

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOLOGIJOS KATEDRA

LAURYNAS RUKAS

**CISPLATINOS IR HIPERTERMIJOS POVEIKIS MITOCHONDRIJŲ
KVĖPAVIMO FUNKCIJOMS *OV*CAR-3 KIAUŠIDŽIŲ VĖŽINĖSE
LĄSTELĖSE**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovė:
Prof. Dr. Sonata Trumbeckaitė

KAUNAS, 2019

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
FARMAKOLOGIJOS KATEDRA

TVIRTINU: Farmacijos fakulteto dekanė:
Prof. Ramunė Morkūnienė

**CISPLATINOS IR HIPERTERMIJOS POVEIKIS MITOCHONDRIJŲ
KVĖPAVIMO FUNKCIJOMS *OV*CAR-3 KIAUŠIDŽIŲ VĖŽINĖSE
LĄSTELĖSE**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovė:
Prof. Dr. Sonata Trumbeckaitė

Recenzentas:

Darbą atliko:
Magistrantas
Laurynas Rukas

KAUNAS, 2019m.

TURINYS

SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
SANTRUMPOS	8
1. ĮVADAS	9
2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	11
3. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
3.1. Kiaušidžių vėžys ir jo gydymas	12
3.1.1. Kiaušidžių vėžio paplitimas ir patogenezė.....	12
3.1.2. Kiaušidžių vėžio gydymas	14
3.1.3. Cisplatinos taikymas kiaušidžių vėžio gydyme	14
3.2. Mitochondrijų struktūra ir funkcijos	15
3.3. Mitochondrijose vykstantis oksidacinis fosforilimas.....	16
3.4. Hipertermijos taikymas vėžio gydyme. Veikimo mechanizmas.....	18
3.5. Hipertermijos poveikis mitochondrijų funkcijoms	18
3.6. Cisplatinos poveikis mitochondrijų funkcijoms.....	19
4. METODIKA.....	22
4.1. Naudojama aparatūra ir indai	22
4.2. Medžiagos	22
4.3. Ląstelių linijos ir auginimo sąlygos	22
4.4. OVCAR-3 kiaušidžių vėžinių ląstelių kvėpavimo greičio matavimas.....	23
4.5. Statistinė duomenų analizė.....	26
5. REZULTATAI	27
5.1. Cisplatinos ir hipertermijos poveikis kiaušidžių vėžinių ląstelių <i>OVCAR-3</i> endogeniniam kvėpavimo greičiui.....	27
5.2. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiams <i>OVCAR-3</i> kiaušidžių vėžinėse ląstelėse normotermijos (37°C) sąlygomis	28
5.3. Cisplatinos poveikis mitochondrijų išorinės membranos laidumui (citochromo c) efektui kiaušidžių <i>OVCAR-3</i> vėžinėse ląstelėse, esant 37°C	29
5.4. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui <i>OVCAR-3</i> kiaušidžių vėžinėse ląstelėse.....	29
5.5. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiams <i>OVCAR-3</i> kiaušidžių vėžinėse ląstelėse, hipertermijos (43 °C) sąlygomis	30
5.6. Cisplatinos poveikis citochromo c efektui kiaušidžių <i>OVCAR-3</i> vėžinėse ląstelėse, esant 43°C...	31
5.7. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui <i>OVCAR-3</i> kiaušidžių vėžinėse ląstelėse, esant 43°C	32

5.8. Cisplatinos ir hipertermijos poveikis (43°C) derinio poveikis kiaušidžių vėžinių ląstelių <i>OVCAR-3</i> mitochondrijų kvėpavimo greičiams	33
5.9. Cisplatinos ir hipertermijos (43°C) derinio poveikis kiaušidžių vėžinių ląstelių <i>OVCAR-3</i> mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui ir citochromo c efektui	35
6. REZULTATŲ APTARIMAS	36
7. IŠVADOS.....	39
8. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	40
9. LITERATŪROS ŠALTINIAI.....	41

SANTRAUKA

Lauryno Ruko magistro baigiamasis darbas „Cisplatinos ir hipertermijos poveikis mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms *OVCAR-3* kiaušidžių vėžinėse ląstelėse“/ mokslinė vadovė prof. dr. S. Trumbeckaitė; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Farmacijos fakulteto, Farmakognozijos katedra.
– Kaunas

Tyrimo tikslas. Ištirti cisplatinos ir hipertermijos poveikį kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms.

Uždaviniai. Ištirti cisplatinos bei hipertermijos (43°C) poveikį mitochondrijų kvėpavimo greičiams kiaušidžių vėžinėse ląstelėse *OVCAR-3*; Ištirti cisplatinos bei hipertermijos (43°C) poveikį mitochondrijų vidinės ir išorinės membranos laidumui kiaušidžių *OVCAR-3* vėžinėse ląstelėse; Įvertinti hipertermijos (43°C) ir cisplatinos derinio poveikį mitochondrijų kvėpavimo greičiams kiaušidžių *OVCAR-3* vėžinėse ląstelėse.

Metodai. Kiaušidžių vėžinės ląstelės buvo suskirstytos į dvi grupes: kontrolinę ir tiriamąją (ši grupė paveikta cisplatiną IC₅₀ 158μM). Naudojant oksigrafinį metodą (37°C temperatūroje) buvo registruojamas kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* kvėpavimo greitis, oksiduojant glutamatą, malatą ir sukcinatą. Šis metodas buvo atliekamas naudojant „*Oroboros Oxygraph-2k*“ įrenginį.

Rezultatai. Tyrimo metu nustatyta, kad cisplatiną slopino kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* mitochondrijų endogeninį kvėpavimo greitį. Be to, nustatyta, kad cisplatiną normotermijos ir hipertermijos (43°C) slopino *OVCAR-3* vėžinių ląstelių mitochondrijų kvėpavimo greičius ir kvėpavimo kontrolės koeficientus, oksiduojant glutamatą/malatą. Mūsų tyrimas parodė, kad cisplatiną neveikė mitochondrijų vidinės membranos laidumo, tačiau šio chemoterapinio preparato poveikyje, hipertermijos sąlygomis (43°C) buvo slopinama sukcinato oksidacija ir didinamas išorinės mitochondrijų membranos laidumas.

Išvados. Cisplatiną slopina mitochondrijų kvėpavimo funkcijas visose metabolinėse būsenose oksiduojant glutamatą/malatą, o hipertermijos taikymas (43°C) neturėjo poveikio mitochondrijų kvėpavimo greičiams *OVCAR-3* vėžinėse ląstelėse. Cisplatiną neveikė mitochondrijų vidinės membranos pralaidumo, tačiau padidino išorinės mitochondrijų membranos pralaidumą hipertermijos sąlygomis. Cisplatinos ir hipertermijos (43°C) derinys sustiprino slopinantį poveikį mitochondrijų kvėpavimo greičiams. Tyrimo metu, taikant vien hipertermiją *OVCAR-3*, poveikio kiaušidžių vėžinių ląstelių mitochondrijoms nebuvo, o taikant cisplatinos ir hipertermijos (43°C) derinį, nustatytas mitochondrijų funkcijų slopinimas ir išorinės membranos pažeidimas *OVCAR-3* kiaušidžių vėžinėse ląstelėse, tai rodo sinergistinį cisplatinos ir hipertermijos poveikį mitochondrijų funkcijoms.

SUMMARY

Laurynas Rukas the final master thesis "The effect of cisplatin and hyperthermia on mitochondrial respiratory function in *OVCAR-3* ovarian cancer cells"/ Advisor prof. dr. S. Trumbeckaite; Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy. – Kaunas.

The aim of thesis. To investigate the effect of cisplatin and hyperthermia on mitochondrial respiratory functions of ovarian *OVCAR-3* cancer cells.

The tasks of thesis are the following. To investigate the effect of cisplatin and hyperthermia (43°C) on mitochondrial respiratory rates in ovarian cancer cells *OVCAR-3*; To investigate the effect of cisplatin and hyperthermia (43°C) on the mitochondrial inner and outer membrane permeability in ovarian cancer cells *OVCAR-3*; To evaluate the effect of hyperthermia (43°C) and cisplatin on mitochondrial respiratory rates in ovarian cancer *OVCAR-3* cells.

Methods. Ovarian cancer cells were divided into control and study groups treated with cisplatin (IC50 158µM) and hyperthermia (43°C). The *OVCAR-3* respiratory rate of ovarian cancer cells oxidizing glutamate, malate, and succinate was recorded using the oxygraphic method. This method was performed using the *Oroboros Oxygraph-2k* device.

Results. The study showed that cisplatin inhibited the endogenous respiratory rate of ovarian cancer cells *OVCAR-3*. In addition, cisplatin has been shown to inhibit the mitochondrial respiratory rates and respiratory control index in ovarian cancer *OVCAR-3* cells in both conditions (normothermia and hyperthermia (43°C), oxidizing glutamate/malate), however had no effect on the mitochondrial inner membrane permeability. Cisplatin and hyperthermia (43°C) reduced succinate oxidation and increased the permeability of mitochondrial outer membrane.

Conclusion. Cisplatin inhibits mitochondrial respiratory functions in all metabolic states, and single hyperthermia (43°C) had no effect on mitochondrial respiration rates in *OVCAR-3* cancer cells. Cisplatin had no effect on mitochondrial inner membrane permeability, but increased the permeability of the outer mitochondrial membrane under hyperthermia (43°C). Cisplatin in combination with hyperthermia (43°C) inhibited mitochondrial respiratory rates much more as compared to cisplatin alone. Using a combination of cisplatin and hyperthermia (43°C), mitochondrial outer membrane permeability was increased in *OVCAR-3* ovarian cancer cells. These data showed a synergistic effect of cisplatin and hyperthermia on mitochondrial respiratory function.

PADEKA

Dėkoju šio darbo vadovei prof. dr. Sonatai Trumbeckaitei už pagalbą rašant šį magistro baigiamąjį darbą ir suteiktas informatyvias bei aiškias konsultacijas. Už pagalbą rengiant šį mokslinį darbą taip pat dėkoju Neuromokslų instituto, biochemijos laboratorijos ir Virškinimo sistemos tyrimų instituto chirurginės gastroenterologijos laboratorijos darbuotojams.

SANTRUMPOS

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija

ADP – adenzino 5'-difosfatas

ATP – adenzino 5'-trifosfatas

FAD – flavinadenino dinukleotido oksiduota forma

FADH₂ – flavinadenino dinukleotido redukuota forma

NAD – nikotinamido adenino dinukleotido oksiduota forma

NADH – nikotinamido adenino dinukleotido redukuota forma

KKK - mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientas

ROS – ang. aktyvūs deguonies junginiai

1. ĮVADAS

Kiaušidžių vėžys yra vienas pagrindinių mirtį sukeliančių vėžių, kuris dažnai diagnozuojamas vėlyvose stadijose. Manoma, kad kiaušidžių vėžio atsiradimui įtakos turi paveldimumas, kitos onkologinės ligos (krūties ar gaubtinės žarnos vėžys), žalingi įpročiai, endometrioze, nutukimas, o vėlyvas šios ligos pastebėjimas yra susijęs su specifinių simptomų ignoravimu.

Kiaušidžių vėžys yra agresyvi ir lokali vėžio forma, kuri ne tik sutrumpina gyvenimo trukmę, bet ir stipriai pablogina žmogaus gyvenimo kokybę, todėl mokslininkų nuomone – tai viena agresyviausių vėžio formų, kuri po keletos metų pasikartoja dviem trečdaliams šia liga sirgusių pacienčių (įvyksta ligos remisija). Taigi, pastaruoju metu didelis dėmesys skiriamas efektyviems kiaušidžių vėžio gydymo metodams. Vienas jų – hipertermijos ir intraperitoninio chemoterapinio preparato (cisplatinos) taikymas.

Cisplatina tyrime buvo pasirinkta, nes šis vaistas yra gerai žinomas ir naudojamas onkologinių ligų gydyme. Šis intraperitoninis preparatas yra naudojamas šlapimo pūslės, reprodukcijos organų, galvos ir kaklo, plaučių onkologinių ligų gydymui ir yra veiksmingas įvairioms vėžio stadijoms gydyti, įskaitant karcinomas, limfomas ir sarkomas. Cisplatinos veiksmingumui nustatyti yra svarbus veikimo būdas. Jis yra susijęs su gebėjimu jungtis prie purino bazių DNR molekulėje bei trikdyti DNR vykstančius mechanizmus. Šiuo būdu sukeliama DNR pažeida ir vėžinėje ląstelėje įvyksta apoptozė.

Žinių apie sinergistinį hipertermijos ir cisplatinos poveikį, ypač subląsteliniam (mitochondrijų) lygmenyje trūksta arba moksliniai tyrimai išlieka prieštaringi. Moduluojant naujus gydymo metodus svarbu iširti cisplatinos ir hipertermijos poveikį organui bei ląstelių organelėms – mitochondrijoms, kadangi šios organelės yra atsakingos ne tik už ATP gamybą ląstelėje, bet ir jos žūties kelius, todėl bet koks mitochondrijų funkcijos sutrikdymas gali turėti poveikį ląstelių gyvybingumui ir ląstelių funkcijoms.

Šiame tyrime *in vitro* buvo analizuojama kaip cisplatina arba hipertermija, taikomos atskirai, veikė *OVCAR-3* vėžinių ląstelių mitochondrijų kvėpavimo funkcijas ir tyrėme ar papildomas hipertermijos (43°C) taikymas kartu su cisplatinos terapija turi sinergistinį poveikį ląstelių energiniam metabolizmui. Mūsų tyrime buvo analizuojama ar hipertermija padidina cisplatinos poveikį ir veikia efektyviau nei vien tik cisplatina. Eksperimentai buvo atliekami su *OVCAR-3* kiaušidžių vėžinėmis ląstelėmis, matuojant mitochondrijų kvėpavimo greičius „*Oroboros Oxygraph-2k*“ įrenginiu.

Kadangi tyrimų, koku mechanizmu cisplatina veikia kiaušidžių *OVCAR-3* vėžines ląsteles nėra, šiame darbe buvo ne tik išnagrinėta ir apibendrinta literatūra susijusi su kiaušidžių vėžiu, jo

gydymu, bet ir ištirtas cisplatinos, hipertermijos ir cisplatinos bei hipertermijos derinio poveikis kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* mitochondrijoms *in vitro*. Tuo pačiu nustatytas šio derinio sinergistinis poveikis mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms.

