
- buferinis fosfatinis druskų tirpalas pH 7,4 (PBS, Gibco),
- dimetilsulfoksidas (DMSO, Sigma-Aldrich, $\geq 99,5$ proc.),
- *Dulbecco'o* modifikuota *Eagle* ląstelių mitybinė terpė su didele gliukozės koncentracija (*DMEM GlutaMAX*, Gibco) su 10 proc. fetaliniu veršiukų serumu (FBS, Gibco) ir 1 proc. antibiotikų tirpalu (10 000 VV / ml penicilino ir 10 mg/ml streptomicino, Gibco),

- *Hoechst* 33342 10 mg/ml vandeninis tirpalas (Thermo Scientific),
- išgrynintas vanduo,
- kristalinis violetinis dažas (Sigma-Aldrich, ≥ 90 proc.),
- nanodalelės *NanoShuttle*TM (Nano3D Biosciences),
- propidžio jodido 1 mg/ml vandeninis tirpalas (Thermo Scientific),
- tripsino analogas *TrypLE*TM Express (Gibco).

Tyrimams naudotos sterilios priemonės: 10 cm skersmens lėkštelės ląstelių auginimui, 5 ml ir 10 ml pipetės, Pastero pipetės (3 ml tūrio), 15 ml ir 50 ml centrifuginiai mėgintuvėliai, 6, 12, 24, 96 šulinėlių plokštelės, 1 ml, 100 μ l, 1 μ l tūrio antgaliai pipetėms (Corning), itin mažo prilipimo 96 šulinėlių plokštelės sferoidų gamybai, magnetinės plokštelės sferoidams formuoti (Nano3D Biosciences), automatinės vienkanalės ir daugiakanalės pipetės. Ląstelėms skaičiuoti naudota *Neubauer* kamera (Sigma-Aldrich) ir rankinis ląstelių skaičiuotuvas.

Aparatūra:

- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5702 R (Eppendorf),
- fluorescencinis mikroskopas IX73 (Olympus),
- G:Box Chemi XRQ gelių vaizdavimo sistema (Syngene International Ltd),
- inkubatorius HERAcell 150i su 5 proc. CO₂ kontrole (Thermo Scientific),
- laminaras (Tekan),
- mikroplokštelių skaitytuvas MultiscanTM FC (Thermo ScientificTM),
- purtyklė (BioSan).

2.3. Tyrimo metodikos

2.3.1. Ląstelių kultūrų auginimas

Ląstelių persėjimas. Nuo ląstelių, auginamų ant lėkštelės dugno, nusiurbama mitybinės terpės su 10 proc. serumo ir 1 proc. antibiotikų (toliau mitybinė terpė), ląstelės praplaunamos PBS. Įpilama 1 ml tripsino analogo tirpalo, inkubuojama 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ atmosferoje, kol ląstelės atkimba nuo lėkštelės dugno (5-10 min.). Užpilama 9 ml mitybinės terpės, ląstelės suspenduojamos, visas lėkštelės turinys perkeliamas į 15 ml centrifuginį mėgintuvėlį. Centrifuguojama 4 min. kambario temperatūroje (19-23 °C), 1000 aps./min greičiu. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos įpilant 2-5 ml mitybinės terpės. Jei reikia, ląstelės skaičiuojamos panaudojant *Neubauer* kamerą. 0,5-1 ml suspensijos perkeliama į 10 cm skersmens lėkštelę, sumaišoma su 9-10 ml šviežios mitybinės terpės, auginama 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ atmosferoje.

2.3.2. Poveikio ląstelių gyvybingumui nustatymas

Iš pradžių buvo atrinkti efektyviausi SNT analogai kiekvienai tiriamai ląstelių linijai. SNT analogų poveikis ląstelių gyvybingumui buvo nustatomas MTT redukcijos metodu MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 ir HF ląstelių linijoms. Taip pat buvo nustatinėjamas SNT, kaip palyginamojo junginio, poveikis gyvybingumui. Į 96 šulinėlių plokštelę pilama po 100 μ l paruoštos ląstelių suspensijos taip, kad kiekviename šulinėlyje būtų po 5000 MDA-MB-231 arba 10000 MCF-7, BT-474 ir HF ląstelių. Plokštelė inkubuojama 24 val. 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ atmosferoje. Tuomet į šulinėlius su ląstelėmis pilama po 100 μ l skirtingų tiriamųjų junginių tirpalų mitybinėje terpėje taip, kad jų koncentracija būtų 2 μ M. Kiekvienam junginiui naudojama po tris šulinėlius. Kaip teigiamai kontrolė

naudojama mitybinė terpė be ląstelių, su 0,5 proc. DMSO, neigiamai – mitybinė terpė su ląstelėmis ir su 0,5 proc. DMSO. Ląstelės inkubuojamos 72 val. 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ atmosferoje. Dirbama mažai apšviestoje aplinkoje. Praėjus 72 val. į šulinėlius pilama po 20 µl 5 mg/ml sterilaus MTT tirpalo ir inkubuojama 3 val. 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ atmosferoje. Skystis iš plokštelių išpilamas ir susiformavę kristalai tirpinami į kiekvieną šulinėlį įpilant 100 µl DMSO ir maišant ant automatinės purtyklės. Gyvybingų ląstelių kiekis vertinamas spektrofotometriškai, tirpalų absorbciją matuojant mikroplokštelių skaitytuvu 570 nm ir 630 nm bangos ilgiuose. Skaičiuojant, kiek procentų ląstelių išgyveno, paveikus atitinkama junginio koncentracija, buvo įvertintas visų 17 junginių priešvėžinis aktyvumas.

Taip atrinktų aktyviausių SNT analogų poveikis ląstelių gyvybingumui buvo nustatomas MTT redukcijos metodu visoms keturioms ląstelių linijoms, taikant tokią pačią metodiką. Kiekvienai junginio koncentracijai naudojama po tris šulinėlius.

Išmatuotos absorbcijos vertės normalizuojamos nuo 0 iki 1, kur 0 atitinka teigiamą, o 1 – neigiamą kontrolę. Gauti duomenys analizuojami Microsoft Office Excel 2010 programa, skaičiavimams naudojama *Hill* formulė, nustatomos junginių koncentracijos, slopinančios 50 proc. ląstelių gyvybingumą (EC_{50}).

2.3.3. Poveikio ląstelių kamieniškumui nustatymas

SNT analogų poveikis kamieniškumui tiriamas, įvertinant kaip ląstelės geba suformuoti kolonijas. Į 12 šulinėlių plokšteles pilama po 1 ml paruoštos ląstelių (MDA-MB-231, MCF-7, BT-474) suspensijos taip, kad kiekviename šulinėlyje būtų po 100 ląstelių. Į šulinėlius supilami SNT analogų tirpalai taip, kad galutinės junginių koncentracijos šulinėliuose atitiktų 10 proc. ir 90 proc. MTT tyrimo metu nustatytų EC_{50} verčių. DMSO koncentracija visuose šulinėliuose ir neigiamoje kontrolėje, kur ląstelės, nepaveiktos SNT analogais, buvo 0,2 proc. Ląstelės inkubuojamos 14 dienų 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ atmosferoje. Po 14 dienų terpė nusiurbama, šulinėliai 2 kartus praplaunami PBS tirpalu, kolonijos fiksuojamos 4 proc. paraformaldehido tirpalu kambario temperatūroje 15 min. Tada skystis nusiurbiamas, vėl 2 kartus plaunama PBS tirpalu. Dažoma su 0,1 proc. kristalinio violetinio vandeniniu tirpalu. Tuomet kelis kartus plaunama dejonizuotu vandeniu ir džiovinama. Plokštelės fotografuojamos G:BOX gelių dokumentacijos sistema, naudojant *Genesys* programą. Naudojant *GeneTools* programą, apskaičiuojamas ląstelių kolonijų skaičius ir plotas procentais. Kontrolė prilyginta 100 proc., pagal ją apskaičiuoti kitų grupių rezultatai.

2.3.4. Ląstelių žūties būdo nustatymas

Krūties vėžio ląstelių linijos MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 sėjamos į 24 šulinėlių plokšteles po 0,5 ml taip, kad kiekviename šulinėlyje būtų 10000 MDA-MB-231 ar po 15000 MCF-7 ir BT-474 ląstelių. Plokštelės su ląstelėmis 24 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ atmosferoje.

Tuomet į šulinėlius supilami SNT analogų tirpalai taip, kad kiekviename šulinėlyje DMSO koncentracija būtų 0,5 proc., o galutinės SNT analogų koncentracijos būtų lygios 10 proc., 50 proc. ir 90 proc. MTT redukcijos tyrimo metu jų nustatytų EC_{50} verčių. Kiekvienai junginio koncentracijai naudojama po tris šulinėlius. Plokštelės su ląstelėmis 72 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ atmosferoje.

Po 72 val. iš šulinėlių atsargiai nusiurbiami terpė ir pilama po 500 μ l naujos terpės. Į kiekvieną šulinėlį pilama po 3 μ l 10 mg/ml Hoechst 33342 vandeninio tirpalo ir 1 μ l 1 mg/ml propidžio jodido vandeninio tirpalo. Po 10 min. ląstelės fotografuojamos fluorescenciniu mikroskopu, naudojant 10 \times didinimo objektyvą. Padaroma po penkias skirtingose kiekvieno šulinėlio vietose augančių ląstelių nuotraukas.

Nuotraukose rankiniu būdu apskaičiuojama procentinė apoptozinių ir nekrozinų ląstelių dalis nuo bendro ląstelių skaičiaus. Gyvybingos ląstelės yra mėlynos spalvos, apoptozinės ląstelės susitraukia, jų branduoliai melsvi, o nekrozinės ląstelės nusidažo raudona spalva.

2.3.5. Poveikio ląstelių sferoidams tyrimas

Suformuoti sferoidus iš MDA-MB-231, MCF-7 ir BT-474 ląstelių taikytas 3D *Bioprinting* metodas. Šios ląstelių linijos buvo maišomos su žmogaus HF santykiu 1:1. 6 šulinėlių plokštelės šulinėliuose inkubuojamos krūties vėžio ląstelės ir žmogaus HF (apie 600 000 ląstelių viename šulinėlyje). Po 10-12 val. nuo inkubavimo pradžios į kiekvieną šulinėlį įpilama po 15 μ l nanodalelių NanoShuttle ir ląstelės inkubuojamos dar 8-10 val. Ląstelės tripsinizuojamos mitybinėje terpėje su 20 proc. serumo kiekiu, gaminamos suspensijos. Jos sumaišomos lygiais santykiais ir išpilstomos į 96 šulinėlių labai mažo prilipimo plokšteles po 100 μ l taip, kad kiekviename šulinėlyje būtų po 2500 MDA-MB-231 ar 2000 MCF-7 ir BT-474 krūties vėžio ląstelių ir po tiek pat HF. Paruošta plokštelė dedama ant magnetinės plokštelės ir inkubuojama 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂ atmosferoje.

