VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ CENTRAS INOVATYVIOS MEDICINOS CENTRAS

Sima GARBERYTĖ

CITOTOKSINIŲ VAISTŲ ĮSISAVINIMO IR SULAIKYMO ORGANIZME SĄSAJŲ SU CHEMOTERAPINIU ATSPARUMU IR NAVIKO ATKRYČIU ĮVERTINIMAS

Mokslo daktaro disertacija Gamtos mokslai, Biologija (N 010)

Vilnius, 2021

Mokslo daktaro disertacija rengta 2015–2020 metais Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre ir Nacionaliniame vėžio institute pagal LR švietimo, mokslo ir sporto ministro 2019 m. vasario 22 d. įsakymu Nr. V-160 suteiktą doktorantūros teisę Vytauto Didžiojo universitetui, Gamtos tyrimų centrui ir VMTI Inovatyvios medicinos centrui.

Mokslinis vadovas:

Dr. Marius Strioga (Nacionalinis vėžio institutas, Gamtos mokslai, Biologija N 010), nuo 2015-10-01 iki 2020-03-31,

Dr. Vita Pašukonienė (Nacionalinis vėžio institutas, Gamtos mokslai, Biologija N 010) nuo 2020-04-01.

Mokslo daktaro disertacija ginama Vytauto Didžiojo universiteto, Gamtos tyrimų centro ir Inovatyvios medicinos centro Biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

Prof. dr. **Jaunius Urbonavičius** (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Gamtos mokslai, Biologija N 010).

Nariai:

Doc. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, Gamtos mokslai, Biologija N 010).

Dr. Eiva Bernotienė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, Gamtos mokslai, Biologija N 010).

Doc. dr. **Vincas Urbonas** (Nacionalinis vėžio institutas, Medicinos ir sveikatos mokslai, Medicina M 001).

Dr. **Dace Pjanova** (Latvijos biomedicininių tyrimų ir studijų centras, Ryga, Latvija, Gamtos mokslai, Biologija N 010).

Mokslo daktaro disertacija bus ginama viešame Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2021 m. rugsėjo 29 d. 11:00 val. Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre.

Adresas: Santariškių g. 5, LT-08406, Vilnius, Lietuva.

STATE RESEARCH INSTITUTE CENTRE FOR INNOVATIVE MEDICINE

Sima GARBERYTĖ

EVALUATION OF PATTERN OF CHEMOTHERAPY RESISTANCE AND TUMOUR RELAPSE RELATED TO CYTOTOXIC DRUG UPTAKE AND RETENTION

Doctoral dissertation Natural Sciences, Biology (N 010)

Vilnius, 2021

The doctoral dissertation has been prepared during the period of 2015–2020 at State Research Institute Centre for Innovative Medicine and at National Cancer Institute. The right of doctoral studies was granted to Vytautas Magnus University, Nature Research Centre and State Research Institute Centre for Innovative Medicine, on 22 February 2019, by the decision No. V-160 of the Minister of Education and Science of the Republic of Lithuania.

Academic supervisor:

Dr. Marius Strioga (National Cancer Institute, Natural Sciences, Biology N 010), from 2015-10-01 till 2020-03-31

Dr. Vita Pašukonienė (National Cancer Institute, Natural Sciences, Biology N 010), from 2020-04-01

Dissertation will be defended at the Committee of Biology of Vytautas Magnus University, Nature Research Centre, Centre for Innovative Medicine:

Chairman

Prof. Dr. Jaunius Urbonavičius (Vilnius Gediminas Technical University, Natural Sciences, Biology N 010).

Members:

Assoc. Prof. Dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology N 010).

Dr. **Eiva Bernotienė** (State Research Institute Centre for Innovative Medicine, Natural Sciences, Biology N 010).

Assoc. Prof. Dr. Vincas Urbonas (National Cancer Institute, Medical and Health Sciences, Medicine M 001).

Dr. Dace Pjanova (Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia, Natural Sciences, Biology N 010).

The doctoral thesis will be defended in the public meeting of the Committee of Biology at 29th of September, 11:00 am, at State Research Institute Centre for Innovative Medicine.

Address: Santariškių str. 5, LT-08406, Vilnius, Lithuania.

TURINYS

| SANTE | RUMPOS | 8 |
|----------|--|-----|
| ĮVADA | ۸S | .11 |
| 1. LIT | ERATŪROS APŽVALGA | .15 |
| 1.1. | Atsparumas chemoterapijai | 15 |
| 1.1.1. | Daugiavaisčio atsparumo baltymai | 16 |
| 1.1.2. | Ne genominiai veiksniai | .18 |
| 1.2. | Vaisto dozės apskaičiavimo metodikos | .19 |
| 1.2.1. | Kūno paviršiaus plotu (KPP) paremtas vaisto dozės skaičiavimo metodas | .19 |
| 1.2.2. | Terapinis vaistų monitoringas | 21 |
| 1.2.2.1. | 5-Fluoruracilas | .23 |
| 1.3. | Platinos turintys junginiai | .25 |
| 1.4. | Mielosupresija | 26 |
| 1.5. | Vietinio (lokalaus) vaistų pristatymo įstrategijos | .27 |
| 1.6. | Pelių limfomos modeliai | 29 |
| 2. ME | DŽIAGOS IR METODAI | .31 |
| 2.1. | Prietaisai | 31 |
| 2.2. | Medžiagos | .31 |
| 2.2.1. | Cheminės medžiagos | .31 |
| 2.2.2. | Antikūnai | .32 |
| 2.3. | Metodai | .32 |
| 2.3.1. | Pelės | .32 |
| 2.3.2. | Vaistai | .32 |
| 2.3.3. | Ląstelės | .33 |
| 2.3.4. | Ląstelių skaičiavimas | .33 |
| 2.3.4.1. | In vitro kultivuotų ląstelių skaičiavimas ir gyvybingumo vertinimas | .33 |
| 2.3.4.2. | Iš pelių pilvaplėvės ertmės išskirtų ląstelių diferencinis skaičiavimas | .34 |
| 2.3.5. | Bendro ascito tūrio vertinimas | .35 |
| 2.3.6. | Naviko modelis ir in vivo gydymas | .35 |
| 2.3.6.1. | EL4 T ląstelių limfomos modelis | 35 |
| 2.3.6.2. | SL2 TSDR (two step dormancy/recurrence) modelis | .35 |
| 2.3.7. | SL2 imuninio fenotipo vertinimas | .35 |
| 2.3.8. | Doksorubicino susikaupimo ląstelės vertinimas tėkmės citometrijos metodu | .36 |

| 2.3.9. | Injekcija į retro-orbitalinį rezginį | 36 |
|----------|--|-----|
| 2.3.10. | Kraujo mėginių analizė | 37 |
| 2.3.11. | Medžiagos paruošimas histologinei analizei | 37 |
| 2.3.12. | Ląstelių iš blužnies ir užkrūčio liaukos suspensijos paruošimas | 37 |
| 2.3.13. | Didelio našumo skysčių chromatografijos metodas | 38 |
| 2.3.14. | Farmakokinetika | 38 |
| 2.3.15. | Elektroninė mikroskopija (TEM) | 39 |
| 2.3.16. | Liposominio doksorubicino vertinimas dinaminės šviesos sklaidos metodu | 39 |
| 2.3.17. | Konfokalinė mikroskopija ir spektrinė analizė | .39 |
| 2.3.18. | Statistinė duomenų analizė | 40 |
| 3. RE2 | ZULTATAI | 41 |
| 3.1. | Chemoterapinio vaisto doksorubicino susikaupimo EL4 T limfomos ląstelėse ir jo | |
| | terapinio efektyvumo sąsajų su naviko dydžiu vertinimas | .41 |
| 3.1.1. | C57BL6/NCr pelių išgyvenamumo tyrimai | 41 |
| 3.1.2. | EL4 T limfomos ląstelių augimo C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmėje vertinimas | 44 |
| 3.1.2.1. | Ascito tūrio augimo C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmėje vertinimas | 44 |
| 3.1.2.2. | EL4 limfomos ląstelių kiekio C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmėje vertinimas | 45 |
| 3.1.2.3. | EL4 limfomos ląstelių tankio C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmėje vertinimas | 46 |
| 3.1.3. | Doksorubicino farmakokinetika | 48 |
| 3.1.3.1. | Viduląstelinio doksorubicino vertinimas | 48 |
| 3.1.3.2. | Ląstelinio doksorubicino ir naviko dydžio sąsajų vertinimas | 51 |
| 3.1.3.3. | Plazmos doksorubicino vertinimas C57BL6/NCr pelėse | 52 |
| 3.1.4. | Sisteminis doksorubicino hematologinis poveikis | 53 |
| 3.1.5. | Apibendrinimas | 56 |
| 3.2. | SL2 limfomos TSDR modelis | 57 |
| 3.2.1. | SL2 ląstelių, inkubuotų su doksorubicinu, vertinimas tėkmės citometru | 59 |
| 3.2.2. | DBA/2 pelių išgyvenamumo tyrimai | 61 |
| 3.2.3. | Doksorubicino plazmos farmakokinetikos vertinimas | 62 |
| 3.2.4. | Apibendrinimas | 63 |
| 3.3. | Doksorubicino stabilumo tyrimai | 64 |
| 3.3.1. | Vaistų stabilumo tyrimas HPLC pagalba | 64 |
| 3.3.2. | Doksorubicino sugerties ir fluorescencijos spektrų vertinimas | 66 |
| 3.3.3. | Doksorubicino stabilumo tyrimai Ramano spektroskopijos metodu | .69 |
| 3.3.4. | Chemoterapinio vaisto doksorubicino fluorescencijos vertinimas konfokalinės | |
| | mikroskopijos metodu | 71 |

| . Ilgalaikio 37 °C temperatūros poveikio chemoterapinio vaisto doksorubicino | | |
|--|--|--|
| imas tėkmės citometru | 72 | |
| sto doksorubicino fluorescencijos vertinimas | | |
| meabilizuotose SL2 ląstelėse | 74 | |
| bicino Caelyx stabilumo vertinimas | 75 | |
| noterapinio vaisto doksorubicino poveikio | | |
| | 76 | |
| | 79 | |
| REZULTATŲ APTARIMAS80 | | |
| | | |
| L DISSERTATION | | |
| | | |
| | 132 | |
| CIJOSE | 133 | |
| | 134 | |
| GYVENIMO APRAŠYMAS135 | | |
| | 138 | |
| | peratūros poveikio chemoterapinio vaisto doksorub imas tėkmės citometru sto doksorubicino fluorescencijos vertinimas meabilizuotose SL2 ląstelėse bicino Caelyx stabilumo vertinimas noterapinio vaisto doksorubicino poveikio S L DISSERTATION | |

SANTRUMPOS

5-FU-5-fluoruracilas

ABC – ATP surišanti kasetė (anglų k. ATP binding cassette)

AML – Ūmi mieloleukemija (anglų k. Acute myeloid leukaemia)

ALL – Ūmi limfoleukemija (anglų k. Acute lymphoblastic leukaemia

AU(M)C – Plotas po (momentine) koncentracijos kreive (anglų k. *Area under the (first moment) curve*)

BCRP - Krūties vėžio atsparumo baltymas (anglų k. Breast cancer resistance protein)

BSA – Kūno paviršiaus plotas (anglų k. Body surface area)

CBC – Pilnas kraujo ištyrimas (anglų k. Complete blood count)

CIN – Chemoterapijos sukeliama neutropenija (anglų k. Chemotherapy induced neutropenia)

CR – Visiška remisija (anglų k. Complete remission)

Cl-Pašalinimas, klirensas (anglų k. Clearance)

C_{max} – Didžiausia koncentracija plazmoje

Css - Pusiausvyros koncentracija plazmoje (anglų k. Steady state plasma level)

CTR – Vario nešiklis (anglų k. Copper transporter)

DHFU – 5,6-dihidro-5-fluoruracilas

dMCF – Vidutinės kanalo fluorescencijos skirtumas (anglų k. Difference in mean channel

fluorescence)

DLS – Dinaminė šviesos sklaida (anglų k. Dynamic light scattering)

DAU-Daunorubicinas

Dox – Doksorubicinas

Dox-dgr – Ilgą laiką 37 °C žmogaus kūno temperatūroje laikytas degradavęs doksorubicinas

(anglų k. Degraded doxorubicin)

DPD – Dihidropirimidino dehidrogenazė

EPI – Epirubicinas

EPR – Sustiprintas pralaidumas ir sulaikymas (anglų k. Enhanced permeability and retention)

 $FBAL-\alpha\text{-fluor-}\beta\text{-alaninas}$

FBS – Veršelio serumas (anglų k. Fetal Bovine Serum)

FCM – Tėkmės citometrija (anglų k. Flow cytometry)

GI – Virškinamasis traktas (anglų k. Gastrointestinal)

GR – Granulocitai

HGB – Hemoglobinas

HIV – Žmogaus imunodeficito virusas (anglų k. Human immunodeficiency virus)

HR – Santykinė rizika (anglų k. Hazard ratio)

HPLC – Didelio našumo skysčių chromatografija (anglų k. *High performance liquid chromatography*)

IP/i.p. – į pilvaplėvės ertmę (anglų k. *Intraperitoneal*)

IV/i.v. – į veną (anglų k. Intravenous)

Kel-Eliminacijos konstanta

KPP – Kūno paviršiaus plotas

LY – Limfocitai

MBC - Metastazavęs krūties vėžys (anglų k. Metastatic breast cancer)

MCV – Vidutinis ląstelių tūris (anglų k. Mean cell/corpuscular volume)

MCF – Vidutinė kanalo fluorescencija (anglų k. Mean channel fluorescence)

MDR – Daugiavaistis atsparumas (anglų k. Multidrug resistance)

MO – Monocitai

MP - Merkaptopurinas

MPV – Vidutinis trombocitų tūris (anglų k. Mean platelet volume)

MRP – Daugiavaisčio atsparumo baltymas (anglų k. Multidrug resistance protein)

MRT – Vidutinis gyvavimo laikas (anglų k. Mean residence time)

MTD – Didžiausia toleruojama dozė (anglų k. Maximum tolerated dose)

MTX – Metotreksatas (anglų k. Methotrexate)

MTT– Metiltiazolildifenil-tetrazolio bromidas (anglų k. *Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*)

NBD – Nukleotidą prijungiantis domenas (anglų k. Nucleotide binding domain)

NSCLC – Nesmulkialąstelinis plaučių vėžys (anglų k. Non-small cell lung cancer)

PBS – Fosfatinis buferinis druskos tirpalas (anglų k. Phosphate buffered saline)

PD – Farmakodinamika

PerC – Pilvaplėvės ertmė (anglų k. Peritoneal cavity)

P-gp – Pralaidumo glikoproteinas (anglų k. Permeability glycoprotein)

PK – Farmakokinetika

PLT – Trombocitai (anglų k. Platelets)

PR – Dalinis atsakas į gydymą (anglų k. Partial response)

RES – Retikuloendotelinė sistema

ROI – Dominanti sritis (anglų k. Region of interest)

SD – Stabili liga (anglų k. Stable disease)

TBM – Naviką turinčios pelės (anglų k. Tumour bearing mice)

TEM – Transmisijos elektroninė mikroskopija

TDM – Terapinis vaistų monitoringas (anglų k. Therapeutic drug monitoring)

TKI – Tirozino kinazių slopikliai (anglų k. Tyrosine kinase inhibitors)

TMD – Transmembraninis domenas

 $TSDR-Dviejų žingsnių ramybės būsenos/atsinaujinimo modelis (anglų k. \ Two \ step$

dormancy/recurrence)

T_{1/2} – Eliminacijos iš plazmos pusėjimo laikas

 V_d – Pasiskirstymo tūris (anglų k. Volume of distribution)

WBC – Leukocitai (anglų k. White blood cells)

ĮVADAS

Temos aktualumas

Doksorubicinas (Dox) – vienas antraciklinų grupės priešvėžinių vaistų, plačiai taikomas krūties, kiaušidžių, prostatos, smegenų, kasos, plaučių vėžio, taip pat ūminės limfoleukemijos ir mieloleukemijos bei Hodžkino limfomos gydymui [1]. Nors vaistas pasižymi puikiu citostatiniu efektyvumu tiek hematologiniu, tiek kietuju (solidiniu) naviku atveju, doksorubicino sukeliamas sunkus šalutinis poveikis ir dažnai išsivystantis atsparumas chemoterapijai riboja jo taikymo galimybes onkologinėje terapijoje [2], [3]. Dažniausiai minimi chemoterapinį atsparumą sukeliantys veiksniai yra daugiavaisčio atsparumo baltymai MDR1, MRP1, BCRP [4]; padidėjusi lastelių apoptoze slopinančių ir proliferacija skatinančių onkogenų raiška, naviko gebėjimas išvengti imuninės sistemos atsako, angiogenezės skatinimas ir kt. [5]. Taip pat parodyta, kad priešvėžinių agentų isisavinimas lastelėse ir jų sukeliamas citotoksiškumas sumažėja didėjant ląstelių tankiui. Šis procesas, pirmą kartą pastebėtas in vitro, vadinamas "inokuliaciniu efektu" (anglų k. inocular effect) [6], [7]. Šis reiškinys galėtų lemti didesnį gydymo atsparumą ūminių leukemijų su padidėjusiu leukocitų skaičiumi atveju. Tokiu atveju galima būtų tikėtis, kad vartojant didesnes vaisto suleistas dozes, terapiniai rezultatai bus geresni. Deja, chemoterapinio vaisto dozės ir koncentracijos plazmoje įtaka gydymo atsakui nėra pakankamai ištirta [8]. Didesnė vaisto koncentracija plazmoje nebūtinai lemia didesnį vaisto įsisavinimo navike ar geresnį gydymo atsaką. Terapinio vaistų monitoringo (anglų k. TDM – therapeutic drug monitoring), sėkmingai naudojamo vaistu doziu individualizavimui ir ju veiksmingumo gerinimui ivairiose srityse, pritaikymas onkologijoje yra labai ribotas [9], [10], o šiuo metu plačiai taikomas dozės apskaičiavimas pagal kūno paviršiaus plotą (KPP, anglų k. BSA – body surface area) neįvertina individualių citotoksinių vaistų pašalinimo iš organizmo ypatumų, kas gali lemti per didelės ar per mažos vaisto dozės paskyrimą pacientui. Dėl to vaisto koncentracija pacientų kraujo plazmoje gali skirtis 10-100 kartų, nepaisant to, kad pacientai gauna tą pačią vaisto dozę kvadratiniam metrui kūno ploto [11-13]. Situaciją apsunkina didelis citotoksinių junginių pasiskirstymo tūris ir trumpas eliminacijos plazmoje pusėjimo laikas, kurie lemia greitą vaisto pašalinimą iš plazmos ir susikaupima audiniuose daug didesniais nei didžiausia plazmos koncentracija kiekiais [12], [14]. Pavyzdžiui, kraujo ir kaulų čiulpų ląstelės geba sukaupti iki 200 kartų daugiau chemoterapinio vaisto doksorubicino negu plazma [14]. Parodyta, kad platinos junginiu išlaikymas audiniuose net iki 20 metų po užbaigto gydymo buvo susijęs su ilgesne remisijos trukme ir geresniu išgyvenamumu nesmulkialąstelinio (anglų k. NSCLC - non-small cell lung cancer) plaučių vėžio atveju [15], [16]. Manoma, kad svarbus ne tik audiniuose sukaupto vaisto kiekis, bet ir jo sulaikymo audiniuose trukmė. Šiuo atveju ploto po vaisto koncentracijos audiniuose kreive (AUC) skaičiavimas galėtų būti svarbus kriterijus chemoterapinio gydymo efektyvumui vertinti.

Ascitinių navikų modeliai galėtų būti patogi priemonė įvertinti ląstelėse sukaupto chemoterapinio vaisto doksorubicino įsisavinimą, jo sulaikymo organizme trukmę bei ieškoti gautų duomenų sąsajų su terapiniu gydymo efektyvumu ir naviko atkryčiu. Tokių sąsajų nustatymas leistų sukurti stebėti vaisto patekimo, fiksacijos ir kaupimosi ląstelėse ypatumus ir, esant būtinybei, koreguoti terapijos schemą ar preparato dozę. Ilgalaikio temperatūros poveikio doksorubicino stabilumui tyrimai padėtų įvertinti fiziologinės temperatūros įtaką audiniuose sukaupto vaisto gebėjimui slopinti vėžinių ląstelių proliferaciją ir naviko atsinaujinimą po ilgo remisijos laikotarpio.

