



VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS

GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS

BIOLOGIJOS KATEDRA

Sandra Ivanauskienė

**CITOPROTEKCINIO KARŠČIO INDUKUOJAMO BALTYMO
HEMOKSIGENAZĖS-1 RAIŠKOS POKYČIŲ VERTINIMAS SKIRTINGOMIS
HIPERTERMINĖS CHEMOTERAPIJOS SĄLYGOMIS KASOS
ADENOKARCINOMOS LĄSTELĖSE T3M4**

Magistro baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos ir biotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621C71001

Molekulinės biologijos, biofizikos ir biochemijos studijų kryptis

Vadovas (-ė) Prof. dr. Žilvinas Dambrauskas _____
(Moksl. Laipsnis, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Apginta Doc. dr. Saulius Mickevičius _____
(Fakulteto/studijų instituto dekanas/direktorius) (Parašas) (Data)

Kaunas, 2017

Darbas atliktas: 2016 – 2017 m. Lietuvos sveikatos mokslų universitete, Virškinimo sistemos tyrimų institute, Chirurginės gastroenterologijos laboratorijoje.

Recenzentas (-ė): Daiva Ambrasienė

Darbas ginamas: viešame magistrų darbų gynimo komisijos posėdyje 2017 metų gegužės 22 d. Vytauto Didžiojo universitete, Biologijos katedroje, 801 auditorijoje. Adresas: Vileikos 8, Kaunas 44404, Lietuva.

Protokolo Nr. _____

Darbo vykdytojas: Sandra Ivanauskienė

(Parašas)

Mokslinio darbo vadovas: Prof. dr. Žilvinas Dambrauskas

(Parašas)

Katedra, atsakinga už magistro darbo parengimą: Biologijos katedra

Katedros vedėjas: Prof. habil. dr. Algimantas Paulauskas

(Parašas)

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovui prof. dr. Žilvinui Dambrauskui už galimybę atlikti magistro baigiamąjį darbą LSMU Virškinimo sistemos tyrimų instituto Chirurginės gastroenterologijos laboratorijoje, puikų vadovavimą ir vertingus patarimus. Esu nuoširdžiai dėkinga laboratorijos vedėjui prof. dr. Antanui Gulbinui ir visam laboratorijos kolektyvui už nuoširdų bendravimą ir palaikymą, ypač jaunajai mokslo darbuotojai dr. Aldonai Jasiukaitienei už suteiktas žinias, naudingus patarimus ir pagalbą atliekant eksperimentus laboratorijoje. Taip pat dėkoju savo šeimai už kantrybę ir palaikymą.

TURINYS

SANTRAUKA	6
ABSTRACT	7
SANTRUMPOS	8
ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Kasos struktūra	11
1.2. Kasos vėžys.....	12
1.2.1. Kasos vėžio rizikos veiksniai ir epidemiologija.....	14
1.2.2. Mirtingumas	15
1.3. Hiperterminė chemoterapija	16
1.3.1. Hiperterminės chemoterapijos poveikis ląstelėms	16
1.3.2. Hiperterminė intraperitoninė chemoterapija (HIPEC)	18
1.4. Hemoksigenazė-1.....	19
1.4.1. HO-1 baltyminė ir genetinė struktūra.....	20
1.4.2. HO-1 ekspresija audiniuose ir viduląstelinė lokalizacija	21
1.4.3. HO-1 reakcijos produktai	22
1.4.3.1. Anglies monoksidas.....	23
1.4.3.2. Geležis ir feritinas.....	24
1.4.3.3. Biliverdinas ir Bilirubinas	24
1.4.4. HO-1 indukcija	25
1.4.5. HO-1 vaidmuo kancerogenezėje	27
1.3.5.1. Vėžio proliferacija	27
1.3.5.2. Citoprotekcija ir apoptozė	27
1.3.5.3. Angiogenezė	28
1.3.5.4. Metastazės	29
1.4.6. HO-1 raiška kasos adenokarcinomos ląstelėse.....	29
1.5. Cisplatina	30
1.6. Kasos adenokarcinomos ląstelių linija T3M4.....	33
2. TYRIMO METODIKA.....	34
2.1. Tyrimo organizavimas	34
2.2. T3M4 ląstelių auginimas	35

2.2.1. T3M4 ląstelių kultivavimas ir skaičiavimas.....	35
2.3. T3M4 ląstelių gyvybingumo pokyčių nustatymas MTT metodu	36
2.4. T3M4 ląstelių morfologinių pokyčių analizė.....	38
2.5. T3M4 ląstelių paveikimas hiperterminė chemoterapija molekuliniams tyrimams	38
2.6. <i>HMOX1</i> geno raiškos tyrimas kRL-PGR metodu.....	39
2.6.1. RNR išskyrimas kolonėlių metodu	39
2.6.2. RNR reversinė transkripcija į kopijinę DNR	39
2.6.3. Kiekybinis tikro laiko PGR.....	40
2.7. HO-1 koncentracijos nustatymas Western blot metodu	42
2.7.1. Baltymų ekstrakcija.....	42
2.7.2. Elektroforezė	42
2.7.3. Perkėlimas ant PVDF membranos	43
2.7.4. Western breeze chromogeninė imunodetekcija.....	43
2.8. Duomenų analizė	43
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	44
3.1 T3M4 ląstelių gyvybingumo pokyčiai hiperterminės chemoterapijos sąlygomis	44
3.2 Hiperterminės chemoterapijos poveikis T3M4 ląstelių morfologijai	46
3.3. <i>HMOX1</i> raiškos pokyčiai.....	48
3.4. HO-1 koncentracija	49
3.5. Rezultatų apibendrinimas	50
IŠVADOS.....	51
REKOMENDACIJOS.....	52
LITERATŪROS SĄRAŠAS	53

SANTRAUKA

Magistro darbo autorius:	Sandra Ivanauskienė
Magistro darbo pavadinimas:	Citoprotekcinio karščio indukuojamo baltymo hemoksigenazės-1 raiškos pokyčių vertinimas skirtingomis hiperterminės chemoterapijos sąlygomis kasos adenokarcinomos ląstelėse T3M4
Vadovas:	Prof. dr. Žilvinas Dambrauskas
Darbas pristatytas:	Vytauto Didžiojo Universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Kaunas, 2017
Puslapių skaičius:	61
Lentelių skaičius:	10
Paveikslų skaičius:	20
Priedų skaičius:	-

Kasos vėžys pasižymi bloga prognoze ir vienu didžiausiu mirštamumu iš visų vėžio tipų. Potencialus gydymo būdas yra po chirurginio naviko pašalinimo taikoma hiperterminė intraperitoninė chemoterapija (HIPEC), tačiau trūksta fundamentinių žinių apie hiperterminės chemoterapijos poveikį skirtingoms vėžinėms ląstelėms ir molekulinis mechanizmus. Nustatyta, kad citoprotekcinio karščio indukuojamas baltymas hemoksigenazė-1 (HO-1) atlieka svarbų vaidmenį kancerogenezėje ir rezistencijos mechanizmuose. HO-1 hiperekspresija nustatyta daugelyje vėžinių audinių ir yra dar labiau indukuojama taikant chemoterapinį ar radioterapinį gydymą.

Šio darbo tikslas buvo pritaikyti skirtingas hiperterminės chemoterapijos sąlygas *in vitro*, ištirti poveikį kasos adenokarcinomos ląstelėms T3M4 ir nustatyti HO-1 raiškos pokyčius. Tyrimo metu ląstelės T3M4 paveiktos skirtinga temperatūra ir cisplatina. Po 48 valandų buvo vertinti T3M4 ląstelių gyvybingumo pokyčiai MTT metodu ir mikroskopu stebėti galimi morfologijos pakitimai. *HMOX1* santykinė RNR raiška buvo nustatyta dviejų etapų kiekybine realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (kRRL-PGR), taikant $\Delta\Delta C_T$ santykinės kiekybinės analizės metodą. Taip pat, kokybiškai įvertinta HO-1 baltymo koncentracija Western blot metodu.

Tyrimo metu nustatyta, kad hipertermijos poveikis T3M4 ląstelių gyvybingumui ir morfologijai nėra aiškus ir neadityvus cisplatinos poveikiui. Atlikto eksperimento sąlygomis hipertermija neindukuoja HO-1 raiškos. Poveikis cisplatina visose tirtose temperatūrose indukuoja *HMOX1* raišką 4, 46 – 7,45 karto ir padidina HO-1 koncentraciją, 37 °C ir 40 °C temperatūra paveiktose T3M4 ląstelėse.

ABSTRACT

Author of Master Thesis:	Sandra Ivanauskienė
Full title of Master Thesis:	An Evaluation study of cytoprotective heat induced protein heme oxygenase-1 expression changes in pancreatic adenocarcinoma cells T3M4 under different hyperthermic chemotherapy conditions
Supervisor:	Prof. dr. Žilvinas Dambrauskas
Presented at:	Vytautas Magnus University, Faculty of Biology, Kaunas, 2017
Number of pages:	61
Number of tables:	10
Number of pictures:	20
Number of appendices:	-

Pancreatic cancer has a very poor prognosis and one of the highest mortality rate of all cancers. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) is a potential treatment technique for gastrointestinal cancers applied after all visible tumors are surgically removed. However, there is still a lack of fundamental knowledge about the effects of hyperthermic chemotherapy for different cancer cells and molecular mechanisms. The cytoprotective heat induced protein heme oxygenase-1 (HO-1) plays a major role in carcinogenesis and tumor resistance. HO-1 is overexpressed in many cancerous tissues and is further induced after chemotherapeutic and radiotherapeutic treatment.

The aim of this study was to apply different hyperthermic chemotherapy conditions *in vitro* and to evaluate the effect on pancreatic adenocarcinoma cells T3M4 and cytoprotective HO-1 expression. T3M4 cells were treated with different temperatures and cisplatin for one hour. 48 hours later the analysis was carried out. T3M4 cell viability changes were investigated using MTT assay and cell morphology was examined via microscope. HO-1 gene *HMOX1* expression analysis was performed with two step qRT-PCR method and $\Delta\Delta C_T$ comparative analysis, also HO-1 concentration changes were qualitatively evaluated with Western blot immunoassay.

In this study it was determined that the effect of hyperthermia on T3M4 cell viability and morphology is not clear and it has no additive effect for cisplatin cytotoxicity. Under this experiment conditions hyperthermia does not trigger HO-1 expression. The impact of cisplatin in all the investigated temperatures induced *HMOX1* expression by 4,46 – 7,45 times in all the temperatures investigated. HO-1 protein concentration was greater in temperatures 37 °C and 40 °C affected by cisplatin.

SANTRUMPOS

BVR – biliverdino reduktazė

CEA – žmogaus karcinoembrioninis antigenas (angl. Carcinoembryonic antigen)

CO – anglies monoksidas

COX-2 – ciklooksigenazė-2

CRS – citoredukcinė chirurgija (angl. Cytoreductive surgery)

DMSO - dimetilsulfoksidas

DNR – deoksiribonukleininė rūgštis

ET – endoplazminis tinklas

GRP – gliukoze reguliuojami baltymai (angl. Glucose regulated proteins)

GSH – glutationas; GSSH – redukuotas glutationas

HIPEC – hiperterminė intraperitoninė chemoterapija

HMOX1 – hemo oksigenazės 1 genas

HO-1 – hemo oksigenazė I / hemooksigenazė-1

HSP – citoprotekcinio karščio indukuojamas baltymas (angl. Heat Shock Protein)

IC50 – koncentracija inhibuojanti biologinį procesą 50 % (angl. Half maximal inhibitory concentration)

IRP – geležies reguliaciniai baltymai (angl. Iron regulative proteins)

kDNR – kopijinė deoksiribonukleininė rūgštis (angl. cDNA)

kRL-PGR – kiekybinė realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (angl. qRT-PCR)

KT – kambario temperatūroje

MAPK – mitogenais aktyvuojamos baltymų kinazės (angl. Mitogen-activated protein kinases)

NO – azoto oksidas

PBS – fosfatinis buferis (angl. Phosphate buffered saline)

RNR – ribonukleininė rūgštis

RNS – reaktyviosios azoto formos (angl. Reactive nitrogen species)

ROS – reaktyviosios deguonies formos (angl. Reactive oxygen species)

RT – Atvirkštinė transkripcija (angl. Reverse Transkription)

UTR – (angl. Untranslated region)

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo faktorius (angl. Vascular endothelial growth factor)

IVADAS

Kasos vėžys pasižymi sunkiausia prognoze ir yra ketvirtoje vietoje pagal pacientų mirštamumą iš visų vėžio tipų (Siegel, Naishadham ir Jemal, 2017). Daugiau nei pusei sergančiųjų diagnozuojamas vėlyvojoje stadijoje, nes iki tol nepasireiškia specifiniai simptomai (Kelsen, Portenoy, Thaler, Tao ir Brennan, 1977; Almadi ir kt., 2013). Kasos vėžys pasižymi greita invazija į audinius, metastazėmis ir mažu atsaku į chemoterapinį ir radioterapinį gydymą (Hidalgo, 2010). Kasmet Lietuvoje diagnozuojama apie 400 - 500 kasos vėžio atvejų, iš kurių ketvirtos stadijos liga diagnozuojama 57,8 % vyrų ir 51,4 % moterų (Gaidelytė, Madeikytė ir Tendziagolskytė, 2013). Nepaisant mokslo pasiekimų onkologijos srityje kasos vėžiu sergančių pacientų 5-erių metų išgyvenamumo rodiklio vidurkis vos 8 % (Siegel et al., 2017).

Mokslas ir technologijos žengia į priekį, tačiau chirurginis kasos vėžio pašalinimas yra vis dar pagrindinis būdas išgydyti kasos vėžį, bet jis gali būti taikomas tik 10 - 20 % pacientų (Verbeke ir Menon, 2009). Dabartiniai chemoterapiniai ir radioterapiniai gydymo metodai nėra pakankamai efektyvūs (Holohan, Shaeybroeck, Longley ir Johnston, 2013), todėl siekiant padidinti sergančių žmonių išgyvenamumą, bei sumažinti lokoregioninių atkričių ir atokiųjų metastazių riziką, ieškoma naujų gydymo metodų, preparatų ir jų kombinacijų. Vienas iš potencialių būdų gydyti gastroenterologinius vėžinius susirgimus yra po chirurginio naviko pašalinimo taikoma hiperterminė intraperitoninė chemoterapija (HIPEC) (Van der Zee, 2002; Wust et al., 2002). Atlikti klinikiniai tyrimai rodo, kad tinkamai optimizavus sąlygas ir parinkus pacientus HIPEC prailgina pacientų gyvenimo trukmę ir sumažina chemoterapijos nepageidaujamus šalutinius poveikius (Verwaal et al., 2003; Padmanabhan, Kumar, Pookunju, Srinivasan ir Mahajan, 2015; Poškus, Strupas, Gushin ir Sugarbaker, 2014). Tačiau hiperterminės chemoterapijos taikymas yra gan ribotas, nes vis dar trūksta fundamentinių žinių apie hiperterminės chemoterapijos poveikį skirtingų vėžinių ląstelių energetikai ir molekuliniais mechanizmais.

Vėžio piktybiškumas ir atsparumas gydymui yra susijęs su molekulinėmis išgyvenamumo mechanizmų aktyvacija, tokių kaip citoprotekcinio baltymo hemoksigenazės-1 (HO-1) indukcija (Berberat et al., 2005; Was, Dulak ir Jozkowicz, 2010). HO-1 katalizuojamos reakcijos produktai pasižymi anti-uždegiminėmis ir anti-apoptotinėmis savybėmis, bei susiję su ląstelių augimu ir proliferacija (Ryter, Alam ir Choi, 2006; Was et al., 2010). HO-1 hiperekspresija nustatyta daugelyje vėžinių audinių ir ląstelių, bei dar labiau padidėja taikant priešvėžinį gydymą (Berberat et al., 2005; Abraham ir Kappas, 2008; Busserolles, Megías, Terencio ir Alcaraz, 2006). Įrodyta, kad HO-1 inhibicija padidina vėžinių ląstelių jautrumą chemoterapiniam ir chemospinduliniam gydymui

(Barberat et al., 2005; Jakštaitė et al., 2015). Yra mažai duomenų apie hiperterminės chemoterapijos poveikį HO-1 raiškos aktyvumui skirtingose žmogaus vėžinėse ląstelėse.

Tyrimo objektas kasos adenokarcinomos ląstelių linija - T3M4. Šios antrinės kultūrinės ląstelės gautos iš Europos kasos centro Heidenberge (angl. The European Pancreas Center). Pasižymi žmogaus karcinoembrioninio antigeno sekrecija (CEA) (Okabe, Yamaguchi ir Ohsawa, 1983) ir daugybinėmis genų mutacijomis (Koscielny et al., 2016).

Tyrimo metu sukuriama *in vitro* HIPEC sąlygos T3M4 ląstelėms. Ląstelės paveiktos viena valandą nustatyta temperatūra ir temperatūra kartu su chemoterapiniu vaistu cisplatina. Po poveikio ląstelės gražintos į įprastines auginimo sąlygas. Po 48 valandų atlikta analizė, lyginant T3M4 ląsteles paveiktas skirtingomis hiperterminės chemoterapijos sąlygomis su kontrolinėmis T3M4 ląstelėmis, nepaveiktomis hipertermija ir vaistu. Vertinti hiperterminės chemoterapijos sukelti T3M4 ląstelių morfologijos pakitimai, MTT metodu nustatyti gyvybingumo pokyčiai. HO-1 geno *HMOX1* santykinė RNR raiška buvo nustatyta dviejų etapų kiekybine realaus laiko polimerazės grandinine reakcija (kRL-PGR), taikant $\Delta\Delta C_T$ santykinės kiekybinės analizės metodą. HO-1 baltymo koncentracija T3M4 ląstelėse analizuota Western blot metodu.

Darbo tikslas: Ištirti skirtingų hiperterminės chemoterapijos sąlygų poveikį kasos adenokarcinomos ląstelių linijai T3M4 ir citoprotekcinio karščio indukuojamo baltymo hemoksigenazės-1 raiškai.

Darbo uždaviniai:

1. Pritaikyti skirtingas hiperterminės chemoterapijos sąlygas *in vitro* ir nustatyti poveikį kasos adenokarcinomos ląstelių gyvybingumui.
2. Įvertinti temperatūros ir cisplatinos poveikio indukuotus T3M4 ląstelių morfologinius pokyčius.
3. Nustatyti ir įvertinti *HMOX1* raiškos pokyčius paveikus T3M4 ląsteles skirtingomis hiperterminės chemoterapijos sąlygomis, taikant kRL-PGR metodą.
4. Western blot metodu įvertinti HO-1 koncentracijos skirtumus hiperterminės chemoterapijos paveiktų T3M4 ląstelių baltymų ekstraktuose.

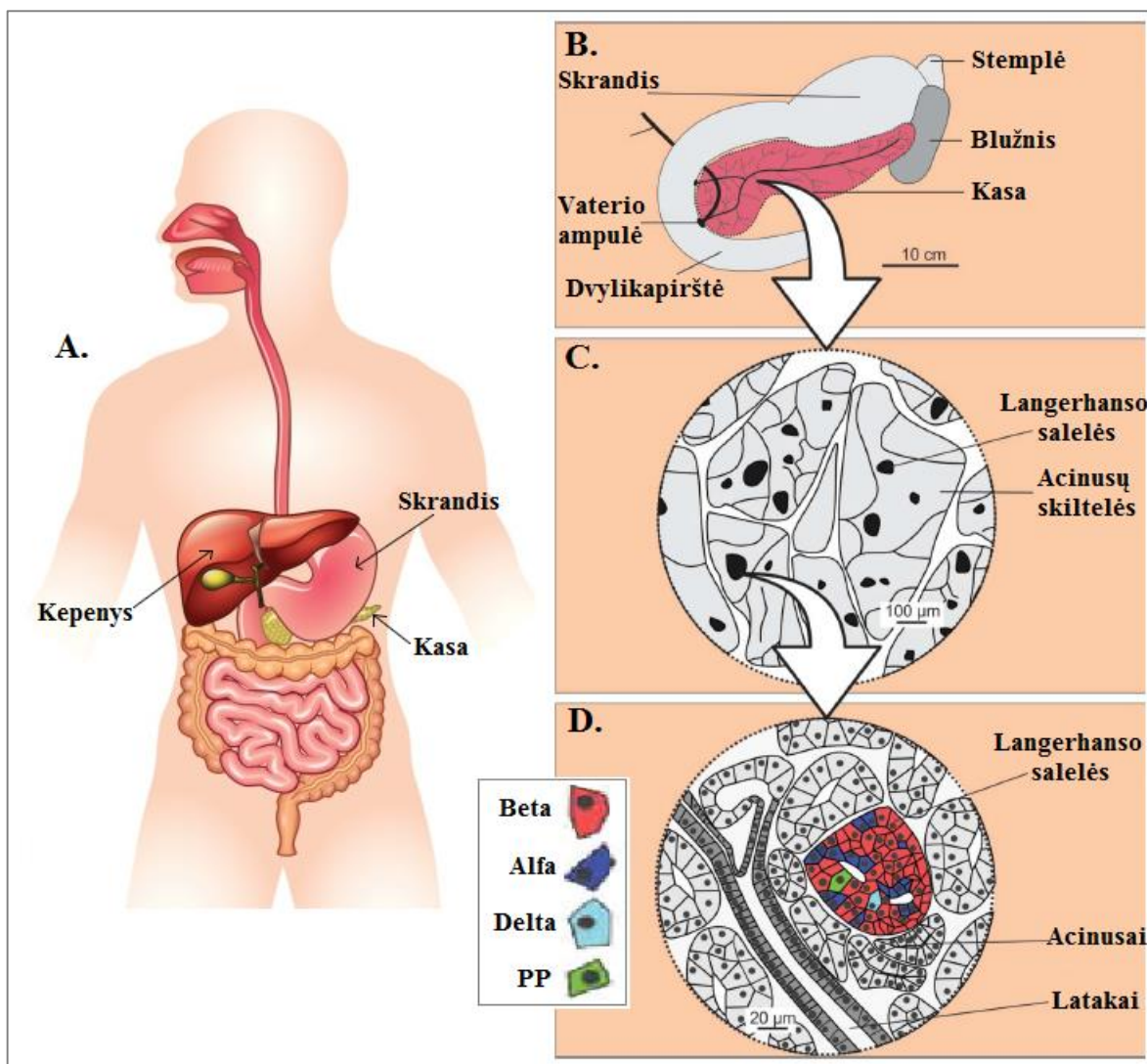
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kasos struktūra

Kasa tai svarbi egzokrininė ir endokrinė liauka, lokalizuota retriperitoninėje viršutinėje pilvo ertmės dalyje. Žmogaus kasa struktūriškai sudaryta iš galvos, kūno ir uodegos. Galva kontaktuoja su dvylikapiršte žarna, o uodega liečiasi su blužnimi (1 pav.) (Beger et al., 2008). Kasa yra 14 – 18 cm ilgio, 2 – 9 cm pločio ir 2 – 3 cm storio, sveria 50 – 100 g (Dolenšek, Rupnik ir Stožer, 2015). Kasą supa fibrozinė kapsulė iš kurios jungiamojo audinio pertvaros dalina parenchiminę dalį į skiltis ir mažas skilteles (Dolenšek et al., 2015). Nėra gerai išreikštos pertvaros tarp skiltelių ir visa parenchima yra kaip vientisas audinys. Egzokrininė kasos dalis sudaro 96 – 99 % bendro kasos tūrio (Dolenšek et al., 2015). Kiekviena kasos skiltelė sudaryta iš acinusų, kurie sudaryti iš virškinimo fermentus produkuojančių acinarinių ląstelių. Centroacinarinės ląstelės formuoja ertmes ir latakėlių sistemą, kurie sueina į tarpuskiltelinius ir į didesnius tarpuskiltinius latakėlius, kurie atsiveria į pagrindinį kasos lataką, einantį išilgai visos kasos liaukos (Beger et al., 2008; Dolenšek et al., 2015). Pagrindinis kasos latakas atsiveria į dvylikapirštę žarną greta bendro tulžies latako ir tolimiausia abiejų latakų dalis, vadinama hepatopankreatine ampule arba Vaterio ampule (Dolenšek et al., 2015).