Sferoidai iš MDA-MB-231, MCF-7 ir BT-474 ląstelių susiformavo per 48 val. Tuomet sferoidai kiekviename šulinėlyje fotografuojami fazių kontrastiniu mikroskopu, naudojant 10 \times (4 \times kai kuriems MCF-7 sferoidams) padidinimo objektyvą. Mitybinė terpė pakeičiama nauja terpe su skirtingomis SNT analogų koncentracijomis (EC_{50} ar $2\times EC_{50}$). Kaip neigiama kontrolė naudojama terpė su 0,2 proc. DMSO (tokia DMSO koncentracija buvo visuose šulinėliuose). Sferoidai fotografuojami kas 2 dienas, terpė taip pat keičiama kas 2 dienas. SNT analogų poveikis trimatėms kultūroms vertinamas pagal sferoidų skersmens pokytį, analizė atliekama naudojantis *ImageJ* programa.

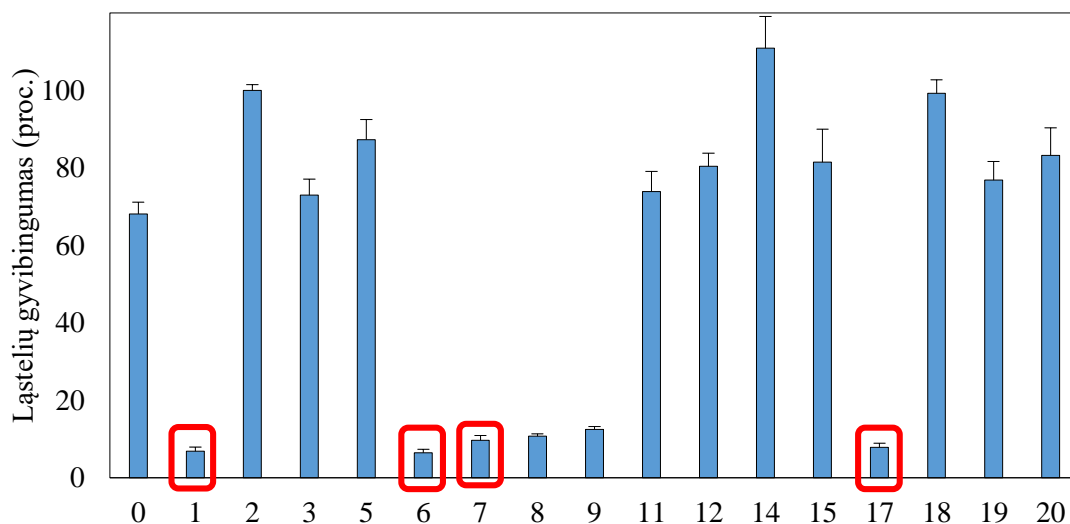
2.3.6. Statistinis duomenų įvertinimas

Gauti duomenys apdoroti *Microsoft Office Excel 2016* programa, apskaičiuojant trijų nepriklausomų eksperimentų metu gautų rezultatų vidurkius ir santykinius nuokrypius. Neviršijus norimo santykinio standartinio nuokrypio, vidurkiai palyginti naudojant Student'o t kriterijus. Skirtumai tarp lyginamų grupių laikomi statistiškai patikimais, kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

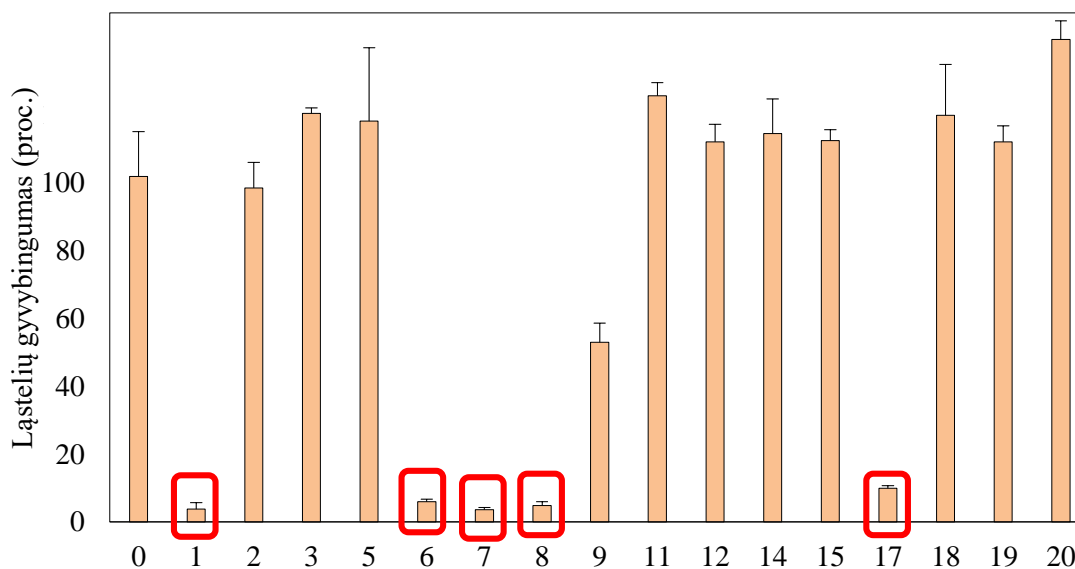
3.1. Sunitinibo analogų poveikis krūties vėžio ląstelių gyvybingumui

Atlikus MTT redukcijos testą, buvo atrinkti tie tiriami SNT analogai, kurie krūties vėžio ląstelių gyvybingumą sumažino labiausiai. SNT analogai tarpusavyje pasižymėjo skirtingu priešvėžiniu aktyvumu. MDA-MB-231 ląstelių linijai atrinkti keturi junginiai: 1, 6, 7 ir 17.



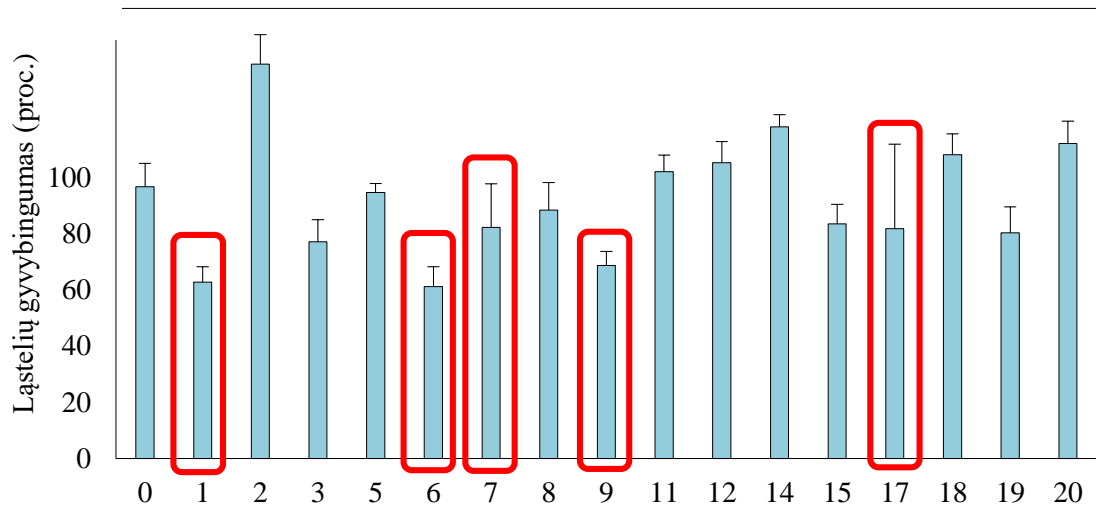
14 pav. Junginių aktyvumas MDA-MB-231 ląstelių linijai

MCF-7 ląstelių gyvybingumą slopino daugiau junginių. Kaip ir MDA-MB-231 ląstelių, MCF-7 gyvybingumą slopino 1, 6, 7, 17 taip pat dar vienas kitas – 8 junginys.



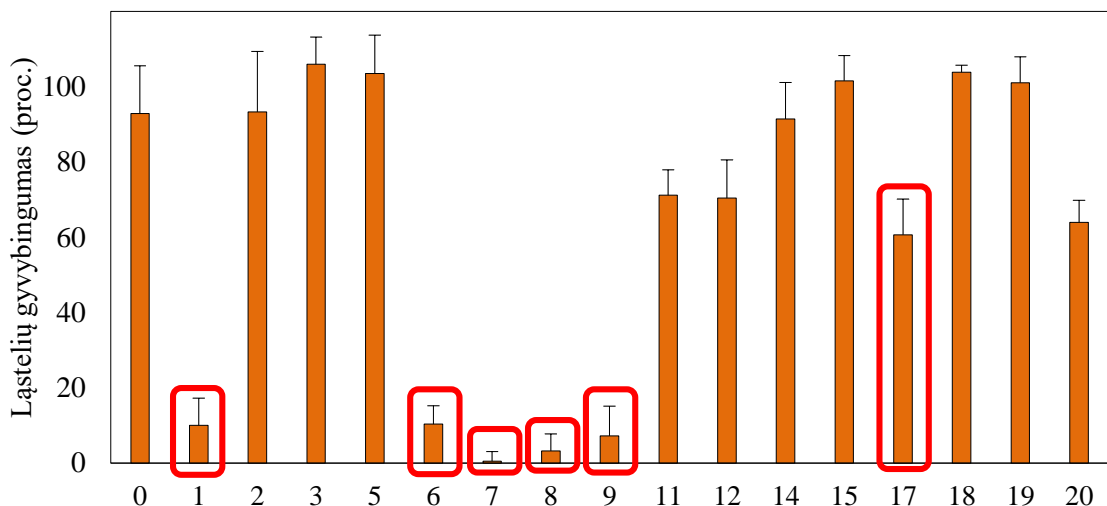
15 pav. Junginių aktyvumas MCF-7 ląstelių linijai

BT-474 ląstelių linijai taip pat atrinkti penki junginiai: 1, 6, 7, 17 bei 9, kuris efektyviai veikė tik šią ląstelių liniją. 1, 6, 7 ir 17 junginiai buvo atrinkti visoms trimis krūties vėžio ląstelių linijoms.