Darbo tikslas

Šio disertacijos darbo tikslas buvo ištirti citotoksinio vaisto doksorubicino įsisavinimo ir sulaikymo organizme sąsajas su chemoterapiniu atsparumu ir naviko atkryčiui pelių limfomos modeliuose.

Darbo uždaviniai

- Nustatyti eksperimentinių pelių limfomos ląstelių linijos naviko dydžio ir ląstelių tankio įtaką doksorubicino įsisavinimui ir sulaikymo naviko ląstelėje trukmei ir įvertinti šių rodiklių sąsajas su naviko atkryčiu ir atsparumu chemoterapijai.
- Nustatyti eksperimentinių pelių limfomos ląstelių linijos naviko dydžio ir ląstelių tankio įtaką sisteminiam doksorubicino poveikiui ir įvertinti šio poveikio sąsajas su chemoterapinio gydymo efektyvumu.
- Naudojant sukurtą in vitro → in vivo dviejų žingsnių ramybės/atsinaujinimo eksperimentinių pelių limfomos ląstelių linijos modelį įvertinti viduląstelinio doksorubicino koncentracijos su naviko atkryčiu ir pelių bendru išgyvenamumu sąsajas.
- 4. Įvertinti fiziologinės žmogaus kūno temperatūros ilgalaikį poveikį chemoterapinio vaisto doksorubicino stabilumui, mielosupresiniam ir antiproliferaciniam aktyvumui.
- Įvertinti liposominio doksorubicino "Caelyx" mielopsupresinį aktyvumą ir susikaupimo gyvose ir permeabilizuotose ląstelėse ypatumus prieš ir po ilgalaikio fiziologinės žmogaus kūno temperatūros poveikio.

Ginamieji teiginiai

- Net nedidelis vėžinių ląstelių kiekio ir tankio padidėjimas lemia reikšmingą chemoterapinio vaisto doksorubicino įsisavinimo, sulaikymo trukmės ir atsako į gydymą pablogėjimą. Vaisto įsisavinimas didesnio dydžio ir tankio navikų ląstelėse yra reikšmingai blogesnis lyginant su mažesnio dydžio navikais.
- Vietinis doksorubicino įsisavinimas ir jo sulaikymo naviko ląstelėse trukmė, priešingai nei jo sukeliamas sisteminis poveikis, teigiamai koreliuoja su terapiniu vaisto efektyvumu ir naviko atkryčiu.
- 3. Ilgalaikis fiziologinės žmogaus kūno temperatūros poveikis lemia laisvo chemoterapinio vaisto doksorubicino mielosupresinio ir antiproliferacinio aktyvumo mažėjimą, silpnesnį vaisto jungimąsi prie ląstelės branduolio struktūrų. Priešingai, nei liposominio doksorubicino atveju, laisvo doksorubicino įsisavinimas ląstelėse po ilgalaikio fiziologinės žmogaus kūno temperatūros poveikio reikšmingai sumažėja lyginant su šviežiu vaistu.
- 4. Lyginant su laisvu doksorubicinu, liposominio chemoterapinio vaisto doksorubicino įsisavinimas ląstelėse vyksta lėčiau. Antiproliferacinis liposominio doksorubicino poveikis, tikėtina, labiau pasireiškia ne cirkuliuojant kraujotakoje, bet vaisto susilaikymo audiniuose metu pasibaigus chemoterapiniam gydymui.

Darbo naujumas

Daugelio autorių parodyta, kad dideli doksorubicino kiekiai kaupiasi audiniuose, kuriuose jis geba išsilaikyti ilgai, praėjus net 8–240 dienų nuo gydymo pabaigos [17] ir iki 550 kartų didesniais nei kraujo plazmoje kiekiais [18], [19], [20], [21]. Visgi ankstesni tyrinėjimai apsiribodavo vaisto farmakokinetikos rodiklių kraujo plazmoje nustatymu. Tiesa, kai kurie autoriai vertino audiniuose sukaupto doksorubicino plotą po koncentracijos kreive (AUC) [20], [21], tačiau šio galimai svarbaus klinikiniu požiūriu rodiklio įtaka terapiniam efektyvumui ar sukeltam pašaliniam poveikiui anksčiau nebuvo tyrinėta. Šiame darbe buvo tirta audiniuose sukaupto doksorubicino AUC ir jo sąsajos su chemoterapiniu efektyvumu.

Chemoterapinio vaisto doksorubicino stabilumas anksčiau buvo tiriamas įvairiomis sąlygomis: hidrolize, peroksido oksidacija, kaitinant 80 °C, fotolize, apšvitinimu mikrobangomis [22], [23]. Autorės žiniomis, ilgalaikis (365 dienų trukmės) žmogaus kūno temperatūros poveikis doksorubicino stabilumui iki šiol nebuvo vertinamas.

Siekiant įvertinti doksorubicino susikaupimo ląstelėse su naviko atkryčiu sąsajas, buvo sukurtas specialus *in vitro* \rightarrow *in vivo* dviejų žingsnių ramybės/atsinaujinimo TSDR (anglų k. TSDR – *two step dormancy/recurrence*) modelis. Priešingai nei kitų autorių [24], mūsų modelis paremtas trumpalaike (iki 30 min.) naviko ląstelių inkubacija su vaistu ir jų tolesniu vertinimu ne *in vitro* sąlygomis, bet *in vivo* pelių pilvaplėvės ertmėje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Atsparumas chemoterapijai

Atsparumas chemoterapijai – vienas pagrindinių veiksnių, lemiančių mažesnį priešvėžinio gydymo veiksmingumą ir siejamas su blogesne prognoze bei didesne onkologinių pacientų mirties rizika [25]. Ląstelių atsparumas pagal atsiradimo pobūdį gali būti skirstomas į įgytą, išsivystantį priešvėžinės terapijos metu, ir vidinį, t. y. įgimtą, ląstelių atsparumą [26]. Naviko ląstelių atsparumo citotoksiniams vaistams vystymąsi gali lemti genų mutacijos, padidėjęs vaistų išmetimas (*efflux*) dėl padidėjusios daugiavaisčių atsparumo baltymų (MDR1, MRP1, BCRP) raiškos, miRNR, egzosomos, su vėžiu susiję fibroblastai (CAF), naviko mikroaplinka (TME), alternatyvių signalizavimo kelių suaktyvinimas (1 pav.).



1 pav. Veiksniai, lemiantys atsparumo vaistams vystymąsi vėžinėse ląstelėse (Hussain et al., 2019) Fig. 1. Factors contributing to development of drug resistance in cancer cells (Hussain et al., 2019)

Atsparumą chemoterapijai sukeliančių "vaistams atsparių mutacijų" (anglų k. – *drug resistant mutations*) sąvoka naudojama nuo 1950-ųjų [27]. Nuo to laiko buvo identifikuota daug su vėžiu susijusių genų. Pavyzdžiui, APC (angl. k. – *adenomatous polyposis coli*) geno mutacija, kurią turintiems žmonėms nuolat formuojasi polipai, yra susijusi su didesne rizika susirgti storosios ir gaubtinės žarnos vėžiu [28], [29]. Storosios ir gaubtinės žarnos vėžio atveju taip pat parodyta KRAS geno, kaip prognozuojamojo (prediktyvinio) žymens nuspėti atsaką į gydymą cetuksimabu, svarba [29], [30]. Kitas gerai žinomas onkogenas HER2, reguliuojantis ląstelių proliferaciją, kurio raiškos padidėjimas yra siejamas su 20–25 % krūties vėžio atvejų. Taikant trastuzumabo terapiją šio tipo krūties vėžio gydymui, moterų mirtingumas sumažėjo trečdaliu,

pasikartojančio krūties vėžio atvejų sumažėjo 40 % [29], [31]. Tuo tarpu DNR pažaidų reparacijoje (taisyme) dalyvaujančių BRCA1 ir BRCA2 genų mutacijos lemia iki 60–85 % didesnę krūties vėžio, iki 40–60 % epitelinio kiaušidžių naviko riziką. Šios mutacijos taip pat siejamos su didesniu prostatos vėžio atvejų skaičiumi [29], [32].

Daugelis tyrimų parodo prognostinių biožymenų, kaip potencialių taikinių, priešvėžinei terapijai, paieškos svarbą. Priešvėžinėje taikinių terapijoje naudojami tirozino kinazių slopikliai (anglų k. *TKI – tyrosine kinase inhibitors*) yra efektyvūs kai kurių onkologinių ligų atveju. Pavyzdžiui, imatinibas parodytas virškinamojo trakto stromos navikų ir lėtinės mieloleukemijos gydymui. Tuo tarpu junginiai gefitinibas, elotinibas, critonizibas sėkmingai taikomi nesmulkia-ląstelinio plaučių vėžio terapijoje [8], [29], [33].

Šiuo metu daug dėmesio skiriamas individualios terapijos remiantis konkretaus naviko molekuliniu fenotipu tobulinimui. Pavyzdžiui, neoadjuvantinėje terapijoje šiuo metu tiriami alternatyvūs metodai įvertinti navikų jautrumą chemoterapijai. Pavyzdžiui, genų koekspresijos (koraiškos) ekstrapoliacijos metodas COXEN (anglų k. *co-expression extrapolation*) buvo sėkmingai naudojamas keliuose tyrimuose [34]–[36].

Solidinių (kietųjų) navikų atveju atsparumas chemoterapijai gali būti nulemtas ne genominių veiksnių, bet chemoterapinio vaisto negebėjimo prasiskverbti į gilesnius naviko sluoksnius. Vertinant doksorubicino susikaupimą naviko ląstelių sferoiduose, buvo nustatytas tik paviršinis vaisto įsisavinimas [37], o didesnio tankio navikuose šio vaisto įsiskverbimas į gilesnius sluoksnius buvo parodytas mažesnis [38], [39]. Panašiai pastebėtas ir staigus vaisto koncentracijos mažėjimas naviko centrinėje dalyje krūties vėžio atveju [40]. Solidinio naviko dydis buvo pasiūlytas kaip pagrindinis veiksnys doksorubicino įsiskverbimui į gilesnius naviko sluoksnius [37], [40]. Chemoterapinio vaisto paklitakselio atveju didelis vėžinių ląstelių tankis taip pat buvo kliūtis vaisto įsiskverbimui į naviko audinį. Naudojant didesnes paklitakselio koncentracijas, galinčias sukelti apoptozę (ir tuo pačiu mažesnį ląstelių tankį), vaisto skverbimasis į gilesnį naviko audinį staiga padidėdavo [37], [39].

1.1.1. Daugiavaisčio atsparumo baltymai

ABC (anglų k. *ATP binding cassette*) nešikliai yra didelė nuo ATP priklausančių pernašos baltymų šeima. Junginių (amino rūgščių, baltymų, angliavandenių, lipidų, neorganinių jonų, vaistų ir jų metabolitų) pernašai ABC nešikliai naudoja ATP hidrolizės metu išsiskyrusią energiją [4], [41], [42]. Visi ABC šeimos baltymai turi du transmembraninius (anglų k. *TMD – transmembrane domain*) ir du nukleotidus surišančius (anglų k. *NBD – nukleotide binding domain*) domenus (2 pav.). TMD dalyvauja substratų atpažinime ir jų pernašoje pro membraną, o

NBD yra ATP surišantis domenas. Kai ATP prisijungia prie NBD, vyksta ATP hidrolizė ir išsiskiria substratų pernašai reikalinga energija. Nuo ATP hidrolizės priklausančių baltymų yra tiek prokariotuose, tiek eukariotuose. Žmogaus genome yra 49 ABC genai, išdėstyti septyniuose (A, B, C, D, E, F, G) lokusuose ir sudarantys atitinkamai ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCG, ABCE, ABCF pošeimes. ABCB, ABCC ir ABCG pošeimėms priklausantys baltymai yra atsakingi už priešvėžinių vaistų išmetimą iš naviko ląstelių, dėl ko mažėja viduląstelinė vaistų koncentracija ir sukeliamas atsparumas taikomam gydymui. Todėl šie baltymai yra galimi priešvėžinio gydymo taikiniai [42]–[44].



2 pav. ABC šeimos baltymai yra nuo ATP priklausantys nešikliai. Substrato pernaša įvyksta dėl substrato prisijungimo ir ATP hidrolizės pasikeitusios baltymo konformacijos (Chen et al., 2015)

Fig. 2. Energy-dependent ABC transporters exhibit a conformational change upon substrate binding and ATP hydrolysis which drives the transport process of the substrate (Chen et al., 2015)

MDR (anglų k. MDR – multidrug resistance) nešiklių šeima – tai ABC pernašos baltymų grupei ABCB, būdingai tik žinduoliams, priklausantys baltymai, kurių keletas narių yra susiję su chemoterapinių vaistų pašalinimu iš vėžinių ląstelių, sukeliančiu daugiavaistį atsparumą [42]. Geriausiai charakterizuotas šios pošeimės atstovas vra pralaidumo glikoproteinas (P-glikoproteinas, P-gp), kitaip dar žinomas kaip MDR-1 ar ABCB1. Normaliomis salygomis P-gp veikia kaip fiziologinis barjeras, apsaugantis smegenis, kepenis ir kitus organus nuo lipofilinių vaistų pertekliaus. Šio baltymo raiška būdinga visoms periferinio kraujo ląstelėms, išskyrus granulocitus [45]. Navikuose P-gp yra susijęs su atsparumu įvairiems chemoterapiniams vaistams, tarp jų paklitakseliui ir doksorubicinui [46]–[48]. Padidėjusi P-gp raiška yra labai svarbi tiek pradiniam, tiek sukeltam naviko ląstelių atsparumui chemoterapijai, dėl to padidėja vėžinių ląstelių atsparumas citotoksiniams vaistams [45]. Pavyzdžiui, parodyta, kad P-gp inhibitoriaus verapamilio pridėjimas reikšmingai sumažino paklitakselio išmetimą limfoblastomos ir kiaušidžių ląstelėse [49]. Padidėjusi šio nešiklio raiška pastebėta paklitakseliui ir doksorubicinui atsparių kiaušidžių vėžio linijose [50]. Padidėjusi p-glikoproteino raiška taip pat buvo susijusi su didesne atkryčio ir mažesne visiškos remisijos (anglų k. *CR – complete remission*) tikimybe pacientams, sergantiems *de novo* ūmine mieloidine leukemija (AML), gydomiems standartiniu antraciklino (daunorubicino arba idarubicino) ir citarabino deriniu [51]. Pelėse su pašalintu (anglų k. *knockout*) p-gp baltymą koduojančio *ABCB1/MDR1* geno aleliu chemoterapinio vaisto efektyvumas buvo daug didesnis negu laukinėse pelėse [52]. Siekiant padidinti vaisto efektyvumą sulaikant vaistą ląstelės viduje būtų galima papildomai naudoti p-glikoproteino (P-gp) slopiklius.

ABCG pogrupio narys BCRP (anglų k. *BCRP – breast cancer resistance protein*), arba ABCG2, yra dar vienas svarbus ABC nešiklis, atsakingas už ląstelių apsaugą nuo toksinų ir ksenobiotikų. BCRP raiška padidėjusi placentoje, virškinimo trakte, kepenyse, inkstuose, pieno liaukose, sėklidžių ląstelėse. Esant tam tikroms ligoms, tokioms kaip ūminė leukemija ir ūminė mieloleukemija, šio baltymo padidėjusi raiška siejama su ląstelių atsparumu vaistams ir blogesne gydymo prognoze [53], [54]. Esant padidėjusiai BCRP raiškai ląstelės įgyja atsparumą topotekanui, daunorubicinui, mitoksantronui ir doksorubicinui [46], [50], [53].

ABCC porūšio ABCC1 nešiklis, dar žinomas kaip MRP1 (anglų k. *MRP1 – multidrug resistance-associated protein 1*), pirmą kartą buvo aptiktas smulkialąstelinio plaučių vėžio ląstelėse [42], [55]. Padidėjusi MRP1 raiška siejama su neigiama prognoze ankstyvosiose krūties vėžio stadijose. Prostatos vėžio ląstelėse šio baltymo raiška susijusi su pažengusia vėžio stadija ir naviko invaziškumu, atsparumu doksorubicinui. Padidėjusi šio baltymo ekspresija taip pat pastebėta platinos turintiems vaistams atspariose ląstelėse [56], [57].

1.1.2. Ne genominiai veiksniai

Nors gana didelė priešvėžinį atsparumą tiriančių studijų dalis yra skirta būtent genomo veiksnių tyrimams, mutacijos gali būti ne vienintelis ir ne pagrindinis veiksnys, lemiantis atsparių naviko ląstelių proliferaciją [58], [59]. Pastaruoju metu daug vykdomų tyrimų daug dėmesio skiria ne genominiams veiksniams, tokiems kaip vaisto koncentracijos gradientas [40], hipoksijos regionai [60], naviko kraujagyslių formavimasis anomalijas [61], ląstelių nuolaužų gausa [62], naviko sukeliama imunosupresija ir kai kurie kiti reiškiniai.

Dažnu atveju keliama prielaida, kad skiriamo vaisto dozės padidinimas lems palankesnę chemoterapijos prognozę. Visgi sąsajos tarp paskirtos vaisto dozės, jo koncentracijos plazmoje ir gydymo atsako yra blogai ištirtos [8]. Viena iš nepakankamo gydymo efektyvumo priežasčių gali būti ta, kad ne visada pavyksta užtikrinti pakankamą chemoterapinio vaisto patekimą į navikinį audinį, o patogaus klinikinio metodo vertinti jo kinetikos organizmo audiniuose nėra sukurta. Literatūroje yra duomenų, kad doksorubicino terapinis efektyvumas yra apsprendžiamas

individualių farmakokinetinių ir farmakodinaminių procesų, pasireiškiančių konkrečiam pacientui [40], [60], [62]. Vaisto terapinis efektas gali priklausyti nuo jo individualaus metabolizmo greičio, eliminavimo efektyvumo, susijungimo su plazmos baltymais, patekimo į naviką, fiksacijos ląstelėse ar lėto atpalaidavimo iš aplinkinių audinių. Keleto publikacijų duomenimis individuali doksorubicino kinetika kraujyje gali būti svarbiu veiksniu, apsprendžiančiu ne tik terapinį efektą, bet ir vaisto mielotoksiškumą, kardiotoksiškumą, ar sąveiką su kitais kartu naudojamais preparatais [1], [63]–[65]. Tačiau daug didesni, palyginus su krauju, doksorubicino kiekiai fiksuojasi audiniuose, kuriuose sulaikomas itin ilgai. Doksorubicino AUC audiniuose įtaka terapiniam efektyvumui ar pašaliniam poveikiui nebuvo tyrinėta.

1.2. Vaisto dozės apskaičiavimo metodikos

1.2.1. Kūno paviršiau plotu (KPP) paremtas metodas

Ryšys tarp gyvūnų kūno paviršiaus ploto ir jų fiziologinių parametrų pastebėtas dar XIX a. pabaigoje, kai vokiečių mokslininkas Max Rubner parodė, kad turėdami santykinai didesnį kūno paviršiaus plotą mažesnio svorio gyvūnai sunaudoja daugiau deguonies ir kalorijų nei tos pačios rūšies didesnį svorį, bet santykinai mažesnį kūno paviršiaus plotą, turintys gyvūnai [66]. Amerikos gydytojas, vaikų hematologas ir onkologas Donald Pinkel iškėlė prielaidą, kad maksimali toleruojama vaisto dozė (anglų k. *MTD – maximum tolerated drug dose*), apskaičiuota kūno paviršiaus plotui, yra panaši skirtingose gyvūnų rūšyse ir žmonių organizme. Remiantis šia prielaida, kūno paviršiaus ploto skaičiavimai pradėti taikyti žmonėms [66], [67]. KPP skaičiavimu paremtas vaisto dozavimas (mg/m²) onkologijoje pirmą kartą buvo panaudotas apskaičiuoti saugią chemoterapinio vaisto dozę I fazės klinikiniuose tyrimuose. KPP nustatymui buvo naudojami keli skaičiavimo būdai, tačiau vyraujančiu laikoma 1916 m. Du Bois brolių pasiūlyta (1) formulė [66]–[68].

$$KPP = 0,007184 * svoris^{0,425} * \bar{u}gis^{0,725}$$
(1)

Nepaisant Du Bois formulės naudojimo patogumo, šio metodo skaičiavimo tikslumas kelia daug klausimų. Visų pirma, metodika buvo patikrinta su grupe, sudaryta tik iš devynių žmonių, tarp kurių buvo tik vienas vaikas ir nė vieno paauglio. Be to, buvo pastebėta, kad Du Bois ir Du Bois pasiūlytas skaičiavimo metodas ne vienodai tiksliai veikia skirtingo kūno sudėjimo žmonėms [67], [69]. Belgų mokslininkas Johan Verbaecken su kolegomis lygino 1868 normalaus kūno sudėjimo (KMI 20–24,9 kg/m²), turinčių viršsvorį (KMI 25–29,9 kg/m²) ir nutukusių (KMI \geq 30 kg/m²) pacientų KPP reikšmes, apskaičiuotas naudojant skirtingus skaičiavimo

metodus. Jie parodė, kad Du Bois ir Du Bois skaičiavimo metodas vaisto dozę pagal KPP nutukusiems žmonėms nėra tinkamas, nes gaunamos iki 8 % mažesnės reikšmės. Panaši situacija yra parodyta naujagimių atveju, kai nustatomas iki 5 % mažesnis vaisto kiekis [70]. Be to, pirminė vaisto dozės nustatymo pagal KPP paremtą metodiką paskirtis buvo tik nustatyti pradinį saugų vaisto kiekį. Visgi vaisto terapinis efektas gali priklausyti nuo jo individualaus metabolizmo greičio, eliminavimo efektyvumo, susijungimo su plazmos baltymais, vaisto patekimo į naviką ir fiksacijos ląstelėse ar lėto atpalaidavimo iš aplinkinių audinių. Tačiau tik KPP paremtas dozės apskaičiavimas to neįvertina individualaus vaisto pašalinimo iš organizmo greičio, bendros paciento būklės [10], [12], [69]. Tą patvirtina Felici su kolegomis, kurie parodė, kad klirensas (pašalinimas) tarp dažniausiai vartojamų citotoksinių vaistų kinta nuo 25 % iki 70 % [71]. Vertinant ūmine limfoleukemija ir ne Hodžkino limfoma sergančių pacientų didžiausią plazmos vaisto koncentraciją C_{max} nustatyti svyravimai nuo 3,5 iki 198 % [11], [72].

