

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aistė
SKEBERDYTĖ

Sinergistinis citotoksinis salinomicino
ir dichloroacetato poveikis vėžinėms
ląstelėms *in vitro* ir *in vivo*

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2014–2019 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų instituto Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje bei Biochemijos instituto Biologinių modelių skyriuje, Nacionaliniame vėžio institute ir Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos institute.

Moksliniai tyrimai buvo remiami Nacionalinio vėžio instituto mokslo fondo lėšomis.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

TURINYS

SANTRUMPOS	5
IVADAS	7
Darbo tikslas	10
Uždaviniai	10
Darbo mokslinis aktualumas ir naujumas	10
Ginamieji teiginiai	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1 Storosios žarnos vėžio epidemiologija ir gydymas	13
1.2 Plaučių vėžio epidemiologija ir gydymas	14
1.3 Kombinuota vėžio terapija	14
1.4 Vėžio kamieninės ląstelės	16
1.5 Epitelinė–mezenchiminė tranzicija	20
1.6 Mezenchiminė–epitelinė tranzicija	21
1.7 EMT sąsaja su vėžio progresavimu ir metastazavimu	21
1.8 Metastazių reikšmė ir jų gydymo problematika	22
1.9 Salinomocinas	23
1.10 Dichloroacetatas ir Varburgo efektas	26
2. TYRIMŲ METODAI	29
2.1 Ląstelių kultūros ir eksperimentiniai gyvūnai	29
2.2 Ląstelių gyvybingumo analizė	29
2.3 3D ląstelių kultūra	30
2.4 Ląstelės ciklo ir apoptozės įvertinimas tėkmės citometru, naudojant Aneksino V ir propidžio jodido reagentus	30
2.5 Viduląstelinio pH matavimai	31
2.6 Kalceino testas	31
2.7 RNR ekstrakcija	32
2.8 Kiekybinė tikro laiko polimerazės grandininė reakcija (RT-qPCR)	32
2.9 Mitochondrijų membranos potencialo pokyčio matavimas	33
2.10 Genų raiškos tildymas sintetinėmis siRNR	33
2.11 Fluksominė analizė	33
2.12 <i>In vivo</i> eksperimentai	34
2.13 Imunohistocheminė analizė	35
2.14 Statistinė analizė	35

3. REZULTATAI	36
3.1 SAL ir DCA poveikis storosios žarnos vėžio ląstelėms <i>in vitro</i> ..	36
3.1.1 DCA, SAL ir jų kombinacijos poveikis DLD-1 ir HCT116 ląstelėms 2D kultūroje	36
3.1.2 DCA, SAL ir jų kombinacijos poveikis DLD-1 ir HCT116 ląstelėms 3D kultūroje	39
3.1.3 Genų raiškos palyginimas tarp ląstelių linijų 2D ir 3D ląstelių kultūrose	40
3.1.4 SAL ir DCA sinergizmo mechanizmo tyrimai	42
3.1.4.1 Daugiavaisčio atsparumo baltymo vaidmuo	42
3.1.4.2 Viduląstelinis pH	44
3.1.4.3 SAL, DCA ir jų kombinacijos poveikis mitochondrijų membranos potencialui	46
3.1.4.4 Kiti galimi dichloracetato taikiniai mitochondrijose	48
3.2 SAL ir DCA poveikis plaučių vėžio ląstelėms <i>in vitro</i> ir <i>in vivo</i> ..	50
3.2.1 DCA, SAL ir jų kombinacijos poveikis LLC1 ląstelėms 2D ir 3D kultūrose	50
3.2.2 DCA ir SAL kombinacija mažina navikų augimo greitį C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelėmis indukuotais navikais	52
3.2.3 SAL ir DCA kombinacija slopina navikų metastazavimą į C57BL/6 pelių su LLC1 ląstelėmis indukuotais navikais plaučius	54
3.2.4 SAL ir DCA kombinacija slopina EMT, CSC ir prolifерacijos žymenų raišką C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelėmis indukuotais navikais	55
4. REZULTATŲ APTARIMAS	57
IŠVADOS	61
PRIEDAI	62
LITERATŪROS SĄRAŠAS	63
Disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas	77
Kitos publikacijos, nesusijusios su darbo tema	77
Pranešimai mokslinėse konferencijose	77
Finansinė parama	75
CURRICULUM VITAE	79
PADĖKA	80

SANTRUMPOS

5-FU	5-fluorouracilas
ACE	Acetatas
ALDH1	Aldehido dehidrogenazė 1
AO	Akridino oranžinis
CBNX	Karbenoksolonas (angl. <i>carbenoxolone</i>)
CD	Diferenciacijos klasteris (angl. <i>cluster of differentiation</i>)
CI	Kombinacinis indeksas (angl. <i>combination index</i>)
CSC	Vėžio kamieninės ląstelės (angl. <i>cancer stem cells</i>)
Cyt C	Citochromas C
DCA	Dichloroacetatas
DMSO	Dimetilsulfoksidas (angl. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
e-kadherinas	Epitelinis kadherinas
EMT	Epitelinė–mezenchiminė tranzicija
Fa	Paveiktoji frakcija (angl. <i>fraction affected</i>)
FC	Pokytis kartais
GABA	gama-amino sviesto rūgštis (angl. <i>gamma aminobutyric acid</i>)
GPP	Glikoproteinas P
H&E	Hematoksilinas ir eozinas
kDNR	Kopijinė deoksiribonukleorūgštis
LLC1	Luiso (Lewis) plaučių karcinoma
MCAT	Malonil CoA-acil baltymo transacilazė (angl. <i>malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase</i>)
MET	Mezenchiminė–epitelinė tranzicija
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas
MRP	Daugiavaisčio atsparumo baltymas (angl. <i>multidrug resistance protein</i>)
NSCLC	Nesmulkiajų plaučių vėžys (angl. <i>non-small cell lung carcinoma</i>)
OAT	Ornitino aminotrasferazė (angl. <i>ornithine aminotransferase</i>)
PARP	Poli(adenozindifosfato ribozės) polimerazė (<i>poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase</i>)
PDGFR	Trombocitų kilmės augimo veiksnio receptorius (angl. <i>platelet-derived growth factor receptor</i>)

PDC	Piruvato dekarboksilazė (angl. <i>pyruvate decarboxylase</i>)
PDK	Piruvato dehidrogenazės kinazė
pH _i	Viduląstelinis pH (angl. <i>intracellular pH</i>)
pH _o	Ekstraląstelinis pH
PI	Propidžio jodidas
qPCR	Kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (angl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
ROS	Aktyviosios deguonies formos (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RT-qPCR	Tikro laiko kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (angl. <i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>)
SAL	Salinomicinas
SAL + DCA	Salinomicino ir dichloracetato kombinacija
SCLC	Smulkialąstelinis plaučių vėžys (angl. <i>small cell lung carcinoma</i>)
SEM	Vidurkio standartinė paklaida (angl. <i>standard error of the mean</i>)
siRNR	Mažosios interferuojančios ribonukleorūgštys (angl. <i>small interfering ribonucleic acid</i>)
TCA	Trikarboksirūgštis
VEG-F	Kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (angl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

ĮVADAS

Kombinuotos terapijos taikymas onkologinių ligų gydyme yra plačiai pripažintas ir vienas labiausiai vertinamų metodų (1). Šio gydymo dėka, pagerinamas vaistų efektyvumas, taip pat dėl mažesnės vartojamos dozės, pacientai patiria silpnesnius šalutinius reiškinius, be to lėčiau išsivysto atsparumas chemoterapijai.

Salinomycinas (SAL) yra monokarboksilinis polieteris jonoforas, daugybę metų naudotas paukščių kokcidiozei gydyti (2). Pirmą kartą SAL kaip potencialus priešvėžinis vaistas buvo paminėtas beveik prieš dešimtmetį, kuomet amerikiečių mokslininkai pastebėjo, kad jis šimtą kartų stipriau veikia vėžio kamienines ląsteles (CSC, angl. *cancer stem cells*), lyginant su paklitakseliu – gerai žinomu priešvėžiniu vaistu, plačiai naudojamu krūties, plaučių, kasos ir kitoms onkologinėms ligomis gydyti (3). Nuo 2009 metų pasirodė daugybė straipsnių, aiškinančių SAL veikimo mechanizmą. Vienos mokslininkų grupės teigia, kad SAL yra ABC transporterių slopiklis (4, 5), kitos – kad tai WNT signalų kelių perdavimo slopiklis (6), trečios pateikia įrodymų, kad citotoksinis SAL poveikis pasireiškia dėl jo inicijuojamų autofagijos procesų ląstelėse (7-10). Nors kol kas nėra vieningos nuomonės apie šio vaisto veikimo mechanizmą, tačiau jis yra pripažintas kaip veiksmingas CSC slopiklis (11, 12). Vartojamas nedidelėmis dozėmis, SAL turi vos keletą šalutinių poveikių, kurių pagrindiniai yra tachikardija bei tremoras, tačiau SAL nėra būdingi tradicinės chemoterapijos metu pasireiškiantys šalutiniai reiškiniai, tokie kaip pykinimas, alopecija, virškinimo sistemos sutrikimai ar kraujo kūnelių skaičiaus sumažėjimas (13).

Dichloroacetatas (DCA) yra maža sintetinė molekulė, žinoma kaip piruvato dehidrogenazės kinazės (PDK) slopiklis (14). DCA priešvėžinės savybės yra siejamos su jo gebėjimu slopinti Varburgo (Warburg) efektą (15). Šio proceso metu DCA dėka vėžinės ląstelės, intensyviai atliekančios glikolizės procesus, grįžta prie sveikoms ląstelėms būdingo oksidacinio fosforilinimo ir tuo pačiu – prie įprastų apoptozės procesų. Dėl keleto savo savybių DCA yra laikomas patraukliu kandidatu chemoterapiniam vėžio gydymui. Visų pirma, DCA minimaliai veikia sveikas ląsteles, kadangi jo taikynys yra ląstelės su pakitusia mitochondrijų veikla, būdinga vėžinėms ląstelėms (16). Antra, jis pasižymi geru bioprieinamumu kas užtikrina efektyvų vaisto pasisavinimą (15). Taip pat, DCA yra nebrangus vaistas, kadangi nebegalioja jo patentas. Galiausiai, viena iš svarbiausių jo savybių yra saugumas – DCA jau daugiau

negu keturiasdešimt metų yra naudojamas tiek vaikų, tiek suaugusiųjų įgimtai laktinei acidozei gydyti, tad šio vaisto poveikis ir šalutiniai reiškiniai yra gerai žinomi (17). Paskutinį dešimtmetį daugybė mokslininkų grupių tyrinėjo ir aprašė DCA priešvėžinį poveikį. DCA citotoksinis poveikis yra įrodytas krūties (18), neuroblastomos (19), plaučių (20), prostatos (21) ir kituose navikuose tiek *in vitro* tiek *in vivo* tyrimuose. Taip pat yra atlikta ir keletas klinikinių tyrimų. Pavyzdžiui, 2014 metais grupė amerikiečių mokslininkų ir medikų atliko pirmos fazės klinikinį tyrimą su pacientais sergančiais piktybiniais smegenų navikais ir padarė išvadą, kad DCA yra saugus, gerai toleruojamas ir tinkamas pastoviam vartojimui (22). Šalutiniai DCA sukelti poveikiai gali būti suskirstyti į dvi grupes: 1) neurologiniai poveikiai, tokie kaip periferinė neuropatija, sedacija, nuotaikų kaita, disorientacija; 2) virškinimo sistemos poveikiai, tokie kaip pykinimas, virškinimo sutrikimai ir vėmimas (23).

Yra daugybė priežasčių, dėl kurių chemoterapinis gydymas gali būti nesėkmingas. Viena iš svarbiausių – navikinio audinio ląstelių heterogeniškumas. Yra manoma, kad nedidelė ląstelių subpopuliacija, vadinama vėžio kamieninėmis ląstelėmis, yra atsakinga už navikų metastazavimą, atsparumą gydymui bei ligos atsinaujinimą po gydymo (24, 25). Šiandien yra žinoma daugiau negu 40 vėžio kamieninių ląstelių žymenų, kurių padidėjusi raiška yra nustatyta daugelyje navikų tipų (26).

Vėžio kamieninės ląstelės yra ramybės fazėje (G0 ląstelės ciklo fazė), todėl tradiciniai chemoterapiniai vaistai, kurių veikimo mechanizmas paremtas ląstelės ciklo slopinimu, jų neveikia. Pastaraisiais metais skiriama daug dėmesio vaistų, besitaikančių į vėžio kamienines ląsteles, paieškoms. Tai junginiai, veikiantys signalų perdavimo kelius, genų raišką, imuninę sistemą, ir kito pobūdžio preparatai (27-35).

Daugelyje mokslinių publikacijų daugiavaisčio atsparumo atsiradimas siejamas su padidėjusia daugiavaisčio atsparumo baltymų (MRP, angl. *multidrug resistance protein*) ABC šeimos transporterių raiška (36-39). Glikoproteinas P (GPP) buvo pirmasis aprašytas ABC šeimos transporteris, kurio padidėjusi raiška yra matoma daugelyje vėžių tipų (40). Kai kurie mokslininkai teigia, kad SAL yra GPP slopiklis (41), tuo tarpu, iki mūsų publikacijos (42) literatūroje nebuvo duomenų, kad DCA galėtų turėti tokį poveikį.

Jau daugybę metų yra žinoma, kad dėl suaktyvėjusios glikolizės bei nepakankamo deguonies tiekimo, piktybinių ląstelių viduląstelinis pH (pH_i) yra rūgštinis (43). Taip pat yra nustatyta, kad modifikuojant pH_i galima sukelti ląstelių pažaidas ir įjautrinti jas chemoterapijai, radioterapijai bei aukštai

temperatūrai (44, 45). Teoriškai, DCA gali turėti dvejopą poveikį pH_i – iš vienos pusės – DCA aktyvuodamas piruvato dehidrogenazės kinazę (PDK) ir sugražindamas piruvatą į mitochondrijas, galėtų padidinti pH_i dėl sumažėjusios laktato gamybos, tačiau kitą vertus DCA sumažintų V-ATPazių – vienu iš svarbiausių pH_i reguliatorių – raišką, dėl ko pH_i turėtų sumažėti (46). Kol kas yra atliktas tik vienas eksperimentas šiai hipotezei patvirtinti: 2017 metais tiriant glioblastoma sergančias peles, buvo nustatyta, kad net ir vienietinė DCA injekcija turi gebėjimą mažinti pH_i (47).

Vienas didžiausių iššūkių onkologijoje yra metastazavusių navikų, turinčių blogą ligos prognozę, gydymas. Literatūros duomenys rodo, kad DCA gali turėti ženkliai didesnę poveikį metastazavusių navikų gydymui, kuomet yra kombinuojamas su kitu preparatu, pavyzdžiui su metforminu arba bikarbonatu (48, 49). Tuo tarpu, SAL antimetastazinį poveikį turėjo tik eksperimentuose, kuomet buvo naudojamos didelės jo dozės (pvz. 8 mg/kg) (50).

Epitelinė–mezenchiminė tranzicija (EMT) yra procesas, kurio metu statinės epitelio ląstelės dėl įvairių biocheminių virsmų transformuojasi į mobilias ir invazyvias mezenchimines ląsteles (51). Ši patologija yra laikoma kertine metastazių atsiradimo bei ligos progresijos priežastimi. Keletas veiksnių nulemia EMT iniciaciją ir progresiją. Bene svarbiausias veiksnys yra pakitusi epitelinio kadherino (e-kadherino) bei vimentino raiška (52). E-kadherinas yra pagrindinė ląstelių adhezijos molekulė – tai tarsi klėjai, laikantys ląsteles kartu. Sumažėjusi šio žymens raiška yra siejama su navikinių ląstelių invazyvumu (53). Vimentinas yra vienas plačiausiai aprašytų EMT žymenų (54). Padidėjusi jo raiška yra nustatyta daugybėje metastazavusių vėžių tipų. EMT fenomenas yra puikus taikynys, tyrinėjant metastazių atsiradimą ir progresiją. Literatūroje aprašyta, kad SAL turi gebėjimą slopinti EMT procesus (55), tačiau iki šiol nebuvo dokumentuota tokia DCA savybė.

Per paskutinius kelis dešimtmečius buvo sukauptas didelis arsenalas žinių apie vėžio atsiradimą, jo vystymąsi ir gydymą. Taip pat daug efektyvių terapijos metodų buvo atrasta ir sėkmingai pritaikyta praktikoje, tačiau kai kurie onkologiniai reiškiniai, tokie kaip vėžio kamieninės ląstelės, EMT, daugiavaistis atsparumas, metastazavimas, vėžio atsinaujinimas ir kt. vis dar reikalauja tolimesnių tyrimų ir veiksmingų priešvėžinių vaistų kūrimo. Viena iš tokių vaistų kūrimo strategijų galėtų būti tokių vaistų sinergistinio veikimo paieška ir panaudojimas, pasiekiant maksimalų poveikį minimaliomis vaistų dozėmis bei mažinant jų šalutinius poveikius. SAL ir DCA yra du skirtingus, aukščiau apibūdintus, priešvėžinius veikimo mechanizmus turintys vaistai, kurie, veikdami kartu, galėtų turėti didesnę ar net sinergistinę terapinę poveikį.

Tačiau šių vaistų kombinacijos poveikis vėžinėms ląstelėms iki šiol nėra tirtas nei *in vitro*, nei *in vivo*.

Darbo tikslas

Ištirti SAL, DCA ir jų kombinacijos poveikį žmogaus storosios žarnos vėžio DLD-1 ir HCT116 ląstelėms *in vitro* bei plaučių plaučių vėžio LLC1 ląstelėms *in vitro* ir *in vivo* bei įvertinti šių vaistų sąveikos pobūdį ir mechanizmą.

Uždaviniai

1. Ištirti SAL, DCA ir jų kombinacijos poveikį žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linijų HCT116, DLD-1 ir plaučių vėžio ląstelių linijų LLC1 gyvybingumui 2D ir 3D kultūrose.
2. Ištirti SAL ir DCA kombinacijos veikimo pobūdį ir galimą mechanizmą.
3. Ištirti SAL, DCA ir jų kombinacijos terapinį poveikį gydant C57BL/6 pelės, sergančias metastazavusiu plaučių vėžiu, su LLC1 ląstelių linija indukuotais navikais.
4. Nustatyti SAL ir DCA terapijos potencialą slopinti metastazių formavimąsi C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelių linija indukuotais navikais.
5. Ištirti SAL, DCA ir jų kombinacijos poveikį epitelinės-mezenchiminės tranzicijos, vėžio kamieninių ląstelių ir proliferacijos žymenų raiškiai C57BL/6 pelėse, su LLC1 ląstelių linija indukuotais navikais.

Darbo mokslinis aktualumas ir naujumas

Šiame darbe dviejų vaistų – SAL ir DCA – poveikis vėžinėms ląstelėms buvo tirtas keliais aspektais. Visų pirma, *in vitro* atliktų eksperimentų metu buvo tiriamas DCA ir SAL poveikis storosios žarnos ir plaučių vėžio ląstelėms. Pagrindinis principas, kuriuo buvo remiamasi inovatyvios terapijos paieškose, yra siekis taikytis į skirtingas vėžio ir jo aplinkos ląstelių populiacijas. Ypatingai svarbią reikšmę priešvėžiniuose tyrimuose šiandien užima vėžio kamieninių ląstelių sąvoka. Nors kasmet yra publikuojama daugybė straipsnių, atskleidžiančių naujos informacijos šia tema, tačiau gana retai atliekama vėžio kamieninių ląstelių slopiklių poveikio kartu su kitais junginiais tyrimų. Dėl šių priežasčių pirmiausia SAL buvo pasirinktas kaip vėžio kamieninių ląstelių slopiklis. Antrasis kombinacijos komponentas, DCA, yra plačiai ištyrinėtas ir daugelį metų klinikoje naudojamas vaistas laktinei acidozei gydyti. Šio vaisto unikalumas yra jo selektyvus toksinis poveikis ląstelėms su pakitusia

mitochondrijų veikla, būdinga vėžinėms ląstelėms. Šiame darbe pirmą kartą panaudojome SAL ir DCA kombinaciją ir atskleidėme sinergistinį citotoksinį jų poveikį vėžinėms ląstelėms.

In vitro eksperimentų metu mes taip pat tyrėme kombinuotos terapijos veikimo mechanizmą. Nustatėme iki šiol nepublikuotą DCA veikimo mechanizmą – parodėme, kad DCA yra MRP slopiklis, dėl ko ląstelės yra ilgiau ir stipriau veikiamos SAL. Taip pat nustatėme, kad DCA geba sumažinti pH_i , dėl ko ląstelės gali tapti jautresnės chemoterapijai bei lengviau inicijuoti apoptozės procesus.

Mūsų tyrimų rezultatai leidžia manyti, kad SAL yra galimai tik vienas iš daugelio vaistų, kurių poveikis ženkliai sustiprėja sąveikoje su DCA, ir kad kiti panašios struktūros junginiai galėtų būti sėkmingai derinami su DCA gydant vėžį.

Ilgamečių tyrinėjimų dėka žinome, kad tik nedaugelis chemoterapinių vaistų, davusių daug žadančių rezultatų eksperimentuose *in vitro*, pasiteisina perkėlus eksperimentus į *in vivo* platformą. Bandymais su pelėmis nustatėme, kad kombinuota terapija išlaiko sinergistinį citotoksinį poveikį ir *in vivo* eksperimentuose bei geba ženkliai sulėtinti naviko augimą, lyginant su kontrole ir monoterapijomis. Taip pat reikšmingą poveikį kombinuota terapija turėjo metastazių formavimuisi. Metastazių gydymas yra vienas didžiausių iššūkių onkologijoje, ir daugelis iki šiol patvirtintų vaistų taikosi į greitai besidalijančių ląstelių populiacijas, neturėdami poveikio ląstelių judrumui ir invazyvumui. Šio darbo metu nustatėme, kad kombinuotos terapijos grupės pelių organuose nebuvo aptikta metastazių, kai tuo tarpu kontrolėje ir abiejų monoterapijų grupėse jau buvo matomi metastaziniai židiniai. Nors iki šiol atlikta nemažai *in vivo* eksperimentų tiek su SAL, tiek su DCA, tačiau nei vienas tyrimas neparodė gero terapinio poveikio metastazių formavimuisi. Mūsų atrastą fenomeną siejame su kombinuotos terapijos gebėjimu slopinti EMT procesus bei taikymąsi į vėžio kamienines ląsteles. EMT yra pripažinta kaip vienas svarbiausių veiksnių metastazių formavimosi procese. Mūsų rezultatai parodė, kad šio proceso žymenų – vimentino ir e-kadherino – raiška ženkliai skyrėsi tarp kombinuotos terapijos, SAL ir kontrolinės terapijos grupių, o DCA grupės rezultatai parodė, kad šis junginys taip pat ženkliai gebėjo slopinti metastazių formavimąsi. Mūsų žiniomis iki šiol nėra publikuotų duomenų apie DCA poveikį metastazių atsiradimui.

Taip pat, šiame darbe aprašėme ir keletą nepasiteisinusių eksperimentų, kurie galėtų būti aktualūs SAL ir DCA tyrimuose ateityje.

Ginamieji teiginiai

1. SAL ir DCA kombinacija sukelia sinergistinę citotoksinę poveikį žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linijoms HCT116, DLD-1 ir plaučių vėžio ląstelių linijai LLC1 2D ir 3D kultūrose;
2. SAL ir DCA sinergistinis poveikis pasireiškia dėl DCA poveikio MDR baltymams bei gebėjimo sumažinti pH_i;
3. SAL ir DCA kombinacija turi priešvėžinį poveikį gydant navikus, indukuotus LLC1 ląstelių linija, C57BL/6 pelėse.
4. SAL ir DCA turi antimetastazinį poveikį gydant navikus, indukuotus LLC1 ląstelių linija, C57BL/6 pelėse.
5. SAL ir DCA terapija turi gebėjimą mažinti naviko agresyvumo žymenų raišką C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelių linija indukuotais navikais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Storosios žarnos vėžio epidemiologija ir gydymas

2018 metų statistika rodo, kad storosios žarnos vėžys yra trečioje vietoje pagal susirgimų dažnumą tarp vyrų ir moterų (<https://www.cancer.org/duomenys>). 2018 metais buvo užregistruota virš 1,8 milijono naujų atvejų. Apie 75–90 proc. ligonių neturi genetinio polinkio į šią ligą. Pagrindiniai ligos rizikos veiksniai yra amžius, lytis (vyras serga dažniau), nesaikingas cukraus, alkoholio ir raudonosios mėsos vartojimas, nutukimas, rūkymas bei mažas fizinis aktyvumas (<https://www.cancer.org/duomenys>)

Storosios žarnos vėžio gydymas priklauso nuo ligos stadijos. Aptikus naviką ankstyvoje stadijoje, dažniausiai yra atliekama operacija laparotomijos, laparoskopijos arba kolostomijos būdu, ir pacientas gali pilnai pasveikti. Diagnozavus metastazavusį vėžį, gydymas yra daug sudėtingesnis, dažniausiai pritaikoma radioterapija arba chemoterapija, o ypač pažengusios ligos atveju skiriamas paliatyvusis gydymas, slopinantis ligos simptomus (<https://www.cancer.org/duomenys>). Chemoterapija yra plačiai taikoma storosios žarnos vėžiui gydyti, tačiau šis gydymo būdas dažniausiai yra skiriamas tik sergant III ar IV stadijos vėžiu. Tokiais atvejais yra taikomi 5-fluorouracilo (5-FU), kapecitabino, irinotekano ar oksaliplatinos preparatai (<https://www.cancer.org/duomenys>). Derinant šiuos vaistus tarpusavyje, gaunami plačiai naudojami gydymo režimai (<https://www.cancer.org/duomenys>). Antiangiogeniniai preparatai, tokie kaip bevacizumabas, neretai pridedami prie šių terapijų (56). Antros eilės pasirinkimas yra epidermio augimo veiksmų slopikliai: cetuksimabas ir panitumumabas (57). Iš imunoterapinių vaistų pembrolizumabas yra patvirtintas vėlyvųjų stadijų storosios žarnos vėžio gydymui (58). Radioterapija gali būti taikoma tik tiesiosios, bet ne gaubtinės, žarnos vėžio gydymui dėl didelio gaubtinės žarnos audinių jautrumo radiacijai (59).

Europoje mažiau nei 60 proc. storosios žarnos vėžiu sergančių pacientų išgyvena ilgiau nei penkerius metus. Išgyvenamumas yra tiesiogiai susijęs su stadija, kurioje navikas buvo diagnozuotas, bei tikslia naviko lokalizacija. Taip pat nuo ligos stadijos priklauso ir išgydyto paciento ligos atsinaujinimas penkerių metų bėgyje, kuris svyruoja tarp 5 ir 30 proc. (<https://www.cancer.org/duomenys>).