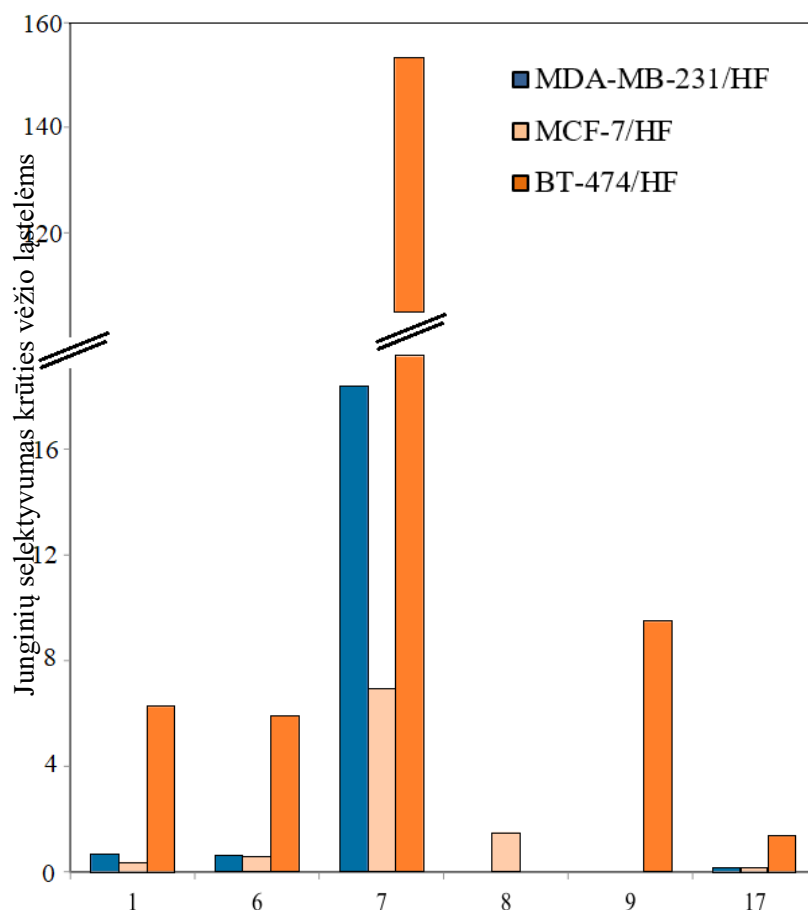
16 pav. Junginių aktyvumas BT-474 ląstelių linijai

Palyginimui su vėžinėmis ląstelėmis buvo naudota HF ląstelių kultūra. Jai taip pat buvo nustatinėjami aktyviausi junginiai. Rezultatai matomi. Šią liniją efektyviai veikė tie patys junginiai kaip ir vėžines ląsteles (1, 6, 7, 8, 9 ir mažiau 17).



17 pav. Junginių aktyvumas HF ląstelių linijai

Po MTT redukcijos testo su HF dar buvo apskaičiuotas atrinktų junginių selektyvumas vėžinėms ląstelėms – poveikio vėžinėms ir nevėžinėms ląstelėms santykis. Ne visi atrinkti junginiai vėžines ląsteles slopino labiau nei sveikas. Junginys 7 efektyviau veikė HF nei tirtas krūties vėžio ląsteles, taip pat visi junginiai buvo labiau aktyvūs slopinant HF nei BT-474 ląstelių liniją. Junginys 8 labiau veikė HF nei MCF-7 ląsteles. Vadinas šie anksčiau paminėti SNT analogai nebūtų tinkami vartoti kaip vaistai, nes paveiktų ir sveikas ląsteles. Pagal šį atliktą eksperimentą HF neveikė ir pritaikomumui taikinių terapijai pranašumą turi junginiai 1, 6, 8, 9 ir 17.

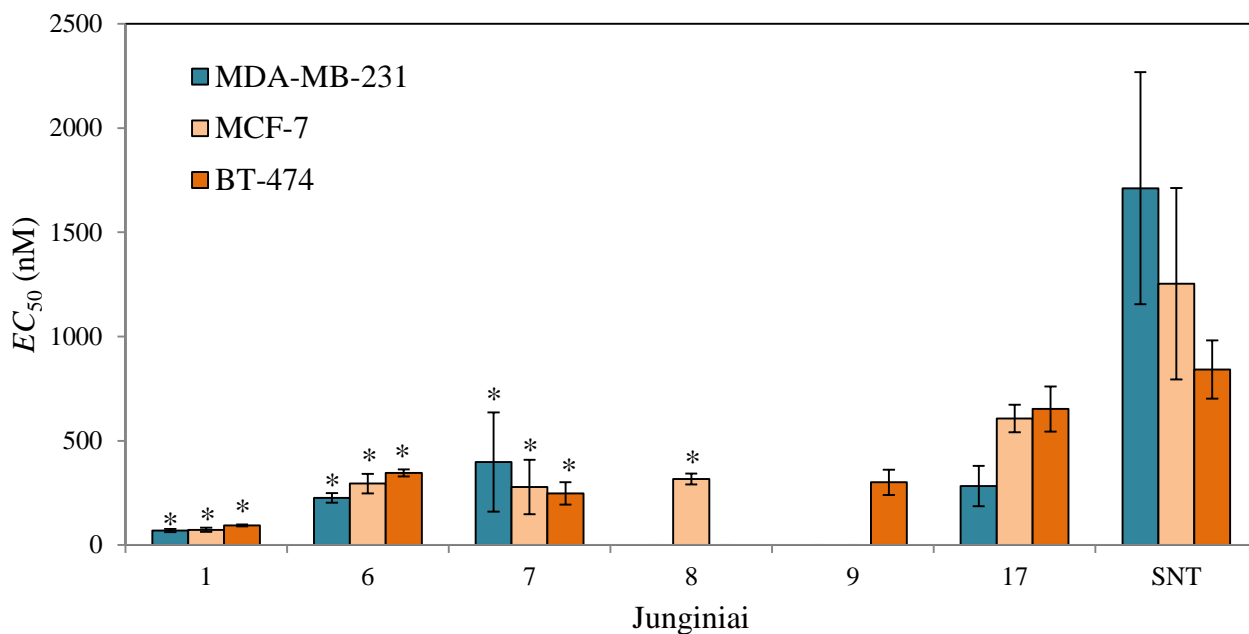


18 pav. Junginių selektyvumas vėžinėms ląstelėms, lyginant su poveikiu HF

Kito tyrimo metu nustatytos EC_{50} vertės (koncentracija, kuri slopina ląstelių gyvybingumą iki 50 proc.). Gautos junginių koncentracijų vertės buvo lyginamos su SNT. Po 72 val. didžiausiu priešvėžiniu aktyvumu abiem krūties vėžio ląstelių linijoms pasižymėjo junginys 1 (EC_{50} vertė MDA-MB-231 ir MCF-7 ląstelių linijose atitinkamai lygi $69,3 \pm 7,6$; $73,3 \pm 9,9$ nM). MDA-MB-231 linijai didelis priešvėžinis aktyvumas taip pat buvo nustatytas veikiant junginiu 6 ($258,3 \pm 23,2$ nM), o mažiausias – junginiu 7 ($502 \pm 5,3$ nM). MCF-7 ląstelių gyvybingumą mažiausiai slopino junginys 17 ($675 \pm 65,8$ nM). Pagal aktyvumą MDA-MB-231 ląstelėms junginiai išsidėstė tokia seka: $1 > 6 > 17 > 7$. MCF-7 ląsteles aktyviai veikė ir junginys 7 ($279 \pm 65,8$ nM). Tokie patys slopikliai MDA-MB-231 ir MCF-7 ląstelių linijas veikė panašiai, EC_{50} vertės tarp šių ląstelių linijų daugiau skyrėsi tik tiriant 17 junginį, o junginys 8 buvo tirtas tik su MCF-7 ląstelėmis.

Didžiausi aktyvumu, taip pat kaip ir prieš tai aptartoms ląstelių linijoms, BT-474 pasižymėjo junginys 1 (EC_{50} vertė lygi $94,3 \pm 5,1$ nM), o mažiausiu 17 ($652,7 \pm 108,1$). Panašiu aktyvumu BT-474 ir MDA-MB-231 bei MCF-7 linijoms pasižymėjo junginys 6, kurio EC_{50} vertė BT-474 ląstelėms lygi $346 \pm 16,4$ nM.

Kaip palyginamasis junginys buvo tiriamas SNT. Nors jis yra klinikoje vartojamas kinazių slopiklis, jo efektyviosios koncentracijos buvo didesnės už atrinktų SNT analogų. SNT EC_{50} vertės siekė nuo $903 \pm 84,6$ nM iki $1712 \pm 555,9$ nM.



19 pav. Aktyviausių junginių ir SNT EC_{50} verčių palyginimas tarp tirtų vėžinių ląstelių linijų; $n = 3$; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, $p < 0,05$

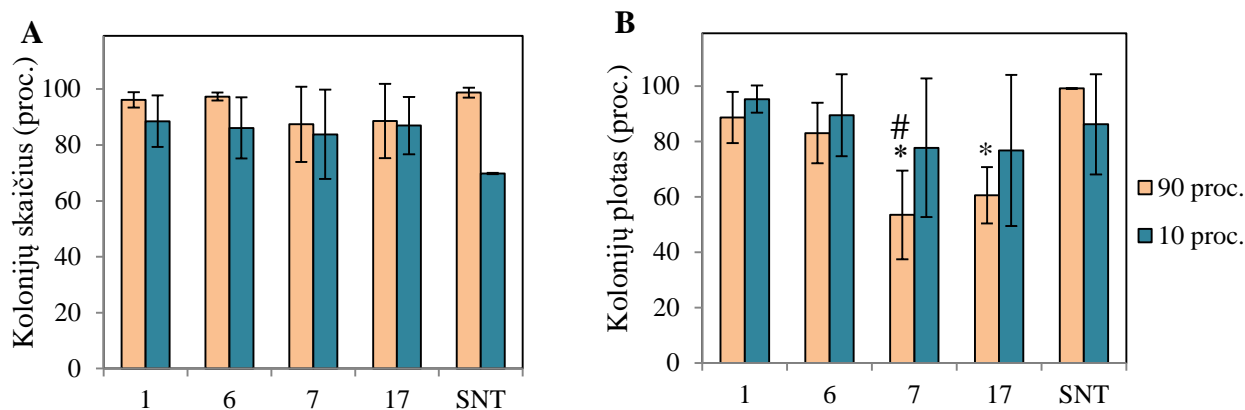
Konecny G. E. ir kitų autorių atliktame tyrime lapatinibo (selektyvus EGFR ir HER-2 tirozino kinazių slopiklis) EC_{50} vertė MDA-MB-231 ląstelių linijai lygi $18,6 \pm 9,8 \mu\text{M}$, o MCF-7 – $7,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$ [29]. Literatūroje nustatytos žymiai didesnės lipatinibo EC_{50} vertės už tiriamus SNT analogus gali būti dėl mažesnio junginio selektyvumo šioms ląstelių linijoms.

Agrawal ir kitų autorių tyrime nustatytas gefitinibo (mažos molekulinės masės slopiklis, turintis labai selektyvias ir grįžtamas tirozino kinazės slopinimo savybes, nukreiptas į EGFR. Tai yra stiprus slopiklis ne tik EGFR raiška pasižyminčiose ląstelėse, bet ir tose, kurios pasižymi papildoma HER2 raiška, galbūt gefitinibui tarpininkaujant EGFR / HER2 heterodimero fosforilinimo mažinimui) aktyvumas MCF-7 ląstelių linijai yra apie $3,33 \mu\text{M} = 3330 \text{ nM}$ [54]. Matome, kad EC_{50} vertės skiriasi net tarp konkrečių tirozino kinazės slopiklių bei yra žymiai didesnės nei nustatytos šiame darbe tirtų junginių (didžiausia $EC_{50} = 675 \pm 66 \text{ nM}$ su junginiu 17).