Gurney savo apžvalgoje pasisako už KPP naudojimo chemoterapijoje atsisakymą ir už fiksuotos pradinės kiekvienam vaistui dozės įvedimą. Ši fiksuota dozė būtų koreguojama nustatomas atsižvelgiant į vaisto klirensą, kepenų fermentų ar bilirubino koncentracijos padidėjimus ir kitus parametrus. Vėliau vaisto kiekis būtų koreguojamas pagal sukeliamą toksiškumą [69]. Dažnu atveju paskirtos vaisto dozės mažinamos dėl pasireiškusios sunkios mielosupresijos, esant reikšmingiems inkstų ar kepenų funkcijos sutrikimams ir kitais atvejais. Tačiau dozės koregavimo tokiose situacijose gairės dažnai yra netikslios ir empirinės [73]–[76].

Įdomu tai, kad Gurney, kitaip nei dauguma kitų autorių, didesne problema įvardija ne chemoterapinių vaistų sukeliamą toksiškumą, o dažnai paskiriamą per mažą chemoterapinio vaisto kiekį, lemiantį neefektyvų priešvėžinį gydymą, naviko atkrytį ir blogesnę prognozę. Savo prielaidas jis vaizduoja naudodamas hipotetinio vaisto I fazės klinikinio tyrimo schema (3 pav.). Pacientams skiriant tris skirtingas to paties vaisto dozes, bus gautas skirtingas sisteminis poveikis. Didžiausia paskirta dozė (3 pav. schemoje pažymėta 3) daliai pacientų sukels toksiškumą, dėl to tolesniems tyrimams bus rekomenduojama vidutinė vaisto dozė (3 pav. pažymėta 2), nes tai – maksimali dozė, nesukelianti toksiškumo. Deja, dėl individualių savybių didelei daliai pacientų ši dozė bus per maža ir gydymas daugeliu atveju gali būti neveiksmingas [77].

Šiuo metu onkologijoje taikomas vaisto dozės apskaičiavimo metodas pagal kūno paviršiaus plotą yra netikslus, nes neatsižvelgia į individualias farmakokinetines/farmakodinamines savybes, dėl to galutinė vaisto koncentracija kraujo plazmoje skirtingiems pacientams gali skirtis nuo 10 iki 100 kartų. Vaisto dozės apskaičiavimo pagal kūno paviršiaus plotą (KPP) metodas neįvertina citotoksinio individualių vaisto pašalinimo iš organizmo savybių. Dėl to maždaug 30 % ar net daugiau ligonių gali negauti pakankamos dozės priešvėžiniam efektui pasiekti, jeigu ta dozė skaičiuojama pagal standartinius KPP apskaičiavimo metodus [17]. Tyrimo metu apie 20 %

moterų, sergančių krūties vėžiu, išgyveno trumpiau dėl paskirtos per mažos dozės adjuvantinio gydymo metu. Panašūs dėsningumai nustatyti gydant kiaušidžių, skrandžio, storosios žarnos, sėklidžių vėžį, limfomą ir kitus navikus.

Vaisto dozei esant per didelei pasireiškęs šalutinis poveikis yra nesunkiai nustatomas dėl sukeltos mielosupresijos. Tokiu atveju atsiradus ryškesnei neutropenijai ar trombocitopenijai tolimesniame gydymo plane dozė turėtų būti mažinama. Priešingu atveju, kai mielotoksiškumas nepasireiškia, sunku įvertinti chemoterapijos poveikį, dėl to per mažas vaisto dozės parinkimas gali likti nepastebėtas ir nekeičiamas keletą mėnesių. Ši situacija, kartais vadinama "netyčiniu nepakankamu dozavimu" (anglų k. *'unintentional underdosing'*) [77], [78], gali lemti nepakankamą terapijos efektyvumą – naviko atkrytį, atsparumą paskirtam gydymui [77], [79]

Dėl to tikėtina, kad standartiniais metodais apskaičiuota citostatiko dozė galėtų būti naudojama tik gydymo pradžioje, o vėliau turėtų būti pakoreguojama pagal hematologinius rodiklius, siekiant sukelti mažo laipsnio mielosupresiją.

1.2.2. Terapinis vaistų monitoringas

Terapinis vaisto stebėjimas (anglų k. *TDM – therapeutic drug monitoring*) yra vaisto kiekio kraujyje ar plazmoje matavimo ir stebėjimo metodas, skirtas individualizuoti vaisto dozavimą ir (arba) paskyrimo dažnumą ir tokiu būdu pagerinti vaisto veiksmingumą ir sumažinti galimą jo šalutinį poveikį. Nuo pritaikymo klinikinėje praktikoje pradžios 1960 m. TDM suvaidino svarbų vaidmenį tobulinant dozavimus kelių vaistų klasėms, įskaitant imunosupresantus, antibiotikus, vaistus, skirtus gydyti epilepsiją ir ŽIV [10], todėl sunku paaiškinti, kodėl jis nėra praktiškai naudojamas citotoksinių vaistų onkologijoje monitoringui (stebėjimui) [9]. Juo labiau, kad citotoksiniai vaistai atitinka TDM taikymui būtinus reikalavimus, tokius kaip siauras terapinis indeksas (anglų k. *narrow therapeutic index*) ir didelis individualus farmakokinetinis kintamumas.

Galbūt platesnį TDM taikymą riboja didelis navikų heterogeniškumas, skirtinga perfuzija naviko viduje, o tai gali turėti įtakos vaisto patekimui. Be to, dažnas ne atskirų vaistų, bet jų derinių vartojimas apsunkina sąsajų tarp konkretaus citostatiko koncentracijos ir jo sukeliamo poveikio nustatymą. Kiekvienu atveju taip pat reikėtų nustatyti kiekvieno vaisto skilimo produktus ir jų įtaką gydymui.



3 pav. Hipotetinė I fazės klinikiniame tyrime naudojamo vaisto su linijine farmakokinetika schema. Horizontalios linijos reprezentuoja skirtingą sisteminį vaisto poveikį tarp pacientų. Vertikalios linijos atspindi skirtingą pacientą tyrime (Gurney, 2002)

Fig. 3. Hypothetical phase I study of a drug with linear pharmacokinetics. Horizontal bars represent interpatient variation in systemic exposure. Each vertical tick mark represents an individual patient (Gurney, 2002)

Nepaisant to, vaisto koncentracijos ir jo sukeliamo poveikio sąsaja, kuri yra viena iš pagrindinių TDM sąlygų, yra gerai apibrėžta keliems vaistams: 5-fluorouracilui, merkaptopurinui (MP)ir metotreksatui (MTX). Pavyzdžiui, merkaptopurino ir metotreksato, kurie metabolizuojami į aktyvius viduląstelinius metabolitus, sisteminiam poveikiui vertinti buvo naudojama jų aktyviųjų metabolitų koncentracija eritrocituose [80]. Metotreksatas (MTX), struktūrinis folio rūgšties analogas, plačiai taikomas gydant įvairius vėžinius susirgimus ir autoimunines ligas. Nepaisant parodytų teigiamų rezultatų, pagrindinis vaisto trūkumas - didelis sisteminio poveikio kintamumas tarp skirtingų pacientų. MTX sukelti nepageidaujami reiškiniai ir toksiškumas kelia susirūpinimą ir net gali būti dozės mažinimo ar gydymo nutraukimo priežastis. Dėl to šio vaisto koncentracija plazmoje yra reguliariai stebima naudojant TDM [81]. Metotreksato farmakokinetikos vertinimui sėkmingai buvo taikomas Bajeso metodas (anglų k. Bayes approach), kuris paremtas ne tik informacija, gauta iš individo vaisto koncentracijos, bet ir anksčiau gautais populiacijos farmakokinetikos duomenimis [76]. MTX dozė buvo stebima ir koreguojama realiuoju laiku 24 valandu arba 8 valandu infuzijos metu [80], [81].

Dar viena kliūtis sėkmingam TDM taikymui tradicinėms chemoterapijos priemonėms yra gana trumpa vaistų pašalinimo pusėjimo trukmė ir intervalinis vaisto patekimas į veną. Didelio kraujo ėminių kiekio būtinybė vienam pacientui taip pat sukelia nepatogumų [10]. Nors vis dar egzistuoja daugybė priešvėžinių vaistų vartojimo TDM apribojimų, naujos šiuolaikinės chemoterapijos vartojimo schemos, tokios kaip nuolatinė intraveninė infuzija, leidžia pasiekti pastovią vaisto koncentraciją plazmoje (C_{ss}). Tokiu būdu palengvinamas ploto po vaisto koncentracijos kreive AUC (anglų k. – *area under the curve*) apskaičiavimas ir dėl to galima tiksliau įvertinti vaisto sukeliamą sisteminį poveikį. Pažangių vaistų skyrimo metodų atsiradimas leidžia tikėtis, kad ilgainiui TDM bus taikomas įprastinėje praktikoje. Šią prielaidą patvirtina daugybė tyrimų su 5-fluoruracilu, kurie parodė daug žadantį TDM pranašumą vertinant sisteminį vaisto poveikį palyginus su tradiciniu kūno paviršiaus matavimo metodu.

1.2.2.1. 5-Fluoruracilas

Nuo pirmojo išsamaus klinikinio Curreri ir kolegų įvertinimo 1958 m., 5-fluoruracilas (5-FU) išlieka viena iš plačiausiai naudojamų chemoterapijos priemonių visame pasaulyje. 5-FU taikomas įvairiems daugybinių kietų piktybinių navikų, tokių kaip galvos ir kaklo, storosios žarnos ir kitų virškinimo trakto navikų, gydymui [82]-[84]. Per 50 metų vaisto taikymo klinikinėje praktikoje patirtį atsiradęs gilesnis supratimas apie 5-FU veikimo mechanizmą leido pasiekti didesnį klinikinį efektyvumą ir sumažinti sukeliamą nepageidaujamą šalutinį poveikį [84]. Nepaisant pasiektos pažangos tobulinant vaisto taikymą, 5-FU vis tiek sukelia sunkų šalutinį poveiki, įskaitant neutropeniją, trombocitopeniją, anemiją, karščiavimą, nuovargi, viduriavimą, pykinimą, vėmimą, odos bėrimus, neuropatiją ir kt. [9], [82], [85], [86]. Jis taip pat yra antras pagal dažnumą vaistas, susijęs su kardiotoksiškumu. 5-FU gali ūminius koronarinius sindromus, įskaitant miokardo infarktą, krūtinės skausmą, įvairias aritmijas, širdies nepakankamumą ir net mirti [87]. Uridino triacetatas yra vienas neseniai patvirtintų junginių, galinčių sumažinti šį kardiotoksinį poveikį ir tuo pačiu pagerinti gydomų pacientų būklę [87]. Nepaisant visų terapijos pasiekimų, 5-FU sukeliami širdies ir kraujagyslių sistemos pažeidimai iki šiol kelia daug iššūkių. Situaciją dar labiau sunkina reikšmingi sisteminio vaisto poveikio skirtumai tarp pacientų taikant standartines 5-fluoruracilo dozes. Šiuos skirtumus gali lemti individualūs paciento parametrai, iskaitant amžių, lytį, ligas, organų būklę, taip pat dihidropirimidino dehidrogenazės (DPD) aktyvumas. Irodyta, kad pacientų, trūkstant fermento DPD, atsakingo už 5-FU metabolizmą, organizmas nesugeba 5-fluoruracilo suskaidyti iki 5,6-dihidro-5-fluorouracilo (DHFU), kuris toliau skaidomas iki α -fluor- β -ureidopropiono rūgšties ir α -fluor- β -alanino (FBAL) ir išsiskiriamas su šlapimu per 24 valandas [85], [88]. Sunkus toksiškumas ir didelis vaisto koncentracijos ir poveikio kintamumas tarp pacientų kėlė daug problemų ir parodė tradicinio kūno paviršiaus plotu (KPP) paremto dozės skaičiavimo metodo netobulumą ir reikėjo pažangesnių ir tikslesnių dozių skaičiavimo metodų. Manoma, kad vaisto farmakokinetika paremtas dozavimas yra vienas tinkamesnių būdų chemoterapinių vaistų dozei nustatyti. Glaudus ryšys tarp 5-fluoruracilo koncentracijos kraujo plazmoje ir šio vaisto gydymo efektyvumo virškinimo trakto vėžiu sergantiems pacientams buvo parodytas dar 1970 metais [89], [90]. JAV mokslininkas Brian Hillcoat su kolegomis šiame tyrime aiškiai parodė, kad apskaičiuotas 5-fluoruracilo AUC buvo reikšmingai didesnis tiems pacientams, kuriems buvo nustatytas bent dalinis atsakas į gydymą (anglų k. *PR – partial response*) arba liga buvo stabili (anglų k. *SD – stable disease*) lyginant su tais atvejais, kai terapinis poveikis nebuvo stebimas [89], [90]. Panašūs rezultatai buvo stebimi vertinant 5-FU pašalinima šia onkologine liga sergantiems pacientams. Vidutinis 5-FU klirensas tiems pacientams, kuriems gydymas buvo neefektyvus, buvo reikšmingai didesnis (p < 0.02) lyginant su tais, kuriems nustatytas bent dalinis atsakas į chemoterapija $(1.40 \pm 0.21 \text{ L/min } vs)$ 0.73 ± 0.15 L/min) [89], [91]. Visgi nepaisant visu pasiekimu, tuo metu farmakokinetika (PK) paremto modelio taikymas klinikinėje praktikoje buvo labai ribotas. Tik pradėjus chemoterapijoje taikyti nepertraukiamą 5-FU infuziją, leidžiančią palaikyti pastovią vaisto koncentraciją plazmoje (Css - steady state concentration), PK modelio taikymas tapo įmanomas [92]. Yra įtikinamų duomenų, kad PK modelis gali būti vienas esminių veiksnių tobulinant gydymo efektyvumą tuo pačiu mažinant jo sukeliamą toksiškumą. Keli tyrimai parodė, kad 5-FU dozės koregavimas pagal iš anksto nustatytą AUC (plotas po vaisto koncentracijos kreive) leido pasiekti geresnį priešvėžinį atsaką ir mažesnį toksiškumą, palyginus su standartiniu dozavimu, pagrįstu KPP skaičiavimu. Savo tyrime Morawska ir kolegos apskaičiavo AUC 155 pacientams, kuriems buvo paskirta kūno paviršiaus plotu paremta 5-FU dozė [86]. Remiantis gautais rezultatais, pasiekti planuoto 18-28 mg · h/L AUC intervalo po 1 gydymo ciklo nepavyko daugiau nei pusei (50,7 %) visu pacientu. Pakoregavus 5-FU dozę pagal AUC, sumažėjo per mažą vaisto dozę gavusių pacientų skaičius, taip pat sumažėjo sunkaus toksiškumo atvejų [86]. Idomu, kad KPP paremtas dozavimas taip pat buvo labiau susijęs su dažnesniais ir sunkesniais toksiškumo atvejais moterų, bet ne vyrų, tarpe. Pakoregavus vaisto dozę pagal AUC, šalutinio poveikio skirtumų tarp lyčių nebuvo nustatyta [86]. Nepaisant daugelio autorių aprašytų terapinio vaistų stebėjimo privalumų, šio metodo taikymas taip pat susiduria su tam tikrais iššūkiais. Pavyzdžiui, kambario temperatūroje 5-FU kraujo ir plazmos mėginiuose yra labai nestabilus dėl juose esančio fermento dihidropirimidino dehidrogenazės (DPD), verčiančio 5-fluoruracilą į dihidro-5-fluoruracilą, aktyvumo. 5-FU nestabilumas gali lemti klaidingą šio vaisto koncentracijos įvertinimą kraujo mėginiuose ir iš to sekanti vaisto perdozavima pacientams ateityje [89].

Kadangi KPP modelis remiasi ne individualiomis pacientų PK/PD savybėmis, o tik žmogaus kūno paviršiaus plotu, tai yra nelabai tinkamas metodas klinikinėje praktikoje.

1.3. Platinos turintys junginiai

Platinos pagrindu pagaminti vaistai plačiai naudojami daugelio onkologinių ligų, tokių kaip plaučių, krūties, kiaušidžių ir storosios žarnos vėžys, gydymui. Tradiciniai platinos vaistai, įskaitant visame pasaulyje patvirtintą cisplatiną, karboplatiną ir oksaliplatiną (žr. priedas G), yra neutralūs platinos (II) kompleksai su dviem amino ir dviem papildomais ligandais [93]–[95]. Šių junginių veikimas paremtas jų kovalentiniu prisijungimu prie DNR purino bazių. Susidarę platinos ir DNR aduktai gali trukdyti ląstelių dalijimuisi ir sukelti ląstelių apoptozę. Nepaisant klinikinio pasisekimo, šių junginių taikymas ribotas dėl sukeliamo sunkaus šalutinio poveikio ir būdingo ar įgyto atsparumo gydymui [16], [19], [93], [95], [96].

Vienas žinomiausių ir plačiausiai taikomų platinos vaistų yra cisplatina, arba cisdiamindichlorplatina (II), yra gerai žinomas chemoterapinis vaistas, plačiai naudojamas daugelio kietųjų piktybinių navikų, tokių kaip sėklidžių, šlapimo pūslės vėžys, pažengusios stadijos kiaušidžių, galvos ir kaklo bei plaučių navikai (išskyrus smulkialąstelinį plaučių vėžį), gydymui [95]. Cisplatina buvo susintetinta dar 1845 metais, bet šio junginio gebėjimas stabdyti ląstelių dalijimąsi buvo nustatytas tik 1965 [95], [97].

Dėl atsparumo vaistams ir daugelio nepageidaujamų šalutinių poveikių, tokių kaip sunkios inkstų problemos, alerginės reakcijos, imuniteto infekcijoms sumažėjimas, virškinimo trakto sutrikimai, kraujavimas ir klausos praradimas, ypač jaunesniems pacientams [16], [19], [97], buvo pradėti naudoti ir kiti platinos junginiai, tokie kaip oksaliplatna, karboplatina ir kt.

Pavyzdžiui, karboplatinos taikymas kitiems citotoksiniams vaistams atsparaus mestazavusio krūties vėžio (anglų k. *MBC – metastatic breast cancer*) gydymui buvo susijęs su 20–35 % objektyvaus atsako dažniu ORR (anglų k. *ORR – objective response rate)* [98], [99]. Siekiant sumažinti terapijos toksiškumą taip pat buvo bandoma platinos junginius derinti terapiją su kitais priešvėžiniais vaistais. Parodyta, kad pacientų, sergančių HER2 teigiamu metastazavusiu krūties vėžiu, karboplatinos ir trastuzumabo/paklitakselio derinys buvo veiksmingesnis [99], [100]. Krūties vėžio su metastazėmis smegenyse atveju kombinuota karboplatinos ir taksanų (docetakselio/paklitakselio) terapija buvo efektyvesnė nei šių vaistų vartojimas individualiai [99], [101]. Pavyzdžiui, karboplatinos ir paklitakselio derinys yra pirmos eilės vaistai, taikomi moterų, sergančių išplitusiu epiteliniu kiaušidžių vėžiu, gydymui. Tačiau dažnu atveju terapinis atsakas labai varijuoja, kiaušidžių navikas įgyja atsparumą chemoterapijai ir gydymas tampa neefektyvus [50], [102] ir skiriamas gydymas kitais preparatais.