Kanalėlių paviršių dengia kūbinės epitelinės kanalėlių ląstelės, kurios vėliau pereina į vienasluoksnį stulpinį epitelį (Beger et al., 2008). Acinarinės ir epitelinės kanalėlių ląstelės epikalinėje pusėje turi mikrogaurelis ir tarpusavyje yra susijungusios tvirtomis tarpląstelinėmis jungtimis (Beger et al., 2008). Kanalėlių epitelis sekretuoja bikarbonatus ir mucinus, kurie padeda pernešti kasos virškinimo fermentus į dvylikapirštę žarną ir neutralizuoja skrandžio rūgštingumą (Grapin-Botton, 2005).

Likusią dalį kasos tūrio sudaro endokrininiai mikroorganai – Langerhanso salelės, kurios paprastai būna apvalios, ovalios ar netaisyklingos formos ir sudarytos nuo keleto iki kelių tūkstančių endokrininių ląstelių (Dolenšek et al., 2015). Salelėse aptinkama bent penkių rūšių endokrininės ląstelės, sintezuojančios polipeptidinius hormonus: 50 – 70 % beta ląstelės sintezuojančios insuliną, 20 – 40 % alfa ląstelės sekretuojančios gliukagoną ir mažiau kaip 10 % sudaro delta ir PP ląstelės, gaminančios somatostatatiną ir kasos polipeptidą (1 pav.). Taip pat aptinkama mažiau kaip 1 % epsilon ląstelių sekretuojančių greliną (Dolenšek et al., 2015). Kasos endokrininiai hormonai išskiriami į kraują, reguliuoja angliavandenių metabolizmą ir kitus svarbius procesus organizme (American cancer society).

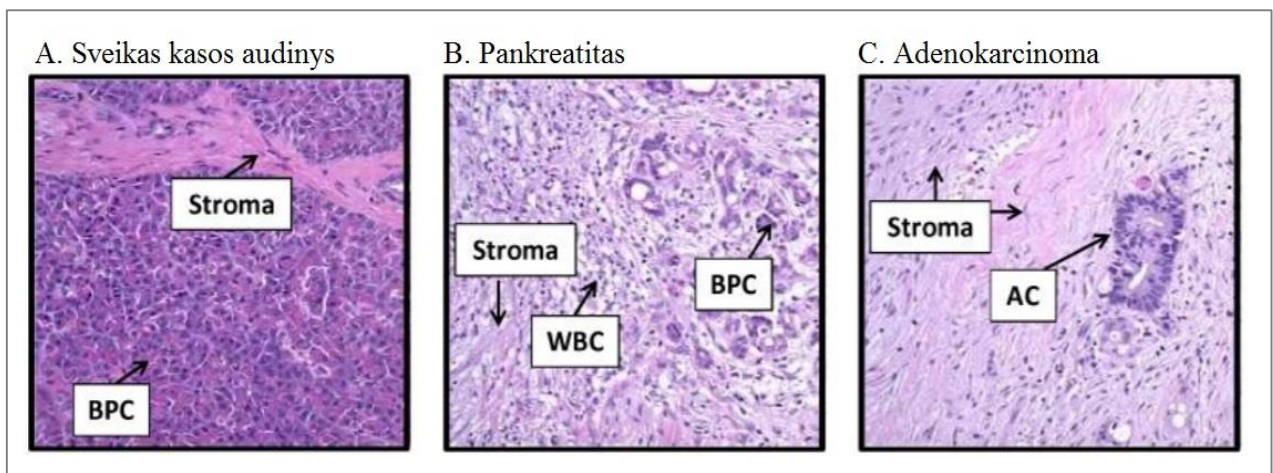


1 pav. Kasos lokalizacija organizme ir pagrindinės struktūros: A - Lokalizacija organizme; B – lokalizacija su gretimais organais; C – Langerhanso salelės ir acinusai; D – Langerhanso salelių ląstelės (adaptuota iš Dolenšek et al., 2015).

1.2. Kasos vėžys

Tapti vėžine gali bet kuri ląstelė gyvame organizme, ne išimtis ir kasos audinio ląstelės. Yra keletas kasos vėžio tipų, jie gali būti egzokrininės arba endokrininės kilmės (American Cancer Society). Priklausomai nuo kilmės jiems būdingi skirtingi rizikos veiksniai, simptomai, diagnostika ir gydymas. Kasos vėžio tipai patologiškai yra skirstomi į solidinį ir cistinį (Wolfgang et al., 2013). Dalis kasos darinių yra nepiktybiniai, kurie negydomi gali tapti vėžio pirmtakais. Tokie navikai dar vadinami neoplazmomis (nenormalus naujo audinio susidarymas). Serozinės ir mucininės cistinės neoplazmos tai navikai turintys serozinio skysčio arba baltymo mucino pripildytas cistas.

Kasos adenokarcinoma arba invazyvi latakinė adenokarcinoma tai pats dažniausias kasos navikas pasižymintis ypač bloga prognoze (Wolfgang et al., 2013). Kasos adenokarcinoma tai egzokrininės kilmės kasos vėžys kilęs iš kasos latakų liaukinio epitelio ląstelių. Sudaro 95 % egzokrininių ir 85 % visų kasos vėžio atvejų (Ferlay ir kt., 2013), todėl kai kalbama apie kasos vėžį tai paprastai yra apie kasos adenokarcinomą (Wolfgang et al., 2013). Šis vėžys paprastai yra solidinis ir stangrus, plintantis už pagrindinio naviko ribų. Beveik visos invazyvios adenokarcinomos plinta į nervus, limfinę sistemą ir smulkias kraujagysles, metastazuodamas į limfmazgius ir kepenis. Kol liga diagnozuojama, adenokarcinoma būna išplitusi už kasos liaukos ribų ir chirurginis gydymas jau nebetaikytinas (Wolfgang et al., 2013). Histologiškai kasos adenokarcinomai būdinga desmoplastinė reakcija, reiškinyje, kuriame dalyvauja fibroblastai, uždegiminės ląstelės, endotelinės ląstelės ir ekstraląstelinio matriksa kompleksai, susiję su žymiai padidėjusiu intersticiniu skysčių slėgiu auglyje. Padidėjęs slėgis, manoma, yra kliūtis naviko perfuzijoje ir terapinių medžiagų difuzijai (Wilson et al., 2009). Adenokarcinomos ląstelės turi padidėjusius branduolius, adenokarcinomos ir pankreatito pažeistoje kasoje yra žymiai daugiau kolageno nei sveikame kasos audinyje (2 pav.) (Wilson et al., 2009). Kiti egzokrininiai kasos navikai tai žymiai retesnės adenoplokščialąstelinės, plokščialąstelinės, nediferencijuotos ir kitos adenokarcinomos, bei Vaterio ampulės vėžys (American Cancer Society).



2 pav. Histologiniai kasos audinio paveikslai. A – Sveikas kasos audinys (BPC – gėrybinės kasos ląstelės); B – Pankreatitas (WBC – leukocitai); C – Adenokarcinoma (AC- adenokarcinomos ląstelės)(adaptuota iš Wilson et al., 2009).

Endokrininiai kasos navikai yra reti, sudaro 5 % visų kasos vėžio atvejų (Ferlay ir kt., 2016). Jie dar žinomi kaip kasos neuroendokrininiai navikai (NET) arba kasos salelių ląstelių navikai (American Cancer Society). Kasos neuroendokrininiai navikai gali būti gėrybiniai ir piktybiniai (vėžiniai). Atskirti gėrybinį nuo piktybinio yra sunku, nes morfologiškai panašūs. Kartais diagnozė

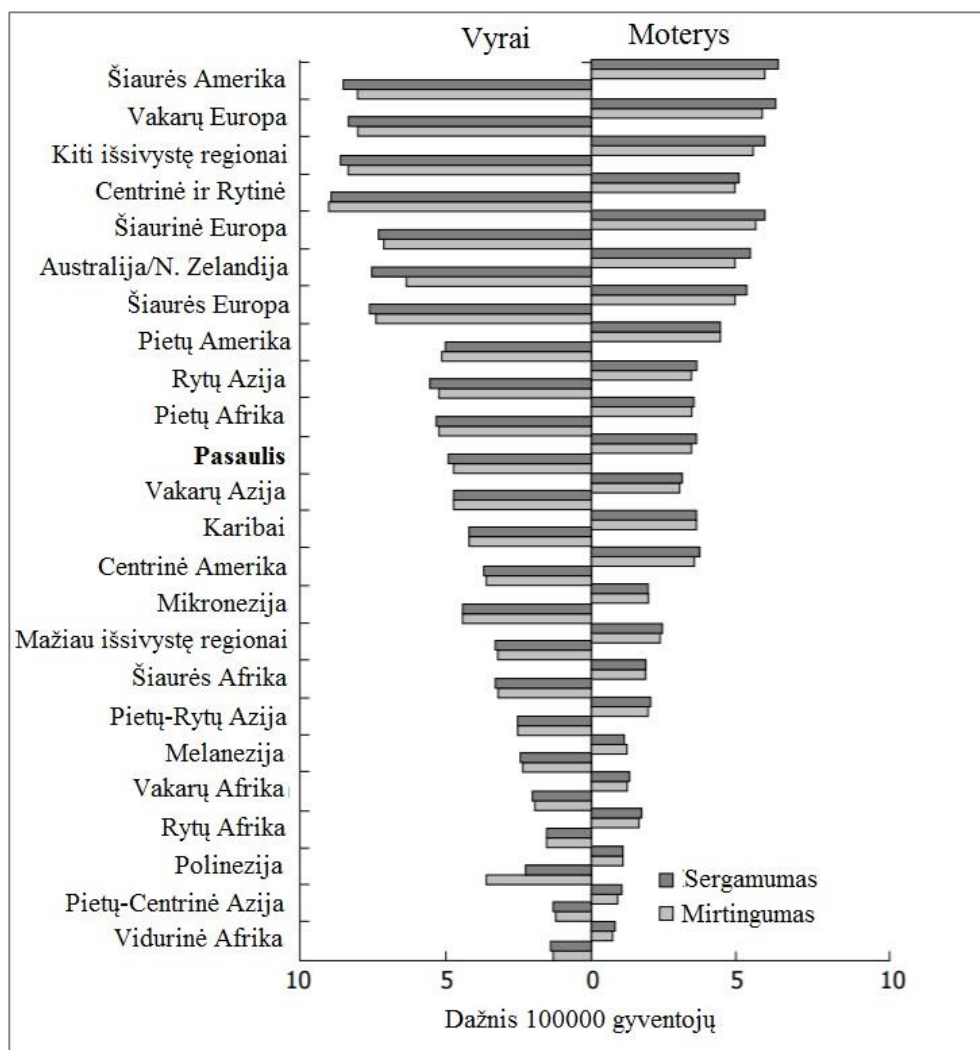
paaikškėja kai navikas išplinta už kasos ribų. Yra daug kasos neuroendokrininių navikų tipų. Jie gali būti navikai gaminantys kasos hormonus, kuriuos išskiria į kraują, sukeldami simptomus. Jie pavadinami pagal tai kokį hormoną sekretuoja – gastrinomos, insulinomos, gliukagonomos, somatostatinomos, PPomos. Neuroendokrininiai navikai nesekretuojantys hormonų yra žymiai pavojingesni. Dar yra karcinoidiniai navikai – tai neuroendokrininių navikų tipas, kuris retai prasideda kasoje, dažniau kitose virškinamojo trakto vietose. Šie navikai gamina serotoniną ar jo pirmtaką (American Cancer Society).

Kasos vėžys diagnozuojamas vėlyvojoje stadijoje, nes iki tol nepasireiškia specifiniai simptomai (Kelsen et al., 1977; Almadi ir kt., 2013). Pasižymi greita invazija į audinius, metastazėmis ir mažu atsaku į chemoterapinį ir radioterapinį gydymą (Hidalgo, 2010). Vėžinės ląstelės prisitaikiusios apsisaugoti ir įgauti atsparumą daugumai stresinių dirgiklių. Jos gali mutuoti, gali įvykti jų genų, koduojančių atsparumą didinančius baltymus, amplifikacija, gali pakisti medžiagų transportas per membraną, indukuoti DNR pažaidų taisymo ir vaisto inaktyvavimo mechanizmus.

1.2.1. Kasos vėžio rizikos veiksniai ir epidemiologija

Vieno konkretaus rizikos faktoriaus sukeliančio kasos vėžį nėra. Rizika susirgti kasos vėžiu didėja su amžiumi. Jauniems žmonėms kasos vėžys diagnozuojamas retai, dažniausiai aptinkamas vyresnio amžiaus, maždaug 60 – 70 metų (Raju et al., 2015). Sergamumas ir mirštamumas tarp vyrų ir moterų yra panašus, tačiau dažniau serga vyrai (Siegel et al., 2017). Daugiau sergančiųjų aukštos ir vidutinės ekonomikos šalyse (3 pav.) (Ferlay ir kt., 2013). Įrodyta, kad tabako vartojimas padidina riziką 20 - 30 %. Kiti veiksniai tai kaloringa mityba, 2-tipo diabetas, alkoholio vartojimas, lėtiniai pankreatitai ir kitos ligos (Brasiūnienė, Brasiūnas, Barauskas ir Juozaitytė, 2003; Chari, 2007).

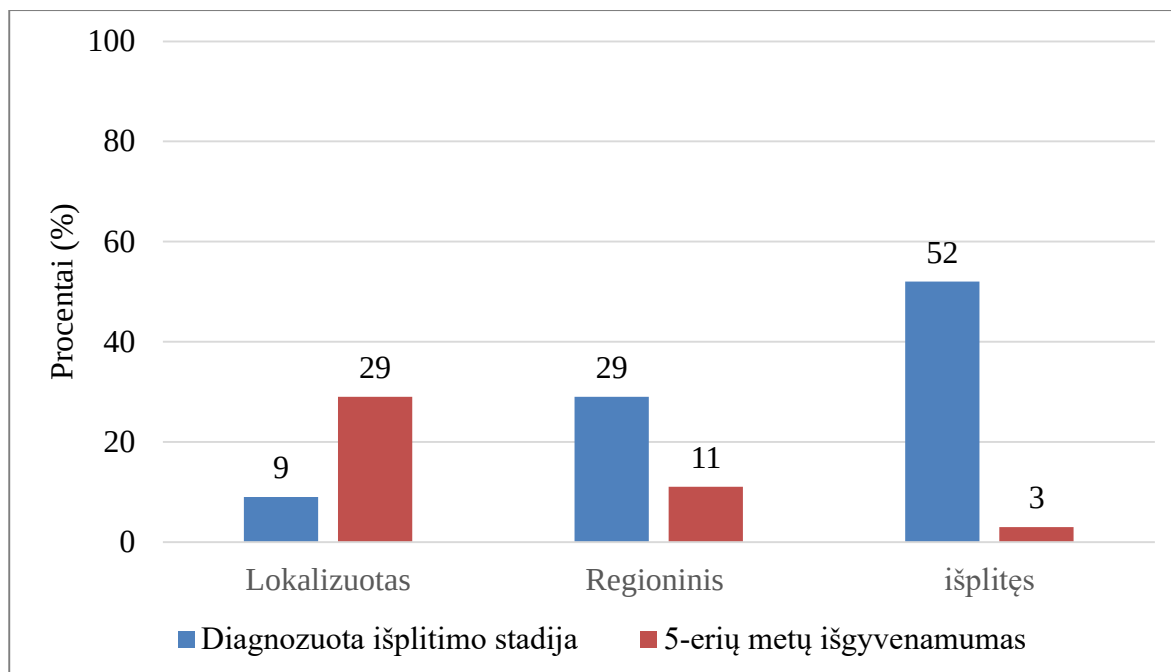
Žmonėms, kurių šeimoje buvo kasos ir kitų vėžinių ligų atvejų rizika padidėja iki 15 %. Kasos kancerogenezėje ypač reikšmingos kai kurios genų mutacijos. Nuo 75 % iki 95 % atvejų kasos vėžio audinyje nustatoma onkogeno *KRAS* 12, 13 ir 14 kodonų mutacijos. *KRAS* tai genas 12-toje chromosomoje koduojantis mažą GTPazę, svarbią ląstelės signaliniam mitogonais-aktyvuojamų baltymų kinazių (MAPK) kelyje ir kituose (Wolfgang et al., 2013). *p16* auglių supresijos genas yra inaktyvuotas 95 % kasos vėžio atvejų, koduojamas baltymas dalyvauja ląstelės ciklo reguliacijoje ir yra susijęs su nereguliuojamu vėžinių ląstelių augimu. Kitas supresijos genas – *TP53* neaktyvus 75 % kasos vėžių. *TP53* koduoja baltymą p53, kuris svarbus ląstelinio streso atsake, aktyvuodamas DNR reparaciją, indukuodamas augimo areštą ir ląstelių žūtį (Wolfgang et al., 2013). Onkogeno c – *erbB* - 2 pakitimų randama apie 20 – 52 % kasos vėžio atvejų, 50 % turi *Smad4* mutacijas, bei padidėjusią augimo faktorių (EGF, TGF alfa, ir kiti.) ir jų receptorių ekspresiją. Neseniai nustatyta, kad iki 19 %. Kasos vėžio atvejų susiję su *BRCA* 1 ir 2 mutacijomis (Carnevale ir Ashworth, 2015).



3 pav. Kasos vėžio sergamumas ir mirtingumas tarp vyrų ir moterų skirtinguose regionuose (pateiktas skaičius tenkantis 100000 gyventojų). Aukštos ir vidutinės ekonomikos šalyse sergančiųjų daugiau (adaptuota iš GLOBOCAN 2012).

1.2.2. Mirtingumas

Kasos vėžys yra sunkiausiai pagydomas ir yra ketvirtyje vietoje pagal pacientų mirštamumą iš visų vėžinių ligų (Siegel et al., 2017). GLOBOCAN 2012 duomenimis kasmet nuo kasos vėžio miršta 331000 žmonių (Ferlay ir kt., 2013). Sergančiųjų skaičius pamažu didėja, bet išgyvenamumo rodiklis išlieka panašus jau 40 metų (Pancreatic Cancer Canada, 2006). Kasos vėžiu sergančių pacientų išgyvenamumas labiausiai priklauso nuo diagnozuotos kasos vėžio stadijos, tačiau daugiau nei pusei pacientų diagnozuojama vėlyvoji stadija ir bendras kasos vėžiu sergančių pacientų 5-erių metų išgyvenamumo rodiklio vidurkis 8 % (4 pav.) (Siegel et al., 2017).



4 pav. Diagnozuota kasos vėžio išplitimo stadija ir 5-erių metų išgyvenamumo rodikliai, kai visų stadijų bendras 5-erių metų išgyvenamumo rodiklis yra 8 % (pateikiami Jungtinių Valstijų duomenys) (Siegel et al., 2017).

Kasmet Lietuvoje kasos vėžys diagnozuojamas apie 400 - 500 pacientų, iš kurių ketvirtos stadijos liga diagnozuojama 57,8 % vyrų ir 51,4 % moterų (Gaidelytė et al., 2013). Mažiau nei 20 % pacientų yra diagnozuojama ankstyvoji stadija tinkama operacijai, iš kurių tik mažai daliai pilnai pašalinamas vėžinis audinys (Jemal et al., 2005). Daliai operacijai atrinktų pacientų, ultragarsu arba kompiuterine tomografija, nustato neoperuojamų metastazių. Maždaug 30 % pacientų operacijos metu nevysiškai pašalinamas vėžinis audinys (Chari, 2007). Chirurginis kasos vėžio išpjovimas yra pagrindinis gydymo būdas, bet nėra pakankamai efektyvus. Operuotų pacientų išgyvenamumas vidutiniškai tik 12 - 18 mėnesių ilgesnis nei pacientų, kuriems neatlikta operacija (4 - 6 mėn.) (Chari, 2007).

1.3. Hiperterminė chemoterapija

1.3.1. Hipertermijos poveikis ląstelėms

Hipertermija indukuoja pasikeitimus ląstelių fiziologijoje (1 lentelė), keičia membranų pralaidumą, skatina citoskeleto modifikacijas, inhibuoja DNR taisymą, veikia apoptozės signalinius kelius ir skatina citoprotekcinio karščio indukuojamų baltymų – HSP veiklą (Ahmed ir Zaidi, 2013). Dėl hipertermijos savybių ji tampa vis patrauklesnė įvairiuose gydymo metoduose. Ląstelių membranos dėl savo struktūros yra itin jautros hiperterminiam stresui. Dėl hipertermijos didėja

membranos pralaidumas ir tai pagerina vaistų patekimą į vėžines ląsteles. Taip pat paveikiamas daugelio ląstelių membranų laidumas svarbių jonų pernašai (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^+ , K^+), Ca^{2+} veikia svarbias baltymų kinazių ir kitas signalines kaskadas. Ląstelių citoskeleto pakitimai priklauso nuo ląstelių tipo ir hipertermijos dozės. Hipertermija ardo citoskeleto struktūrą ir didina poras, taip pat pakinta mitozinės verpstės (Huang, Yang, Wu, Chang ir Wang, 1999), centrosomų organizacija ir baltymų denatūracija (Vidair, Doxey ir Dewey, 1993). Hipertermija indukuoja integrinų-citoskeleto tinklo modifikacijas, lemiančias ląstelių formos pakitimus ir programuotą ląstelių žūtį (Yonezawa et al., 1996; Ahmed ir Zaidi, 2013). Nustatyta, kad hipertermija skatina DNR grandinės trūkius, dėl termolabilių reparacijos baltymų, tokių kaip DNR polimerazė, danatūracijos ir disfunkcijos (Takahashi et al., 2005). Dėl hipertermijos poveikio citoskeletui, membranai ir DNR pažeidimų taisymui hipotetiškai hipertermija padidina vėžinių ląstelių jautrumą chemoterapiniam ar spinduliniam gydymui (Ahmed ir Zaidi, 2013).

1 lentelė. Hipertermijos poveikis ląstelių komponentams (adaptuota iš Ahmed et al., 2008).

Ląsteliniai komponentai	Funkcijos pakitimai
Ląstelės membrana	Stabilumo pakitimai Struktūros pokyčiai Jonų pernašos sutrikimai (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^+ , K^+) Membraninio potencialo modifikacija Transmembraninio potencialo siurblio moduliacija
Citoplazma	Baltymų struktūros ir funkcijos denatūracija Poveikis baltymų sintezei Baltymų agregacija HSP indukcija
Mitochondrijos	Vidinės mitochondrijos membranai laidumo amplifikacija Mitochondrinio membranai potencialo depoliarizacija ATP produkcijos redukcija ROS generacija Ca^{2+} transporto sutrikimas
Endoplazminis tinklas (ET)	ET stresas dėl neteisingai suskleistų baltymų
Branduolys	RNR/DNR sintezės sutrikimai DNR reparacinių fermentų inhibicija DNR konformacijos pokyčiai Genų ekspresijos ir signalų perdavimo modifikacijos

Hipertermija apoptozę veikia dvejopai: pro-apoptotiškai ir anti-apoptotiškai (Ahmed ir Zaidi, 2013). 41 – 45 °C temperatūra daugelyje ląstelių kultūrų indukuoja apoptozę, daugiausiai dėl ROS generacijos ir Ca^{2+} jonų disbalanso (Zuo et al., 2000). Hipertermija taip pat gali aktyvuoti ląstelių

išgyvenamumo signalinius kelius ir gali išsivystyti termotolerancija. Anti-apoptoziniai ir citoprotekciniai signaliniai veiksniai yra nepageidaujamas reiškinys hiperterminėje vėžio terapijoje, todėl ieškoma molekulinų taikinių, kurių inhibicija padidintų gydymo efektyvumą (Ahmed ir Zaidi, 2013).