Darbo praktinė reikšmė ir naujumas

Kiaušidžių vėžys blogina žmogaus gyvenimo kokybę ir dažnai tampa viena pagrindinių mirties priežasčių moterų tarpe, todėl pastaruoju metu didelis dėmesys yra skiriamas efektyvių kiaušidžių vėžio gydymo metodų paieškoms.

Kiaušidžių vėžio gydymui dažnai taikoma hiperterminė chemoterapija, t.y. temperatūros ir intraperitoninių chemoterapinių preparatų derinys, kurio taikynys pilvaplėvės ertmėje esančios metastazinės ląstelės. Vienas iš pagrindinių skiriamų chemoterapinių preparatų yra cisplatina, todėl šiame darbe buvo siekiama nustatyti šio citotoksinio intraperitoninio vaisto ir hipertermijos (esant 43°C), derinio poveikį mitochondrijų funkcijoms kiaušidžių vėžinėse *OVCAR-3* ląstelėse. Eksperimentinių duomenų apie cisplatinos ir hipertermijos sinergistinį poveikį mitochondrijoms nėra, todėl šiame darbe parinkus *in vitro* modelį ištirtas cisplatinos ir hipertermijos poveikis ląstelių energetiniams procesams ir įvertintas jų poveikis mitochondrijų funkcijoms bei poveikio mechanizmams.

Tyrimai parodė, kad hipertermija sustiprina cisplatinos poveikį kiaušidžių vėžinėse ląstelėse *OVCAR-3* mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms. Todėl galime teigti, kad šio derinio poveikis gali būti perspektyva kiaušidžių vėžinių ląstelių terapijoje.

2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: ištirti cisplatinos ir hipertermijos poveikį kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms.

Darbo uždaviniai:

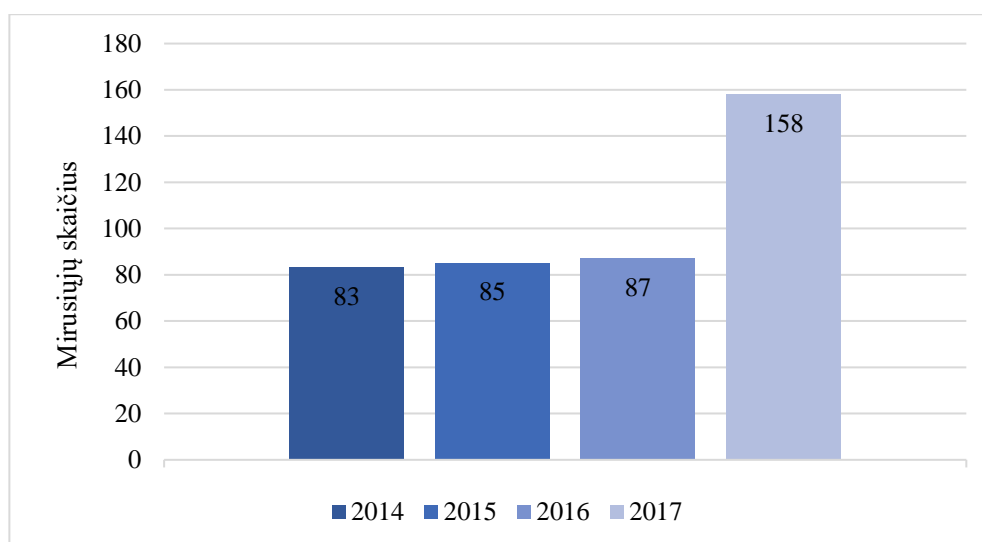
1. Ištirti cisplatinos bei hipertermijos (43°C) poveikį mitochondrijų kvėpavimo greičiams kiaušidžių vėžinėse *OVCAR-3* ląstelėse.
2. Ištirti cisplatinos bei hipertermijos (43°C) poveikį mitochondrijų vidinės ir išorinės membranos laidumui kiaušidžių vėžinėse *OVCAR-3* ląstelėse.
3. Įvertinti hipertermijos (43°C) ir cisplatinos derinio poveikį mitochondrijų kvėpavimo greičiams kiaušidžių vėžinėse *OVCAR-3* ląstelėse.

3. LITERATŪROS APŽVALGA

3.1. Kiaušidžių vėžys ir jo gydymas

3.1.1. Kiaušidžių vėžio paplitimas ir patogenezė

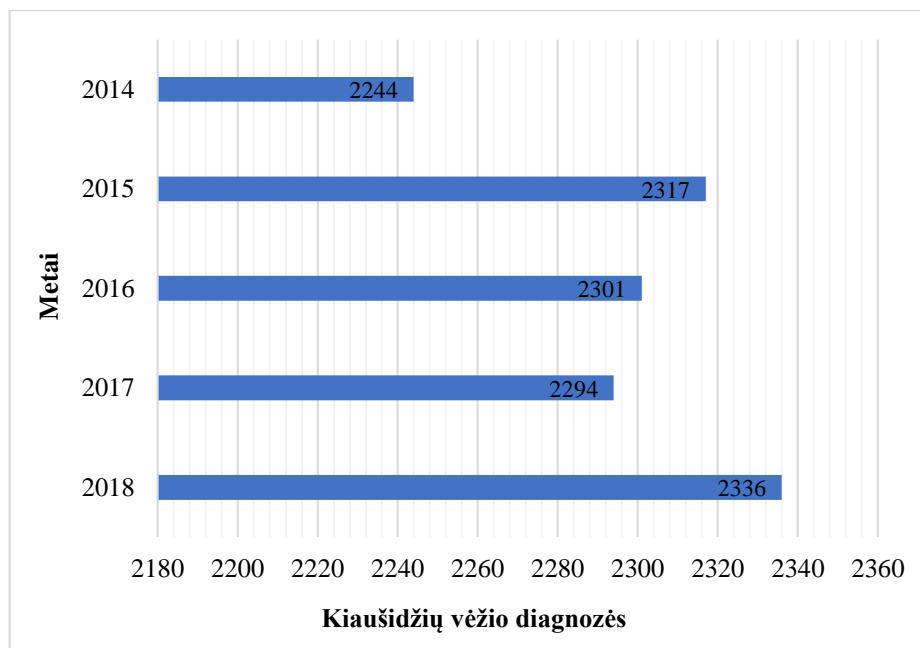
Kiaušidžių vėžys per metus pareikalauja 125 000 gyvybių visame Pasulyje ir yra septinta pagrindinė mirčių priežastis moterų populiacijoje [1]. Net 75% pacienčių kiaušidžių vėžys diagnozuojamas jau vėlyvoje stadijoje. Tai susiję su tam tikrų specifinių simptomų ignoravimu ir kiaušidžių išsidėstymų dubens srityje. Anot mokslininkų *Alison M. Karst ir Ronny Drapkin*, kiaušidžių išsidėstymas moters dubenyje pasunkina ankstyvą kiaušidžių vėžio patologiją [1]. Šiomis dienomis mokslininkai kiaušidžių vėžį skirsto į dvi pagrindines grupes: I tipo – navikai, kurie apsiriboja tik kiaušidėmis, ir II tipo – labai agresyvi forma, kuri vystosi sparčiai ir beveik visada aptinkama jau vėlyvoje stadijoje [2].



1 pav. Kiaušidžių vėžio sukeltos mirtys Lietuvoje 2014 – 2017 m. [3].

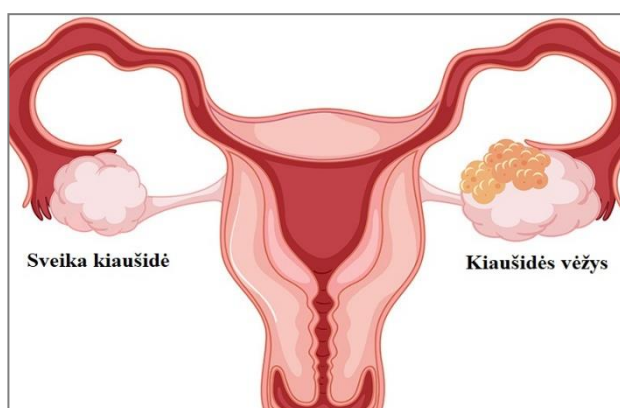
Pagal Lietuvos higienos instituto (LHI) duomenis dėl kiaušidžių vėžio Lietuvos Respublikoje 2017 metais mirė 158 moterys. Iš jų didžiąją dalį sudarė moterys, kurioms buvo 70-74 metai (30 atvejų). 2016 metais dėl šio vėžio mirė 87 moterys (daugiausiai 70-74 metų – 17 atvejų). 2015 metais mirė 85 moterys, iš jų daugiausiai buvo 75-79 metų. 2014 metais dėl kiaušidžių vėžio mirė 83 moterys, iš kurių daugiausiai buvo 80 – 84 metų (16 atvejų).

Lietuvos higienos instituto duomenimis 2018 m. kiaušidžių vėžys buvo diagnozuotas 2336 pacientėms. 2017 m. buvo diagnozuoti 2294 kiaušidžių vėžio atvejai. 2016 m. ta pati onkologinė liga buvo diagnozuota 2301 pacientei, o 2016 metais ši liga buvo diagnozuota 2317 ligonių [3].



2 pav. Kiaušidžių vėžio diagnozavimas 2014 - 2018 m. [3].

Mokslininkai nustatė, kad pacientėms, kurioms buvo diagnozuota endometriozė, kiaušidžių vėžys pasireiškė dažniau. Šio vėžio atsiradimui įtakos turi taip pat: paveldimumas, rūkymas, žmogaus papilomos virusas (ŽPV), o vienas iš galimų būdų mažinti kiaušidžių vėžio atsiradimo riziką – anovuliacija, t.y kontraceptinių tablečių vartojimas arba nėštumas. Mokslininkai mano, kad didėjant kontraceptinių vaistų vartojimui, ateityje galima tikėtis kiaušidžių vėžio diagnozių mažėjimo tendencijos [4].



3 pav. Kiaušidžių vėžys [23].

** paveikslėlis anglų kalba išverstas į lietuvių kalbą*

Daugiau nei 90% kiaušidžių vėžio atsiradimo priežasčių yra nekontroliuojamas epitelinių ląstelių augimas ir dalijimasis [5].

Riziką sirgti šia onkologine liga didina [6,7]:

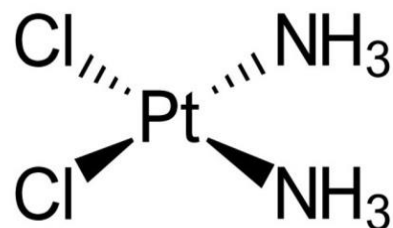
- **Amžius** – rizika sirgti šiuo vėžiu išauga moterims, vyresnėms nei 50 metų.
- **Genetinis polinkis** – rizika didėja, jei artimieji sirgo kiaušidžių, krūties ar gimdos onkolginėmis ligomis.
- **Gimdymas** – rizika didėja, kai moteris nėra gimdžiusi.
- **Ginekologinės ligos** – rizika didėja, kai kiaušidėse diagnozuojamos cistos arba aptinkama endometriozė.
- **Žalingi įpročiai** – rizika didėja, jei moteris yra nutukusi, rūko arba vartoja alkoholį.

3.1.2. Kiaušidžių vėžio gydymas

Įprastas šio vėžio gydymas apima operaciją ir chemoterapiją. Gydomo parinkimui svarbūs šie veiksniai: naviko dydis, padėtis, išplitimas bei bendra ligonio būlė, ligos atsinaujinimas bei moters imunitetas [8]. Koku būdu atliekama operacija priklauso nuo ligos stadijos - jei moteris jauna ir planuoja susilaukti vaikų bandoma palikti nepažeistus organus. Tačiau galimas ir radikalus organų šalimas arba vienos iš dviejų kiaušidžių palikimas bei gimdos išsaugojimas. Jei ligos stadija nėra pažengusi, užtenka operacijos, o esant II kiaušidžių vėžio tipui - operacija derinama su chemoterapija [9].

3.1.3. Cisplatinos taikymas kiaušidžių vėžio gydyme

Cisplatiną – chemoterapinis vaistas, kuris naudojamas šlapimo pūslės, plaučių, reprodukcijos organų, galvos ir kaklo vėžio gydymui. Šio preparatas veiksmingas įvairioms vėžio stadijoms, įskaitant karcinomas, limfomas ir sarkomas. Cisplatinos veiksmingumui nustatyti yra svarbus veikimo būdas, kuris susijęs gebėjimu sietis su purino bazėmis DNR molekulėje bei trukdyti DNR molekulėje vykstančius mechanizmus. Šiuo būdu sukeliama DNR pažeidimas ir vėžinėje ląstelėje įvyksta apoptozė [10,11].



4 pav. Cisplatinos stereocheminė formulė [30].

Amino grupė cisplatinos molekulėje suteikia stipresnius ryšius su platinos jonu, o chlorido jonai leidžia cisplatinai jungtis su DNR molekulėmis. Molekulė, patekusi į organizmą, atiduoda chlorido jonus ir tampa hidratuota. Ši molekulė pavirsta reaktyvia ir sąveikauja su DNR, RNR ir organizmo baltymais [12].

Esant normalioms sąlygoms, ląstelės generuoja aktyvių deguonies junginių koncentracijas, jų susidarymą ir eliminaciją iš ląstelės. Šiems ląstelėje vykstantiems procesams svarbus sumažėję glutationo – GSH, superoksido dismutazės – SOD ir katalazės – CAT kiekiai. Esant oksidaciniam stresui, aktyvūs deguonies junginiai pakenkia ląstelių baltymams, lipidams ir DNR ir pačiu sukelia tokius pokyčius, kaip DNR pažeidimas ir DNR sintezės slopinimas. Be to, gali būti skatinama apoptozė ir sukiamas oksidacinis stresas [11]. Cisplatina yra vienas veiksmingiausių plataus spektro citotoksinių vaistų, galinčių sudaryti kelis skirtingus DNR – platinos junginius bei skatinti ląstelių atsparumą, aktyvinant arba slopinant įvairius genus [31].

Skiriant šį preparatą siekiama išsiaiškinti nepageidaujamas reakcijas, tokias kaip sunkus inkstų funkcijos sutrikimas, alerginės reakcijos, imuniteto sumažėjimas, virškinamojo trakto sutrikimai, kraujavimas bei sąveikos su kitais vaistais [11].