Įdomu, kad platinos junginiai pasižymi labai greitu įsisavinimu audiniuose (inkstai, kepenys, sėklidės ir kt.) bei geba išsilaikyti žmogaus organizme dešimtmečius po paskirto gydymo [15], [10], [103], [104], o didesnių cisplatinos dozių paskyrimas teigiamai koreliavo su didesniais

platinos kiekiais serume iki 28 metų po paskirto gydymo [15]. Įdomu, kad didesnis platinos audinių kiekis rastas navikuose, kuriuose vario nešiklio CTR1 (anglų k. – *Copper transporter 1*) raiška padidėjusi. Šis baltymas yra atsakingas už cisplatinos pasisavinimą, dėl to ląstelėse su padidėjusia CTR1 raiška cisplatinos susikaupimas ir jautrumas vaistui yra didesnis [102], [105]. CTR1 baltymas mėginiuose prieš ir po chemoterapijos teigiamai koreliavo su klinikiniu atsaku kiaušidžių, šlapimo pūslės, plaučių vėžiu sergantiems pacientams [105], [106]. CTR1 baltymo raiškos vertinimas prieš gydymą galėtų būti puiki priemonė prognozuoti skiriamo gydymo platinos junginiais efektyvumą ir tokiu būdu atskirti jautrius platinos junginiams pacientus, kuriems atsako į gydymą yra didžiausia nuo pacientų, kuriems gydymas greičiausiai bus neefektyvus ir dėl to nerekomenduotinas [105].

1.4. Mielosupresija

Priešvėžinio gydymo metu pasireiškiantis mielotoksiškumas arba mielosupresija gali būti viena pagrindiniu nuovargio, kraujavimo, sepsio ar netgi mirtingumo priežasčiu [107]-[109]. Jautriausias citotoksinių vaistų sukeliamo mielotoksinio poveikio rodiklis - reikšmingas neutrofilu kiekio sumažėjimas, kitaip dar vadinamas chemoterapijos indukuota neutropenija CIN (anglų k. chemotherapy induced neutropenia). CIN būdingas reikšmingas neutrofilų kiekio sumažėjimas iki < 1500 ląst./µl, dažnai pasireiškiantis pirmo chemoterapijos ciklo metu, maždaug 4-14 dienomis po chemoterapinio vaisto dozės suleidimo [78], [110]. Neutrofilų kiekio sumažėjimas iki > 1000 ląst./µl laikomas vidutine (1-2 laipsnio) mielosupresija, kai tuo tarpu < 1000 ląst./µl ląstelių būdingas pažengusia (3–4 laipsnio) mielosupresijai [111]. Ypač pavojinga uždegiminė, arba kitaip, febrilinė neutropenija (anglu k. febrile neutropenia), kuri pasireiškia karščiavimu iki 38 °C, šaltkrėčiu ir nustatytu neutrofilų sumažėjimu iki 500 ląst./µl arba esant tokio sumažėjimo tikimybei per artimiausias 24–48 val. [107], [112]. Neutropenija yra siejama su geresne plaučių, skrandžio, metastazavusio storosios žarnos, krūties vėžio prognoze [78], [110], [111], [113], [114]. Dėl trumpo gyvenimo ciklo neutrofilai yra labai jautrūs chemoterapijos poveikiui. Mažas neutrofilų skaičius lemia didesnę infekcijų riziką. Vis dėlto neutropenija lengvai nustatoma bendru kraujo tyrimu pagal sumažėjusį leukocitų kiekį - leukopeniją ir, jei reikia, visada imamasi atsargumo priemonių, tokių kaip vaisto dozės sumažinimas, intervalų tarp injekciju didinimas, dažnesnis bendro kraujo tyrimas CBC (anglu k. Complete blood count), granulopoezę stimuliuojančių glikoproteinų, tokių kaip granulocitų kolonijas stimuliuojantis veiksnys G-CSF (angly k. Granulocyte colony-stimulating factor) ar granulocity-makrofagy kolonijas stimuliuojantis veiksnys GM-CSF (anglų k. Granulocyte-macrophage colonystimulating factor), skyrimas [78], [115], [116]. Tiesa, parodyta, kad minėti veiksniai, produkuojami ir naviko ląstelių, ne tik stimuliuoja neutrofilų gamybą, brendimą, funkciją ir išgyvenimą, bet ir yra susiję su paraneoplastinio sindromo (PS) atsiradimu, susijusiu su įvairiais organų pažeidimais vėžiu sergantiems pacientams ir pasireiškiančiu nervų–raumenų ir reumatologinėmis ligomis, širdies, endokrininiais, inkstų, virškinimo trakto sutrikimais ir hematologinių rodiklių pokyčiais (eozinofilija, gryna raudonųjų ląstelių aplazija, trombocitozė ir granulocitozė) [117]–[121]. Be to, šie veiksniai skatina vėžinių ląstelių proliferaciją ir migraciją *in vitro* bei kai kurių navikų (sarkoma, smulkialąstelinio ir nesmulkialąstelinio plaučių vėžio, glioblastomos, melanomos, šlapimo pūslės karcinomos, kasos adenokarcinoma, galvos ir kaklo navikai ir kt.) progresavimą *in vivo* [116], [119], [122] ir yra susiję su blogesne vėžiu sergančių pacientų gydymo prognoze [123], ypač pacientų, kuriems nustatyta padidėjusi G-/GM-GSF receptorių (G/GM-GSFR) raiška [116]. Kadangi G-/GM-CSF taikymas chemoterapijos sukeltos neutropenijos gydymui tam tikrais atvejais gali sukelti naviko atkrytį, svarbu iš anksto identifikuoti pacientus, kuriems ši rizika yra padidėjusi.

Tais atvejais, kai chemoterapijos metu, hematologinis toksiškumas nenustatomas, jokie veiksmai neatliekami, todėl padidėja pavojus perdozavimui. Nors manoma, kad didesnės chemoterapinio vaisto dozės sukelia dalinę ar visišką remisiją ir pagerina išgyvenamumą, didesnės citotoksinių junginių dozės ne visada pagerina gydymo prognozę. Nesmulkialąsteliniu plaučių vėžiu sergančių pacientų, patyrusių neutropeniją, gydymas fluoropirimidinu S-1 buvo efektyvesnis palyginus su pacientais, kuriems nebuvo nustatytas neutrofilų mažėjimas. Visgi pažengusi (3–4 laipsnio) neutropenija su < 500 ląst./µl neutrofilų skaičiumi nebuvo siejama su geresniais gydymo rezultatais, palyginus su vidutine (1–2 laipsnio) neutropenija [111], [124]. Panašūs rezultatai gauti storosios žarnos vėžio atveju [125]. Vien neutropenija nelemia vėžio gydymo rezultatų, tačiau parodo, kad buvo paskirta tinkama chemoterapinių vaistų dozė [124]. Taigi neutropenija gali būti interpretuojama kaip chemoterapijos stebėjimo žymuo, siekiant įvertinti dozės pakankamumą.

1.5. Vietinio (lokalaus) vaistų pristatymo strategijos

Doksorubicinas (Dox) yra vienas antraciklinų grupės (priedas A) priešvėžinių vaistų, pirmą kartą išskirtas iš *Streptomyces peucetius* dar 1960-ųjų pradžioje [126]. Nors nuo doksorubicino atradimo praėjo daugiau nei pusė šimtmečio, šis vaistas iki šiol plačiai taikomas daugelio onkologinių ligų (krūties, kiaušidžių, prostatos, smegenų, kasos, plaučių vėžys, ūminė limfoblastinė ir ūminės mieloblastinė leukemija, Hodžkino limfoma) gydymui [1], [126]. Nors vaistas pasižymi puikiu citostatiniu efektyvumu tiek hematologinių, tiek solidinių navikų atveju, jo sukeliamas sunkus šalutinis poveikis (kepenų, sėklidžių pažeidimai, negrįžtama

kardiomiopatija ir širdies nepakankamumas) riboja taikymo galimybes onkologinėje terapijoje [2], [127].

Nors mirtingumas nuo piktybinių ligų dėl tobulesnės ankstyvos vėžio diagnostikos ir pažangesnių technologijų nuolat mažėjo pastaruosius kelis dešimtmečius, vis dar yra problemų su ligos gydymo efektyvumu, recidyvų dažniu, bendra ligos prognoze. Kiekvienoje vėžio stadijoje, ypač nepažengusioje, yra potencialių intervencijos taškų, kur lokali (vietinė) terapija galėtų papildyti arba pakeisti esamą gydymą.

Intraveninės sisteminės chemoterapijos metu nėra labai sunku pasiekti pakankamą vaisto kiekį navike ar jo aplinkoje. Be to, vaistas dažnai kaupiasi sveikuose audiniuose ir lemia sunkaus šalutinio poveikio pasireiškimą, dėl ko tenka riboti skiriamo vaisto dozę.

Šiuo atveju pilnas vietinis naviko pašalinimas atrodo tinkama priemonė. Deja, dažnai net atlikus pilną naviko rezekciją operacijos vietoje lieka mikroskopinė naviko dalis [128], dėl to agresyvesnių vėžių atveju, skiriamas gydymas radiacija ir (arba) chemoterapija bandant užkirsti kelią pasikartojančiam naviko augimui.

Tokiu atveju lokalios terapijos priemonės galėtų būti tikslinga priemonė efektyvesniam priešvėžiniam gydymui. Dalelių, užpildytų citostatiko, panaudojimas priešvėžinėje terapijoje leido pasiekti didelę vaisto koncentraciją vietiniuose limfmazgiuose ir lėmė limfinių metastazių sumažėjimą 80 % palyginus su kontrole [128]. Vietinės terapijos taikymas onkologinių ligų gydymui galėtų būti veiksminga priemonė tobulinant priešvėžinį gydymą.

Lokali terapija siekiant susilpninti doksorubicino toksiškumą ir pagerinti terapinį poreikį galėtų būti tikslinga priemonė. Tikslesniam vaisto pateikimui į naviką buvo naudojamos nanodalelės, liposomos, polimerinės micelės ir polimerų konjugatai ir kitos priemonės [129]–[133]. Kai kurios jų buvo siejamos su geresniu terapiniu aktyvumu.

Pavyzdžiui, paklitakseliu pakrautų liposomų panaudojimas krūties vėžio atveju priešvėžinėje terapijoje leido pasiekti didelę vaisto koncentraciją vietiniuose limfmazgiuose ir lėmė limfinių metastazių sumažėjimą 80 % palyginus su kontrole [134].

Nanodalelių efektyvumas pasiekiamas dėl jų gebėjimo ilgą laiką cirkuliuoti kraujyje ir sulaikymo naviko mikroaplinkoje. Navikiniuose audiniuose nėra kraujagyslių palaikančių audinių, kraujagyslėse susidaro poros (nuo 100 nm iki 2 µm skersmens), o dėl prastos limfinės sistemos į navikinį audinį patekę junginiai yra sulaikomi. Šis reiškinys yra žinomas kaip sustiprintas pralaidumas ir sulaikymas EPR (anglų k. *EPR – Enhanced permeability and retention*) [135]–[138].

Labai svarbu, kad nanodalelės būtų apsaugotos nuo retikuloendotelinės sistemos (RES) ir nebūtų sunaikintos. Vienas iš metodų to išvengti yra jų padengimas polietilenglikoliu (PEG), arba pegilinimas [136], [139], [140]. Buvo parodyta, kad želatinos nanodaleles padengus polietilenglikoliu jų eliminacijos pusėjimo laikas ($t_{1/2}$) pailgėjo nuo 3 iki 15 valandų [141].

Vienas gerai žinomų, klinikiniam naudojimui patvirtintų pegilintų liposomų pavyzdžių yra Doxil® (arba Caelyx®) – PEGilinta liposoma padengtas chemoterapinis vaistas doksorubicino hidrochloridas. Caelyx® pasižymėjo ilgesne cirkuliacijos kraujotakoje trukme, palyginus su laisvu doksorubicinu, ir iki 60 kartų didesniu plazmos AUC, palyginus su laisvu vaistu [136], [142]–[144], buvo patvirtintas išplitusio kiaušidžių vėžio, metastazavusio krūties vėžio ir su AIDS susijusios Kaposi sarkomos gydymui [145].

Vis dėlto, pegilintų liposomų patekimas į naviko ląsteles buvo mažiau efektyvus nei polietilenglikoliu nepadengtų liposomų. Įtakos galėjo turėti hidrofilinis padengimas, kuris pagerina lipidinio apvalkalo stabilumą ir sumažina pasisavinimą ląstelėse [146]–[148].

Nors liposominių citotoksinių vaistų mechanizmas nėra pilnai išaiškintas, remiantis kai kurių tyrimų duomenimis [149], [150], manoma, kad laisvo doksorubicino priešvėžinis aktyvumas pasireiškia vaistui ištekėjus iš suskaidytų liposomų į tarpląstelinę erdvę ir tolesniu įsisavinimu ląstelėse. Tuo tarpu olandų mokslininkas Seynhaeve su kolegomis pasiūlė, kad chemoterapinio vaisto doksorubicino viduląstelinis susikaupimas nulemtas liposomų patekimo į ląsteles endocitozės būdu [151]. Mažiau tikėtinas, bet neatmetamas makrofagų vaidmuo pateikiant vaistą po liposomų fagocitozės [130].

Kai kurių tyrimų duomenimis, didesnis liposominio doksorubicino pasisavinimas kai kuriuose navikuose nebuvo susijęs su geresniu terapiniu efektyvumu [152]–[154], galimai dėl to, kad vaistas liposomose nebūtinai yra biologiškai prieinamas ar pakankamai efektyvus dėl jo lėtesnio išskyrimo iš pūslelių [155].

1.6. Pelių limfomos modeliai

Vienas iš pagrindinių žingsnių optimizuojant nanonešikliais pagrįstas vaistų pristatymo sistemas yra šiomis sistemomis pristatytų terapinių junginių farmakokinetikos vertinimas *in vivo* naudojant gyvūnų modelius [129], [156]. Farmakokinetikos tyrimams plačiausiai naudojamos žiurkės ir pelės tiek dėl ekonominių priežasčių, tiek dėl kraujo mėginių ėmimo ir vaisto dozavimo patogumo [129], [157].

Pelės (*Mus musculus*) genetiniuose tyrimuose naudojamos nuo 1930 metų [158]. Kaip modelinis organizmas, jos plačiai naudojamos limfomos tyrimuose ligos progresavimui, vaistų efektyvumui vertinti [159]. Pelių vėžio modelių taikymas yra labai paplitęs onkogenezės, metastazių susidarymo, terapinio veiksmingumo, naviko mikroaplinkos, imuninės sistemos

tyrimuose. Tai viena pažangiausių ikiklinikinių technologijų vaisto kūrimui [160], [161]. Singeniniai pelių modeliai – vienas seniausių ikiklinikinių modelių limfomos tyrimuose [162] leidžia vertinti limfomą esant nepažeistai imuninei sistemai. Singeninių limfomų modeliams dažniausiai naudojamos S49, A20, BL3750, H11, EL4, ląstelių linijos [161], [162].

Piktybiniai ascitai – dažnai stebima komplikacija terminalinio kiaušidžių vėžio atveju, reikšmingai prisideda prie blogos gyvenimo kokybės ir mirtingumo. Perteklinis skysčių kaupimasis pilvaplėvės ertmėje nulemiamas sutrikusio skysčio nutekėjimo ir padidėjusio intraperitoninio kraujagyslių pralaidumo. Kraujagyslių endotelio veiksnys VEGF (anglų k. *vascular endothelial growth factor*), dar žinomas kaip kraujagyslių permeabilizacijos veiksnys (anglų k. *vascular permeability factor*), atlieka svarbų vaidmenį pilvaplėvės ertmės skysčio kaupimui, angiogenezei, ascitinio naviko augimui [163]–[165]. Parodyta, kad anti-VEGF terapija lėmė ascitų formavimosi ir kraujagyslių pralaidumo sumažėjimą [165].

Pelių ascitinių navikų modeliai – patogus būdas vaistų farmako-kinetinėms/dinaminėms savybėms ląstelėse vertinti [159], tinkama priemonė detalesniam chemoterapinių junginių, pvz. doksorubicino, susikaupimo, eliminacijos ir sąsajų su gydymo efektyvumu tyrimams.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Prietaisai

2.1 lentelė. Naudoti prietaisai

Table 2.1. Used devices

| Prietaisas | Gamintojas | |
|---|--------------------------------------|--|
| Analitinės svarstyklės A&D Weighing GR-202 Semi Micro | A & D Commence I inside a Ion on its | |
| Balance | A&D Company, Limited, Japonija | |
| Laminarinio oro srauto boksas NU-440 | Nusiro Divrouth IAV | |
| CO2 inkubatorius Autoflow NU-5510 | Nualle, Flylliouth, JAV | |
| Ultragarsinis homogenizatorius Branson 450 Digital Sonifier | Marshal Scientific, JAV | |
| Automatinis ląstelių skaičiuotuvas Digital Bio ADAM | NanoEnTek Inc., Seulas, P. Korėja | |
| Flexar LC HPLC sistema: | | |
| Flexar Binary LC Pump | | |
| Flexar LC Autosampler | Darlein Elman Shaltan IAM | |
| Flexar 3 kanalų vakuuminis nudujintojas | Perkin Elmer, Snelton, JAV | |
| Flexar Fluorescencijos daviklis (Ksenono lempa) | | |
| Brownlee Bio C18 kolonėlė (4,6x150mm, 5 µm dalelių dydis) | | |
| Tėkmės citometras BD LSR II | Becton Dickinson, JAV | |
| Hematologinis analizatorius ABX Micros 60 | Horiba, Japonija | |
| Inversinis mikroskopas Nikon Eclipse Te2000-U | Olympus Corporation, Japonija | |
| Šaldomoji centrifuga ALC PK 120R | DJB Labcare, Jungtinė Karalystė | |
| Spektrofotometras ELX800 | Biotek Instruments, JAV | |
| Spektrofotometras Varian Cary Win UV | Varian Inc., Australija | |
| Sealten fluorimating EL S020 | Edinburgh Instruments, Livingstonas, | |
| Spektonuoninetias FLS920 | Jungtinė Karalystė | |
| Konfokalinis mikroskopas Eclipse TE2000-S C1 plus | Nikon Janonija | |
| Objektyvas 60x1.4 NA | Nikoli, Japolilja | |
| 515/30 filtras | Semrock Inc., JAV | |
| Purtyklė Vortex V-1 plus | Biosan Laboratories, Inc., JAV | |
| Zetasizer Nano ZS | Malvern Panaytical, D. Britanija | |
| Tecnai G2 F20 X-TWIN transmisijos elektroninis mikroskopas | FEI, Japonija | |

2.2.Medžiagos

2.2.1. Cheminės medžiagos

2.2. lentelė. Cheminės medžiagos, naudoti tyrimuose

Table 2.2. Chemical materials, used in the experiments

| Cheminės medžiagos: | Gamintojas: | |
|---|--------------------------|--|
| 7-AAD | | |
| Reagentai tėkmės citometrijai: | | |
| BD FACSFlow | BD Biosciences, JAV | |
| BD FACSRinse; | | |
| BD FACSClean | | |
| L-Glutaminas | Biochrom AG Vokietija | |
| PS (Penicilino-streptomicino tirpalas) | Biochiolii AO, Vokietija | |
| 10x Permeabilizacijos buferis | | |
| Fiksacijos/permeabilizacijos koncentracijos tirpalas | eBioscience | |
| Tirpiklis fiksacijos/permeabilizacijos koncentruoto tirpalo skiedimui | | |
| Etanolis, 96 % | Gintarinė vaistinė | |
| Annexin V reagentas | Thormo Fisher Scientifie | |
| DMEM kultivavimo terpė | (IAV) | |
| FBS – veršelio serumas | (JAV) | |

| Cheminės medžiagos: | Gamintojas: |
|--|----------------------------|
| Hematoksilino ir eozino dažas | |
| PBS (fosfato buferinis tirpalas) | |
| RPMI kultivavimo terpė | |
| Tripano mėlynojo tirpalas, 0,4 % | |
| 0,25 % Tripsino-EDTA tirpalas | |
| Reagentai ląstelių skaičiuotuvui ADAM | NanoEnTek, Inc., P. Korėja |
| Acetonitrilas | |
| ChloroformasDruskos rūgštis | |
| Etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska | Sigma Chemical Company |
| Fosforo rūgštis | (St. Louis, MO, JAV) |
| 10xPBS | |
| Triton X-100 tirpalas | |
| Metanolis | Carl Roth (Karsruhe, |
| Dimetilsulfoksidas (DMSO), 99,5 % | Vokietija) |
| 4 % formaldehidas | Kaltek srl. (Italija) |

2.2.2. Antikūnai

| 2.3 lentelė | . Naudoti antikūnai |
|-------------------|---------------------|
| <i>Table 2.3.</i> | Used antibodies |

| Pavadinimas | Fluoroforas | Klonas | Gamintojas | Kiekis |
|----------------|----------------------------|--------|--------------------------|---------|
| anti-CD45 | Pacific Blue | 30-F11 | Thermo Fisher Scientific | 2,0 µg |
| anti-CD3 | APC-eFluor | 17A2 | Thermo Fisher Scientific | 0,4 μg |
| anti-CD4 | FITC | GK 1.5 | Thermo Fisher Scientific | 0,5 μg |
| anti-CD8 | PerCP-Cy TM 5.5 | 53-6.7 | Thermo Fisher Scientific | 0,5 μg |
| anti-CD44 | PE | IM7 | Thermo Fisher Scientific | 0,02 µg |
| Anti-CD16/CD32 | - | 2.4G2 | Thermo Fisher Scientific | 0,1 µg |

2.3. Metodai

2.3.1. Pelės

8–14 savaičių amžiaus DBA/2 ir C57BL/6 pelių patelės gautos iš Valstybinio mokslinių tyrimų instituto (VMTI) Inovatyvios medicinos centro veisyklos (Vilnius, Lietuva). Visos procedūros su gyvūnais buvo atliekamos pagal 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos parlamento ir tarybos direktyvą 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (*Directive 2010/63/EU, 2010*). Visi tyrimų protokolai taip pat buvo patvirtinti institucinio gyvūnų priežiūros komiteto. Pelės buvo auginamos gerai vėdinamuose plastikiniuose narvuose dienos šviesos sąlygomis su neribota galimybe pasiekti maisto ir vandens. Esant būtinybei, pelės buvo nužudomos naudojant cervikalinę dislokaciją.