Yra mažai duomenų apie skirtingų hiperterminės chemoterapijos sąlygų poveikį skirtingoms vėžinių ląstelių kultūroms ir molekulinis mechanizmus. Hou et al. (2014) tyrimai su žmogaus osteosarkomos ląstelėmis parodė, kad hipertermija sukėlė mitochondrijų disfunkciją, skatino reaktyviųjų deguonies formų (ROS) gamybą, aktyvavo kaspazę 3 ir kaspazę 9, inicijuojančias ląstelių apoptozę. Zunino su kolegomis (2015) nustatė, jog HIPEC paveiktos navikų ląstelės skatina augliui specifiskų T limfocitų aktyvaciją ir sukelia vakcinacijos efektą prieš navikines ląsteles pelėse. HIPEC indukavo imunomoduliuojančio karščio indukuojamo baltymo HSP 90 atsiradimą ląstelės plazminėje membranoje. Inhibavus HSP 90, nebuvo sukurta antinavikinė vakcinacija. Manoma, kad hiperterminė chemoterapija ne tik tiesiogiai naikina navikines ląsteles, bet ir sukelia aktyvų priešvėžinį imunitetą.

1.3.2. Hiperterminė intraperitoninė chemoterapija (HIPEC)

Klinikinis hiperterminės chemoterapijos pritaikymas yra hiperterminė intraperitoninė chemoterapija (HIPEC). HIPEC tai yra vienas iš išplitusio virškinimo sistemos ir kiaušidžių vėžio gydymo metodų skirtas sunaikinti likusias po operacijos vėžines ląsteles. Klinikoje hiperterminė intraperitoninė chemoterapija (HIPEC) taikoma po to kai chirurgiškai pašalinami visi matomi vėžio židiniai, t. y. po operacijos, vadinamos citoredukcija (angl. cytoreductive surgery – CRS) (González-Moreno, González-Bayón ir Ortega-Pérez, 2010). Į pilvo ertmę leidžiamas koncentruotas, 41 – 42 °C temperatūros chemoterapinis vaistas. Per vieną ar dvi valandas vaistas pasiskirsto po pilvo ertmę, sunaikina likusias vėžines ląsteles ir sumažina vėžio atsinaujinimo tikimybę, o tada yra pašalinamas (UC San Diego Health). Tyrimai rodo, kad per valandą didžioji dalis sveiko audinio yra nepažeidžiama kai temperatūra yra iki 44 °C (Ahmed ir Zaidi, 2013). HIPEC suteikia farmakokinetinį pranašumą citotoksiniam vaistui tiesiogiai patenkant į organų ertmes ir audinius, bei leidžia lokaliai panaudoti didesnę chemoterapijos dozę, nei taikant sisteminę chemoterapiją, taip pat prisideda ir hipertermijos poveikis (González-Moreno et al., 2010; UC San Diego Health). Hipertermija padidina chemoterapijos efektyvumą, pagerindama kraujo cirkuliaciją, vaisto absorbciją, citotoksiškumą ir poveikį vėžio mikroaplinkai (Hildebrandt et al., 2002; Van der Zee, 2002; Issels, 2008; Ahmed ir Zaidi, 2013).

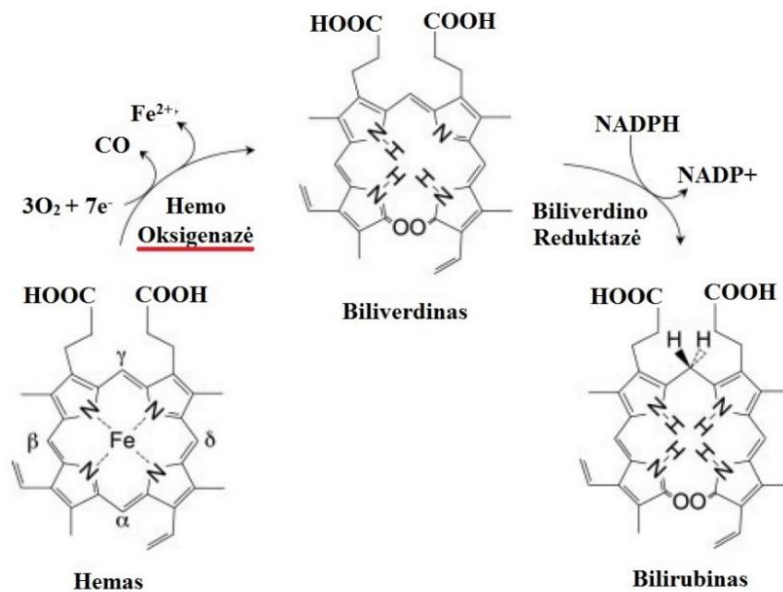
Atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad tikslios chirurginės procedūros, standartizuoti metodai ir tinkama pacientų atranka reikšmingai pagerino pacientų sergančių gastroenterologiniais ir kiaušidžių vėžiu išgyvenamumą ir sumažino komplikacijų kiekį (Esquivel et al., 2006; Hou, Lin, Hou,

ir Liu, 2014). Onkologijos institute Indijoje buvo atliktos pilnos CRS ir HIPEC operacijos trylikai pacientų su peritoninėmis metastazėmis. Vidutinė pacientų amžiaus mediana 52 metai, peritoninės karcinomatozės indekso (PCI) mediana 13.5. Dažniausias neigamas poveikis buvo žarnų obstrukcija, intra-abdominaliniai abscesai, septicemija ir kepenų funkcijos sutrikimai. Šalutiniai efektai pasireiškė 3 iš 13 pacientų, operacijos metu nežuvo nei vienas pacientas (Padmanabhan et al., 2015). CRS ir HIPEC buvo atlikta ir Baltijos šalyse. Iš penkių Lietuvos ir Estijos centrų šie metodai buvo taikyti 127 pacientams, iš kurių pusei diagnozuotas kaušidžių vėžys. Gauti optimistiški rezultatai su komplikacijų rizika 11,8 % ir 1,6 % mirštamumu. (Poškus et al., 2014). Pacientų su peritonine karcinomatoze arba po nepilnos citoredukcijos mirštamumas vis dar aukštas (Verwaal et al., 2003).

HIPEC metodas dar nėra gerai standartizuotas ir vienas iš skirtumų – chemoterapinio vaisto ir temperatūros pasirinkimas konkretaus vėžio gydymui. Renkantis vaistą svarbu atsižvelgti į vaisto farmakokinetiką ir farmakodinamiką, sisteminį toksiškumą, stabilumą ir taikant *in vitro* tyrimams – veikimo mechanizmą. Dažnai naudojami platinos junginiai, 5-FU, irinotecanas, adriamicinas ir Mitomicinas C (González-Moreno et al., 2010; de Bree, 2015). Kuriama ir ieškoma naujų vaistų ir vaistų kombinacijų, siekiant padidinti hiperterminės chemoterapijos efektyvumą (Van der Speeten, Stuart ir Sugarbaker, 2009).

1.4. Hemoksigenazė-1

Hemoksigenazė-1 tai fermentas priklausantis karščio indukuojamų baltymų šeimai (angl. Heat shock protein - HSP), kuris pasižymi ne tik metabolinėmis, bet ir citoprotekcinėmis funkcijomis, asocijuotomis su ląsteliniu stresu ir patologinėmis būsenomis (Abraham ir Kappas, 2005; Stocker ir Perrella, 2006). Pagrindinė HO funkcija dalyvauti hemo degradacijoje į bilirubiną (Tenhunen, Marver ir Schmid, 1968). HO katalizuoja pirmąją ir reguliuojančiąją hemo (Geležies-protoporfirino-IX) oksidacinės degradacijos reakciją į anglies monoksidą (CO), laisvą geležį (Fe^{2+}) ir tulžies pigmentą biliverdiną-IX (5 pav.) (Stocker ir Perrella, 2006). Biliverdinas konvertuojamas fermento biliverdino reduktazės (BVR) į bilirubiną-IX, o laisva geležis įjungiamą į feritino sudėtį (7 pav.) (Otterbein ir Choi, 2000). Nuo 80 % iki 85 % bilirubino susintetinto *in vivo* yra gaunama iš senstančių ar pažeistų eritrocitų hemoglobino degradacijos (Abraham ir Kappas, 2008 iš Schacter, 1988).



5 pav. HO-1 katalizuojama hemo degradacija, lemianti biologiškai aktyvių molekulių – CO, laisvos geležies ir bilirubino homeostazės palaikymą (adaptuota iš Stocker ir Perrella, 2006).

HO ne tik reguliuoja ląstelinio hemo homeostazę, bet ir dalyvauja geležies perdirbime iš senstančių raudonųjų kūnelių ir ekstrakreatopoetinių ląstelių. Kasdien produkuojama apie 28 mg Fe²⁺ ir tai sudaro beveik 1 % bendro geležies kiekio organizme (Koury ir Ponka, 2004; Stocker ir Perrella, 2006). Laisva geležis prijungiama plazmos glikoproteino transferinio ir pernešama į kaulų čiulpus, kur panaudojama hemoglobino biosintzei besivystančiose eritroidinėse ląstelėse (Stocker ir Perrella, 2006) arba kaupiama prisijungusi prie baltymo feritino. Aktyvi bilirubino ir hemo homeostazė rodo didelį HO aktyvumą audiniuose, tokiuose kaip blužnis ir kaulų čiulpai, kuriuose gausu retikuloendotelinių ląstelių, taip pat HO veikla aptinkama mažesniais kiekiais daugumoje kitų ląstelių tipų: kepenų, inkstų, sėklidžių, smegenų, žarnyno ir kitų (Ryter et al., 2006; Abraham ir Kappas, 2008).

1.4.1. HO-1 baltyminė ir genetinė struktūra

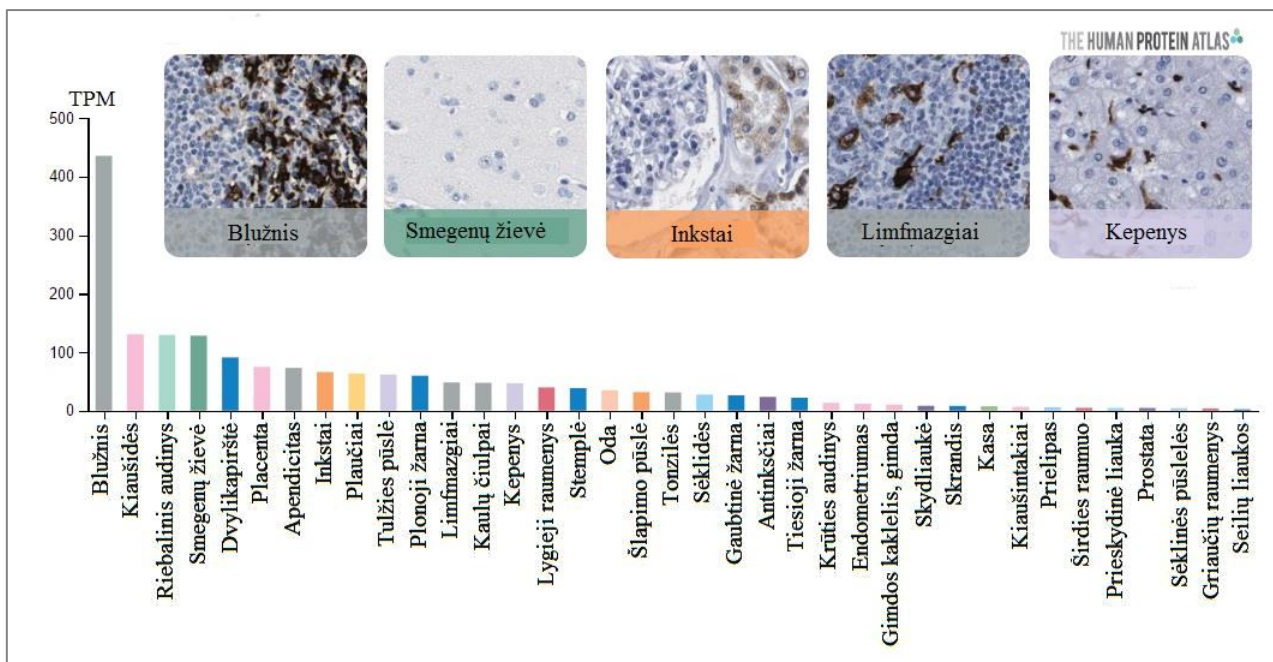
Žmogaus HO-1 yra sudaryta iš 288 amino rūgščių (NCBI, 2017a). Antrinę HO-1 struktūrą sudaro septynios α spiralės sąveikaujančios su hemo grupe (Sugishima et al., 2007). Hemo oksigenazės yra identifikuotos trys izoformos HO-1, HO-2 ir HO-3 (McCoubrey, Ewing ir Maines, 1992; Shibahara et al., 1993; Hayashi et al., 2004). HO-1 ir HO-2 yra ekspresuojamos daugelyje ląstelių ir yra katalitiškai aktyvios, kai tuo tarpu HO-3 funkcija ir reikšmė yra mažiausiai ištirta (Hayashi et al., 2004). HO-1 (~32kDa) yra labiausiai ištirta, indukuojama HO forma, o HO-2 (~36 kDa) ekspresuojama nuolatos (McCoubrey et al., 1992; Ryter et al., 2006). HO-1 ir HO-2

katalizuoja tą pačią biocheminę reakciją su tais pačiais substratais ir kofaktoriais, tačiau skiriasi šių fermentų kinetinės savybės, termostabilumas ir imunoreaktyvumas (Ryter et al., 2006). HO-2 turi papildomus reguliacinius domenus (Ryter et al., 2006). HO-1 ir HO-2 koduoja du atskiri genai *HMOX1* ir *HMOX2*, lokalizuoti skirtingose chromosomose.

Hemoksigenazę-1 koduojantis *HMOX1* (arba *ho-1*) genas lokalizuotas 22 chromosomoje q12.3 pozicijoje, o *HMOX2* 16 chromosomoje p13.3. *HMOX1* yra 13,854 bazių porų ilgio ir lokalizuotas tarp 35,380,361 ir 35,394,214 bp (NCBI, 2017b). *HMOX1* genas sudarytas iš 5 egzonus ir 4 intronų (Ryter et al., 2006).

1.4.2. HO-1 ekspresija audiniuose ir viduląstelinė lokalizacija

HMOX1 ekspresuojamas daugelyje žmogaus ir žinduolių organų, bet aktyviausiai blužnyje ir kituose organuose dalyvaujančiuose pasenusių eritrocitų degradacijoje (6 pav.) (HPA, 2017; NCBI, 2017(b)), bei specializuotose kepenų ir kaulų čiulpų retikuloendotelinėse ląstelėse (Ryter et al., 2006). *HMOX2* ekspresuojamas nulatose ir randamas visuose audiniuose, daugiausiai sėklidėse ir smegenyse (Ryter et al., 2006; HPA, 2017b).



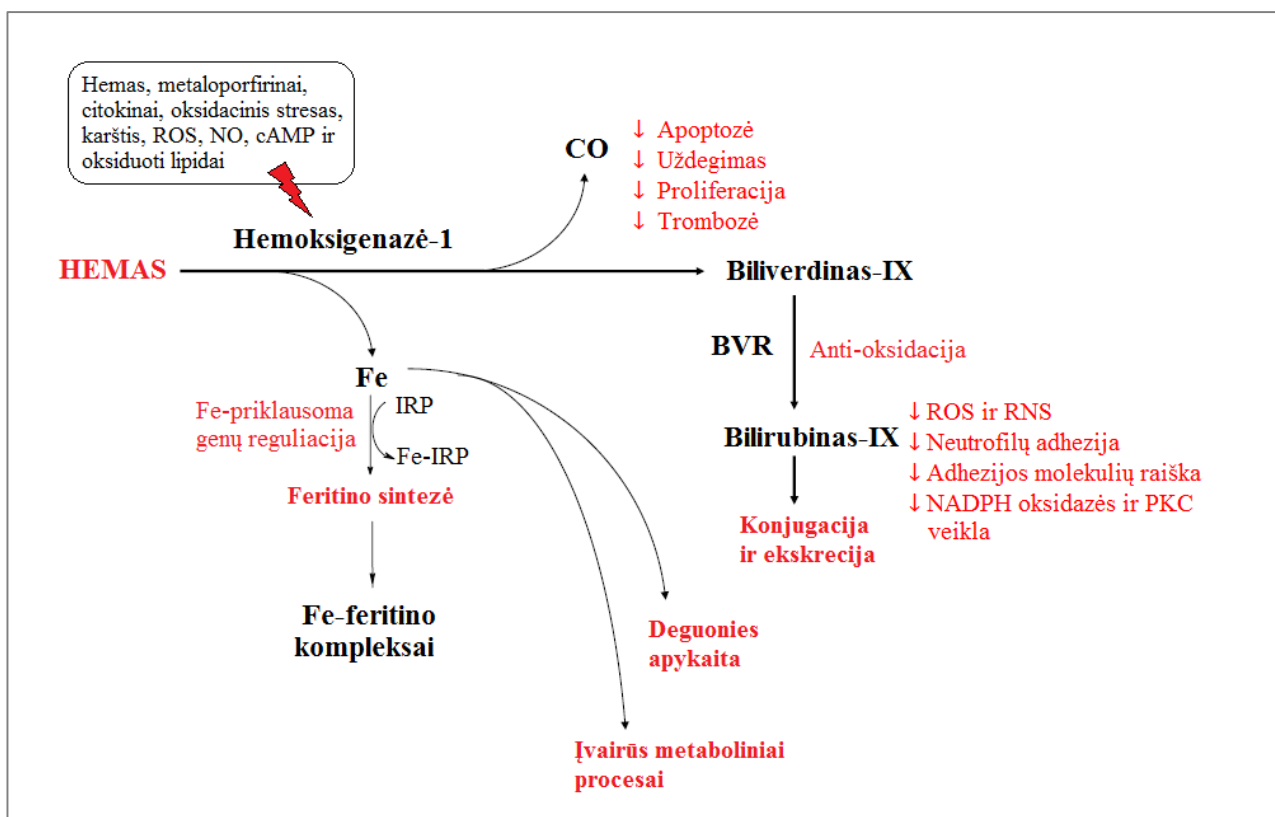
6 pav. *HMOX1* RNR raiška sveikuose žmogaus audiniuose ir organuose (TPM – transkriptų per milijoną) ir imunohistocheminės HO-1 baltymo ekspresijos nuotraukos blužnies, smegenų žievės, inkstų, limfmazgių ir kepenų audiniuose (adaptuota iš HPA, 2017a).

HO-1 fermentas žmogaus, žinduolių, graužikų ir paukščių organizme struktūriškai ir funkciškai labai panašus, o žemesniuose organizmuose (vabzdžiuose, bakterijose, grybuose, augaluose ir dumbliuose) taip pat aptinkami į HO-1 panašūs baltymai (Ryter et al., 2006).

Nuo pat atradimo 1968 metais HO-1 charakterizuojamas kaip endoplazminio tinklo (ET) baltymas (Tenhunen et al., 1968), HO-1 aptinkamas ir endotelinių ląstelių membranos kaveolėse (Ryter et al., 2006), prostatos vėžio ląstelių branduolyje (Sacca et al., 2007) ir hemu paveiktų žiurkių kepenų mitochondrijose (Stocker ir Perrella, 2006 iš Converso et al., 2006). HO-2 baltymas aptinkamas citozolyje ir pūslelėse (HPA, 2017b).

1.4.3. HO-1 reakcijos produktai

Hemoksigenazės-1 citoprotekcinės savybės yra labai priklausomos nuo HO-1 katalizuojamos reakcijos produktų funkcijos (7 pav.). Hemo degradacija ląstelėms yra ypač svarbi, dėl to kad pro-oksidas hemas yra pašalinamas ir padidėjusi bilirubino ir CO produkcija yra svarbi ląstelių apsauginių mechanizmų dalis. HO-1 indukcija gali turėti tiek naudingą, tiek žalingą poveikį, priklausomai nuo audinio ir situacijos (Ryter et al., 2006).

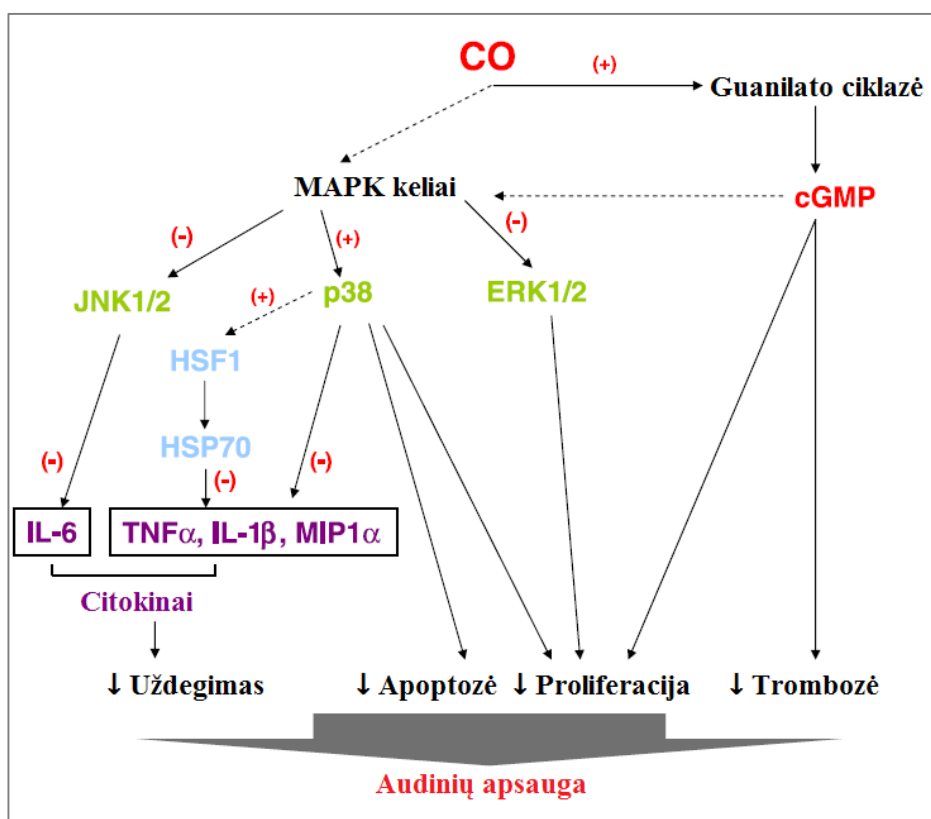


7 pav. HO-1 katalizuojamos reakcijos schema: reakcijos produktai ir jų citoprotekcinis poveikis (adaptuota iš Ryter et al., 2006; Abraham ir Kappas, 2008).

1.4.3.1. Anglies monoksidas

Biologinėse sistemose yra du pagrindiniai CO šaltiniai: HO-priklausomas ir HO-nepriklausomas, pastarojo CO yra gaunamas iš organinių molekulių, fenolių ir flavanoidų oksidacijos ir lipidų peroksidacijos (Abraham ir Kappas, 2008). HO-nepriklausomas kelias gali būti nepakankamas fiziologinėmis sąlygomis, todėl CO padidėjimas *in vivo* 80 % yra nuo indukuotos HO-1 ir pastoviai ekspresuojamos HO-2 veiklos (Abraham ir Kappas, 2008).

CO atlieka svarbų vaidmenį viduląstelinuose signaliniuose procesuose, kurie lemia anti-uždegiminius, anti-proliferacinius, anti-apoptotinius ir antikoaguliacinius poveikius (7 ir 8 pav.)(Ryter et al., 2006; Abraham ir Kappas, 2008). CO gali aktyvuoti tirpią guanilato ciklazę, kurią paprastai reguliuoja azoto oksidas (NO). Šios aktyvacijos rezultatas cGMP (ciklinio guanozino mono fosfato) produkcija (Ryter et al., 2006). Taip pat, CO gali moduluoti mitogenais aktyvuojamos baltymų kinazės (MAPK) veiklą, įskaitant p38, MAPK, ERK ir JNK kinazių kelius (Ryter et al., 2006). CO per p38 ir MAPK kelius slopina uždegimo citokinų produkciją, taip apsaugodamas audinius nuo uždegimo. CO poveikis taip pat sukelia audiniams specifiską apoptozės, proliferacijos ir trombozės indukciją. CO stimuliuoja kalio kanalus ir sukelia vazorelaksaciją, bei didina angiogenezę (Abraham ir Kappas, 2008)



8 pav. Potencialus CO Poveikis: aktyvuojama guanilato ciklazė ir MAPK signaliniai keliai, kurie lemia citoprotekcinį poveikį (adaptuota iš Ryter et al., 2006).