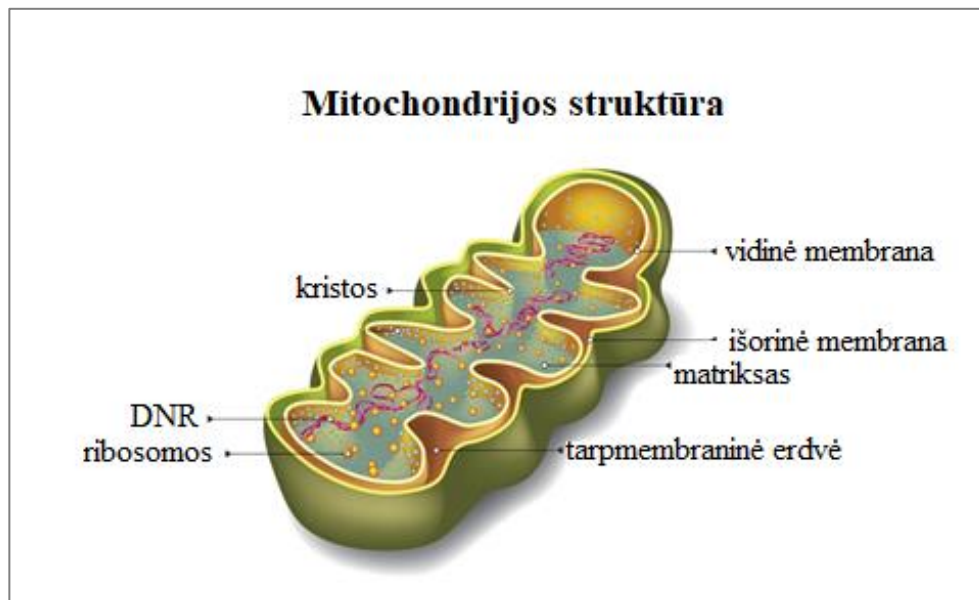
Per tris dešimtmečius cisplatina ir karboplatina tapo vis dažniau pasirenkamais vaistais piktybinių ginekologinių navikų gydyme. Gydymo pažangai ir tinkamam šių platinos vaistų pasirinkimui reikalingas veikimo mechanizmo ir struktūros suvokimas. Tokia informacija reikalinga, kad būtų atrastas tinkamas platininių vaistų selektyvumas specifiniams navikams ir sukurtas veiksmingas gydymo mechanizmas [13].

3.2. Mitochondrijų struktūra ir funkcijos

Mitochondrijos raumenų ląstelėse buvo aptiktos dar 1850 m., o vėliau nustatyta ir šių organelių svarba organizmui. Šių organelių skaičius ląstelėse priklauso nuo audinio rūšies ir ląstelių energijos poreikio [14].

Mitochondrijos gali būti rutulio, siūlelių bei lazdelių formos. Jų dydis organizme gali svyruoti nuo 0,5 iki 10 μm [19]. Šios organelės sintetina, skaido, oksiduoja įvairias medžiagas ir tokiu būdu teikia ląstelėms energiją, kuri yra reikalinga užtikrinti gyvybinėms funkcijoms. Jos taip pat svarbios oksidaciniame fosforiliniame ir kvėpavime, todėl kuo didesnis šių organelių kiekis organizme, tuo geriau organizmas aprūpinamas deguonimi ir jėga raumenyse [15].

Mitochondrijos yra sudarytos iš dviejų membranų – išorinės ir vidinės (5 pav.). Šias dvi membranas skiria tarpmembraninė erdvė, kuri yra svarbi oksidaciniam fosforilinimui. Abi mitochondrijų membranos skiriasi baltymų ir lipidų santykiu bei pralaidumu jonams ir mažoms molekulėms, todėl šios organelės struktūros elementai atlieka skirtingas funkcijas [16].



5 pav. Mitochondrijų struktūra [18].

** paveikslėlis anglų kalba išverstas į lietuvių kalbą*

Vidinė mitochondrijų membrana palaiko protonų gradientą, reikalingą oksidaciniam fosforilinimui, o išorinė membrana turi baltymus, kurie sudaro kanalus, pro kuriuos praeina mažos molekulės. Mitochondrijų vidus yra užpildytas matriksu, jame yra fermentai, reikalingi oksidaciniam fosforilinimui. Matrikse vykstančių reakcijų metu iš piruvato ir riebalų rūgščių gaunamas acetilkofermentas (Acetyl-CoA), kuris oksiduojamas iki anglies dioksido (CO_2). Šis dalyvauja redukcijos procesuose, kai iš NAD^+ gaunama NADH , o iš FAD gaunama FADH_2 . Iš šių medžiagų vykstant oksidaciniam fosforilinimui gaunama energija (ATP) [17].

3.3. Mitochondrijose vykstantis oksidacinis fosforilinimas

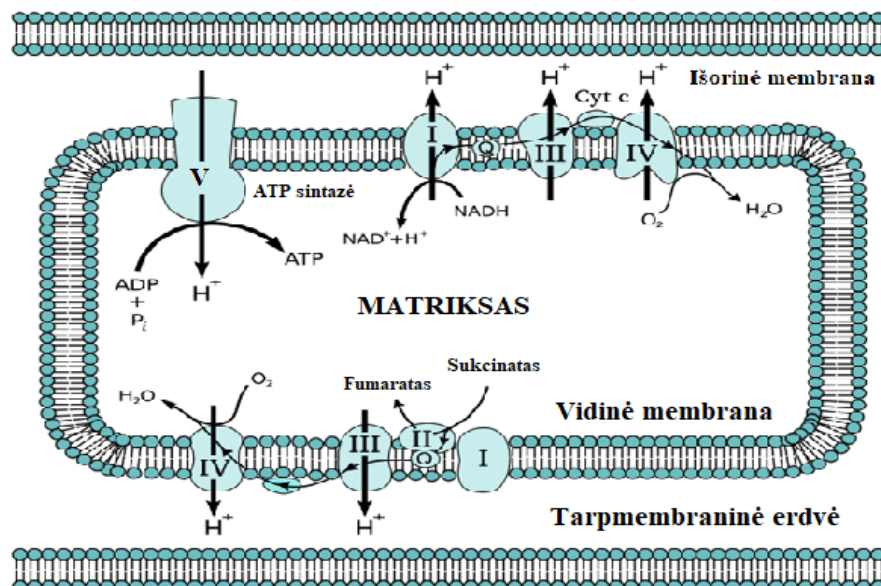
Oksidacinis fosforilinimas vyksta vidinėje mitochondrijų membranoje. Šio proceso metu vyksta NADH ir FADH_2 oksidacija, išsiskiria energija, reikalinga ATP sintetinimui.

Išskiriami 5 mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksai (6 pav.) [21]:

- *I kompleksas* – NADH dehidrogenazė. NADH yra flavoproteinas, sudarytas iš 45 baltymų subvienetų, 1 FMN molekulės ir 9 Fe-S baltymų [22]. Šis flavoproteinas turi L formos struktūrą,

kurios viena dalis yra hifrofilinė, kita – hidrofobinė. Hidrofilinė šio komplekso dalis nukreipta į mitochondrijos matriksą. Šioje dalyje yra redokso kofaktoriai, reikalingi NADH oksidacijai ir elektronų pernašai [23].

- *II kompleksas* – sukcinato dehidrogenazė. Šiame komplekse vyksta sukcinato virtimas fumaratu. Šis kompleksas taip pat yra vidinėje mitochondrijos membranoje. Šis kompleksas kaip ir I kompleksas turi Fe-S baltymus bei FAD prostetinę grupę. Prostetinės grupės pagalba elektronai pernešami nuo sukcinato iki ubichinolio [24].
- *III kompleksas* – citochromo c oksidoreduktazė. Šis kompleksas yra išsidėstęs išorinėje mitochondrijos membranoje ir nukreiptas į tarpmembraninę erdvę. III komplekse iš ubichinolio elektronai pernešami į citochromą b, o paskui ir į citochromą c [25].
- *IV kompleksas* – citochromo C oksidacija. Šiame komplekse yra 13 subvienetų. Jis citochromo c pagalba katalizuoja deguonies redukciją. [4] Šis kompleksas gali pakisti dėl tam tikrų ligų, tokių kaip vėžys ar cukrinis diabetas [24].
- *V kompleksas* – ATP sintazė. Šis kompleksas atsakingas už ATP sintezę iš ADP. Tam reikalingas kvėpavimo grandinės sukurtas elektrocheminis H^+ jonų gradientas [22].



6 pav. Mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksai [35].

* paveikslėlis anglų kalba išverstas į lietuvių kalbą

3.4. Hipertermijos taikymas vėžio gydyme. Veikimo mechanizmas

Anot mokslininkų *Steven A. Curley, Flavion Palalon ir kt.*, hipertermija (kūno temperatūros padidinamas iki 42-43°C) gali būti naudojama metastazinėms ligoms gydyti.

Ieškant efektyvių vėžio gydymo būdų, pradedami taikyti kombinuoti jau žinomi gydymo metodai. Vienas iš jų – chemoterapijos arba radioterapijos taikymas kartu su hipertermija. Hipertermija – dirbtinis temperatūros pakėlimas nuo 39 iki 43°C. Temperatūra gali būti pakeliama dirbtinėmis sąlygomis, naudojant įvairias elektromagentines arba ultragarso bangas. Šis temperatūros pakėlimas gali veikti nepriklausomai, papildomai ar sinergistiškai kartu su kitais gydymo būdais. Cisplatinos ir jos analogų, tokių kaip karboplatina, kartu su hipertermija, stiprus citotoksiškas poveikis įrodytas santykinai mažoje temperatūroje 40,5 °C. Sinergistinis hipertermijos ir citotoksinių vaistų poveikis pasižymi didesniu vaistų pasisavinimu, didesniu aktyvių deguonies junginių susidarymu bei dažnesniu ir stipresniu DNR pažeidimo bei DNR atkūrimo proceso slopinamu poveikiu [26].

Dirbtinis temperatūros pakėlimas gali būti taikomas tiek vėžio apimtam organui, tiek visam kūnui. Be to, nustatyta, kad hipertermijos poveikis dažniausiai siejasi su baltymų denatūracija ir yra efektyvus naudojant cisplatinos preparatus, kadangi cisplatinos aktyvumas didėja kylant kūno temperatūrai [27].

3.5. Hipertermijos poveikis mitochondrijų funkcijoms

Literatūros duomenys rodo, kad hipertermija mitochondrijose didina viduląstelinę kalcio koncentraciją ir slopina kalcio pašalinimą iš ląstelės ir sukelia ląstelių žūtį. Be to, nustatyta, jog veikiant ląsteles dirbtinai pakelta temperatūra, mitochondrijose sutrinkdoma energijos gamyba, silpninamas oksidacinio fosforlinimo procesas bei padidinamas mitochondrijų vidinės membranos pralaidumas [42].

Nustatyta, kad hipertermijos poveikis ląstelėms priklauso nuo ląstelių dalijimosi fazių, o didžiausias jautrumas siejamas su mitozės faze. Hipertermija pažeidžia ląstelių membranas, o šios tampa jautresnės citotoksiniams preparatams ir didina absorbciją [28].

Mokslininkai *Z.Wang, F.Cai, X.Chen ir kt.* savo atliktame tyrime nustatė, kad hipertermija sukėlė intraląstelinę aktyvių deguonies junginių (ang. ROS) gamybą mitochondrijose. Šio tyrimo metu nustatyta, kad hipertermija sumažino trombocitų agregaciją ir trombocitų mangango superoksido dismutazės (MnSOD) kiekį, fermentų aktyvumą bei nikotinamido adenino dinukleotido fosfato (NADPH) oksidazės, azoto oksido sintazės, ciklooksigenazės ir lipoksigenazės aktyvumą [37].

Kitame atliktame mokslininkų tyrime buvo siekiama išsiaiškinti ar hipertermija sukelia ląstelių apoptozę ir kaip tai siejasi su mitochondrijų funkcijomis ir dalyvavimu ląstelių mirties procese. Tyrimas

buvo atliktas remiantis srauto citometriniu analize. Jo metu buvo naudojamas rekombinantinis pelių nekrozės faktorius TNF – α (50 ng/ml) ir pelių fibroblastų (L929) ląstelės. Tyrimo rezultatai parodė, kad hipertermija sugebėjo depoliarizuoti membranos potencialą, o naudojant ciklosporiną A buvo slopinamas hipertermijos ir TNF – α sukeltas citotoksinis poveikis. Anot mokslininkų *W.F.Yuen, K.P. Fung ir kt.* hipertermija ir jos sąlygota mitochondrijų disfunkcija gali būti svarbi ląstelių mirties procese (apoptozėje) [36].

Literatūros šaltiniuose rašoma, kad hipertermija turi įtakos lizosomų skaičiaus ir lizosomų fermentų kiekio padidėjimui piktybinėse ląstelėse. Šios organelės dalyvauja ląstelės susinaikinimo procesuose, kuriuose padidėja ląstelės destrukcija, sumažėja navikinio audinio kraujotakos cirkuliacija, atsiranda navikinio audinio kraujagyslių stazė ir tuo pačiu mažėja naviko aprūpinimas reikalingomis medžiagomis. Tokiame audinyje vyksta oksidacinio metabolizmo slopinimas, anaerobinė glikolizė, vėliau pradeda kauptis pieno rūgštis, kuri turi įtakos mažesnio pH atsiradimui piktybinės ląstelės mikroaplinkoje, o sumažėjęs pH (rūgštinė aplinka) turi įtakos didesniai lizosomų kiekio atsiradimui ir tai lemia spartesnę piktybinių ląstelių pažeidimą bei mirtį, lyginant su sveikomis ląstelėmis [38].

Tyrimų apie hipertermijos poveikį vėžinių ląstelių funkcijoms nėra daug. 2018 m. mokslininkai *S.Trumbeckaitė ir kt.* nustatė, kad hipertermija (40°C ir 43°C) didina mitochondrijų kvėpavimo greitį antroje metabolinėje būsenoje (didina mitochondrijų vidinės membranos pralaidumą) skrandžio (AGS) ląstelėse, tačiau neveikė CaCo-2 (storosios žarnos) ir T3M4 (kasos vėžinių ląstelių) [42].

Kitų mokslininkų atlikti tyrimai apie hipertermijos poveikį mitochondrijoms buvo atliekami su sveikais organais. Mokslininkė *R. Žukienė ir kt.* nustatė, kad hipertermija (42°C ir 45°C) mažina žiurkių pelių kepenų mitochondrijų kvėpavimo funkcijas bei slopina mitochondrijų kvėpavimo greitį trečioje metabolinėje būsenoje ir didina mitochondrijų vidinės membranos pralaidumą [43].