1.2 Plaučių vėžio epidemiologija ir gydymas

Plaučių vėžys yra antroje vietoje pagal vyrų ir moterų susirgimų dažnį, o pagal mirštamumą – pirmoje (<https://www.cancer.org/> duomenys). Yra išskiriami du pagrindiniai plaučių vėžio tipai: smulkialąstelinis (*SCLC*, angl. *small cell lung carcinoma*) ir nesmulkialąstelinis (*NSCLC*, angl. *non-small cell lung carcinoma*) plaučių vėžys. Plaučių vėžiu dažniausiai serga vyresnio amžiaus žmonės, amžiaus vidurkis – 70 metų. Didžiausias rizikos veiksnys yra tabako rūkymas, tačiau 10–15 proc. šios ligos atvejų sudaro ir niekada nerūkę pacientai (<https://www.cancer.org/> duomenys). Šie atvejai yra aiškinami genetiniu polinkiu arba dažnu sąlyčiu su kancerogeninėmis medžiagomis, tokiais kaip asbestas, radono dujos ar užterštame ore esantys junginiai.

Plaučių vėžio gydymas priklauso nuo vėžio tipo, ligos stadijos bei paciento būklės (<https://www.cancer.org/> duomenys). NSCLC atveju dažniausiai yra taikoma operacija, jeigu tai leidžia paciento būklė. SCLC tipiškai yra gydomas chemoterapija arba radioterapija. Gydymas chemoterapiniais vaistais taip pat priklauso nuo vėžio tipo: SCLC atveju dažniausiai skiriama cisplatina arba etopozidas, taip pat galimi deriniai su karboplatina, gemcitabinu, paklitakseliu, vinorelbinu, topotekanu arba irinotekanu (60). Pažengusiam NSCLC vėžiui gydyti taip pat yra naudojama chemoterapija. Šiuo atveju dažniausiai skiriamas vaistų derinys, jungiant cisplatiną arba karboplatiną su docetakseliu, pemetreksedu, gemcitabinu arba paklitakseliu (61). Yra patvirtinta ir keletas taikinių terapijos vaistų: erlotinibas, gefitinibas bei afatinibas, kurie yra tirozino kinazės, dalyvaujančios signalų perdavime per epidermio augimo veiksnio receptorių, slopikliai (62-64). Kitas taikinių terapijos grupei priklausantis vaistas yra monokloninis antikūnas denozumabas, dažnai skiriamas pacientams sergantiems į kaulus metastazavusiu plaučių vėžiu (65). Taip pat abiejų ligų atvejais yra taikoma adjuvantinė bei paliatyvioji terapijos (66, 67).

Tik apie 10–15 proc. pacientų išgyvena ilgiau nei 5 metus nuo ligos diagnozavimo. Taip yra dėl to, kad apie 30–40 proc. pacientų, diagnozuotų NSCLC, jau yra IV ligos stadijoje, o SCLC atveju šis skaičius siekia 60 proc. Kasmet šie rodikliai mažėja dėl vis pažangesnių diagnostikos metodų bei rūkymo prevencijos (68).

1.3 Kombinuota vėžio terapija

Dviejų ir daugiau vaistų tarpusavio derinimas yra vienas pagrindinių vėžio gydymo metodų (69, 70). Monoterapija yra laikoma mažiau veiksminga

gydymo forma, kadangi ji neselektyviai taikosi į greitai besidalijančių ląstelių populiaciją, dėl ko žūsta tiek vėžinės, tiek ir sveikos ląstelės. Chemoterapija yra toksiškas gydymo būdas, sukeliantis daugybę šalutinių poveikių ir stipriai slopinantis paciento imuninę sistemą. Taikant kombinacinę chemoterapiją yra ženkliai sumažinama šalutinių poveikių rizika, kadangi kombinacijoje vartojamos dozės yra gerokai mažesnės, negu būtų skiriamos monoterapijoje. Tokiu būdu sukeliamas mažesnis citotoksinis poveikis sveikoms ląstelėms.

Viena didžiausių vėžinių ligų gydymo problemų yra atsirandantis atsparumas vaistams. Atsparumo vaistams atsiradimą gali nulemti keletas pagrindinių veiksnių:

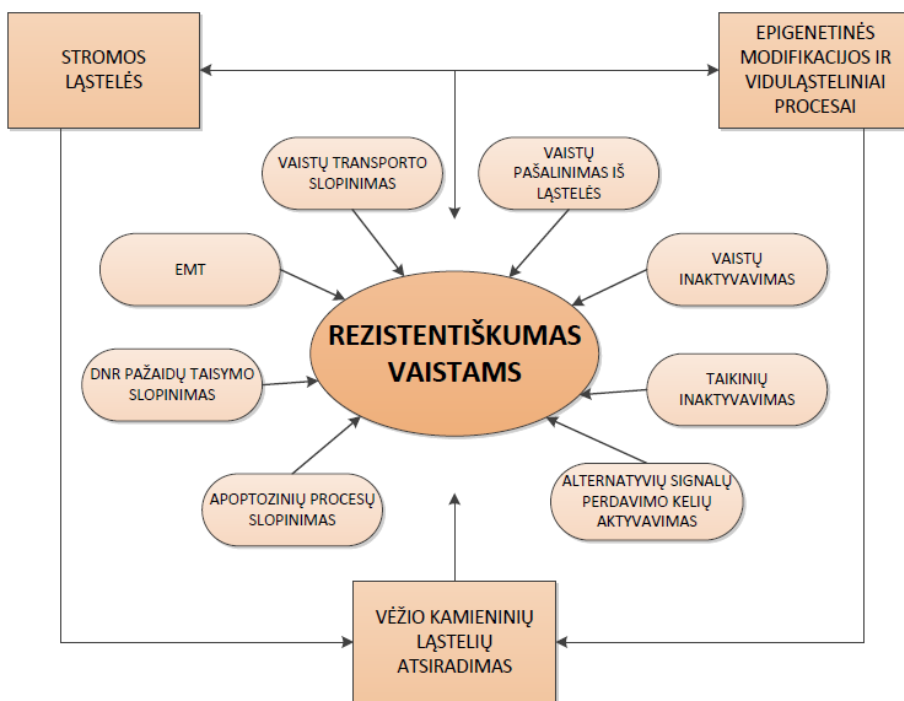
- suaktyvėjęs vaisto pašalinimas iš ląstelės;
- pakitęs taikinytis, į kurį orientuotas vaistas;
- suaktyvėjęs vaisto metabolizmas;
- pakitę ląstelės paviršiaus receptoriai;
- inicijuoti su onkogenais susiję genetiniai/epigenetiniai procesai;
- sutrikęs apoptozės procesų reguliavimas ir kiti veiksniai (71).

Monoterapinis gydymas daug dažniau sąlygoja šios patologijos atsiradimą, kadangi vėžinės ląstelės greitai adaptuojasi prie pakartotinio vaisto poveikio.

Kita nemažiau aktuali problema yra CSC (72). Naviko mikroaplinkoje randamos CSC yra atsakingos už navikinių ląstelių diferenciaciją, invazyvumą bei naviko atsinaujinimą po gydymo. Gydymas kombinacine terapija leidžia panaudoti vaistus, kurie taikosi į vėžines ląsteles ir į CSC (73). Kombinuota terapija gali būti panaudota ir metastazavimo prevencijai (74-76). Neretai pacientai, sergantys agresyviais vėžio tipais, yra gydomi ne tik citotoksinais vaistais, bet ir terapija, slopinančia patologinius metastazių atsiradimo procesus.

Vaistų kombinacija vėžio gydyme buvo pradėta taikyti tuomet, kai buvo išsiaiškinta, kad vėžio atsiradimą ir progresavimą nulemia ne vienas, o daugiau ląstelės gyvybinę veiklą reguliuojančių procesų. Kombinacine terapija pirmiausia buvo pradėta gydyti leukemiją ir limfomą. Šiai dienai dviejų ir daugiau vaistų terapija plačiai taikoma ir kitoms onkologinėms ligoms gydyti (69). Pavyzdžiui, buvo nustatyta, kad, pridėjus rituksimabą prie standartinio, dažnai taikomo CHOP (ciklofosfamidą, doksorubiciną, vinkristiną ir prednizoną) terapijos režimo, ženkliai pailgėjo pacientų išgyvenamumas (77). Taip pat kiaušidžių vėžiui gydyti jau neretai yra skiriama hormonų terapija ir/ar kraujagyslių endotelio augimo veiksniai (VEG-F, angl. *vascular endothelial growth factor*) ar poli(adenozindifosfato ribozės) polimerazės

slopikliai (PARP, angl. *poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase*) kartu su standartine chemoterapija (78). Kepenų navikai turi tendenciją greitai įgyti atsparumą vaistams. Šio tipo vėžiui gydyti daugiausia naudojama cisplatina ir/ar doksorubicinas. Krūties vėžio atveju dažnai naudojama doksorubicino kombinacija su taksanų grupės vaistais, 5-FU, ciklofosfamidų bei karboplatina (79). Paklitakselis yra pirmos eilės vaistas gydyti krūties, plaučių bei kiaušidžių vėžį, tačiau atsparumas šiam vaistui išsivysto gana greitai. Yra pasirodę daugybė straipsnių su siūlomomis kombinacinėmis terapijomis, padedančiomis įjautrinti vėžines ląsteles paklitakseliui (pvz., derinys su gemcitabinu) (80). Vaistų atsparumo atsiradimo mechanizmai pavaizduoti pirmame paveikslėlyje (**pav. 1**).



1 pav. Vaistų atsparumo atsiradimo mechanizmai (modifikuota pagal (153)).

1.4 Vėžio kamieninės ląstelės

Ilgamečių tyrinėjimų dėka žinome, kad vėžys yra heterogeniškas darinys, sudarytas ne tik iš piktybinių ląstelių frakcijos, bet ir iš kompleksinės ekosistemos, kurioje yra infiltruoti su vėžiu susiję fibroblastai, makrofagai,

endotelio, hematopoetinės, imuninės ir kitų tipų ląstelės (81). Jų visuma sudaro individualius navikus, besiskiriančius savo ląstelių morfologija, genų raiška, metabolizmu, judrumu ir proliferacijos bei metastazavimo potencialu.

Viena iš svarbiausių ir didžiausių susidomėjimą keliančių šios ekosistemos dalių yra CSC. Manoma, kad ši maža naviko ląstelių subpopuliacija, turinti bendrų bruožų su nevėžinėms kamieninėms ląstelėms, yra atsakinga už naviko atsinaujinimą, metastazavimą bei atsparumą chemoterapijai. Pagal CSC teoriją, tam tikra nedidelė dalis navike esančių kamieninių ląstelių turi išskirtinę savybę gaminti diferencijuotas vėžines ląsteles, kurios yra užprogramuotos sustoti daugintis dėl savo riboto mitozinių dalijimusi skaičiaus (82). Taip navikuose pasireiškia hierarchinė ląstelių sistema, būdinga sveikiems audiniams. CSC, kaip naviko formavimąsi inicijuojančios ląstelės, gali būti apibrėžtos pagal ląstelių hierarchinę hipotezę, kaip nedidelė navikinių ląstelių subpopuliacija, turinti tokias savybes:

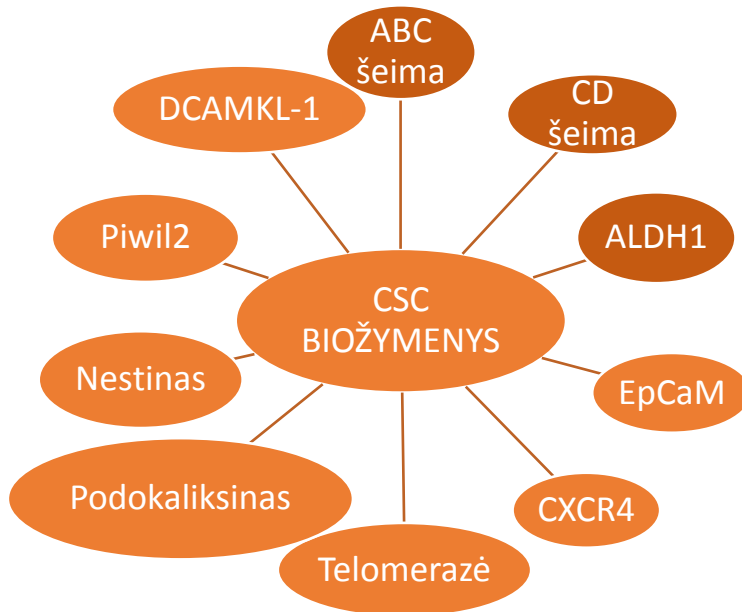
- sugebėjimą atsinaujinti;
- sugebėjimą diferencijuoti;
- sugebėjimą inicijuoti naviko formavimąsi;
- atsparumą chemo/radioterapijai.

Pagrindinė problema tyrinėjant CSC yra sudėtingas jų identifikavimas ir izoliavimas. Tėkmės citometrija yra dažniausiai taikomas metodas norint identifikuoti CSC. Šis metodas yra paremtas padidėjusia specifinių žymenų raiška arba suintensyvėjusia tam tikrų junginių gamyba. Skirtingų organų navikai turi skirtingus žymenis. Plačiausiai moksliniuose tyrinėjimuose taikomi CSC žymenis yra šie: CD (angl. *cluster of differentiation*) šeimos žymenis, ABC šeimos žymenis bei suintensyvėjusi ALDH1 (aldehido dehidrogenazės 1) gamyba. Daugiau CSC žymenų pateikta **2 pav.** ir tekste žemiau.

CD šeimos žymenis (3 pav.). CD yra didžiausia žymenų šeima, kurių padidėjusi ar sumažėjusi raiška charakterizuoja daugybę įvairiausių tipų navikų. Keletas svarbesnių su vėžio kamieninėms ląstelėms siejamų CD žymenų yra (83):

CD133 – tarpmembraninis pentaspano baltymas, kuris yra universalus hematopoetinių ląstelių žymuo. Jo padidėjusi raiška siejama su smegenų, gaubtinės žarnos, gliomos, kaklo, kasos, prostatos, inkstų, skydliaukės navikais;

CD44 – daugiafunkcinė ląstelės paviršiaus molekulė, dalyvaujanti ląstelės proliferacijoje, diferenciacijoje, migracijoje, angiogenezėje, citokinų ir chemokinų pateikime, atsake į augimo veiksnius bei signalų, susijusių su ląstelės išgyvenamumu, perdavime. Pakitusi jo raiška siejama su osteosarkoma, krūties karcinoma, gaubtinės žarnos, galvos, kaklo ir prostatos navikais;



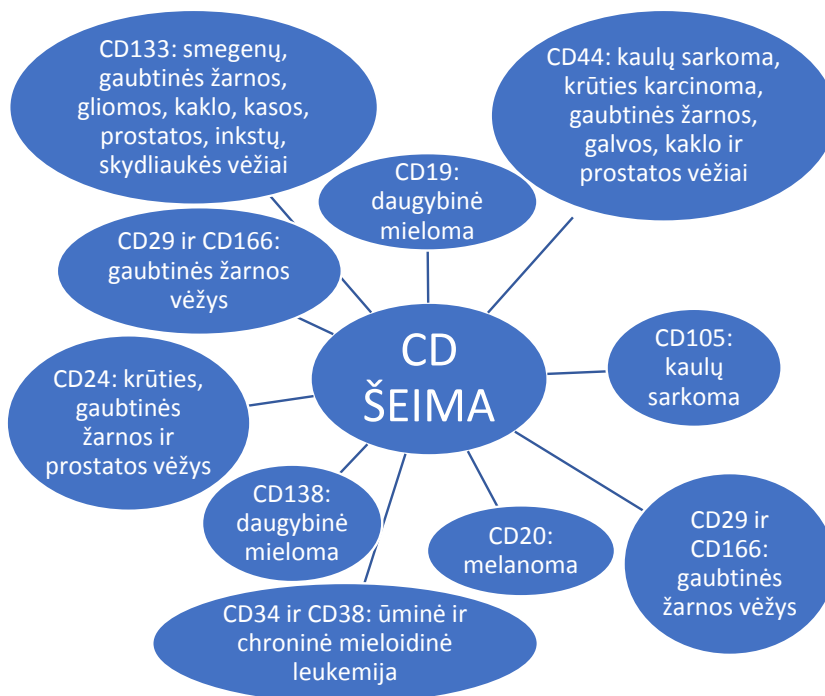
2 pav. Su vėžio kamieninėmis ląstelėmis siejami žymenys (modifikuota pagal (25)).

CD24 – šilumai atsparus antigenas, ląstelių adhezijos molekulė. Jis randamas B limfocitų, granulocitų ir neuroblastų paviršiuje. Pakitusi CD24 raiška siejama su krūties, gaubtinės žarnos ir prostatos navikais;

CD138 arba kitaip sindekanas 1 – baltymas, dalyvaujantis ląstelių tarpusavio jungimesi, signalų perdavime, proliferacijoje ir migracijoje. Padidėjusi jo raiška yra siejama su daugybine mieloma.

ABC šeimos žymenys. Daugelis CSC yra atsparios citotoksinėms medžiagoms dėl pakitusios savo reakcijos į jas: jos arba gamina daugiau baltymų, kurie sėkmingai jas detoksifikuoja, arba turi efektyvesnių pašalinimo iš ląstelės mechanizmą, lyginant su sveikoms ląstelėmis. Chemoterapijai atsparioms CSC būdinga padidėjusi vieno ar keleto ABC transporterių raiška (84). Vienas iš žinomiausių tokių transporterių yra MRP-1 (ABCB1 arba PGP) (85). Pavyzdžiui, su padidėjusia ABCG2 geno raiška yra siejami kaklo ir galvos navikai (86), o su ABCB5 – gaubtinės žarnos navikai (87).

ALDH1. ALDH molekulė yra svarbi kamieninių ląstelių diferenciacijos procesams. Yra žinoma 19 ALDH molekulės izoformų, kurių viena svarbiausių – ALDH1 – yra siejama su CSC bei atsparumu chemoterapijai. Nustatyta, kad daugelyje navikų tipų ALDH1 raiška yra padidėjusi, todėl jis sutartinai yra laikomas CSC žymeniu. Šios molekulės nustatymas yra paremtas keletas reagentų, naudojamų CSC populiacijai įvertinti (pvz., ALDEFLUOR) (88).



3 pav. Vėžio tipai, siejami su specifinių CD šeimos žymenų padidėjusia raiška (modifikuota pagal (26))

EpCAM (epitelio ląstelių adhezijos molekulė) – tarpmembraninis glikoproteinas, medijuojantis nuo kalcio priklausomą homotipinę tarpląstelinę adheziją epitelyje. EpCAM dalyvauja signalų perdavimo, ląstelių migracijos, proliferacijos, diferenciacijos procesuose. Kadangi EpCAM yra gaminamas išskirtinai tiktai epitelyje ir neoplazmose, susijusiose su epiteliu, jis yra vertingas žymuo įvairaus tipo epitelinių navikų nustatyme.

Nestinas – tarpinis filamentų baltymas, siejamas su smegenų navikais.

CXCR4 – 4-ojo tipo chemokinių receptorius. Jo padidėjusi raiška nustatyta 23 skirtinguose navikuose.

Telomerazė. Padidėjusi telomerazės raiška siejama su 90 proc. įvairių navikų.

Podokaliksinas. Šio plazminės membranos glikoproteino raiška yra padidėjusi daugelyje CSC. Su šiuo padidėjimu siejamas naviko agresyvumas ir greitas ligos progresavimas.

Piwil2 – AGO/PIWI šeimos baltymas, kurio raiška padidėjusi kasos navikų kamieninėse ląstelėse.

DCAMKL-1 – doublekortino ir CaM kinazės-tipo-1 baltymas siejamas su kasos ir plonojo žarnyno navikais.

1.5 Epitelinė–mezenchiminė tranzicija

EMT yra procesas, kurio metu epitelio vėžinės ląstelės praranda tarpusavio sukibimą ir įgauna migracinių ir invazinių savybių, virstamos mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis (51). EMT yra būtina įvairiems vystymosi procesams, tokiems kaip mezodermos atsiradimas ar neuroninių vamzdelių formavimasis. Taip pat yra manoma, kad EMT vyksta žaizdų gijimo metu, organų fibrozės metu bei metastazių iniciavimo metu, progresuojant vėžiui. Mezenchiminės ląstelės yra multipotentinės stromos ląstelės, galinčios diferencijuotis į įvairius skirtingus ląstelių tipus. Mezenchimine gali būti klasifikuojama ta ląstelė, kuri turi fibroblastams būdingą morfologiją, neturi stiprių adhezinių savybių ir kuri gali virsti į osteoblastus, chondrocitus, miocitus, adipocitus (89). Taip pat jiems būdingi paviršiaus žymenys, tokie kaip CD73, CD90, CD105, ir sumažėjusi CD11b, CD14, CD19, CD35, CD45, CD97a ir HLA-DR raiška (90).

Epitelinės ląstelės gamina didelius e-kadherino kiekius, o mezenchiminėse ląstelėse gausu n-kadherino, fibronektino ir vimentino. Biologiniame kontekste EMT ląstelės skirstomos į tris tipus: vystymosi, fibrozės ir žaizdų gijimo bei vėžio. E-kadherino praradimas yra esminis EMT įvykis. Daugybė transkripcijos veiksnių, kurie gali tiesiogiai ar netiesiogiai slopinti e-kadheriną, gali būti laikomi EMT induktoriais (90):

- SNAI1/Snail1, SNAI2/Snail2, ZEB1, ZEB2, E47 ir KLF8 gali jungtis su e-kadherino promoteriu ir stabdyti transkripciją (91);
- Veiksnyys Twist, gooseoid, TCF4, homeobox p baltymas, SIX1 ir FOXC2 slopina e-kadheriną netiesiogiai (92).

Kadangi naviko progresavimo metu vykstanti EMT yra panaši į EMT, būdingą organizmo vystymosi fazei, daugelis EMT transkripcijos veiksnių dalyvauja metastazių atsiradime. Keletas augimo faktorių (transformuojantis augimo faktorius beta (TGF-beta), fibroblastų augimo faktorius (FGF), epidermio augimo faktorius (EGF), hepatocitų augimo faktorius (HGF)), signalų perdavimo kelių (Wnt/beta-katenino ir Notch) ir hipoksija gali sukelti EMT (93).

SNAIL transkripcijos veiksnys yra laikomas pagrindiniu EMT procesų reguliatoriumi. Šį veiksnių aktyvuoja Ras-MAPK kinazė (91). SNAIL tiesiogiai slopina e-kadherino, klaudinų ir kitų tarpląstelinų adhezijos molekulių

gamybą bei skatina mezenchiminėms ląstelėms būdingų baltymų, tokių kaip fibronektinas ar užpildo metalo proteinazės, raišką.

E-kadherinas yra nuo kalcio jonų priklausomas glikoproteinas, dalyvaujantis tarpląstelinėje adhezijoje (94). Viduląstelinis e-kadherino domenas turi stipriai fosforilintą regioną, būtiną jungimuisi su beta kateninu. Tai e-kadherino veikimo principo esminė dalis. Beta kateninas savo ruožtu jungiasi su alfa kateninu, kuris dalyvauja aktino turinčių citoskeleto filamentų reguliavime. Mutacijos gene, koduojančiame šį baltymą, sąlygoja skrandžio, krūties, storosios žarnos, skydliaukės ir kiaušidžių vėžį (95-99). Yra manoma, kad e-kadherino praradimas skatina vėžio progresavimą dėl pagreitėjusios navikinių ląstelių proliferacijos, invazijos ir metastazių susidarymo. Slug ir Snail taip pat yra žinomi kaip transkripcijos veiksnio p63 izoformų aktyvatoriai, kuris yra reikalingas epitelinių struktūrų vystymuisi (100). Pakitusi *p63* geno raiška sumažina tarpląstelinę adheziją ir padidina migracines vėžinių ląstelių savybes.

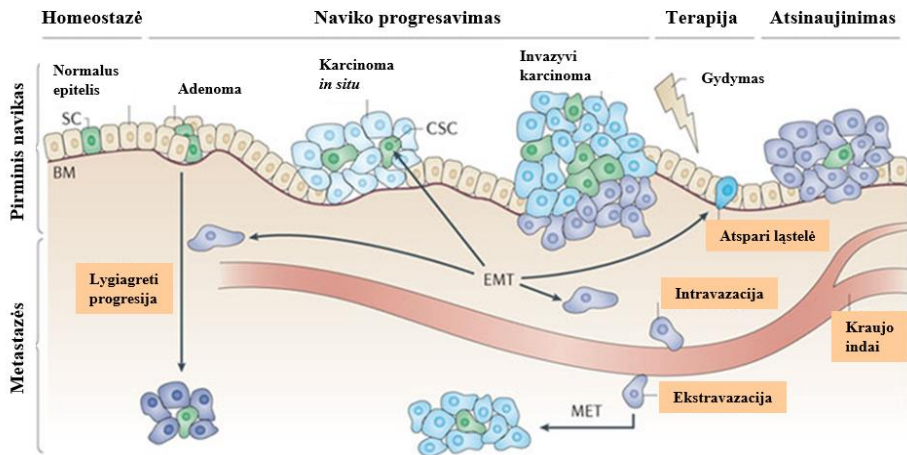
1.6 Mezenchiminė–epitelinė tranzicija

Mezenchiminė–epitelinė tranzicija (MET) – grįžtamas biologinis procesas, priešingas EMT, kurio metu judrios, multipolinės ląstelės, numigravusios iš pirminės lokalizacijos „nusėda“ naujoje vietoje ir praranda savo dinamiškumą (101). MET yra būdinga tiek normaliems vystymosi procesams, tiek patologinei vėžio metastazių formavimosi pradžia. Padidėjusi vimentino, fibronektino, n-kadherino, Twist ir Snail raiška yra laikoma šio proceso žymenimis. Lyginant su daugybe atliktų EMT studijų, sąlyginai nedaug žinoma apie MET vaidmenį kancerogenezeje. Yra manoma, kad MET dalyvauja tolimųjų metastazių stabilizavimo procese, įgalindama mezenchiminės ląstelės atgauti savo epitelines charakteristikas ir integruotis į naujus organus.