1.4.3.2. Geležis ir feritinas

Citoprotekcinės HO-1 funkcijos yra susijusios su geležies akumuliacija, feritino biosintezės indukcija, nuo geležies priklausomų genų moduliavimu ir anti-apoptotinėmis funkcijomis (Ryter et al., 2006). Laisvas hemas yra pavojingas oksidantas, galintis sukelti membranos lipidų peroksidaciją, o HO veiklos išlaisvinta viduląstelinė geležis ne tik svarbi metabolinių procesų dalis (deguonies pernaša, elektronų transportas, DNR sintezė, etc.), bet laisva geležis gali būti toksiška (Ponka, Beaumont ir Richardson, 1998; Ryter et al., 2006), todėl yra išsivystę mechanizmai kaip nukenksminti žalingą geležies poveikį. Geležis susijungia su citoplazminiais geležies reguliaciniais baltymais IRP1 ir IRP2 (IRP – angl. Iron regulatory proteins) ir potransliacinės reguliacijos būdu įtakoja baltymų, atsakingų už geležies homeostazę, genų raišką (Ponka et al., 1998; Ryter et al., 2006; Kühn, 2015). Labiausiai IRP reguliuoja feritino sunkiųjų ir lengvųjų grandinių transliaciją, bei transferino receptoriaus mRNR stabilumą (Ponka et al., 1998; Kühn, 2015). Ferritinas tai baltymas kaupiantis geležies atsargas, o transferino receptorius atsakingas už geležį pernešančio transferino endocitozę, daugiausiai eritroidinėse ląstelėse, kur geležis panaudojama hemoglobino sintezei (Ponka et al., 1998). Esant geležies stygiui, IRP prisijungia prie 5'-UTR regiono ir slopina feritino mRNR transliaciją, o atsipalaidavusi citoplazminė geležis susijungia su IRP ir atpalaiduoja IRP nuo feritino mRNR, taip indukuojama feritino transliacija ir geležies kaupimo funkcija. Priešingai yra su transferino receptoriaus mRNR, IRP atsipalaidavimas nuo 3'-UTR ją destabilizuoja ir tai lemia sumažėjusį geležies įsisavinimą iš plazmos (Ponka et al., 1998; Ryter et al., 2006; Kühn, 2015).

Geležis organizme yra gyvybiškai svarbi. Apie 70 % geležies randama baltymų, atsakingų už deguonies apykaitą, struktūroje (hemoglobine ir mioglobine), apie 6 % įeina į fermentų sudėtį, kurie dalyvauja svarbiuose metaboliniuose procesuose (viduląsteliname kvėpavime ir energijos metabolizme, kolageno ir kai kurių neurotransmiterių sintezėje, taip pat imuninėse reakcijose), o likusi geležies dalis tai daugiausiai geležies atsargos kaupiamos ferritine (UCSF, 2002). Ferritinas apsaugo endotelines ląsteles nuo oksiduotų mažo tankio lipoproteinų, geležies indukuoto oksidacinio streso ir UV spinduliuotės. Taip pat, feritinas yra citoprotekcinis endotelio antioksidantas, pasižymintis ir anti-apoptotinėmis savybėmis (Ponka et al., 1998; Berberat et al., 2003; Abraham ir Kappas, 2008).

1.4.3.3. Biliverdinas ir Bilirubinas

Analizuojant HO-1 svarbą, daug dėmesio skiriama tulžies pigmentams biliverdinui ir bilirubinui, kurių pagrindinis *in vivo* šaltinis yra hemoproteinų degradacija. Biliverdinas yra tirpus, žalsvas pigmentas, kuris greitai redukuojamas biliverdino reduktazės į bilirubiną, gelsvą hidrofobišką pigmentą. Kaip ir CO, bilirubinas formaliai laikomas žalingu metaboliniu produktu. Didelės bilirubino koncentracijos veikia toksiškai, ypač pavojingas naujagimiams (Ryter et al., 2006;

Abraham ir Kappas, 2008). Audiniai ir ląstelės išskiria bilirubiną į kraujo serumą, kur susijungęs su serumo albuminais yra pernešamas į kepenis. Kepenyse bilirubinas konjuguojamas su gliukurono rūgštimi fermentų UDP-gliukoroniltransferazių. Konjuguotas bilirubinas patenka į tulžį arba per žarnyną į išmatas, kuriose yra toliau degraduojamas mikroorganizmų. (Ryter et al., 2006; Durante, 2015).

Mažomis koncentracijomis bilirubinas ir biliverdinas *in vitro* veikia kaip antioksidantai, mažina ROS ir reaktyviųjų azoto formų (RNS) sukeltą oksidacinį stresą, bei apsaugo endotelines ląsteles nuo uždegimo ir apoptozės (Ryter et al., 2006; Abraham ir Kappas, 2008; Durante, 2015). Nustatyta, kad bilirubinas mažina adhezijos molekulių ekspresiją ir neutrofilų adheziją, uždegimą, bei slopina NADPH oksidazių ir baltymų kinazių C veikimą (Abraham ir Kappas, 2008; Durante, 2015). NADPH oksidazės tai plazminės membranos fermentų grupė katalizuojanti deguonies redukciją, naudojant NADPH kaip elektronų donorą. Redukuotas deguonis naudojamas įvairių ROS gamybai, kuriuos naudoja imuninę funkciją atliekantys fagocitai (Babior, 1999). Baltymų kinazės C tai signalinių fermentų šeima dalyvaujanti ląstelių proliferacijoje, išgyvenamume, invazijoje, migracijoje, apoptozėje, angiogenezėje ir vaistų rezistentiškumo mechanizmuose (Kang, 2014). HO-1 ir BVR sintezuotas bilirubinas aktyvuoja fermentus, kurie endotelinėse ląstelėse didina vazodilataciją ir jautrumą insulinui (Durante, 2015).

1.4.4. HO-1 indukcija

HO-1 indukuojama įvairių skirtingų molekulių ir veiksnių, tokių kaip reakcijos substratas hemas, azoto oksidas, citokinai, stresas, angiogenezė, sunkieji metalai, endotoksinai, hipoksija, ultravioletinė spinduliuotė, karščio stresas, prostaglandinai, peroksidai ir kt. (Berberat et al., 2005; Ryter et al., 2006; Stocker ir Perrella, 2006; Abraham ir Kappas, 2008). Padidėjusi HO-1 biosintezė yra biologinių sistemų atsakas į stresą, kuris priklauso nuo *HMOX1* transkripcijos aktyvacijos ir *de novo* mRNR sintezės (Ryter et al., 2006).

HO-1 priskiriama HSP streso baltymų šeimai, kurių transkripcijos reguliacija priklauso nuo nepalankių aplinkos sąlygų ir dažniausiai yra atsakas į hipertermijos sukeltą baltymų denatūraciją (Subjeck ir Shyy, 1986; Ryter et al., 2006). HO-1 neturi HSP būdingų homologiškų amino rūgščių sekų ir nepasižymi baltyminių šaperonų aktyvumu, tačiau *HMOX1* genas turi HSP genams būdingus elementus ir dėl transkripcijos atsako į hipertermiją graužikuose, HO-1 kartais dar vadinamas HSP32 (Shibahara, Müller ir Taguchi, 1987; Ryter et al., 2006).

Kita streso baltymų klasė – gliukoze reguliuojami baltymai (GRP), kurie yra susiję su endoplazminio tinklo stresu. GRP transkripcija indukuojama esant gliukozės nepakankamumui, ląstelinės kalcio homeostazės sutrikimams, baltymų glikozilinimo interferencijai ir neteisingai

susipakavusių baltymų ekspresijai (Lee, 2001). HO-1 baltymas, kurio pagrindinė lokalizacija ET, kaikuriuose ląstelių tipuose galima transkripcijos aktyvacija esant maistingųjų medžiagų trūkumui (Chang, Garcia, Melendez, Kilberg ir Agarwal, 2003; Ryter et al., 2006). Nustatyta bendra GRP ir HO-1 indukcija hepatomos ląstelių kultūrose, esant gliukozės nepakankamumui (Chang et al., 2003). HO-1 indukciją gali sukelti ir kiti ET streso induktoriai, tokie kaip thapsargininas, kuris sumažina ET kalcio atsargas, arba brefeldinas A, kuris interferuoja glikozilintų baltymų translokaciją (Liu et al., 2005; Ryter et al., 2006). Cheminiai proteosomos inhibitoriai gali aktyvuoti *HMOX1* paraleliai su ET streso atsaku (Wu, Chi, Ho, Tsao ir Lin, 2004; Ryter et al., 2006).

Yra keletas hipotezių dėl HO-1 indukcijos. Pirmoji, tai kad hemas pats yra stiprus induktorius ir sąlygos didinančios ląstelinio hemo koncentraciją, tuo pačiu aktyvina HO-1 (Kikuchi ir Yoshida, 1983; Ryter et al, 2006). Tačiau ne visi veiksniai didinantys *HMOX1* indukciją, sukelia hemoproteinų degradaciją (Kikuchi ir Yoshida, 1983; Ryter et al, 2006). Antroji, kad ląstelinis ROS aktyvuoja redokso reguliuojamus indukcijos kelius. Ši hipotezė paremta tuo, kad didžioji dalis induktorių yra oksidatoriai arba susiję su ROS gamyba (Ryter et al, 2006). Trečioji, kad pakitimai viduląstelinėje tiolių pusiausvyroje, išreikštoje viduląstelinio redukuoto glutationo (GSH) ir oksiduoto glutationo (GSSH) santykiu, veikia kaip oksidacinio streso jutikliai arba yra bent susiję su redokso signalinių kelių aktyvacija, kurie susiję su *HMOX1* ekspresija. Dauguma medžiagų susijusių su ROS ir RNS generacija ar tiesiogiai reaguojančių su laisvomis tiolių grupėmis aktyviai mažina viduląstelinio GSH prieinamumą (Ryter et al, 2006).

Dauguma HO-1 induktorių aktyvuoja baltymų fosforilinimo priklausomas signalų kaskadas, kurios galiausiai paveikia *HMOX1* raišką reguliuojančius transkripcijos faktorius (Ryter et al, 2006). Didelį vaidmenį atlieka MAPK kinazių sistema, tačiau tirozino kinazės, fosfatidilinositol-3-kinazės ir baltymų kinazės A, G ir C taip pat potencialiai papildo aktyvinimo mechanizmą (Elbirt ir Bonkovsky, 1999; Ryter et al, 2006). MAPK tai konservatyvi ir universali signalų transdukcijos superšeima Ser/Thr baltymų kinazių, kurios reguliuoja ląstelių augimą, apoptozę, judėjimą, diferenciaciją ir atsaką į aplinkos stimulus. MAPK superšeimą sudaro trys pagrindinės signalų kaskados: ekstraląstelinio signalų reguliuojamos kinazės (ERK1/2 keliai), c-Jun NH₂-terminalinės kinazės arba streso aktyvuojamos kinazės (JNK/SAPK) ir p38 MAPK kinazės. Kiekviename kelyje galioja kinazių hierarchija, kurios fosforilina ir aktyvina kitas kinazes. Įrodyta, kad daugelyje ląstelių struktūriškai ir funkciškai didelė veiksmų įvairovė, kuri indukuoja HO-1, paraleliai aktyvuoja vieną ar daugiau MAPK kaskadų (Kyriakis ir Avruch, 2001; Cowan ir Storey, 2003; Ryter et al, 2006). Specifinė MAPK kelių aktyvacijos variacija priklauso nuo induktoriaus ir ląstelių tipo ar rūšies (Ryter et al, 2006). Pavyzdžiui, p38 MAPK ir ERK keliai lėmė *HMOX1* indukciją, kadmiu paveiktose žmogaus skrandžio vėžio ląstelėse (Liu, Moënné-Loccoz, Loehr ir Ortiz de Montellano, 1997), o krūties vėžio ląstelėse tik p38 MAPK (Alam et al., 2000). Skirtingi ekstraląsteliniai ir viduląsteliniai

faktoriai aktyvuoja sudėtingus signalinius kelius, priklausomus nuo veiksnio ir ląstelių tipo, kurie aktyvuoja įvairius branduolio transkripcijos faktorius, veikiančius HO-1 geno transkripciją (Ryter et al, 2006).

1.4.5. HO-1 vaidmuo kancerogenezėje

HO-1 ekspresija labai padidėja ląstelinio streso sąlygomis ir HO-1 pagrindinė funkcija yra apsaugoti nuo oksidacinių pažeidimų. Be to, reguliuoja ląstelių proliferaciją, moduliuoja uždegiminį atsaką ir gerina angiogenezę. HO-1 poveikis aptiktas daugelyje patologinių būklių, pavyzdžiui, aterosklerozė, diabetas, išeminės/reperfuzinės pažeidos ar organų transplantacija (Abraham ir Kappas, 2008; Was et al., 2010). HO-1 hiperekspresija nustatoma daugelyje vėžinių audinių, tokių kaip limfosarkoma, prostatos vėžys, smegenų vėžys, adenokarcinoma, hepatoma, glioblastoma, melanoma, kasos vėžys ir kituose (Was et al., 2010), bei dar labiau suaktyvėja po radioterapijos, chemoterapijos ar fotodinaminio gydymo. Teigiama, kad HO-1 baltymas svarbus kancerogenezėje ir spartina auglių augimą ir plitimą, todėl medžiagos veikiančios HO-1 veiklą ir raišką gali būti svarbus įrankis stabdant įvairių vėžio tipų progresavimą ir gali padidinti jų jautrumą priešvėžinėms terapijoms (Berberat et al., 2005; Was et al., 2010).

1.3.5.1. Vėžio proliferacija

HO-1 itin aktyvi sparčiai besidalijančiose ląstelėse, pažeistose odos epitelio ląstelėse ar vėžinėse ląstelėse augančiuose augliuose. HO-1 stimuliuoja keratinocitų, kraujagyslių endotelio ar reguliacinių CD4⁺ CD25⁺ T limfocitų proliferaciją, bet inhibuoja dalijimasi fibroblastų, lygiųjų miocitų, epitelio ląstelių, efektorinių T limfocitų ir astroglijos ląstelių (Was et al., 2010). Navikuose HO-1 veikla taip pat labai priklauso nuo ląstelių tipo. HO-1 hiperekspresija padidino melanomos ląstelių proliferaciją, o HO-1 inhibicija sumažino dalijimąsi kasos, prostatos, hepatoląstelinės ir kitų vėžio tipų ląstelių. Antiproliferacinis HO-1 poveikis nustatytas plaučių adenokarcinomos, krūties vėžio ir prostatos vėžio ląstelėse (2 lentelė)(Was et al., 2010).

1.3.5.2. Citoprotekcija ir apoptozė

HO-1 apsaugo ląsteles nuo oksidacinės žalos ir skirtingose ląstelėse slopina apoptozę, mažindamas viduląstelinį oksidantų kiekį, didindamas bilirubino kiekį ir CO produkciją (Eisenstein, Garcia-Mayol, Pettingel ir Munro, 1991; Fang, Akaike ir Maeda, 2004). HO-1 citoprotekcijos svarba buvo nustatyta įvairiose ligose: aterosklerozėje, išemijos-reperfuzijos ir ūmaus inkstų pažeidimo, toksinės nefropatijos, cisplatinos nefrotoksiškumo ar endotoksinio šoko (Fang et al., 2004). Citoprotekcinis ir antiapoptotinis HO-1 poveikis įrodytas vėžinėse ląstelėse. Farmakologinė ir

genetinė HO-1 aktyvacija reikšmingai padidino išgyvenamumą hepatomos, skydliaukės karcinomos, lėtinės mieloidinės leukemijos, skrandžio karcinomos, gaubtinės žarnos karcinomos, melanomos, plaučių karcinomos ir gliomos, o HO-1 inhibicija sumažino gyvybingumą ūmios mieloidinės leukemijos ir hormonams atsparaus prostatos vėžio (2 lentelė) (Was et al., 2010). Taikant priešvėžinį gydymą HO-1 raiška dar labiau padidėja, didindama ir vėžio rezistentiškumą (Berberat et al., 2005). HO-1 indukcija nevisada apsaugo ląsteles nuo chemoterapijos indukuotos apoptozės, tai parodė tyrimas su krūties karcinoma ir B-limfoblastais (Andreadi, Howells, Atherfold ir Manson, 2006).

1.3.5.3. Angiogenezė

Angiogenezė yra labai svarbus veiksnys vėžio augimui ir plitimui. HO-1 vaidmuo angiogenezėje susijęs su kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus VEGF produkcija. Genetinė HO-1 hiperekspresija padidino VEGF ir jo poveikį endotelinėse ląstelėse: proliferaciją, migraciją, kapiliarinių struktūrų formavimąsi (Józkowicz et al., 2003; Was et al., 2010). HO-1 proangiogeninis poveikis taip pat pasireiškia per fermentą timidino fosforilazę, kuri stimuliuoja endotelinių ląstelių migraciją ir kapiliarų formavimą *in vitro* ir *in vivo* (Moghaddam et al., 1995).

2 Lentelė. Skirtingas HO-1 hiperekspresijos poveikis skirtingų vėžio tipų proliferacijai, apoptozei, angiogenezei ir metastazėms (adaptuota iš Was et al., 2010).

HO-1 Poveikis	Vėžio tipas
↑ Proliferacija	Prostatos v., sarkoma, hepatoma, hepatoląstelinis v., endotelioma, kasos v., angioma, melanoma, plaučių vėžys, neoplastinių kamieninių ląstelių v., šlapimo trakto v.
↓ Proliferacija	Prostatos v., plaučių adenokarcinoma, krūties v.
↑ Apoptozė	Krūties v.
↓ Apoptozė	Hepatoma, sarkoma, kasos v., lėtinė mieloidinė leukemija, šlapimo trakto karcinoma, melanoma, skydliaukės karcinoma, skrandžio karcinoma, žarnyno karcinoma, plaučių karcinoma, ūmi mieloidinė leukemija ir kt.
↑ Angiogenezė	Hepatoląstelinė karcinoma, glioma, melanoma, endotelioma, kasos v., plaučių v., fibrosarkoma, krūties karcinoma.
↑ Metastazės	Prostatos v., melanoma, kasos v., oralinė raginio epitelio karcinoma
↓ Metastazės	Oralinė karcinoma, krūties v., kolorektalinis v.

1.3.5.4. Metastazės

Angiogenezė yra ne tik svarbi vėžio augimui, bet ir metastazėms. Tai kompleksinis procesas apimantis ląstelių adheziją, aplinkinio ekstraląstelinio matrikso degradaciją, migraciją, proliferaciją ir vascularizaciją naujai susiformavusiuose vėžio židiniuose (Was et al., 2010). Metastazės plinta trimis būdais – lokalus plitimas į gretimus audinius, per kraujotaką į kitus organus ir per limfinę sistemą į gretimus ir tolimus limfmazgius (Price ir Thompson, 2002; Was et al., 2010).

Dėl proangiogeninių HO-1 savybių, buvo patvirtinta, kad HO-1 susijęs su padidėjusia metastazių rizika kaikiuriuose vėžio modeliuose. Modifikuotos melanomos ir kasos vėžio ląstelės, kurios hiperekspresuoja HO-1, formavo žymiai daugiau metastazių pelių plaučiuose, nei jų laukinio tipo analogai (Was et al., 2006). Farmakologinė HO-1 inhibicija visiškai nuslopino metastazavimą (Was et al., 2006). HO-1 geno nuslopinimas prostatos karcinomoje sumažino ląstelių invaziją *in vitro* ir inhibavo augimą pirminių ir metastazinių navikų *in vivo* (Alaoui-Jamali et al., 2009). Kaip ir visur, HO-1 poveikis priklauso nuo ląstelių tipo ir būsenos. Kolorektalinėje ir oralinėje karcinomoje HO-1 apibūdintas kaip mažos metastazių rizikos markeris (2 lentelė) (Was et al., 2010).

1.4.6. HO-1 raiška kasos adenokarcinomos ląstelėse

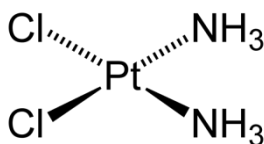
Berberat su kolegomis (2005) nustatė HO-1 hiperekspresiją kasos vėžio ląstelėse Colo357, Panc-1, MiaPaCa ir SU.86.86. Kasos vėžio ląstelėse nustatytas 6 kartus didesnis HO-1 mRNR ir 3,5 karto didesnis HO-1 baltymo kiekis nei normaliose kasos ląstelėse. Paveikus ląsteles chemoterapija ir radioterapija HO-1 ekspresija dar labiau padidėjo. HO-1 mRNR ir baltymo kiekis Panc-1 ir Colo357 ląstelių kultūrose buvo nustatytas žymiai didesnis nei MiaPaCa ir SU.86.86. Imunohistochemija parodė, jog HO-1 yra ne tik kasos vėžio ląstelėse, bet ir šalia naviko lokalizuotuose imunocituose. Inhibavus HO-1 ekspresiją, sumažėjo HO-1 kiekis ir aktyvumas, sumažėjo visų keturių kasos vėžio ląstelių linijų proliferacija, padidėjo jautrumas oksidaciniam stresui, chemoterapijai ir radioterapijai. Paveikus oksidaciniu stresu ląstelių gyvbingumas sumažėjo nuo 12 iki 20 %, nuo 5 iki 9 % paveikus chemoterapija gemcitabinu ir nuo 13 iki 23 % γ spindulių radioterapija (Berberat et al., 2005).

Jakštaitė et al.(2015) ištyrė RNR surišančio baltymo baltymo HuR (ELAV1), kuris atlieka citoprotekcinį baltymų, tokių kaip HO-1 ir COX-2 (ciklooksigenazė-2) potranskripcines modifikacijas, ekspresiją kasos vėžio ląstelėse MiaPaca2, Su.86.86, Capan-1, Capan-2 ir poveikį HO-1 ir COX-2. Pacientų audiniuose nepaveiktuose gemcitabinu HuR mRNR ekspresija buvo 3,2 karto mažesnė, o COX-2 ir HO-1 mRNR buvo atitinkamai 2,3 ir 7,2 karto didesnė nei normaliame kasos audinyje. Nustatyta HuR, COX-2 ir HO-1 mRNR hiperekspresija visose keturiose ląstelių kultūrose paveikus puse maksimaliai slopinančios dozės (IC50 - Half maximal inhibitory concentration)

gemcitabino. Užslopinus HuR su anti-HuR siRNR žymiai sumažėjo COX-2 ir HO-1 lygis ląstelėse ir padidėjo jų jautrumas gemcitabinui, ląstelių gyvybingumas sumažėjo 11,6 – 53,7 %, buvo indukuota nuo kaspazių priklausoma apoptozė (Jakštaitė et al., 2015).

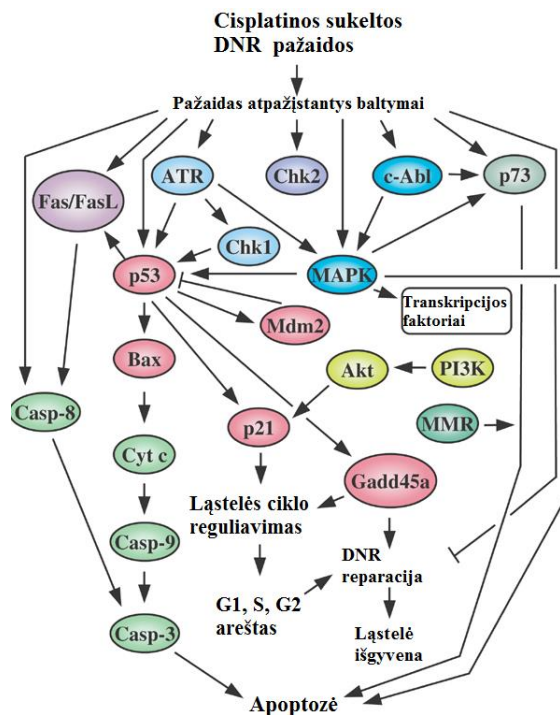
1.5. Cisplatina

Cisplatina arba CDDP (*cis*-diamino-dicloro-platina)(9 pav.) - tai vienas iš platinos junginių naudojamų chemoterapijoje (Siddik, 2003; Florea ir Büsselberg, 2011). Klinikoje dažnai sutinkamas generiniu pavadinimu - Platinol. Kambario temperatūroje cisplatina yra balti-ryškiai geltoni milteliai, mažai tirpūs vandenyje ir ganėtinai stabilūs normaliomis sąlygomis (Dasari ir Tchounwou, 2014). Cisplatina taikoma skirtingų tipų vėžiui gydyti, įskaitant karcinomas, limfomas, sarkomas, minkštųjų audinių, kaulų, raumenų, kraujo vėžį ir kitus (Florea ir Büsselberg, 2011; Dasari ir Tchounwou, 2014). Jos veikimas susijęs su poveikiu DNR reparacijai, DNR žala ir apoptozės indukcija. Dėl vėžio atsparumo cisplatinai ir gausybės nepageidaujamų šalutinių poveikių, tokių kaip nefrotoksiškumas, alerginės reakcijos, imunosupresija, virškinamojo trakto sutrikimai, hemoragijos ir klausos netekimas, dažniau naudojami kiti platinos junginiai, tokie kaip karboplatina, oxaliplatina ir kiti. (Florea ir Büsselberg, 2011; Dasari ir Tchounwou, 2014).