Taip pat buvo nustatyta, kad hipertermija mažina žiurkių skeleto raumenų mitochondrijų membranos potencialą (didina mitochondrijų vidinės membranos pralaidumą) [44].

Vis dėlto, tyrimų apie hipertermijos poveikį apie hipertermijos poveikį kiaušidžių vėžinių ląstelių mitochondrijoms *OVCAR-3* nėra.

3.6. Cisplatinos poveikis mitochondrijų funkcijoms

Atsižvelgiant cisplatinos inertiškumą, šis citotoksinis vaistas turi būti aktyvuojamas ląstelių viduje aktyvinimo reakcijų pagalba. Šio proceso metu cis – chloro grupės pakeičiamos polinėmis (tirpiomis vandenyje). Aktyvinimo reakcijos vyksta citoplazmoje, dėl santykinai mažos chloridų jonų

koncentracijos. Ląstelių viduje (citoplazmoje) susidaro reaktyvios cisplatinos formos (mono- ir bi-), kurios sąveikauja su citoplazmos substratais, tokiais kaip glutationas, metioninas ir baltymai (ypač cisteinas). Cisplatina turi įtakos redokso pusiausvyrai, gali sukelti oksidacinį stresą ir DNR molekulių pažeidimą [33].

Užsienio šalio mokslininkų atliktame tyrime buvo nustatyta, kad naudojant tam tikrus baltymus, prie kurių galima prijungti tokius vaistus, kaip cisplatina, buvo paveikta mitochondrijų DNR. Tyrimo metu paaiškėjo, kad cisplatina pažeidė mitochondrijų DNR seką, dėl ko sutriko ląstelės gyvavimo ciklas. Po šios ląstelių organelių pažeidimo pradėjo gamintis aktyvūs deguonies junginiai (ang.ROS), kurie sukėlė ląstelių mirtį [34].

Mokslininkai taip pat nustatė, kad citotoksinį cisplatinos veikimo mechanizmą skatina jos sąveika su DNR molekulėmis, kurių metu cisplatina jungiasi prie DNR ir sudaro molekulinis junginys, tarp kurių yra kryžminiai ryšiai (1,2 – intrastriniai APG ir CpG). Šie ryšiai aktyvuoja signalo perdavimo kelius ir aktyvina apoptozę. Įrodyta, kad būtent šie ryšiai sukelia didžiausią cisplatinos citotoksinį poveikį. Poveikis DNR, ląstelių mirtis ir pakitusi mitochondrijų funkcija gali sukelti svarbius vėžinių ląstelių pakitimus [33,39].

Kiti užsienio šalių tyrėjai, norėdami iširti cisplatinos veikimo mechanizmą ir poveikį kiaušidžių vėžio ląstelių linijose, atliko tyrimus su OV433, SKOV3, TOV112D ląstelėmis (*Bostonas, JAV*). Ląstelės buvo paveiktos skirtingomis cisplatinos dozėmis, o vėliau atliekamas MTT testas. Rezultatai rodo, kad cisplatina slopino visų trijų kiaušidžių vėžio ląstelių linijų augimą, skyrėsi tik ląstelių linijų jautrumas cisplatinos preparatui. Atspariausias buvo SKOV3 (kiaušidžių vėžinės ląstelės). Tame pačiam tyrime mokslininkai nustatė, kad *PI3 K, Akt, mTOR* - pagrindiniai signalų keliai, atliekantys pagrindinį vaidmenį ląstelėse ir būtini ląstelių funkcijoms, įskaitant ląstelių proliferaciją, augimą, gyvavimą ir metabolizmą. Šiame tyrime mokslininkai parodė, kad cisplatina būtent slopindama *Akt/mTOR* signalų kelią didina ląstelių apoptozę. [40]

Nepaisant to, kad cisplatina daugiau nei 25 metus naudojama chemoterapijoje jos veikimas subląsteliniam (mitochondrijų) lygmenyje nėra pakankamai aiškus ir tyrimų su *OVCAR-3* kiaušidžių vėžinių ląstelių linija nėra. Pastarųjų metų *S.Trumbeckaitės ir kt.* mokslininkų darbai tiriant storosios žarnos CaCo – 2, skrandžio AGS ir kasos (T3M4) vėžines ląsteles nustatė, kad cisplatina didina mitochondrijų kvėpavimo greitį antroje metabolinėje būsenoje ir slopina oksidacinį fosforilinimą CaCo – 2, AGS ir T3M4 ląstelėse [42]. Tiriant šias vėžines ląsteles didžiausias efektas nustatytas skrandžio ir kasos vėžinėms ląstelėms. Tyrimų metu nustatyta, kad cisplatina 16-40 % slopina mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientus skrandžio, kasos ir storosios žarnos vėžinėse ląstelėse. Taip pat nustatyta, kad cisplatina nedidina mitochondrijų išorinės membranos pralaidumo CaCo – 2 ląstelėse, tačiau sukelia išorinės membranos pažeidimą AGS (skrandžio) ir T3M4 (kasos) vėžinėse ląstelėse. [42]

Custodio ir kt. mokslininkai nustatė, kad cisplatina sukėlė kepenų mitochondrijų brinkimą ir mitochondrijų vidinės membranos pralaidumo padidėjimą [45]. O mokslininkai *Ortega – Dominguez ir kt.* priešingai, parodė, kad cisplatina neturi poveikio inkstų mitochondrijoms bei jų kvėpavimo greičiui ketvirtoje metabolinėje būsenoje, o slopina mitochondrijų kvėpavimo greitį trečioje metabolinėje būsenoje [46].

Tyrimų apie cisplatinos poveikį kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* energetiniam metabolizmui taip pat nėra.

4. METODIKA

4.1. Naudojama aparatūra ir indai

Oroboros Oxygraph 2k įrenginys, centrifuga *Eppendorf 5810R*, magnetinė maišyklė *Variomag*, analitinės svarstyklės *Kern – ABJ 2204M*, pHmetras *pH-meter 776*, automatinės pipetės su vienkartiniais antgaliais, mikrošvirškiai *Hamilton*, mėgintuvėliai, cilindrai, kiuvetės.

4.2. Medžiagos

Glutamatas (*SIGMA*), malatas (*SIGMA*), digitoninas (*SIGMA*), amitalis (*SIGMA*), ADP (*SIGMA*), citochromas C (*SIGMA*), sukcinatas (*SIGMA*), karboksiatraktilozido Na druska (*SIGMA*), dinitrofenolis (DNF) (*SIGMA*), etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) (*SIGMA*), etilenglikolio (2 – aminoetileterio) – N,N,N'N' – tetraacto rūgštis (EGTA) (*ROTH*), HEPES (*SIGMA*), KH₂PO₄ (*SIGMA*), MgCl₂ · 6H₂O (*ROTH*), taurinas (*SIGMA*), etanolis, sacharozė (*ROTH*), K – laktobionatas (*ALDRICH*), distiliuotas vanduo.

4.3. Ląstelių linijos ir auginimo sąlygos

Tyrimė buvo naudojamos žmogaus vėžinės kiaušidžių *OVCAR-3* epitelinės ląstelės (ATTC, Manassas, JAV). Jos buvo kultivuojamos RPMI terpėje, steriliose 75 cm² lėkštelėse, naudojant 10 proc. veršelio embriono serumą RPMI terpėje (5 ml). Taip pat buvo naudojamas penicilino ir streptocido antibiotikų 0,01 mg/ml koncentracijos tirpale. Kiaušidžių vėžinės ląstelės buvo patalpinamos į inkubatorių ir auginamos 5 proc. CO₂, esant 37°C ir 97proc. drėgmei.

Ląstelės buvo auginamos ir jų gyvybingumo testas atliktas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Virškinimo sistemos tyrimų instituto chirurginės gastroenterologijos laboratorijoje.

Cisplatinos ir hipertermijos poveikiui *in vitro* modeliuoti, kiaušidžių vėžinės ląstelės *OVCAR-3* buvo inkubuojamos 24 val. nurodytomis sąlygomis, vėliau paveiktos (1 val.) 37°C arba 43°C temperatūra (esant arba nesant cisplatinai IC₅₀ 158μM). Vėliau ląstelės buvo atplautos ir tada matuojamas mitochondrijų kvėpavimo greitis.

Prieš ląstelių kvėpavimo greičių tyrimus, į 50 ml talpos mėgintuvėlį nupilama ląstelių auginimo terpė, naudojant fosfatinį buferinį druskos tirpalą (PBS) nuplaunamas flakono dugnas, kurio visas turinys taip pat nupilamas į tą patį 50 ml talpos mėgintuvėlį. Tam, kad ląstelės atkibtų nuo flakono dugno, įpilama 10 ml terpės /2ml 0,25 proc. tripsino ir ląstelės inkubuojamos nuo 7 iki 10 min. Tripsino poveikiui užslopinti buvo įpilta ląstelių auginimo terpė (2 ml tripsino inaktyvuoti reikia 10 ml terpės). Vėliau ląstelių suspensija buvo perkeliama į 50 ml talpos mėgintuvėlį ir *Eppendorf 5810 R* centrifugoje buvo centrifuguojamos 5 min., esant 800 aps./min. Po to, nupylus ląstelių supernantą, likusios ląstelės mėgintuvėlio dugne vėl suspenduojamos su 1 ml ląstelių auginimo terpės. Ląstelių kultūra kiekybiškai įvertinama naudojant Triptano mėlio metodą (Virškinimo sistemos tyrimų instituto chirurginės gastroenterologijos laboratorija). Prieš oksigrafinį matavimą ląsteles buvo nusodinamos, naudojant centrifugą (800 aps./min) ir suspenduojamos su 100 µl matavimo terpe, o tada iš karto registruojamas mitochondrijų kvėpavimo greitis.

4.4. OVCAR-3 kiaušidžių vėžinių ląstelių kvėpavimo greičio matavimas

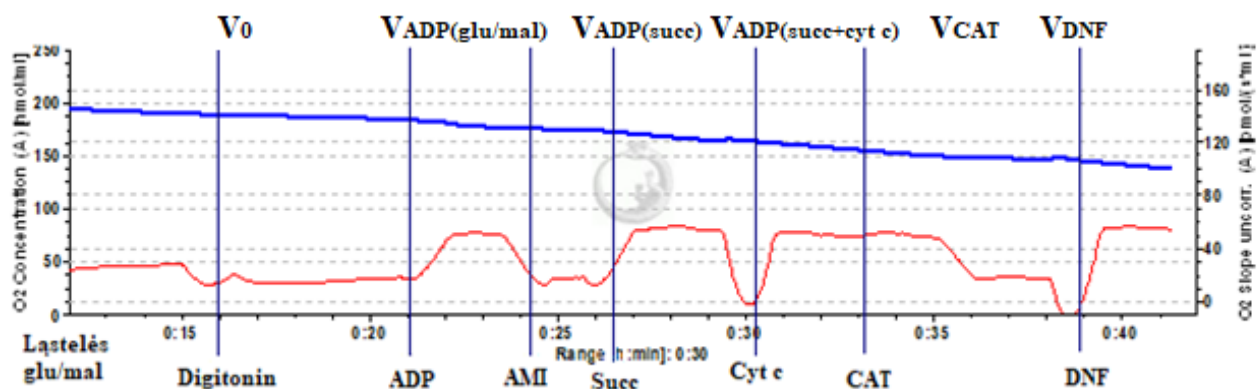
Kiaušidžių vėžinių ląstelių kvėpavimo greičio matavimas buvo atliekamas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Farmacijos fakulteto Klinikinės farmacijos katedros laboratorijoje, naudojant poliarografinį įrenginį *Oroboros Oxygraph – 2k*. Naudojant oksigrafinį metodą buvo įvertinamas deguonies sunaudojimo greitis per vieną minutę epitelinėse kiaušidžių vėžinėse ląstelėse *OVCAR-3*, kurios buvo paveiktos arba nepaveiktos cisplatina arba cisplatinos ir hipertermijos deriniu. Eksperimento metu buvo naudojami mitochondrijų kvėpavimo grandinės substratai ir slopikliai bei matuojama deguonies sunaudojimo pokyčiai tam tikrame laiko intervale.



Oroboros įrenginys [32].

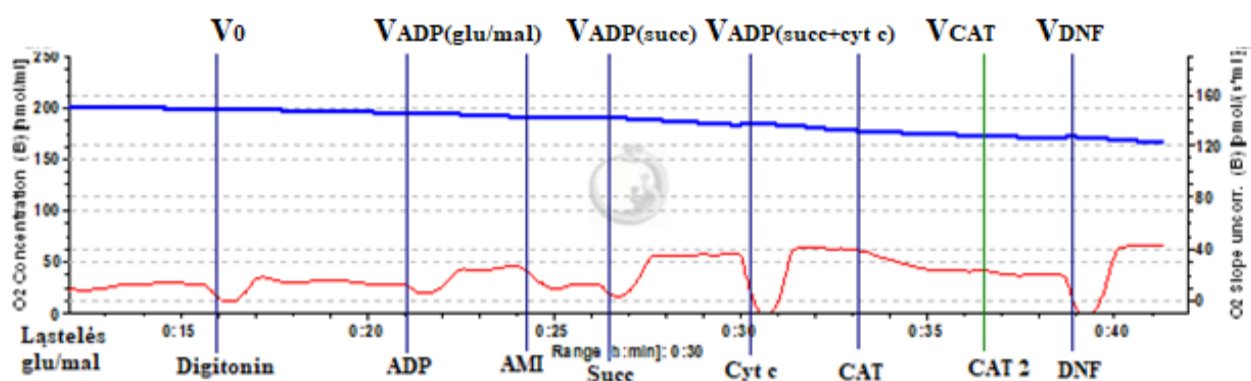
Eksperimentas buvo atliekamas naudojant kiuvetę, kurioje buvo palaikoma 37°C temperatūra. Kiuvetės viduje buvo *KLARK* tipo deguonies elektrodas. Tyrimo esmė – deguonies koncentracijos pokyčiai ir deguonies redukcija virš platinos elektrodo bei tirpale esančios srovės stiprio pokyčių registravimas. Gauti kvėpavimo greičių kreivių pokyčiai atitinka srovės stiprumo pokytį. Iš to galime spręsti apie mitochondrijų sunaudotą deguonį, jo pokytį tam tikrame laiko tarpe (žr.8 pav.)

Žemiau pateiktame 8 pav. pavaizduoti kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* kvėpavimo greičiai, esant 43°C temperatūrai (be cisplatinos).