2.3.2. Vaistai

Doksorubicino hidrochloridas (2 mg/ml) buvo pirktas iš Ebewe gamintojo (Unterach, Austrija). Daunorubicino hidrochloridas (2 mg/ml) buvo pirktas iš Sigma Chemical Company

(St. Louis, Misūris, JAV). Pegilintas liposominis doksorubicino hidrochloridas Caelyx® (2 mg/ml) (Janssen Pharmaceutical NV, Belgija) buvo gautas iš NVI klinikos, kaip vaisto, nepanaudoto pacientams, likučiai. Vaistai buvo laikomi pagal gamintojo rekomendacija arba, esant būtinybei, pagal eksperimento planą. Reikiamos koncentracijos vaistų tirpalai buvo ruošiami švieži eksperimento dieną.

2.3.3. Ląstelės

EL4 pelių limfomos linijų ląstelės buvo įsigytos iš ATCC (anglų k. *American Type Culture Collection, JAV*). Ląstelės buvo kultivuojamos pagal ATCC rekomendacijas DMEM terpėje (*Thermo Fisher Scientific, JAV*) papildytoje 10 % FBS (*veršelio serumu*), 2 mM L-glutaminu ir antibiotikais (100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino).

SL2 limfomos ląstelių linija buvo gauta iš Utrechto universiteto medicinos centro Olandijoje. Ląstelių kultivavimui buvo naudojama RPMI-1640 (*Thermo Fisher Scientific, JAV*) terpė, analogiškai papildyta 10 % veršelio serumu, L-glutaminu bei penicilino ir streptomicino antibiotikų mišiniu. Abiejų linijų ląstelės buvo auginamos steriliuose 75 cm² plastikiniuose flakonuose (*Thermo Fisher Scientific*), inkubuojamos CO₂ inkubatoriuje su 5 % CO₂ koncentracija, 37 °C temperatūroje.

Kai eksperimentai nebuvo vykdomi, SL2 ir EL4 ląstelės buvo šaldomos naudojant specialią šaldymo terpę, sudarytą iš 90 % veršelio serumo ir 10 % dimetilsulfoksido (DMSO). Paruošta ląstelių suspensija buvo perkelta į specialias izopropanolio pripildytas dėžutes, leidžiančias mėginius šaldyti lėtu kontroliuojamu (-1 °C/min) greičiu ir 24–48 val. laikoma šaldiklyje, palaikančiame -80 °C temperatūrą. Po 24–48 val. ląstelės buvo perkeliamos į skystą azotą ilgalaikiam saugojimui.

Atšildymui ląstelės buvo laikomos apie 1 minutę kambario temperatūroje ir sumaišomos su auginimo terpe ne mažesniu nei 1:10 santykiu ir užsėjamos į flakonus. Po 24 valandų auginimo terpė buvo keičiama šviežia. Ne anksčiau nei po 48 valandų, kai ląstelių gyvybingumas buvo ne mažiau 90 %, ląstelės buvo naudojamos eksperimentams.

2.3.4. Ląstelių skaičiavimas

2.3.4.1. In vitro kultivuotų ląstelių skaičiavimas ir gyvybingumo vertinimas

Prieš naudojant ląsteles eksperimentams, jos buvo skaičiuojamos "ADAM" automatiniu skaičiuotuvu ir/ar Goriajevo kamera. Ląstelių skaičiavimui jos buvo skiedžiamos žinomo tūrio kultivavimo terpėje, po 20 µl ląstelių tirpalo perkeliama į du Eppendorf[™] tipo mėgintuvėlius,

kuriuose ląstelės dažomos visas ląsteles arba tik negyvas ląsteles dažančiu rinkinio dažu 1:1 santykiu. Po 12 μl paruoštų tiriamųjų mėginių užlašinama į griovelius ant specialios plokštelės. Plokštelę įdėjus į automatinį ląstelių skaičiuoklį "ADAM", prietaisas suskaičiuoja bendrą ląstelių kiekį, negyvas ląsteles ir įvertina ląstelių gyvybingumą (%). Matavimų rezultatai yra pateikiami "ADAM" prietaiso ekrane.

Norint išvengti nuolaužų skaičiavimo, ląstelės buvo perskaičiuojamos Goriajevo kamera papildomai vizualiai įvertinus jų būklę. Bendras ląstelių skaičius buvo perskaičiuojamas pagal formulę: $X = (a \times 250 \times K) / n$, kur X - ląstelių sk. 1 µl; a – apskaičiuotas ląstelių skaičius kvadratėliuose; n – vertintų kvadratėlių skaičius, K – skiedimo koeficientas.

2.3.4.2. Iš pilvaplėvės ertmės išskirtų ląstelių diferencinis skaičiavimas

Iš pelės pilvaplėvės ertmės gautos ascitinio skysčio ląstelės yra 2 kartus praplaunamos su 2 ml PBS centrifuguojant po 5 min 400 g greičiu. Praplovus ląsteles jos užpilamos žinomo tūrio PBS tirpalu ir suskaičiuojamos 2.3.4.1 aprašytu metodu. Bendras ląstelių skaičius ascite apskaičiuojamas ląstelių sk./ml padauginus iš bendro ascito tūrio (ml), apskaičiuoto pagal 2.3.5 aprašytą metodą.

Diferencinis ląstelių skaičiavimui po 10 µl PBS tirpalo su ląstelėmis padengiama ant objektinių stiklelių ir kitu objektiniu stikleliu, laikomu 45° kampu, paskleidžiama per visą stiklelį. Paruošti tepinėliai džiovinami ore kambario temperatūroje ir ne anksčiau nei po 60 minučių dažomi May-Grünwald metodu, kai ant kiekvieno stikliuko paskaičiavus 200 ląstelių, buvo vertinama kiekvieno tipo ląstelių (%) dalis ir vėliau išskaičiuojamas bendras kiekvienos rūšies ląstelių skaičius.

2.3.5. Bendro ascito tūrio vertinimas

Prieš nužudant peles, ascito tūrio vertinimui jos buvo pasveriamos analitinėmis svarstyklėmis 0,01 g tikslumu ("šlapias" svoris). Po cervikalinės dislokacijos pelės pilvaplėvės ertmė buvo atveriama ir, švirkštu susiurbus visą skystį, švelniai ir kruopščiai išdžiovinta medvilnine kempine. Vėliau pelė buvo dar kartą pasveriama, siekiant nustatyti "sausą" gyvūno kūno svorį. Ascitinio skysčio kiekis gramais (g) buvo apskaičiuojamas atėmus "sausą" svorį iš "šlapio" svorio (gyvūno svorio prieš mirtį). Skysčio masė g buvo perskaičiuojama į skysčio tūrį mililitrais (ml). Pritaikius prielaidą, kad 1 g ascitinio skysčio atitinka 1 ml tūrį. Kontrolinėse pelėse ir tose, kuriose ascitas buvo minimalus, buvo fiksuojamas kempinės svorio pokytis po mirkymo pilvaplėvės skystyje.

2.3.6. Naviko modelis ir in vivo gydymas

2.3.6.1. EL4 limfomos modelis

Eksperimento pradžioje (Diena 0) C57BL/6 pelėms į pilvaplėvės ertmę (IP) buvo suleidžiamas 0,2 ml tūrio natrio chlorido 0,9 % injekcinis (fiziologinis) tirpalas su $5 \cdot 10^4$ EL4 ląstelių. Prieš vykdant eksperimentą EL4 ląstelės buvo kultivuojamos ne mažiau nei 48 valandas, kad būtų pasiektas > 90 % gyvybingumas.

Pagal eksperimento planą naviką turinčioms C57BL/6 pelėms (anglų k. *TBM – tumour bearing mice*) 3, 5 arba 9 dieną po EL4 naviko ląstelių įvedimo, į uodegos veną (IV) buvo švirkščiama vienodos 15 mg/kg dozės doksorubicino injekcija. Doksorubicino poveikis buvo stebimas 60 dienų. Visos pelės, kurios išgyveno per šį laikotarpį, buvo laikomos išgydytomis.

2.3.6.2. SL2 TSDR (two step dormancy/recurrence) limfomos modelis

SL2 ląstelės buvo naudojamos *in vivo* eksperimente tik pasiekusios ne mažesnį nei 90 % gyvybingumą. Eksperimento dieną ląstelės buvo apskaičiuojamos, padalintos į tėkmės citometrijai skirtus mėgintuvėlius tokiu būdu, kad kiekvienai pelei būtų skirta $5 \cdot 10^5$ gyvų ląstelių. Praplautos nuo auginimo terpės ląstelės buvo užpiltos šviežiai paruošta auginimo terpe su skirtinga doksorubicino koncentracija (0,00; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 10 µg/ml) ir 30 minučių inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės buvo praplaunamos nuo terpės su doksorubicinu ir užpilamos šaltu fiziologiniu tirpalu, kad galutinė koncentracija būtų $5 \cdot 10^5$ ląst./0,2 ml. Po inkubacijos dar kartą įvertinus ląstelių gyvybingumą trypano mėlynuoju tirpalu nei reikšmingų skirtumų tarp grupių, nei bendro reikšmingo gyvybingumo sumažėjimo nebuvo nustatyta. Iki pat įleidimo pelėms visi mėginiai buvo laikomi ant ledo.

Paruoštos SL2 ląstelių suspensija su skirtinga doksorubicino koncentracija buvo suleista DBA/2 pelėms į pilvaplėvės ertmę (IP). Kontrolei SL2 ląstelės buvo inkubuojamos auginimo terpėje be doksorubicino. Visos procedūros buvo vykdomos analogiškai.

Pelės buvo tiriamos 60 dienų. Išgyvenusios 60 dienų laikotarpį pelės buvo laikomos išgydytomis.

2.3.7. SL2 ląstelių imuninio fenotipo vertinimas

SL2 ląstelės FACS buferiu (*Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ 07417, JAV*) praplaunamos nuo kultivavimo terpės jas 5 minutes centrifuguojant 400 g greičiu 20 °C temperatūroje. Po praplovimo ląstelės užpilamos tokiu FACS buferio tūriu, kad galutinė ląstelių

koncentracija sudarytų 10⁶ ląst./100 µl tirpalo. Siekiant eliminuoti nespecifinį antikūnų prisijungimą, ląstelės buvo inkubuojamos 20 minučių 4 °C temperatūroje su 1 µg/10⁶ ląstelių anti-CD16/CD32 (Fc γ R III/II) antikūnu (93 klonas), kuris blokuoja sąveiką su imunoglobulinų Fc domenais. Po inkubacijos ląstelės paskirstomos į atskirus mėgintuvėlius po 10⁶ ląstelių tolesniam žymėjimui šiais antikūnais: 0,4 µg anti-CD3-APC (17A2 klonas); 0,5 µg anti-CD4-FITC (GK1.5 klonas); 0,5 µg anti-CD8aPerCP (53-6.7 klonas); 0,02 µg anti-CD44-PE (IM7 klonas); 2 µg anti-CD45-Pacific Blue (30-F11 klonas). Po dažymo ląstelės buvo inkubuojamos 20 minučių +4 °C temperatūroje ir, praplovus FACS buferiu, analizuojamos FACS-LSRII tėkmės citometru (*Becton-Dickinson, San Chosė, CA, JAV*) ir FlowJo v10.7 programine įranga (*Tree Star, Ashland, OR, JAV*).

2.3.8. Doksorubicino susikaupimo ląstelės vertinimas tėkmės citometrijos metodu

Doksorubicino susikaupimas ląstelėse po inkubacijos pagal 2.3.6.2. punkte aprašytą metodiką buvo vertinamas tėkmės citometru.

Doksorubicino susikaupimo permeabilizuotose SL2 ląstelėse vertinimui, ląstelių permeabilizacija buvo atlikta pagal Telford ir kolegų aprašyta metodiką [166]. Šaltu (4 °C) PBS tirpalu praplautos nuo kultivavimo terpės SL2 ląstelės buvo lėtai užpiltos šaltu 80 % etanoliu nuolat purtant Vortex purtykle. Remiantis aprašyta procedūra [166] EDTA, Triton-X 100 ir RNAzė nebuvo naudoti. Paruoštas 2*10⁶ ląst./ml permeabilizuotų ląstelių tirpalas etanolyje buvo laikomas mažiausiai 1 val. šaldytuve arba ant ledo iki eksperimento.

Tėkmės citometrijai gyvos arba permeabilizuotos ląstelės buvo atitinkamai praplaunamos nuo terpės arba etanolio, suspenduojamos šaltu FACS buferiu ir analizuojamos naudojant 488 nm bangos ilgio lazerį. Tyrimui naudota ne mažiau nei 20000 ląstelių viename mėginyje. Doksorubicino susikaupimo ląstelėse vertinimas buvo paremtas vidutinės kanalo fluorescencijos (anglų k. *MCF – mean channel fluorescence*) intensyvumu. Esant poreikiui, ląstelių apoptozė buvo patvirtinta Annexin V reagentu [167]. Duomenys buvo analizuoti naudojant FlowJo v10.7 programinę įrangą.

2.3.9. Injekcija į retro-orbitalinį rezginį

Doksorubicino injekcija pelei buvo atlikta pagal Yardeni ir kolegų aprašytą metodiką [168]. Šis metodas paremtas vaisto įvedimu ne į uodegos veną, bet injekcija į retroorbitalinį rezginį už pelės akies. Taikant autorių pasiūlytą protokolą buvo naudojami 1 ml tūrio sterilūs insulino
švirkštai su integruota 29G × 12,7 mm adata (*Yangzhou Goldenwell Medical Devices Factory, Kinija*). Procedūra buvo vykdoma naudojant anesteziją dietileteriu.

2.3.10. Kraujo mėginių analizė

Tiriamų pelių kraujo rodikliai buvo tiriami 5 min., 30 min., 60 min., 6 val., 12 val., 48 val. ir 72 val. po doksorubicino injekcijos. Pelių kraujas buvo surenkamas iš retroorbitalinio rezginio į EDTA dengtus Microcuuvette® mėgintuvėlius (*Sarstedt, Vokietija*). Kiekvienas mėginys buvo kelis kartus švelniai apverčiamas, kad būtų užtikrintas visiškas sumaišymas su EDTA kaip antikoaguliantu. 10 minučių centrifugavus 5000 x g greičiu, plazmos mėginiai buvo atskirti ir laikomi -20 °C temperatūroje. Hematologiniai rodikliai buvo tiriami Micros EV60 analizatoriumi (*Horiba, Japonija*).

2.3.11. Medžiagos paruošimas histologinei analizei

Pašalinus blužnį ir užkrūčio liauką chirurginiu būdu, gauta medžiaga buvo sveriama el. svarstyklėmis (0,001 g tikslumu) ir buvo apskaičiuojamas užkrūčio liaukos ir blužnies svorio ir pelės kūno svorio santykis (%). Histologinei analizei chirurginiu būdu išpjautas audinys (blužnies ir/ar užkrūčio liaukos) buvo užkonservuotas 10 % formalino tirpalu. Įdėti į parafiną audiniai, buvo pjaustomi 4 µm storio pjūviais, kurie vėliau buvo dažomi hematoksilinu ir eozinu, tada tiriami šviesos mikroskopu.

2.3.12. Ląstelių iš blužnies ir užkrūčio liaukos suspensijos paruošimas

Pasverta išoperuota medžiaga buvo smulkinta skalpeliu ir praleista pro dviejų tipų nerūdijančio plieno tinklelius. Gautą ląstelių suspensiją praplovus du kartus, paruoštas 10⁶ ląstelių/ml PBS tirpalas buvo laikomos ant ledo tolesnei tėkmės citometrijos analizei.

Chromatografijos analizei paruoštas 10^6 ląstelių vandeninis tirpalas 30 sekundžių buvo veikiamas ultragarsu (Branson 450 Sonifier). Pridėjus 111 µl 1 N druskos rūgšties (HCl), mėginiai su ląstelėmis 1 minutę buvo purtomi Vortex purtykle ir tada centrifuguojami 5 minutes 600 × g greičiu. Po centrifugavimo surinktas supernatantas užšaldytas tolesnei HPLC analizei.

2.3.13. HPLC (Didelio našumo skysčių chromatografija)

Vaisto didelio efektyvumo skysčių chromatografijos (HPLC) mėginiai buvo paruošti į 60 µl mėginio pridedant 900 µl chloroformo/metanolio mišinio (4:1 tūrių santykis) ir 50 µl daunorubicino hidrochlorido tirpalo (1 µg/ml) vidinio standarto [129]. Tada mėginiai 10 minučių buvo purtomi Vortex purtykle ir tada 10 minučių centrifuguojami 10000 x g greičiu. Po centrifugavimo organinė fazė buvo surenkama ir perkeliama į naują švarų Eppendorf mėgintuvėlį. Visi mėginiai buvo išgarinami azoto srovėje iki pilno išdžiūvimo, tada ištirpinti 60 µl judriosios fazės (pH = 2,6), susidedančios iš acetonitrilo ir vandens (32:68, t/t), ir centrifuguoti 5 minutes 10000 × g. 50 µL tirpalo buvo suleista į chromatografinę kolonėlę. HPLC analizė buvo atlikta naudojant Perkin Elmer sistemą, kuri susideda iš Flexar binarinės LC pompos, Flexar 3 CHNL VAC nudujintojo, Flexar LC automatinio mėginus suleidžiančio įrenginio ir Flexar fluorescencijos detektoriaus (ksenoninė lempa). Chromatografijos atskyrimas buvo atliktas su Brownlee Bio C18 kolonėle (4,6 × 150 mm, 5 µm dalelių dydis, Perkin Elmer, Shelton, JAV). Mėginiai buvo leidžiami izokratiškai 0,25 ml/min greičiu. Kolonėlės temperatūra buvo palaikoma 37 °C, o sužadinimo ir emisijos bangos ilgiai buvo nustatyti atitinkamai 475 ir 555 nm.

Chromatografijos duomenys buvo gauti ir išanalizuoti Chromera programine įranga (*Perkin Elmer, Shelton, JAV*).