Moksliniame S. Goel ir kitų autorių tyrime nustatytas lapatinibo poveikis BT-474 ląstelių linijai, jo EC_{50} vertė yra apie 100 nM . Šis junginys veikė panašiai kaip mūsų tirtas aktyviausiu šiai ląstelių linijai nustatytas junginys 1 (EC_{50} vertė lygi $94,3 \pm 5,1 \text{ nM}$) [55].

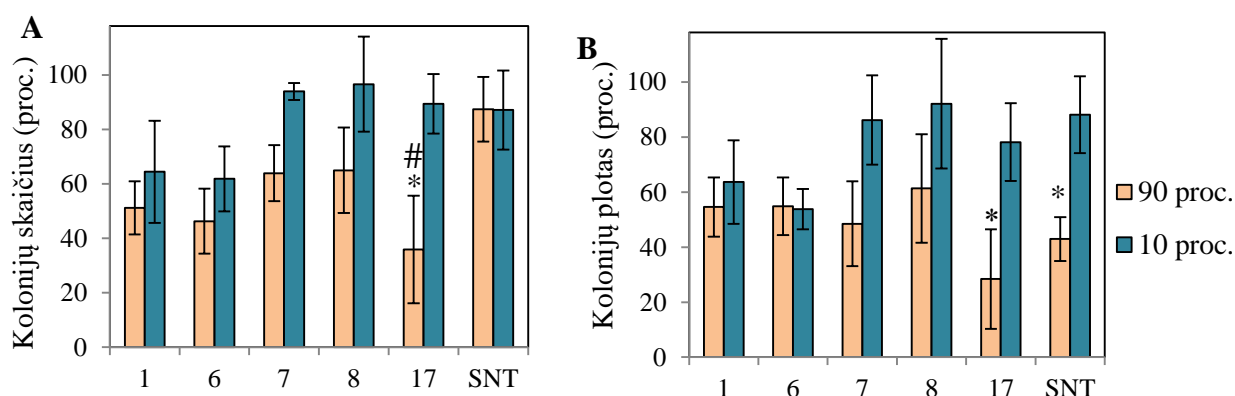
3.2. Sunitinibo analogų poveikis krūties vėžio ląstelių kamieniškumui

Tirti SNT analogai tam tikromis koncentracijomis mažina besiformuojančių žmogaus krūties vėžio ląstelių kolonijų skaičių bei plotą. Nei vienas iš tirtų SNT analogų reikšmingai nemažina MDA-MB-231 ląstelių linijos kolonijų skaičiaus ar ploto. Tą būtų galima paaiškinti tuo, kad ši ląstelių linija atspari daugeliui vaistų, dėl receptorių nebuvimo paviršiuje. Didesniu aktyvumu MDA-MB-231 ląstelių linijai pasižymėjo junginio 7 90 proc. koncentracija nuo nustatytos EC_{50} vertės. Jis susidariusių kolonijų plotą lyginant su kontrole mažino iki 70,8 proc.



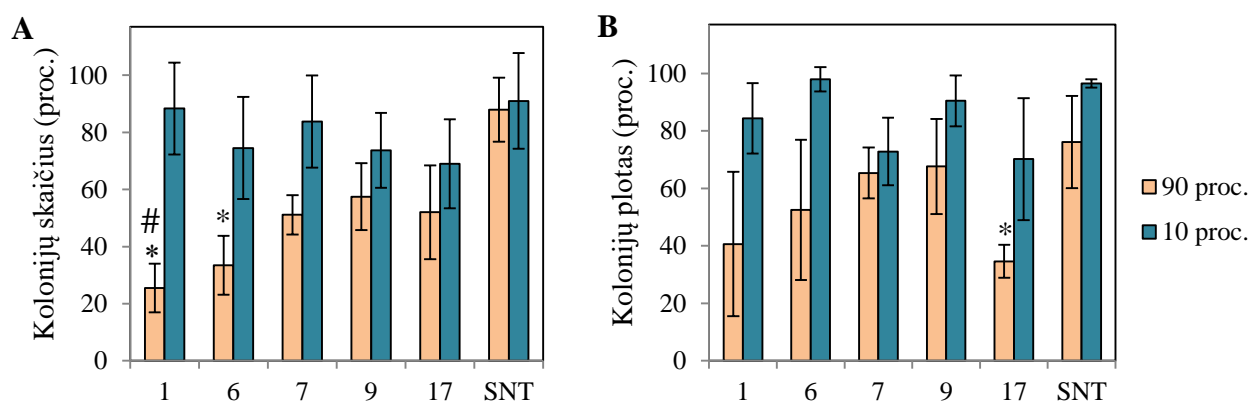
20 pav. SNT analogų ir SNT poveikis MDA-MB-231 kolonijų formavimui. Poveikis skaičiui (A) ir plotui (B) po 14 dienų inkubacijos su junginiais; $n = 3$; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinės grupių, $p < 0,05$; # pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, $p < 0,05$

MCF-7 ląstelių linijos kolonijų skaičių ir plotą efektyviausiai sumažino junginio 17, kuris pakaite turi jodo atomą, 90 proc. koncentracija nuo nustatytos EC_{50} vertės, kolonijų skaičius sumažėjo iki 32,2 proc., o plotas – 22,4 proc. Šios ląstelių linijos kamieniškumą reikšmingai mažino ir SNT.



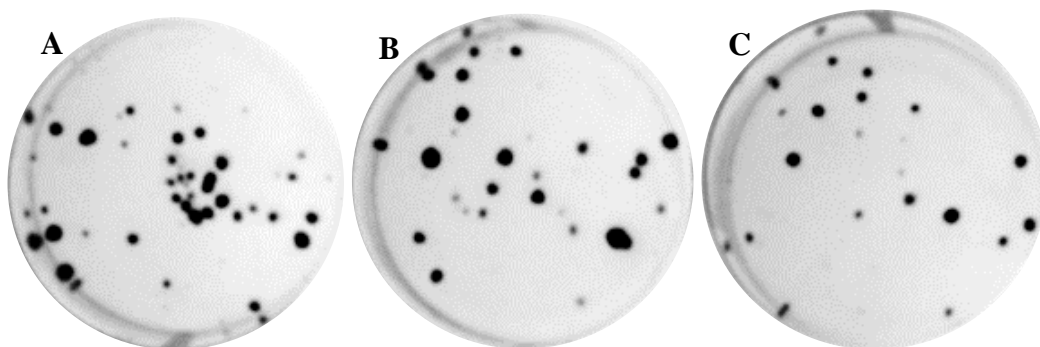
21 pav. SNT analogų ir SNT poveikis MCF-7 kolonijų formavimui. Poveikis skaičiui (A) ir plotui (B) po 14 dienų inkubacijos su junginiais; $n = 3$; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinės grupių, $p < 0,05$; # pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, $p < 0,05$

SNT analogai labiausiai paveikė BT-474 ląstelių linijos kamieniškumą. Besiformuojančių kolonijų skaičių aktyviausiai paveikė junginio 1 90 proc. koncentracija (iki 25,5 proc.), o kolonijų plotą – junginys 17 (iki 35,8 proc.). 10 proc. visų tirtų junginių koncentracijos reikšmingai nemažino nei kolonijų skaičiaus, nei jų ploto.



22 pav. SNT analogų ir SNT poveikis BT-474 kolonijų formavimui. Poveikis skaičiui (A) ir plotui (B) po 14 dienų inkubacijos su junginiais; $n = 3$; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinės grupių, $p < 0,05$; # pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, $p < 0,05$

Besiformuojančių kolonijų skaičių ir plotą skirtingų koncentracijų junginiai veikia skirtingai. Didesnė SNT analogų koncentracija labiau mažina ląstelių gebėjimą formuoti kolonijas.



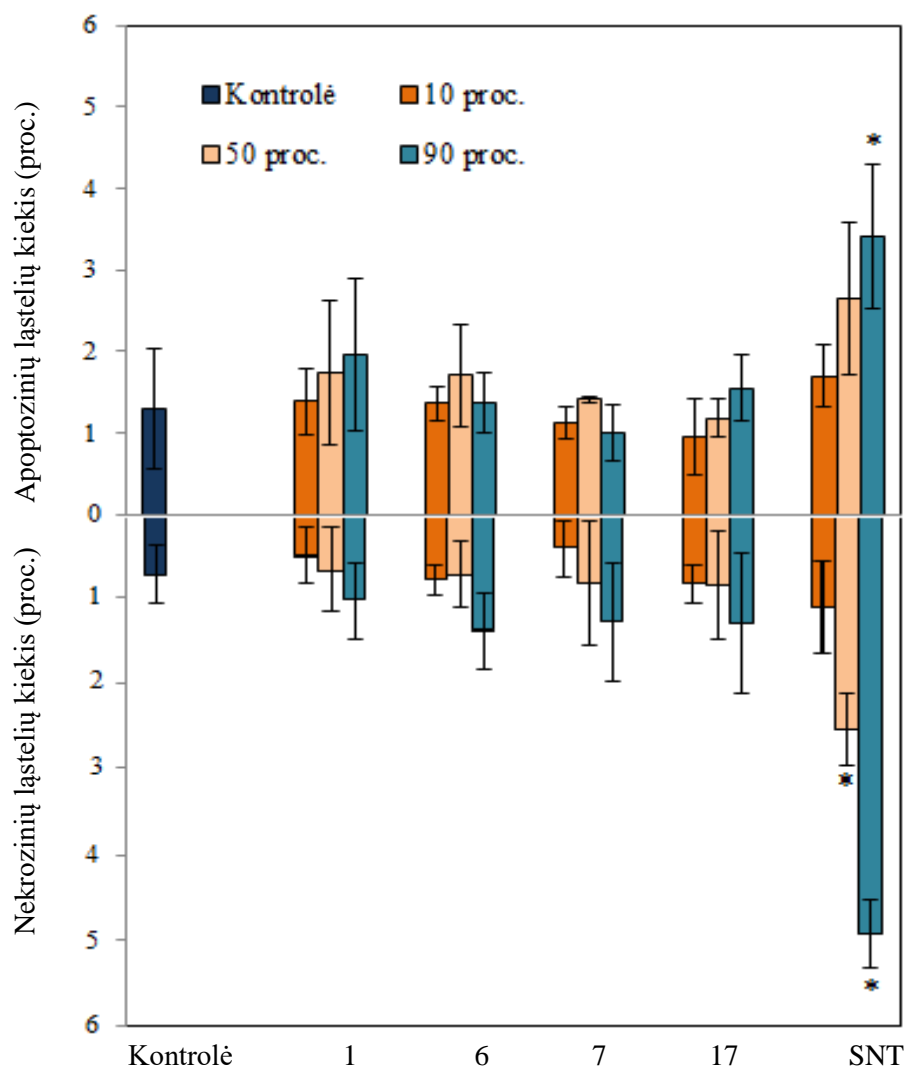
23 pav. Junginio 1 gebėjimas slopinti MCF-7 ląstelių linijos kamieniškumą. A – ląstelių kolonijos, nepaveiktos junginiu 1, kontrolė, B – ląstelių kolonijos, paveiktos 10 proc. EC_{50} junginiu 1, C – ląstelių kolonijos, paveiktos 90 proc. EC_{50} junginiu 1