1.7 EMT sąsaja su vėžio progresavimu ir metastazavimu

Metastazės iniciacijai yra būtina invazija, kuri yra galima EMT dėka. Navikai pirmiausiai praranda tarpląstelinį sukibimą, priklausomą nuo e-kadherino, ir patenka į kraujo sistemą. Vėliau, kuomet cirkuliuojančios vėžinės ląstelės palieka kraujotakos sistemą, kad suformuotų mikrometastazes, jos pereina atvirkštinį procesą, vadinamą MET. Tada judrios ir nepriklausomos mezenchiminės ląstelės vėl virsta stacionariomis ląstelėmis, metastaziniuose židiniuose susijungusiomis įvairaus tipo jungtimis (102). Tai padeda

susidariusioms metastazėms įsitvirtinti ir stabilizuotis bei integruotis į naują organą. Apibendrinant galima teigti, kad epitelinės vėžio ląstelės, perėjusios EMT, įgauna kamieninių ląstelių savybių ir tampa CSC. Tuo tarpu, MET dalyvauja susidariusių metastazių įsitvirtinime. Tokiu būdu EMT ir MET kartu sudaro metastazių atsiradimo pradžios ir pabaigos kaskadą. Šie procesai pavaizduoti 4 pav.



4 pav. Epitelinės–mezenchiminės tranzicijos procesai (modifikuota pagal (51)).

1.8 Metastazių reikšmė ir jų gydymo problematika

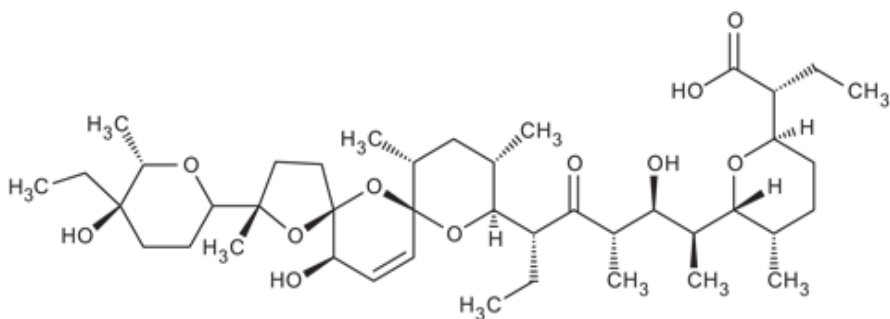
Vėžinių ląstelių atsiskyrimas nuo pirminio naviko ir paplitimas po kitus organus yra vadinamas metastazavimu. Tai pagrindinis ligos progresavimo ir prastos prognozės rodiklis. Kai atsiskyrusios navikinės ląstelės įsitvirtina netoli pirminės vietos, jos vadinamos regioninėmis metastazėmis, o ląstelės, priaugusios kituose organuose, vadinamos tolimosiomis metastazėmis (103). Metastazių diagnozavimas ir gydymas yra sudėtingi. Gydymo parinkimas priklauso nuo vėžio tipo, pirminės lokalizacijos, metastazių dydžio, plitimo krypties, paciento genetinių charakteristikų bei kitų veiksnių. Dažniausiai metastazavęs vėžys reikalauja sisteminio gydymo tokio kaip chemoterapija ar hormonų terapija (104). Kartais taikoma ir imunoterapija, radioterapija, operacija arba šių metodų derinys. Nors išvardinti metodai ir padeda sumažinti metastazių dydį bei plitimo greitį, tačiau tik retais atvejais pavyksta pilnai pašalinti susiformavusias metastazes. Neretai taikoma ir paliatyvioji terapija – tai vėžio simptomų gydymas, norint pagerinti paciento gyvenimo kokybę, tačiau nesitikint ligos progresijos mažėjimo.

Nemažiau svarbi yra ir metastazių prevencija. Įvairių patologinių procesų, tokių kaip EMT arba CSC formavimosi, slopinimas yra vienas iš pagrindinių iššūkių onkologijos srityje.

Ypatingai svarbią reikšmę metastazavusio vėžio gydymui turi taikinių terapija. Vėžio taikinių terapija – tai specifinių vėžio ląstelių molekulinį baltyminių darinių (taikinių), būtinų navikui vystytis, augti ir plisti, blokavimas, panaudojant vaistus, specialiai sukurtus paveikti šiuos taikinius. Vien 2019 metais buvo patvirtinta keletas vaistų: alpelisibas, skirtas metastazavusiam krūties vėžiui gydyti, erdafitinibas – šlapimo takų karcinomai bei pembrolizumabas – metastazavusiam SCLC gydyti (pagal www.centerwatch.com duomenis).

1.9 Salinomicinas

SAL yra karboksilinis polietėris jonoforas, izoliuotas iš *Streptomyces albus* bakterijų, kuris yra plačiai naudojamas žemės ūkyje kaip antibiotikas, gydantis paukščių koccidiozę (2). Antibiotikas SAL, kaip kalio jonoforas, sukelia ląstelių membranos depoliarizaciją ir pakeičia jonų koncentracijos gradientą, kuris paskatina apoptozės procesų vyksmą ląstelėje (8). Salinomicino struktūra yra pateikta 5 pav.

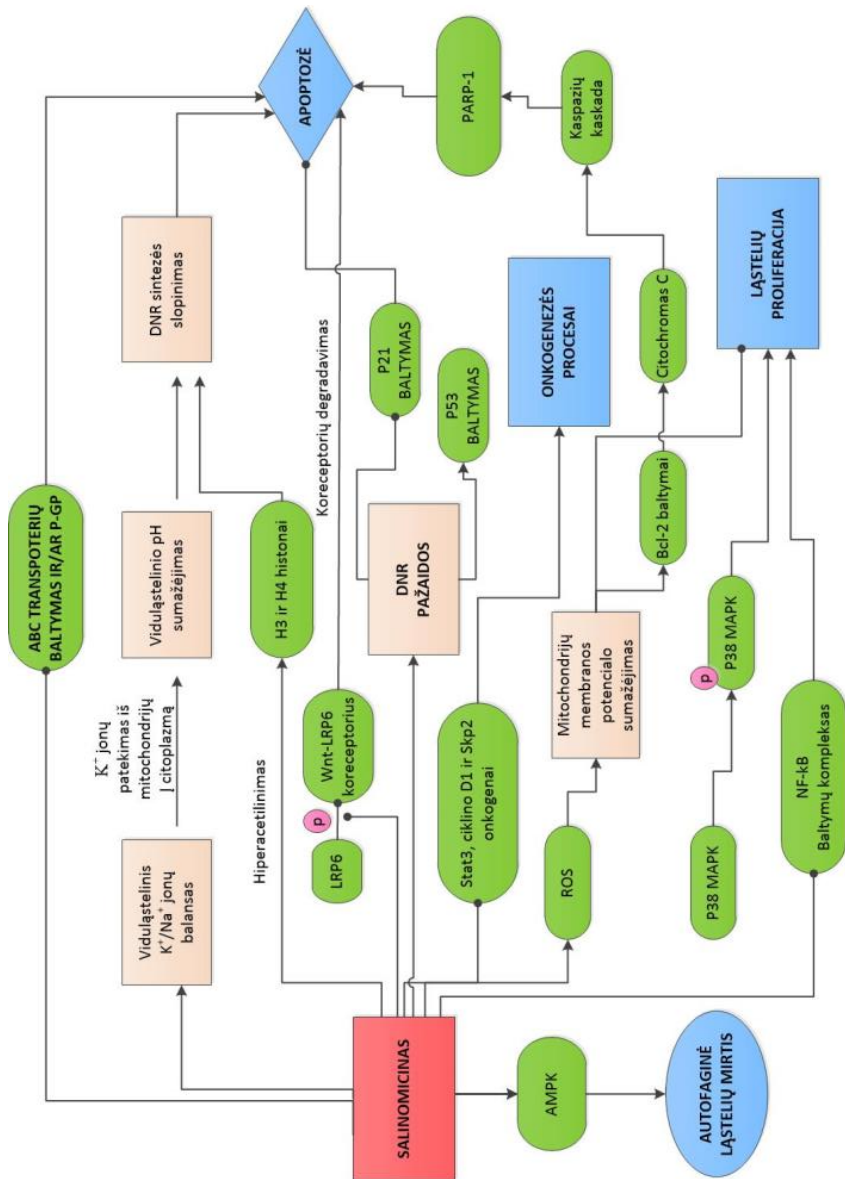


5 pav. Salinomicino struktūra (pagal (2)).

Pirmą kartą onkologijoje SAL buvo paminėtas 2009 metais, kuomet Gupta ir bendraautorių publikuotame straipsnyje buvo parodyta, kad SAL sumažino CSC skaičių šimtą kartų stipriau, lyginant su paklitakseliu, dažnai naudojamu chemoterapiniu vaistu krūties vėžiui gydyti (3). Pastaraisiais metais buvo atlikta nemažai ikiklinikinių tyrimų su šiuo junginiu, o 2010 metais buvo vykdomas pirmasis klinikinis tyrimas, kuris baigėsi teigiamais rezultatais tiek efektyvumo, tiek ir toksiškumo požiūriu (105). Nors kol kas nėra žinomas

tikslus SAL veikimo mechanizmas, paskutinių metų tyrimai leidžia po truputį suprasti jo veikimo mechanizmo principą (6 pav.). Galima išskirti keletą svarbesnių hipotezių:

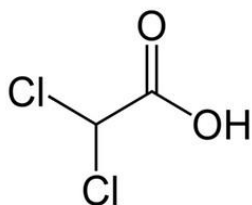
- Aktyvuodamas kaspazės-3 medijuojamą PARP skilimą, SAL sukelia vėžinių ląstelių apoptozę (106);
- SAL yra stiprus MRP-1 slopiklis, kuris gražina vėžinėms ląstelėms chemoterapinį jautrumą, mažindamas ABC transporterių šeimai priklausančio MRP, dėl kurio vaistai yra pašalinami iš ląstelės, raišką (4, 5);
- SAL yra WNT signalų perdavimo kelių slopiklis. WNT kelias yra siejamas su CSC atsparumu chemoterapijai ir radioterapijai bei ląstelių proliferacijai. Atliekant tyrimus su lėtinės limfocitinės leukemijos ląstelėmis buvo nustatyta, kad SAL blokuoja WNT kelius, slopindamas WNT koreceptorių LRP6 bei WNT signalų kaskados reguliuojamus genus *LEF1*, *CCND1* ir *FNI*, dėl ko įvyksta apoptozė (107);
- Oksidacinio fosforilinimo slopinimas. Priešingai nei sveikose ląstelėse, energiją gaminančiose oksidacinio fosforilinimo būdu, vėžinėse ląstelėse vyksta aerobinė glikolizė. Tačiau yra keletas išimčių – gliomos kamieninėse ląstelėse praktiškai vyksta vien tik oksidacinis fosforilinimas. SAL geba slopinti oksidacinį fosforilinimą mitochondrijose ir taip sustabdyti ląstelių dauginimąsi (108);
- SAL slopina EMT ląstelėje, didindamas e-kadherino raišką ir mažindamas mezenchiminių ląstelių žymens vimentino raišką (109);
- SAL sukelia DNR pažeidimus ir stabdo ląstelės ciklą G2 fazėje (41, 110);
- SAL sukelia histonų modifikacijas, hiperacetilindamas H3 ir H4 MDA-MB-231 ląstelėse, dėl ko gali būti aktyvuojama specifinių genų transkripcija, nulemianti ląstelės žūtį (111);
- SAL sukelia ląstelių žūtį, inaktyvuodamas STAT3 signalų perdavimo kelius, kurie yra siejami su įvairiais ląstelės augimo veiksniais, bei sumažindamas onkogeno *SKP2* raišką, kurio suaktyvėjusi veikla yra siejama su keletu įvairių tipų vėžių (106, 112);
- SAL slopina PDGFR (angl. *platelet-derived growth factor receptor beta*), MYC ir NOTCH signalų perdavimo kelius, kurių padidėjusi raiška yra siejama su leukemija (113); SAL sukelia mitochondrijų hiperpoliarizaciją, dėl to inicijuojami apoptozės procesai (114).



6 pav. Galimi salinomicino veikimo mechanizmai (modifikuota pagal (105)).

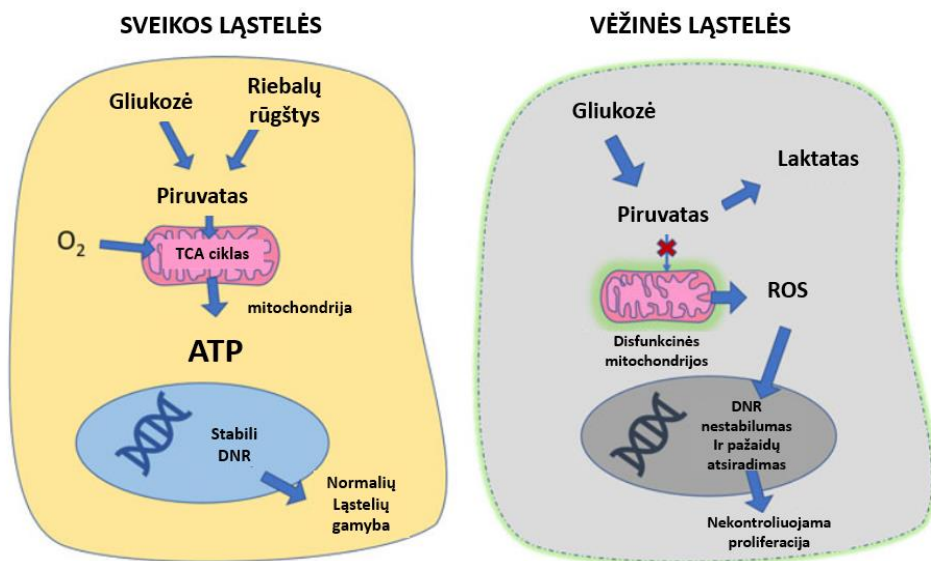
1.10 Dichloroacetatas ir Varburgo efektas

Jau beveik šimtmetį yra žinoma, kad vėžinės ląstelės didžiąją savo energijos dalį generuoja ne įprastinio oksidacinio kvėpavimo, būdingo sveikoms ląstelėms, būdu, o vykdydamos aerobinę glikolizę (115). Šis reiškinys yra vadinamas Varburgo efektu. Glikolizės metu yra pagaminama daug pieno rūgšties, kas skatina greitesnį vėžinių ląstelių dalijimąsi, atsparumą apoptozei, angiogenezės procesų aktyvavimą bei ląstelių mobilumą – veiksnius, turinčiu įtakos metastazių formavimuisi bei ligos progresavimui (116).



7 pav. Dichloroacetato struktūra (3).

DCA yra maža sintetinė molekulė (7 pav.), struktūriškai analogiška piruvatui, kuri turi gebėjimą slopinti PDK. Blokuodamas PDK, DCA sumažina laktato gamybą, dėl ko ląstelės yra priverstos sugrįžti prie oksidacinio fosforilavimo, o tuo pačiu ir prie įprastų, sveikai ląstelei būdingų, apoptozės procesų (15). Šie procesai supaprastintai pavaizduoti 8 pav.



8 pav. Metabolinių procesų, vykstančių sveikose ir navikinėse ląstelėse, palyginimas pagal Varburgo teoriją (modifikuota pagal (116)).

Dėl poveikio PDK yra nustatyti keletas antrinių DCA efektų, nulemiančių priešvėžinį šio vaisto poveikį:

- Sumažėjęs mitochondrijų membranos potencialas: DCA padidina mitochondrijų porų pralaidumą, dėl ko įvairūs proapoptoziniai tarpininkai, tokie kaip citochromas c ir apoptozę aktyvinantys veiksniai, patenka į ląstelės citoplazmą, kur jų dėka yra aktyvinama apoptozės procesų kaskada (117);
- Aktyviųjų deguonies formų (ROS, angl. *reactive oxygen species*) gamyba: dėl intensyviai vykstančių glikolizės procesų, vėžinės ląstelės išvengia ROS formavimosi, paprastai vykstančio oksidacinio fosforilinimo metu. Keisdamas metabolinius procesus ląstelėje, DCA aktyvuoja kaspazes, dėl kurių pradeda gamintis ROS ir aktyvinami apoptozės procesai (118).
- Kalcio jonų atpalaidavimas: dėl prislopintų metabolinių procesų mitochondrijose vėžinės ląstelės pradeda kaupti viduląstelinio kalcio jonus, dėl ko pagausėja proliferacijos transkripcijos veiksnių kiekis (15). DCA sumažina viduląstelinio kalcio kiekį, taip slopindamas proliferaciją bei aktyvuodamas apoptozės procesus (119).

Šiandien yra žinomi 3 su vėžinėmis ligomis siejami klinikiniai tyrimai, atlikti su DCA, kurių teigiami rezultatai leidžia teigti, kad DCA yra saugus ir perspektyvus vaistas onkologinėms ligoms gydyti (www.clinicaltrials.gov duomenys). DCA molekulė vėžio gydyme yra unikali tuo, kad jos terapinė dozė nepaveikia sveikų, nevėžinių ląstelių, todėl kad jos taikynys yra ląstelės su pakitusia mitochondrijų veikla (120). Taip pat išskirtinė šio vaisto savybė yra jo geras bioprieinamumas (15).

Tačiau kaip ir visi vaistai DCA turi ir šalutinių poveikių, kuriuos būtų galima suskirstyti į dvi kategorijas: neurologinius (periferinė neuropatija, sedacija, nuotaikų kaita, disorientacija) bei virškinimo sistemos (pykinimas, vėmimas, virškinimo sutrikimai, rėmuo). Nustojus vartoti DCA, šalutiniai poveikiai dažniausiai išnyksta kelių savaičių bėgyje (23).

Kalbant apie galimą DCA poveikio mechanizmą, verta paminėti ir atvirkštinio Varburgo efekto teoriją (121). Ši hipotezė, pirmą kartą paminėta 2009 metais, teigė, kad epitelinės vėžio ląstelės indukuoja aerobinę glikolizę (Varburgo efekto sąvoka) stromoje esančiuose fibroblastuose. Tokie su vėžiu susiję fibroblastai pereina miofibroblastinę diferenciaciją ir pradeda išskirti laktatą bei piruvatą. Šiuos aerobinės glikolizės metabolitus pasisavina epitelinės vėžio ląstelės ir naudoja juos trikarboksirūgščių cikle (TCA), taip pagamindami didelius energijos kiekius, leidžiančius ląstelėms intensyviau

vykdyti proliferaciją. Pagal šį alternatyvų onkogenezės modelį, epitelinės vėžio ląstelės „instruktuoja“ gerai funkcionuojančias stromos ląsteles transformuotis į žaizdų gijimo stromos ląsteles, kurių mikroaplinkoje yra gausu energijos, leisiančios greičiau augti navikui ir kraujagyslėms aplink jį (121).

Apibendrinant literatūros apžvalgą apie SAL ir DCA, galima teigti, kad nors kol kas ir nežinome išsamaus šių vaistų veikimo mechanizmo, tačiau jis greičiausiai tarpusavyje nepersidengia, o tai yra pageidautina charakteristika kombinacinei terapijai.

DCA ir SAL pasirinkimas šiame darbe grindžiamas trejopa galima terapine nauda:

- Pirma, dėl ypač lengvų, tradicinei chemoterapijai nebūdingų DCA šalutinių poveikių bei nedidelės SAL dozės, galima tikėtis, kad kombinacinė terapija bus pakankamai netoksiška sveikoms ląstelėms.
- Antra, SAL, selektyvaus CSC slopiklio, panaudojimas šioje terapijoje turėtų apsaugoti nuo terapinio atsparumo atsiradimo bei naviko atsinaujinimo.
- Trečia, veikiant navikines ląsteles dviem vaistais, turinčiais skirtingą veikimo mechanizmą, dėl galimų įvairių sąveikų, galima tikėtis sinergistinio citotoksinio poveikio vėžinėms ląstelėms.

2. TYRIMŲ METODAI

2.1 Ląstelių kultūros ir eksperimentiniai gyvūnai

Žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linijos DLD-1 ir HCT116 bei pelių plaučių vėžio ląstelių linija LLC1 buvo gautos iš *American Type Culture Collection* (Manasas, JAV). Visos trys ląstelių linijos buvo kultivuojamos RPMI-1640 ląstelių terpėje, papildytoje 10 proc. jaučio embriono serumu (Gibco, Vokietija), 2 mM glutamino (Gibco, Vokietija), 100 UI/ml penicilino (Sigma Aldrich, JAV) ir 0,1 mg/ml streptomicino (Sigma Aldrich, JAV). Ląstelės buvo kultivuojamos 5 proc. CO₂ aplinkoje.

SAL (Sigma Aldrich, JAV) buvo tirpinamas 96 proc. DMSO (angl. *dimethyl sulfoxide*), gaminant 5 mM koncentracijos tirpalą, kuris buvo laikomas –20°C temperatūroje. DCA (Sigma Aldrich, JAV) buvo ištirpintas fiziologiniame tirpale ir laikomas 4°C, 300 mM koncentracijoje. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido (MTT) milteliai (Sigma Aldrich, JAV) buvo ištirpinti vandenyje ir laikomi 4°C, 5 mg/ml koncentracijoje. Akridino oranžinis (AO) (ThermoFisher Scientific, JAV) ir propidžio jodidas (PI) (Invitrogen, CA, JAV) buvo tirpinami vandenyje, ruošiami atitinkamai 5 mg/ml ir 1 mg/ml koncentracijų ir laikomi 4°C temperatūroje.

C57BL/6 pelės (8–12 savaičių amžiaus) buvo įsigytos iš Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Biologinių modelių skyriaus (Vilnius, Lietuva). Gyvūnai buvo laikomi po keturis plastikiniuose narvuose, su pakankamu vandeniu ir maisto kiekiu. Visi eksperimentai buvo atlikti pagal Europos Parlamento direktyvas, darbui su gyvūnais moksliniais tikslais bei Lietuvos maisto ir veterinarijos tarnybos reikalavimais (Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimo atlikti bandymo su gyvūnais projektą Nr. G2-85; darbo su gyvūnais licencijos Nr. 397).

2.2 Ląstelių gyvybingumo analizė

Siekiant nustatyti kombinuotos terapijos poveikį ląstelių linijų gyvybingumui, buvo pasitelkta MTT analizė. MTT analizė buvo atliekama pagal gamintojo protokolą (122). Ląstelės buvo auginamos 96 šulinėlių plokštelėse, sėjant po 15 tūkst. (DLD-1 ir LLC1) ir 20 tūkst. (HCT116) ląstelių šulinėliui, 200 μl RPMI-1640 terpės. Po 24 val. inkubacijos, ląstelės buvo veikiamos SAL (0,01, 0,05, 0,25, 0,5, 1 μM), DCA (1, 5, 15, 30, 45 mM) arba įvairiomis šių vaistų kombinacijomis (visos vaistų kombinacijos bei jų

indeksai pateikiami **1 priede**. Įvairios DMSO koncentracijos buvo naudojamos kaip neigiama kontrolė SAL ir kombinacinei terapijai. Paveikus ląsteles vaistais, jos buvo kultivuojamos 48 val., tuomet veikiamos MTT reagentu ir inkubuojamos termostate. Po 1,5 val. susidarę formazano kristalai buvo tirpinami DMSO. Absorbicija buvo matuojama spektrofotometru prie 490 nm bangos ilgio. Kiekvienos grupės absorbcijos reikšmės buvo pateikiamos procentine išraiška, lyginant su kontroline grupe. Sinergistiniam poveikiui įvertinti buvo panaudotas Čou–Talalei (Chou–Talalay) metodas. Pirmiausia buvo apskaičiuojamos pusinės monoterapijų efektyvumo reikšmės (ED50), kurios vėliau buvo panaudotos kombinaciniam indeksui gauti (CI), tuomet, norint įvertinti koks buvo vaistų kombinacijos veikimo modelis (antagonistinis, adityvus ar sinergistinis) buvo brėžiamos Fa-CI kreivės (Fa, angl. *fraction affected*) bei izobologramos. Fa-CI kreivė atspindi vaistų veikimo modelį, o izobologramos nurodo poveikio priklausomybę nuo dozės. Šiame darbe buvo pateikiamos tik Fa-CI kreivės, kadangi jos vizualiai perteikia aiškesnę vaizdą, o izobologramose reikšmės neretai tarpusavyje persidengia. Fa-CI kreivėse kiekvienas taškas nurodo skirtingą kombinuotos terapijos dozę. Pagal Čou–Talalei metodą, visi taškai žemiau linijos ($CI < 1$) nurodo sinergizmą, taškai ant linijos nurodo adityvumą ($CI = 1$), o virš linijos yra antagonistinės reikšmės ($CI > 1$).

2.3 3D ląstelių kultūra

Daugialąsteliniai sferoidai buvo gaminami pagal Friedrich et al. paruoštą protokolą (123). Ląstelės buvo sėjamos į U formos 96 šulinėlių plokšteles, padengtas 1 proc. agaroze. Siekiant po 48 val. užauginti ~400 μm sferoidus, į šulinėlius buvo sėjama 1,3 tūkst. HCT116 ląstelių, 4,5 tūkst. DLD-1 ląstelių bei 1 tūkst. LLC1 ląstelių, tuomet plokštelės buvo centrifuguojamos 10 min., 1000 g. Po 48 val., sferoidai buvo veikiami monoterapijomis arba kombinacine terapija. Sferoidų dydis buvo matuojamas SpheroidSizer 1.0 kompiuterine įranga po 48, 96 ir 144 val. Nuotraukos buvo daromos su inversiniu optiniu mikroskopu Eclipse TS100 bei skaitmenine kamera DS-Fi2 (Nikon, Japonija).

2.4 Ląstelės ciklo ir apoptozės įvertinimas tėkmės citometru, naudojant Aneksino V ir propidžio jodido reagentus

Šiam eksperimentui ląstelės buvo sėjamos į 6 šulinėlių plokštelę, po 300 tūkst. HCT116 ląstelių ir 400 tūkst. DLD-1 ląstelių. Po 24 val., ląstelės buvo

veikiamos 0,25 μM SAL, 15 mM DCA arba jų kombinacija. Po 48 val., ląstelės buvo surinktos, nuplautos ir nucentrifuguotos. Apoptozės procesų analizei buvo naudojamas aneksino V–FITC apoptozės nustatymo rinkinys (Sigma Aldrich, JAV). Nucentrifuguotos ląstelės buvo suspenduotos 500 μl jungiančio buferio ir paveiktos 5 μl aneksino V reagentu, konjuguotu su FITC bei 5 μl propidžio jodido (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bei palaikytos tamsoje 5 min. Ląstelės buvo analizuojamos BD LSR II tėkmės citometru (BD Biosciences, JAV) ir FACS Diva programine įranga (BD Biosciences, JAV).