2.3.14. Farmakokinetika

Doksorubicino kiekis iš pilvaplėvės ertmės išskirtose ląstelėse buvo matuojamas 10 dienų (240 valandų) po vaisto suleidimo. Vaisto koncentracija periferiniame kraujyje buvo matuojamas 72 val. po citostatiko injekcijos. Buvo vertinamas citotoksinio vaisto kiekio pokytis ląstelėse arba plazmoje per tiriamą laikotarpį. Grafikai gauti GraphPad Prism 9 arba Origin Pro 8.5 programomis Plotas po koncentracijos kreive AUC buvo apskaičiuotas pagal 6 pav. pavaizduotą trapecijos formulę (anglų k. *Linear Trapezoidal Method*) ir GraphPad Prism 9 programa.

$$AUC = \frac{1}{2} \times (c_1 + c_2) \times (t_2 - t_1).$$
⁽²⁾

Pritaikius ne linijinę regresinę (anglų k. *non-linear regression fitting*) analizę GraphPad Prism 9.0.2 programoje buvo gautos eliminacijos konstanta K_{el} ir vaisto eliminacijos pusėjimo trukmė (t_{1/2}), apskaičiuotas klirensas (Cl), pasiskirstymo tūris V_d ir kt. [129]

2.3.15. Elektroninė mikroskopija (TEM)

Transmisijos elektroninės mikroskopijos (TEM) vertinimui 6,5 µl 50 k. distiliuotu vandeniu praskiesto mėginio buvo užpilta ant anglimi dengtų vario tinklelių (*Agar Scientific, D. Britanija*). Skysčio perteklių nusausinus filtravimo popieriumi, ant tinklelių buvo užpilama 2 % uranilo acetato (pH 4,5). Išdžiovinti mėginiai buvo tiriami Tecnai G2 F20 X-TWIN transmisijos elektroniniu mikroskopu (*FEI, Japonija*), veikiančiu esant 200 kV įtampai.

2.3.16. Liposominio doksorubicino vertinimas dinaminės šviesos sklaidos metodu

Dinaminė šviesos sklaida (anglų k. *DLS – dynamic light scattering*) buvo matuota Zetasizer Nano ZS nanodalelių dydžio ir zeta potencialo matuokliu (*Malvern Panalytical, D. Britanija*), veikiančiu 4 mW 633 nm bangos ilgio He–Ne lazeriu. Matavimas buvo atliekamas 50 sekundžių 316000 fotonų per sekundę (316.0 kcps) vidutiniu šviesos sklaidos intensyvumu 25 °C temperatūroje.

2.3.17. Konfokalinė mikroskopija ir spektrinė analizė

Konfokalinei mikroskopijai ląstelės buvo fiksuojamos pagal Tsang et. al. aprašytą metodiką. SL2 suspensijos ląstelės po inkubacijos su doksorubicinu buvo gerai nuplautos nuo kultivavimo terpės, suspenduotos PBS iki 10⁶ ląst./ml koncentracijos ir paskirstytos po 1 ml į 12 šulinėlių plokštelės šulinėlius su iš anksto ten įdėtais dengiamaisiais stikleliais (*TPP AG. Trasadingen, Šveicarija*). Po 30 minučių laikymo kambario temperatūroje ant dengiamųjų stiklelių dėl gravitacijos susidarė nuosėdos, kurios buvo fiksuotos 10 % formalino tirpalu, užpiltos PBS ir tada analizuojamos.

Vaisto lokalizacija ląstelėse buvo tiriama Nikon Eclipse TE2000-U C1 Plus lazeriniu konfokaliniu mikroskopu, kuriame sumontuotas 488 nm argono lazeris (*Nikon, Japonija*) naudojant 60×1.4 NA objektyvą (*Nikon, Japonija*). Ląstelių morfologija vertinta šviesos mikroskopu. Dox ir dox-dgr fluorescencijai nustatyti buvo naudojamas 515/30 pralaidumo filtras (*Semrock Inc., JAV*). Fluorescencijos spektrai analizuoti tiek pavienėse ląstelėse, tiek jų vidinėse struktūrose. Fluorescencija buvo matuojama dominančiame lauke ROI (anglų k. *ROI-region of interest*). Vaizdai buvo toliau apdorojami naudojant EZ-C1 v3.91 (*Nikon, Japonija*) ir ImageJ v1.53a programinę įrangą (*NIH, JAV*).

Doksorubicino sugerties ir fluorescencijos spektrai PBS tirpale (20 µg/ml) buvo matuojami vieno pluošto Varian Cary Win UV (*Varian Inc., Australija*) spektrofotometru ir FLS920

spektrofluorimetru (*Edinburgh Instruments, Livingston, Didžioji Britanija*) ir toliau analizuoti naudojant OriginPro 8.5 programinę įrangą.

2.3.18. Statistinė duomenų analizė

Chromatografijos duomenys buvo analizuoti Chromera programine įranga (*Perkin Elmer*, *JAV*). Tėkmės citometrijos duomenys buvo analizuojami naudojant BD FACSDiva ir FlowJoTM v10.7 programas. Konfokalinės mikroskopijos metu gauti vaizdai buvo apdoroti naudojant EZ-C1 v3.91 (*Nikon, Japonija*) ir ImageJ v1.53a programinę įrangą (*NIH, JAV*). Duomenų atvaizdavimui diagramose ir statistinei duomenų analizei buvo naudojama programinė įranga OriginPro 8.5 (*OriginLab Software, JAV*). Kur taikytina, kiekybiniai duomenys buvo pateikti kaip vidutinis \pm standartinis nuokrypis. Plotas po vaisto koncentracijos kreive (AUC) buvo apskaičiuotas pagal trapecijos formulę (2). Vaisto farmakokinetikos vertinimas buvo atliktas GraphPad Prism 9.0.2 programa. Duomenims su normaliu pasiskirstymu statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant dvipusį neporinį Stjudento t testą. Kitais atvejais buvo taikomas Mann-Whitney U testas. Išgyvenamumo vertinimui buvo braižomos Kaplano-Mejerio išgyvenamumo kreivės naudojant OriginPro 8.5 programinę įrangą. Tiriamų gyvūnų išgyvenamumo medianos, p reikšmės ir rizikos santykis HR (anglų k. - *hazard ratio*) buvo analizuojami OriginPro 8.5 ir GraphPad Prism 9.0.2 programomis naudojant Log-rank testą.

Tiriant koreliaciją tarp parametrų buvo skaičiuojamas Pearson'o koreliacijos koeficientas R. Koreliacija buvo laikoma stipria, kai $0,7 \le R \le 1$ arba $-0,7 \ge R \ge -1$.

Statistiškai reikšmingi rezultatai kai kuriose diagramose buvo užkoduoti taip: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

3. REZULTATAI

3.1. Chemoterapinio vaisto doksorubicino susikaupimo EL4 T limfomos ląstelėse ir jo terapinio efektyvumo sąsajų su naviko dydžiu vertinimas

3.1.1. C57BL6/NCr pelių išgyvenamumo tyrimai

Chemoterapinio vaisto doksorubicino plazmos farmakokinetikos ir jo sulaikymo ląstelėse tyrimai buvo atlikti naudojant C57BL/6NCr pelių patelių EL4 limfomos modelį.



4 pav. C57BL/6NCr pelių EL4 T limfomos modelis

C57BL6/NCr pelių patelėms 0 dieną (eksperimento pradžioje) implantuota 5*10⁴ EL4 limfomos ląstelių. Kontrolė – negydytos pelės. 3, 5 arba 9 dieną po EL4 ląstelių implantacijos buvo suleidus 15 mg/kg doksorubicino dozę stebimas išgijimas, atkrytis arba atsparumas.

Fig. 4. EL4 T lymphoma model in C57BL 6NCr mice

On day 0 female C57BL6/NCr mice were implanted with 5*10⁴ EL4 lymphoma cells followed by single 15 mg/kg doxorubicin dose on day 3, 5 or 9. Depending on treatment regimen (drug injection day) recovery ('Išgijimas'), relapse ('Atkrytis') or resistance ('Atsparumas') were observed. Mice that survived > 60 days were considered cure. 'Kontrole' - untreated mice (control group).

Eksperimento pradžioje (0 diena) visos pelės buvo pasvertos ir joms į pilvaplėvės ertmę buvo įvesta $5 \cdot 10^4$ EL4 limfomos ląstelių. Priklausomai nuo planuojamo gydymo plano, gyvūnai buvo paskirstyti į kontrolinę ir tris tiriamas grupes: "Dox 3", "Dox 5" ir "Dox 9" (po 10 pelių kiekvienoje grupėje). Kontrolinėms pelėms nebuvo skirtas joks gydymas, "Dox 3", "Dox 5" ir "Dox 9" grupių pelėms 3, 5 arba 9 dieną po EL4 ląstelių įvedimo į veną buvo sušvirkšta 15 mg/kg doksorubicino hidrochlorido (2 mg/ml) tirpalo (Dox). Eksperimento schema pavaizduota 4 pav. Vidutinis pelių kūno svoris eksperimento pradžioje buvo $20,0 \pm 0,087$ g, $19,9 \pm 0,43$ g, $19,9 \pm 0,95$ g ir $20,3 \pm 0,70$ g atitinkamai kontrolės, "Dox 3", "Dox 5" ir "Dox 9" pelių grupėms. Jokių reikšmingų svorio skirtumų tarp grupių eksperimento pradžioje nebuvo nustatyta. *In vivo* eksperimento metu visų grupių pelės buvo sveriamos nuo EL4 transplantacijos dienos iki gyvūno mirties arba eksperimento pabaigos (60 diena).

Vidutinis negydytų naviką turinčių pelių (kontrolinės grupės) išgyvenamumas buvo $14,5 \pm 1,08$ dienos. Šioje grupėje taip pat buvo nustatytas reikšmingas kūno svorio padidėjimas nuo $20,0 \pm 0,87$ g eksperimento pradžioje iki $34,4 \pm 1,52$ g 13 dieną po naviko transplantacijos (p < 0,0001, HR = 0,03894). Analizuojant skirtingos 15 mg/kg Dox dozės skyrimo dienos (skirtingos gydymo schemos) įtaką EL4 turinčių pelių gydymo veiksmingumui, paaiškėjo, kad pelės, kurioms 3 dieną buvo suleista Dox, pasveiko, o 60 proc. šios grupės pelių išgyveno daugiau nei 60 dienų (5 pav.). Reikšmingo kūno svorio pokyčio šioje grupėje nenustatyta.

Tuo tarpu "Dox 9" pelių grupė buvo visiškai atspari gydymui. Šios grupės pelių vidutinė gyvenimo trukmė buvo 14 ± 0.94 d., (mediana – 14,5 dienos) ir nesiskyrė nuo negydytų pelių gyvenimo trukmės (p = 0.8949, HR = 1.089). Kūno svorio dinamika buvo analogiška negydytoms pelėms.

Vidutinis išgyvenamumas "Dox 5" grupėje buvo $26,2 \pm 0,92$ dienos, mediana – 25 dienos. Nors šios grupės pelių mes negalime laikyti išgydytomis (išgyveno mažiau nei 60 dienų), visgi nustatytas reikšmingas gyvenimo trukmės pailgėjimas (p < 0,0001, HR = 0,2245) lyginant su kontrole.

Remiantis išgyvenamumo rezultatais C57BL/6NCr pelių grupės buvo pervadintos atitinkamai į "išgydytų" (Dox 3), "atkryčio" (Dox 5) ir "atsparių" (Dox 9) pelių grupes. Šių grupių išgyvenamumas pavaizduotas 5 pav. esančiame grafike.



5 pav. C57BL/6NCr (n=10) pelių išgyvenamumas

Kontrolė – negydytos pelės. Išgydytų, atkryčio, atsparių pelių grupėms atitinkamai 3, 5 ir 9 dieną po 5*10⁴ EL4 ląstelių implantacijos buvo suleista 15 mg/kg Dox dozė. Vidutinis išgyvenamumas atitinkamai 14,5 ± 1,08 d.; 14 ± 0,94 d.; 26,2 ± 0,92 d.; > 60 dienų. C57BL6/NCr pelių išgyvenamumo mediana: 1) kontrolė – 14,5 d.; 2) išgydytos/dox 3 d. > 60 d., p < 0,0001***;
3) atkryčio/dox 5 d. – 25 d., p < 0,0001, HR = 0,03894; 4) atsparios/dox 9 d. – 14,50 d., p = 0,8949, HR = 1,089. Grafikas gautas OriginPro 8.5 programa. Išgyvenamumo medianos, HR ir p reikšmės apskaičiuotos su GraphPad Prism 9.0.2 programa (Log-rank testas).

Fig. 5. Survival rate of C57BL/6NCr mice (n = 10)

'Kontrole' – untreated, control mice. A single 15 mg / kg Dox dose was injected to cure ('Išgydytos'), relapse ('Atkryčio') or resistant ('Atsparios') mice on days 3, 5, and 9 respectively. Median survival rate of C57BL6 / NCr mice: 1) control - 14.5 days; 2) cure/dox 3 d. > 60 days, p <0.0001 ***; 3) relapse/dox 5 d. - 25 days, p < 0.0001, HR = 0.03894; 4) resistant/dox 9 d. - 14.50 days, p = 0.8949, HR = 1.089. For the graph the OriginPro 8.5 software was used. Median survival, hazard ratio (HR), and p values were calculated with GraphPad Prism 9.0.2 software (Log-rank test).

3.1.2. EL4 T limfomos ląstelių augimo pilvaplėvės ertmėje vertinimas

3.1.2.1. Ascito tūrio augimo C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmėje vertinimas

Vertinant EL4 limfomą turinčių C57BL6/NCr pelių būklę, buvo tirta ne tik bendra pelių gyvenimo trukmė, bet ir naviko tūrio, dydžio pokyčiai. Pelių ascito tūris buvo matuojamas pagal 2.3.5 skyriuje aprašytą metodą.



6 pav. Ascito tūrio augimas (linijinė skalė) negydytose C57BL6/NCr pelėse

X ašyje parodyta laiko trukmė po 5*10⁴ EL4 ląstelių suleidimo C57BL6/NCr pelėms. Y ašyje – ascito tūris (ml). Ascito tūris per 13 dienų padidėjo 48,5 karto (nuo 0,2 iki 9,7 ml), per pirmas 9 dienas ascito tūris padidėjo tik 4,15 karto (iki 0,83 ml). OriginPro 8.5 programinė įranga

Fig. 6 Ascites volume growth (linear scale) in untreated C57BL6/NCr mice

The X-axis shows the time after implantation of 5*10⁴ EL4 cells in C57BL6/NCr mice. The volume of ascites (ml) is shown on y axis. The 48.5-fold increase of ascites volume (from 0.2 to 9.7 ml was demonstrated during 13 days after tumour implantation. Interestingly until day 9 only 4.15-fold (to 0.83 ml) increase was shown. OriginPro 8.5 software

Per pirmas 9 dienas po EL4 ląstelių įvedimo buvo nustatytas nereikšmingas 11,7 % (p > 0,05) kūno svorio pokytis kontrolinėse pelėse. Ankstyvos stadijos navikai (1–9 dienos) taip pat nepasižymėjo reikšmingu naviko tūrio didėjimu (lag fazė). 9 dieną ascito tūris sudarė tik

0,83 ml. Priešingai, vėlesnėje naviko augimo stadijos (10–13 dienos) buvo pastebėtas reikšmingas tiek pelių svorio, tiek naviko tūrio didėjimas, kurį lėmė spartus skysčio kaupimasis tirtų pelių pilvaplėvės ertmėje. Iš viso per 13 dienų nuo eksperimento pradžios EL4 ascito tūris padidėjo 48,5 karto nuo 0,2 ml iki 9,7 ml. 6 pav. pavaizduotas eksponentinis tūrio padidėjimas rodo ascitinį naviko augimą.

Vėlesnėje naviko augimo stadijoje (po 10 dienų po EL4 ląstelių suleidimo) visų tirtų gyvūnų, išskyrus išgydytas/dox 3 peles, pilvaplėvės ertmėje buvo stebimas ryškus eritrocitų skaičiaus padidėjimas, būdingas hemoraginiams ascitams [169].

3.1.2.2. EL4 ląstelių kiekio C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmėje vertinimas

Eksperimento metu buvo vertinamas implantuotų EL4 limfomos ląstelių skaičiaus kitimas tirtose C57BL6/NCr pelių grupėse. Papildomai tyrėme visų pelių pilvaplėvės ertmės ląstelių kiekio pokyčius progresuojant EL4 navikui. Ląstelių skaičius buvo vertinamas pagal 2.3.5 ir 2.3.4.1 skyriuose aprašytą metodiką. EL4 limfomos ląstelių skaičius didėjo 83,7 karto greičiau nei ascito tūris per ta pati 13 dienų laikotarpi. Naviko lastelių skaičius negydytose pelėse padidėjo nuo 0.05·10⁶ eksperimento pradžioje net 4060 kartų iki 203*10⁶ ląstelių 13 eksperimento dieną. 3, 5 ir 9 doksorubicino injekcijos dieną C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmėje buvo atitinkamai $(0,15 \pm 0,03) \cdot 10^{6}$, $(0,6 \pm 0,07) \cdot 10^{6}$, $(22,7 \pm 3,89) \cdot 10^{6}$ EL4 limfomos lastelių, fiksuojant 151 k. ląstelių skaičiaus padidėjimą šiomis dienomis. Nors EL4 naviko masė sudarė tik 0,045 % gyvūno masės 9-ą naviko augimo dieną, kai vaisto suleidimas neturėjo jokio gydomojo poveikio. Vertinant visu pilvaplėvės ertmės (*PerC – peritoneal cavity*) lastelių pokyčius tarp pelių grupių parodyta, kad pirmas 5 dienas po EL4 naviko suleidimo bendras pilvaplėvės ertmės ląstelių skaičius reikšmingai nesiskyrė nuo sveikų pelių. Bendras lastelių skaičius pastarojoje grupėje buvo $(2,2 \pm 0,30) \cdot 10^6$. Bendras ląstelių skaičius naviką turinčiose pelėse (TBM – tumour bearing mice) pirmas 5 dienas po naviko implantacijos reikšmingai nesiskyrė nuo sveikų pelių. 3-ią dieną šis skaičius sudarė $(2,3 \pm 0,30) \cdot 10^6$ ląstelių, 5-ą dieną – $(2,8 \pm 0,21) \cdot 10^6$ ląstelių. Tuo tarpu nuo 6 dienos PerC ląstelių skaičius didėjo eksponentiškai ir 9-ą dieną po naviko suleidimo jau sudarė $(24,2 \pm 0,40) \cdot 10^{6}$ lastelių.

Eksponentinis į C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmę implantuotų EL4 limfomos ląstelių augimas pavaizduotas 7 pav. esančiame grafike. Bendras pilvaplėvės ertmės ląstelių skaičius tirtose grupėse surašytas 3.2 lentelėje.



7 pav. EL4 naviko augimas (pusiau-logaritminė skalė)

X ašyje parodyta laiko trukmė po 5*10⁴ EL4 ląstelių suleidimo C57BL6/NCr pelėms. Y ašyje – EL4 ląstelių skaičius. Raudona spalva pažymėtos tiriamos pelių grupės (išgydytos, atkryčio, atsparios), kurioms 3, 5, 9 dienomis suleista 15 mg/kg Dox dozė. EL4 ląstelių skaičius per 13 dienų laikotarpį padidėjo 4060 karto. OriginPro 8.5 programinė įranga.

Fig. 7 EL4 tumour growth (semi-logarithmic scale)

The X-axis shows the time (days) after injection of 5*10⁴ EL4 cells in C57BL6/NCr mice. On the Y axis, the amount of EL4 cells. Cure ('Išgydytos'), relapse ('Atkryčio') and resistant ('Atsparios') mice (red dotted line) received a 15 mg/kg Dox dose on days 3, 5, 9. The 4060-fold increase of EL4 cells was demonstrated during the 13-day period. OriginPro 8.5 software.

3.1.2.3. EL4 ląstelių tankio C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmėje vertinimas

Tyrimo metu buvo vertinama ne tik absoliutaus EL4 ląstelių kiekio, bet ir šių ląstelių tankio pilvaplėvės ertmėje, dinamika. Buvo nustatyta, kad per pirmas penkias eksperimento dienas EL4 naviko tankis padidėjo nežymiai. Praėjus 3 dienoms po EL4 implantacijos ląstelių tankis pelių pilvaplėvės ertmėje sudarė tik $0,6\cdot10^6 \pm 0,14$ ląst./ml ir buvo padidėjęs 2,44 karto, 5 dieną EL4 tankis nuo eksperimento pradžios buvo padidėjęs 7,2 karto ir sudarė $(1,8 \pm 0,91)\cdot10^6$ ląst./ml. Tuo tarpu 6–10 dienomis EL4 ląstelių tankis didėjo eksponentiškai ir 9 dieną pasiekė $26,8\cdot10^6 \pm 2,48$ ląst./ml (107,3 karto padidėjimas) (žr. 3.1 lent., 8 pav.). Tolesni tyrimai parodė,

kad EL4 ląstelių tankio pokyčiai po EL4 ląstelių implantacijos neigiamai koreliavo su viduląsteline vaisto koncentracija ir terapiniu poveikiu (3.1.3.2).