Kiti mokslininkai gavo panašius rezultatus. J. Nautiyal straipsnyje rašoma, kad MDA-MB-231 ląstelių, turinčių trigubai neigiamo krūties vėžio savybių, gyvybingumą slopino dasatinibas (tirozinkinazės slopiklis), tačiau šis junginys nepaveikė kolonijų formavimo, kaip ir mūsų atliktame eksperimente su SNT analogais. Trigubai neigiamas krūties vėžys – agresyvus krūties vėžys, kuris atsparus dabartiniam gydymui, nors ir pasižymi dideliu EGFR kiekiu. Įrodyta, kad jis yra atsparus net EGFR taikinių terapijai. Pavyzdžiui, tame pačiame straipsnyje rašoma, kad MDA-MB-231 ląstelės yra atsparios cetuksimabui (monokloninis antikūnas prieš EGFR) [56]. Mokslininkams, ištyrus nuo Ca^{2+} / kalmodulino priklausomus serino / treonino kinazės, Janus kinazės-3, I κ B kinazės slopiklius, paaiškėjo, kad jie mažina MCF-7 ląstelių kolonijų susidarymą virš 50 proc. [57]. Tai yra netgi beveik 20 proc. daugiau nei mūsų tirti SNT analogai. Kitame tyrime trastuzumabas BT-474 ląstelių kolonijų augimą slopino minimaliai, o vien SF1126 (kinazių slopiklis) sukėlė 50 proc. slopinimą. Kombinuojant trastuzumabą ir SF1126, buvo pasiektas šiek tiek stipresnis kolonijų augimo slopinimas nei veikiant vien tik SF1126. Taigi, SF1126 kartu su trastuzumabu augimą slopino efektyviau HER2- išraiška pasižyminčioms krūties vėžio ląstelėms, nes jos tapo atsparios

trastuzumabui [58]. Mūsų atliktame eksperimente nebuvo pasiektas toks kamieniškumo slopinimas BT-474 ląstelėms.

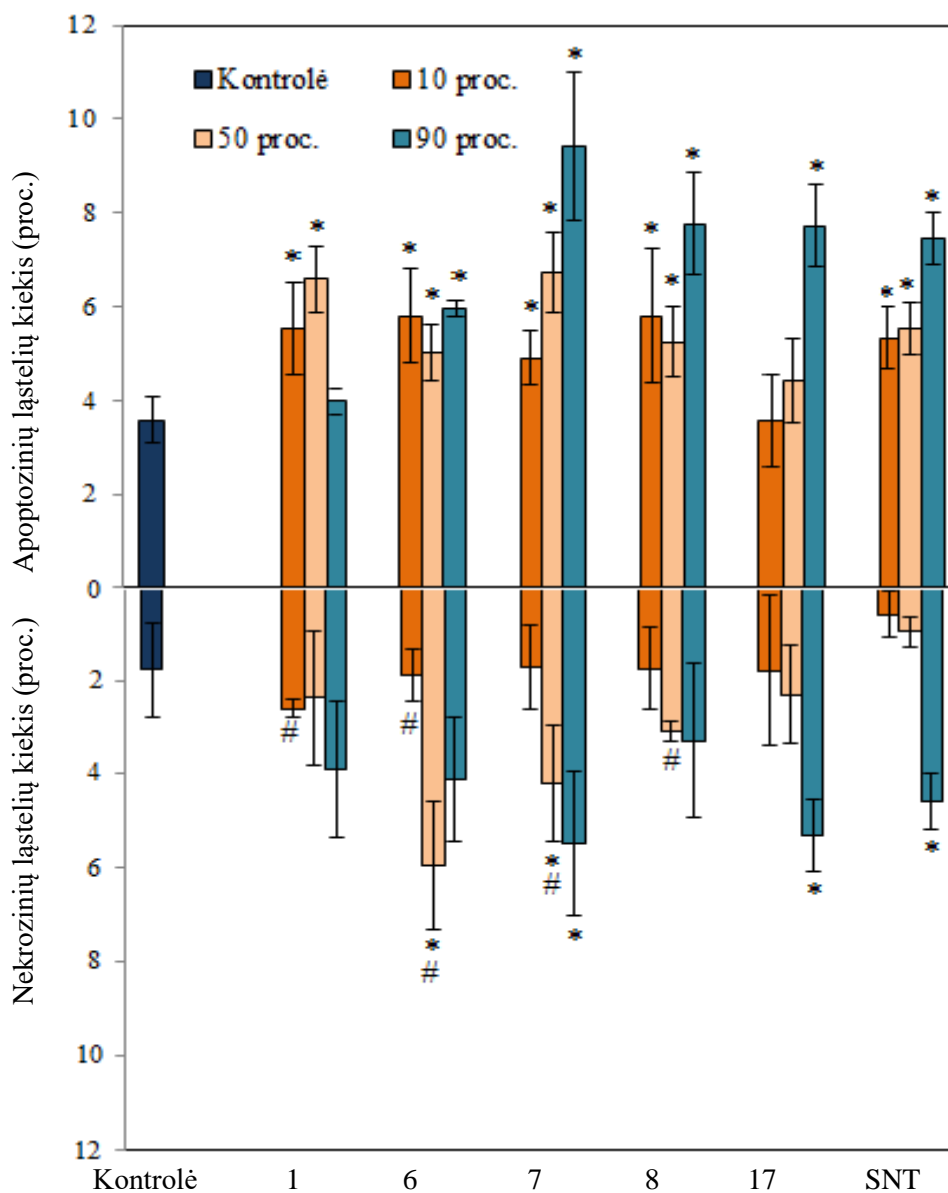
3.3. Sunitinibo analogų sukeliamas ląstelių žūtis būdas

Buvo vertinama, kokiū būdu – apoptozės ar nekrozės – yra sukeliama ląstelių žūtis. Tyrimo rezultatai parodė, jog MDA-MB-231 ląstelių linijai tik nedideliame skaičiui ląstelių SNT analogai sukėlė ląstelių apoptozę bei nekrozę ($p > 0,05$), tačiau pats SNT sukėlė ir apoptozę, ir nekrozę ($p < 0,05$). Apoptozinių ląstelių, jas veikiant su šiai linijai atrinktais analogais, susiformavo daugiau.



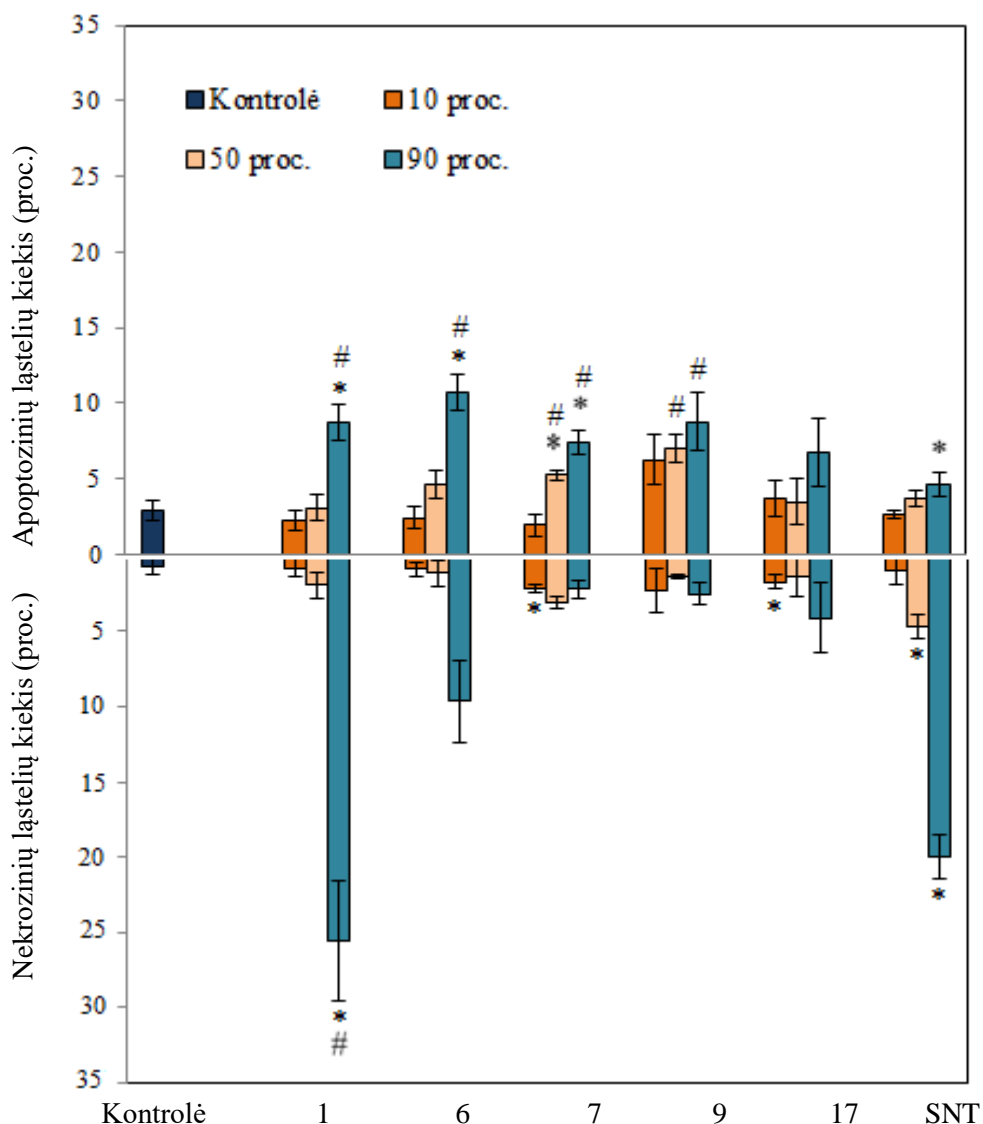
24 pav. Apoptozinių ir nekrozių MDA-MB-231 ląstelių kiekis paveikus SNT analogais ir SNT; $n = 3$; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinės grupių, $p < 0,05$; # pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, $p < 0,05$

MCF-7 ląstelių linijai apoptozę sukėlė visi junginiai, ypač junginio 7 didžiausia koncentracija. Ląstelių nekrozę sukeliantis poveikis buvo reikšmingas veikiant junginiais 6, 7 (50 proc. EC_{50}) ir 17 (90 proc. EC_{50}) ($p > 0,05$). Junginiai 6 ir 7 veikė aktyviau už SNT.



25 pav. Apoptozinių ir nekrozių MCF-7 ląstelių kiekis paveikus SNT analogais ir SNT; n = 3; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinės grupių, $p < 0,05$; # pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, $p < 0,05$

BT-474 ląstelių linijai apoptozę sukėlė junginių 1, 6 ir 7 didžiausia koncentracija (90 proc. EC_{50}), jie veikė aktyviau ir už SNT. Nekrozę taip pat sukėlė junginio 1 90 proc. EC_{50} (aktyviau už SNT) ir tokia pati koncentracija SNT ($p < 0,05$).