2.5 Viduląstelinio pH matavimai

pH_i matavimui naudojome pH jautrų membranai laidų fluorescuojantį dažą BCECF-AM (ThermoFisher Scientific, JAV), kaip aprašyta mūsų ankstesnėje publikacijoje (124). Ant 1 cm diametro 170 μm storio stiklelių užaugintos ląstelės preinkubuojamos 5 min. Krebso-Ringerio (Krebs–Ringer) tirpale (mM): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl_2 , 2; MgCl_2 , 1; CsCl, 2; BaCl_2 , 1; HEPES, 5; gliukozė, 5; piruvatas, 2 (pH 7,4) su BCECF-AM (2 μM). Dažas pakaitomis sužadinas 440 nm ir 495 nm ilgio bangomis, 0,5 sek. trukme, kas 15 sek. (siekiant išvengti blukimo), emisijai naudojant 540 nm ilgio bangos filtrą. 495 nm ilgio banga sužadinas dažas yra jautrus, o sužadinimas 440 nm ilgio banga yra žymiai mažiau jautrus pH. Išspinduliuotos šviesos prie dviejų sužadinimo bangų santykio matavimai (fonas atimtas) perskaičiuoti į pH_i reikšmes pagal kalibracinę kreivę. Kalibracinė kreivė gaunama, veikiant ląsteles 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 pH KCl (140 mM) tirpalu su nigericinu (20 μM) membranos permeabilizavimui ir pusiausvyros tarp pH_i ir ekstraląstelinio pH (pH_o) nusistovėjimui (125).

Fluorescenciniai matavimai atlikti motorizuotu inversiniu fluorescenciniu mikroskopu Olympus IX81, šaldoma skaitmenine kamera Orca R2 (Hamamatsu Photonics K.K., Japonija), fluorescencijos sužadinimo sistema MT10 (Olympus Life Science Europa GmbH, Vokietija) ir programine įranga Excellence (Olympus Life Science Europa GmbH, Vokietija). Viduląstelinis pH matuojamas pasirinktose individualių ląstelių vietose (ROI, angl. *regions of interest*).

2.6 Kalceino testas

Kalceinas yra MRP substratas, todėl naudojome kalceino testą, siekdami įvertinti SAL, DCA, o taip pat žinomo ABC transporterių slopiklio ciklo-

sporino ir paneksinų bei koneksinų puskanalių slopiklio karbenoksolono, kuris yra ir GPP slopiklis, poveikį kalceino pašalinimui iš HCT116 ir DLD-1 ląstelių. Ląstelės užkraunamos membranai laidžia kalceino-AM forma, preinkubuojant RPMI-1640 tirpale su 4 μ M kalceino-AM 37°C 30 min. CO₂ inkubatoriuje. Ląstelės buvo paveikiamos visomis tiriamomis medžiagomis prieš pradedant registravimą. Kalceinas sužadinamas 490 nm ilgio banga, o emisija registruojama panaudojant 540 nm ilgio bangos filtru. Fluorescencija kas 10 min. sužadinama mažo intensyvumo 100 msek. šviesos impulsu. Kalceino fluorescencijos kinetika RPMI-1640 terpėje registruojama 37°C drėgnoje atmosferoje su 5 proc. CO₂, panaudojant Olympus IX81 fluorescencinį inversinį mikroskopą su inkubatoriumi INUBG2E-ONICS (Tokai Hit, Shizuoka-ken, Japonija), šaldomą skaitmeninę kamerą Orca R2 (Hamamatsu Photonics K.K., Japonija), fluorescencijos sužadinimo sistemą MT10 (Olympus Life Science Europa GmbH, Vokietija) ir programinę įrangą Excellence (Olympus Life Science Europa GmbH, Vokietija). Kalceino fluorescencija matuojama pasirinktose individualių ląstelių vietose (ROI).

2.7 RNR ekstrakcija

HCT116 ir DLD-1 ląstelės buvo auginamos 2D ir 3D kultūrose ir surinktos po 4 dienų nuo užsėjimo. RNR ekstrakcija buvo atlikta iš maždaug 2×10^6 kiekvienos kultūros ląstelių, panaudojant Quick RNA MiniPrep (Zymo Research, JAV). Kiekybinis ir kokybinis RNR įvertinimas buvo atliktas Nanodrop spektrofotometru prie 260/280 nm ilgio bangų (ThermoFisher Scientific, JAV)

2.8 Kiekybinė tikro laiko polimerazės grandininė reakcija (RT-qPCR)

Atvirkštinės transkripcijos Aid RT rinkinys (ThermoFisher Scientific, JAV) buvo panaudotas kopijinės DNR (kDNR) sintezei. Vadovaujantis gamintojo instrukcijomis, 1 μ g RNR buvo panaudota kDNR sintezei. Tikro laiko kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (RT-qPCR) buvo atlikta panaudojant Kapa SYBR Fast qPCR mišinį (2x) (Kapa Biosystems, JAV) Realplex4 Mastercycler termociklerio pagalba (Eppendorf, JAV) tokiomis sąlygomis: 95°C (3 min.) polimerazės aktyvavimui, 40 2-jų žingsnių ciklą 95°C (3 sek.) denatūracijai ir 60°C (30 sek.) prilydymui/ilginimui. Kiekvienai reakcijai 96 šulinėlių plokštelėje buvo panaudota 10 μ l, susidedančio iš 1 μ l

kDNR, 5 µl Kapa SYBR FAST qPCR mišinio, tiesioginių ir atvirkštinių pradmenų (Biolegio, Olandija) ir nukleazių neturintio vandens. *HPRT1* (“namų ruošos”) geno raiška buvo naudojama kaip endogeninė kontrolė. Genų raiškos skirtumas buvo įvertinamas kartais, rezultatai buvo analizuojami GenEx v.6.0.1 (MultiD Analyses AB, Švedija) programa.

2.9 Mitochondrijų membranos potencialo pokyčio matavimas

Mitochondrijų membranos potencialo pokytis buvo matuojamas panaudojant JC-1 reagentą (Biotium, JAV) pagal gamintojo instrukcijas. Ląstelės buvo sėjamos į 6 šulinėlių plokšteles ir po 24 val. veikiamos atitinkamai vaistais. Mitochondrijų membranos potencialas buvo matuojamas po 24 val., panaudojant po 1 mln. ląstelių iš kiekvienos grupės. Ląstelės buvo maišomos su 0,5 ml JC-1 darbinio skysčio ir laikomos 15 min. tamsoje. Tuomet ląstelės buvo nucentrifuguojamos, suspenduojamos 2 ml PBS ir analizuojamos tėkmės citometru (BD LSR II, BD Biosciences, JAV). Tyrime buvo naudojami 488 nm ilgio bangos ir 530/30 ir 575/26 filtrai. Rezultatai buvo analizuojami FACS Diva programine įranga (BD Biosciences, JAV)

2.10 Genų raiškos tildymas sintetinėmis siRNR

Genų transfekcijai buvo naudojamas lipofektamino RNAiMAX reagentas (Thermofisher Scientific, JAV) bei sintetinės malonilo CoA-acil baltymo transacilazės (*MCAT*, angl. *malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase*) ir ornitino aminotrasferazės (*OAT*, angl. *ornithine aminotransferase*) genų mažosios interferuojančios ribonukleonorūgštys (siRNR, angl. *small interfering ribonucleic acid*) (Thermofisher Scientific, JAV). 24 val. prieš genų raiškos tildymą, ląstelės buvo sėjamos ir inkubuojamos 24 šulinėlių plokštelėje. Prieš eksperimentą genų siRNR buvo skiedžiama OPTIMEM terpe bei sumaišomos su lipofektamino RNAiMAX reagentu, 1:1 santykiu. Tuomet ląstelės veikiamos paruoštais reakcijų mišiniais ir inkubuojamos apie 24 val. Po 24 val. reakcijos terpė nusiurbama ir ląstelės praplaunamos RPMI-1640 terpe.

2.11 Fluksominė analizė

SAL ir DCA poveikis *in silico* buvo tiriamas, naudojant vėžinių ląstelių genomo apimties metabolinį modelį (angl. *Genome Scale Metabolic Model*)

(126). Šis modelis apima visas žmogaus metaboles reakcijas. Maksimalus kiekvienos reakcijos (srauto) greitis yra pagrindžiamas pagal kiekvienos ląstelių linijos genų raiškos (RNR sekoskaitos) duomenis (126, 127). DCA poveikis modeliuojamas kaip piruvato dekarboksilazės (PDC, angl. *pyruvate decarboxylase*) srauto (reakcijos greičio) padidėjimas, o SAL – kaip protonų pernašos per mitochondrijų membraną padidėjimas. Tokiu būdu, abiejų junginių poveikis modeliuojamas pagal tai, kaip PDC srauto ir protonų pernašos padidėjimas, atskirai ir kartu, pagal duomenų bazėse esančius duomenis galėtų paveikti vėžinių ląstelių dauginimosi greitį.

2.12 *In vivo* eksperimentai

C57BL/6 pelėms (n = 48), įtrauktoms į eksperimentą, buvo suleista apie 3×10^5 LLC1 ląstelių į paodį, sprando srityje. 6-ą dieną, kuomet navikai jau buvo apčiuopiami, pelės atsitiktine tvarka buvo suskirstytos į keturias grupes ir pradėtos gydyti vienu iš keturių preparatų: 1) kontroliniu tirpalu (0,5 proc. DMSO); 2) 3 mg/kg SAL; 3) 200 mg/kg DCA; ir 4) kombinacija iš 3 mg/kg SAL ir 200 mg/kg DCA. Tirpalas injekcijoms buvo paruoštas iš 0,9 proc. NaCl tirpalo. Injekcijos buvo atliekamos kiekvieną dieną, panašiu metu, leidžiant vaistus į peritoniumą.

Naudotos vaistų dozės buvo parinktos pilotinio eksperimento metu. Šio eksperimento metu, dvi SAL ir DCA dozės, atrinktos iš publikuotų mokslinių straipsnių, bei jų kombinacijos buvo pabandytos su nedideliu skaičiumi pelių (2 pelės vienoje grupėje). Taikytos SAL dozės buvo 1 mg/kg bei 5 mg/kg, o DCA dozės – 50 mg/kg bei 300 mg/kg. Pilotinio eksperimento metu nustatėme, kad minimali abiejų vaistų koncentracija nesukėlė reikšmingo terapinio poveikio nei monoterapijų nei kombinacinės terapijos grupėse, o maksimali vaistų dozė, nors ir turėjo ženklų terapinį poveikį, tačiau taipogi nulėmė pastebimai prastesnę pelių būseną, ypač SAL ir SAL + DCA grupėse. Vadovaudamiesi šiais rezultatais, pasirinkome tarpines vaistų koncentracijas: 3 mg/kg SAL ir 200 mg/kg DCA.

Pelės buvo sužymėtos ir navikai matuojami kas dvi dienas. Naviko dydis buvo apskaičiuojamas pagal šią formulę: $V = (W^2 \times L) / 2$ (1), W – naviko išmatavimai plačiausiame taške, L – naviko išmatavimai ilgiausiame taške. Kiekvienas gyvūnas buvo pasveriamas prieš injekcijas ir dozė buvo apskaičiuojama pagal jo kūno masę. Tik pelės, sveriančios 18–22 g, buvo įtrauktos į eksperimentą.

10-ą dieną iš kiekvienos grupės atsitiktine tvarka buvo parinkta po 4 peles histologiniams tyrimams. Likusios 8 pelės kiekvienoje grupėje toliau

dalyvavo tyrime, siekiant įvertinti pelių išgyvenamumą. Dėl etinių priežasčių, eksperimento pabaiga kiekvienai pelei buvo laikoma tada, kai naviko dydis pasiekdavo 1500 mm³ dydį – tuomet pelės buvo eutanazuojamos cervikalinės dislokacijos būdu.

2.13 Imunohistocheminė analizė

Mėginiai analizei buvo paimti iš įvairių navikų vietų. Audiniai buvo fiksuojami 10 proc. formaline, išdžiovinti ir įdėti į parafiną. Parafinizuoti audiniai buvo pjaustomi 2 mm storiumi ir dažomi eozinu ir hematoksilinu (H&E, Sigma-Aldrich). EMT, CSC ir Ki-67 žymenų raiškai nustatyti, audiniai iš pradžių buvo inkubuojami su 5 proc. BSA (angl. *bovine serum albumin*) 45 min., o po to veikiami pirminiais žymenų antikūnais CD133 (Abcam), CD44 (Ventana), vimentinu (Ventana), e-kadherinu (Ventana) ir Ki-67 (Abcam) bei laikomi 4°C per naktį. Tuomet mėginiai buvo veikiami peroksidazę konjuguojančiais antriniais antikūnais 45 min., 37°C bei stebimi panaudojant ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, JAV, Roche Diagnostics GmbH, Vokietija). Žymenų raiškos įvertinimas buvo atliekamas skaičiuojant ląsteles pjūviuose įprastinės šviesinės mikroskopijos būdu ir rezultatas pateikiamas procentine išraiška (ląstelių skaičiaus, kuriose žymuo yra matomas, ir bendro ląstelių skaičiaus santykis). Mėginiai buvo analizuojami OLYMPUS BX43 mikroskopu (OLYMPUS U-TBI-3 1H64849, Japonija) ir nuotraukos buvo daromos su OLYMPUS cellSens Entry 2.1 aparatūra (Build 17342, Japonija). Kiekvieno naviko arba organo analizė buvo atliekama nepriklausomo patologo iš mažiausiai 5 pjūvių, naudojant koduotą mėginį (akluoju būdu).

2.14 Statistinė analizė

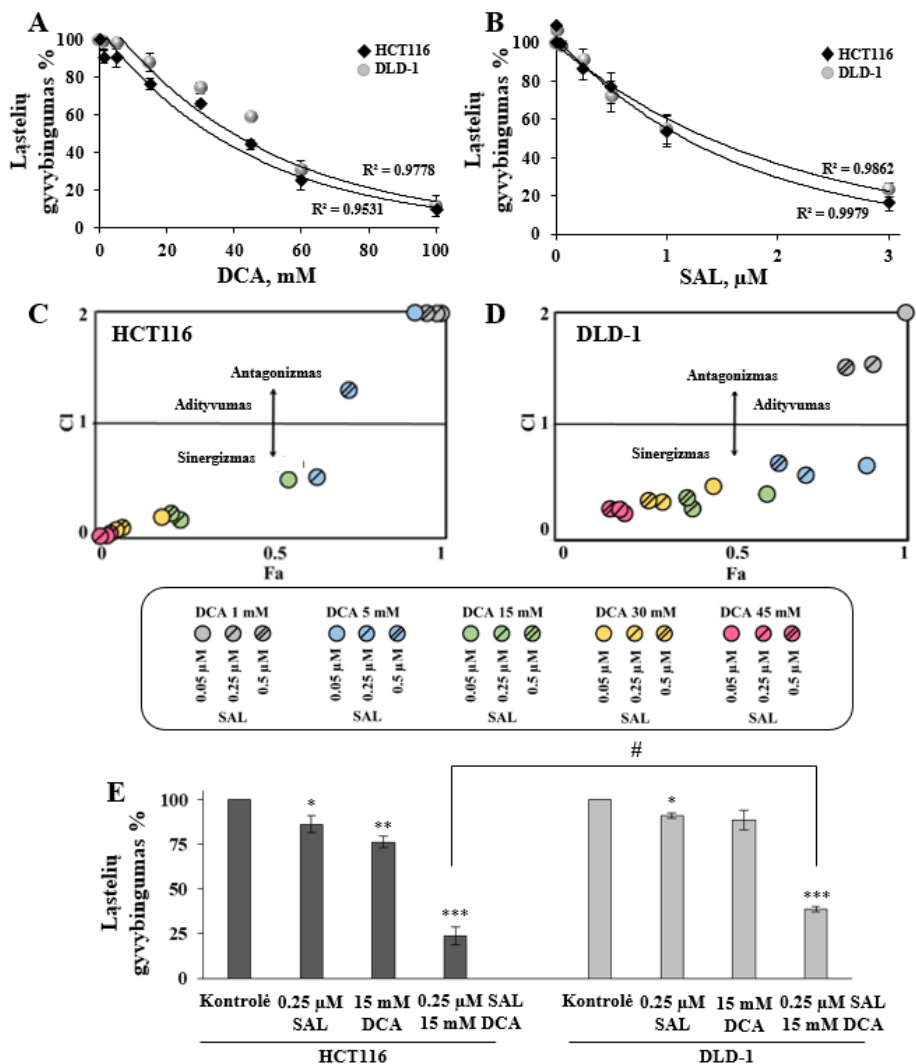
Visi rezultatai buvo išreikšti kaip vidurkis su (\pm) standartine paklaida. Statistinė analizė buvo atliekamos SPSS v.20 (IBM, Armonk, NY, JAV) ir Sigma Plot 10 programine įranga (Systat Software, San Jose, CA, JAV). SAL + DCA kombinacijos sinergistinis įvertinimas, FA-CI grafikų braižymas bei CI apskaičiavimas buvo atliekamas panaudojant Čou–Talalei programinę įrangą CompuSyn 2.0 (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, JAV). Mantelio–Kokso (Mantel–Cox arba long-rank) analizė buvo naudojama gyvybingumo rezultatų patikimumui įvertinti, o Stjudento (Student) t testas – visiems likusiems eksperimentams. P vertės mažesnės už 0,05 buvo laikomos patikimai reikšmingomis.

3. REZULTATAI

3.1 SAL ir DCA poveikis storosios žarnos vėžio ląstelėms *in vitro*

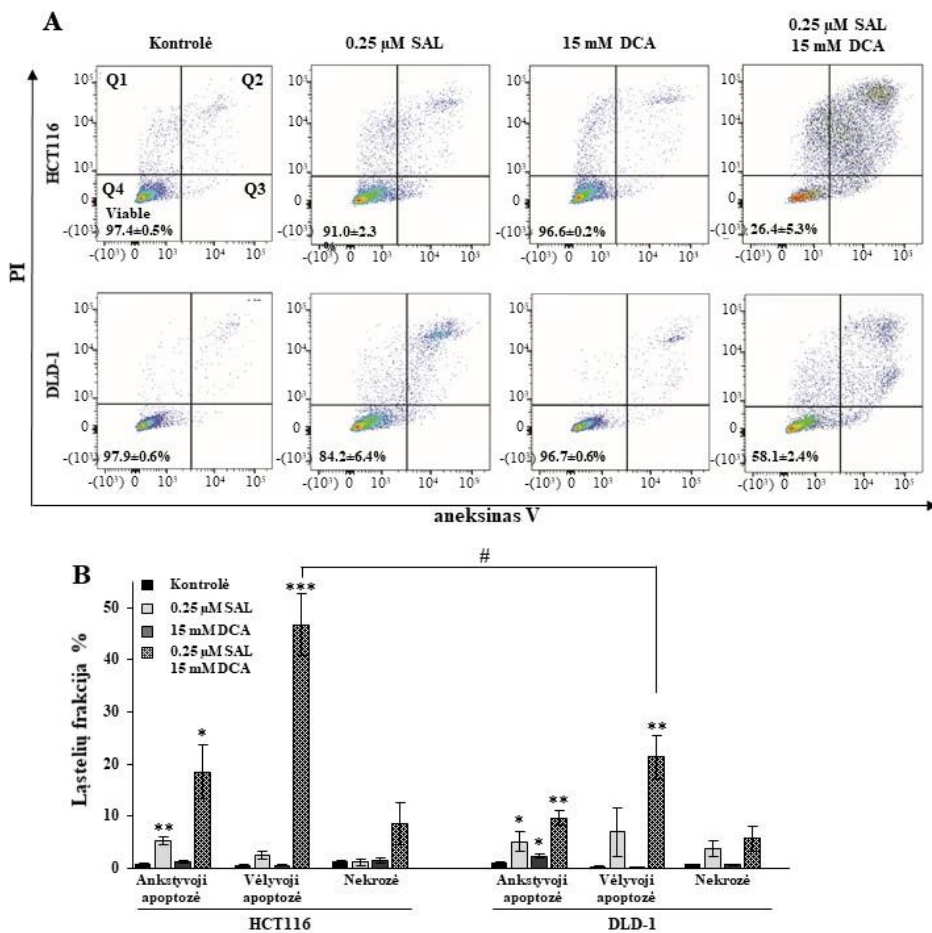
3.1.1 DCA, SAL ir jų kombinacijos poveikis DLD-1 ir HCT116 ląstelėms 2D kultūroje

Eksperto dizainas buvo sukurtas remiantis Čou–Talalei nepastovaus santykio vaistų metodu, skirtu nustatyti koku būdu (sinergistiniu, adityviu ar antagonistiniu) veikia kombinuota terapija. Iš pradžių buvo atlikti dozės-atsako eksperimentai monoterapijoje, siekiant apskaičiuoti DCA ir SAL IC_{50} reikšmes. Jos buvo 33,7 ir 44,4 mM eksperimentuose su DCA bei 1,6 ir 1,3 mM su SAL, atitinkamai eksperimentuose su HCT116 ir DLD ląstelėmis (**9A** ir **B pav.**). Dozės kombinuotos terapijos eksperimentams buvo atrinktos pagal jų citotoksinį poveikį monoterapijoje – tik tos koncentracijos, kurių reikšmė buvo žemiau nei IC_{50} , buvo įtrauktos į kombinuotos terapijos eksperimentus. Tuomet įvairūs šių dozių deriniai buvo bandomi su abiem ląstelių linijomis. Buvo nustatyta, kad kombinacinis gydymas reikšmingai slopino gyvybingumą abejose ląstelių linijose. Kuomet DCA koncentracijos buvo tarp 1 ir 5 mM, su visomis SAL tirtomis koncentracijomis poveikis ląstelėms buvo adityvus arba antagonistinis HCT116 ląstelėse, tačiau paveikus ląsteles su 15 mM ar daugiau DCA, su visomis SAL koncentracijomis poveikis buvo sinergistinis. DLD-1 ląstelės reagavo nežymiai jautriau – jau nuo 5 mM DCA koncentracijos buvo stebimas sinergizmas (**9C** ir **D pav.**). Kaip pavaizduota **9E pav.**, kuomet buvo naudojama 0,25 μ M SAL dozė monoterapijoje, HCT116 ląstelių gyvybingumas sumažėjo vos iki $86,1 \pm 4,6$ proc., o DLD-1 – iki $91,3 \pm 1,5$ proc. Panaši tendencija buvo stebima ir paveikus 15 mM DCA: HCT116 ląstelių gyvybingumas buvo $76,3 \pm 3,2$ proc., o DLD-1 – $88,6 \pm 5,5$ proc. Tačiau sukombinavus šias dvi vaistų koncentracijas, buvo stebimas ženkliai didesnis gyvybingumo sumažėjimas: HCT116 ląstelių iki $23,7 \pm 4,9$ proc., o DLD-1 ląstelių – $38,7 \pm 1,3$ proc. Abejais atvejais nustatytas CI buvo žemesnis nei 1, kas rodo sinergizmą. Lyginant poveikį tarp ląstelių linijų abiejų monoterapijų grupėse, statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo pastebėta, tačiau palyginus kombinuotos terapijos poveikį tarp ląstelių linijų, buvo nustatyta, kad HCT116 ląstelės buvo jautresnės kombinacinei terapijai negu DLD-1 ($p < 0,05$).



9 pav. Citotoksinis salinomicino (SAL), dichloroacetato (DCA) ir jų kombinacijos poveikis HCT116 ir DLD-1 ląstelėms 2D kultūroje, įvertintas MTT būdu. (A, B) Dozės-atsako kreivės po 48 val. poveikio su SAL (A) ir DCA (B) HCT116 ir DLD-1 ląstelių linijose. (C, D, E) Paveiktosios frakcijos ir kombinacinio indekso analizė (Fa-CI), nustatanti kombinuotos terapijos veikimo pobūdį po 48 val. poveikio SAL ir DCA kombinacija HCT116 ir DLD-1 ląstelėms. Visos kombinacinio indekso (CI) reikšmės, didesnės negu 2, pavaizdavimo tikslu buvo prilygintos 2. Duomenys gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų, matuojant 6 šulinėliuose kiekvienomis sąlygomis, ir pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (lyginant su kontrole); # $p < 0,05$ (lyginant ląstelių linijas).

Panašus vaistų poveikis buvo pastebėtas ir atlikus gyvybingumo analizę tėkmės citometru, panaudojant aneksino V reagentą. **10A pav.** pateikiami tyrimo rezultatai, atspindintys ląstelių gyvybingumą. Tėkmės citometrijos tyrimas patvirtina MTT metodu registruotą kombinuotos terapijos poveikį – tiek HCT116, tiek DLD-1 ląstelėse SAL ir DCA veikė sinergistiškai. HCT116 ląstelės buvo šiek tiek jautresnės negu DLD-1 (**10B pav.**).



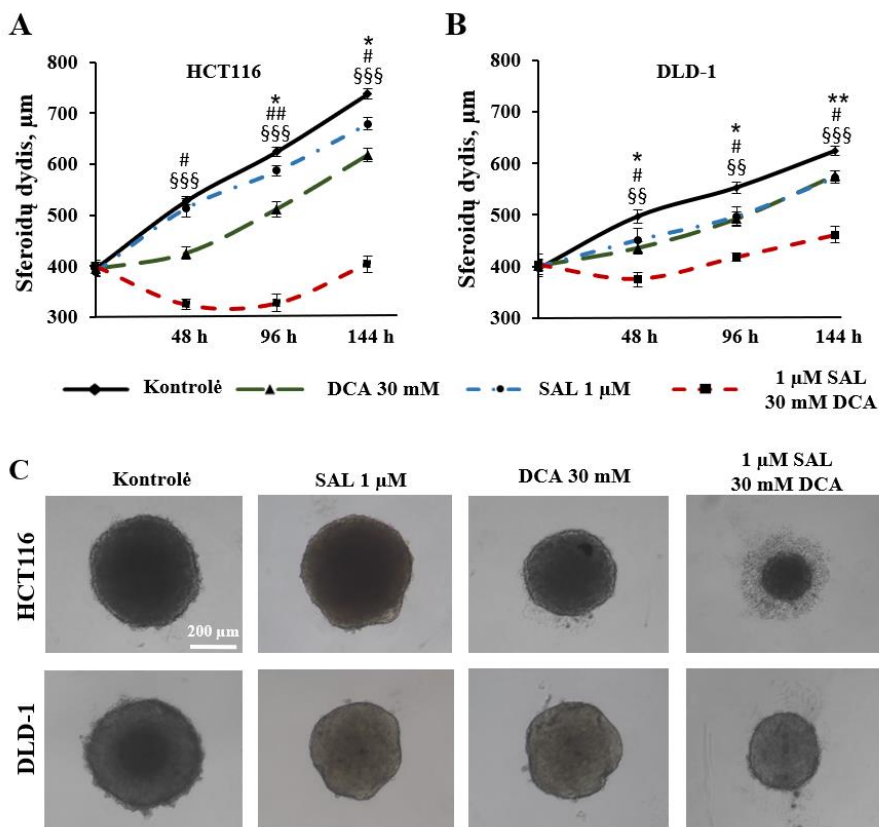
10 pav. Tėkmės citometrijos eksperimentų rezultatai po dažymo su aneksino V ir propidžio jodido (PI) reagentais, paveikus DLD-1 ir HCT116 ląsteles salinomicinu (SAL), dichloroacetatu (DCA) arba jų kombinacija. (A) DLD-1 ir HCT116 ląstelių atsakas į terapiją. Q1 kvartilė (nekrozė) rodo ląsteles, nusidažiusias PI dažu, bet ne Annexin V dažu. Q2 (vėlyvoji apoptozė) – ląstelės nusidažiusios abejais dažais. Q3 (ankstyvoji apoptozė) – ląstelės nusidažiusios aneksino V dažu, bet ne PI dažu. Q4

(gyvybingos ląstelės) – ląstelės nenusidažiusios nei vienu dažu. **(B)** 0,25 μM SAL ir 15 mM DCA poveikis HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumui po 48 val. poveikio. Duomenys gauti tėkmės citometru, atlikus tris nepriklausomus eksperimentus, ir pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (lyginant su kontrole); # $p < 0,05$ (lyginant ląstelių linijas).