9 pav. Cisplatinos molekulės struktūros modelis.

Cisplatina transportinių ląstelės membranos baltymų pernešama į ląstelės vidų ir tampa aktyvi. Citoplazmoje cisplatinos chlorido jonai pakeičiami vandens molekulėmis ir ši hidrolizuota forma tampa potencialiu elektrofilu, kuris gali reaguoti su nukleofilais, tokiais kaip baltymų sulfohidrilo grupės ir nukleorūgščių azoto donoriniais atomais (Dasari ir Tchounwou, 2014). Cisplatina prisijungia prie dviejų DNR grandinėje greta esančių guanino (GpG) arba adenino ir guanino (ApG) bazių azoto atomų ir ši sąveika sukelia DNR sulenkimą, kas sustabdo DNR replikaciją ir reparaciją, bei indukuoja apoptozę (Dasari ir Tchounwou, 2014). Šios DNR pažaidos indukuoja sudėtingus reparacijos mechanizmus ir galutinis poveikis priklausys nuo to kokie signaliniai keliai ląstelėse yra aktyviausi (10 pav.)(Siddik, 2003).

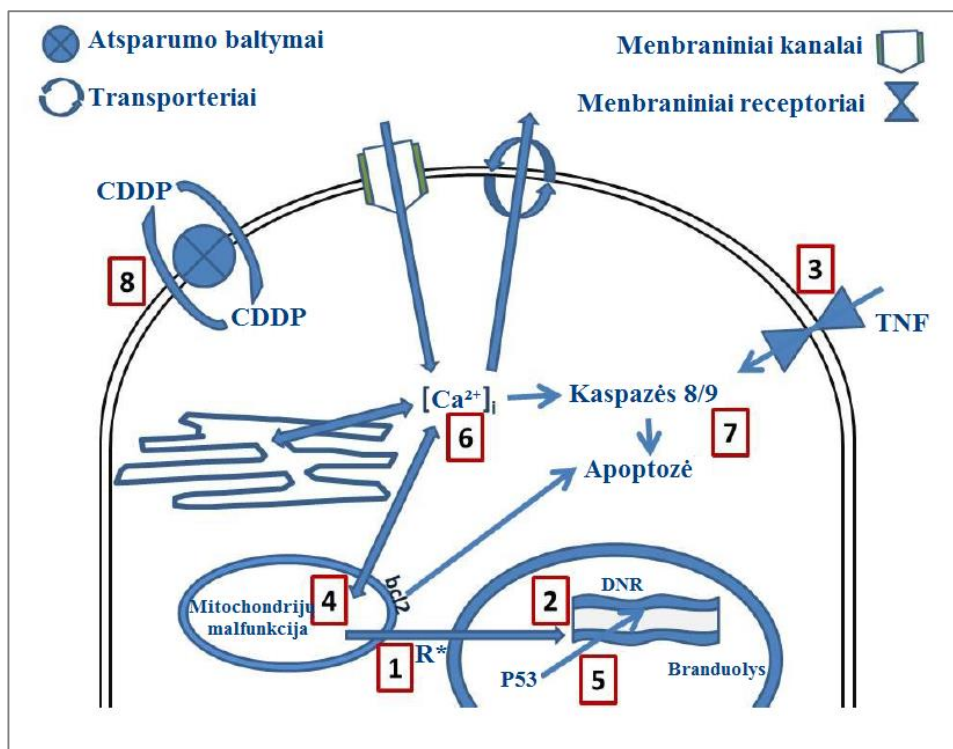


10 pav. Su DNR pažeidomiais susiję ląstelės žūties ir išgyvenamumo mechanizmai. Cisplatinos poveikis priklauso nuo to, kokie signaliniai keliai vėžinėje ląstelėje aktyvūs. Dažnai aptinkama p53 mutacija mažina cisplatinos ir daugelio kitų chemoterapinių vaistų efektyvumą (Siddik, 2003).

Vienas iš svarbiausių cisplatinos toksiškumo mechanizmų yra oksidacinis stresas (11 pav.). Vėžinės ląstelės stipriau nei normalios ląstelės patiria didesnį reaktyviųjų deguonies formų (ROS) stresą, dėl onkogeninės stimuliacijos, padidėjusio metabolinio aktyvumo ir mitochondrijų malfunkcijos. Cisplatinos indukuotas oksidacinis stresas pažeidžia mitochondrijos baltymus, inhibuoja kalcio jonų absorbciją ir mažina mitochondrijų membraninį potencialą (Saad, Najjar ir Alashari, 2004). ROS formavimasis priklauso nuo cisplatinos koncentracijos ir poveikio trukmės (Dasari ir Tchounwou, 2014 iš Brozovic ir kt., 2010). ROS indukuoja apoptozę išoriniu ir vidiniu keliais (Ozben, 2007). Išoriniu keliu padidinamas jautrumas auglių nekrozės faktorių (TNF) šeimos junginiams ir aktyvuojama nuo FAS ligando priklausomų baltymų su mirties domenu ir kaspazių indukuojama apoptozė (Gupta et al., 2012). Vidiniu keliu ROS skatina citochromo c išskyrimą aktyvuodamas poras-stabilizuojančius baltymus (Bcl-2 ir Bcl-xL) ir inhibuodamas poras-destabilizuojančius baltymus (Martindale ir Holbrook, 2002; Dasari ir Tchounwou, 2014).

Cisplatina skatina kalcio jonų perėjimą iš mitochondrijos matriksą į ląstelės citoplazmą (11 pav.). Sutrikusi kalcio homeostazė veikia daugybę ląstelės funkcijų, tokių kaip lipidų peroksidacija ir fermentų aktyvacijos procesai. Mitochondrijų glutationas (GSH) svarbus antioksidantas reguliuojantis mitochondrijų vidinės membranos pralaidumą ir fermentų funkciją palaikydamas SH redukuotoje formoje (Dasari ir Tchounwou, 2014). Kai fermentų SH grupės nepalaikomos redukuotoje formoje, fermentai tampa neaktyvūs. Cisplatina mažina intraląstelinio GSH ir baltymų su SH grupėmis

koncentraciją, bei sumažina NADH, kuris padeda palaikyti SH grupes (Dasari ir Tchounwou, 2014). GSH ir NADH sumažėjimas inhibuoja kai kurias dehidrogenazes ko rezultatas atskirtas oksidacinis fosforilinimas ir reaktyviųjų radikalų formavimasis. Laisvieji radikalai lemia lipidų peroksidaciją ir atakuoja baltymus (Dasari ir Tchounwou, 2014).



11 pav. Cisplatinos multifunkcinio toksiškumo schema: (1) ROS stresas; (2) DNR pažeidimas; (3) TNF aktyvacija; (4) mitochondrijų malfunkcija; (5) p53; (6) Ca²⁺ homeostazės sutrikimas; (7) Kaspazių aktyvacija; (8) vaistams atsparūs baltymai (Florea ir Büsselberg, 2011).

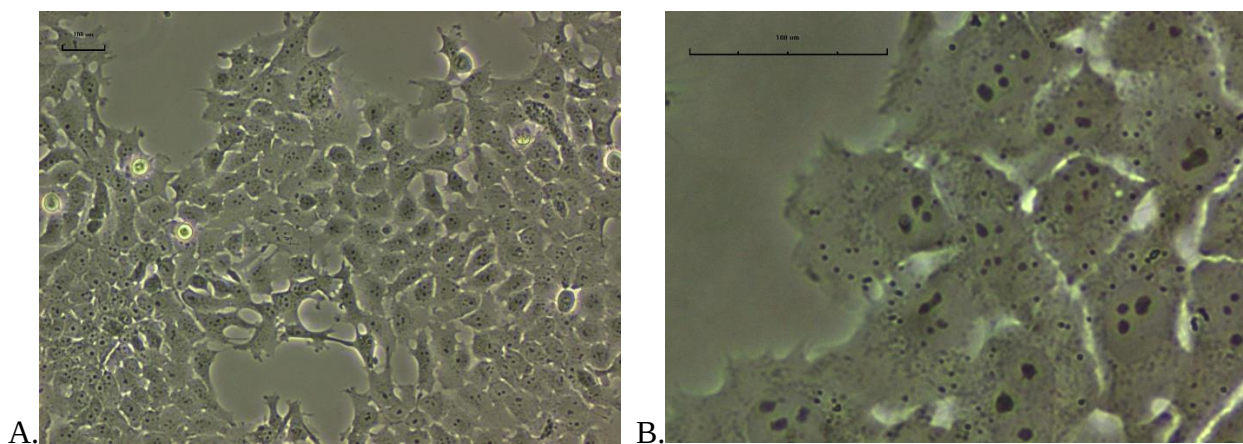
Apoptozė yra užprogramuota ląstelių žūtis, naudojanti energiją ir lemianti ląstelės susitraukimą, chromatino kondensaciją, membranos irimą ir protezių kaspazių aktyvaciją (Salvesen ir Dixit, 1997). Kaspazių aktyvacija yra svarbus žingsnis apoptozėje ir kai kurie stimulai jas aktyvuoja, tarp jų aktyvuojantys plazminės membranos mirties receptorių (kaspazė 8) ir sukeliantys mitochondrijų disfunkciją (kaspazė 9). Kaspazės gali būti apoptozės iniciatorės (kaspazė 8 ir 9) arba vykdytojos (kaspazė 3 ir 7) (Salvesen ir Abrams, 2004). Iniciatorės indukuoja vykdytojas, kurios signaliniais keliais inicijuoja apoptozę. Cisplatinos citotoksinio poveikio indukuotos DNR pažeidimas, ROS stresas, Ca²⁺ balanso sutrikimai ir kiti ląstelės veiklos pažeidimai aktyvuoja kaspazių kaskadą ir inicijuoja apoptozę (11 pav.).

Cisplatina veikia per daugybę mechanizmų, tačiau vėžinės ląstelės geba įgyti atsparumą. Atsparumas susijęs su sumažėjusiu vaisto įsisavinimu, vaisto inaktyvacijos ir DNR reparacijos mechanizmų indukcija. Svarbų vaidmenį atlieka ir mutacijos ląstelių ciklą reguliuojančiuose

baltymuose, antiapoptotinių faktorių hiperekspresija (Siddik, 2003). Cisplatinos taikymas su kitais vaistais ar kombinuotais metodais sumažina vėžinių ląstelių atsparumą gydymui.

1.6. Kasos adenokarcinomos ląstelių linija T3M4

Hiperterminės chemoterapijos tyrimams *in vitro* naudotos kelios ląstelių linijos, viena iš jų žmogaus kasos adenokarcinomos ląstelės T3M4. T3M4 ląstelės išskirtos 1977 metais iš žmogaus kasos egzokrininės adenokarcinomos (Okabe et al., 1983). Jos ypatingos tuo, kad produkuoja žmogaus karcinoembrioninį antigeną (angl. carcinoembryonic antigen – CEA) (Okabe et al., 1983), kuris yra nespecifinis klinikinis kasos vėžio žymuo dažnai nustatomas pacientams sergantiems kasos vėžiu.



12 pav. T3M4 ląstelių kultūros fotografijos stebint šviesiniu inversiniu mikroskopu ir naudojant skirtingo didinimo objektyvus (mastelis 100 µm): A - 10x objektyvą; B - 40x objektyvą.

Šiuolaikiniais molekulinės biologijos metodais buvo nustatytas ir sudarytas T3M4 ląstelių mutacijų profilis iš maždaug 88 mutacijų (Koscielny et al., 2016), tarp kurių nustatyta ir mutacija auglių supresijos gene *TP53*, kuris atsakingas už p53 izoformų sintezę, 220 pozicijoje adeninas pakeistas į guaniną ir dėl to baltymo struktūroje amino rūgštis tirozinas pasikeičia į cisteiną. Taip pat, nustatytas ir metilintas *p16* genas (Moore et al., 2001).

T3M4 ląstelės auginamos *in vitro* formuoja pasklidusį adhezinį monosluoksnį auginimo indų dugno paviršiuje. Panašios į epitelines ląsteles su dideliu branduoliu citoplazmos centre, citoplazminės membranos paviršius grublėtas su mikrogaureliais ir lamelipodijomis (12 pav.). Ląstelių populiacija dvigubėja maždaug kas 20 valandų.

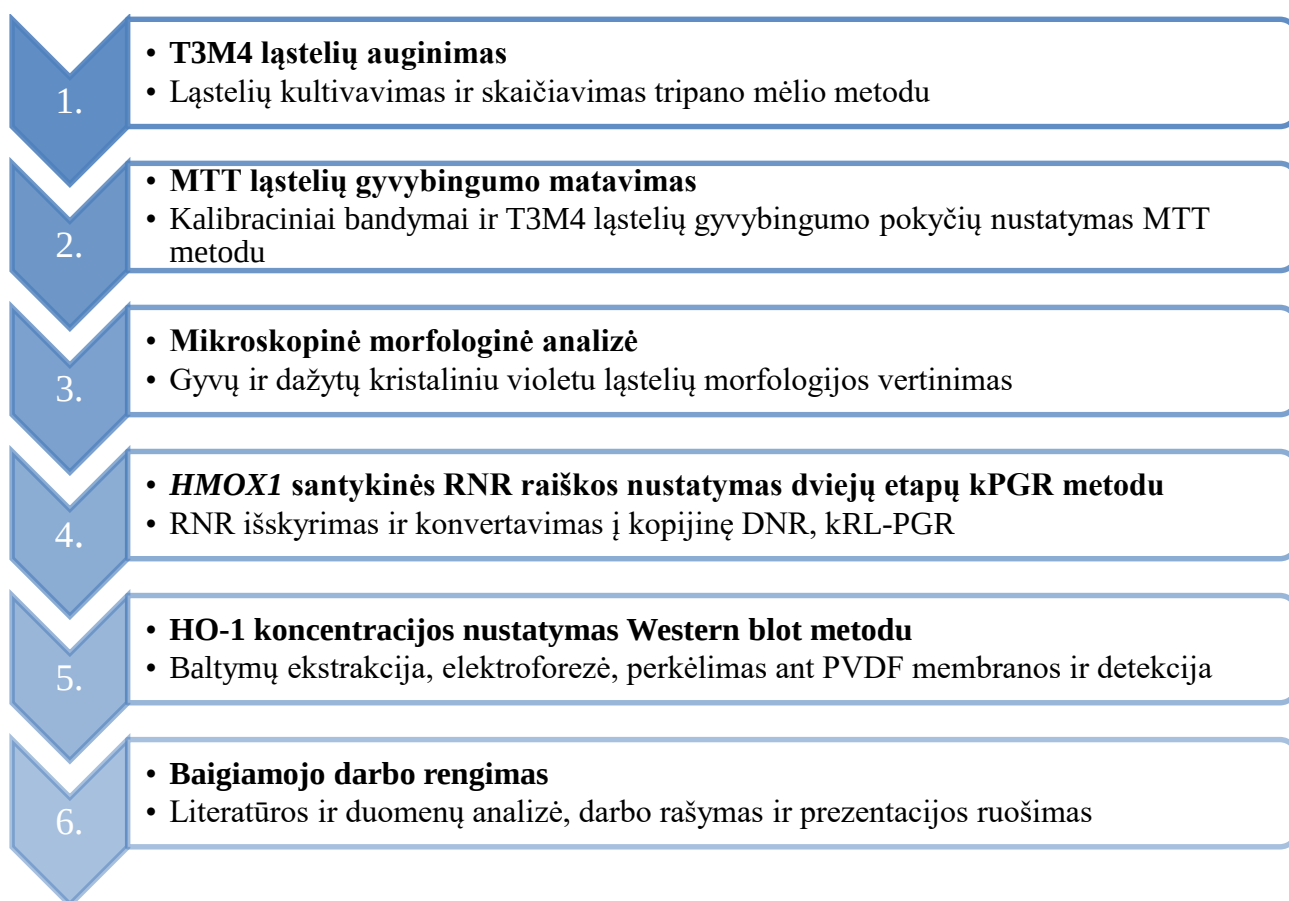
2. TYRIMO METODIKA

2.1. Tyrimo organizavimas

Prieš atliekant tyrimą susipažinta su Chirurginės gastroenterologijos laboratorijos įranga ir vidaus taisyklėmis. Tyrimo eigoje (13 pav.) analizuota mokslinė literatūra kasos vėžio ir hiperterminės chemoterapijos tematika, didelis dėmesys skirtas HO-1 baltymo fiziologinėms savybėms, tyrimo metodams ir galimybėms. Sudarytas planas – nustatytas tyrimo tikslas, išskirti uždaviniai, suderinti tyrimo metodai, bei eksperimento protokolai.

Tyrimo objektas

Šio tyrimo objektas – žmogaus kasos adenokarcinomos ląstelių linija T3M4, kuri valandai buvo paveikta skirtingomis hiperterminės chemoterapijos sąlygomis ir po 48 valandų nustatyti T3M4 ląstelių gyvybingumo ir morfologijos pokyčiai, bei iš RNR ir baltymų ekstraktų tirta HO-1 raiška.



13 pav. Tiriamojo darbo etapai ir taikyta metodika.

2.2. T3M4 ląstelių auginimas

Kasos adenokarcinomos ląstelių linija T3M4 kultivuojama pagal tiekėjo ir laboratorijos protokolus. Ląstelės auginamos steriliuose 25 cm² ir 75 cm² talpos specialiuose plastikiniuose flakonuose su filtriniais kamščiais, o eksperimentams buvo auginamos ir kituose auginimo induose (TPP®, Šveicarija) su atitinkamu kiekiu auginimo terpės (3 lentelė). Auginimo terpė T3M4 vėžinėms ląstelėms ruošama iš modifikuotos terpės RPMI 1640 + GlutaMAX (Gibco™) su 10 % fetalinio veršelių serumo (angl. fetal bovine serum) (Gibco™) ir 1 % antibiotikų mišinio (penicilino 100 U/ml ir streptomicino 100 µg, Gibco™). Ląstelių kultūra auginama inkubatoriuje Galaxy 170R (Eppendorf, Vokietija), kuris palaiko 37 °C temperatūrą, 95 – 98 % drėgnumą ir 5 % CO₂ prisotintą aplinką. T3M4 ląstelės persėjamos du kartus per savaitę.

3 lentelė. Naudojami auginimo indai ir rekomenduojamas auginimo terpės tūris.

Auginimo indai	Auginimo terpės tūris
25 cm ² flakonas	5 ml
75 cm ² flakonas	10 ml
150 cm ² flakonas	20 ml
100 mm petri lėkštelė	10 ml
6 – ių šulinėlių plokštelė	2 ml*
24 – ių šulinėlių plokštelė	1 ml*
96 – ių šulinėlių plokštelė	0,2 ml*

* terpės tūris vienam plokštelės šulinėliui

2.2.1. T3M4 ląstelių kultivavimas ir skaičiavimas

Visi darbai atliekami tik su sveikomis ląstelėmis ir laikantis ląstelių kultūrų laboratorijos švaros reikalavimų. Darbo metu mūvimos lateksinės pirštinės be pudros. Visi veiksmai su T3M4 ir kitomis ląstelių kultūromis atliekami vertikalios srauto laminare Clean Air (Telstar, Nyderlandai), kurio darbinis paviršius sterilizuojamas 15 minučių įjungiant UV lempą ir prieš pat darbą dezinfekuojamas 70 % etanoliu. Taip pat dezinfekuojamos automatinės pipetės (Eppendorf, Vokietija), skysčių pritraukėjas (Gilson, Vokietija) ir visos priemonės, kurios įnešamos į laminaro vidų. Pasiruošiami švarūs ląstelių auginimo indai ir visos reikiamos terpės pašildomos 37 °C temperatūros vandens vonelėje BWT-U (BioSan, Latvija) su maišymo funkcija ir termostatu.

Ruošiant ląstelių suspensiją eksperimentui arba persėjimui, pirmiausiai nupilama auginimo terpė. Terpės likučiai ir žuvusios ląstelės nuplaunamos 3 - 5 ml steriliu 1x PBS fosfatiniu buferiu (angl. phosphate buffered saline)(Gibco™), kuris po to švariai pašalinamas. Ant ląstelių

monosluoksniu pilama 2 ml 0,25% Tripsino (Gibco™) ir inkubuojama 37 °C temperatūroje apie 7 min., kol ląstelės atkibs nuo indo paviršiaus. Ląstelių atkibimas įvertinamas mikroskopu ir plika akimi. Tripsinas inaktyvuojamas jį praskiedžiant su 10 ml auginimo terpės. Ląstelių, tripsino ir terpės mišinys perkeliamas į 15 ml talpos mėgintuvėlį ir centrifuguojamas 5 min. 800 aps/min greičiu, kambario temperatūroje (KT). Gautas supernatantas nupilamas, o ant nusėdusių ląstelių užpilama 1 ml auginimo terpės ir pipete švelniai suspenduojama. Dalis gautos ląstelių suspensijos užsėjama į švarų ląstelių auginimo indą su šilta auginimo terpe. Eksperimentam reikalingas ląstelių kiekis suskaičiuojamas tripano mėlio metodu.

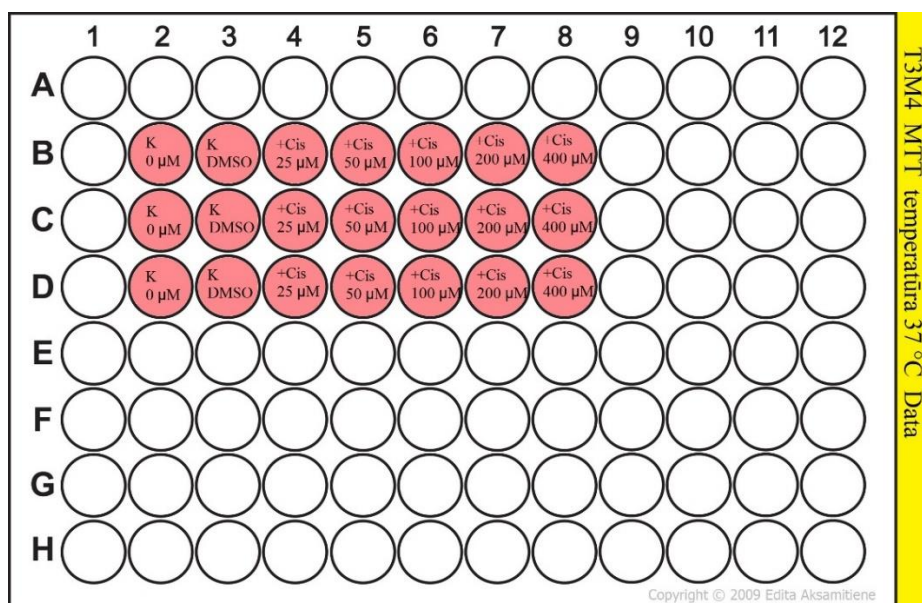
Skaiciavimui naudotas tripano mėlio dažas (0,4 %, Gibco™), Neubauer kamera (Assistant, Vokietija) ir inversinis šviesinis mikroskopas Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonija). Iš 1 ml ląstelių suspensijos, automatine pipete paimama 10 µl ir atskirame mėgintuvėlyje sumaišoma su 90 µl tripano mėlio. Ant Neubauer kameros papučia drėgnu oru ir atsargiai prispaudžiamas dengiamasis stiklelis, kol pasirodo Niutono žiedai. Tada naudojant automatinę pipetę plonu antgaliu, kamera užpildoma ląstelių ir tripano mėlio mišiniu. Žiūrint per mikroskopą ląstelės suskaičiuojamos keturių kameros kraštinių didelių kvadratų viduje, bei ant viršutinės ir kairės kraštinių. Bendras ląstelių kiekis 1 ml suspensijos suskaičiuojamas ląstelių skaičių keturiuose kameros kvadratuose padauginus iš skiedimo (10) ir konversijos į mililitrą faktoriaus (2500). Norint paimti reikiamą ląstelių kiekį ar atlikti skiedimą skaičiuojama pagal formulę $C_1V_1 = C_2V_2$.