8 pav. Kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* (43°C, be cisplatinos) mitochondrijų kvėpavimo greičio registravimo kreivė.

Glu/mal – 5 mM glutamato ir 2 mM malato, *Digitonin* – 8 µg/ml digitonino, *ADP* – 1mM adenozino difosfato, *AMI* – 2mM amitalio, *Succ* – 15mM sukcinato, *Cyt C* – 32µM citochromo c, *CAT* – 0,75µM karboksitraktilozido, *DNF* – 0,3mM dinitrofenolio.



9 pav. Kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* (43°C, su cisplatina) mitochondrijų kvėpavimo greičio registravimo kreivė.

Glu/mal – 5 mM glutamato ir 2 mM malato, *Digitonin* - 8 µg/ml digitonino, *ADP* – 1mM adenozino difosfato, *AMI* – 2mM amitalio, *Succ* – 15mM sukcinato, *Cyt C* – 32µM citochromo c, *CAT* – 0,75µM karboksitraktilozido, *DNF* – 0,3mM dinitrofenolio.

Mitochondrijų kvėpavimo registravimo terpės MiR06 sudėtis: 110μM sacharozės, 60μM K-laktobionato 20μM taurino, 20μM HEPES, 10 μM KH₂PO₄, 3μM MgCl₂·6H₂O, 0,5μM EGTA (pH 7,1; 37°C).

Kiaušidžių vėžinių ląstelių linijų OVCAR-3 tyrimas buvo atliekamas į termostatinę kiuvetę įpylus 2 ml MiR06 terpės. Tuomet kiuvetės buvo uždaromos specialiais kamščiais, o jų viduje palaikoma 37°C temperatūra. Tyrimas buvo atliekamas 40-50 min.

Į kiuvetę pridėjus 1mln. ląstelių 2 ml terpėje, kurios buvo paveiktos arba nepaveiktos (kontrolinė grupė) citotoksiniu preparatu – cisplatina, buvo stebimas kiaušidžių vėžinių ląstelių OVCAR-3 endogeninis kvėpavimas (substratas glutamatas 5mM ir malatas 5mM). Įdėjus digitonino (8 μg/ml) ir esant substratams glutamatui ir malatui, buvo registruojamas pagrindinis (bazinis) mitochondrijų kvėpavimo greitis (antroje metabolinėje būsenoje) (V_0). Kreivei nusistovėjus buvo pridėta 1 mM adenozino difosfato (ADP). Trečioje metabolinėje būsenoje buvo stebimas ryškus mitochondrijų kvėpavimo greičio padidėjimas, kadangi sintetinama ATP. Po to, buvo įleidžiama 2 μM amitalio. Naudojant šį reagentą, užslopinamas pirmasis mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksas. Vėliau pridėjome 15 mM sukcinato (antrojo mitochondrijų kvėpavimo grandinės komplekso substrato) ir matavome mitochondrijų kvėpavimo greitį trečioje metabolinėje būsenoje ($V_{ADP(succ)}$), kai buvo oksiduojamas sukcinatas. Pridėjus 32 μM citochromo c vertinome mitochondrijų kvėpavimo greitį ($V_{ADP(succ+cyt c)}$) ir mitochondrijų išorinės membranos pažeidimą. Membranos pažeidimą nustatėme vertindami kvėpavimo greičio pokyčius (stimuliavimą – citochromo c efektą). Jei membrana yra pažeista – stebimas mitochondrijų kvėpavimo greičio padidėjimas (stimuliavimas). Vėliau buvo pridedama 0,75 μM karboksitraktilozido (CAT) ir registruojamas kvėpavimo greitis (V_{CAT}) ir įvertiname mitochondrijų vidinės membranos laidumą. Šis reagentas slopina ADP/ATP nešiklį, inhibuoja adenozindifosfato (ADP) patekimą ir tokiu būdu yra slopinamas mitochondrijų kvėpavimo greitis. Tyrimo pabaigoje buvo įleidžiama 0,3 μM dinitrofenolio (DNF) ir registruojamas mitochondrijų kvėpavimo greitis (V_{DNF}). Šis reagentas reikalingas oksidacijos ir fosforilavimo proceso atskyrimui, kad galėtume įvertinti mitochondrijų kvėpavimo grandinės aktyvumą.

Pagal deguonies sunaudojimo pokyčius laiko intervale įvertiname mitochondrijų kvėpavimo funkcijas. Apskaičiavimui buvo naudojamos šios formules:

$$\text{citochromo } c \text{ efektas} = \frac{V_{ADP(Succ)+Cyt c}}{V_{ADP}};$$

$$KKK (Glu/mal) = \frac{V_{ADP(glu/mal)}}{V_0};$$

$$KKK (Succ) = \frac{V_{ADP (Succ)+Cyt c}}{V_{CAT}};$$

4.5. Statistinė duomenų analizė

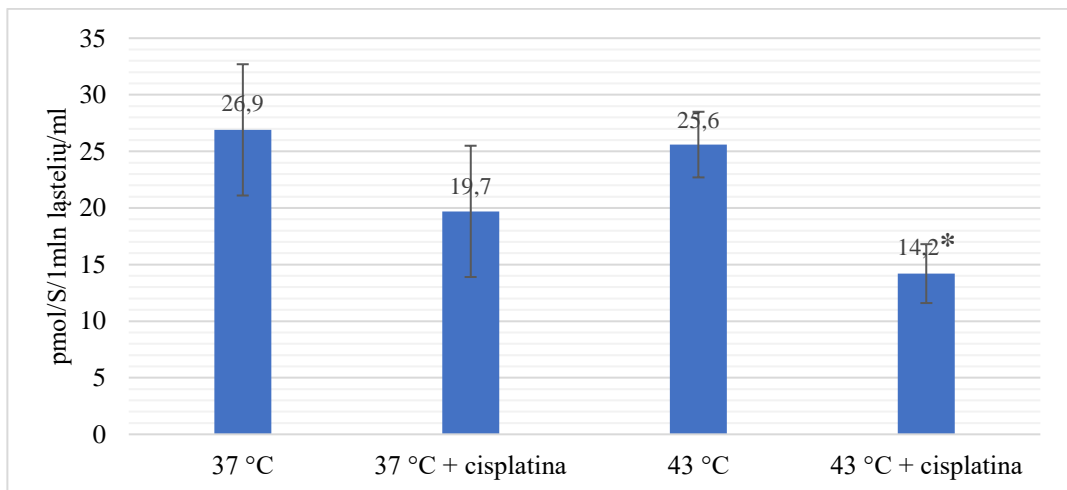
Duomenys buvo apdorojami naudojant „Microsoft Office Excel“, „Microsoft Office Word“, *Sigmaplot 11.0* programas. Statistinė duomenų analizė buvo atliekama naudojant *Sigmaplot 11.0* programą. Rezultatų vidurkiai yra pateikiami su standartinėmis paklaidomis, o statistiškai reikšmingas skirtumas tarp vidurkių laikomas, kai $p < 0,05$. Vidurkiai išvesti iš keturis kartus pakartotų eksperimentų duomenų. Duomenų patikimumui naudojamas *student-t* testas.

5. REZULTATAI

Tyrimo metu buvo vertinama kiaušidžių vėžinių ląstelių endogeninio kvėpavimo greitis, mitochondrijų kvėpavimo greitis antroje, trečioje ir ketvirtoje metabolinėse būsenose. Mitochondrijų kvėpavimo funkcijos kokybės įvertinimui, buvo apskaičiuotas mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientas. Mitochondrijų išorinės membranos pažeidimui nustatyti buvo atliekamas citochromo c testas.

5.1. Cisplatinos ir hipertermijos poveikis kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* endogeniniam kvėpavimo greičiui

Tyrimo metu oksigrafiniu metodu buvo įvertintas kiaušidžių vėžinių ląstelių, paveiktų arba nepaveiktų cisplatiną ar hipertermija endogeninis kvėpavimo greitis.



1 pav. Hipertermijos ir cisplatinos poveikis kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* endogeniniam kvėpavimo greičiui.

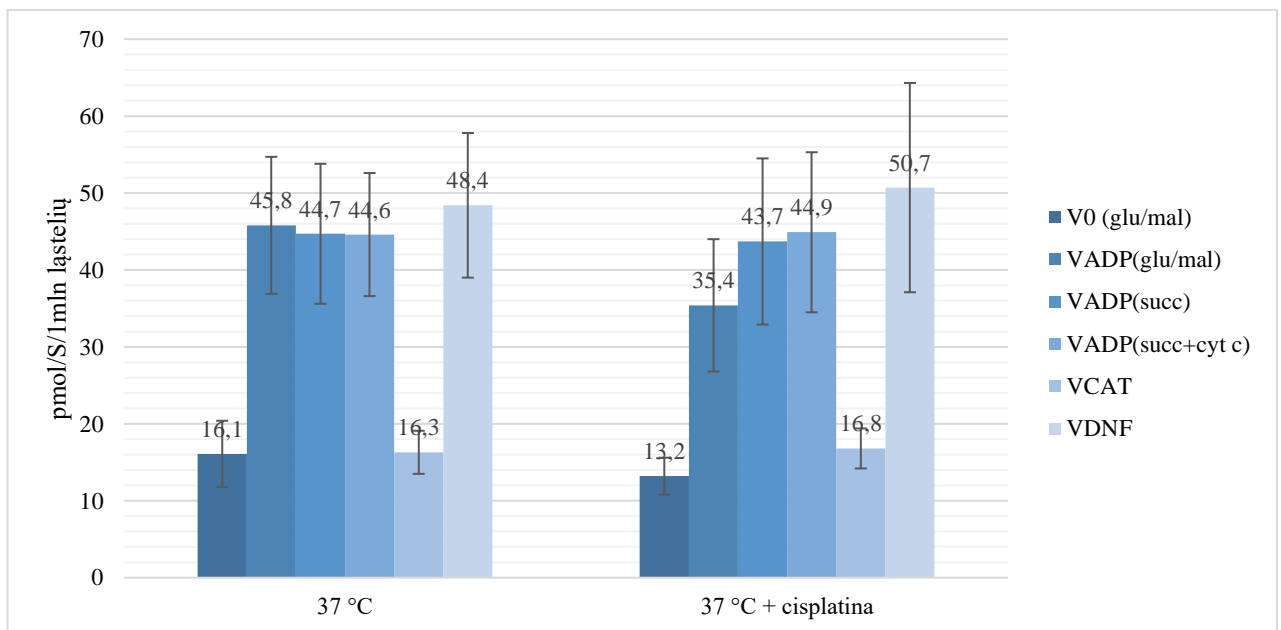
* $p < 0,05$, lyginant su kontroline grupe.

Lyginant pirmosios grupės (37°C) ir antrosios grupės (37°C + cisplatin) endogeninio kvėpavimo greičius galima teigti, kad cisplatin slopino V_{endo} 27%, nors statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo. Lyginant kiaušidžių vėžinių ląstelių (*OVCAR-3*), paveiktas 43°C bei 43°C papildomai paveiktų cisplatiną endogeninio kvėpavimo greitis sumažėjo 44% (tai statistiškai reikšmingas skirtumas lyginant su kontroline grupe) (1 pav.). Rezultatai rodo, jog cisplatin sumažino *OVCAR-3* endogeninio kvėpavimo greitį. Tik hipertermija (43°C) poveikio endogeniniam kvėpavimo greičiui neturėjo. Tuo

tarpu cisplatinos ir hipertermijos (esant 43°C) poveikyje ląstelių V_{endo} sulėtėjo 47 % lyginant su kontroline grupe.

5.2. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiams *OVCAR-3* kiaušidžių vėžinėse ląstelėse normotermijos (37°C) sąlygomis

Cisplatinos poveikis kiaušidžių vėžinėse ląstelėse *OVCAR-3* buvo vertinamas esant 37°C ir 37°C, papildomai paveikus cisplatiną. Lyginant gautus rezultatus, matome, kad mitochondrijų kvėpavimo greitis antrojoje (V_0) ir trečioje ($V_{\text{ADP glu/mal}}$) metabolinėse būsenose, oksiduojant glutamatą ir malatą sumažėjo 18,0% ir 23% atitinkamai, oksiduojant sukcinatą, cisplatinos poveikio nebuvo (2 pav). Ketvirtojoje mitochondrijų metabolinėje būsenoje, pridėjus karboksitraktilozido, kuris slopina ADP patekimą į ląsteles, kvėpavimo greitis nesikeitė (lyginant su kontroline būsenoje). Taigi, poveikio mitochondrijų vidinės membranos laidumui cisplatiną neturėjo. Pridėjus oksidacijos ir fosforilinimo procesų skyriklio (dinitrofenolio) kvėpavimo greitis buvo panašaus dydžio tiek paveiktose cisplatiną, tiek kontroline grupėse (2pav.).

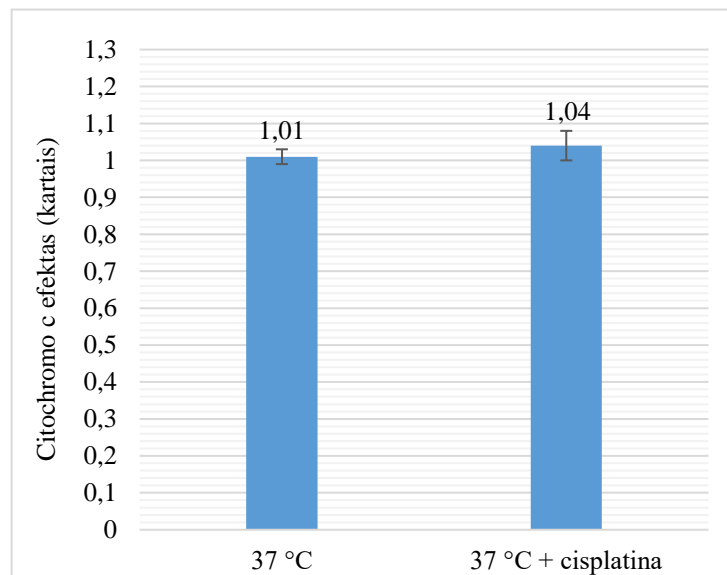


2 pav. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiams *OVCAR-3* vėžinėse ląstelėse, esant 37 °C temperatūrai.