3.1.2 DCA, SAL ir jų kombinacijos poveikis DLD-1 ir HCT116 ląstelėms 3D kultūroje

Kitas uždavinys buvo įvertinti ar kombinuota SAL ir DCA terapija turi toki patį sinergistinį citotoksinį poveikį ir 3D ląstelių kultūroje. Šiai hipotezei patikrinti mes panaudojome daugialąstelių sferoidų technologiją (žr. Metodus). Praėjus 48 val. po ląstelių užsėjimo, buvo pamatuotas sferoidų dydis, kuris siekė $395 \pm 17 \mu\text{m}$ ($n = 216$). Tą pačią dieną sferoidai buvo veikiami įvairių DCA ir SAL koncentracijų monoterapija. Vaistų poveikis buvo analizuojamas po 48, 96 ir 144 val., vertinant sferoidų dydį. Iš gautų monoterapijos rezultatų buvo atrinktos šios koncentracijos kombinacinei terapijai: 30 mM DCA bei 1 μM SAL. Vaistų poveikis, kaip ir monoterapijos eksperimentuose, buvo matuojamas trimis skirtingais laiko momentais (po 48, 96 ir 144 val.). Buvo pastebėta, kad po 48 val. HCT116 ląstelių sferoidų dydis buvo nepakitęs po SAL terapijos, po DCA terapijos sferoidai buvo mažesni ~ 20 proc. ($p < 0,05$), o po kombinuotos terapijos sferoidų dydis sumažėjo 39 proc. ($p < 0,001$), lyginant su kontrole. Kaip pavaizduota **11 pav.**, šioje ląstelių linijoje kombinuotos terapijos poveikis buvo beveik dukart stipresnis lyginant su monoterapijomis visais laiko intervalais. Tuo tarpu DLD-1 ląstelių linijos jautrumas buvo mažesnis DCA ir kombinacinei terapijai. Po 48 val. sferoidų dydis SAL grupėje buvo 10 proc. mažesnis, lyginant su kontrole ($p < 0,05$), DCA grupėje – 12 proc. ($p < 0,05$), o kombinuotos terapijos grupėje – 25 proc. ($p < 0,01$). Panaši tendencija buvo pastebėta ir po 96 bei 144 val. poveikio.



11 pav. Citotoksinis salinomicino (SAL), dichloroacetato (DCA) ir jų kombinacijos poveikis 3D ląstelių kultūroje. 1 µM SAL ir 30 mM DCA poveikis HCT116 (A) ir DLD-1 (B) ląstelių linijose po 48, 96 ir 144 val. Duomenys gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų, matuojant 6 sferoidų dydžius iš kiekvienos grupės, ir pateikti kaip vidurkis ± standartinė paklaida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (lyginant su kontrole); # $p < 0,05$ (lyginant tarp grupių). (C) Tipinės HCT116 ir DLD-1 sferoidų iliustracijos po 48 val., paveikus su 1 µM SAL ir 30 mM DCA.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (SAL lyginant su kontrole); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (DCA lyginant su kontrole); §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ (SAL + DCA lyginant su kontrole).

3.1.3 Genų raiškos palyginimas tarp ląstelių linijų 2D ir 3D ląstelių kultūrose

Pastebėjus pakitusį DLD-1 ląstelių jautrumą chemoterapijai 3D kultūroje, išsiskelėme tikslą išsiaiškinti šio reiškinio priežastį. Kadangi yra žinoma, jog SAL selektyviai taikosi į CSC, suformulavome hipotezę, kad padidėjęs DLD-1 ląstelių jautrumas 3D kultūroje galėtų būti dėl specifinių CSC genų aktyvacijos. Šiai hipotezei patikrinti pasitelkėme genų raiškos analizę ir

ištyrėme toliau nurodytų genų raišką (be chemoterapinio poveikio) abiejose ląstelių linijose – tiek 2D, tiek 3D ląstelių kultūrose:

- vėžio kamieninių ląstelių žymenys (*ALDH1A1*, *CEACAM5*, *ALCAM*, *LGR5*, *DPP4*, *CD133*, *CD24*, *CD29* ir *CD44*);
- epitelinės mezenchiminės tranzicijos žymenys (*SNAIL1*, *SNAIL2*, *CDH1* ir *CDH2*);
- multipotentiškumo žymenys (*NANOG* ir *POU5F1*).

1 lentelė rodo, kad multipotentiškumo genų raiškos skirtumų nebuvo pastebėta nei vienoje ląstelių linijoje (FC – pokytis kartais, angl. *fold change*, $< 1,5$, $p > 0,05$), lyginant 2D ir 3D ląstelių kultūras, ir tik vieno EMT žymens (*SNAIL2*) raiška buvo suaktyvėjusi DLD-1 linijoje 3D ląstelių kultūroje. Tuo tarpu daugumos CSC žymenų raiška (*CEACAM5*, *ALDH1A1*, *CD24*, *CD44* ir *CD133*) buvo žymiai padidėjusi DLD-1 ląstelėse 3D kultūroje, o HCT116 ląstelėse buvo suaktyvėjusi tik vieno geno raiška (*DPP4*). Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad padidėjęs DLD-1 ląstelių jautrumas SAL monoterapijai 3D kultūroje gali būti siejamas su padidėjusia CSC žymenų raiška 3D aplinkoje.

1 lentelė. Santykinė epitelinės–mezenchiminės tranzicijos (EMT), multipotentiškumo ir vėžio kamieninių ląstelių (CSC) genų raiška DLD-1 ir HCT116 ląstelių 2D ir 3D ląstelių kultūrose.

Genų raiškos analizė				
Genai	Ląstelių linijos ir kultūros			
	HCT116 3D/2D		DLD-1 3D/2D	
	FC	P reikšmė	FC	P reikšmė
EMT žymenys				
<i>SNAIL1</i>	-1,1	0,1821	-1,1	0,3618
<i>SNAIL2</i>	-1,4	0,0513	1,1	0,0429
<i>CDH1</i>	1,0	0,7252	1,0	0,5211
<i>CDH2</i>	1,1	0,3529	1,3	0,0821
Multipotentiškumo žymenys				
<i>NANOG</i>	1,0	0,9418	1,3	0,0200
<i>POU5F1</i>	1,2	0,1071	-1,1	0,4263
Vėžio kamieninių ląstelių žymenys				
<i>ALCAM</i>	-1,2	0,0236	1,2	0,1517
<i>CEACAM5</i>	-1,1	0,9179	24,3	0,0000
<i>ALDH1A1</i>	0,0	> 0,99	8,5	0,0193
<i>LGR5</i>	2,2	0,2784	-1,9	0,0001
<i>DPP4</i>	1,7	0,0004	-1,5	0,0001
<i>CD24</i>	1,0	0,6359	2,0	0,0001
<i>CD29</i>	-1,3	0,0055	-1,0	0,4036
<i>CD44</i>	-1,2	0,0661	3,4	0,0001
<i>CD133</i>	1,1	0,1786	1,7	0,0001

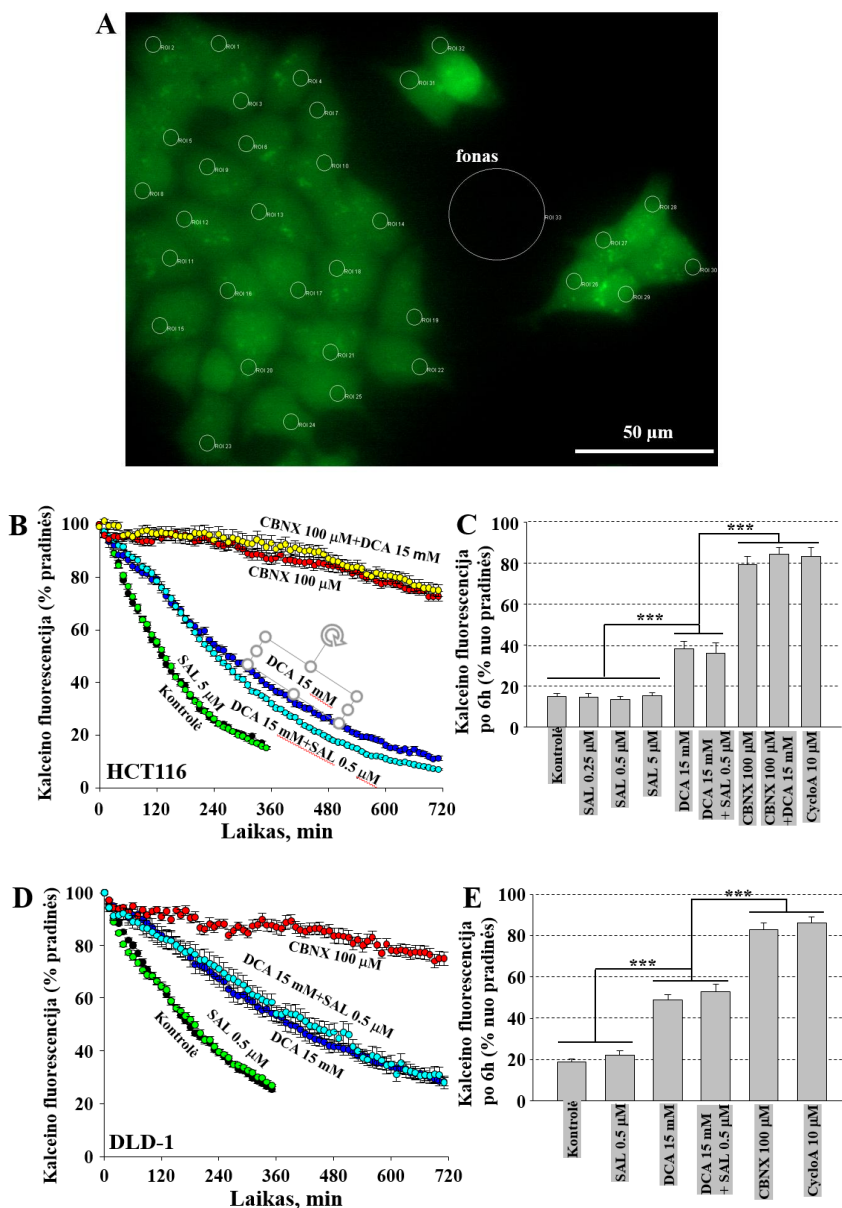
Genų raiškos pokytis įvertintas atliekant tris nepriklausomus RT-qPCR pakartojimus.

3.1.4 SAL ir DCA sinergizmo mechanizmo tyrimai

3.1.4.1 Daugiavaisčio atsparumo baltymo vaidmuo

Aukščiau aprašyti tyrimai parodė, jog DCA ir SAL gali sinergistiškai slopinti navikinių ląstelių gyvybingumą, tačiau liko neaišku, koks šių medžiagų sinergizmo molekulinis mechanizmas. Žinoma, kad vėžinės ląstelės, o ypač vėžio kamieninės ląstelės, gali efektyviai šalinti priešvėžinius vaistus. Tai atliekama daugiavaisčio atsparumo siurblių dėka (128). Iškėlėme hipotezę, kad viena iš tirtų medžiagų gali smarkiai sustiprinti kitos veikimą, slopindama MRP aktyvumą. MRP aktyvumui įvertinti dažnai naudojamas fluorescuojančio dažo kalceino testas (129), nes kalceinas yra daugelio MRP substratas, ir jo šalinimo iš ląstelės kinetiką galima stebėti fluorescencinės mikroskopijos pagalba. Pirmiausia, baziniam HCT116 ir DLD-1 ląstelių MRP aktyvumui įvertinti panaudojome žinomus slopiklius ciklosporiną A ir karbenoksoloną. **12A pav.** parodyta kalceinu užkrautų HCT116 ląstelių grupė. Kiekvienoje iš ląstelių pažymėtame ROI buvo matuojama kalceino fluorescencijos kitimo kinetika, o vidutinės reikšmės pavaizduotos paveikslėlio **B-E** dalyse. Kaip parodyta **12B** ir **D pav.**, kontrolės sąlygose kalceino fluorescencija šiose ląstelėse greitai silpnėja, kas liudija, jog jose MRP aktyvumas yra didelis. Tuo tarpu, panaudojus ciklosporiną A arba karbenoksoloną, kalceino šalinimas iš ląstelės smarkiai sulėtėja. Tai rodo, kad abiejų tipų ląstelėse MRP aktyvumas yra didelis, o DCA ir SAL sinergizmas galėjo būti pasiektas, jei kuri nors iš medžiagų, be jau žinomo savo veikimo būdo, papildomai slopino ir MRP aktyvumą. Ankstesni kitų autorių tyrimai parodė, kad iš tiesų SAL per ilgesnį laiko tarpą gali sumažinti MRP raišką (130), tačiau mūsų eksperimentuose kalceino šalinimo kinetika kontrolės sąlygose ir panaudojus iki 5 μ M SAL nesiskyrė nei HCT116 (**12B** ir **C pav.**), nei DLD-1 (**12D** ir **E pav.**) ląstelėse. Vadinasi, SAL tiesiogiai neslopina MRP aktyvumo. Tačiau kalceino šalinimo iš ląstelių kinetika abiejų tipų ląstelėse smarkiai sulėtėjo panaudojus DCA (**12B-E pav.**). Šis poveikis buvo netikėtas, nes iki šiol, mūsų žiniomis, literatūroje nėra duomenų, kad DCA galėtų slopinti MRP aktyvumą.

Šie rezultatai parodė, kad SAL ir DCA sinergizmas, citotoksiškai veikiant vėžines ląsteles, galėjo būti pasiektas dėl MRP aktyvumą slopinančio DCA poveikio.



12 pav. Dichloroacetato (DCA) poveikis HCT116 ir DLD-1 ląstelių daugiavaišio atsparumo baltymo (MRP) aktyvumui. (A) Kalceinu-AM užkrautų HCT116 ląstelių grupė su pažymėtomis pasirinktomis individualių ląstelių vietomis (ROI) kiekvienoje ląstelėje, kur buvo matuojama kalceino fluorescencijos kinetika. **(B)** Kalceino fluorescencijos silpnėjimas HCT116 ląstelėse kontrolės sąlygomis ($n = 38$) ir panaudojus salinomyciną (SAL) ($5 \mu\text{M}$; $n = 32$), DCA (15 mM ; $n = 27$), DCA su SAL ($n = 32$), karbenoksoloną (CBNX) ($100 \mu\text{M}$; $n = 33$), CBNX su DCA ($n = 35$). **(C)** Kalceino fluorescencijos intensyvumas HCT116 ląstelėse po 6 val., lyginant su pradine

fluorescencija kontrolės sąlygomis ir panaudojus nurodytas medžiagas. **(D)** Kalceino fluorescencijos silpnėjimas DLD-1 ląstelėse kontrolės sąlygomis ($n = 37$) ir panaudojus SAL ($0,5 \mu\text{M}$; $n = 16$), DCA (15 mM ; $n = 17$), DCA su SAL ($n = 21$), CBNX ($100 \mu\text{M}$; $n = 17$). **(E)** Kalceino fluorescencija DLD-1 ląstelėse po 6 val., lyginant su pradine fluorescencija kontrolės sąlygomis ir panaudojus nurodytas medžiagas. C ir D duomenys gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų ir pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida; *** $p < 0,001$.

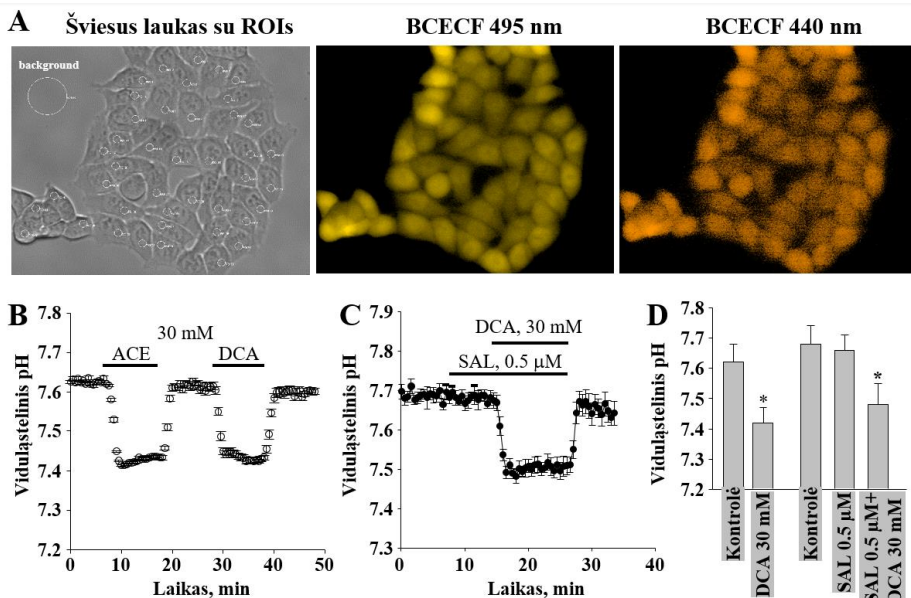
3.1.4.2 Viduląstelinis pH

Žinoma, kad piktybinių navikų mikroaplinka gali būti parūgštėjusi ($\text{pH}_o < 7$), tuo tarpu navikinių ląstelių viduląstelinis pH būna labiau šarminis ($\text{pH}_i = 7,5\text{--}7,7$). Tokiu būdu gali susidaryti gana žymūs pH gradientai, kurie gali skatinti naviko ląstelių gyvybingumą arba silpninti chemoterapijos poveikį (131). Taip pat, prie mažesnio pH_o , kai kurie vaistai į ląstelę patenka sunkiau. (132).

Tyrėme, ar SAL, tariamai veikdamas pH_i reguliuojančių baltymų, tokių kaip anglies anhidrazės, $\text{Na}^+/\text{6CO}_3^-$ kotransporteris, monokarbonsilato transporteris, aktyvumą, gali keisti pH_i . Taip pat patikrinome, ar DCA ($\text{NaCHCl}_2\text{CO}_2$) gali keisti pH_i , greitai pereidamas per ląstelės membraną į ląstelės vidų, taip, kaip tą padaro artimos struktūros acetatas (NaCH_3CO_2), kuris eksperimentuose tradiciškai naudojamas pH_i mažinimui (133).

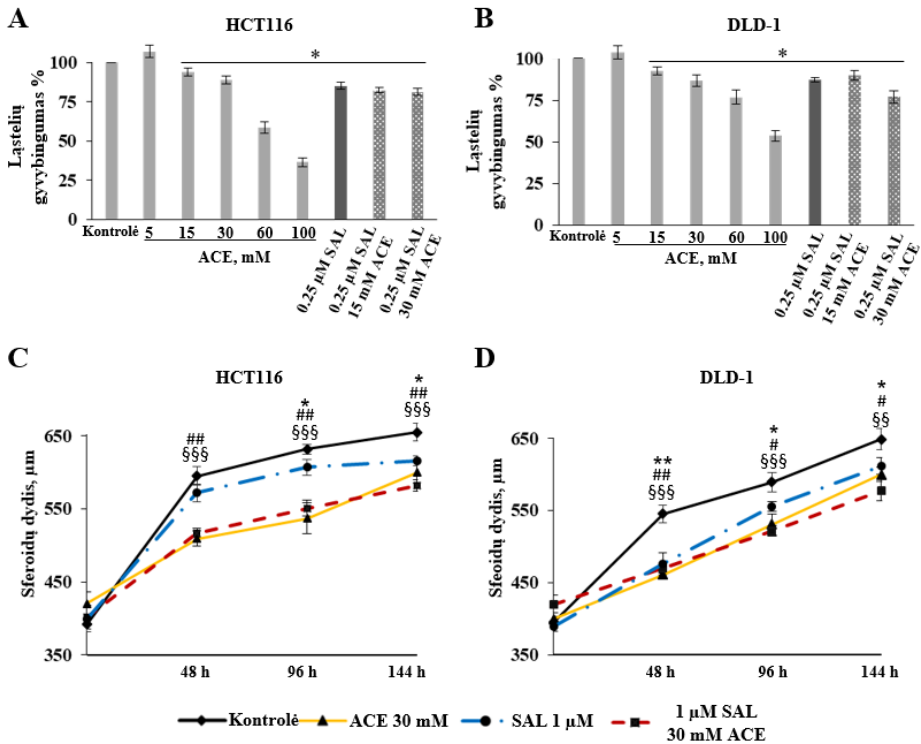
Naudotos SAL ir DCA koncentracijos neturėjo poveikio pH_o . pH_i matavimui naudojome pH_i jautrų fluorescuojantį dažą BCECF-AM (žr. Metodų skyrių). **13A pav.** parodyta BCECF užkrautų HCT116 ląstelių grupė. Kiekvienoje iš ląstelių pažymėtame ROI buvo matuojama BCECF fluorescencijos emisija prie dviejų sužadavimo bangų. Iš tikrųjų, pH_i HCT116 ląstelėse kontrolės sąlygomis buvo padidėjęs ($7,6\text{--}7,7$) (**13B–D pav.**). SAL koncentracija iki $2 \mu\text{M}$ neturėjo jokio poveikio pH_i (**13C ir D pav.**), tuo tarpu 30 mM DCA mažino pH_i panašiai, kaip acetatas (**13B ir D pav.**). Identiškus rezultatus gavome ir eksperimentuose su DLD-1 ląstelėmis.

Šie rezultatai parodė, kad DCA gali mažinti vėžinių ląstelių pH_i ir tokiu būdu galbūt prie SAL ir DCA sinergizmo. Siekdami patikrinti šią galimybę, atlikome HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumo tyrimus 2D ir 3D kultūrose, vietoje DCA panaudodami acetatą, kuris neturi poveikio PDK ir, mūsų žiniomis, MRP aktyvumui.



13 pav. Salinomicino (SAL) ir dichloroacetato (DCA) poveikis HCT116 ląstelių pH_i . (A) BCECF-AM užkrautų HCT116 ląstelių grupė su pažymėtomis pasirinktomis individualių ląstelių vietomis (ROI) kiekvienoje ląstelėje, kur buvo matuojama kalceino fluorescencijos emisijos kinetika prie dviejų sužadavimo bangų. (B) Acetato (ACE; 30 mM) ir DCA (30 mM) poveikis pH_i (n = 41). (C) SAL (0,5 μ M) ir SAL kartu su DCA (30 mM) poveikis pH_i (n = 24). (D) Apibendrinti SAL ir DCA poveikio pH_i duomenys, gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų ir pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida; * p < 0,05.

Kaip parodyta **14 pav.**, SAL ir acetatas neturėjo sinergistinio citotoksinio poveikio HCT116 ir DLD-1 ląstelėms 2D ir 3D kultūrose. Šie rezultatai parodė, kad SAL ir DCA sinergizmas yra nebūtinai susijęs su DCA sukeltu pH_i sumažėjimu.



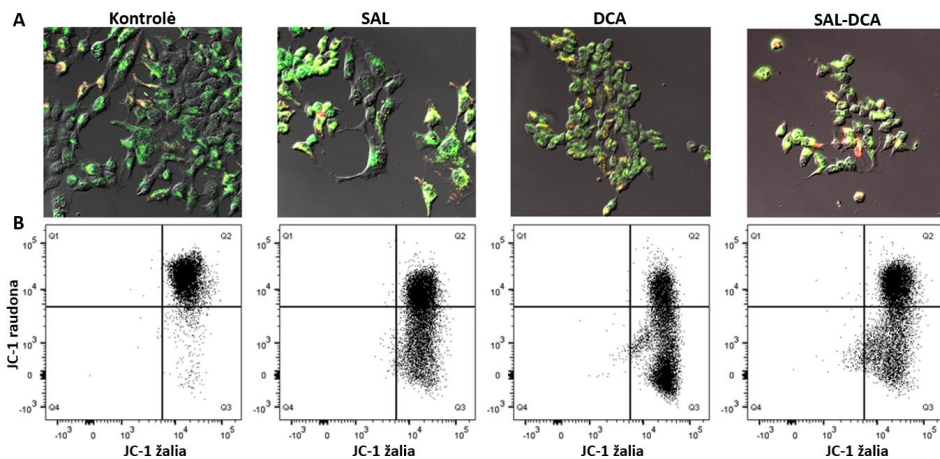
14 pav. Citotoksinis acetato (ACE), salinomicino (SAL) ir jų kombinacijos poveikis HCT116 ir DLD-1 ląstelėms 2D ir 3D kultūrose. (A, B) HCT116 ir DLD-1 ląstelių gyvybingumas po 48 val. poveikio ACE, SAL ir jų kombinacija, įvertintas MTT testu. Čou–Talalei analizė nerodo acetato ir SAL sinergizmo (kombinacinis indeksas (CI) > 1). (C, D) SAL, ACE ir jų kombinacijos poveikis HCT116 ir DLD-1 daigialąstelinėms sferoidų dydžiui. Duomenys gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų, matuojant kiekvienomis sąlygomis atitinkamai ląstelių gyvybingumą 6 šulinėliuose arba 6 sferoidų dydį. * $p < 0,05$ (lyginant su kontrole) – rezultatams A ir B. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (SAL lyginant su kontrole); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ (acetatą lyginant su kontrole); §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ (SAL ir acetato kombinaciją lyginant su kontrole) – rezultatams C ir D.