2.3. T3M4 ląstelių gyvybingumo pokyčių nustatymas MTT metodu

Skirtingos cisplatinos koncentracijos ir skirtingos temperatūros, bei bendras jų poveikis T3M4 ląstelių gyvybingumui nustatytas kolorimetriniu MTT metodu. MTT ląstelių gyvybingumo tyrimas atliktas devyniose 96-ių šulinėlių plokštelėse, kiekviena plokštelė skirtingai temperatūrai nuo 37 °C iki 45 °C. Kiekvienos plokštelės šulinėliuose pasėtas vienodas kiekis T3M4 ląstelių (šulinėlyje apie 3000 ląstelių/200 µl terpės). Kiekvienai koncentracijai skirta po tris šulinėlius (14 pav.): kontrolė (Cis 0 µM), DMSO kontrolė ir cisplatinos koncentracijos 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM ir 400 µM. Darbinis 83,3 mM cisplatinos tirpalas ruošiamas iš cisplatinos miltelių pagal proporciją ištirpintų dimetilsulfoksido (DMSO) (Carl Roth, Vokietija). Norima vaisto koncentracija gaunama skiedžiant pagal formulę $C_1V_1 = C_2V_2$.

Praėjus 24 valandoms po ląstelių pasėjimo buvo nusiurbiamą terpė ir užpilama auginimo terpė su reikiamomis cisplatinos koncentracijomis nuo 0 iki 400 µM ir valandai patalpinama į atitinkamos temperatūros inkubatorių su temperatūra nuo 37 °C iki 45 °C. Po eksperimento, visuose šulinėliuose

terpė pakeičiama į naują ir plokštelės patalpinamos į inkubatorių su įprastinėmis auginimo sąlygomis (37 °C temperatūra , 5 % CO₂, 98 % drėgnumas).



14 pav. Plokštelės schema: kiekviename šulinėlyje užsėjamas vienodas kiekis T3M4 ląstelių (3000 ląst./ 200 μl terpės). Po paros kiekvienos plokštelės šulinėliai paveikiami skirtingomis cisplatinos dozėmis ir plokštelės patalpinamos į skirtingos temperatūros nuo 37 °C iki 45 °C inkubatorių (šablonas E. Aksamitiene).

Praėjus 48 valandoms po eksperimento į kiekvieną analizuojamą šulinėlį įpilta po 20 μl MTT reagento (5 mg/ml, Life technologies, JAV) ištirpinto PBS buferyje. Plokštelės inkubuojamos 4 valandas 37 °C temperatūroje, per šį laiką geltonos spalvos MTT reagentas redukuojamas iki netirpių violetinės spalvos formazano nuosėdų, kurių kiekis tiesiogiai proporcingas ląstelių gyvybingumui. Po inkubacijos, atsargiai nusiurbiamą terpę, o nuosėdos tirpinamos užpylus 200 μl DMSO (Carl Roth, Vokietija). Spektrofotometru Sunrise (Tecan, Austrija) matuojamas gauto spalvoto tirpalo optinių tankių skirtumas prie 550 nm ir 620 nm bangos ilgių bei nustatoma, kad prieš matavimą 5 min veiktų purtymo režimas. Prietaiso matavimo parametrai valdomi ir rezultatai pateikiami programoje Magellan (Tecan, Austrija). Gauti duomenys eksportuojami ir analizuojami programa Excel 2013 (Microsoft Office). Geri MTT rezultatai yra kai kontrolės (37 °C be vaisto) absorbcija artima arba lygi vienetui. Kontrolinio mėginio ląstelių gyvybingumas prilyginamas 100 % ir atitinkamai mėginių su poveikiu absorbcija irgi paverčiama procentais ir vertinamas ląstelių gyvybingumo pokytis procentais (%).

Buvo sudarytas cisplatinos koncentracijos poveikio grafikas iš kurio apskaičiuota cisplatinos dozė, kuri kontrolinėje grupėje (37 °C temperatūroje be vaisto) sumažina T3M4 ląstelių gyvybingumą

50 %, dar vadinama - IC50 koncentracija. Buvo nustatyta, kad T3M4 ląstelėms cisplatinos IC50 lygi 63 μM ir tik ši koncentracija naudojama tolimesniuose hiperterminės chemoterapijos tyrimuose su T3M4 ląstelėmis.

2.4. T3M4 ląstelių morfologinių pokyčių analizė

Ląstelių morfologinių pokyčių analizė atlikta inversiniu šviesiniu mikroskopu Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonija). Morfologijos pokyčiams įvertinti T3M4 ląstelės buvo sėjamos į dvi 6 šulinėlių plokšteles, kurių šulinėliuose buvo įpilta 2 ml auginimo terpės ir užsėta po 100 000 ląstelių T3M4. Kitą dieną viena plokštelė valandai patalpinama į 37 °C temperatūros inkubatorių, vienas šulinėlis 37 °C kontrolė, o kitas 37 °C su cisplatinos IC50 doze, kita plokštelė analogiškai valandai patalpinama į 43 °C temperatūros inkubatori, su atitinkamai šulinėliais 43 °C ir 43 °C su cisplatinos IC50 doze. Po poveikio auginimo terpė nusiurbama ir užpilama nauja, ląstelės gražinamos į įprastines auginimo sąlygas (37 °C temperatūra, 5 % CO₂, 98 % drėgnumas).

Po 48 valandų ląstelės apžiūrimos šviesiniu mikroskopu ir įvertinami morfologiniai pokyčiai. Padaromos ląstelių fotografijos programa Infinity analyze 6.1 (Lumenera, Kanada). Vėliau ląstelių terpė nusiurbama ir ląstelės dažomos kristaliniu violetu. Į šulinėlius pilama po 500 μl dažo ir paliekama 20 minučių, tada plokštelė nuplaunama vandens vonelėje ir paliekama džiūti.

2.5. T3M4 ląstelių poveikimas hiperterminė chemoterapija molekuliniams tyrimams

HMOX1 raiškai ir HO-1 baltymo koncentracijai, bei kitiems molekuliniams ir biocheminiams tyrimams T3M4 ląstelės sėtos į 25 cm² flakonus po 10⁶ ląstelių. *HMOX1* raiškai sėta po du flakonus kiekvienai temperatūrai 37 °C, 40 °C, 42 °C, 43 °C, iš kurių vienas be vaisto, o kitas „+Cis“ su 63 μM cisplatinos koncentracija (K 37 °C; 37 °C +Cis; 40 °C; 40 °C +Cis; 42 °C; 42 °C +Cis; 43 °C; 43 °C +Cis). Analogiškai sėta HO-1 ir kitų baltymų ekstrakcijai, išskyrus du flakonus 42°C temperatūrai (K 37 °C; 37 °C +Cis; 40 °C; 40 °C +Cis; 43 °C; 43 °C +Cis). Po paros į T3M4 ląstelių flakonų grupę „+Cis“ įpilama po 3,8 μl darbinio cisplatinos tirpalo (83,3 mM koncentracijos) tiesiai į terpę ir kartu su grupe be vaisto patalpinama į inkubatorių su atitinkama temperatūra. Po valandos flakonai išimami, terpė pakeičiama į naują ir flakonai patalpinami į 37 °C temperatūros inkubatorių su įprastinėmis auginimo sąlygomis. Praėjus 48 valandoms po poveikio temperatūra ir cisplatina ruošiami T3M4 ląstelių nukleorūgščių ir baltymų ekstraktai.

2.6. *HMOX1* geno raiškos tyrimas kRL-PGR metodu

2.6.1. RNR išskyrimas kolonėlių metodu

RNR išskyrimui naudotas komercinis „PureLink RNA micro kit“ (Invitrogen) gryninimo rinkinys ir vadovautasi gamintojo protokolu. Pirmiausiai nupilama ląstelių auginimo terpė ir užpilama 350 µl paruošto lizės buferio su 1 % 2-merkaptioetanolio. Ląstelės atkeliamos ir lizuojamos pipetuojanč. Lizatas perkeliamas į homogenizacijos mėgintuvėlį ir centrifuguojamas 12,000 x g 2 minutes, KT. Kiekvieno mėginio homogenizatą pilama 350 µl 70 % etanolio, sumaišoma „vortex“ maišykle ir 700 µl į PureLink RNR gryninimo kolonėlę su surinkimo mėgintuvėliu. Kolonėlė centrifuguojama 12,000 x g, 1 minutę, KT. Surinkimo kolonėlė su pratekėjusiu skysčiu pašalinama ir pakeičiama į naują. Po to pilama 350 µl plovimo buferio I ir centrifuguojama 12,000 x g 1 min., KT. Surinkimo kolonėlė pašalinama ir pakeičiama į naują. 10 µl vandenyje be RNazių ištirpintos DNazės sumaišoma su 10 µl 2X DNazės buferiu ir pipete užpilama ant kolonėlės centre esančios membranos, inkubuojama 15 min., KT. Po inkubacijos į kolonėlę pilama 350 µl plovimo buferio I ir centrifuguojama 12,000 x g, 15 sek., KT. Skystis pašalinamas ir pilama 500 µl plovimo buferio II su etanolio ir centrifuguojama 12,000 x g 15 sek., KT. Etapas pakartojamas ir membranoje likusi RNR nusausinama centrifuguojant 12,000 x g, 1 min. Surinkimo mėgintuvėlis pašalinamas ir dedamas saugojimo mėgintuvėlis, o į kolonėlę pilama 12 – 22 µl vandens be RNazių ir inkubuojama 1 min., KT. Centrifuguojama 12,000 x g 2 min., KT., tam kad RNR išsilaisvintų iš membranos į saugojimo mėgintuvėlį. RNR koncentracija ir švarumas nustatytas spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, JAV), tinkami tik švarūs mėginiai, kurių optinių tankių 260/280 nm santykis yra apie 2.

2.6.2. RNR reversinė transkripcija į kopijinę DNR

RNR konvertavimui į kDNR naudotas komercinis „High-Capacity cDNA Reverse Transkripcija kit“ (Applied biosystems) rinkinys. Pirmiausiai paruošiamas 2X RT reakcijos mišinys (4 lentelė). Komponentai ir paruoštas mišinys laikomi lede. Mėgintuvėlyje 10 µl 2X RT reakcijos mišinio sumaišoma su 2 µg RNR mėginio ir trumpai centrifugavus dedama į termociklerį ThermoCycler nexus GSX1 (Eppendorf, Vokietija). Nustatomos termociklerio sąlygos (5 lentelė) ir paleidžiama reakcija. Po konvertavimo gaunama kDNR, kuri iki tolimesnio naudojimo laikoma -20 °C temperatūroje.

4 lentelė. 2X RT reakcijos mišinio komponentai ir jų tūris vienam mėginiui.

2X RT master mix komponentai	Tūris
10X RT buferis	2.0 µl
25X dNTP mišinys (100mM)	0.8 µl
10X RT pradmenys	2.0 µl
MultiScribe Reversinė transkriptazė 50 U/ µl	1.0 µl
RNazių inhibitoriai	1.0 µl
Vanduo be nukleazių	3.2 µl
Bendras tūris: 10.0 µl	

5 lentelė. Termociklerio sąlygos.

Parametras	Žingsnis 1	Žingsnis 2	Žingsnis 3	Žingsnis 4
Temperatūra	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Laikas	10 min.	120 min.	5 min.	∞

2.6.3. Kiekybinis tikro laiko PGR

Darbas su DNR ir PGR reagentais vyksta tik tam skirtame laminare, kuris išvalytas dezinfekuotas su „RnaseZap“, kad būtų išvengta kontaminacijos. Hemoksigenazės-1 raiškos pokyčių vertinimui buvo naudojami komerciniai rinkiniai ir reagentai. Santykinei *HMOX1* RNR raiškai nustatyti buvo naudojamas referentinis genas *GAPDH* (glicerinaldehido-3-fosfato dehidrogenazė). kRL-PGR naudoti Applied biosystems susintezuoti *HMOX1* ir *GAPDH* pradmenys (6 lentelė). *HMOX1* pradmenų sekos: pirmaujančioji 5'-TGCTCAACATCAGCTCTTTGAGGA-3' ir reversinė 5'-CAGGCAGAGAATGCTGAGTTC-3'. Šaldiklyje laikyti reagentai atitirpinami ir išmaišomi „vortex“ maišykle. Ruošiami reakcijos mišiniai (7 lentelė) ir išpilstomi į 96-ių šulinėlių plokštelę.

6 lentelė. „TaqMan Gene expression assays“ (Applied Biosystems) pradmenys.

Genas	Pradmenų kodas	Geno lokalizacija	Amplikono ilgis	Reportinis dažas
<i>GAPDH</i> (glicerinaldehido-3-fosfato dehidrogenazė)	Hs02758991_g1	Chr.12: 6534405 - 6538375	93	FAM
<i>HMOX1</i> (Hemo oksigenazė-1)	Hs01110250_m1	Chr.22: 35381067 - 35394214	82	FAM

7 lentelė. kRL-PGR reakcijos mišinys.

Reagentai	Tūris 1 mėginiui
TaqMan universalus PGR mišinys	10 µl
<i>HMOX-1</i> arba <i>GAPDH</i> pradmenys	1 µl
Vanduo be nukleazių	7 µl
kDNR	2 µl
Bendras tūris šulinėlyje	20 µl

8 lentelė. kRL-PGR reakcijos sąlygos.

Etapas	Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
UNG aktyvacija*	50 °C	2 min.	1
Pradinė denatūracija, Taq polimerazės aktyvinimas	95 °C	10 min.	1
Denatūracija	95 °C	15 sec.	40
Hibridizacija ir amplifikacija	60 °C	1 min.	

*Uracil N-Gliukozilazė esanti PGR mišinio sudėtyje padeda išvengti kroskontaminacijos.

Paruošta plokštelė uždengiama specialia plėvele ir dedama į PGR termociklerį 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied biosystems, JAV) su integruota programine įranga, kurioje įvedami mėginių duomenys ir reakcijos sąlygos (8 lentelė).

HMOX1 santykinės raiškos analizei buvo taikytas $\Delta\Delta C_T$ metodas. Pirmiausia nustatytos ribinio ciklo – C_T vertės, kurios gaunamos atlikus kRL-PGR reakciją. C_T vertės buvo normalizuojamos pagal referentinį *GAPDH* geną ir kontrolinį *HMOX-1* mėginį „k 37“ (T3M4 ląstelėse, kurios nebuvo paveiktos hipertermija ir cisplatina). Kontrolės ΔC_T apskaičiuojama iš C_T kontrolės atėmus referentinio geno C_T (1 formulė), kintamųjų ΔC_T reikšmės apskaičiuojamos analogiškai (2 formulė). Kiekvieno kintamojo mėginio $\Delta\Delta C_T$ gaunama iš kontrolės ΔC_T atėmus kintamojo ΔC_T (3 formulė) ir santykinė mėginio raiška apskaičiuojama $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (formulė 4).

Santykinė *HMOX1* raiška apskaičiuojama pagal formules:

- (1) $\Delta C_{T(HMOX1\ k\ 37)} = C_{T(HMOX1\ k\ 37)} - C_{T(GAPDH\ k\ 37)}$
- (2) $\Delta C_{T(HMOX1\ n)} = C_{T(HMOX1\ n)} - C_{T(GAPDH\ n)}$
- (3) $\Delta\Delta C_{T(HMOX1\ n)} = \Delta C_{T(HMOX1\ k\ 37)} - \Delta C_{T(HMOX1\ n)}$
- (4) $2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{santykinė } HMOX-1 \text{ raiškos reikšmė}$

2.7. HO-1 koncentracijos nustatymas Western blot metodu

2.7.1. Baltymų ekstrakcija

HO-1 koncentracijai T3M4 ląstelėse patikrinti ir įvertinti buvo naudota Western blot analizė. Flakonų su paveiktomis ląstelėmis terpė nupilama ir dukart praplaunama su PBS. Ant ląstelių monosluksnio pilama 100 µl šalto komercinio RIPA lizės buferio (Abcam) su įdėtais proteazių ir fosfotazių inhibitoriais ir flakonai inkubuojami 10 min. lede. Po inkubacijos ląstelės nugramdomos plastikiniiais gramdikliais ir visas skystas lizatas perkeliamas į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį, kuris centrifuguojamas 10 000 RPM, 4 °C temperatūroje, 10 min. Supernatantas nusiurbiamas ir perkeliamas į švarų mikrocentrifuginį mėgintuvėlį ir laikomas -20 °C kameroje iki tolimesnio naudojimo. Bendra baltymų koncentracija nustatoma su komerciniu Pierce BCA protein assay rinkiniu (ThermoFisher scientific) remiantis gamintojo pateikta metodika.

2.7.2. Elektroforezė

Atliekama elektroforezė naudojant komercinius 4 - 12 % bis-tris poliakrilamido NuPAGE gelius ir reagentus (ThermoFisher Scientific) ir remiantis gamintojo protokolais. Pirmajam elektroforezės šulinėliui paimama 5 µl markerio „Page Ruler prestained protein“ (Thermo scientific) ir kitiems šulinėliams kiekvieno tiriamo mėginio 40 µg baltymo kiekis, kurie sumaišomi su 5 µl NuPAGE LDS mėginio buferiu (4x), 2 µl NuPAGE redukuojančiu agentu (10x) ir įpilama dejonizuoto vandens iki mišinio bendro 20 µl tūrio (9 lentelė). Mišinys kaitinamas 5 min 97 °C temperatūroje. Paruošiamas NuPAGE Bis-Tris mini gelis ir elektroforezės aparatas Consort EV243 (Consort, Belgija) užpildomas paruoštu NuPAGE MES SDS running buffer, bei NuPAGE antioksidantu. Mėginiai užnešami į šulinėlius ir paleidžiama elektroforezė 150 V įtampos srove apie 120 min.

9 lentelė. Mėginio mišinys vienam elektroforezės šulinėliui

Komponentas	Tūris
Mėginys arba 5 µl markerio	x µl (bendras baltymo kiekis mėginyje 40 µg)
NuPAGE LDS mėginio buferis (4x)	5 µl
NuPAGE redukuojantis agentas (10x)	2 µl
Dejonizuotas H ₂ O	Iki 20 µl bendro tūrio
Bendras tūris	20 µl

2.7.3. Perkėlimas ant PVDF membranos

Baltymai iš gelio pernešami ant PVDF membranos X cell Blot moduliu (ThermoFisher Scientific), naudojant pernešimo buferį (50 ml NuPAGE Transfer Buffer (20x), 100 ml metanolio, 849 ml dejonizuoto vandens ir 1 ml NuPAGE antioksidanto) ir leidžiant 30 V įtampos, 125 mA elektros srove, 45 minutes.

2.7.4. Western breeze chromogeninė imunodetekcija

Membrana blokuojama 30 minučių su blokavimo buferiu (2 ml Blocker/Diluent (Part A), 3 ml Blocker/Diluent (Part B), 5 ml dejonizuoto vandens) ir tada 90 min inkubuojama su pirminio antikūno tirpalu (2 ml Blocker/Diluent (Part A); 1 ml Blocker/Diluent (Part B); 7 ml dejonizuoto vandens ir pirminiu antikūnu). HO-1 nustatymui naudojami monokloniniai triušio antikūnai IgG1 susintetinti Abcam ir skiesti santykiu 1:2000, kontrolei naudojami GAPDH antikūnai pelės IgG1 (Ambion) santykiu 1:10000. Membrana triskart nuplaunama su 20 ml antikūnų plovimo buferio (10 ml Antibody wash solution(16x), 150 ml dejonizuoto vandens) inkubuojant 5 minutes su maišymu. Inkubuojama 30 minučių su antrinio antikūno konjuguoto su šarmine fosfataze tirpalu ir vėl triskart kartojamas membranos plovimas su antikūno plovimo buferiu ir dukart praplaunama PBS buferiu. Nupylus PBS, inkubuojama 5 min. užpylus 1 ml Chromogeninio substrato (Invitrogen). Membrana vizualizuojama aparatu ChemiDoc XRS+ su integruota programa Image Lab (BioRad, JAV).

2.8. Duomenų analizė

Darbe pateikiami T3M4 ląstelių gyvybingumo pokyčių rezultatų vidurkiai ir standartinės paklaidos, gauti atlikus 3 bandymus, kuriose kiekvieno poveikio po 3 pakartojimus. *HMOX1* santykinės raiškos matavimų vidurkiai ir standartinės paklaidos gauti iš 2 bandymų, kuriuose po 2 pakartojimus. Rezultatų patikimumas buvo įvertintas taikant neparametrinį Kruskalo-Voliso testą lyginant keletą grupių, o skirtumui tarp dviejų grupių Mann-Whitney testą. Statistinė duomenų analizė atlikta programomis Excel 2013 (Microsoft Office), bei „Prism 6” (GraphPad Software, JAV). Ląstelių morfologijos ir HO-1 baltymo raiškos pokyčiams vertinti atlikta kokybinė analizė.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 T3M4 ląstelių gyvybingumo pokyčiai hiperterminės chemoterapijos sąlygomis

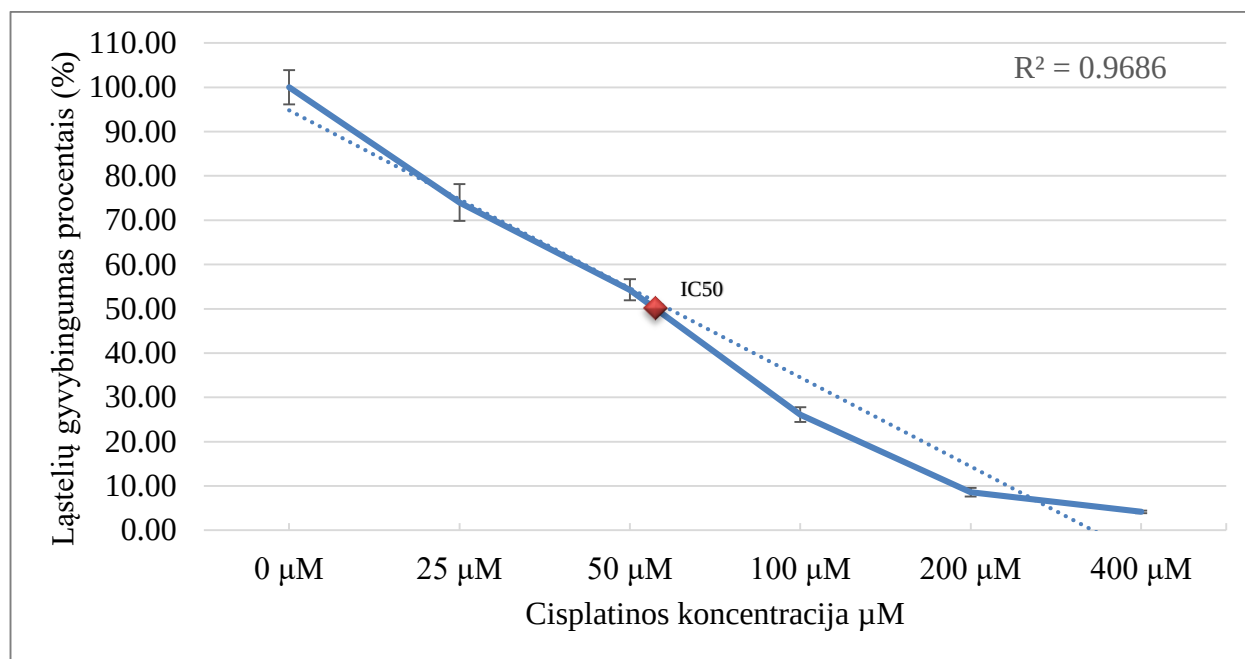
T3M4 ląstelių gyvybingumo pokyčių visų rezultatų vidurkiai su standartine paklaida ($\pm$) pateikiami 10 lentelėje. Remiantis 10 lentele pirmiausiai buvo analizuotas cisplatinos poveikis, nustatyta cisplatinos IC50 koncentracija, o tada vertintas hipertermijos ir skirtingų hiperterminės chemoterapijos sąlygų poveikis T3M4 ląstelių gyvybingumui.