V_0 (glu/mal) – mitochondrijų kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje, pridėjus glutamato, malato ir 8µg/ml digitonino. *VADP(glu/mal)* – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje, pridėjus 1mM ADP. *VADP(succ)* – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje fazėje, pridėjus 15mM sukcinato bei 2µM amitalio. *V(CAT)* – mitochondrijų kvėpavimo greitis ketvirtoje metabolinėje būsenoje, pridėjus 0,75 mM karboksitraktilozido. *V(DNF)* – mitochondrijų kvėpavimo greitis, pridėjus 0,3 mM dinitrofenolio.

5.3. Cisplatinos poveikis mitochondrijų išorinės membranos laidumui (citochromo c) efektui kiaušidžių *OVCA-3* vėžinėse ląstelėse, esant 37°C

Tam, kad būtų įvertinta, ar cisplatina paveikia mitochondrijų išorinės membranos laidumą, buvo atliekamas citochromo c efekto testas. Citochromas c buvo pridamas į terpę, mitochondrijoms esant trečioje metabolinėje būsenoje. Jei pridėjus citochromo c mitochondrijų kvėpavimo greitis stimuliuojamas, tai parodo mitochondrijų išorinės membranos pažeidimą. (3 pav.)

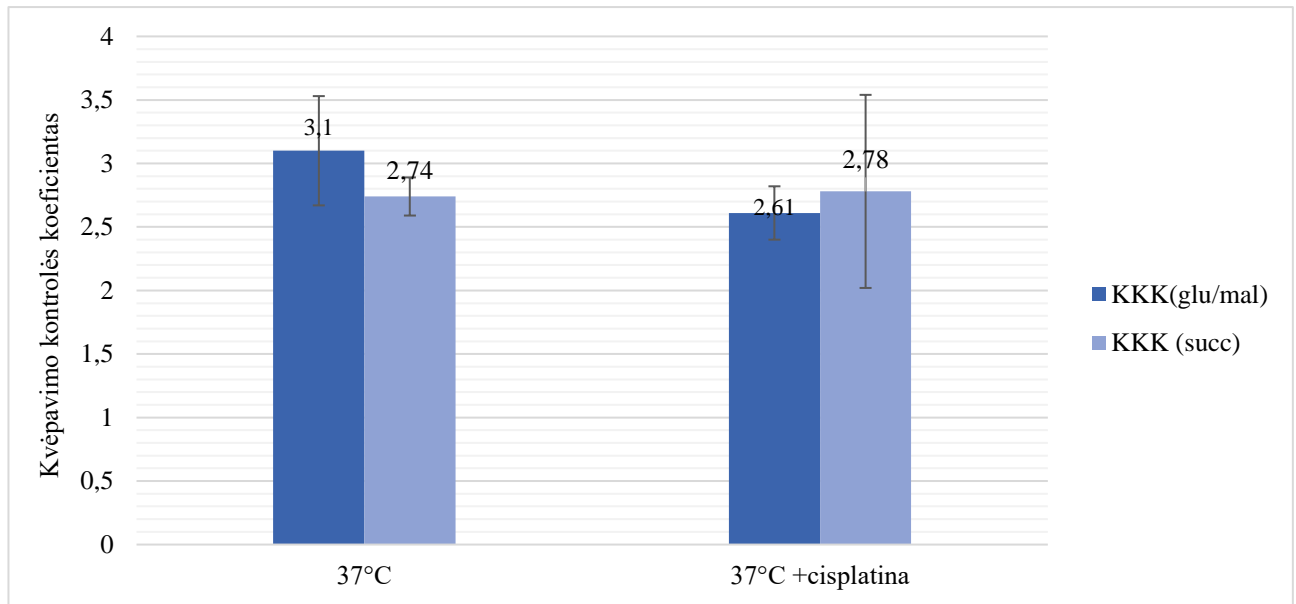


3 pav. Cisplatinos poveikis citochromo c efektui *OVCA-3* kiaušidžių vėžinėse ląstelėse.

Rezultatai parodė (3 pav.), kad citochromo c efektas kontrolinėje grupėje (be cisplatinos) buvo $1,01 \pm 0,02$, o ląstelėse paveiktose cisplatina citochromo c efektas buvo $1,04 \pm 0,02$. Taigi, rezultatai rodo, kad cisplatina neveikė mitochondrijų išorinės membranos laidumo, kadangi abiejose grupėse citochromo c efektas buvo panašus.

5.4. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui *OVCA-3* kiaušidžių vėžinėse ląstelėse

Tyrimo metu buvo įvertintas cisplatinos poveikis (esant 37°C) mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui (KKK) *OVCA-3* vėžinėse ląstelėse. Oksiduoiant glutamatą ir malatą kvėpavimo kontrolės koeficientas, paveikus cisplatina sumažėjo 18,8% (nors statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo), o oksiduoiant sukcinatą kvėpavimo kontrolės koeficientas nesikeitė (4pav.).

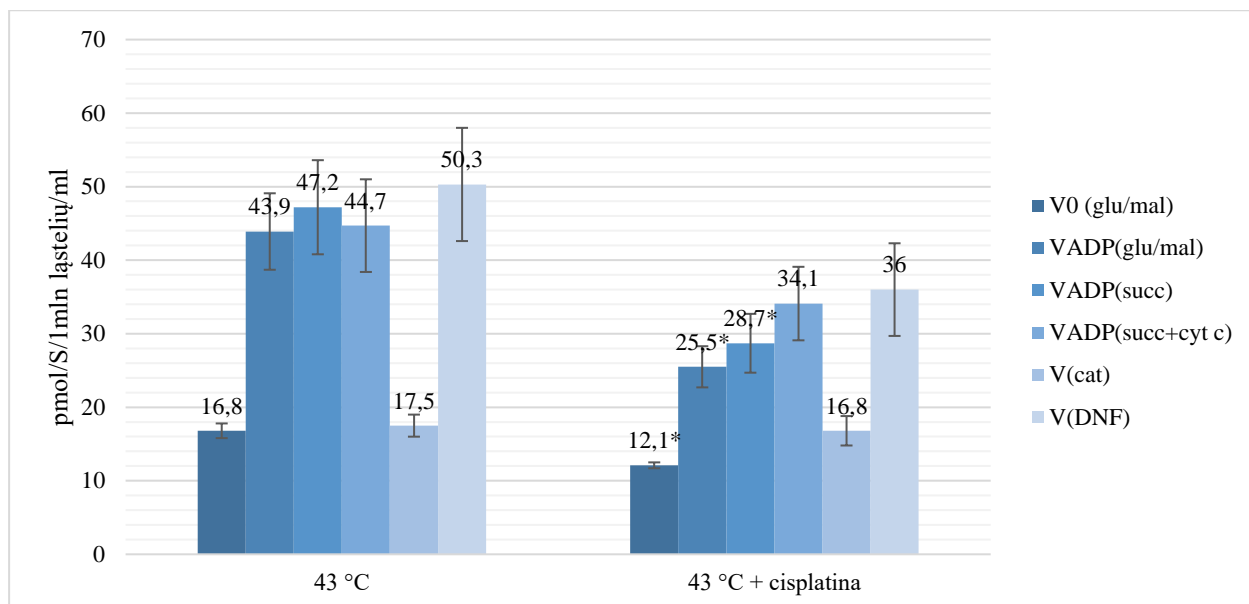


4 pav. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui (KKK), esant 37°C.

5.5. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiams *OVCAR-3* kiaušidžių vėžinėse ląstelėse, hipertermijos (43 °C) sąlygomis

Tolimesniuose tyrimuose ištyrėme cisplatinos poveikį esant 43°C. Nustatyta, kad cisplatiną mitochondrijų kvėpavimo greitį antroje metabolinėje būsenoje (V_0) slopino 29%. Tai statistiškai reikšmingas rezultatas ($p < 0,05$) (5 pav.) Mitochondrijų kvėpavimo greitis trečiojoje metabolinėje būsenoje (V_{ADP}), pridėjus ADP, ženkliai sumažėjo (42%) ($p < 0,02$), toje pačioje metabolinėje būsenoje, oksiduojant sukcinatą kvėpavimo greitis kiaušidžių vėžinėse ląstelėse sumažėjo (61%) ($p < 0,05$), tai yra statistiškai reikšmingas skirtumas (5 pav.).

Be to, pridėjus citochromo c, buvo stebimas mitochondrijų kvėpavimo greičio trečioje metabolinėje būsenoje stimuliavimas 1,19 karto, nuo 28,7 pmol/S/1mln ląstelių iki 34,1 pmol/S/1 mol ląstelių. Tai rodo jog cisplatiną padidino mitochondrijų išorinės membranos pažeidimą. Mitochondrijų kvėpavimo greitis ketvirtoje metabolinėje būsenoje $V_{(CAT)}$ išliko panašus tiek grupėje paveiktoje cisplatiną, tiek be jos. Taigi, cisplatiną kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* mitochondrijų vidinės membranos laidumui poveikio neturėjo (5pav).



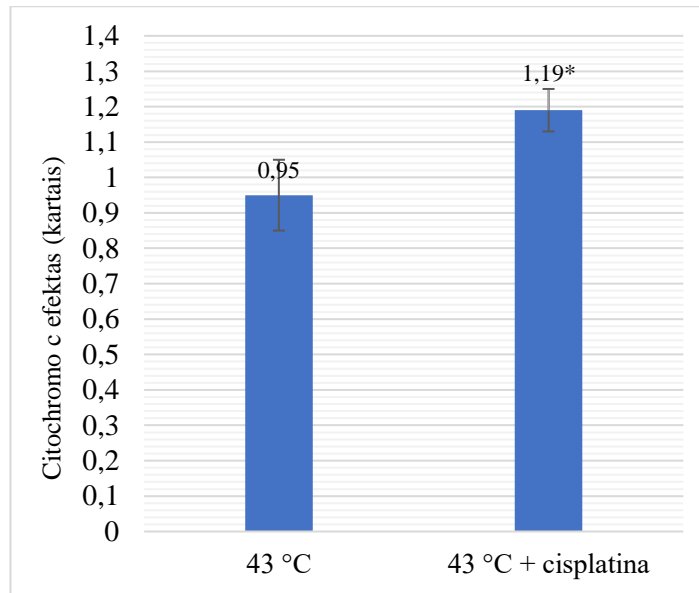
5 pav. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiams *OVCAR-3* vėžinėse ląstelėse, esant 43°C temperatūrai.

* $p < 0,05$, lyginant su kontroline grupe

V0(glu/mal) – mitochondrijų kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje, pridėjus glutamato, malato ir 8 μ g/ml digitonino. *VADP(glu/mal)* – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje, pridėjus 1mM ADP. *VADP(succ)* – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje, pridėjus 15mM sukcinato bei 2mM amitalio. *V(cat)* – mitochondrijų kvėpavimo greitis ketvirtoje metabolinėje būsenoje, pridėjus 0,75 mM karboksitraktilozido. *V(DNF)* – mitochondrijų kvėpavimo greitis, pridėjus 0,3mM dinitrofenolio.

5.6. Cisplatinos poveikis citochromo c efektui kiaušidžių *OVCAR-3* vėžinėse ląstelėse, esant 43°C

Ištirtas cisplatinos poveikis citochromo c efektui, ląsteles paveikus hipertermija (43°C) ir 43°C + cisplatiną. Ląsteles paveikus tik 43°C temperatūra citochromo c efektas $0,95 \pm 0,1$, o taikant hipertermijos ir cisplatinos derinį citochromo c efektas siekė $1,19 \pm 0,06$ karto (6 pav.). Lyginant šiuos du rezultatus, galime teigti kad efektas padidėjo net 25%, tai rodo cisplatinos poveikyje įvykusią mitochondrijų išorinės membranos pažeidimą. Šis rezultatas yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$). Rezultatai pateikti 6 pav.

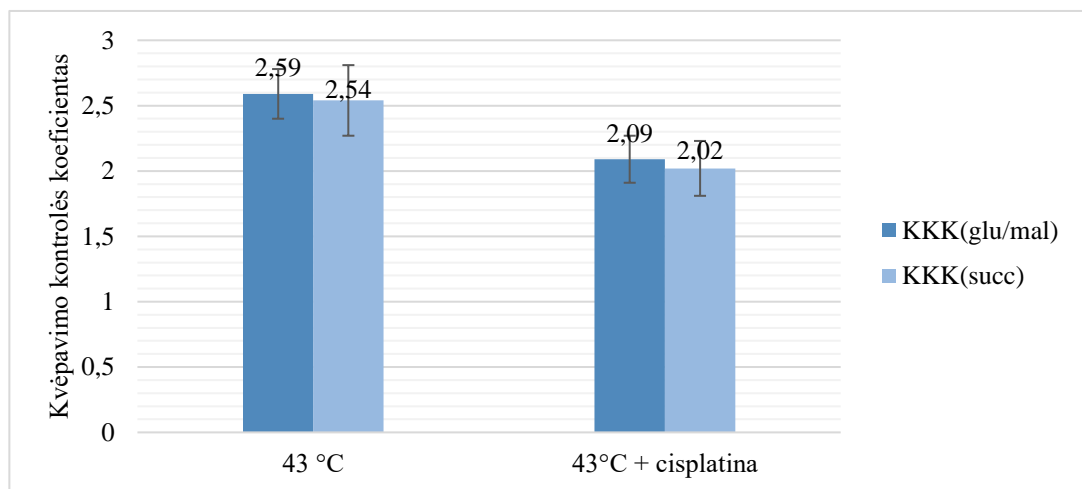


6 pav. Cisplatinos poveikis citochromo c efektui OVCAR-3 kiaušidžių vėžinėse ląstelėse.

* $p < 0,05$, lyginant su 43°C

5.7. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui OVCAR-3 kiaušidžių vėžinėse ląstelėse, esant 43°C

Tyrimo eigoje įvertintas cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui, esant 43°C, t.y. hipertermijos sąlygomis. Oksiduojant glutamatą ir malatą kvėpavimo kontrolės koeficientas sumažėjo 19 % (t.y. nuo 2,59 iki 2,09). Oksiduojant sukcinatą kvėpavimo kontrolės koeficientas sumažėjo 20 % (t.y. nuo 2,54 iki 2,02), nors statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo. Rezultatai pateikti 7 pav.



7 pav. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui (KKK), esant 43°C

Apibendrinami cisplatinos poveikį hipertermijos sąlygomis, galime teigti, kad ląsteles paveikus cisplatina, mitochondrijų kvėpavimo funkcijos ir kokybė blogėja. Tai rodo ne tik mitochondrijų

kvėpavimo greičių (oksiduojant glutamatą ir malatą bei sukcinatą) sulėtėjimas, bet ir kvėpavimo kontrolės koeficiento sumažėjimas ir mitochondrijų išorinės membranos pažeidimas.