3.1.4.3 SAL, DCA ir jų kombinacijos poveikis mitochondrijų membranos potencialui

Mitochondrijoms prarandant savo elektrocheminį gradientą, didėja jų membranos pralaidumas. Tokiu būdu į ląstelės citoplazmą patenka įvairių junginių, signalizuojančių ląstelėms pradėti apoptozės procesus. Šioje darbo dalyje mes iškėlėme hipotezę, kad DCA kombinacijoje su SAL depoliarizuoja

vėžines ląsteles ir dėl to ląstelėse prasideda apoptozės procesai. Šiai hipotezei patikrinti mes panaudojome JC-1 reagentą. JC-1 akumuliuojasi į agregatus sveikų ląstelių mitochondrijose ir fluorescuoja raudonai. Vykstant ląstelių žūčiai, mitochondrijose atpalaiduojami kaspazių aktyvatoriai, tokie kaip citochromas c, pakinta elektronų transportas bei mitochondrijų membranų poliškumas, ir JC-1 iš mitochondrijų patenka į citoplazmą, kur savo monomerinėje formoje fluorescuoja žaliai. Eksperimentai buvo atliekami tėkmės citometru bei fluorescencine mikroskopija po 24 val. poveikio nurodytais vaistais (**15 pav.**).

Nustatėme, kad nėra statistiškai reikšmingo skirtumo tarp monoterapijų bei kombinuotos terapijos grupių ir padarėme išvadą, kad sinergistinis citotoksinis poveikis nėra susijęs su vaistų poveikiu mitochondrijų membranų potencialui.



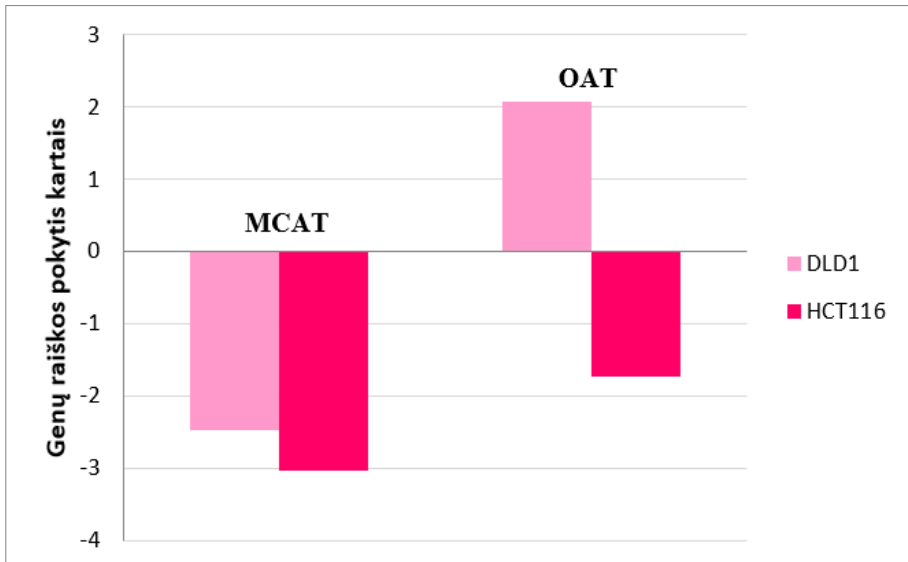
15 pav. Salinomicino (SAL) ir dichloracetato (DCA) kombinuotos terapijos poveikis DLD-1 ląstelių mitochondrijų membranų potencialui. (A) Fluorescencinės mikroskopijos rezultatai: tipiniai ląstelių vaizdai po monoterapijų ir kombinacinės terapijos, pažymėjus ląsteles JC-1 dažų; raudona spalva nurodo mitochondrijas su nepakitusiu mitochondrijų membranų potencialu, žalia spalva – su pažeista membrana. **(B)** Tėkmės citometrijos rezultatai: Q2 kvartilė rodo sveikas ląsteles, Q3 – ląsteles su sumažėjusiu mitochondrijų membranų potencialu. Duomenys gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų.

3.1.4.4 Kiti galimi dichloracetato taikiniai mitochondrijose

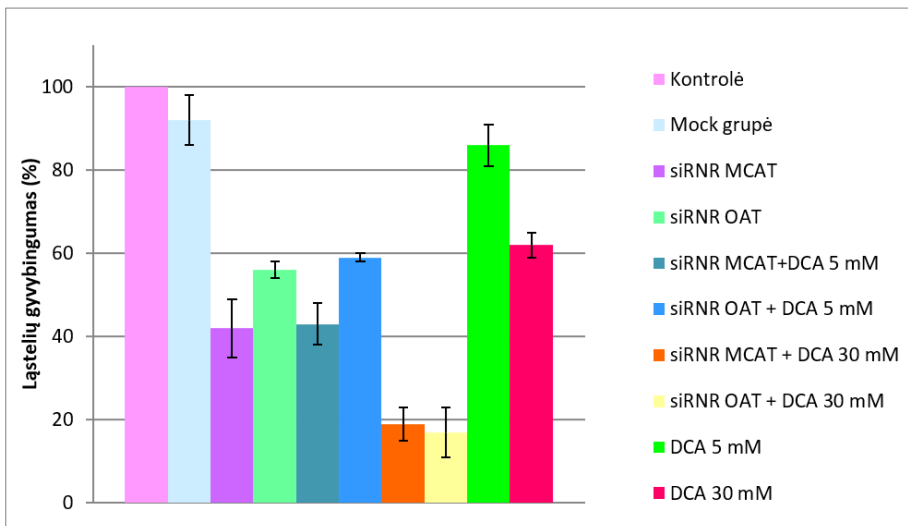
DCA yra struktūriškai analogiškas piruvatui, kuris mitochondrijose slopina PDK ir tokiu būdu sumažina laktato gamybą, dėl ko ląstelės yra priverstos sugrįžti prie oksidacinio fosforilinimo, ir tuo pačiu – prie įprastų, sveikai ląstelei būdingų, apoptozės procesų (15). Taip pat, DCA turi keletą antrinių poveikių, nulemiančių priešvėžines šio vaisto savybes (žr. Literatūros apžvalgą). Todėl, bendradarbiaujant su LSMU Kardiologijos instituto Ląstelių kultūrų laboratorijos vyresniuoju mokslo darbuotoju dr. Sergio Bordel buvo atlikta fliuksominė analizė, siekiant nustatyti papildomus DCA taikinius, kurie galėtų dalyvauti DCA ir SAL sinergizme. Fluksomika vadinama metodų, naudojamų biologinių sistemų metabolinių reakcijų (srautų) greičiui įvertinti, visuma (žr. Metodus). Šiuo būdu buvo nustatyti du pagrindiniai taikiniai: *MCAT* ir *OAT*. *MCAT* ir *OAT* genų koduojami baltymai randami tik mitochondrijose. *MCAT* geno koduojamas baltymas katalizuoja malonilo grupės, esančios malonilo kofermente A, perkėlimą į mitochondrijų baltymus, pernešančius acilo grupę. Šie fermentai mažina malonilo kofermento A koncentraciją. *OAT* geno koduojamas baltymas mitochondrijose skatina arginino ir ornitino virsmus į glutamatą ir gama-amino sviesto rūgštį (GABA). Fliuksominis tyrimas parodė, jog DCA ir SAL sinergizmas, mažinant vėžinių ląstelių gyvybingumą, galėtų būti susijęs su SAL ir/ar DCA galimai slopinančiu poveikiu *MCAT* ir *OAT* genams. Šiai hipotezei patikrinti, visų pirma ištyrėme *MCAT* ir *OAT* genų raiškos pokyčius po poveikio su 1 μM SAL. Kaip parodyta **16 pav.**, *MCAT* geno raiška, lyginant su kontrole, buvo sumažėjusi 2,5 ir 3 kartus atitinkamai DLD-1 ir HCT116 ląstelėse, o tuo tarpu *OAT* geno raiška DLD-1 ląstelių linijoje buvo 2 kartus padidėjusi, o HCT116 – 1,7 karto sumažėjusi.

Kituose eksperimentuose panaudojome siRNR, slopinančią šių genų raišką, ir išmėginome dviejų koncentracijų (5 ir 30 mM) DCA poveikį ląstelių gyvybingumui. Kaip parodyta **17 pav.**, 30 mM DCA koncentracija atitinkamai sumažino transfekuotų ląstelių gyvybingumą net iki 18 ir 19 proc. DLD-1 ląstelėse su nutildytais *OAT* ir *MCAT* genais. Tačiau taip pat pastebėjome, kad, lyginant su kontrole, siRNR panaudojimas žymiai sumažino ir DCA nepaveiktų ląstelių gyvybingumą. Ląstelių su nutildytu *OAT* genu gyvybingumas buvo 59 proc., o su nutildytu *MCAT* genu siekė vos 40 proc. DLD-1 ląstelių linijoje. Panašūs rezultatai buvo gauti ir su HCT116 ląstelių linija.

Akivaizdu, kad šie genai yra gyvybiškai svarbūs ląstelėms ir jų slopinimas pats savaime sukelia greitą ląstelių žūtį. Kadangi tokio stipraus citotoksinio poveikis nepastebėjome nei su vienu iš tiriamųjų vaistų, atliekant eksperimentus monoterapijoje, padarėme išvadą, kad *MCAT* ir *OAT* genų raiškos slopinimas vaistais yra galimas tik teoriškai, o praktikoje, dėl daugybės galimų biologinių priežasčių, ši hipotezė nepasitvirtina.



16 pav. *MCAT* ir *OAT* genų raiškos pokytis po poveikio su salinomycinu (SAL), įvertintas tikro laiko kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos (RT-qPCR) metodu, trimis nepriklausomais eksperimentais.

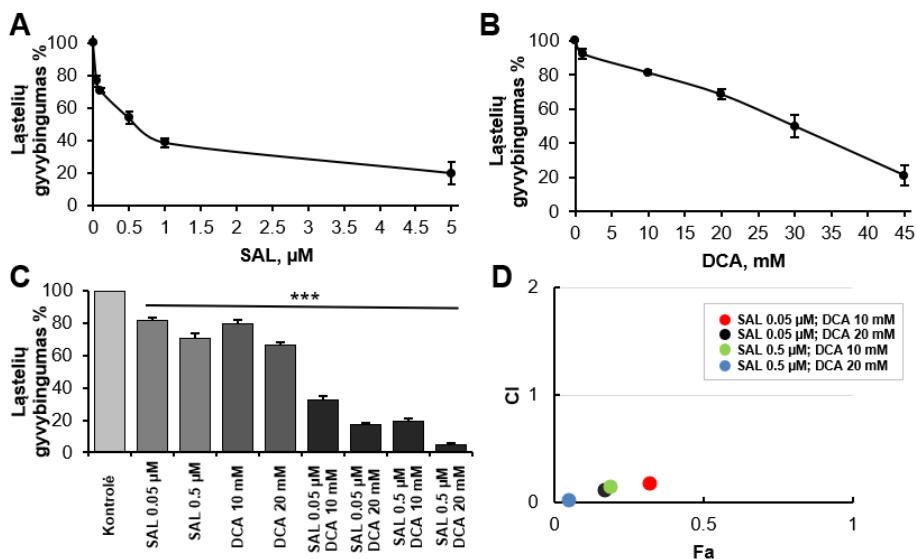


17 pav. Dichloroacetato (DCA) poveikis ląstelių gyvybingumui po *MCAT* ir *OAT* genų nutildymo DLD-1 ląstelių linijoje. Gyvybingumas įvertintas MTT būdu 24 val. po transfekcijos. Duomenys gauti iš dviejų nepriklausomų eksperimentų ir pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida.

3.2 SAL ir DCA poveikis plaučių vėžio ląstelėms *in vitro* ir *in vivo*

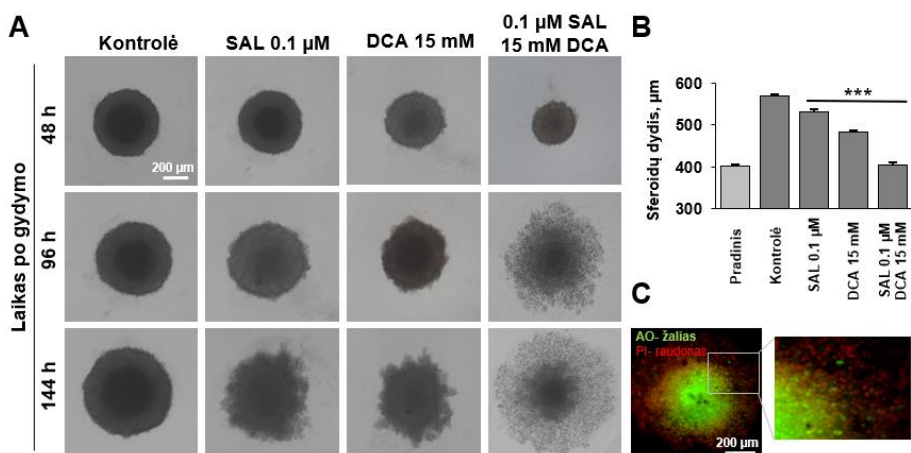
3.2.1 DCA, SAL ir jų kombinacijos poveikis LLC1 ląstelėms 2D ir 3D kultūrose

Tolimesni šio darbo eksperimentai buvo atliekami su pelių plaučių vėžio ląstelėmis LLC1, siekiant įvertinti kombinuotos terapijos poveikį *in vivo*. Tuo tikslu pirmiausia su LLC1 ląstelėmis pakartojome *in vitro* eksperimentus, aprašytus pirmoje darbo dalyje. Atlikę abiejų monoterapijų dozės-atsako eksperimentus, nustatėme, kad SAL ir DCA IC_{50} reikšmės yra atitinkamai 28,26 mM ir 0,66 μ M (**18 pav.**). Kombinuotos terapijos eksperimentai buvo atliekami su 10 ir 20 mM DCA bei 0,05 ir 0,5 μ M SAL. Čou–Talalei metodo pagalba buvo nustatyta, kad visos vaistų kombinacijos turėjo stiprų citotoksinį poveikį LLC1 ląstelių linijai. Kaip pavaizduota **16 pav.**, apskaičiuotas CI buvo mažesnis nei 1, ir tai rodo sinergistinį medžiagų poveikį.



18 pav. Citotoksinis salinomicino (SAL) ir dichloroacetato (DCA) poveikis LLC1 ląstelėms 2D kultūroje (MTT testas). (A, B) Ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo SAL ir DCA koncentracijos po 48 val. poveikio. (C) SAL, DCA ir jų kombinacijos poveikio ląstelių gyvybingumui palyginimas. (D) Skirtingų SAL ir DCA koncentracijų kombinacijos priklausomybė paveiktosios frakcijos ir kombinacinio indekso (Fa-CI) analizėje. Duomenys gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų ir pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida. *** $p < 0,001$.

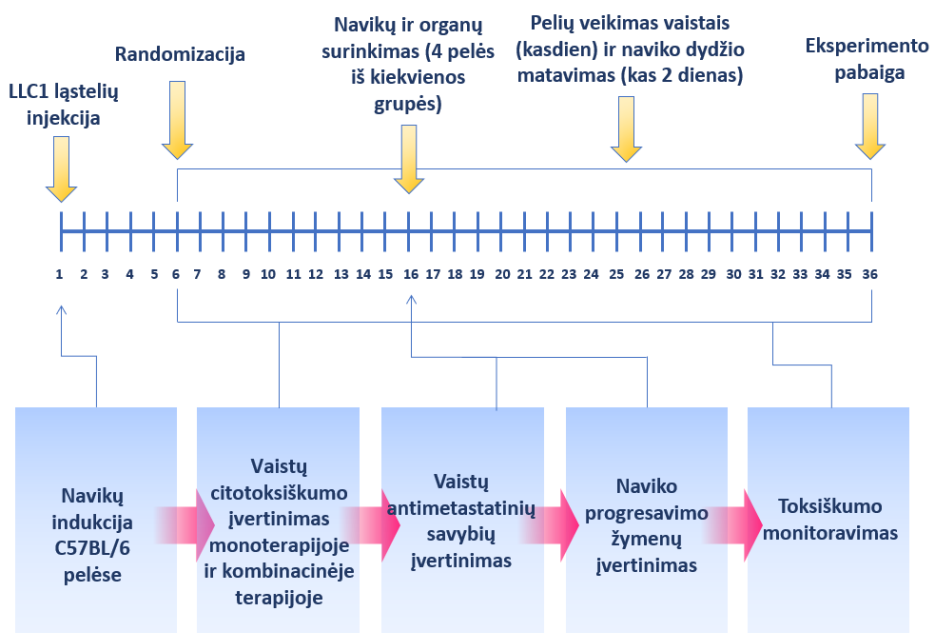
Eksperimentų su LLC1 ląstelėmis 3D kultūroje rezultatai pastebimai skyrėsi nuo eksperimentų su storosios žarnos vėžio ląstelėmis. Panašus buvo tik sferoidų dydžio pokytis po 48 val. poveikio. Kaip ir DLD-1 ląstelių atveju, LLC1 ląstelių linijoje buvo matomas panašus atsakas tiek monoterapijai tiek kombinacinei terapijai: po poveikio su SAL ar DCA, ląstelių dydis sumažėjo atitinkamai 7 ir 15 proc., tuo tarpu kombinuota terapija sumažino sferoidų dydį ~29 proc., lyginant su kontrole. Tačiau, po 96 val. sferoidų dydis tarp monoterapijų ir kombinuotos terapijos tapo nebesulyginamas, nes kombinacine terapija paveiktų sferoidų struktūra pradėjo irti. Po 144 val. šis sferoidų irimo reiškinys buvo pastebėtas taip pat ir monoterapijų grupėse. AO ir PI buvo panaudoti norint išsiaiškinti sferoidų ląstelių gyvybingumą. Buvo nustatyta, kad tik gilesniuose sferoido sluoksniuose esančios ląstelės buvo gyvybingos (žalia spalva – AO dažas), o ląstelės aplink sferoidą buvo mirusios (raudona spalva – PI dažas) (**19 pav.**).



19 pav. Citotoksinis salinomicino (SAL) ir dichloroacetato (DCA) poveikis LLC1 ląstelėms 3D kultūroje. (A) Būdingas LLC1 sferoidų vaizdas po 48, 96 ir 144 val. poveikio su SAL, DCA ir jų kombinacija. **(B)** Citotoksinio 0,1 μM SAL, 15 mM DCA ir jų kombinacijos poveikio palyginimas po 48 val. Duomenys gauti iš trijų nepriklausomų eksperimentų ir pateikti kaip vidurkis ± standartinė paklaida. *** $p < 0,001$. **(C)** Ląstelių gyvybingumo įvertinimas po 96 val. poveikio SAL ir DCA kombinacija, panaudojant dvigubą dažymą akridino oranžiniu (AO) ir propidžio jodidu (PI).

3.2.2 DCA ir SAL kombinacija mažina navikų augimo greitį C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelėmis indukuotais navikais

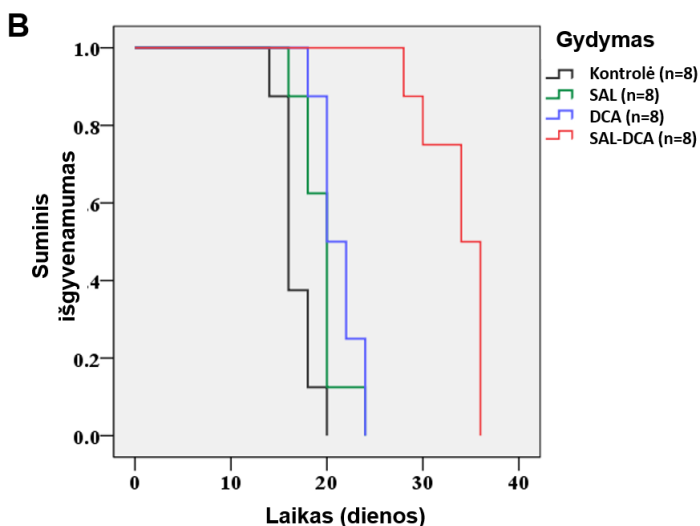
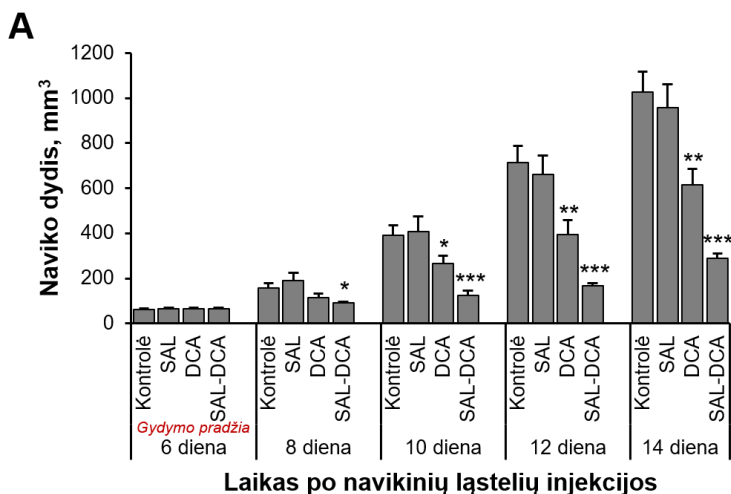
Norint patikrinti kombinuotos terapijos efektyvumą *in vivo*, buvo sukurtas alografinis pelių modelis, panaudojant LLC1 ląsteles ir C57BL/6 peles. Praėjus 6 dienoms po navikų indukcijos, gyvūnai buvo atsitiktine tvarka suskirstyti į keturias grupes pagal taikomą terapiją: kontrolė, SAL grupė (3 mg/kg), DCA grupė (200 mg/kg) ir kombinuotos terapijos grupė (3 mg/kg SAL + 200 mg/kg DCA). 16-ą eksperimento dieną, pirmosiose pelėse kontrolinėje grupėje buvo pasiektas maksimalus naviko dydis (1500 mm³) ir pelės buvo eutanazuotos. *In vivo* eksperimento schema pavaizduota **20 pav.**



20 pav. *In vivo* eksperimento schema

Naviko augimo dinamika visose tirtose grupėse nuo 6-os iki 16-os eksperimento dienos yra pavaizduota **21A pav.** Nustatyta, kad gydymas SAL neturėjo įtakos naviko augimo dydžiui ir rezultatai reikšmingai nesiskyrė nuo kontrolės. Tuo tarpu, nuo 10-os eksperimento dienos DCA pelių grupėje buvo registruojamas reikšmingas naviko augimo sulėtėjimas – 14-ą eksperimento dieną navikų dydis buvo 1,7 karto mažesnis negu kontrolėje. Efektyviausias navikų augimo slopinimas buvo stebimas SAL + DCA grupėje. Pvz., 14-ą dieną išmatuotų navikų dydis buvo 3,6 kartus mažesnis, lyginant su kontrole.

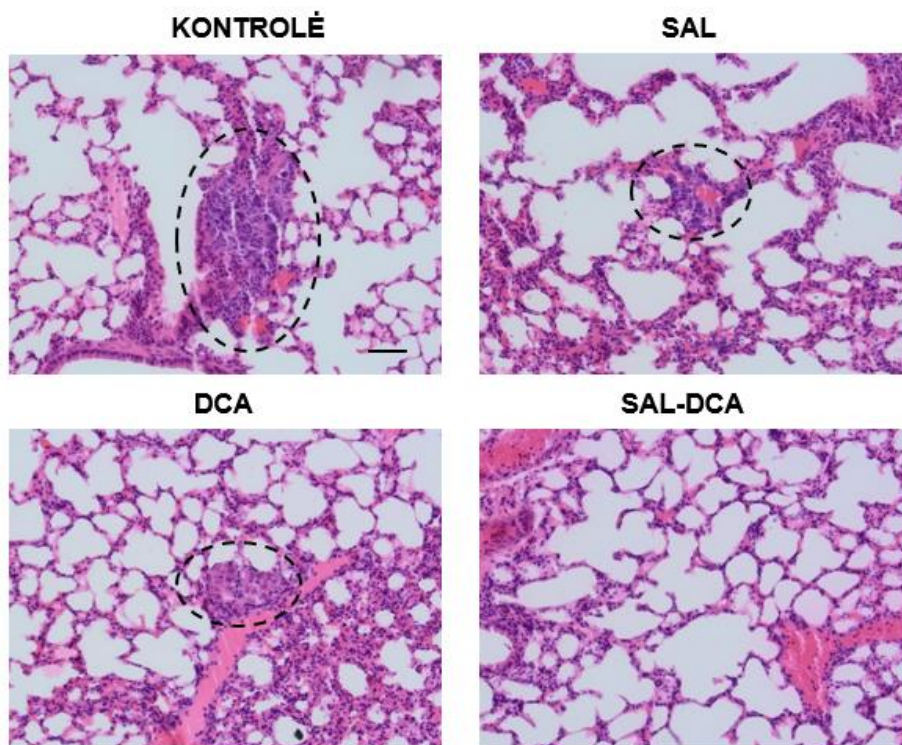
Pelių išgyvenamumo kreivės, sukurtos Kaplano-Mejerio (Kaplan–Meier) metodu, yra pateiktos **21B pav.**



21 pav. Salinomicino ir dichloroacetato kombinacijos (SAL + DCA) poveikis navikų augimui C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelėmis indukuotais navikais. (A) Navikų augimo greitis po gydymo SAL, DCA arba jų kombinacija. Navikų dydis matuotas 8 pelėse kiekvienomis sąlygomis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. **(B)** Kaplano–Mejerio kreivės, atspindinti pelių išgyvenamumą po gydymo su SAL, DCA arba jų kombinacija. Pagal Mantelio–Kokso (long-rank) testa, p reikšmės, lyginant pelių išgyvenamumą po poveikio SAL, DCA ar jų kombinacija su kontrole, buvo atitinkamai $p < 0,05$, $p < 0,005$ ir $p < 0,0001$.

3.2.3 SAL ir DCA kombinacija slopina navikų metastazavimą į C57BL/6 pelių su LLC1 ląstelėmis indukuotais navikais plaučius

Eksperimento pradžioje kiekvienoje grupėje buvo po 12 pelių. 16-ą eksperimento dieną (praėjus 10 dienų nuo gydymo pradžios) iš kiekvienos grupės atsitiktine tvarka buvo atrinkta po 4 pelės histologiniams tyrimams, siekiant įvertinti EMT ir CSC žymenų pokyčius gyvūnų plaučiuose ir kepenyse (šie gyvūnai nebuvo įtraukti į išgyvenamumo statistiką). Ištyrus gyvūnėlių organus, buvo nustatyta, kad visos pelės kontrolinėje ir abiejų monoterapijų grupėse turėjo metastazių plaučių audinyje, o kombinuotos terapijos grupėje nei viena iš 4 tirtų pelių metastazių neturėjo. Taip pat paaiškėjo, kad nei vienos grupės pelės neturėjo metastazių kepenyse (**22 pav.**)



22 pav. Salinomicino ir dichloroacetato kombinacija (SAL + DCA) slopina metastazių atsiradimą C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelėmis indukuotais navikais. Paveikslėlyje matomi plaučių audinių pjūviai, nudažyti hematoksilinu ir eozinu (H&E). Metastazės yra apibrauktos juodomis taškinėmis linijomis. Vaizdinimui buvo naudojamas 200× didinimas; skalė = 50 μm.