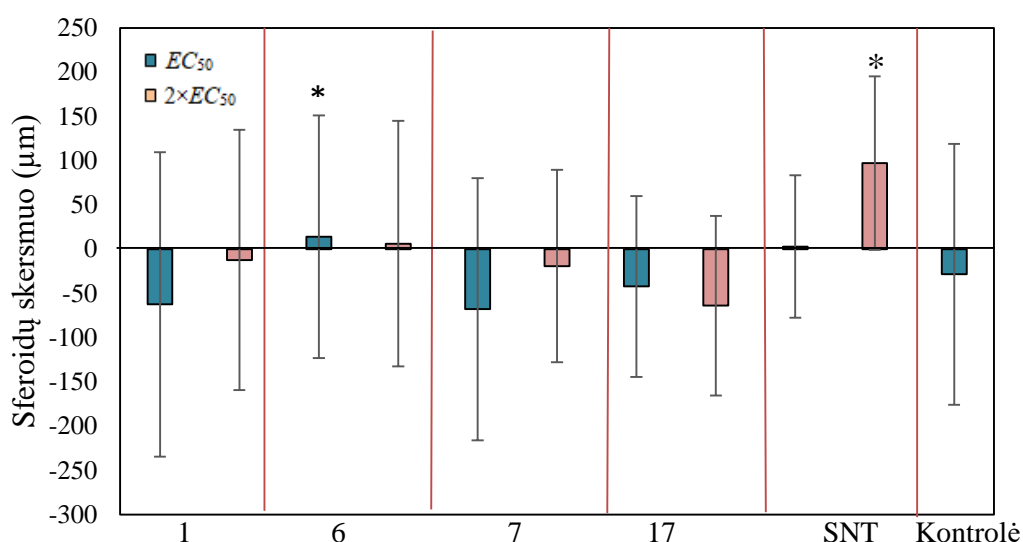
26 pav. Apoptozinių ir nekroziųjų BT-474 ląstelių kiekis paveikus SNT analogais ir SNT; n = 3; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinės grupių, p < 0,05; # pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, p < 0,05

Mokslininkas Li Jin-Ping ištyręs ir aprašęs kai kurių ir šiame darbe tiriamų ląstelių linijų žūties būdą, veikiant jas aurora A kinazės slopikliu alisertibu. Nustatytas apoptozinių MCF-7 ląstelių skaičius kontrolinėmis sąlygomis buvo 16,7 proc., o MDA-MB-231 ląstelių 15,8 proc. Paveikus MCF-7 ląsteles alisertibu, bendras apoptozės procentas padidėjo 2,1 karto, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Panašiai ir MDA-MB-231 ląstelėms. Bendras apoptozinių ląstelių procentas padidėjo 2,2, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis [48]. Mūsų atliktame eksperimente mažesniai kiekiui ląstelių buvo sukelta apoptozė ir skirtingai nei aptartame straipsnyje, MDA-MB-231 ląstelės buvo mažiau jautrios SNT analogams nei MCF-7 ląstelės. Apie BT-474 ląstelėms sukiamą žūties būdą rašoma, kad tiek grįžtami, tiek ir negrįžtami pan-ERBB slopikliai slopino ląstelių proliferaciją ir sukėlė apoptozę veikiant lapatinibu (mažos molekulinės masės kinazių slopiklis, ERBB2 slopiklis, kaip ir humanizuotas monokloninis antikūnas trastuzumabas) atsparioms ląstelėms. Dar nustatyta, kad būtent ERBB2 arba ERBB3 slopinimas sukelia BT-474 ląstelių apoptozę [59]. Mums ir su kai kuriais SNT analogais pavyko sukelti BT-474 ląstelių linijos apoptozę bei nekrozę.

3.4. Sunitinibo analogų poveikis vėžio ląstelių sferoidams

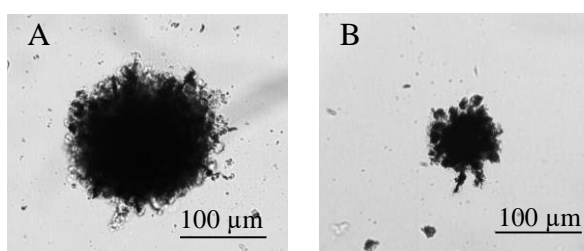
Trimačių ląstelių kultūrų tyrimai leidžia geriau prognozuoti junginio poveikį gyvame organizme. Norint įvertinti, ar SNT analogams priešvėžinis aktyvumas būdingas ne tik dvimatėse ląstelių kultūrose, jais buvo veikiami krūties vėžio ląstelių sferoidai.

SNT analogų poveikis truputį skyrėsi dvimatėse ir trimatėse kultūrose. MDA-MB-231 sferoidų plotą mažino junginiai 1, 7 ir 17. Kiti junginiai veikė panašiai, išskyrus SNT, kurio $2 \times EC_{50}$ koncentracija sferoidų ploto nesumažino.



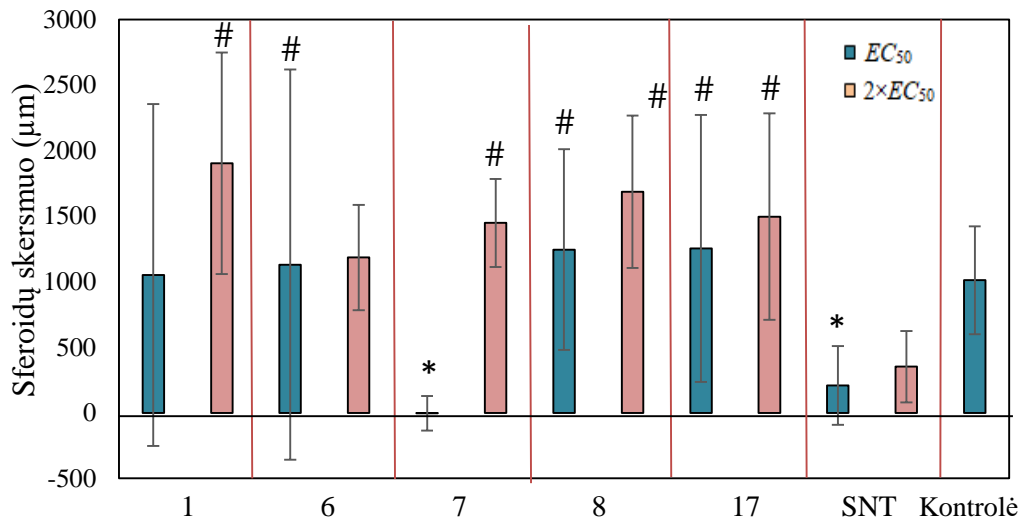
27 pav. MDA-MB-231 sferoidų dydžio kitimas inkubuojant su SNT analogais ir SNT; $n = 3$; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinės grupių, $p < 0,05$; # pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, $p < 0,05$

MDA-MB-231 sferoidus veikiant junginiais, kurie aktyviai slopina jų augimą, sferoidai palaipsniui ima mažėti. Jų ploto sumažėjimas parodo, kad tiriamasis junginys yra aktyvus ir galima numatyti, kad ir navikus gyvame organizme paveiktų panašiai, tai yra stabdytų jų augimą.



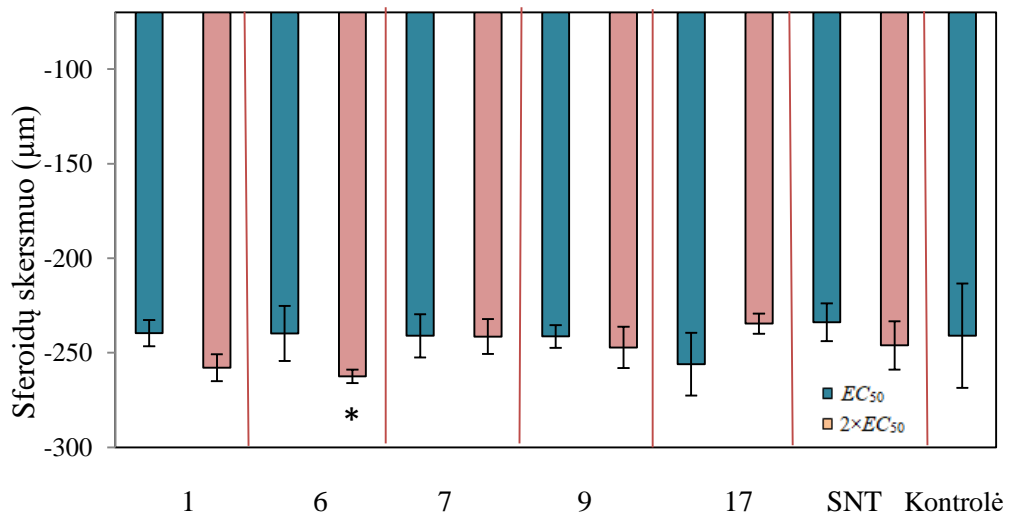
28 pav. MDA-MB-231 ląstelių linijos sferoidai prieš ir po inkubacijos su junginiu 7. A – kontrolė (0 diena) – sferoidas, nepaveiktas SNT analogais, B – sferoidas po 14 dienų inkubacijos su SNT analogais

MCF-7 ląstelių linijos trimatės kultūros buvo mažiau jautrios SNT analogams nei dvimatės ląstelės, išaugintos monosluoksniu. MCF-7 sferoidai palaipsniui didėjo. Tik vienas iš tirtų SNT analogų (junginys 7) reikšmingai slopino sferoidų augimą.



29 pav. MCF-7 sferoidų dydžio kitimas inkubuojant su SNT analogais ir SNT; n = 3; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinės grupių, p < 0,05; # pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, p < 0,05

BT-474 ląstelių sferoidai iš pradžių buvo panašaus dydžio. Po 14 dienų auginimo su skirtingais junginiais, sferoidų skersmuo sumažėjo. Lyginant su kontrole, sferoidų, paveiktų kai kuriais junginiais, skersmuo reikšmingai sumažėjo. Po dviejų savaičių sferoidai, paveikti įvairiais slopikliais, buvo mažesni už kontrolinius. Visi junginiai parodė slopinantį poveikį sferoidų augimui (junginiai 1 ir 6 labiausiai sumažino sferoidų dydį, lyginant su kontrole).