5.8. Cisplatinos ir hipertermijos poveikis (43°C) derinio poveikis kiaušidžių vėžinių ląstelių OVCAR-3 mitochondrijų kvėpavimo greičiams

Norint įvertinti ar hipertermijos ir cisplatinos derinys turi poveikį mitochondrijų funkcijoms, palyginome mitochondrijų kvėpavimo greičius 37°C (kontrolinė grupė) ir hipertermijos sąlygomis (43°C). Pirmiausia buvo palyginta hipertermijos (43°C) poveikis mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms kiaušidžių vėžinėse ląstelėse OVCAR-3. Nustatyta, kad temperatūros pakėlimas poveikio mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms neturėjo. Mitochondrijų kvėpavimo greičiai tiek oksiduojant glutamatą/malatą, tiek sukcinatą išliko panašūs kaip ir kontrolinėje grupėje (esant 37°C) (1 lentelė).

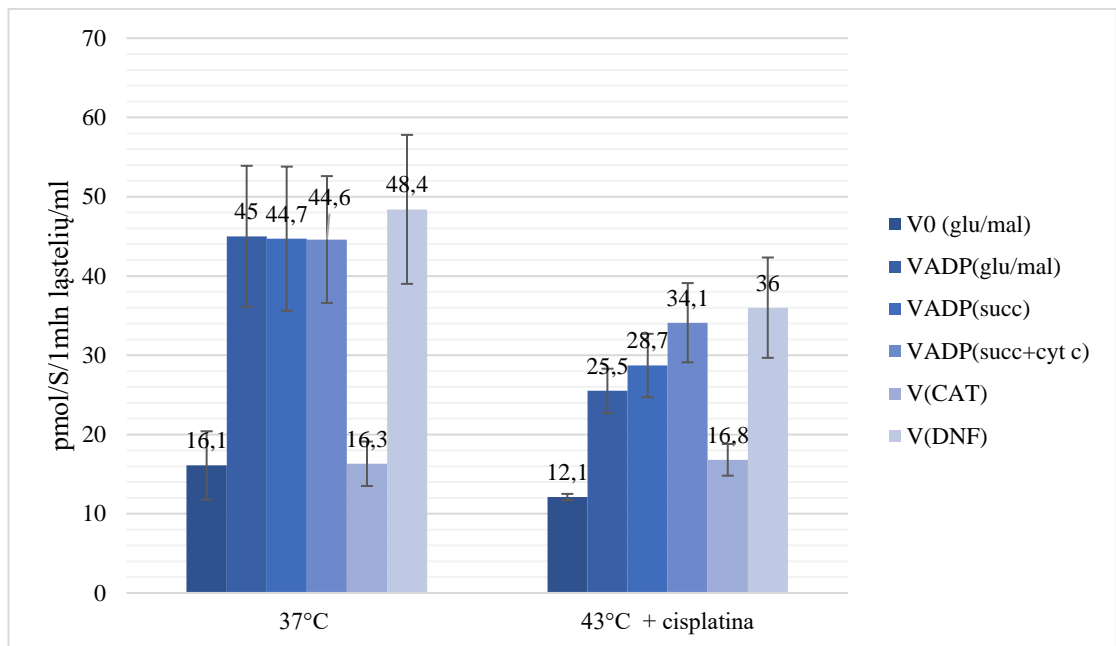
1 lentelė. Hipertermijos įtaka kiaušidžių vėžinių ląstelių OVCAR-3 mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms.

	37°C	43°C
V_o (Glu/mal)	16,1 ± 4,3	16,8 ± 1,0
V_{ADP} (Glu/mal)	45,8 ± 8,9	43,9 ± 5,2
V_{ADP} (Succ)	44,7 ± 9,1	47,2 ± 6,4
V_{ADP} (Succ)+Cyt c	44,6 ± 8,0	44,7 ± 6,3
V_{CAT}	16,3 ± 2,8	17,5 ± 1,5
V_{DNF}	48,4 ± 9,4	50,3 ± 7,7

V_o (glu/mal) – mitochondrijų kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje, pridėjus glutamato, malato ir 8µg/ml digitonino. V_{ADP} (glu/mal) – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje, pridėjus 1mM ADP. V_{ADP} (succ) – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje, pridėjus 15mM sukcinato bei 2µM amitalio. $V(CAT)$ – mitochondrijų kvėpavimo greitis ketvirtoje metabolinėje būsenoje, pridėjus 0,75 mM karboksitraktilozido. $V(DNF)$ – mitochondrijų kvėpavimo greitis, pridėjus 0,3 mM dinitrofenolio.

Vėliau įvertintas cisplatinos ir hipertermijos derinio poveikis mitochondrijų funkcijoms ir nustatyta, kad mitochondrijų kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje (V_o), lyginant su kontroline grupe, oksiduojant glutamatą bei malatą sumažėjo 24%. Kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje (V_{ADP}), pridėjus ADP taip pat buvo ženkliai slopinamas (43%) (8 pav.). Toje pačioje mitochondrijų metabolinėje būsenoje, oksiduojant sukcinatą mitochondrijų kvėpavimo greitis

sulėtėjo 36% (8 pav.). Pridėjus citochromo c, kvėpavimo greitis buvo stimuliuojamas 17% (dėl mitochondrijų išorinės membranos pažeidimo), bet lyginant su kontroline grupe išliko 24 % mažesnis ir citochromas c neatstatė mitochondrijų kvėpavimo greičio iki kontrolės lygio. Tai rodo, kad mitochondrijų funkcijos cisplatinos ir hipertermijos poveikyje blogėja ne tik dėl citochromo c efekto trūkumo, bet ir dėl mitochondrijų kvėpavimo grandinės pažeidimo. Ketvirtoje mitochondrijų metabolinėje būsenoje (V_{CAT}) mitochondrijų kvėpavimo greitis nesikeitė (tai rodo, kad hipertermijos ir cisplatinos derinys neveikė mitochondrijų vidinės membranos pralaidumo). Pridėjus dinitrofenolio mitochondrijų kvėpavimo greitis V_{DNF} buvo 26 % lėtesnis nei kontrolinėje grupėje, tai rodo, kad mitochondrijų pažeidimas gali būti dėl mitochondrijų sistemos fosforilinimo slopinimo. Rezultatai pateikti 8 pav.

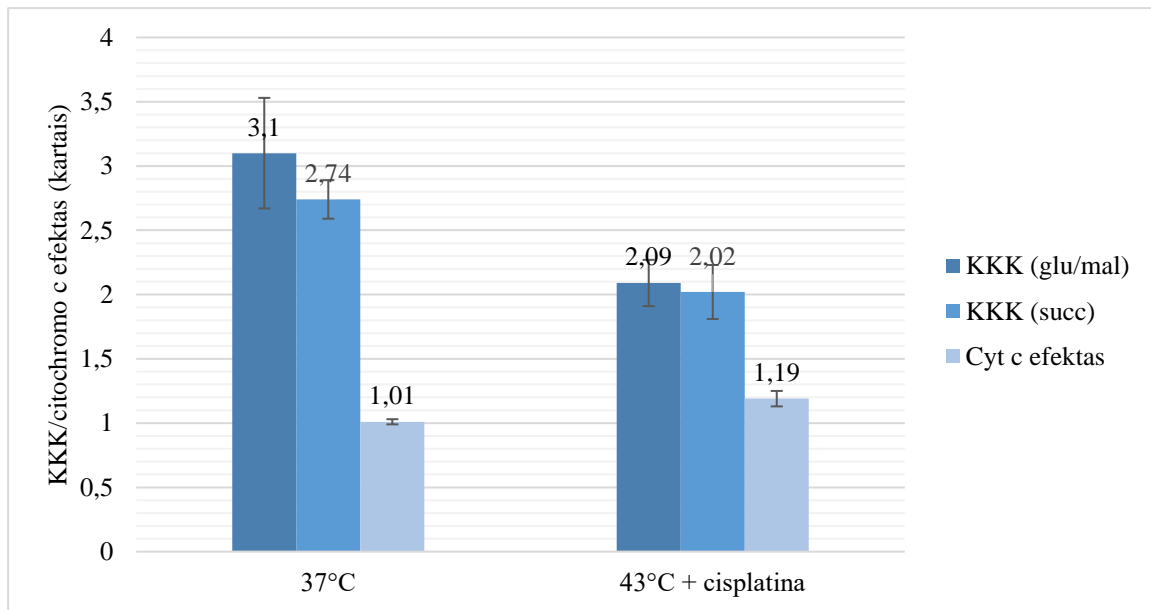


8 pav. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiams OVCAR-3 vėžinėse ląstelėse, esant 43 °C temperatūrai.

V_0 (glu/mal) – mitochondrijų kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje, pridėjus glutamato, malato ir 8μg/ml digitonino. $VADP$ (glu/mal) – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje, pridėjus 1mM ADP. $VADP$ (succ) – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje, pridėjus 15mM sukcinato bei 2mM amitalio. V (CAT) – mitochondrijų kvėpavimo greitis ketvirtoje metabolinėje būsenoje, pridėjus 0,75mM karboksitraktilozido. V (DNF) – mitochondrijų kvėpavimo greitis pridėjus 0,3mM dinitrofenolio.

5.9. Cisplatinos ir hipertermijos (43°C) derinio poveikis kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui ir citochromo c efektui

Tyrimo metu buvo įvertintas cisplatinos ir hipertermijos derinio poveikis poveikis mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientui, oksiduojant glutamatą, malatą ir sukcinatą bei atliktas citochromo c testas.



9 pav. Cisplatinos ir hipertermijos (43°C) derinio poveikis mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientams ir citochromo c efektui.

Rezultatai parodė, kad lyginant kontrolinę grupę (37°C) su ląstelių linijomis, kurios paveiktos cisplatinos ir hipertermijos deriniu mitochondrijų, kvėpavimo kontrolės koeficientas, oksiduojant gultamatą ir malatą sumažėjo 31%, (t.y nuo 3,1 iki 2,09) (9 pav.), o oksiduojant sukcinatą kvėpavimo kontrolės koefientas sumažėjo 26% (nuo 2,74 iki 1,19), o citochromo c efektas padidėjo 19%. Citochromo c efekto padidėjimas rodo mitochondrijų išorinės membranos pažeidimą.

Apibendrinandami visus rezultatus, galime teigti, jog hipertermijos ir cisplatinos derinys turi poveikį mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms, t.y mažina mitochondrijų kvėpavimo greičius, blogina mitochondrijų kokybę ir didina mitochondrijų išorinės membranos pažeidimą. Mūsų rezultatai rodo, kad Cisplatinos ir hipertermijos derinys yra efektyvesnis nei ląstelių gydymas vien tik cisplatiną.

6. REZULTATŲ APTARIMAS

Cisplatina yra vienas dažniausiai skiriamų citotoksinių vaistų vėžio gydyme. Daugelis atliktų mokslinių tyrimų įrodė cisplatinos terapinį efektyvumą, tačiau informacija apie sinergistinę cisplatinos ir hipertermijos poveikį vėžio gydyme išlieka prieštaringa arba mokslinės informacijos nėra daug [41]. Nėra pakankamai duomenų ir apie cisplatinos bei cisplatinos ir hipertermijos derinio poveikį kiaušidžių vėžinių ląstelių mitochondrijų endogeniniam kvėpavimui ar mitochondrijų kvėpavimo greičiams skirtingose metabolinėse būsenose, t.y. ląstelių metaboliniam aktyvumui. Taip pat trūksta informacijos apie cisplatinos poveikį mitochondrijų vidinės ir išorinės membranos pralaidumui OVCAR-3 vėžinėse ląstelėse.

Šiame darbe atlikome tyrimą *in vitro* naudodami kiaušidžių vėžines ląsteles OVCAR-3, kurio metu matavome mitochondrijų kvėpavimo greičius įvairiose metabolinėse būsenose ir lyginome rezultatus tarp paveiktų ir nepaveiktų cisplatiną ląstelių, esant 37°C ir 43°C bei stebėjome mitochondrijų funkcinę būklę, esant 43°C temperatūrai.

Atlikto tyrimo metu nustatyta, kad cisplatina slopino kiaušidžių vėžinių ląstelių OVCAR-3 mitochondrijų endogeninį kvėpavimo greitį tiek 37°C, tiek hipertermijos sąlygomis (esant 43°C). Įvertinus cisplatinos poveikį mitochondrijų kvėpavimo greičiams, nustatėme, kad cisplatinos (esant normotermijai ir hipertermijai) poveikyje slopinamas mitochondrijų kvėpavimo greitis, oksiduojant mitochondrijų kvėpavimo grandinės pirmojo kompleksą substratą glutamatą/malatą. Taip pat nustatyta, kad cisplatina normotermijos ir hipertermijos sąlygomis slopino OVCAR-3 vėžinių ląstelių mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientą (KKK) oksiduojant glutamatą ir malatą.

Įdomu tai, kad sukcinato oksidacija cisplatinos poveikyje normotermijos (37°C) sąlygomis neslopinama, o tuo tarpu paveikus temperatūra iki 43°C jau slopinama ne tik mitochondrijų kvėpavimo grandinės pirmojo kompleksą glutamato/malato bet ir antrojo mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksą sukcinato oksidacija bei mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientas. Sukcinato oksidacijai normotermijos sąlygomis cisplatina poveikio neturėjo. Rezultatai taip pat rodo, kad norint efektyviau užslopinti mitochondrijų funkcijas OVCAR-3 vėžinėse ląstelėse, temperatūrą reikia pakelti iki 43°C. Nustatyta, kad sukcinato oksidacija (sukcinatas - mitochondrijų kvėpavimo grandinės antrojo kompleksą substratas) yra mažiau jautri cisplatinos poveikiui. Tai svarbu aiškinantis cisplatinos veikimo mechanizmą.

Eksperimento metu buvo stebimas cisplatinos ir hipertermijos poveikis citochromo c efektui. Šis parametras buvo analizuojamas, kad įvertintume mitochondrijų išorinės membranos pažeidimą cisplatinos ir/ar hipertermijos poveikyje. Citochromo c efektas OVCAR-3, esant 37°C išliko panašus tiek paveikus, tiek nepaveikus cisplatiną. Esant 43°C citochromo c efektas cisplatinos poveikyje padidėjo 25%. Tai rodo, kad šis intraperitoninis preparatas sukėlė mitochondrijų išorinės membranos pažeidimą.