Apibendrinti EL4 ląstelių kiekio, tankio ir ascito tūrio pokyčiai C57BL6/NCr pelėse parodyti 3.1. lentelėje.



8 pav. EL4 ląstelių tankis C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmėje (linijinė skalė)

Raudona spalva pažymėti laiko momentai (3, 5, 9 dienos), kai buvo suleista 15 mg/kg Dox dozė tiriamoms C57BL6/NCr pelių grupėms (išgydytos, atkryčio, atsparios).

Fig. 8. Density of EL4 lymphoma cells in the peritoneal cavity of C57BL6/NCr mice (linear scale)

Red dotted lines show the time (days 3, 5, 9) at which the 15 mg/kg Dox dose was given to cure ('Išgydytos'), relapse ('Atkryčio') and resistant ('Atsparios') C57BL6/NCr mice respectively.

3.1 lentelė. EL4 ląstelių sk. ir tankio bei ascito tūrio didėjimas 13 dienų po naviko suleidimo į C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmę

| Laikas po EL4 naviko suleidimo | | | | | | | | | | |
|---|---------|-------------------|-------------------|----------------|-------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|------------------|
| | Diena 0 | Diena 3 | Diena 5 | Diena 7 | Diena 8 | Diena 9 | Diena 10 | Diena 11 | Diena 12 | Diena 13 |
| EL4 sk. •10 ⁶ | 0,05 | $0,\!15\pm0,\!03$ | $0,\!59\pm0,\!07$ | $4,2 \pm 1,40$ | 9,4 ± 1,47 | 22,7 ± 3,9 | $62,\!4\pm25,\!4$ | 125,3 ± 32,5 | 179,2±25,5 | $203 \pm 5{,}98$ |
| EL4 tankis ·10 ⁶ ląst./ml | 0,25 | 0,61 ± 0,14 | 1,8±0,91 | 12,69 ± 3,6 | 25,35 ± 1,5 | 26,8 ± 2,5 | 38,15 ± 12,1 | 32,44 ± 1,8 | 28,51±9,2 | 21,5 ± 2,64 |
| Ascito tūris, ml | 0,2 | 0,23 ± 0,02 | 0,44 ± 0,31 | 0,31 ± 0,01 | 0,33 ± 0,01 | 0,83 ± 0,06 | 1,4 ± 0,2 | 3,6±0,36 | 6,83 ± 1.39 | 9,7 ± 1,16 |

Table 3.1. The increase of EL4 cells count and density as well as increase of ascitic volume during 13-day period after tumour injection into the peritoneal cavity of C57BL6/NCr female mice

3.1.3. Doksorubicino farmakokinetika

3.1.3.1.Viduląstelinio doksorubicino koncentracijos nustatymas

Įvertinus bendrą ląstelių skaičių tiriamų pelių pilvaplėvės ertmėje bei nustačius reikšmingus EL4 ląstelių kiekio ir tankio skirtumus tirtuose gyvūnuose buvo siekiama nustatyti, ar šie skirtumai turi įtakos chemoterapinio vaisto doksorubicino įsisavinimui ir susikaupimui pilvaplėvės ertmės ir naviko ląstelėse. Iš 3, 5 ir 9 dieną doksorubicino injekciją gavusių C57BL6/NCr pelių pilvaplėvės ertmės paimtos ląstelės buvo analizuojamos tėkmės citometru po 60 min, 48 val., 96 val., 144 val., 240 val. (10 dienų). Vaisto doksorubicino kiekis pilvaplėvės ertmės ląstelėse kiekvienu laiko momentu buvo vertinamas pagal santykinį fluorescencijos intensyvumo pokytį, perskaičiuotą į ng/10⁶ ląstelių.

Praėjus 60 min. po Dox injekcijos viduląstelinė vaisto koncentracija reikšmingai skyrėsi tik tarp 3 (išgydytos) ir 9 dieną (atkryčio) vaistą gavusių pelių grupių. Citostatiko kiekis šių grupių pelių naviko ląstelėse buvo atitinkamai 10,75 \pm 0,35 ng/mg ir 6,3 \pm 0,99 ng/mg (p = 0,0112). Tuo tarpu praėjus 1 val. po vaisto injekcijos atkryčio pelių grupėje nustatyta buvo 8,7 \pm 0,42 ng/mg dox koncentracija reikšmingai nesiskyrė nei nuo išgydytų (p = 0,1652), nei atsparių (p = 0,0739) pelių grupių. Priešingai nei PerC ląstelėse, doksorubicino kiekis EL4 limfomos ląstelėse 60 min. po injekcijos reikšmingai skyrėsi visose tirtose grupėse. Vidutinis fluorescencijos kanalo poslinkis (*dMCF – difference in mean channel fluorescence*) vėžinėse ląstelėse praėjus 60 min. po 15 mg/kg doksorubicino injekcijos buvo 85 \pm 2,2; 58 \pm 1,7; 11 \pm 2,5 atitinkamai išgydytų, atkryčio ir atsparių pelių grupėse (9 pav., 3.2 lentelė).



9 pav. Doksorubicino kiekis pilvaplėvės ertmės (PerC) ir EL4 limfomos ląstelėse EL4 turinčiose pelėse 60 min. po injekcijos

Išgydytos, atkryčio, atsparios – 15 mg/kg Dox dozė 3 d., 5 d. ir 9 d. atitinkamai. dMCF – vidutinis fluorescencijos kanalo poslinkis, *p < 0,5, ****p < 0,0001

Fig. 9 Doxorubicin levels in peritoneal cavity (PerC) cells and EL4 lymphoma cells of tumour bearing mice 60 min after Dox injection

Cure ('Išgydytos'), relapse ('Atkryčio') and resistant ('Atsparios') mice received a 15 mg/kg Dox dose on days 3, 5 or 9 respectively. dMCF - shift in mean channel fluorescence, *p < 0.5, ****p < 0.0001

Įdomu, kad nors vaisto susikaupimas PerC ląstelėse 60 min. po doksorubicino injekcijos reikšmingai skyrėsi tik 3 ir 9 dieną 15 mg/kg dox dozę gavusiose C57BL6/NCr pelių grupėse, tolesnis vaisto sulaikymo PerC ląstelėse ir vaisto išmetimo greitis reikšmingai skyrėsi visose tirtose grupėse. Doksorubicino suleidimas 9 dieną po naviko implantacijos lėmė citostatiko pašalinimą iš PerC ląstelių mažiau nei per 96 val. po vaisto injekcijos. Tuo tarpu net 144 val. po dox injekcijos 5 dieną, vaistas dar buvo randamas PerC ląstelėse (0,10 ng/mg). Dox suleidus 3 dieną po EL4 suleidimo Dox buvo nustatomas net 240 val. po injekcijos (0,45 ± 0,071 ng/mg). Apskaičiuotas 10 dienų (240 val.) plotas po viduląstelinio doksorubicino koncentracijos kreive AUC_{0-10d} (anglų k. *area under the curve*) atsparių pelių grupėje buvo 157,55 ± 23,3 ng·h/mg (p = 0,0003), atkryčio – 456,83 ± 26,8 ng·h/mg (p = 0,0031), išgydytų pelių grupėje 824,18 ±

57,2 ng·h/mg. AUC_{0-10d} išgydytų pelių grupėje buvo reikšmingai didesnis nei pelėse, kurioms buvo nustatytas atkrytis ar gydymas buvo neveiksmingas (atspari grupė).

Pritaikius ne linijinę regresinę analizę apskaičiuota PerC Dox pusėjimo trukmė $t_{1/2}$ buvo 43,4 h, 39,3 h, 9,5 h atitinkamai išgydytų, atkryčio ir atsparių pelių grupėse. Doksorubicino pusėjimo trukmė $t_{1/2}$ 3 dieną Dox gavusių pelių grupėje buvo 4,6 k. ilgesnė nei atsparių pelių grupėje, kurioms gydymas buvo neefektyvus.

Išgydytų pelių grupėje parodytas ne tik didžiausias vaisto įsisavinimas EL4 ląstelėse per pirmąsias 60 minučių po injekcijos, bet ir fiksuotas stiprus citotoksinis poveikis. Praėjus 72 val. po 15 mg/kg dox injekcijos 3 naviko augimo dieną EL4 ląstelės nebebuvo nustatomos tirtų gyvūnų pilvaplėvės ertmėje.

Naviko dydis (ir tankis) citostatiko suleidimo dieną buvo svarbus veiksnys vaisto sulaikymui, išmetimui ir terapiniam efektyvumui. Būtent vaisto AUC audiniuose gali būti lemiamas veiksnys gydymo efektyvumui.

Doksorubicino sulaikymo ir išmetimo iš pilvaplėvės ertmės ląstelių dinamika atsparių, atkryčio ir išgydytų pelių grupėse pavaizduota 10 pav.



10 pav. Doksorubicino kiekio pokytis per 10 dienų (240 valandų) nuo vaisto suleidimo skirtingose pelių grupėse

Atsparios: $AUC_{0-10d} = 157,55 \pm 23,3 \text{ ng*h/mg} (p = 0,0003), t_{1/2} = 9,5 \text{ val.}; atkryčio - 456,83 \pm 26,8 \text{ ng*h/mg} (p = 0,0031), t_{1/2} = 39,3 \text{ val.}; išgydytos - 824,18 \pm 57,2. t_{1/2} = 43,4 \text{ val.} Duomenys apdoroti OriginPro 8.5 ir GraphPad Prism 9.0.2 programomis.}$

Fig. 10 Change in doxorubicin levels within 10-days (240-hours) period after drug injection in different groups of mice

Resistant ('Atsparios'): $AUC_{0-10d} = 157.55 \pm 23.3 \text{ ng}*h/mg (p = 0.0003), t_{1/2} = 9.5h;$ relapse ('Atkryčio') - $456.83 \pm 26.8 \text{ ng}*h/mg (p = 0.0031), t_{1/2} = 39.3h;$ cure ('Išgydytos') - 824.18 ± 57.2 . $t_{1/2} = 43.4 \text{ h. Data were processed with OriginPro 8.5 and GraphPad Prism 9.0.2 software.}$

3.1.3.2. Ląstelinio doksorubicino ir naviko dydžio sąsajų vertinimas

Vertinant sąsajas tarp EL4 ląstelių kiekio pilvaplėvės ertmėje ir viduląstelinės doksorubicino koncentracijos buvo pritaikyta tiesinės regresijos lygtis ir apskaičiuotas Pearson'o koreliacijos koeficientas R. Nustatyta neigiama koreliacija tarp naviko dydžio ir vaisto kiekio vėžinėse ląstelėse (R = -0.86, p < 0.001) atitinka mūsų hipotezę, kad naviko dydis vaisto suleidimo dieną turi įtakos vaisto susikaupimui ląstelėse ir atitinka gautus pelių išgyvenamumo rezultatus (11 pav.) Galima daryti prielaidą, kad naviko dydis vaisto suleidimo dieną (ligos stadija) lemia vaisto įsisavinimą ląstelėse ir pašalinimą iš jų.



11 pav. Neigiama koreliacija (R = 0,86, p < 0,001) tarp Dox kiekio ir EL4 naviko dydžio pelių pilvaplėvės ertmėje

Fig. 11 Negative correlation (R = -0.86, p < 0.001) between Dox content and EL4 tumour size in the peritoneal cavity of mice

3.1.3.3. Plazmos doksorubicino vertinimas C57BL6/NCr pelėse

Doksorubicino kiekio tiriamų pelių kraujo plazmoje vertinimas neparodė skirtumų nepriklausomai nuo naviko dydžio vaisto suleidimo dieną. Išgydytų, atkryčio, atsparių C57BL6/NCr pelių grupėse vidutinė plazmos doksorubicino koncentracija 60 minučių po injekcijos buvo atitinkamai: $0,25 \pm 0,066$ ng/µl, $0,22 \pm 0,054$ ng/µl, $0,21 \pm 0,049$ ng/µl. Kontrolei buvo pasirinktos EL4 naviko neturinčios sveikos C57BL6/NCr pelės. Nustatyta vaisto koncentracija 60 min. po injekcijos šioje grupėje buvo $0,25 \pm 0,050$ ng/µl.

Gauti EL4 ląstelių kiekio, tankio, pelių svorio duomenys doksorubicino suleidimo dieną bei šio vaisto koncentracijos matavimo 60 minučių po injekcijos rezultatai surašyti 3.2 lentelėje. Doksorubicino kiekis EL4 ląstelėse buvo vertintas pagal vidutinį fluorescencijos kanalo poslinkį dMCF. Kur taikytina, 10⁶ ląstelių skaičius buvo prilygintas 1 mg naviko masės.

3.2 lentelė. Dox koncentracija plazmoje ir PerC ląstelėse 60 min po 15 mg/kg Dox injekcijos

| | Tiriamos grupės | | | | | | | |
|--|------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--|--|--|--|
| Rodiklis | Sveikos pelės | "Išgydytų" pelių grupė | "Atkryčio" pelių grupė | "Atsparumo" pelių grupė | | | | |
| Plazmos Dox (ng/µl) | $0,25 \pm 0,050$ | $0,25 \pm 0,066$ | $0,22 \pm 0,054$ | 0,21 ± 0,049 | | | | |
| Viduląstelinis Dox PerC (ng/10 ⁶ ląstelės arba ng/mg) | $10,75 \pm 0,35$ | $10,5 \pm 0,71$ | 8,7 ± 0,42* | $6,3 \pm 0,99*$ | | | | |
| PerC ląstelių sk. (n*10 ⁶) | $2,2 \pm 0,30$ | $2,3 \pm 0,30$ | 2,8 ± 0,21 | 24,2 ± 0,40** | | | | |
| EL4 ląstelių sk. PerC (n x 10 ⁶) | N.A. | $0,2 \pm 0,03$ | $0,6 \pm 0,08$ | 22,5 ± 0,31** | | | | |
| EL4 ascito masė (mg) | N.A. | 0,2 | 0,6 | 22,5 | | | | |
| Viduląstelinis Dox EL4 ląstelėse (dMCF) | N.A. | 85 ± 2,2 | 58 ± 1,7* | 11 ± 2,5** | | | | |
| Gyvūnų kūno masė (g) | $20,0 \pm 0,87$ | 19,9 ± 0,43 | 19,9 ± 0,95 | $20,3\pm0,70$ | | | | |
| Naviko ir gyvūno kūno masių santykis (%) | N.A. | 0,001 | 0,003 | 0,045 | | | | |

Table 3.2. Dox content in plasma and PerC cells 60 min after 15 mg/kg Dox injection

Įvertinus plazmos doksorubicino farmakokinetiką, jokių vaisto koncentracijos plazmoje sąsajų su naviko dydžiu, tankiu bei bendru gydymo efektyvu nustatyta nebuvo. Galima daryti prielaidą, kad ne plazmos, bet būtent audiniuose sukaupto vaisto kiekis atlieka esminį vaidmenį, lemiantį priešvėžinį aktyvumą.

3.1.4. Sisteminis doksorubicino hematologinis poveikis

Siekiant įvertinti doksorubicino sisteminį poveikį, automatiniu CBC analizatoriumi buvo vertinti C57BL6/NCr pelių kraujo rodikliai. Bendras kraujo tyrimas buvo vykdomas praėjus 48 valandoms ir po 10 dienų po 15 mg/kg Dox dozės suleidimo. Visoms pelėms, nepriklausomai nuo Dox suleidimo dienos, buvo nustatytas reikšmingas leukocitų, limfocitų ir monocitų sumažėjimas palyginus su kontrole. Praėjus 48 val. po vaisto suleidimo leukocitų sk. sumažėjo nuo 7,5 \pm 0,67 \cdot 10⁹/L kontrolinėse pelėse iki 2,5 \pm 0,46 \cdot 10⁹/L (p = 0,00081), 2,6 \pm 0,25 \cdot 10⁹/L (p = 0,00270) ir 2,5 \pm 0,40 \cdot 10⁹/L (p = 0,00104); limfocitų sumažėjo nuo 6,0 \pm 0,70 \cdot 10⁹/L iki

 $1,2 \pm 0,35 \cdot 10^{9}/L$ (p = 0,00197), $1,6 \pm 0,21 \cdot 10^{9}/L$ (p = 0,00498), $1,7 \pm 0,70 \cdot 10^{9}/L$ (p = 0,00163); monocitų – nuo $1,1 \pm 0,15 \cdot 10^{9}/L$ iki $0,8 \pm 0,06 \cdot 10^{9}/L$ (p = 0,03987), $0,7 \pm 0,06 \cdot 10^{9}/L$ (p = 0,02278) ir $0,5 \pm 0,23 \cdot 10^{9}/L$ (p = 0,02565) atitinkamai išgydytų, atkryčio ir atsparių pelių grupėse.

Tarp šių grupių, nepriklausomai nuo gydymo schemos, jokių reikšmingų leukocitų, limfocitų ir monocitų kiekio skirtumų nebuvo nustatyta. Pakartotinas kraujo rodiklių vertinimas 10 dieną po doksorubicino suleidimo parodė visišką limfocitų, leukocitų ir monocitų skaičiaus atsistatymą visose tirtose grupėse. Doksorubicino poveikis granulocitų, trombocitų, hemoglobino kiekiui nenustatytas (12 pav.). Pakartotinas kraujo tyrimas 10 dieną po doksorubicino injekcijos parodė visišką kraujo rodiklių atsigavimą tirtose atkryčio ir išgydytų pelių grupėse (3.3 lentelė). Vidutinis atsparių pelių išgyvenamumas buvo apie 14 dienų, dėl to 10 dieną po dox injekcijos, t. y. 19-ą dieną po EL4 naviko suleidimo kraujo vertinimo šioms pelėms atlikti nebebuvo įmanoma.

Kai kurių tyrimų duomenimis, vidutinė eritrocitų apimtis MCV (anglų k. *mean cell/corpuscular volume*) ir vidutinis trombocitų tūris MPV (anglų k. *mean platelet volume*) vaidina svarbų vaidmenį atsake į chemoterapinį gydymą [65], [170]–[172]. Mūsų tyrime jokių MPV ir MCV skirtumų nebuvo nustatyta.



12 pav. Sisteminis 15 mg/kg dox poveikis išgydytų (3 dieną po EL4 ląstelių suleidimo gauta dox dozė), atkryčio (5 dieną) ir atsparių (9 dieną) C57BL6/NCr pelių grupėse (n = 3)

Kraujo rodikliai tirti po 48 val. po vaisto suleidimo. Nustatytas reikšmingas leukocitų (WBC), limfocitų (LY) ir monocitų (MO) sumažėjimas po Dox injekcijos visose Dox gavusiose pelėse. Kontrolė – Dox injekcijos negavusios C57BL/6NCr pelės. Statistinė analizė atlikta GraphPad Prism 9.0.2 programine įranga.

*
$$p < 0.05$$
, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fig. 12. Systemic effect of doxorubicin 48 h after 15 mg/kg drug injection in cure ('Išgydytos'), relapse ('Atkryčio') and resistant ('Atsparios') C57BL6/NCr mice (n = 3)

Significant decrease in number of leukocytes (WBC), lymphocytes (LY) and monocytes (MO) was observed after Dox injection in all treated mice. 'Kontrole' – untreated, control C57BL/6NCr mice. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 9.0.2 software. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Tirtų C57BL6/NCr pelių kraujo rodikliai po 48 val. ir po 10 dienų po 15 mg/kg doksorubicino dozės suleidimo surašyti 3.3 lentelėje. Kadangi sisteminis doksorubicino poveikis tarp pagal skirtingą protokolą gydytų pelių nesiskyrė (žr. 3.3 lent.), galima teigti, kad nustatytas skirtingas gydymo atsakas nulemtas būtent viduląsteliniu vaisto pasisavinimu ir jo susikaupimu ląstelių viduje.