30 pav. BT-474 sferoidų dydžio kitimas inkubuojant su SNT analogais ir SNT; n = 3; * pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinės grupių, p < 0,05; # pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų junginių ir SNT, p < 0,05

Kinazių slopiklių poveikį šioms krūties vėžio ląstelėms yra ištyrę ir kiti mokslininkai. Amy L. Howes BT-474 ląstelių sferoidai buvo formuoti kabančio lašo metodu, juos pavyko suformuoti ir iš vienu BT-474 ląstelių, ir kartu su nevėžinėmis MCF-10A ląstelėmis [60]. Pastarasis variantas buvo pranašesnis ir labiau primena mūsų taikytą sferoidų formavimo koncepciją: vėžinių ir nevėžinių

ląstelių derinimą. Mūsų darbe sferoidai tik iš BT-474 ląstelių taip pat nebuvo formuojami, derinyje buvo naudojamos HF ląstelės. Taip lengviau suformuoti gražios apvalios formos sferoidus.

Mokslininkai nustatė, kad HER2 receptorių raiška, aktyvacija ir signalo perdavimas trimatėse ir dvimatėse kultūrose skiriasi [60]. BT-474 ląstelėse pastebėtas stiprus HER2 fosforilinimas, ypač dvimatėse kultūrose. Pažymėtina, kad HER2 fosforilinimas buvo daug mažesnis trimatėse kultūrose. Trimatės kultūros buvo labiau jautrios priešvėžinių vaistų lapatinibo ir gefitinibo poveikiui, nei dvimatės.

Maria F. Gencoglu iš BT-474 ir MCF-7 ląstelių suformavo labai kompaktiškus sferoidus, o MDA-MB-231 sferoidai buvo dideli ir netaisyklingos formos. Mūsų atliktame tyrime tik MCF-7 ląstelės suformavo didelius sferoidus [61].

Panašius į mūsų tyrime gautus rezultatus gavo mokslininkas Luqi Wang ir kiti. MDA-MB-231 ląstelių (ER-neigiama) ir MCF-7 (ER-teigiama) sferoidų augimą slopino kinazių slopiklis AZD7762. MDA-MB-231 sferoidai buvo jautresni šiam junginiui nei MCF-7 ląstelėmis sferoidai [62].

Apibendrinant SNT analogų poveikį skirtingose krūties vėžio ląstelių trimatėse kultūrose, galima teigti, kad junginiai slopina trigubai neigiamo krūties vėžio sferoidų augimą (MDA-MB-231), bet neveikia luminalinio A tipo sferoidų (MCF-7) augimo. Luminalinio B tipo (BT-474) trimatės kultūras buvo jautriausia tiriamų analogų poveikiui. Tai galbūt sąlygoja tai, kad šis krūties vėžio tipas pasižymi visų trijų receptorių raiška.

Visi šie atlikti tyrimai leidžia įvertinti SNT analogų priešvėžinį poveikį skirtingoms ląstelių kultūroms ir tolimesnes perspektyvas, taikant juos krūties vėžiu sergančių žmonių gydymui. Atrinkus aktyviausius junginius kiekvienai ląstelių linijai, taikytas krūties vėžio ląstelių gyvybingumo tyrimas. Juo nustatyta, kad junginys 1 labiausiai slopina visų ląstelių linijų gyvybingumą ir aktyviau už SNT. Jis iš kitų SNT analogų chemine struktūra išsiskiria tuo, kad turi chloro pakaitą, kuris galimai suteikia šiam junginiui daugiau galimybių prisijungti prie receptorių, esančių vėžinių ląstelių paviršiuje.

Įdomu tai, kad kai kurie SNT analogai veikia tik tam tikrą vieną ląstelių liniją. Tai reiškia, jog sergantiesiems krūties vėžiu tikslinga pagal vėžio tipą pritaikyti individualų gydymą. Junginiai 6 ir 7, taip pat veikia visų ląstelių linijų gyvybingumą aktyviau už SNT. Junginys 7 dar ir efektyviai mažina trigubai neigiamo krūties vėžio ląstelių linijos (MDA-MB-231) susidariusių kolonijų plotą. Šis junginys savo struktūroje turi jodo pakaitą (toje pačioje vietoje kaip ir junginys 1 turi chloro pakaitą). Tačiau junginys 7 taip efektyviai neveikia nei MCF-7 nei BT-474 ląstelių linijų kamieniškumo. Jų abiejų kamieniškumą mažina junginys 17.

Kalbant apie ląstelių žūties būdą jas veikiant SNT analogais, galima teigti, kad junginiai sukelia ląstelių apoptozę. Šis žūties būdas lemia efektyvesnę krūties vėžio gydymą, nes sumažėja tikimybė pakartotiniam auglio vystymuisi. MCF-7 ląstelių linijos apoptozę aktyviausiai sukelia junginys 7, o BT-474 – junginiai 1, 6 ir 7. Norint tiksliau įvertinti būsimą SNT analogų poveikį žmogaus organizme buvo tiriamas jų poveikis trimatėms vėžinėms ląstelėms – sferoidams. MDA-MB-231 sferoidus mažina tas pats junginys 1, kuris efektyviai šią ląstelių liniją veikė ir anksčiau aptartuose tyrimuose, bei junginiai 7 ir 17. Kito krūties vėžio tipo ląstelių linijos MCF-7 sferoidai sunkiau paveikiami tiriamais junginiais, tačiau BT-474 sferoidų augimą slopina visi analogai, aktyviausiai junginys 6.

Lyginant su kitų mokslininkų atliktais tyrimais, šie kinazių slopikliai ląstelių kultūrose aktyvūs mažomis koncentracijomis, kas galėtų lemti jų mažesnę toksiškumą žmogaus organizmui. SNT analogai yra aktyvūs net prieš trigubai neigiamo krūties vėžio ląsteles, nors pagal iki šiol atliktus tyrimus šio tipo vėžio gydymui taikomi junginiai nebuvo aktyvūs.

Išvados

1. Šeši iš septyniolikos tirtų sunitinibo analogų pasižymi priešvėžiniu aktyvumu prieš MDA-MB-231, MCF-7 ir BT-474 krūties vėžio ląstelių linijas ir daugelis jų aktyvesni už sunitinibą. Junginys 1 labiausiai slopina tirtų ląstelių linijų gyvybingumą. Junginio 1 priešvėžinio aktyvumo EC_{50} vertės yra nuo $69,3 \pm 7,6$ iki $94,3 \pm 5,1$ nM.
2. Sunitinibo analogai labiausiai mažina BT-474 ląstelių linijos kamieniškumą. Besiformuojančių kolonijų skaičių aktyviausiai mažina junginys 1, o kolonijų plotą – junginys 17. MCF-7 ląstelių linijos kolonijų skaičių ir plotą aktyviausiai mažina junginys 17. MDA-MB-231 ląstelių linijai, kuri yra trigubai neigiama, junginiai 7 ir 17 mažina tik kolonijų plotą.
3. Tirti junginiai apoptozę ir nekrozę labiau sukėlė MCF-7 ir BT-474 ląstelių linijoms nei MDA-MB-231. Pagrindinis ląstelių žūties būdas – apoptozė.
4. Junginiai 1, 7 ir 17 mažina MDA-MB-231 sferoidų augimą. MCF-7 sferoidai buvo mažiau jautrūs tiriamiems analogams, o ir BT-474 sferoidų plotui SNT analogai neturėjo poveikio.

Literatūros sąrašas

1. BREAST CANCER FOUNDATION, INC. Breast Cancer Facts [žiūrėta 2019 m. kovo 18 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-facts>
2. ARORA, Amit ir Eric M.SCHOLAR. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005, 315(3):971–9.
3. GRANT, Saltonstall-Kennedy. Therapeutic Protein Kinase Inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009, 66(7):1163–77.
4. GROSS, Stefan, et al. Targeting cancer with kinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*. 2015, 125(5).
5. NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION, INC. Breast Cancer Facts [žiūrėta 2019 m. balandžio 19 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-facts>
6. SIEGEL Rebecca. L., Kimberly D.MILLER ir Ahmedin JAMAL. Cancer Statistics, 2019. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2019, 69(1):7–34.
7. L24.lt. Lietuvoje auga sergamumas vėžiu. Prieiga per internetą: <http://l24.lt/lt/sveikata/item/229766-lietuvoje-auga-sergamumas-veziu>
8. BRAY Freddie, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians* [interaktyvus]. 2018, 68(6):394–424 [žiūrėta 2019 m. balandžio 29 d.]. Prieiga per: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>
9. CANCER RESEARCH UK. Worldwide cancer mortality statistics [žiūrėta 2019 m. gegužės 12 d.]. Prieiga per internetą: [http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/mortality#heading-Zero](http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/mortality#heading-Zero%0Ahttp://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/mortality#heading-Zero)
10. CANCER.NET. Breast Cancer: Statistics [žiūrėta 2019 m. gegužės 12 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/statistics>
11. NAROD, Steven A., et al. Breast cancer mortality after a diagnosis of ductal carcinoma in situ. *JAMA Oncology*. 2015, 1(7):888–96.
12. BRASIŪNIENĖ, Birutė. Šiuolaikinis požiūris į išplitusio krūties vėžio gydymą Bendros žinios: išgyvenamumas. Nacionalinis vėžio institutas [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2019 m. gegužės 12 d.]. Prieiga per: https://www.nvi.lt/uploads/pdf/Konferencijos_medziaga/OASSG.Brasiuniene2.pdf
13. AMERICAN CANCER SOCIETY. What is breast cancer [žiūrėta 2019 m. gegužės 12 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
14. HOLLIDAY, Deborah L. ir Valerie SPEIRS. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*. 2011.
15. COMSA Serban, Anca Maria CIMPEAN ir Marius RAICA. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line : 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*. 2015;3154:3147–54.
16. ATCC. BT-474 [žiūrėta 2019 m. gegužės 12 d.]. Prieiga per internetą: https://www.lgcstandards-atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cBT%2f-474%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=BT-474&geo_country=se&redir=1
17. ECACC. European Collection of Authenticated Cell Cultures. Cell line profile MDA-MB-231. 2017, 231(92020424):1–3 [žiūrėta 2019 m. gegužės 14 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>
18. NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION, INC. Triple negative breast cancer [žiūrėta 2019 m. gegužės 12 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.nationalbreastcancer.org/triple-negative-breast-cancer>
19. BIANCHINI Giampaolo, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a

- heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology* [interaktyvus]. 2016, 13(11):674–90 [žiūrėta 2019 m. gegužės 13 d.]. Prieiga per: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184417> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5461122>
20. WAKS Adrienne G. ir Eric P. WINER. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA The Journal of the American Medical Association*. 2019 321(3):288–300.
 21. NACIONALINIS VĖŽIO INSTITUTAS. Krūtų vėžys [žiūrėta 2019 m. gegužės 13 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.nvi.lt/gydymas-11/>
 22. ONKOLOGO PUSLAPIAI. Išplitusių krūties vėžių sergančioms moterims – naujas gydymas [žiūrėta 2019 m. gegužės 12 d.]. Prieiga per internetą: <https://onkologopuslapiai.lt/naujienos/isplitusiu-kruties-veziu-sergancioms-moterims-naujas-gydymas/>
 23. MILLER Kimberly D., et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *A Cancer Journal for Clinicians* [interaktyvus]. 2016, 66(4):271–89 [žiūrėta 2019 m. gegužės 14 d.]. Prieiga per: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27253694>
 24. GERBER David E. Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. *American Family Physician*. 2008, 77(3):311–9.
 25. FALZONE Luca, Salvatore SALOMONE ir Massimo LIBRA. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Frontiers in Pharmacology*. 2018, 9 (NOV).
 26. DAVIES Stephen P., et al. Protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*. 2000, 105(351):95–105.
 27. FINN Richard S., et al. Targeting the cyclin-dependent kinases breast cancers. *Breast Cancer Research* [interaktyvus]. 2016, 1–11 [žiūrėta 2019 m. gegužės 14 d.]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-015-0661-5>
 28. KANG Jian, et al. Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4 / 6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2014, 1:1–13.
 29. KONENCY Gottfried E., et al. Activity of the Dual Kinase Inhibitor Lapatinib (GW572016) against HER-2-Overexpressing and Trastuzumab-Treated Breast Cancer Cells. *American Association for Cancer Research*. 2006, (3):1630–40.
 30. NOBLE Martin E. M., Jane A. ENDICOTT ir Louise N. JOHNSON. Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure. *Science*. 2004, 303(5665):1800–5.
 31. BHULLAR Khushwant S., et al. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer*. 2018, 17(1):1–20.
 32. LAVANYA V, et al. Small molecule inhibitors as emerging cancer therapeutics. *Integrative Cancer Science and Therapeutics* [interaktyvus]. 2014;1(3):39–46. [žiūrėta 2019 m. gegužės 17 d.]. Prieiga per: <http://www.oatext.com/pdf/ICST-1-109.pdf>
 33. PAYNE Sarah ir David MILES. Mechanisms of anticancer drugs. *The Journal of Cell Biology* [Internet]. 2018 [žiūrėta 2019 m. gegužės 17 d.]. Prieiga per: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780203731031>
 34. WU Peng, Thomas E. NIELSEN ir Mads H. CLAUSEN. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences* [interaktyvus]. 2015, 36(7):422–39 [žiūrėta 2019 m. gegužės 17 d.]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005>
 35. WU Peng, Thomas E. NIELSEN ir Mads H. CLAUSEN. Small-molecule kinase inhibitors: An analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discovery Today* [interaktyvus]. 2016, 21(1):5–10 [žiūrėta 2019 m. gegužės 18 d.]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.07.008>
 36. YADAV A. V., et al. Co-Crystals: A Novel Approach to Modify Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009
 37. KLAEGGER Susan, et al. The target landscape of clinical kinase drugs. *Science*. 2017;358(6367).
 38. RUSSU Wade A. Kinase Inhibitors — Targeted Personalized Cancer Therapy. *Cancer Treatment*.

- 2016, 13.
39. ROSKOSKI Robert. Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, 356(2):323–8.
 40. DELHALDO Catherine, et al. Sunitinib in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: Latest evidence and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2012, 4(1):9–18.
 41. POLENA Helena, et al. The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: A marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2018, 118(9):1179–88.
 42. ZERBINATI Nicola, et al. In Vitro Evaluation of the Biosafety of Hyaluronic Acid PEG Cross-Linked with Micromolecules of Calcium Hydroxyapatite in Low Concentration. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2018;6(1):15–9.
 43. TERRY L Riss, et al. Cell Viability Assays [interaktyvus]. 2013 [žiūrėta 2019 m. gegužės 18 d.]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
 44. FRANKEN Nicolaas A. P., et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* [interaktyvus]. 2006, 1(5):2315–9 [žiūrėta 2019 m. gegužės 20 d.]. Prieiga per: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473>
 45. FULDA Simone. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* [interaktyvus]. 2015;31:84–8 [žiūrėta 2019 m. gegužės 20 d.]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.05.002>
 46. PROSKURYAKO Sergey., Vladimir GABAI. Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Current Pharmaceutical Design*. 2009, 16(1):56–68.
 47. Contents IIKIT. Double Stain Apoptosis Detection Kit (Hoechst 33342 / PI) Cat . No . L00309 VII Introduction Kit Contents Key Features Storage Control. (0361). Prieiga per internetą: https://www.genscript.com/tech_guide/TM0361.pdf
 48. LI Jin-Ping, et al. The investigational Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G₂/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015, 9:1627–52.
 49. SOUZA Aline G., et al. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Current Pharmaceutical Design*. 2018, 1689–94.
 50. SWAMINATHAN Swathi, et al. Bioprinting of 3D breast epithelial spheroids for human cancer models To. *Biochemical Journal*. 2008.
 51. RUSTAMOV Valeh, et al. Bone Sialoprotein Shows Enhanced Expression in Early, High-Proliferation Stages of Three-Dimensional Spheroid Cell Cultures of Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231. *Frontiers in Oncology* [interaktyvus]. 2019, 9 (vasaris) [žiūrėta 2019 m. gegužės 12 d.]. Prieiga per: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00036/full>
 52. BOO Lily, et al. MiRNA transcriptome profiling of spheroid-enriched cells with cancer stem cell properties in human breast MCF-7 cell line. *International Journal of Biological Sciences*. 2016, 12(4):427–45.
 53. PROMEGA. Luminescent Viability Assays in Magnetically Bioprinted 3D Cultures [žiūrėta 2019 m. gegužės 21 d.]. Prieiga per internetą: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/bioprinting-3d-cell-cultures/>
 54. AGRAWAL A. Overview of tyrosine kinase inhibitors in clinical breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2005, 135–44.
 55. GOEL Shom, et al. Overcoming Therapeutic Resistance in HER2- Positive Breast Cancers with CDK4 / 6 Inhibitors Article Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4 / 6 Inhibitors. *Cancer Cell* [Internet]. 2016, 29(3):255–69 [žiūrėta 2019 m. gegužės 21 d.]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.006>
 56. NAUTIYAL Jyoti, et al. Src inhibitor dasatinib inhibits growth of breast cancer cells by

- modulating EGFR signaling. *Cancer Letters* [interaktyvus]. 2009, 283(2):143–51 [žiūrėta 2019 m. gegužės 21 d.]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.03.035>
57. CHOI Hack Sun, et al. Screening of breast cancer stem cell inhibitors using a protein kinase inhibitor library. *Cancer Cell International*. 2017, 1–12.
 58. OZBAY Tuba, et al. In vitro evaluation of pan-PI3-kinase inhibitor SF1126 in trastuzumab-sensitive and trastuzumab-resistant HER2-over-expressing breast cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2010, 65(4):697–706.
 59. CAN Kaleigh, et al. Receptor tyrosine kinase ERBB4 mediates acquired resistance to ERBB2 inhibitors in breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2015, 14(4):648–55.
 60. HOWES Amy L., et al. 3-Dimensional Culture Systems for Anti-Cancer Compound Profiling and High-Throughput Screening Reveal Increases in EGFR Inhibitor-Mediated Cytotoxicity Compared to Monolayer Culture Systems. *PLOS ONE*. 2014, 9(9).
 61. GENCOGLU MF, et al. Methods and Implications for Drug Screening. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2018, 4(2):410–20.
 62. WANG Luqi, et al. Effects of a checkpoint kinase inhibitor, AZD7762, on tumor suppression and bone remodeling. *International Journal of Oncology*. 2018, 53(3):1001–12.

Priedai

1 priedas. Sertifikatas ir diplomas, patvirtinantys dalyvavimą tarptautinėje konferencijoje „Science and Practice 2018“

Kaune 2018 metų lapkričio 9 d., pristatytas stendinis pranešimas tema “Anticancer Activity of Kinase Inhibitors in 2D and 3D Breast Cancer Cell Culture”. Užimta III vieta. Pridedami dalyvavimą patvirtinantys A – sertifikatas ir B – diplomas.

A



B



9th International Pharmaceutical Conference
"SCIENCE AND PRACTICE 2018"
dedicated to the 100th anniversary of independent
Lithuania's pharmacy
Friday, November 9, 2018

Diploma

Organizing Committee hereby certifies that

Laura Šarmulytė

Is awarded this diploma for 3rd place for exceptional
poster

R. Morkūnienė

On behalf of the Organizing Committee
Prof. Ramunė Morkūnienė



2 priedas. Sertifikatas, patvirtinantis dalyvavimą Jaunųjų mokslininkų ir tyrėjų konferencijoje

Farmacijos sekcijoje, pristatytas pranešimas tema „Sunitinibo analogų priešvėžinio aktyvumo 2D ir 3D krūties vėžio ląstelių kultūrose įvertinimas“. Pridedamas dalyvavimą patvirtinantis sertifikatas.



3 priedas. Straipsnis „Investigating the Anticancer Activity of Isatin/Dihydropyrazole Hybrids“

ACS Medicinal Chemistry Letters žurnale išspausdintas straipsnis, kuriame aprašyta dalis šiame magistro darbe pateiktų rezultatų.

MELEDDU Rita, et al. Investigating the Anticancer Activity of Isatin/Dihydropyrazole Hybrids. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2018 [žiūrėta 2019 m. birželio 01 d.]. Prieiga per internetą: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.8b00596Hybrids>.



Investigating the Anticancer Activity of Isatin/Dihydropyrazole Hybrids

Rita Meleddu^{a,†}, Vilma Petrikaite^{b,c,†}, Simona Distinto^{a*}, Antonella Arridu^a, Rossella Angius^d, Lorenzo Serusi^a, Laura Škarnulytė^b, Ugnė Endriulaitytė^b, Miglė Paškevičiūtė^b, Filippo Cottiglia^a, Marco Gaspari^e, Domenico Taverna^e, Serenella Deplano^a, Benedetta Fois^a and Elias Maccioni^a.

^aDepartment of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Via Ospedale 72, 09124 Cagliari, Italy

^bDepartment of Drug Chemistry, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, 50162 Kaunas, Lithuania

^cInstitute of Biotechnology, Vilnius University, LT-10257 Vilnius, Lithuania

^dLaboratorio NMR e Tecnologie Bioanalitiche, Sardegna Ricerche, 09010 Pula, Cagliari, Italy

^eDepartment of Experimental and Clinical Medicine, "Magna Græcia" University of Catanzaro, Viale Europa, 88100 Catanzaro, Italy

KEYWORDS: *Anticancer agents, isatin-dihydropyrazole hybrids, apoptosis inducers.*

ABSTRACT: A series of isatin-dihydropyrazole hybrids have been synthesized in order to assess their potential as anticancer agents. In particular, twelve compounds were evaluated for their anti-proliferative activity toward A549, IGR39, U87, MDA-MB-231, MCF-7, BT474, BxPC-3, SKOV-3, H1299 cell lines, and human foreskin fibroblasts. Four compounds exhibited an interesting anti-proliferative activity and were further examined to determine their EC₅₀ values toward a panel of selected tumor cell lines. Best compounds were then investigated for their induced mechanism of cell death. Preliminary structure-activity relationship indicates that the presence of a substituent such as chlorine atom or a methyl moiety in the position 5 of the isatin nucleus is beneficial for the antitumor activity. **EMAC4001** resulted the most promising compound within the studied series with EC₅₀ values ranging from 0.01 μM to 0.38 μM.