Aktualu paminėti, kad *S. Trumbeckaitės* ir mokslininių bendradarbių atliktuose tyrimuose, cisplatinos ir hipertermijos derinys neturėjo poveikio mitochondrijų išorinės membranos pažaidai CaCo-2 (storosios žarnos), tačiau veikė skrandžio (AGS) ir kasos (T3M4) vėžines ląsteles [42].

Tyrimo metu tyrėme ar cisplatinos ir hipertermijos derinys dar labiau pažeistų mitochondrijų kvėpavimo funkcijas lyginant su normotermine grupe (37°C). Nustatėme, kad pakėlus temperatūrą iki 43°C ir papildomai ląsteles paveikus cisplatiną mitochondrijų kvėpavimo funkcijos dar labiau slopinamos. Endogeninis mitochondrijų kvėpavimo greitis sulėtėjo 45%, mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje, oksiduojant sukcinatą sulėtėjo net 44% (lyginant normotermijos sąlygomis tik 22%). Sukcinato oksidacija buvo slopinama taikant hipertermijos ir cisplatinos derinį net 40%, o tuo tarpu normotermijos sąlygomis nebuvo veikiamas. Hipertermijos ir cisplatinos poveikyje buvo slopinamas ir mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientas oksiduojant tiek glutamatą/malatą (32%), tiek sukcinatą (26%). Normotermijos sąlygomis glutamato/malato oksidacija buvo slopinama 16%, t.y. dviem kartais mažiau, o sukcinato oksidacija normotermijos sąlygomis buvo visai nesulopinama. Įdomu pažymėti ir tai, kad nei cisplatiną, nei hipertermiją nedidino mitochondrijų vidinės membranos intaktiškumo, tuo tarpu mitochondrijų išorinės membranos pažaidą didino cisplatiną, kai temperatūra siekė 43°C arba kai ląstelės buvo paveiktos hipertermijos ir cisplatinos deriniu. Mūsų gauti rezultatai rodo cisplatinos ir hipertermijos derinio efektyvumą.

Palyginti šio tyrimo metu gautus rezultatus, tiriant cisplatinos ir hipertermijos poveikį mitochondrijų metabolizmo lygmenyje *OVCAR-3* vėžinėse ląstelėse su kitų autorių darbais negalime, kadangi tokių tyrimų nėra. Tokio pobūdžio tyrimai *in vitro*, imituojant hipertermijos ir cisplatinos poveikį kiaušidžių vėžinių ląstelių *OVCAR-3* energetikai yra pirmieji.

Panašaus pobūdžio darbai atliekami Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biochemijos laboratorijoje. Šiuose darbuose nustatyta, kad cisplatiną didina mitochondrijų kvėpavimo greitį antroje metabolinėje būsenoje ir slopina oksidacinį fosforilinimą CaCo-2, AGS ir T3M4 ląstelėse [42]. Didžiausias efektas nustatytas skrandžio ir kasos vėžinėmis ląstelėmis.

Mūsų tyrimai parodė, kad vienos hipertermijos taikymas neturi poveikio *OVCAR-3* ląstelių energetikai. Mokslininkų LSMU Biochemijos laboratorijose atlikti eksperimentai, parodė, kad ne visos vėžinės ląstelės reaguoja į hipertermijos poveikį [42].

Šio tyrimo metu taip pat įvertinome vien tik hipertermijos poveikį *OVCAR-3* ląstelėms ir nustatėme, kad temperatūros pakėlimas iki 43°C šiose vėžinėse ląstelėse mitochondrijų funkcijų neveikė, mūsų universiteto mokslininkai nustatė, kad temperatūros pakėlimas (hipertermija) neturėjo poveikio mitochondrijų kvėpavimo greičiams CaCo-2, T3M4 vėžinėms ląstelėms. Tuo tarpu AGS (skrandžio) vėžinėse ląstelėse hipertermija padidino mitochondrijų kvėpavimo greitį antroje

metabolinėje būsenoje ir slopino mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientą oksiduojant glutamatą ir malatą. Cisplatina didino mitochondrijų vidinės membranos pralaidumą ir slopino oksidacinį fosforilinimą $\text{CaCo} - 2$, AGS, T3M4 vėžinėse ląstelėse. Hipertermijos ir cisplatinos derinys nesustiprino cisplatinos sąlygoto poveikio nei storosios, nei skrandžio, nei kasos vėžinėse ląstelėse. Tuo tarpu mūsų tyrimai, naudojant kiaušidžių vėžines ląsteles rodo hipertermijos ir cisplatinos sinergistinį poveikį.

Įdomu paminėti ir tai, kad ir kiti mokslininkai *Custodio, 2009 m.* [45] tirdami cisplatinos poveikį mitochondrijoms, nustatė, kad cisplatina stimuliuoja mitochondrijų kvėpavimo greitį antroje ir ketvirtoje metabolinėje būsenose žiurkių kepenų mitochondrijose. Tai rodo, kad cisplatina didina vidinės mitochondrijų membranos pralaidumą, mažina mitochondrijų membranos potencialą bei mažina mitochondrijų kvėpavimo kontrolės koeficientą. Ištyrus kiaušidžių vėžines ląsteles *OVCAR-3*, galime teigti, kad cisplatina nedidina mitochondrijų vidinės membranos pralaidumo, o tik slopina mitochondrijų kvėpavimo greitį trečioje metabolinėje būsenoje dėl mitochondrijų oksidacinio fosforilinio proceso pažaidos. Tam reikalingi tolimesni tyrimai.

Apibendrinami gautus rezultatus, galime teigti, kad cisplatinos ir hipertermijos poveikis ląstelių energetikai priklauso nuo vėžinių ląstelių rūšies. Kadangi tyrimų susijusių su kiaušidžių vėžinių ląstelių funkcijoms nėra, tolimesni tyrimai reikalingi gilesniam šio poveikio mechanizmo ištyrimui. Mūsų gauti rezultatai yra nauji ir turi praktinę reikšmę siekiant pritaikyti ir įrodyti hipertermijos ir cisplatinos derinio efektyvumo naudą onkologinių ligų terapijoje.

7. IŠVADOS

1. Cisplatina esant 37°C ir 43°C slopino mitochondrijų kvėpavimo funkcijas visose metabolinėse būsenose, oksiduojant glutamatą/malatą. Sukcinato oksidacija cisplatinos poveikyje buvo slopinama tik hipertermijos sąlygomis, esant 43°C. Vien tik hipertermijos (43°C) taikymas poveikio mitochondrijų kvėpavimo greičiams *OVCAR-3* vėžinėse ląstelėse neturėjo.
2. Cisplatina neveikė mitochondrijų vidinės membranos pralaidumo nei oksiduojant glutamatą/malatą, nei sukcinatą, tačiau padidino išorinės mitochondrijų membranos pralaidumą hipertermijos (43°C) sąlygomis. Hipertermija neturėjo poveikio nei vidinės, nei išorinės mitochondrijų membranos pralaidumui.
3. Cisplatinos ir hipertermijos (43°C) derinys sustiprino slopinantį poveikį mitochondrijų kvėpavimo greičiams tiek oksiduojant glutamatą/malatą, tiek sukcinatą. Taikant cisplatinos ir hipertermijos (43°C) derinį, nustatyta mitochondrijų išorinės membranos pažeida *OVCAR-3* kiaušidžių vėžinėse ląstelėse. Šie duomenys parodė sinergistinį cisplatinos ir hipertermijos poveikį mitochondrijų kvėpavimo funkcijoms.

8. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Tyrimuose *in vitro* nustatyta, kad cisplatinos ir hipertermijos derinys turi sinergistinį poveikį, t.y slopina mitochondrijų kvėpavimo funkcijas ir mažina energijos gamybą *OVCAR-3* kiaušidžių ląstelėse. Derinant chemoterapinį cisplatinos preparatą kartu su hipertermija galimas sinergistinis poveikis kiaušidžių vėžinių ląstelių gydyme.

Remiantis tyrimo metu gautais rezultatais, rekomenduojame papildomai atlikti tolimesnius tyrimus *in vitro* su kitų tipų vėžinėmis ląstelėmis, jas tirti platesniame hipertermijos diapozone.

9. LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Karst, Alison M., and Ronny Drapkin. "Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution." *Journal of oncology* 2010.
2. Kurman, Robert J., and Ie-Ming Shih. "The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer- a proposed unifying theory." *The American journal of surgical pathology* 34.3 (2010): 433.
3. Lietuvos higienos institutas. Internetinė prieiga: <http://www.hi.lt/> Žiūrėta: 2018-08-26; 2019-02-01
4. Jayson, Gordon C., et al. "Ovarian cancer." *The Lancet* 384.9951 (2014): 1376-1388.
5. Internetinė prieiga: Cancer Research UK. Types of ovarian cancer. Peržiūrėta 2018.12.20 <http://www.cancerhelp.org.uk/type/ovarian-cancer/about/types-of-ovarian-cancer>
6. Roett MA, Evans P. *American Academy of Family Physicians* (2009). 80(6):609-616
7. Badgwell D, Bast RC. *Markers* 2007;23:397–410
8. Hennessy, Bryan T., Robert L. Coleman, and Maurie Markman. "Ovarian cancer." *The lancet* 374.9698 (2009): 1371-1382.
9. Gubbels, Jennifer AA, et al. "The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer." *Journal of ovarian research* 3.1 (2010):8.
10. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2011;31(15):1869-1883.
11. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014;740:364-378.
12. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research*. 2016;106:27-36.
13. Muggia, Franco. "Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer." *Gynecologic oncology* 112.1 (2009): 275-281.
14. Chen, Xin Jie, and Ronald A. Butow. "The organization and inheritance of the mitochondrial genome." *Nature Reviews Genetics* 6.11 (2005): 815.
15. Panov, Alexander, et al. "Species-and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292.2 (2007): C708-C718.
16. Man, J., Shoemake, J.D., Ma, T., et al., 2015. Hyperthermia sensitizes glioma stem-like cells to radiation by inhibiting AKT signaling. *Cancer Res*. 28
17. Cooper G.M. *Mitochondria, The Cell*, 2nd edition. A molecular Approach, 2000
18. Mitochondria and the art of DNA maintenance. Internetinė prieiga: <https://phys.org/news/2018-05-mitochondria-art-dna-maintenance.html>

19. Vafai, Scott B., and Vamsi K. Mootha. "Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle." *Nature* 491.7424 (2012): 374.
20. Nakamaru-Ogiso E, Han H, Matsuno-Yagi A, Keinan E, Sinha SC, Yagi T, Ohnishi T. (January 2010). "The ND2 subunit is labeled by a photoaffinity analogue of asimicin, a potent complex I inhibitor."
21. Kadziauskas J. Biochemijos pagrindai. Vilnius. Vilniaus universitetas; 2012. [428-435]
22. Osellame, Laura D., Thomas S. Blacker, and Michael R. Duchon. "Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function." *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 26.6 (2012): 711-723.
23. Internetinė prieiga: <https://www.standardmedia.co.ke/evewoman/article/2001300532/testing-for-ovarian-cancer-how-ovarian-cancer-is-diagnosed> (peržiūrėta 2018.12.13)
24. Van der Laan M, Horvath S, Pfanner N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Current Opinion in Cell Biology*. 2016;41:33-42.
25. Wainer G, Djafarzadeh R. DEVS modelling and simulation of the cellular metabolism by mitochondria. *Molecular Simulation*. 2010;36(12):907-928.
26. Burchardt, Ewa, and Andrzej Roszak. "Hyperthermia in cervical cancer—current status." *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* (2018).
27. Issels R. Hyperthermia adds to chemotherapy. *European Journal of Cancer*. 2008;44(17):2546-2554.
28. Halperin, E.C., Perez, C.A., Brady, L.W., 2008. Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
29. Hatakeyama, Hiroto, et al. "Role of CTGF in sensitivity to hyperthermia in ovarian and uterine cancers." *Cell reports* 17.6 (2016): 1621-1631.
30. European Pharmacopoeia, 7th edition. Strasbourg: European Commission.
32. Internetinė prieiga: http://www.mitophysiology.org/index.php/oroboros_instruments (peržiūrėta 2019.02.02)
33. Galluzzi, L., et al. "Molecular mechanisms of cisplatin resistance." *Oncogene* 31.15 (2012): 1869.
34. Wisnovsky S, Wilson J, Radford R, Pereira M, Chan M, Laposa R et al. Targeting Mitochondrial DNA with a Platinum-Based Anticancer Agent. *Chemistry & Biology*. 2013;20(11):1323-1328.
35. Internetinė prieiga: https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_transport_chain#/media/File:Mitochondrial_electron_transport_chain%E2%80%944.svg (peržiūrėta:2019.02.26)
36. Yuen, W. F., et al. "Hyperthermia and tumour necrosis factor- α induced apoptosis via mitochondrial damage." *Life Sciences* 67.6 (2000): 725-732.

37. Cardol, Pierre, et al. "Oxidative phosphorylation: building blocks and related components." *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, 2009. 469-502.
38. González-Moreno, Santiago, Luis A. González-Bayón, and Gloria Ortega-Pérez. "Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Rationale and technique." *World journal of gastrointestinal oncology* 2.2 (2010): 68.
39. Shen, Ding-Wu, et al. "Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes." *Pharmacological reviews* 64.3 (2012): 706-721.
40. Siddik, Zahid H. "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance." *Oncogene* 22.47 (2003): 7265.
41. Jin, L., G. N. Alesi, and S. Kang. "Glutaminolysis as a target for cancer therapy." *Oncogene* 35.28 (2016): 3619.
42. Trumbeckaite, Sonata, et al. "Different mitochondrial response to cisplatin and hyperthermia treatment in human AGS, Caco-2 and T3M4 cancer cell lines." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 50.5 (2018): 329-338.
43. Zukiene R, Nauciene Z, et al. „Acute temperature resistance threshold in heart mitochondria: Febrile temperature activates function but exceeding it collapses the membrane barrier Int J Hyperthermia“ (2010) 26:56-66.
44. Jarmuszkiewicz, Wieslawa, et al. "Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria." *Free Radical Biology and Medicine* 83 (2015): 12-20.
45. Custódio, José BA, et al. "Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: prevention by thiol group protecting agents." *Toxicology* 259.1-2 (2009)
46. Ortega-Domínguez, Bibiana, et al. "Curcumin prevents cisplatin-induced renal alterations in mitochondrial bioenergetics and dynamic." *Food and Chemical Toxicology* 107 (2017): 373-385.