Buvo įvertintas cisplatinos citotoksinis poveikis T3M4 ląstelių gyvybingumui. Nustatytas statistiškai reikšmingas ląstelių gyvybingumo mažėjimas didėjant vaisto koncentracijai (15 pav.). Apskaičiuota cisplatinos IC50 koncentracija lygi 63 μ M, kuri sumažina T3M4 ląstelių populiacijos gyvybingumą 50 %.

10 lentelė: Ląstelių gyvybingumo pokyčiai procentais, praėjus 48 val. po poveikio skirtingomis hiperterminės chemoterapijos sąlygomis, kai kontrolė (37 °C, Cis 0 μ M) prilyginama 100 %. Lentelėje pateikiami 3 matavimų vidurkiai ir standartinė paklaida ($\pm$).

T3M4 ląstelių gyvybingumas procentais (%)		Cisplatinos koncentracija					
		0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M	400 μ M
Temperatūra	37 °C	100.00	74.01	54.30	26.09	8.60	4.16
	$\pm$	3.88	4.18	2.41	1.66	0.96	0.30
	38 °C	85.15	73.82	52.64	34.00	13.97	5.27
	$\pm$	5.26	3.15	4.10	4.61	1.19	0.37
	39 °C	89.45	73.87	48.80	26.41	8.83	5.04
	$\pm$	4.37	3.56	5.14	3.10	0.31	0.48
	40 °C	78.21	69.10	43.57	23.03	7.77	4.49
	$\pm$	2.31	5.64	4.39	2.35	0.52	0.39
	41 °C	87.33	56.15	40.01	15.03	5.97	4.53
	$\pm$	6.81	5.18	3.44	0.96	0.29	0.47
	42 °C	68.92	54.90	40.15	16.10	6.89	4.90
	$\pm$	9.96	6.11	5.21	2.24	0.55	0.45
	43 °C	109.29	79.37	53.84	17.62	6.94	5.69
	$\pm$	8.47	4.63	2.47	3.00	0.34	0.52
	44 °C	97.09	52.45	27.20	7.35	6.20	5.69
	$\pm$	3.99	3.46	3.64	0.34	0.34	0.40
	45 °C	79.93	34.97	15.17	5.50	6.20	5.87
	$\pm$	6.12	5.37	3.00	0.39	0.34	0.55

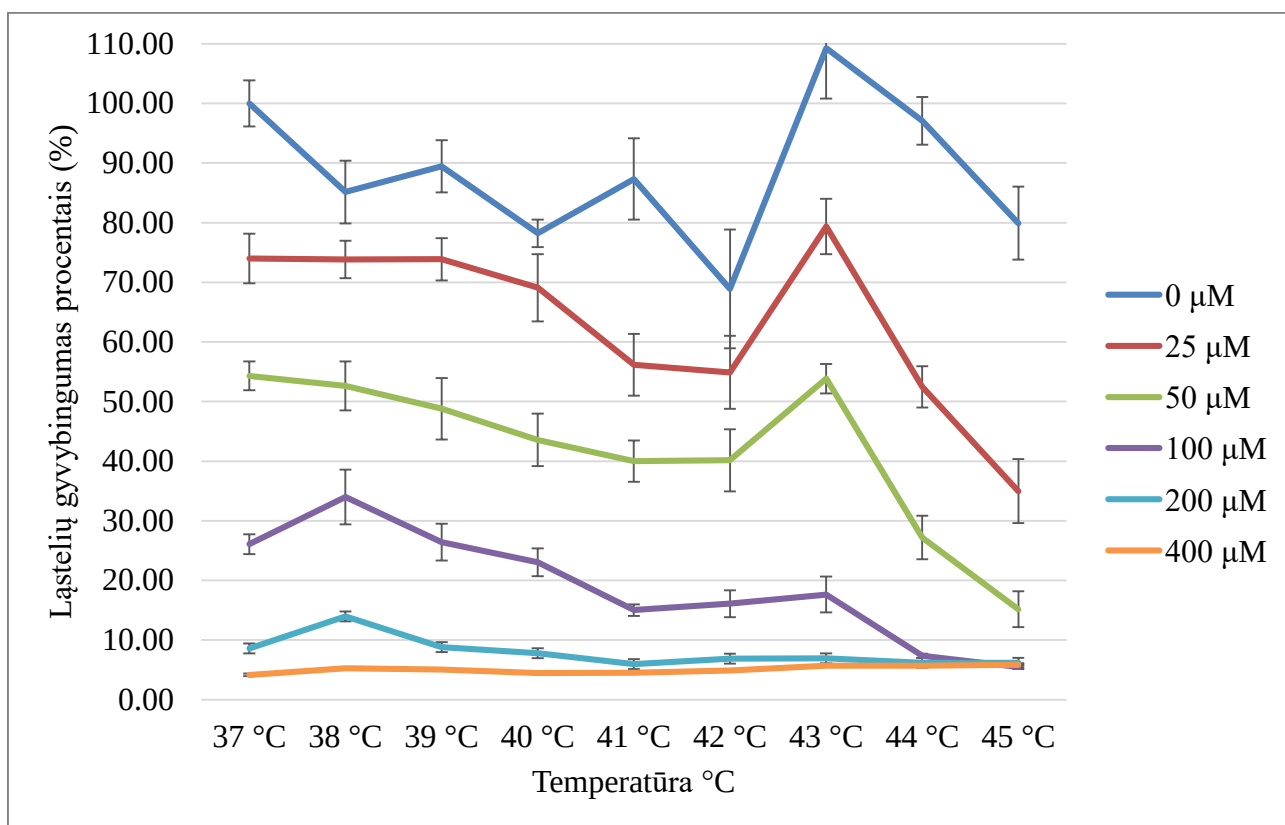
Nustatyti cisplatinos IC₅₀ kasos T3M4 ląstelėms yra svarbu įvertinant vaisto efektyvumą ir optimizuojant tyrimą. Cisplatinos citotoksinis efektyvumas gali labai žymiai skirtis tarp skirtingų ląstelių kultūrų, priklausomai nuo jų specifinių morfologinių, metabolinių, genetinių požymių. Šiame tyrime cisplatinos IC₅₀ yra naudingas atskaitos taškas vertinant hipertermijos įtaką cisplatinos poveikiui, todėl ši 63 μM koncentracija naudota tolimesniuose in vitro hiperterminės chemoterapijos tyrimuose su T3M4 kasos adenokarcinomos ląstelių linija energetikos, molekuliniuose ir biocheminiuose tyrimuose.



15 pav. Ląstelių gyvybingumo mažėjimas (%) 48 val. po poveikio skirtingomis cisplatinos koncentracijomis nuo 0 iki 400 μM, prilyginus kontrolę (37 °C, Cis 0 μM) 100 % (p=0,0001).

Veikiant T3M4 ląsteles temperatūros intervalu nuo 37 °C iki 45 °C nėra tolygios ląstelių gyvybingumo kitimo tendencijos (16 pav.) ir gauti rezultatai, vertinant gyvybingumą tarp tos pačios cisplatinos dozės ir skirtingų temperatūrų nėra patikimi (p>0,05). Ląstelėse valandą paveiktose temperatūra nuo 37 °C iki 42 °C gyvybingumas temperatūros atžvilgiu mažėja, tiek grupėje be vaisto, tiek ląstelėse paveiktose su cisplatinos koncentracija iki 100 μM. Tai rodo, kad temperatūros poveikis gyvybingumui nėra adityvus cisplatinos citotoksiniam poveikiui T3M4 ląstelėse. T3M4 ląstelių grupėje paveiktoje 43 °C gyvybingumas net didesnis nei hipertermijos nepaveiktose ląstelėse ir tai gali būti susijęs su vėžinių ląstelių atsparumo mechanizmų indukcija, padidėjusia citoprotekcinėmis molekulėmis raiška, suintensyvėjusiais energetiniais ir biocheminiais procesais. Straipsniuose teigiama, kad temperatūra veikia ląstelių membranų laidumą, didindama įvairių medžiagų ir vaisto įsisavinimą (Ahmed ir Zaidi, 2013), bet panašu, kad šio tyrimo atveju hipertermija veikia per kitus mechanizmus, galbūt, per baltymų denatūracijos ir DNR reparacijos pažaidas.

Rezultatų priežastis gali būti MTT metodo tinkamumas. MTT matuojamą ląstelių gyvybingumą atspindi jų metabolizmo aktyvumas, kuris priklauso nuo energetinių procesų ir molekulių, tokių kaip adenzintrifosfatas (ATP) ir nikotinamido adenino dinukleotidų formos (NAD(P)H) ir todėl gyvybingumo savoka neatskleidžia informacijos apie tikrąją ląstelių būklę, jų dydį ir kiekį. Neatsižvelgiant į metodo ypatumus, galima daryti prielaidą, kad parinkus netinkamą temperatūrą galima ir pabloginti kasos vėžio gydymą.



16 pav. T3M4 ląstelių gyvybingumo pokyčiai didėjant temperatūrai. Matuota 48 val. po poveikio skirtinga temperatūra ir skirtingomis cisplatinos koncentracijomis, kai kontrolė (37 °C, Cis 0 μM) prilyginta 100 %.

Aukštesnės nei 43 °C temperatūros poveikis neigiamai veikia gyvybingumą. Aukštesnė temperatūra ląstelėms padaro žalos sukeldama didelį ląstelinį stresą, denatūruodama baltymus, veikdama DNR ir neaktyvina apsauginių mechanizmų arba jie būna nepakankami.

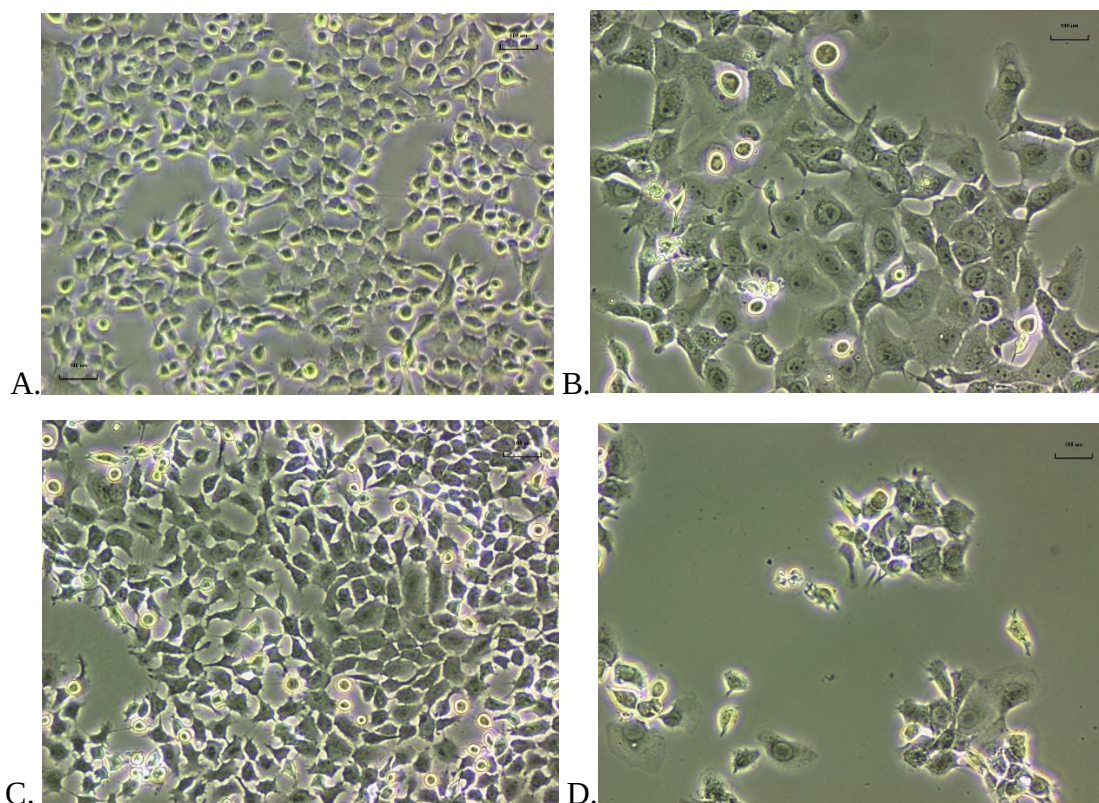
3.2 Hiperterminės chemoterapijos poveikis T3M4 ląstelių morfologijai

T3M4 morfologijos pokyčių nustatymui buvo pasirinkta ląstelių valandai paveikti 37 °C ir 43 °C temperatūra, bei temperatūra su cisplatinos IC₅₀ (63 μM). Po 48 valandų atlikta mikroskopinė analizė ir padarytos ląstelių populiacijos nuotraukos iš kurių atrinktos reprezentatyviausios (17 - 18

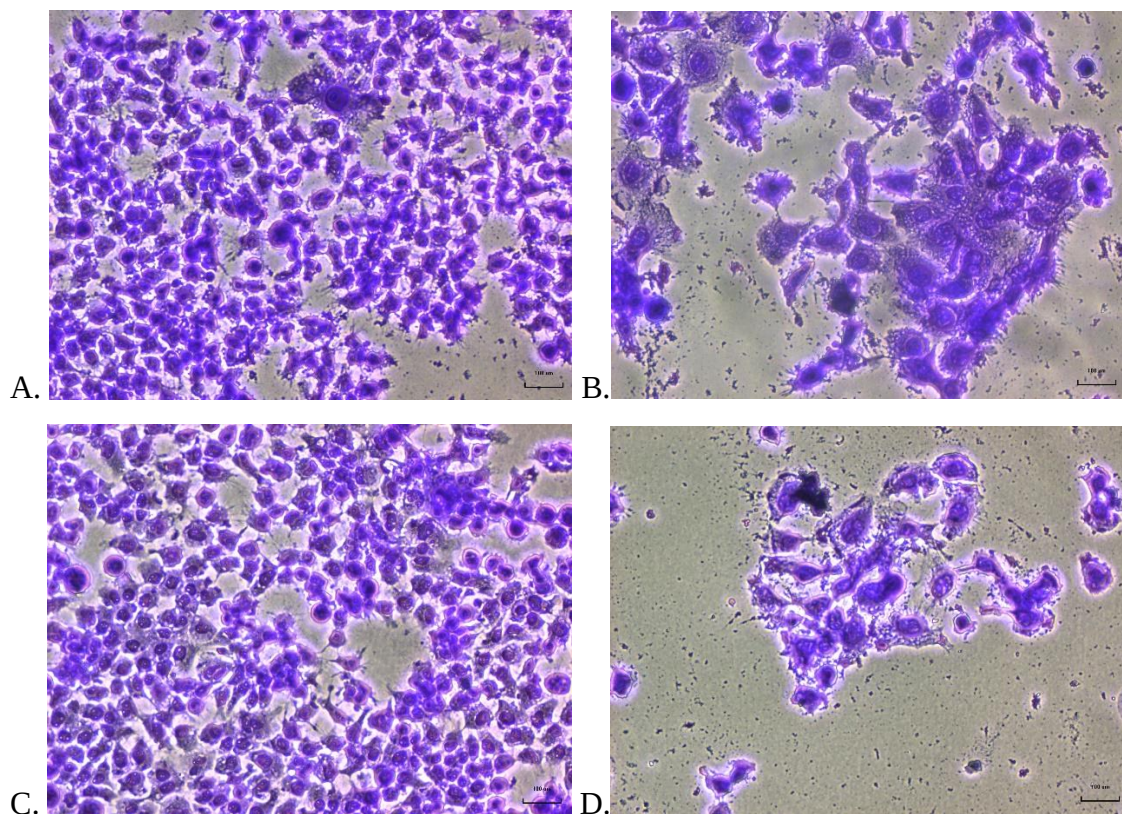
pav.). Per mikroskopo Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonija) 10x objektyvą buvo stebimos gyvos ląstelės (17 pav.), kurios vėliau buvo nudažytos kristaliniu violetu (18 pav.).

Kontrolinės ląstelės, augintos 37 °C temperatūroje (17 pav. A) yra tankiai priaugusios ir nedidelės, tuo tarpu cisplatinos IC50 koncentracija (17 pav. B) sumažina T3M4 ląstelių gyvybingumą 50 %, bet maždaug keturis kart padidina ląsteles. Stebint mikroskopu nenustatyta akivaizdžių ląstelių kiekio ar morfologijos skirtumų tarp kontrolinės (17 pav. A) ir 43 °C (17 pav. C) temperatūra paveiktų ląstelių grupių, ląstelių kiekis ir dydis labai panašus. Mažiausias ląstelių kiekis yra paveiktose 43 °C temperatūra ir cisplatina (17 pav. D), bei jų dydis yra tik dvigubai didesnis už kontrolines. Analogiškai tai atsispindi ir ląstelėse dažytose kristaliniu violetu (18 pav. A-D).

Remiantis atliktais T3M4 ląstelių gyvybingumo rezultatais, kontrolinių ląstelių ir paveiktų 43 °C temperatūra morfologija (17 pav. A ir C) atspindi panašius MTT rezultatus, atitinkamai $100 \pm 3.88 \%$ ir $109.29 \pm 8.47 \%$. Tose pačiose temperatūrose cisplatinos IC50 paveiktų ląstelių gyvybingumas tarpusavyje panašus, tačiau morfologija labai skiriasi ir tai dar kartą įrodo, kad reikia atsižvelgti į MTT metodo galimybes.



17 pav. Ląstelių populiacijos fotografijos praėjus 48 valandoms po poveikio temperatūra ir cisplatina. A) Kontrolė 37 °C. B) 37 °C su cisplatina. C) 43 °C temperatūra. D) 43 °C su cisplatina.

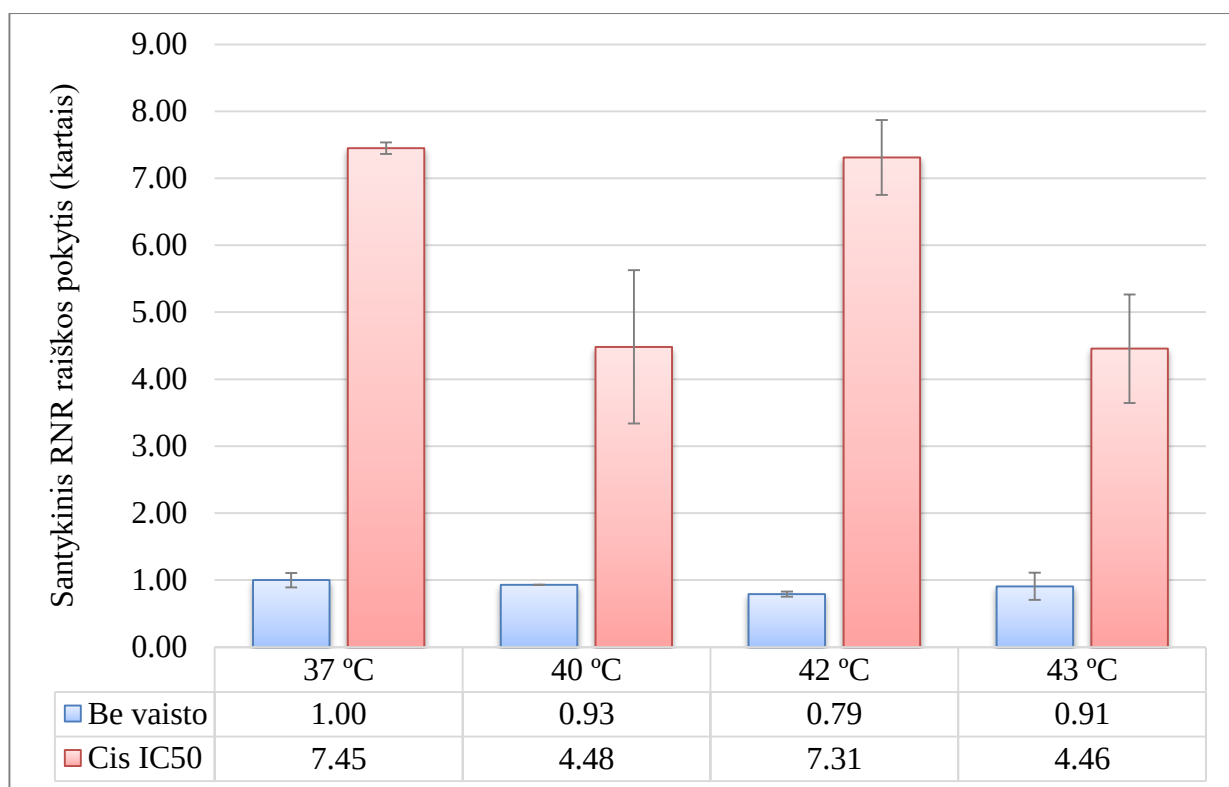


18 pav. Dažytų ląstelių populiacijos fotografijos praėjus 48 valandoms po poveikio temperatūra ir cisplatina. A) Kontrolė 37 °C. B) 37 °C su cisplatina. C) 43 °C temperatūra. D) 43 °C su cisplatina.

3.3. *HMOX1* raiškos pokyčiai

Raiškos analizei naudotas $\Delta\Delta C_T$ metodas, kai raiškos vėžiniame audinyje vertės buvo normalizuotos kaip atskaitos tašką naudojant hiperterminės chemoterapijos nepaveiktas kontrolines ląsteles (K 37 °C). 19 paveiksle pateikiami rezultatai gauti iš 2 matavimų vidurkių ir stulpelinėje histogramoje pažymėtos standartinės paklaidos. Pritaikius statistinius kriterijus negauta patikimo skirtumo ($p>0,05$), dėl to, kad reikia daugiau duomenų, tačiau skirtumą tarp *HMOX1* raiškos grupėje nepaveiktoje cisplatinos ir grupėje paveiktoje, galima laikyti pakankamai patikimais, nes pasikliautiniai intervalai nepersidengia.

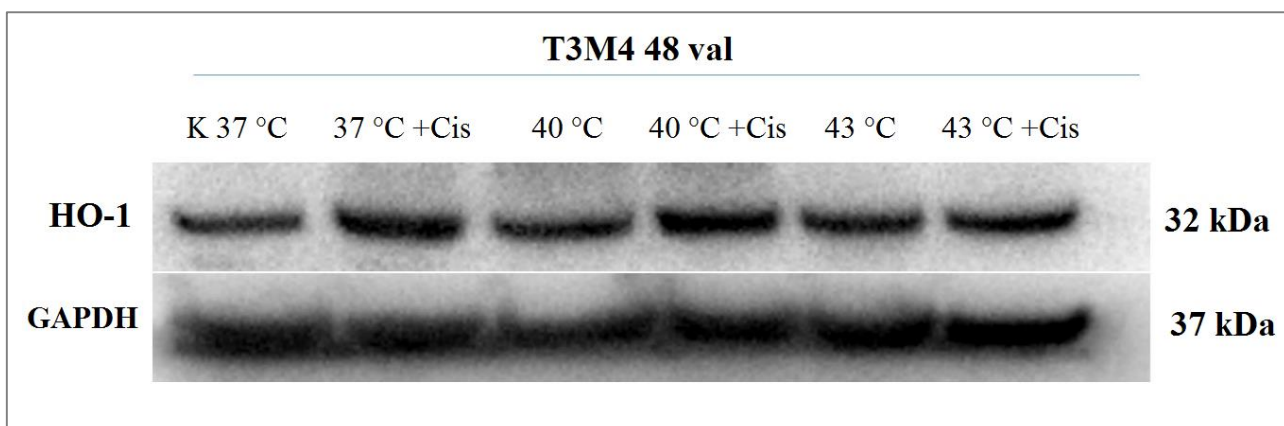
Gauti rezultatai rodo, kad valandą paveikus T3M4 ląsteles hipertermija neindukuoja *HMOX1* raiška (19 pav.). Tai gali būti dėl to, kad per trypas hipertermijos poveikis arba T3M4 ląstelėms reikia aukštesnės temperatūros hiperterminiam stresui sukelti. Cisplatina akivaizdžiai padidino hemoksigenazės raišką, 37 °C ir 42 °C temperatūros grupėse atitinkamai 7,45 ir 7,31 karto. 40 °C ir 43 °C temperatūros grupėse 4,48 ir 4,46 karto. Cisplatinos sukelta indukcija dar kartą pagrindžia, kad taikant chemoterapinį gydymą, HO-1 raiška dar labiau indukuojama (Berberat et al., 2005; Abraham ir Kappas, 2008; Busserolles et al., 2006).