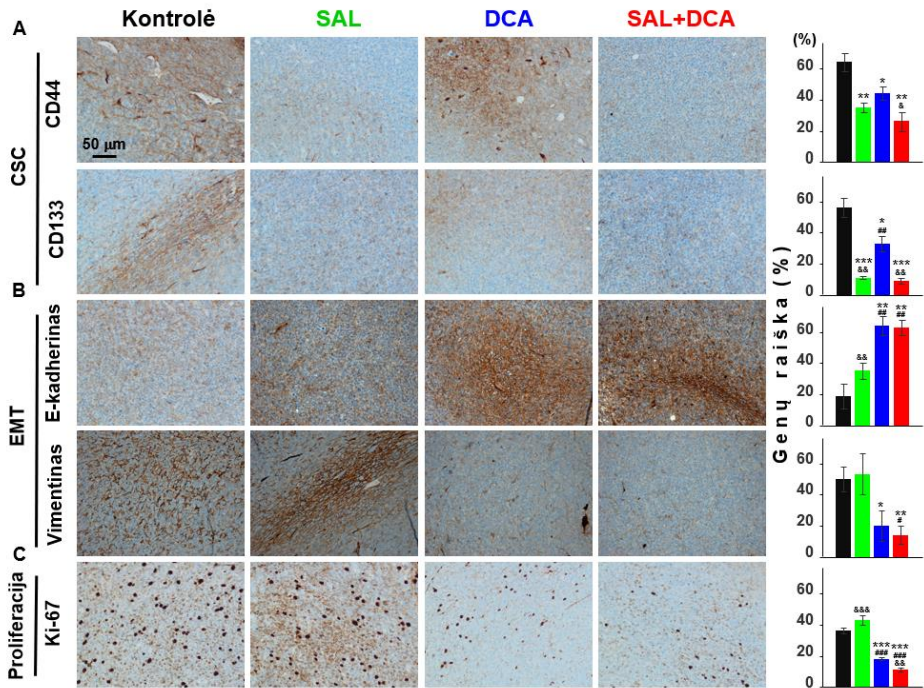
3.2.4 SAL ir DCA kombinacija slopina EMT, CSC ir proliferacijos žymenų raišką C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelėmis indukuotais navikais

Norint įvertinti monoterapijų ir kombinuotos terapijos įtaką vėžinių ląstelių kamieniškumui, EMT ir proliferacijai, panaudoti atitinkami žymenys: CD133 ir CD44 naudoti įvertinti ląstelių kamieniškumą, vimentinas ir e-kadherinas – EMT; Ki-67 – proliferaciją.

Imunohistocheminė analizė atskleidė reikšmingą skirtumą tarp EMT žymenų raiškos, lyginant kombinuotos terapijos mėginius su kontrole. Kontrolėje buvo nustatyta 19 ± 8 proc. ląstelių su padidėjusia e-kadherino ir 50 ± 8 proc. su padidėjusia vimentino raiška, tuo tarpu kombinuotoje grupėje šie skaičiai buvo atitinkamai 63 ± 5 proc. ir 14 ± 6 proc., t.y., e-kadherino raiška padidėjo 3,3 karto, o vimentino – sumažėjo 3,5 karto. SAL grupės mėginių rezultatai statistiškai nesiskyrė nuo kontrolės, o DCA grupės rezultatai buvo panašūs į kombinuotos terapijos rezultatus: e-kadherino raiška buvo 3,4 kartus padidėjusi, lyginant su kontrole, o vimentino – 2,5 kartus sumažėjusi (**23 pav.**)

CSC žymenų raiška buvo žymiai sumažėjusi SAL bei kombinuotos terapijos grupėse, tačiau DCA turėjo tik nežymų poveikį CSC žymenims, lyginant su kontrole. Pavyzdžiui, CD133 žymens genų raiška kontrolinėje grupėje siekė 56 ± 6 proc., SAL – 11 ± 1 proc., o SAL + DCA grupėje – 9 ± 2 proc., tuo tarpu DCA mėginiuose šio žymens genų raiška buvo 33 ± 5 proc. Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad tyrinėjamoje vaistų kombinacijoje SAL yra atsakingas už kamieniškumo slopinimą, o DCA – už EMT procesų slopinimą.

Proliferacijos žymens Ki-67 rezultatai koreliavo su naviko augimo greičio ir pelių išgyvenamumo duomenimis. SAL grupėje Ki-67 genų raiška buvo nepakitusi, lyginant su kontrole, o DCA ir SAL + DCA grupėse Ki-67 raiška buvo atitinkamai sumažėjusi 2 ir 3,3 kartus, lyginant su kontrole.



23 pav. Salinomicino (SAL), dichloroacetato (DCA) bei jų kombinacijos poveikis vėžio kamieninių ląstelių (CSC), epitelinės–mezenchiminės tranzicijos (EMT) ir proliferacijos žymenų raiškai C57BL/6 pelėse su indukuotais navikais po 10 dienų gydymo, įvertintas imunohistocheminės analizės metodu. (A) Vėžio kamieninių ląstelių žymenų CD133 ir CD44 raiškos įvertinimas. (B) EMT žymenų e-kadherino ir vimentino raiška. (C) Proliferacijos žymens Ki-67 įvertinimas. Dešinėje pusėje pateikti kiekybiniai žymenų raiškos duomenys. Paveikslėliai padaryti naudojant 200× didinimą, skalė = 50 μm.

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, lyginant su kontrole; # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001, lyginant su SAL; & p < 0,05; && p < 0,01; &&& p < 0,001, lyginant su DCA.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Disertacinio darbo metu atlikti tyrimai pirmą kartą atskleidė dviejų vaistų – SAL ir DCA – sinergistinį citotoksinį poveikį storosios žarnos vėžio DLD-1 ir HCT116 ląstelėms *in vitro* bei pelių plaučių vėžio LLC1 ląstelėms *in vitro* ir *in vivo*.

Atliekant kombinuotos terapijos veikimo mechanizmo tyrimus, buvo išaiškintos kelios anksčiau nežinomos DCA savybės. Visų pirma, kalceino testu buvo parodyta, kad DCA slopina kalceino šalinimą iš ląstelės, kas leidžia daryti prielaidą, kad kombinuotos terapijos sinergistinis poveikis gali būti susijęs su MRP blokavimu ir SAL užlaikymu ląstelėje, tuo pačiu pailgėjant jo citotoksiniam poveikiui. Šis atradimas ne tik galimai paaiškina SAL + DCA terapijos sinergistinį poveikį, bet ir leidžia manyti, kad kitų priešvėžinių vaistų citotoksinis poveikis galėtų būti sustiprinamas, juos naudojant kombinuotoje terapijoje su DCA.

Kita DCA savybė, kuri galimai sustiprina DCA ir SAL kombinacijos citotoksinį poveikį, yra DCA gebėjimas parūgštinti pH_i. Nustatėme, kad naudota DCA koncentracija sumažina vėžinių ląstelių pH_i per ~0,2 padalos, dėl ko galima tikėtis stipresnio SAL, o taip pat ir kitų panašių chemoterapinių vaistų, poveikio.

Kituose darbo etapuose tyrėme kombinacinės terapijos poveikį pelėms su indukuotais navikais. Parodėme, kad SAL + DCA terapija išlaiko savo stiprą sinergistinį citotoksinį poveikį ir *in vivo*. Nustatėme, kad naudojant 3 mg/kg SAL kombinacijoje su 200 mg/kg DCA, ženkliai sumažėjo navikų dydis, lyginant su kontrolės bei abiejų monoterapijų grupėmis, bei buvo prailgintas pelių išgyvenamumas.

Siekiant išsiaiškinti SAL + DCA poveikį patologiniams vėžio vystymosi procesams, imunohistocheminės analizės metodu tyrėme pelių organus ir navikus. Nustatėme, kad DCA bei SAL + DCA grupėse buvo ženkliai sumažėjusi EMT ir proliferacijos žymenų raiška, lyginant su kontroline ir SAL grupėmis. Tai leidžia daryti prielaidą, jog DCA yra EMT slopiklis ir turi antimetastazinių savybių. O tirdami CSC žymenų raišką pelių navikuose po poveikio vaistais, patvirtinome, kad tiek SAL, tiek SAL + DCA grupėse CSC žymenų raiška buvo ženkliai mažesnė negu kontrolinėje bei DCA grupėse, kas leidžia teigti, jog SAL yra CSC slopiklis. Taip pat, siekiant išsiaiškinti kombinuotos terapijos poveikį metastazių formavimuisi, tyrėme metastazavimo lygį plaučiuose ir kepenyse. Nustatėme, kad tiek kontrolės, tiek abiejų monoterapijų grupėse metastazės atsirado plaučiuose, tuo tarpu

nei vienas piktybinių ląstelių židinytų nebuvo stebimas kombinuotos terapijos grupės pelėse. Taip pat, po 10 dienų metastazės dar nebuvo matomos nei vienos iš tirtų grupių kepenų audiniuose.

Daugybėje mokslinių darbų yra pateikiama įrodymų apie kombinuotos terapijos pranašumą, lyginant su monoterapija. Naudojant vaistus, turinčius skirtingus veikimo mechanizmus, ne tik galima pasiekti geresnę terapinę poveikį, sumažinti vaistų dozes bei šalutinių reiškinių skaičių, bet taip pat galima taikyti į skirtingas ląstelių populiacijas, esančias vėžio aplinkoje (1). Tiek su SAL, tiek su DCA jau yra atliktas ne vienas eksperimentas kombinacijoje su kitais junginiais. Keletas vertingų pavyzdžių: taikant SAL kartu su epidermio augimo veiksnio receptoriaus slopikliu gefitinibu buvo pasiektas stiprus sinergistinis citotoksinis poveikis storosios žarnos vėžio ląstelėms (134). Taip pat su SAL buvo sėkmingai sustiprintas citotoksinis 5-FU poveikis kepenų vėžio ląstelėms (135). Minėtinos ir SAL kombinacijos su kitais junginiais: resveratroliu, doksorubicinu, LBH589 ir paklitakseliu (136-139). Tuo tarpu DCA buvo naudotas kartu su metforminu, gydant kiaušidžių vėžį, kombinacijoje su omeprazoliu, siekiant paveikti fibrosarkomos ir storosios žarnos vėžio ląsteles (49, 140) bei gerai žinomais chemoterapiniais junginiais tokiais kaip cisplatina, 5-FU, taksolis, bevacizumabas, paklitakselis ir kt. (20, 141-144). Šiame darbe DCA ir SAL kombinaciją pasirinkome neatsitiktinai. Abu vaistai ne tik turi skirtingus veikimo mechanizmus, kas yra svarbi sėkmingos kombinacinės terapijos sąlyga, tačiau jie dar ir taikosi į skirtingas ląstelių populiacijas. Dėl šių charakteristikų galima tikėtis, kad veiksmingai terapijai prireiks mažesnių vaistų koncentracijų, bus stebimi silpnesni šalutiniai poveikiai bei lėčiau išsivystys atsparumas chemoterapijai.

Vienas iš ikiklinikinių tyrimų iššūkių yra rasti tinkamą orientacinę dozę pirmiesiems klinikiniams eksperimentams. Tokios dozės apskaičiavimas yra atliekamas pagal nustatytą formulę (145). Pasinaudodami šia formule apskaičiavome, kad mūsų naudotos vaistų dozės eksperimentuose su pelėmis atitiktų 30 mg/kg DCA bei 0,15 mg SAL dozes eksperimentuose su žmonėmis. Su SAL iki šiol nėra atlikta jokių klinikinių tyrimų, tačiau mūsų pasirinkta DCA dozė yra artima DCA dozėms, kurias radome jau atliktuose klinikiniuose tyrimuose, pvz., 2014 metais vykusiam pirmos fazės klinikiniame tyrime su pacientais, turinčiais piktybinius smegenų navikus, buvo naudojama 25 mg/kg dozė (22). Tyrimo metu nebuvo stebima rimtų šalutinių poveikių, ir išbandyta dozė buvo įvertinta kaip saugi.

Yra žinoma, kad ląstelės prie šarminio pH greičiau proliferuoja, diferencijuoja, migruoja, lengviau pereina EMT bei yra atsparesnės apoptozei

(43-46). pH_i įtaka vėžio progresavimui yra seniai žinomas ir nemažai tyrinėtas reiškinys, tačiau pH moduliavimas praktikoje iki šiol mažai taikytas. Tiek prieš trisdešimt metų, tiek ir šiandien publikuotuose straipsniuose galima rasti įrodymų apie pH_i svarbą vėžinių ląstelių atsakui į chemoterapiją (146-151). Mūsų žiniomis, šiai dienai su DCA yra atliktas tik vienas eksperimentas tyrinėjant pH_i : 2017 metais, paveikus DCA glioblastoma sergančias peles, buvo nustatyta, kad užtenka vienetinės DCA injekcijos reikšmingai sumažinti pH_i . Taigi, ši unikali ir daug žadanti DCA savybė kol kas yra mažai tyrinėta. Tikimės, kad mūsų eksperimentų duomenys bus naudingi tolimesniuose priešvėžiniuose tyrimuose.

Daugiavaisčio atsparumo reiškinys yra vienas iš pagrindinių priežasčių, ribojančių chemoterapijos efektyvumą bei nulemiančių nesėkmingą gydymo eigą (36-39). Vienas iš veiksmingiausių būdų, norint apsaugoti ląsteles nuo šios patologijos, yra mažų molekulių, gebančių slopinti MRP aktyvumą, panaudojimas kombinacijoje su priešvėžiniais vaistais (152, 153). Pvz., yra nustatyta, kad beksarotenas padeda apsaugoti nuo MRP veikimo, gydant paklitakseliu, doksorubicinu, gemcitabinu ar cisplatina (154-157), deksrazoksanas – terapijoje su doksorubicinu (158), kurkuminoidai – su adriamicinu (159, 160). SAL taip pat buvo identifikuotas kaip galimas MRP slopiklis (41, 65), o DCA poveikis MRP iki šiol nebuvo tirtas. Šiame darbe mes pirmą kartą parodėme, kad DCA geba slopinti MRP aktyvumą. DCA yra idealus kandidatas šiai rolei: tai yra ne tik maža, lengvai absorbuojama ir netoksiška molekulė, tačiau ji taip pat pasižymi ir priešvėžiniu poveikiu.

LLC1 yra labai agresyvi vėžio ląstelių linija, gebanti ne tik greitai išvystyti pirminius navikus, bet ir per trumpą laiką sukelti metastazes plaučiuose, kepenyse, inkstuose ir kituose organuose. Šią liniją savo eksperimentuose pasirinkome, nes dėl savo agresyvios prigimties LLC1 ląstelės yra ypač vertingos eksperimentuose tyrinėjant metastazių atsiradimą ir progresavimą bei vertinant su šia patologija susijusių žymenų raišką. Literatūroje yra plačiai aprašyta, kad viena iš pagrindinių metastazių atsiradimo priežasčių yra EMT iniciacija. EMT yra biologinis procesas, kurio metu poliarizuotos epitelinės ląstelės, kurios sąveikauja su bazine membrana ir vėžio stromos ląstelėmis, pereina daugybę biocheminių pokyčių ir tampa judriomis mezenchiminėmis ląstelėmis, kurios gali migruoti, turi invazinių savybių bei yra atsparesnės apoptozei (50). Šiandien EMT slopiklių paieška yra vienas iš ypač aktualių uždavinių ir jau nemažai mokslinių publikacijų pateikia įrodymų apie tokių junginių veiksmingumą. Vienas iš tokių slopiklių pavyzdžių – rapamicinas, kuris yra TGF- β signalinių kelių, dalyvaujančių EMT procesuose, modulatorius (161). Kitas

pavyzdys – junginiai, kurie yra azoto oksido donoriai – blokuodami NF- κ B transkripcijos veiksnį (angl. *nuclear factor*), jie slopina EMT virusus (162). Mūsų žiniomis, DCA poveikis EMT iki šiol nebuvo tirtas. Mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad DCA galimai yra EMT slopiklis, tačiau šiai hipotezei patvirtinti reikia išsamesnių tyrimų.

Šiandien CSC sąvoka užima ypač svarbią reikšmę onkologiniuose tyrinėjimuose. Manoma, kad CSC yra pagrindinė priežastis, kodėl vėžinės ligos atsinaujina. Todėl daug mokslininkų grupių siekia sukurti naujas terapijas, kurios veiktų šią ląstelių populiaciją. CSC populiacijos identifikavimas yra vėžio tipui specifinis, taigi nėra universalaus junginio, galinčio taikytis į bet kurio vėžio CSC. Krūties vėžio CSC yra charakterizuojamos pagal padidėjusią CD44 ir sumažėjusią CD24 žymenų raišką (163, 164). Neseniai publikuotame straipsnyje pateikiama įrodymų, kad krūties vėžio CSC gali būti veikiamos beta interferonu, kuris mažina mezenchiminių baltymų gamybą, skatina CD24 žymens raišką bei slopina ląstelių migravimą (165). Smegenų navikai yra identifikuojami pagal padidėjusią CD133, integrino alfa 6, CD49, CD36 bei L1CAM raišką (166-169). Keletas naujų junginių, tokių kaip brefeldinas A ir EHT-1864, veikiančių per VEGF sekrecijos slopinimą, yra įvertinti kaip daug žadantys smegenų CSC slopikliai (170). Plaučių vėžio CSC yra įvertinamos pagal CD44, CD166 bei ALDH1 žymenų raišką (171). Viena iš įdomesnių terapinių plaučių vėžio gydymo strategijų yra mikroRNR, kuri įjautrina gydymui atsparią plaučių vėžio CSC populiaciją radiacijai, panaudojimas (172). Jau daugiau nei dešimtmetį SAL yra pripažintas kaip įvairių navikų CSC slopiklis (3). Šiame darbe, tirdami CSC žymenų raišką pelėse su LLC1 ląstelių linija indukuotais navikais, įsitikinome, kad SAL yra veiksmingas CSC slopiklis.

Šiuolaikinei medicinai tobulėjant, yra siekiama sukurti vaistus, kurie būtų vartojami ypač mažomis dozėmis, jų poveikis būtų kuo selektyvesnis ir sukeltų kaip įmanoma mažiau šalutinių reiškinių (173). Deja, ši užduotis nėra lengva ir neretu atveju patys naujausi vaistai ne tik neišpildo šių lūkesčių, bet ir neduoda siekto priešvėžinio poveikio. Todėl verta atsigręžti į jau daugelį metų tyrinėtus junginius, kurie yra ne tik efektyvūs, bet ir nebrangūs. Šiame darbe tyrinėtų vaistų patentai yra senai nebegaliojantys ir todėl šie junginiai nėra aktualūs farmacinėms kompanijoms, tačiau nepaisant to, jų priešvėžinis, galimai sinergistinis poveikis yra daug žadantis ir turėtų būti patikrintas klinikiniais tyrimais, siekiant sukurti saugias ir efektyvias terapijas onkologiniams pacientams gydyti.

IŠVADOS

1. SAL ir DCA kombinacija turi sinergistinį citotoksinį poveikį DLD-1, HCT116 ir LLC1 vėžinėms ląstelėms *in vitro*.
2. SAL ir DCA sinergizmas galimai pasireiškia dėl DCA poveikio MDR baltymams bei gebėjimo sumažinti viduląstelinį pH.
3. SAL ir DCA terapija ženkliai slopina naviko didėjimą C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelių linija indukuotais navikais.
4. SAL ir DCA kombinacija slopina navikų metastazavimą į C57BL/6 pelių su LLC1 ląstelių linija indukuotais navikais plaučius.
5. SAL ir DCA kombinacija slopina EMT, CSC ir proliferacijos žymenų raišką C57BL/6 pelėse su LLC1 ląstelių linija indukuotais navikais.

PRIEDAI

Priedas 1. Nuo koncentracijos priklausomas SAL ir DCA suminis poveikis DLD-1 ir HCT116 ląstelių linijoms. Fa (angl. *fraction affected*) – paveikta frakcija; CI (angl. *combination index*) – kombinacijos indeksas. CI < 1 nurodo sinergistinį poveikį, CI = 1 – adityvų poveikį, CI > 1 – antagonistinį poveikį.

Dozė DCA (mM)	Dozė SAL (µM)	HCT116		DLD-1	
		Fa	CI	Fa	CI
1	0,05	0,99	6,632	0,99	3,850
5	0,05	0,94	2,981	0,88	0,649
15	0,05	0,55	0,534	0,6	0,409
30	0,05	0,19	0,178	0,45	0,477
45	0,05	0,03	0,031	0,19	0,264
1	0,25	0,99	33,158	0,9	1,543
5	0,25	0,63	0,554	0,71	0,567
15	0,25	0,24	0,180	0,39	0,288
30	0,25	0,06	0,056	0,3	0,341
45	0,25	0,01	0,011	0,18	0,278
1	0,5	0,99	35,167	0,82	1,515
5	0,5	0,72	1,316	0,63	0,675
15	0,5	0,22	0,218	0,37	0,360
30	0,5	0,07	0,083	0,26	0,345
45	0,5	0,03	0,043	0,16	0,278

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Yap TA, Omlin A and de Bono JS: Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways. *J Clin Oncol* 31: 1592-1605, 2013.
2. Miyazaki Y, Shibuya M, Sugawara H, Kawaguchi O and Hirsoe C: Salinomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 27: 814-821, 1974.
3. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al.: Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138: 645-659, 2009.
4. Fuchs D, Daniel V, Sadeghi M, Opelz G and Naujokat C: Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 1098-1104, 2010.
5. Riccioni R, Dupuis ML, Bernabei M, et al.: The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor. *Blood Cells Mol Dis* 45: 86-92, 2010.
6. Lu W and Li Y: Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/beta-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* 115: 1799-1807.
7. Jiang J, Li H, Qaed E, et al.: Salinomycin, as an autophagy modulator-- a new avenue to anticancer: a review. *J Exp Clin Cancer Res* 37: 26, 2018.
8. Kim SH, Choi YJ, Kim KY, et al.: Salinomycin simultaneously induces apoptosis and autophagy through generation of reactive oxygen species in osteosarcoma U2OS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 473: 607-613, 2016.
9. Zhu LQ, Zhen YF, Zhang Y, Guo ZX, Dai J and Wang XD: Salinomycin activates AMP-activated protein kinase-dependent autophagy in cultured osteoblastoma cells: a negative regulator against cell apoptosis. *PloS one* 8: e84175.
10. Li T, Su L, Zhong N, et al.: Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells. *Autophagy* 9: 1057-1068, 2013.
11. Mai TT, Hamai A, Hienzsch A, et al.: Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. *Nat Chem* 9: 1025-1033.

12. Zhang G, Zhang S, Ren J, et al.: Salinomycin may inhibit the cancer stem-like populations with increased chemoradioresistance that nasopharyngeal cancer tumorspheres contain. *Oncol Lett* 16: 2495-2500, 2018.
13. Naujokat C and Steinhart R: Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol* 2012: 950658.
14. Whitehouse S, Cooper RH and Randle PJ: Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids. *Biochem J* 141: 761-774, 1974.
15. Michelakis ED, Webster L and Mackey JR: Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer* 99: 989-994, 2008.
16. Blackshear PJ, Fang LS and Axelrod L: Treatment of severe lactic acidosis with dichloroacetate. *Diabetes Care* 5: 391-394, 1982.
17. Stacpoule PW, Henderson GN, Yan Z and James MO: Clinical pharmacology and toxicology of dichloroacetate. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 4: 989-994, 1998.
18. Sun RC, Board PG and Blackburn AC: Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloroacetate in breast cancer cells. *Mol Cancer* 10: 142, 2011.
19. Vella S, Conti M, Tasso R, Cancedda R and Pagano A: Dichloroacetate inhibits neuroblastoma growth by specifically acting against malignant undifferentiated cells. *Int J Cancer* 130: 1484-1493, 2012.
20. Garon EB, Christofk HR, Hosmer W, et al.: Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 140: 443-452, 2014.
21. Cao W, Yacoub S, Shiverick KT, et al.: Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate* 68: 1223-1231, 2008.
22. Dunbar EM, Coats BS, Shroads AL, et al.: Phase I trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. *Invest New Drugs* 32: 452-464, 2014.
23. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, et al.: Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med* 2: 31ra34, 2010.
24. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al.: A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645-648, 1994.

25. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111, 2001.
26. Chen K, Huang YH and Chen JL: Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 34: 732-740.
27. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F and Dick JE: Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* 12: 1167-1174, 2006.
28. Wang CH, Chiou SH, Chou CP, Chen YC, Huang YJ and Peng CA: Photothermolysis of glioblastoma stem-like cells targeted by carbon nanotubes conjugated with CD133 monoclonal antibody. *Nanomedicine* 7: 69-79, 2010.
29. Altaner C, Altanerova V, Cihova M, et al.: Complete regression of glioblastoma by mesenchymal stem cells mediated prodrug gene therapy simulating clinical therapeutic scenario. *Int J Cancer* 134: 1458-1465, 2013.
30. Kauer TM, Figueiredo JL, Hingtgen S and Shah K: Encapsulated therapeutic stem cells implanted in the tumor resection cavity induce cell death in gliomas. *Nat Neurosci* 15: 197-204, 2011.
31. Tobias AL, Thaci B, Auffinger B, et al.: The timing of neural stem cell-based virotherapy is critical for optimal therapeutic efficacy when applied with radiation and chemotherapy for the treatment of glioblastoma. *Stem cells translational medicine* 2: 655-666, 2013.
32. Li L, Guan Y, Liu H, et al.: Silica nanorattle-doxorubicin-anchored mesenchymal stem cells for tumor-tropic therapy. *ACS Nano* 5: 7462-7470, 2011.
33. Bertz H, Illerhaus G, Veelken H and Finke J: Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for patients with relapsed or refractory lymphomas: comparison of high-dose conventional conditioning versus fludarabine-based reduced-intensity regimens. *Ann Oncol* 13: 135-139, 2002.
34. Karan D, Dubey S, Van Veldhuizen P, Holzbeierlein JM, Tawfik O and Thrasher JB: Dual antigen target-based immunotherapy for prostate cancer eliminates the growth of established tumors in mice. *Immunotherapy* 3: 735-746, 2011.
35. Di Pietro A, Dayan G, Conseil G, et al.: P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *Braz J Med Biol Res* 32: 925-939, 1999.

36. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654, 1992.
37. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al.: A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15665-15670, 1998.
38. Kool M, de Haas M, Scheffer GL, et al.: Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57: 3537-3547, 1997.
39. Tarasova NI, Seth R, Tarasov SG, et al.: Transmembrane inhibitors of P-glycoprotein, an ABC transporter. *J Med Chem* 48: 3768-3775, 2005.
40. Lehne G: P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Curr Drug Targets* 1: 85-99, 2000.
41. Kim WK, Kim JH, Yoon K, et al.: Salinomycin, a p-glycoprotein inhibitor, sensitizes radiation-treated cancer cells by increasing DNA damage and inducing G2 arrest. *Invest New Drugs* 30: 1311-1318, 2012.
42. Skeberdyte A, Sarapiniene I, Aleksander-Krasko J, Stankevicius V, Suziedelis K and Jarmalaite S: Dichloroacetate and Salinomycin Exert a Synergistic Cytotoxic Effect in Colorectal Cancer Cell Lines. *Sci Rep* 8: 17744, 2018.
43. Takasu T, Lyons JC, Park HJ and Song CW: Apoptosis and perturbation of cell cycle progression in an acidic environment after hyperthermia. *Cancer Res* 58: 2504-2508, 1998.
44. Lee HS, Park HJ, Lyons JC, Griffin RJ, Auger EA and Song CW: Radiation-induced apoptosis in different pH environments in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38: 1079-1087, 1997.
45. Liu JC and Fox MH: Modification of intracellular pH and thermotolerance development by amiloride. *Int J Hyperthermia* 11: 511-522, 1995.
46. Park HJ, Lyons JC, Ohtsubo T and Song CW: Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br J Cancer* 80: 1892-1897, 1999.
47. Albatany M, Li A, Meakin S and Bartha R: Dichloroacetate induced intracellular acidification in glioblastoma: in vivo detection using AACID-CEST MRI at 9.4 Tesla. *J Neurooncol* 136: 255-262, 2018.
48. Robey IF and Martin NK: Bicarbonate and dichloroacetate: evaluating pH altering therapies in a mouse model for metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 11: 235, 2011.

49. Li B, Li X, Ni Z, et al.: Dichloroacetate and metformin synergistically suppress the growth of ovarian cancer cells. *Oncotarget* 7: 59458-59470, 2016.
50. Klose J, Eissele J, Volz C, et al.: Salinomycin inhibits metastatic colorectal cancer growth and interferes with Wnt/beta-catenin signaling in CD133(+) human colorectal cancer cells. *BMC Cancer* 16: 896, 2016.
51. Kalluri R and Weinberg RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119: 1420-1428, 2009.
52. Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH and Bussink J: Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol* 99: 344-348, 2011.
53. Pecina-Slaus N: Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int* 3: 17, 2003.
54. Satelli A and Li S: Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 68: 3033-3046, 2011.
55. Li R, Dong T, Hu C, Lu J, Dai J and Liu P: Salinomycin repressed the epithelial-mesenchymal transition of epithelial ovarian cancer cells via downregulating Wnt/beta-catenin pathway. *Onco Targets Ther* 10: 1317-1325, 2017.
56. McCormack PL and Keam SJ: Bevacizumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs* 68: 487-506, 2008.
57. Price TJ, Peeters M, Kim TW, et al.: Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol* 15: 569-579, 2014.
58. Weber J and McCormack PL: Panitumumab: in metastatic colorectal cancer with wild-type KRAS. *BioDrugs* 22: 403-411, 2008.
59. Hafner MF and Debus J: Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives. *Visc Med* 32: 172-177, 2016.
60. Chan BA and Coward JI: Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. *J Thorac Dis* 5 Suppl 5: S565-578, 2013.
61. Niitani H and Kobayashi K: Cisplatin/carboplatin therapy in non-small cell lung cancer. *Oncology* 49 Suppl 1: 51-56, 1992.
62. Gridelli C, Bareschino MA, Schettino C, Rossi A, Maione P and Ciardiello F: Erlotinib in non-small cell lung cancer treatment: current status and future development. *Oncologist* 12: 840-849, 2007.

63. Nurwidya F, Takahashi F and Takahashi K: Gefitinib in the treatment of nonsmall cell lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation. *J Nat Sci Biol Med* 7: 119-123, 2016.
64. Ezeife DA, Melosky B, Tudor R, et al.: Afatinib in advanced pretreated non-small-cell lung cancer- a Canadian experience. *Curr Oncol* 25: e385-e390, 2018.
65. De Castro J, Garcia R, Garrido P, et al.: Therapeutic Potential of Denosumab in Patients With Lung Cancer: Beyond Prevention of Skeletal Complications. *Clin Lung Cancer* 16: 431-446, 2015.
66. Sangha R, Price J and Butts CA: Adjuvant therapy in non-small cell lung cancer: current and future directions. *Oncologist* 15: 862-872, 2010.
67. Li H and Li J: Effectiveness of palliative care for non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med* 12: 2387-2389, 2016.
68. Cheng TY, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C and Reid ME: The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *J Thorac Oncol* 11: 1653-1671, 2016.
69. Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, et al.: Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* 8: 38022-38043, 2017.
70. Blagosklonny MV: Analysis of FDA approved anticancer drugs reveals the future of cancer therapy. *Cell Cycle* 3: 1035-1042, 2004.
71. Housman G, Byler S, Heerboth S, et al.: Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)* 6: 1769-1792, 2014.
72. Prieto-Vila M, Takahashi RU, Usuba W, Kohama I and Ochiya T: Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci* 18, 2017.
73. Naveen SV and Kalaivani K: Cancer stem cells and evolving novel therapies: a paradigm shift. *Stem Cell Investig* 5: 4, 2018.
74. Subramaniam D, Ramalingam S, Houchen CW and Anant S: Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. *Mini Rev Med Chem* 10: 359-371, 2010.
75. Li S and Li Q: Cancer stem cells and tumor metastasis (Review). *Int J Oncol* 44: 1806-1812, 2014.
76. Shiozawa Y, Nie B, Pienta KJ, Morgan TM and Taichman RS: Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacology & therapeutics* 138: 285-293, 2013.
77. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al.: CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346: 235-242, 2002.

78. Mukherjee S, Pal M, Mukhopadhyay S, et al.: VEGF Expression to Support Targeted Therapy in Ovarian Surface Epithelial Neoplasms. *J Clin Diagn Res* 11: EC43-EC46, 2017.
79. Mittica G, Ghisoni E, Giannone G, et al.: PARP Inhibitors in Ovarian Cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 13: 392-410, 2018.
80. Rau KM, Li SH, Chen SM, et al.: Weekly paclitaxel combining with gemcitabine is an effective and safe treatment for advanced breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 41: 455-461, 2011.
81. Fisher R, Puzstai L and Swanton C: Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer* 108: 479-485, 2013.
82. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP and Pestell RG: Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 2144-2151, 2012.
83. Rezaeeyan H, Shahrabi S, McKee TD and Saki N: The expression of CD markers in solid tumors: Significance in metastasis and prognostic value. *Histol Histopathol* 33: 1005-1012, 2018.
84. Begicevic RR and Falasca M: ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci* 18, 2017.
85. Amin ML: P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* 7: 27-34, 2013.
86. Shen B, Dong P, Li D and Gao S: Expression and function of ABCG2 in head and neck squamous cell carcinoma and cell lines. *Exp Ther Med* 2: 1151-1157, 2011.
87. Wilson BJ, Schatton T, Zhan Q, et al.: ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 71: 5307-5316, 2011.
88. Clark DW and Palle K: Aldehyde dehydrogenases in cancer stem cells: potential as therapeutic targets. *Ann Transl Med* 4: 518, 2016.
89. Ullah I, Subbarao RB and Rho GJ: Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep* 35, 2015.
90. Kalluri R: EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation* 119: 1417-1419, 2009.
91. Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ and Yang J: Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res* 71: 245-254, 2011.
92. Liu F, Gu LN, Shan BE, Geng CZ and Sang MX: Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update. *Oncol Lett* 12: 4869-4876, 2016.
93. Gonzalez DM and Medici D: Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* 7: re8, 2014.

94. van Roy F and Berx G: The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65: 3756-3788, 2008.
95. Grigoras ML, Arghirescu TS, Folescu R, et al.: Expression of E-cadherin in lung carcinoma, other than those with small cells (NSCLC). *Rom J Morphol Embryol* 58: 1317-1325, 2017.
96. Singhai R, Patil VW, Jaiswal SR, Patil SD, Tayade MB and Patil AV: E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *N Am J Med Sci* 3: 227-233, 2011.
97. Naito A, Iwase H, Kuzushima T, Nakamura T and Kobayashi S: Clinical significance of E-cadherin expression in thyroid neoplasms. *J Surg Oncol* 76: 176-180, 2001.
98. Rosso M, Majem B, Devis L, et al.: E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness. *PloS one* 12: e0184439, 2017.
99. Christou N, Perraud A, Blondy S, Jauberteau MO, Battu S and Mathonnet M: E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncol Lett* 13: 4571-4576, 2017.
100. Herfs M, Hubert P, Suarez-Carmona M, et al.: Regulation of p63 isoforms by snail and slug transcription factors in human squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 176: 1941-1949, 2010.
101. Chen S, Chen X, Li W, et al.: Conversion of epithelial-to-mesenchymal transition to mesenchymal-to-epithelial transition is mediated by oxygen concentration in pancreatic cancer cells. *Oncol Lett* 15: 7144-7152, 2018.
102. Takaishi M, Tarutani M, Takeda J and Sano S: Mesenchymal to Epithelial Transition Induced by Reprogramming Factors Attenuates the Malignancy of Cancer Cells. *PloS one* 11: e0156904, 2016.
103. Chiang AC and Massague J: Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 359: 2814-2823, 2008.
104. Park GT and Choi KC: Advanced new strategies for metastatic cancer treatment by therapeutic stem cells and oncolytic virotherapy. *Oncotarget* 7: 58684-58695, 2016.
105. Naujokat C and Steinhart R: Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol* 2012: 950658, 2012.
106. An H, Kim JY, Oh E, Lee N, Cho Y and Seo JH: Salinomycin Promotes Anoikis and Decreases the CD44+/CD24- Stem-Like Population via Inhibition of STAT3 Activation in MDA-MB-231 Cells. *PloS one* 10: e0141919, 2015.

107. Lu D, Choi MY, Yu J, Castro JE, Kipps TJ and Carson DA: Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13253-13257, 2011.
108. Mitani M, Yamanishi T, Miyazaki Y and Otake N: Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration. *Antimicrob Agents Chemother* 9: 655-660, 1976.
109. Mao Z, Wu Y, Zhou J and Xing C: Salinomycin reduces epithelial-mesenchymal transition-mediated multidrug resistance by modifying long noncoding RNA HOTTIP expression in gastric cancer cells. *Anticancer Drugs* 30: 892-899, 2019.
110. Kim JH, Yoo HI, Kang HS, Ro J and Yoon S: Salinomycin sensitizes antimetabolic drugs-treated cancer cells by increasing apoptosis via the prevention of G2 arrest. *Biochem Biophys Res Commun* 418: 98-103, 2012.
111. Al Dhaheri Y, Attoub S, Arafat K, et al.: Salinomycin induces apoptosis and senescence in breast cancer: upregulation of p21, downregulation of survivin and histone H3 and H4 hyperacetylation. *Biochim Biophys Acta* 1830: 3121-3135, 2013.
112. Koo KH, Kim H, Bae YK, et al.: Salinomycin induces cell death via inactivation of Stat3 and downregulation of Skp2. *Cell Death Dis* 4: e693, 2013.
113. Zhou S, Wang F, Zhang Y, et al.: Salinomycin Suppresses PDGFRbeta, MYC, and Notch Signaling in Human Medulloblastoma. *Austin J Pharmacol Ther* 2: 1020, 2014.
114. Manago A, Leanza L, Carraretto L, et al.: Early effects of the antineoplastic agent salinomycin on mitochondrial function. *Cell Death Dis* 6: e1930, 2015.
115. Warburg OH: The classic: The chemical constitution of respiration ferment. *Clin Orthop Relat Res* 468: 2833-2839, 2010.
116. Liberti MV and Locasale JW: The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 41: 211-218, 2015.
117. Sutendra G and Michelakis ED: Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol* 3: 38, 2013.
118. Haugrud AB, Zhuang Y, Coppock JD and Miskimins WK: Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 147: 539-550, 2014.

119. Remillard CV and Yuan JX: Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L49-67, 2004.
120. Stacpoole PW: The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 38: 1124-1144, 1989.
121. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, et al.: The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8: 3984-4001, 2009.
122. Kumar P, Nagarajan A and Uchil PD: Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018, 2018.
123. Friedrich J, Seidel C, Ebner R and Kunz-Schughart LA: Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 4: 309-324, 2009.
124. Skeberdis VA, Rimkutė L, Skeberdytė A, Paulauskas N and Bukauskas FF: pH-dependent modulation of connexin-based gap junctional uncouplers. *J. Physiol.* 589: 3495-3506., 2011.
125. Ressot C, Latour P, Blanquet-Grossard F, et al.: X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMTX): new mutations in the connexin32 gene. *Hum Genet* 98: 172-175, 1996.
126. Raskevicius V, Mikalayeva V, Antanaviciute I, et al.: Genome scale metabolic models as tools for drug design and personalized medicine. *PloS one* 13: e0190636, 2018.
127. Bordel S: Constraint based modeling of metabolism allows finding metabolic cancer hallmarks and identifying personalized therapeutic windows. *Oncotarget* 9: 19716-19729, 2018.
128. Hirose M: The process behind the expression of mdr-1/P-gp and mrp/MRP in human leukemia/lymphoma. *Anticancer Res* 29: 1073-1077, 2009.
129. Feller N, Kuiper CM, Lankelma J, et al.: Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry. *Br J Cancer* 72: 543-549, 1995.
130. Dewangan J, Srivastava S and Rath SK: Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. *Tumour Biol* 39: 1010428317695035, 2017.
131. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL and Hulikova A: The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369: 20130099, 2014.

132. Reshetnyak YK, Andreev OA, Lehnert U and Engelman DM: Translocation of molecules into cells by pH-dependent insertion of a transmembrane helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6460-6465, 2006.
133. Ferro S, Azevedo-Silva J, Casal M, Corte-Real M, Baltazar F and Preto A: Characterization of acetate transport in colorectal cancer cells and potential therapeutic implications. *Oncotarget* 7: 70639-70653, 2016.
134. Zou ZZ, Nie PP, Li YW, et al.: Synergistic induction of apoptosis by salinomycin and gefitinib through lysosomal and mitochondrial dependent pathway overcomes gefitinib resistance in colorectal cancer. *Oncotarget* 8: 22414-22432, 2017.
135. Wang F, Dai W, Wang Y, et al.: The synergistic in vitro and in vivo antitumor effect of combination therapy with salinomycin and 5-fluorouracil against hepatocellular carcinoma. *PloS one* 9: e97414, 2014.
136. Dewangan J, Tandon D, Srivastava S, Verma AK, Yapuri A and Rath SK: Novel combination of salinomycin and resveratrol synergistically enhances the anti-proliferative and pro-apoptotic effects on human breast cancer cells. *Apoptosis* 22: 1246-1259, 2017.
137. Kai M, Kanaya N, Wu SV, et al.: Targeting breast cancer stem cells in triple-negative breast cancer using a combination of LBH589 and salinomycin. *Breast Cancer Res Treat* 151: 281-294, 2015.
138. Yu Z, Cheng H, Zhu H, et al.: Salinomycin enhances doxorubicin sensitivity through reversing the epithelial-mesenchymal transition of cholangiocarcinoma cells by regulating ARK5. *Braz J Med Biol Res* 50: e6147, 2017.
139. Zhou J, Sun M, Jin S, et al.: Combined using of paclitaxel and salinomycin active targeting nanostructured lipid carriers against non-small cell lung cancer and cancer stem cells. *Drug Deliv* 26: 281-289, 2019.
140. Ishiguro T, Ishiguro M, Ishiguro R and Iwai S: Cotreatment with dichloroacetate and omeprazole exhibits a synergistic antiproliferative effect on malignant tumors. *Oncol Lett* 3: 726-728, 2012.
141. Tong J, Xie G, He J, Li J, Pan F and Liang H: Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011: 740564, 2011.
142. Xie Q, Zhang HF, Guo YZ, et al.: Combination of Taxol(R) and dichloroacetate results in synergistically inhibitory effects on Taxol-resistant oral cancer cells under hypoxia. *Mol Med Rep* 11: 2935-2940, 2015.

143. Kumar K, Wigfield S, Gee HE, et al.: Dichloroacetate reverses the hypoxic adaptation to bevacizumab and enhances its antitumor effects in mouse xenografts. *J Mol Med (Berl)* 91: 749-758, 2013.
144. Wang M, Liao C, Hu Y, Qinwen P and Jiang J: Sensitization of breast cancer cells to paclitaxel by dichloroacetate through inhibiting autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 489: 103-108, 2017.
145. Nair AB and Jacob S: A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7: 27-31, 2016.
146. Haveman J: The pH of the cytoplasm as an important factor in the survival of in vitro cultured malignant cells after hyperthermia. Effects of carbonylcyamide 3-chlorophenylhydrazone. *Eur J Cancer* 15: 1281-1288, 1979.
147. Chu GL and Dewey WC: The role of low intracellular or extracellular pH in sensitization to hyperthermic radiosensitization. *Radiat Res* 115: 576-585, 1988.
148. Jahde E, Glusenkamp KH and Rajewsky MF: Increased drug cytotoxicity at reduced pH counteracts cyclophosphamide resistance in cultured rat mammary carcinoma cells. *Int J Cancer* 44: 1082-1087, 1989.
149. Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ and Gillies RJ: Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol Pharm* 8: 2032-2038, 2011.
150. Pellegrini P, Dyczynski M, Sbrana FV, et al.: Tumor acidosis enhances cytotoxic effects and autophagy inhibition by salinomycin on cancer cell lines and cancer stem cells. *Oncotarget* 7: 35703-35723, 2016.
151. Thews O, Gassner B, Kelleher DK, Schwerdt G and Gekle M: Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Neoplasia* 8: 143-152, 2006.
152. Frenkel GD and Caffrey PB: A prevention strategy for circumventing drug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Des* 7: 1595-1614, 2001.
153. Wang J, Seebacher N, Shi H, Kan Q and Duan Z: Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget* 8: 84559-84571, 2017.
154. Yen WC and Lamph WW: The selective retinoid X receptor agonist bexarotene (LGD1069, Targretin) prevents and overcomes multidrug resistance in advanced breast carcinoma. *Mol Cancer Ther* 4: 824-834, 2005.

155. Yen WC, Corpuz MR, Prudente RY, et al.: A selective retinoid X receptor agonist bexarotene (Targretin) prevents and overcomes acquired paclitaxel (Taxol) resistance in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10: 8656-8664, 2004.
156. Yen WC and Lamph WW: A selective retinoid X receptor agonist bexarotene (LGD1069, Targretin) prevents and overcomes multidrug resistance in advanced prostate cancer. *Prostate* 66: 305-316, 2006.
157. Tooker P, Yen WC, Ng SC, Negro-Vilar A and Hermann TW: Bexarotene (LGD1069, Targretin), a selective retinoid X receptor agonist, prevents and reverses gemcitabine resistance in NSCLC cells by modulating gene amplification. *Cancer Res* 67: 4425-4433, 2007.
158. Sargent JM, Williamson CJ, Yardley C, Taylor CG and Hellmann K: Dexrazoxane significantly impairs the induction of doxorubicin resistance in the human leukaemia line, K562. *Br J Cancer* 84: 959-964, 2001.
159. Xu D, Tian W and Shen H: Curcumin prevents induced drug resistance: a novel function? *Chin J Cancer Res* 23: 218-223, 2011.
160. Xu D, Tian W and Shen H: P-gp upregulation may be blocked by natural curcuminoids, a novel class of chemoresistance-preventing agent. *Mol Med Rep* 7: 115-121, 2013.
161. Reka AK, Kuick R, Kurapati H, Standiford TJ, Omenn GS and Keshamouni VG: Identifying inhibitors of epithelial-mesenchymal transition by connectivity map-based systems approach. *J Thorac Oncol* 6: 1784-1792, 2011.
162. Bonavida B and Baritaki S: Inhibition of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Cancer by Nitric Oxide: Pivotal Roles of Nitrosylation of NF-kappaB, YY1 and Snail. *For Immunopathol Dis Therap* 3: 125-133, 2012.
163. Al-Othman N, Alhendi A, Ihbaisha M, Barahmeh M, Alqaraleh M and Al-Momany BZ: Role of CD44 in breast cancer. *Breast Dis* 39: 1-13, 2020.
164. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, et al.: CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 8: R59, 2006.
165. Doherty MR, Cheon H, Junk DJ, et al.: Interferon-beta represses cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 13792-13797, 2017.

166. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al.: Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15178-15183, 2003.
167. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, et al.: Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6: 421-432, 2010.
168. Hale JS, Otvos B, Sinyuk M, et al.: Cancer stem cell-specific scavenger receptor CD36 drives glioblastoma progression. *Stem Cells* 32: 1746-1758, 2014.
169. Bao B, Ahmad A, Li Y, et al.: Targeting CSCs within the tumor microenvironment for cancer therapy: a potential role of mesenchymal stem cells. *Expert Opin Ther Targets* 16: 1041-1054, 2012.
170. Almiron Bonnin DA, Havrda MC, Lee MC, et al.: Secretion-mediated STAT3 activation promotes self-renewal of glioma stem-like cells during hypoxia. *Oncogene* 37: 1107-1118, 2018.
171. Zakaria N, Satar NA, Abu Halim NH, et al.: Targeting Lung Cancer Stem Cells: Research and Clinical Impacts. *Front Oncol* 7: 80, 2017.
172. Cortez MA, Valdecanas D, Niknam S, et al.: In Vivo Delivery of miR-34a Sensitizes Lung Tumors to Radiation Through RAD51 Regulation. *Mol Ther Nucleic Acids* 4: e270, 2015.
173. Satti J: The emerging low-dose therapy for advanced cancers. *Dose Response* 7: 208-220, 2009.

Disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas

- Dichloroacetate and Salinomycin Exert a Synergistic Cytotoxic Effect in Colorectal Cancer Cell Lines. Aistė Skeberdytė, Ieva Antanavičiūtė, Jan Alexander-Krasko, Vaidotas Stankevičius, Kęstutis Sužiedėlis, Sonata Jarmalaitė, Scientific Reports, 2018. November.
- Salinomycin and Dichloroacetate Synergistically Inhibit Lewis Lung Carcinoma Cell Proliferation, Tumor Growth and Metastasis. Skeberdytė A, Sarapinienė I, Krasko JA, Barakauskienė A, Žilionytė K, Sužiedėlis K, Bukelskienė V, Jarmalaitė S., BBRC, 2019, December.

Kitos publikacijos, nesusijusios su darbo tema

- KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. Cicenąs J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, Meskinyte-Kausiliene E, Skeberdyte A, Cicenąs J. Cancers (Basel), 2017 April;
- Decreased Expression of MT1E is a Potential Biomarker of Prostate Cancer Progression. Rita Demidenko, Kristina Daniunaite, Aiste Skeberdyte, Indra Baltrusaityte, Arvydas Laurinavicius, Feliksas Jankevicius, Juozas R. Lazutka and Sonata Jarmalaite, Journal of Urology 2017, July.

Pranešimai mokslinėse konferencijose

- „Laboratory Animals in Research“, 2018, lapkritis, Vilnius, Lietuva, (žodinis pranešimas)
- “Computational methods in drug design”, 2018, kovas, Stambulas, Turkija, (žodinis pranešimas)
- COINS tarptautinė gyvybės mokslų konferencija, 2018, kovas, Vilnius, Lietuva (stendinis pranešimas)
- “Epigenetic Chemical Biology ECI Workshop and Core Group Meeting”, 2018, vasaris, Paryžius, Prancūzija, (stendinis pranešimas)
- “FEBS Advanced Course in Oncometabolism”, konferencija 2017, birželis, Koimbra, Portugalija, (stendinis pranešimas)

- COINS tarptautinė gyvybės mokslų konferencija, 2017, kovas, Vilnius, Lietuva, (stendinis pranešimas)
- „Drug Discovery“ konferencija, 2016, lapkritis, Hamburgas, Vokietija, (stendinis pranešimas)

Finansinė parama

Dalis disertacijoje aprašytų darbų buvo finansuota iš Nacionalinio vėžio instituto mokslo fondo lėšų.

CURRICULUM VITAE

Aistė Skeberdytė (1986-11-06)

Kontaktinė informacija

Telefonas: +370 61542353

El. paštas: aiste.skeberdyte@gmail.com

Tyrimų sritis:

biomedicinos mokslai, priešvėžiniai tyrimai

Išsilavinimas:

- Biologijos krypties doktorantūros studijos, Vilniaus universitetas, 2014-2019 m.
- Farmacijos magistras, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, 2006-2011 m.

Darbo patirtis

- Klinikinių tyrimų specialistė, PAREXEL International, Vilnius, Lietuva (2015-2020)
- Klinikinių tyrimų monitorė, PAREXEL International, Vilnius, Lietuva (2012-2015)
- Vaistininkė, Gedimino vaistinė, Kaunas, Lietuva (2010-2011)

Mokslinė produkcija:

- 5-ių mokslinių publikacijų, turinčių citavimo indeksą, bendraautorė;
- pranešėja 7-se tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

Sertifikatai:

- Laboratorinių gyvūnų mokslo kursas;
- Geros klinikinės praktikos (GKP) kursas.

Narystė:

Lietuvos biochemikų draugija.

PADEKA

Nuoširdžiai dėkoju savo vadovams prof. dr. Sonatai Jarmalaitei ir dr. Kęstučiui Sužiedėliui už suteiktas galimybes įgyvendinti savo idėjas, patarimus ir palaikymą.

Ypatingai dėkoju dr. Jan Aleksander Krasko bei dr. Ievai Antanavičiūtei už jų didžiulę pagalbą atliekant bei analizuojant eksperimentus ir už gerą nuotaiką dirbant drauge.

Dėkoju dr. Virginijai Bukelskienei už jos nepaprastai geranorišką pagalbą dirbant su pelėmis.

Doktorantams Linui Kunigėnui, Karolinai Žilionytei bei Rimvilei Prokarenkaitei už gerą darbinę atmosferą.

Dr. Jūratei Stumpf už jos palaikymą ir suteiktas galimybes suderinti studijas su darbu.

Ačiū šeimai ir draugams už paramą ir neišsemiamus juokelius apie doktorantų gyvenimą.

Bet labiausiai už viską dėkoju savo Tėčiui prof. dr. Arvydui Skeberdžiui už jo tikėjimą, kantrybę, patarimus, palaikymą, neišmatuojamas žinias ir visokeriopą pagalbą atliekant šį darbą.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 12 egz.