19 pav. Santykinė *HMOX1* RNR raiška, skirtingomis hiperterminės chemoterapijos sąlygomis paveiktose T3M4 ląstelėse.

3.4. HO-1 koncentracija

HO-1 koncentracijos skirtumams įvertinti atlikta kokybinė Western blot dėmių analizė. Referentinis baltymas pasirinktas GAPDH. Kaip ir Santykinės *HMOX1* raiškos atveju, taip ir HO-1 koncentracijos pokyčių hipertermija neindukuoja. Matomas koncentracijos padidėjimas ląstelėse paveiktose cisplatina 37 °C ir 40 °C temperatūra.



20 pav. HO-1 baltymo koncentracija, skirtingomis hiperterminės chemoterapijos sąlygomis paveiktose T3M4 ląstelėse.

3.5. Rezultatų apibendrinimas

Atlikto tyrimo rezultatai rodo, kad valanda hiperterminio streso turi neaiškų poveikį T3M4 ląstelių gyvybingumui ir morfologijai, todėl reikėtų išsamesnių tyrimų. Valanda hipertermijos neindukuoja citoprotekcinio karščio indukuojamo baltymo hemoksigenazės-1 raiškos. Cisplatinos poveikis yra pakankamai stiprus ląstelėms ir HO-1 raiškai. Hipertermijos poveikis nesukelia cisplatinai adityvaus efekto.

IŠVADOS

1. Cisplatinos koncentracija patikimai mažina T3M4 ląstelių gyvybingumą, tačiau hipertermijos poveikis ląstelėms ir cisplatinos veiklai neaiškus ir nepatikimas.
2. Cisplatinos IC50 dozė padidina ląsteles maždaug keturis kartus, kai tuo tarpu IC50 ir 43 °C temperatūra paveiktos ląstelės buvo vos dvigubai didesnės už kontrolines ir vizualiai jų buvo mažiausiai. Žymių morfologijos skirtumų tarp 37 °C kontrolės ir 43 °C temperatūra paveiktų ląstelių nepastebėta.
3. Valanda hipertermijos nepadidina *HMOX1* raiškos T3M4 ląstelėse, o cisplatina indukuoja raišką 4,46 - 7,45 karto visose tirtose temperatūrose.
4. Nustatyta didesnė HO-1 baltymo koncentracija T3M4 ląstelių lizatuose, kurios buvo paveiktos cisplatina ir temperatūromis 37 °C ir 40 °C.

REKOMENDACIJOS

Reikėtų pakartoti šiuos tyrimus su kitomis vėžinių ląstelių linijomis, atsižvelgiant į ląstelių morfologinę, genetinę ir metabolinę įvairovę, būtų galima susidaryti tvirtesnę nuomonę apie hipertermijos poveikį atskiroms ląstelių kultūroms ir HO-1 raiškai. Labai vertinga būtų jei pavyktų ištirti HO-1 raišką operuotų pacientų vėžio biopsijose ir palyginti su pacientų, kuriems buvo taikytas HIPEC metodas.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abraham, N. G. and Kappas, A. (2008). Pharmacological and Clinical Aspects of Heme Oxygenase. *Pharmacological Reviews*, 60(1), 79–127. doi: 10.1124/pr.107.07104
2. Ahmed, K., Hori, T., Yu, D-Y., Wei, Z-L., Zhao, Q-L., Nakashima, M., ... Kondo, T. (2008). Hyperthermia chemo-sensitization, chemical thermo-sensitization and apoptosis. *Thermal Medicine*, 24, 1-12. doi: <http://doi.org/10.3191/thermalmed.24.1>
3. Ahmed, Z. Ir Zaidi, S. F. (2013). Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(4), 504-508. Prieiga per internetą: http://jpma.org.pk/full_article_text.php?article_id=4123
4. Alam, J., Wicks, C., Stewart, D., Gong, P., Touchard, C., Otterbein, S., ... Tou, J. (2000). Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *The Journal of biological chemistry*, 275(36), 27694-27702. doi: 10.1074/jbc.M004729200
5. Alaoui-Jamali, M. A., Bismar, T. A., Gupta, A., Szarek, W. A., Su, J., Song, W., ... Schipper, H. M. (2009). A novel experimental heme oxygenase-1-targeted therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*, 69(20), 8017-8024. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0419
6. Almadi, M. A., Alharbi, O., Azzam, N., Altayeb, M., Javed, M., Alsaif, F., ... Aljebreen, A. M. (2013). Clinical Predictors of Resectability of Pancreatic Adenocarcinoma. *Saudi Journal of Gastroenterology : Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 19(6), 278–285. doi: <http://doi.org/10.4103/1319-3767.121036>
7. American Cancer Society. (n.d.). Pancreatic Cancer. Prieiga per internetą: <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer.html>
8. Andreadi, C. K., Howells, L. M., Atherfold, P. A. ir Manson, M. M. (2006). Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemeoxygenase-1 by dietary polyphenols. *Molecular pharmacology*, 69(3), 1033-1040. doi: 10.1124/mol.105.018374
9. Babior, B. M. (1999). NADPH Oxidase: An Update. *Blood*, 39(5), 1464-1476. Prieiga per internetą: <http://www.bloodjournal.org/content/93/5/1464.long?sso-checked=true>
10. Beger, H. G, Buchler, M., Kozarek, R., Lerch, M., Neoptolemos, J. P., Warshaw, A., ... Shiratori, K. (2008). *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery* (2-asis leidimas). Jungtinė karalystė: Blackwell

11. Berberat, P. O., Dambrauskas, Ž., Gulbinas, A., Giese, T., Giese, N., Kunzli, B., ... Friess, H. (2005). Inhibition of Heme Oxygenase-1 Increases Responsiveness of Pancreatic Cancer Cells to Anticancer Treatment. *Clinical Cancer Research*, 11(10), 3790-3798. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2159
12. Berberat, P. O., Katori, M., Kaczmarek, E., Anselmo, D., Lassman, C., Ke, B., ... Soares, M. P. (2003). Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB journal*, 17(12), 1724-1726. doi: 10.1096/fj.03-0229fje
13. Brasiūnienė, B., Brasiūnas, V., Barauskas, G. ir Juozaitytė E. (2003). Molekuliniai kasos vėžio patogenezės ir prognozės faktoriai. *MEDICINA*, 39(7), 631-636. Prieiga per internetą: <http://gs.elaba.lt/object/elaba:4883710/index.html>
14. Busserolles, J., Megías, J., Terencio, M. C., Alcaraz, M. J. (2006) Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), 1510–1517. doi: <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.03.013>
15. Carnevale, J. ir Ashworth, A. (2015). Assessing the Significance of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(28), 3080-3081. doi: 10.1200/JCO.2015.61.6961
16. Chang, S. H., Garcia, J., Melendez, J. A., Kilberg, M. S. ir Agarwal, A. (2003). Haem oxygenase 1 gene induction by glucose deprivation is mediated by reactive oxygen species via the mitochondrial electron-transport chain. *The Biochemical journal*, 371(3), 877-885. doi: 10.1042/BJ20021731
17. Chari, S. T. (2007). Detecting Early Pancreatic Cancer - Problems and Prospects. *Seminars in Oncology*, 34(4): 284–294. doi: 10.1053/j.seminoncol.2007.05.005
18. Cowan, K. J. ir Storey, K. B. (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *The Journal of experimental biology*, 206(7), 1107-1115. doi: 10.1242/jeb.00220
19. Dasari, S. ir Tchounwou, PB. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 364–378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
20. De Bree, E. (2015). Optimal drugs for HIPEC in different tumors. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, 20, 40-46.
21. Dolenšek, J., Rupnik, M. S. ir Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), 1-16. doi: 10.1080/19382014.2015.1024405.
22. Durante, W. (2015). Bilirubin: Striking Gold in Diabetic Vasculopathy? *Diabetes*, 64(5), 1506-1508. doi: 10.2337/db14-1901

23. Eisenstein, R. S., Garcia-Mayol, D., Pettingell, W. ir Munro, H. N. (1991). Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(3), 688-692. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC50878/>
24. Elbirt, K. K. ir Bonkovsky, H. L. (1999). Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111(5), 438-447. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10519165>
25. Esquivel, J., Sticca, R., Sugarbaker, P., Levine, E., Yan, D., Alexander, R., ... Sebbag, G. (2006). Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in the Management of Peritoneal Surface Malignancies of Colonic Origin: A Consensus Statement. *Annals of Surgical Oncology*, 14(1), 128-133. doi: 10.1245/s10434-006-9185-7
26. Fang, J., Akaike, T. ir Maeda, H. (2004). Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis*, 9(1), 27-35. doi: 10.1023/B:APPT.0000012119.83734.4e
27. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... Bray F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), 359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.
28. Florea, AM. Ir Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, 3, 1351-1371; doi: 10.3390/cancers3011351
29. Gaidelytė, R., Madeikytė, N., Tendziagolskytė, D. (2013). *Lietuvos sveikatos statistika 2012*. Higienos instituto Sveikatos informacijos centras, Vilnius 2013. Prieiga per internetą: <http://sic.hi.lt/data/la2012.pdf>
30. González-Moreno, S., González-Bayón, L. A., Ortega-Pérez, G. (2010). Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Rationale and technique. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2(2), 68-75. doi: 10.4251/wjgo.v2.i2.68
31. Grapin-Botton, A. (2005). Ductal cells of the pancreas. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(3), 504-510. doi: 10.1016/j.biocel.2004.07.010
32. Gupta, S. C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W. ir Aggarwal, B. B. (2012). Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxidants and Redox Signaling*, 16(11), 1295–1322. doi: 10.1089/ars.2011.4414
33. Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y. ir Noguchi, M. (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes

- derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 336(2), 241-250. doi: 10.1016/j.gene.2004.04.002
34. Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*, 362(17), 1605-1617. doi: 10.1056/NEJMra0901557.
 35. Hildebrandt, B., Wust P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T, ... Ries, H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Oncology/Hematology*, 43(1) 33-56. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00179-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00179-2)
 36. Holohan, C., Schaeysbroeck, S. V., Longley, D. B. ir Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13, 714–726. doi: 10.1038/nrc3599
 37. Hou, C.-H., Lin, F.-L., Hou, S.-M., ir Liu, J.-F. (2014). Hyperthermia Induces Apoptosis through Endoplasmic Reticulum and Reactive Oxygen Species in Human Osteosarcoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 17380–17395. doi: 10.3390/ijms151017380.
 38. HPA – The Human Protein Atlas. (2017a). HMOX1. Prieiga per internetą: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000100292-HMOX1/tissue>
 39. HPA – The Human Protein Atlas. (2017b). HMOX2. Prieiga per internetą: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000103415-HMOX2/tissue>
 40. Huang, S. H., Yang, K. J., Wu, J. C., Chang, K. J. ir Wang, S. M. (1999). Effects of hyperthermia on the cytoskeleton and focal adhesion proteins in a human thyroid carcinoma cell line. *Journal of cellular biochemistry*, 75(2), 327-337. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502304>
 41. Yonezawa, M., Otsuka, T., Matsui, N., Tsuji, H., Kato, K. H., Moriyama, A. ir Kato, T. (1996). Hyperthermia induces apoptosis in malignant fibrous histiocytoma cells in vitro. *International journal of cancer*, 66(3), 347-51. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960503)66:3<347::AID-IJC14>3.0.CO;2-8
 42. Issels, RD. (2008). Hyperthermia adds to chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 44(17), 2546-2554. doi: 10.1016/j.ejca.2008.07.038.
 43. Jakstaite, A., Maziukiene, A., Šilkuniene, G., Kmieliute, K., Gulbinas, A. ir Dambrauskas, Z. (2015). HuR mediated post-transcriptional regulation as a new potential adjuvant therapeutic target in chemotherapy for pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 21(46), 13004-13019. doi:10.3748/wjg.v21.i46.13004
 44. Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R. C., Ghafoor, A., ... Thun, M. J. (2005). Cancer Statistics, 2005. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 55(4), 10-30. Prieiga per internetą: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/canjclin.55.1.10/full>

45. Józkowicz, A., Huk, I., Nigisch, A., Weigel, G., Dietrich, W., Motterlini, R. ir Dulak, J. (2003). Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxidants & redox signaling*, 5(2), 155-162. doi: 10.1089/152308603764816514
46. Kang, J. H. (2014). Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer. *New Journal of Science*, 2014, 1-36. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/231418>
47. Kelsen, D. P., Portenoy, R., Thaler, H., Tao, Y., Brennan, M. (1997). Pain as a predictor of outcome in patients with operable pancreatic carcinoma. *Surgery*, 122(1), 53-59. doi: 10.1016/S0039-6060(97)90264-6.
48. Kikuchi, G. ir Yoshida, T. (1983). Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 53(3), 163-183. doi: 10.1007/978-1-4613-3879-6_10
49. Kyriakis, J. M. ir Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews*, 81(2), 807-869. Prieiga per internetą: <http://physrev.physiology.org/content/81/2/807.long>
50. Koscielny, G., An, P., Carvalho-Silva, D., Cham, J.A., Fumis, L., Gasparyan, R., ... Dunham, I. (2016). Open Targets: a platform for therapeutic target identification and validation. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), 985-994. doi: 10.1093/nar/gkw1055
51. Koury, M. J. Ir Ponka, P. (2004). New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annual review of nutrition*, 24, 105-131. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306
52. Kühn, L. C. (2015). Iron regulatory proteins and their role in controlling iron metabolism. *Metallomics*, 7(2), 232-243. doi: 10.1039/c4mt00164h.
53. Lee, A. S. (2001). The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends in biochemical sciences*, 26(8), 504-510. Prieiga per internetą: [http://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/fulltext/S0968-0004\(01\)01908-9](http://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/fulltext/S0968-0004(01)01908-9)
54. Liu, Y., Moënné-Loccoz, P., Loehr, T. M. ir Ortiz de Montellano, P. R. (1997). Heme oxygenase-1, intermediates in verdoheme formation and the requirement for reduction equivalents. *The Journal of biological chemistry*, 272(11), 6909-6917. doi: 10.1074/jbc.272.11.6909
55. Liu, X. M., Peyton, K. J., Ensenat, D., Wang, H., Shafter, A. L., Alam, J. ir Durante, W. (2005). Endoplasmic reticulum stress stimulates heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle. Role in cell survival. *The Journal of biological chemistry*, 280(2), 872-877. doi: 10.1074/jbc.M410413200
56. Martindale, J. L. Ir Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of cellular physiology*, 192(1), 1-15. doi: 10.1002/jcp.10119

57. McCoubrey, W. K-Jr., Ewing, J. F. ir Maines, M. D. (1992). Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 295, 13-20. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90481-B](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90481-B)
58. Moghaddam, A., Zhang, H. T., Fan, T. P., Hu, D. E., Lees, V. C., Turley, H., ... Bicknell, R. (1995). Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), 998–1002. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC42624/>
59. Moore, P. S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F. X., Lemoine, N. R., ... Scarpa, A. (2001). Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 439, 798–802. doi 10.1007/s004280100474
60. NCBI - National Center for Biotechnology Information. (2017a). Heme oxygenase 1 [Homo sapiens]. Prieiga per internetą: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_002124.1
61. NCBI - National Center for Biotechnology Information. (2017b). HMOX1 heme oxygenase 1 [Homo sapiens (human)]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3162>
62. Okabe, T., Yamaguchi, N. ir Ohsawa, N. (1983). Establishment and Characterization of a Carcinoembryonic Antigen (CEA) - Producing Cell Line from a Human Carcinoma of the Exocrine Pancreas. *Cancer*, 51(4), 662-668. doi: 10.1002/1097-0142(19830215)51:4<662::AID-CNCR2820510419>3.0.CO;2-X
63. Otterbein, L. E. ir Choi, A. M. K. (2000). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), 1029-1037. Prieiga per internetą: <http://ajplung.physiology.org/content/279/6/L1029.long>
64. Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(9), 2181-2196. doi: 10.1002/jps.20874
65. Padmanabhan, N., Kumar, B. R., Pookunju, A. P., Srinivasan, A., Mahajan, V. (2015). Preliminary Experience and Morbidity Analysis of Cytoreductive Surgery with Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (CRS/Hiperc) from a Tertiary Cancer Center in India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(6), 9-13. doi: 10.7860/JCDR/2015/14216.6075
66. Pancreatic Cancer Canada. (2006). Know the Facts and Statistics. Prieiga per internetą: http://www.pancreaticcancercanada.ca/site/PageServer?pagename=facingpancreaticcancer_facts
67. Ponka, P., Beaumont, C. Ir Richardson, D. R. (1998). Function and regulation of transferrin and ferritin. *Seminars in hematology*, 35(1), 35-54. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9460808>

68. Poškus, P., Strupas, K., Gushin, V. Ir Sugarbaker, PH. (2014). Cyto-reductive Surgery and HIPEC in the Baltic States: An International Scientific Workshop with Live Surgery. *Viszeralmedizin*, 30(5), 353-359. doi: 10.1159/000368685
69. Price, J. T. ir Thompson, E. W. (2002). Mechanisms of tumour invasion and metastasis: emerging targets for therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 6(2), 217-233. doi: 10.1517/14728222.6.2.217
70. Raju, R. S., Coburn, N., Liu, N., Porter, J. M., Cheung, M. C., ... Mittmann N. (2015). A population-based study of the epidemiology of pancreatic cancer: a brief report. *Current Oncology*. 22(6), 478-484. doi: 10.3747/co.22.2653.
71. Ryter, S. W., Alam, J. Ir Choi, A. M. K. (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews*, 86, 583–650. doi: 10.1152/physrev.00011.2005.
72. Saad, S. Y., Najjar, T. A. ir Alashari, M. (2004). Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 31(12), 862-867. doi: 10.1111/j.1440-1681.2004.04127.x
73. Sacca, P., Meiss, R., Casas, G., Mazza, O., Calvo, JC, Navone, N. ir Vazquez, E. (2007). Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 97(12), 1683-1689. doi: 10.1038/sj.bjc.6604081
74. Salvesen, G. S. ir Abrams, J. M. (2004). Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene*, 23, 2774–2784. doi: 10.1038/sj.onc.1207522
75. Salvesen, G. S. ir Dixit, V. M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 443–446. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80430-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80430-4)
76. Shibahara, S., Yoshizawa, M., Suzuki, H., Takeda, K., Meguro, K. ir Endo, K. (1993). Functional Analysis of cDNAs for Two types of Human Heme Oxygenase and Evidence for Their Separate Regulation. *The Journal of Biochemistry*, 113, 214-218. Prieiga per internetą: https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/113/2/113_2_214/_pdf
77. Shibahara, S., Müller, R. M. ir Taguchi, H. (1987). Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *The Journal of biological chemistry*, 262(27), 12889-12892. Prieiga per internetą: <http://www.jbc.org/content/262/27/12889.long>
78. Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265–7279. doi: 10.1038/sj.onc.1206933
79. Siegel, R. L., Naishadham, D. ir Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA: Cancer Journal For Clinicians*, 67, 7–30, doi: 10.3322/caac.21387

80. Stocker, R. ir Perrella MA. (2006). Heme Oxygenase-1 A Novel Drug Target for Atherosclerotic Diseases?. *Circulation*, 114, 2178-2189. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.598698
81. Subjeck, J. R. ir Shyy, T. T. (1986). Stress protein systems of mammalian cells. *The American journal of physiology*, 1(1), 1-17. Prieiga per internetą: <http://ajpcell.physiology.org/content/ajpcell/250/1/C1.full.pdf>
82. Sugishima, M., Higashimoto, Y., Oishi, T., Takahashi, H., Sakamoto, H., Noguchi, M. ir Fukuyama, K. (2007). X-ray Crystallographic and Biochemical Characterization of the Inhibitory Action of an Imidazole–Dioxolane Compound on Heme Oxygenase. *Biochemistry*, 46 (7), 1860–1867. doi: 10.1021/bi062264p
83. Takahashi, A., Matsumoto, H., Nagayama, K., Kitano, M., Hisrose, S., Tanaka, H., ... Ohnishi, T. (2005). Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing. *Cancer research*, 64(24), 8839-8845. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1876
84. Tenhunen, R., Marver, H. S. ir Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61, 748-755. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC225223/>
85. UC San Diego Health. (n. d.). HIPEC treatment. Prieiga per internetą: <https://health.ucsd.edu/specialties/cancer/programs/gastrointestinal/HIPEC/Pages/default.aspx>
86. UCSF – University of California San Francisco. (2002). Hemoglobin and Functions of Iron. Prieiga per internetą: https://www.ucsfhealth.org/education/hemoglobin_and_functions_of_iron/
87. Van Der Speeten, K., Stuart, O. A. Ir Sugarbaker, P. H. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of perioperative cancer chemotherapy in peritoneal surface malignancy. *Cancer journal*, 15(3), 216-224. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181a58d95
88. Van Der Zee, J. (2002). Heating the patient: a promising approach? *Annals of Oncology*, 13(8), 1173–1184. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181239>
89. Verbeke, C. S., ir Menon, K. V. (2009). Redefining resection margin status in pancreatic cancer. *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 11(4), 282–289. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2009.00055.x>
90. Verwaal, V. J., van Ruth, S., de Bree, E., van Sloothen, G. W., van Tinteren, H., Boot, H., ... Zoetmulder, F. A. (2003). Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(20), 3737-3743. doi: 10.1200/JCO.2003.04.187

91. Vidair, C. A., Doxey, S. J. ir Dewey, W. C. (1993). Heat shock alters centrosome organization leading to mitotic dysfunction and cell death. *Journal of cellular physiology*, 154(3), 443-455. doi: 10.1002/jcp.1041540302
92. Was, H., Cichon, T., Smolarczyk, R., Rudnicka, D., Stoppa, M., Chevalier, C., ... Jozkowicz, A. (2006). Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *The American journal of pathology*, 169(6), 2181-2198. doi: 10.2353/ajpath.2006.051365
93. Was, H., Dulak, J. ir Jozkowicz, A. (2010). Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy. *Current Drug Targets*, 11(12), 1551-1570. doi: 10.2174/1389450111009011551
94. Wilson, R. H., Chandra, M., Scheiman, J., Simeone, D., McKenna, B., Purdy J. Ir Mycek, M. A. (2009). Optical spectroscopy detects histological hallmarks of pancreatic cancer. *Optics Express*, 17(20), 17502-17516. doi: 10.1364/OE.17.017502
95. Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K. ir Hruban, R. H. (2013). Recent Progress in Pancreatic Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(5), 318-348. doi:10.3322/caac.21190.
96. Wu, W.-T., Chi, K.-H., Ho, F.-M., Tsao, W.-C., & Lin, W.-W. (2004). Proteasome inhibitors up-regulate haem oxygenase-1 gene expression: requirement of p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) activation but not of NF-kappaB (nuclear factor kappaB) inhibition. *Biochemical Journal*, 379(Pt 3), 587-593. <http://doi.org/10.1042/BJ20031579>
97. Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., ... Schlag, P. M. (2002). *The Lancet Oncology*, 3(8), 487-497. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00818-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00818-5)
98. Zunino, B., Rubio-Patiño, C., Villa, E., Meynet, O., Proics, E., Cornille, A., ... Ricci, J. E. (2015). Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy leads to an anticancer immune response via exposure of cell surface heat shock protein 90. *Oncogene*, 35(2), 261-268. doi: 10.1038/onc.2015.82
99. Zuo, L., Christofi, F. L., Wright, V. P., Liu, C. Y., Merola, A. J., Berliner, L. J. ir Clanton, T. L. (2000). Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle. *American journal of physiology. Cell physiology*, 279(4), 1058-1066. Prieiga per internetą: <http://ajpcell.physiology.org/content/279/4/C1058.long>