3.3 lentelė. Sisteminis hematologinis poveikis praėjus 2 d. ir 10 d. po 15 mg/kg Dox suleidimo skirtingose naviko augimo stadijose

| | | Kraujo rodikliai | | | | | | | | |
|---------------------------|--|------------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|--|
| Laikas po Dox (dienos) | HGB (g/l) | MCV (fl) | PLT (10 ⁹ /L) | MPV (fl) | WBC (10 ⁹ /L) | LY (10 ⁹ /L) | MO (10 ⁹ /L) | GR (10 ⁹ /L) | | |
| Kontrolė (be Dox) | | 142±8,4 | 46±0,6 | 751±70,7 | 6,8±0,61 | 7,5±0,67 | 6±0,70 | 1,1±0,15 | 0,3±0,06 | |
| | Sveikos pelės, kurioms buvo suleista Dox | 139±7,8 | 46±0,6 | 713±100,6 | 7,5±0,10 | 2,5±0,40 | 1,3±0,25 | 0,8±0,05 | 0,4±0,12 | |
| 2 diana no | "Išgydytų" pelių grupė | 140±9,6 | 46±1,0 | 658±75,9 | 7,4±0,32 | 2,5±0,46 | 1,2±0,35 | 0,8±0,06 | 0,5±0,1 | |
| injekcijos | "atkryčio" grupė | 143±6,0 | 46±0,6 | 639±121,0 | 7,3±0,26 | 2,6±0,25 | 1,6±0,21 | 0,7±0,06 | 0,3±0,15 | |
| | "atspari" pelių grupė | 139±5,8 | 47±0,6 | 671±89,1 | 7,3±0,31 | 2,5±0,40 | 1,7±0,70 | 0,5±0,23 | 0,3+0,15 | |
| 10 diena po | "Išgydytų" pelių grupė | 144±15,1 | 47±1,2 | 763±160,2 | 6,7±0,21 | 7,3±0,38 | 5,9±0,15 | 1,1±0,15 | 0,3±0,15 | |
| injekcijos | "atkryčio" grupė | 140±16,8 | 46±0,6 | 768±105 | 6,6±0,51 | 6,8±0,93 | 5,3±0,6 | 1,2±0,21 | 0,3±0,12 | |

Table 3.3. Systemic haematological effects 2 days and 10 days after a single 15 mg/kg Dox injection at different stages of tumour growth

3.1.5. Apibendrinimas

Tyrimo metu parodėme, kad priešvėžinio gydymo rezultatai nekoreliavo su chemoterapinio vaisto doksorubicino kiekiu pelių kraujo plazmoje. Doksorubicino koncentracija tiriamų pelių kraujo plazmoje 60 min. po injekcijos nesiskyrė tarp tiriamų grupių. Sisteminio citostatiko poveikio vertinimas taip pat neparodė jokių skirtumų mūsų tirtose pelių grupėse. Visose trijose grupėse 48 val. po doksorubicino suleidimo pastebėta leukopenija (daugiausia dėl sumažėjusio limfocitų ir granulocitų skaičiaus) bei trombocitopenija. Praėjus 72 valandoms po injekcijos, vaisto koncentracija plazmoje buvo žemiau aptikimo ribos. Tuo tarpu nedideli doksorubicino kiekiai pelių pilvaplėvės ertmės ląstelėse buvo randami mažiausiai 10 dienų po vaisto injekcijos.

Mūsų duomenimis, ne plazmos, bet būtent viduląstelinio doksorubicino koncentracija koreliavo su terapiniu efektyvumu mūsų tyrime. Naviko dydis ir tankis doksorubicino injekcijos dieną turėjo lemiamos reikšmės viduląstelinio vaisto susikaupimui, naviko atkryčiui ir gydymo prognozei.

Gauti tyrimų rezultatai leidžia teigti, kad net nedidelis vėžinių ląstelių tankio padidėjimas ankstyvoje avaskulinėje naviko augimo stadijoje gali lemti reikšmingus citotoksinių vaistų susikaupimo ir sulaikymo ląstelėse skirtumus ir būti lemiamu veiksniu gydymo efektyvumui prognozuoti. Šis reiškinys panašus į aprašytą *in vitro* inokuliacijos efektą, kai vaisto pasisavinimas ląstelėse buvo atvirkščiai proporcingas ląstelių skaičiui [38].

Viduląstelinio doksorubicino stebėjimas naviką turinčiose ląstelėse gali būti patogi priemonė toliau tirti šį reiškinį. Šių tyrimų rezultatų klinikinis pritaikymas galėtų būti galimybė atlikti doksorubicino įsisavinimo kraujyje ir jo kiekio limfocituose tyrimus pacientams, kurie yra gydomi chemoterapija. Šis metodas galėtų būti naudojamas kaip papildoma priemonė nustatyti kiekvieno paciento individualų vaisto įsisavinimą ir sulaikymą kraujyje ir tokiu būdu jau gydymo eigoje esant poreikiui tikslinti priešvėžinio vaisto dozę siekiant geriausių gydymo rezultatų.

3.2. SL2 limfomos TSDR modelis

Doksorubicino C57BL6/NCr pelių EL4 limfomos modelyje tyrimai parodė naviko dydžio sąsajas su vaisto susikaupimu ląstelėse ir terapiniu efektyvumu. Kitų autorių tyrimai rodo, kad kai kurių citostatikų (pvz. platinos junginių) likučiai audiniuose yra randami praėjus ilgam laikui po gydymo ir yra siejami su šalutiniu gydymo toksiškumu [17], [173]. Visgi chemoterapinių vaistų susikaupimas audiniuose gali būti susijęs ne tik su šalutiniu poveikiu, bet ir su naviko ląstelių buvimu ramybės būsenoje (anglų k. *dormancy*) ir remisija, o citotoksinių junginių išmetimas iš naviko ląstelių gali lemti naviko atsinaujinimą net po ilgo remisijos laikotarpio. Siekdami įvertinti vaisto susikaupimo ląstelėse su naviko atkryčiu sąsajas, mes sukūrėme dviejų žingsnių ramybės būsenos/atsinaujinimo TSDR SL2 limfomos modelį DBA/2 pelėse (anglų k. *TSDR – two step dormancy/recurrence*) (žr. 2.3.6.2, 13 pav.).



13 pav. DBA/2 pelių SL2 T limfomos TSDR modelis

DBA/2 pelių patelėms 0 dieną (eksperimento pradžioje) implantuota 5*10⁵ SL2 limfomos ląstelių, 30 min. preinkubuotų su Dox 37 °C temp. Kontrolė – SL2 be Dox. Stebėjimas 60 dienų

Fig. 13. TSDR SL2 T lymphoma model in DBA/2 mice

On day 0 female DBA/2 mice were implanted with $5*10^5$ SL2 lymphoma cells, preincubated for 30 min at 37° C with Dox. 'Kontrole' - SL2 cells without Dox. Mice were observed for 60 days

Tyrimams buvo parinktos SL2 T limfomos ląstelės, nes jos pasižymėjo jautrumu doksorubicinui tiek DBA/2 pelėse *in vivo*, tiek ląstelių kultūroje *in vitro* bei specifiniu imuniniu fenotipu, leidžiančiu sekti vėžinių ląstelių kiekio pokyčius ascito mėginiuose ir tokiu būdu stebėti ligos eigą ir gydymo efektyvumą.





Fig. 14. Flow cytometry analysis A) of in vitro cultivated and B) from the peritoneum cavity of DBA/2 mice isolated cells. The gate defines the population of SL2 lymphoma cells.

Be to, dėl SL2 ląstelėms būdingų specifinių šviesos sklaidos charakteristikų jas buvo galima aiškiai identifikuoti FSC-A vs. SSC-A lange pelių ascito mėginiuose netgi esant kitų ląstelių priemaišų (14 pav.).

Tiriant SL2 limfomos ląstelių liniją tėkmės citometrijos metodu buvo nustatyta, kad SL2 ląstelės išlaikė T limfocitams būdingas charakteristikas [174], pasižymėjo CD3+CD8+CD4-CD44+CD45+ imuniniu ląstelių fenotipu (15 pav.).



15 pav. SL2 ląstelių imuninio fenotipo vertinimas tėkmės citometru

Paveiksle pavaizduotas ląstelių pasiskirstymas pagal: A) dydį (FSC ašis) ir grūdėtumą (SSC ašis), B) CD3, C) CD45, D) CD4, E) CD8, F) CD44 žymenis. Tėkmės citometrijos duomenys analizuoti FlowJo programine įranga. B-F pav. nurodyti tirti žymenys ir fluoroforai, y ašyje – normalizuotas ląstelių sk. raudona sp. – atitinkamu antikūnu pažymėtos ląstelės, šviesiai mėlyna sp. – nedažyta kontrolė.

Fig. 15. Immune phenotype of SL2 cells analysed by flow cytometry

A) SL2 cells are distributed according to size versus granularity (FSC-A vs. SSC-A axis. B-F) histograms show the expression of: B) CD3; C) CD45; D) CD4; E) CD8; F) CD44; markers. Y axis - normalized cell count, X axis - mean channel fluorescence (MCF). Light blue colour - autofluorescence, unlabelled control cells.

Flow cytometry data were analysed with FlowJo software.

3.2.1. SL2 ląstelių, inkubuotų su doksorubicinu, vertinimas tėkmės citometrija

Prieš pradedant *in vitro* \rightarrow *in vivo* eksperimentus, SL2 ląstelės buvo inkubuotos 30 minučių 37 °C temperatūroje su 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml chemoterapinio vaisto doksorubicino koncentracijos tirpalais pagal 2.3.6.2 protokolą ir analizuotos tėkmės citometru. Vaisto susikaupimas ląstelėse, išreikštas vidutine kanalo fluorescencija (anglų k. *MCF – mean channel fluorescence*), pavaizduotas 16 pav. 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 10,0 µg/ml doksorubicino koncentracijos tirpalai buvo atrinkti tolesniems *in vivo* tyrimams.



16 pav. Doksorubicino SL2 ląstelėse vertinimas tėkmės citometrija

Dox vidutinė kanalo fluorescencija (anglų k. MCF-mean channel fluorescence) pavaizduota y ašyje (linijinė skalė). Vaisto koncentracijos pavaizduotos X ašyje log skalėje. Punktyrais pažymėtos tolesniems in vivo tyrimams atrinktos koncentracijos (0,05 μg/ml, 0,1 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1,0 μg/ml, 10,0 μg/ml). Histogramose pavaizduotas Dox fluorescencijos poslinkis. FlowJo programinė įranga. Grafikas paruoštas Origin 8.5 programa.

Fig. 16. Flow cytometry analysis of doxorubicin uptake in SL2 cells

Dox mean channel fluorescence (MCF) is plotted on the Y axis (linear scale). Drug concentrations are plotted on the X axis on a log scale. $0.05 \ \mu g/ml$, $0.1 \ \mu g/ml$, $0.5 \ \mu g/ml$, $1.0 \ \mu g/ml$, $10.0 \ \mu g/ml$ drug concentrations were selected for further in vivo studies. The shift in Dox fluorescence is shown in histograms (FlowJo software). The graph was performed by OriginPro 8.5 software.

3.2.2. DBA/2 pelių išgyvenamumo tyrimai



17 pav. DBA/2 pelių išgyvenamumo vertinimas

Pelėms buvo suleista 5*10⁵ SL2 ląstelių, 30 min 37 °C temp. inkubuotų be arba su skirtinga dox koncentracijos (0,05 μg/ml, 0,1 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1,0 μg/ml, 10,0 μg/ml) tirpalais. DBA/2 pelių išgyvenamumo mediana: kontrolė – 16 d., n = 7; 2) Dox 0,05 μg/ml – 17 d., p = 0,4741, HR = 1,481, n = 3; 3) Dox 0,1 μg/ml – 16 d., p = 0,1940, HR= 1,662, n = 6; 4) Dox 0,5 μg/ml – 19 d., p = 0,4711, HR = 0,4761, n = 3; 5) Dox 1,0 μg/ml – 19,5 d., p = 0,0615, HR = 0,4761, n = 6; 6) Dox 10 μg/ml – > 60 d. (išgydytos), (p = 0,0004***), HR = 0,09486, n = 6. Grafikas gautas OriginPro 8.5 programine įranga. Išgyvenamumo medianos, HR ir p reikšmės apskaičiuotos su GraphPad Prism 9.0.2 programa (Log-rank testas).

Fig. 17 Survival assessment of DBA / 2 mice

Mice were injected with $5*10^5$ SL2 cells, preincubated for 30 min at 37°C with or without different conc. of Dox (0.05 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1.0 µg/ml, 10.0 µg/ml). Median survival of DBA/2 mice: 1) Untreated mice ('Kontrole') – 16 days, n = 7; 2) Dox 0.05 µg/ml –17 d., p = 0.4741, HR = 1.481, n = 3; 3) Dox 0.1 µg/ml – 16 days, p = 0.1940, HR = 1.662, n = 6; 4) Dox 0.5 µg/ml – 19 days, p = 0.4711, HR = 0.4761, n = 3; 5) Dox 1.0 µg/ml - 19.5 days, p = 0.0615, HR = 0.4761, n = 6; 6) Dox 10 µg/ml -> 60 d., (p = 0.0004 ***), HR = 0.09486, n = 6. The graph was obtained with OriginPro 8.5 software. Median, HR, and p values were calculated with GraphPad Prism 9.0.2 (Log-rank test). Chemoterapinio vaisto doksorubicino susikaupimo vėžinėse ląstelėse su priešvėžinio gydymo efektyvumu ir bendru išgyvenamumu sąsajų vertinimui SL2 T limfomos ląstelės buvo inkubuotos su 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 10,0 µg/ml doksorubicino hidrochlorido tirpalais pagal 2.3.6.2 skyriuje aprašytą metodiką ir suleistos į DBA/2 pelių pilvaplėvės ertmę.

Gydymo atsakas buvo lyginamas su negydytomis pelėmis (kontrolė). Kontrolinių pelių grupėje (n = 7) vidutinis išgyvenamumas buvo 17,14 ± 1,95 d., išgyvenamumo mediana (anglų k. *median survival*) buvo 16 dienų. Vertinant doksorubicino kiekio poveikį tiriamų gyvūnų gyvenimo trukmei nustatyta, kad tik 10 µg/ml doksorubicino koncentracija buvo veiksminga. Su šiuo vaisto kiekiu inkubuotas SL2 ląsteles gavusios DBA/2 pelės išgyveno daugiau nei 60 dienų (p = 0,0004, HR = 0,09486, n = 6) ir buvo laikomos išgydytomis. Tiriamų pelių, kurioms buvo suleista su vidutine (1 ug/ml ar 0,5 µg/ml) doksorubicino koncentracija inkubuotų SL2 ląstelių, vidutinė išgyvenimo trukmė buvo atitinkamai 21,17 ± 3,54 d. ir 19,33 ± 0,58 d., išgyvenamumo mediana buvo atitinkamai 19,5 d., (p = 0,0615, HR = 0,4761, n = 6) ir 19 d. (p = 0,4711, HR = 0,4761, n = 3). Dar mažesnis citostatiko kiekis (0,1 µg/ml, ir 0,05 µg/ml) neparodė jokių skirtumų lyginant su kontrole. Išgyvenamumo mediana šiose grupėse buvo atitinkamai 16 d. (p = 0,1940, HR = 1,662, n = 6) ir 17 d. (p = 0,4741, HR = 1,481, n = 3), o vidutinė gyvenimo trukmė – atitinkamai 16,17 ± 1,6 d. ir 17 ± 1,79 dienos. Išgyvenamumo rezultatai pavaizduoti 17 pav.

DBA/2 pelių patelėse, kurioms buvo implantuotos su 0,05–1 µg/ml Dox doze inkubuotos SL2 ląstelės taip pat buvo stebimas pelių kūno svorio didėjimas palyginus su 0 diena. Kontrolinėje grupėje, reikšmingesnis svorio padidėjimas (Δ) buvo lygus 8,35 ± 0,6 g, 15 dieną Δ = 12,5 ± 3,1 g. 15 dieną po SL2+Dox ląstelių implantacijos grupėse buvo nustatytas vidutinis 3,2 g, 7,9 g, 11,7 g pelių svorio didėjimas atitinkamai 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml Dox pelių grupėse. Vėlesnėse stadijose taip pat buvo stebimas hemoraginiams navikams būdingas ryškus eritrocitų skaičiaus padidėjimas [169]. Gauti rezultatai panašūs į mūsų tyrimų duomenis su EL4 limfomos modeliu.

3.2.3. Doksorubicino plazmos farmakokinetikos vertinimas

Matuojant plazmos doksorubicino farmakokinetiką sveikose DBA/2 pelėse, pelių kraujas buvo tirtas praėjus 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 6 val., 48 val., 72 val. po 15 mg/kg vaisto injekcijos. Doksorubicino koncentracijos mažėjimas pavaizduotas 15 pav. Tiek C57BL6/NCr, tiek DBA/2 pelėse didžiausia Dox koncentracija plazmoje C_{max} buvo 1,33 µg/ml (5 min. po injekcijos). Doksorubicino pasiskirstymo tūris V_d (anglų k. *volume of distribution*) – 128,4 L/kg. Apskaičiuotas plotas po doksorubicino koncentracijos plazmoje kreive 72 val. po injekcijos laikotarpiu AUC₀₋₇₂ buvo 3,6 μ g*h/ml, klirensas (Cl – anglų k. *clearance*) buvo lygus 3,1 L/(kg*h), o pusėjimo trukmė t_½ – 28,8 val. Praėjus 72 val. po injekcijos vaistas plazmoje nebebuvo randamas. Jokių doksorubicino plazmos farmakokinetikos sąsajų su gydymo efektyvumu nebuvo nustatyta. Palyginimui, mūsų TSDR modelyje efektyviai 10 μ g/ml doksorubicino koncentracijai apskaičiuotas AUC_{0-0,5} buvo lygus 5 μ g*h/ml (18 pav.).



18 pav. Dox farmakokinetika DBA/2 kraujo plazmoje 72 val. po 15 mg/kg Dox injekcijos

 $K_{el} = 0,024h^{-1}, V_d = 128,4 L/kg, t_{max} = 5 min, C_{max} = 1,33 \mu g/ml, AUC_{0-72} buvo 3,6 \mu g*h/ml, MRT = 41,67 h, Cl = 3,1 L/(kg*h), t_{1/2} = 28,8 h. GraphPad Prism programa.$

Fig. 18. Pharmacokinetics of plasma Dox in plasma 72 hours after a single 15 mg/kg Dox injection

 $K_{el} = 0.024h^{-1}$, $V_d = 128.4 L/kg$, $t_{max} = 5 min$, $C_{max} = 1.33 \mu g/ml$, $AUC_{0.72}$ was 3.6 $\mu g^*h/ml$, MRT = 41,67 h, $Cl = 3,1 L/(kg \cdot h)$, $t_{1/2} = 28,8 h$. Values were obtained by GraphPad Prism software.

3.2.4. Apibendrinimas

Panašūs doksorubicino ramybės/atsinaujinimo (*dormancy/recurrence*) modelio eksperimentai buvo atlikti 2014 metais su SUM159 krūties vėžio ląstelių linija, kai buvo taikyta 2 dienų inkubacija su 1 µg/ml doksorubicinu [24]. Mes savo tyrimams pasirinkome 0,05–10 µg/ml

Dox koncentraciją ir trumpesnę 30 min. inkubaciją, nes tokia trukmė labiausiai atitinka vaisto plazmos farmakokinetiką *in vivo*. Tokios trukmės ląstelių inkubacija 37 °C taip pat nepakenkė SL2 ląstelių gyvybingumui mūsų tyrimuose (duomenys nepateikti). Suleidus SL2 limfomos ląsteles, 30 min., inkubuotas 10 μ g/ml dox tirpale, navikas neužaugo ir pelės išliko sveikos. Mažesnės dox koncentracijos (0,05–1,0 μ g/ml) nebuvo veiksmingos.

Plazmos dox koncentracijos tyrime nustatėme didžiausią plazmos koncentraciją $C_{max} = 1,33 \ \mu g/ml$, išmatuotą 5 min. po vaisto injekcijos. Mūsų duomenys atitinka kitų autorių parodytą didžiausia dox koncentracija plazmoje 1–4 $\mu g/ml$. Mūsų parodyta veiksminga 10 $\mu g/ml$ dox koncentracija plazmoje nebuvo pasiekta, tačiau apskaičiuotas dox AUC_{0-0,5} naviko ląstelėse buvo lygus 5,0 $\mu g \cdot h/ml$, kai plazmos AUC₀₋₇₂ (3,6 $\mu g \cdot h/ml$).

Mūsų pasiūlytas TSDR galėtų būti patogi priemonė tirti audiniuose sukaupto vaisto įtaką naviko atkryčiui ir gydymo efektyvumui.

3.3. Chemoterapinio vaisto doksorubicino stabilumo tyrimai

Daugelis priešvėžinių vaistų, patekę į audinį, gali išlaikyti jame itin ilgai – mėnesius ar net metus [15], [16], [103], [175]. Dox susikaupimas išgyvenusių onkologinių pacientų audiniuose siejamas su jų sukeliamu ilgalaikiu neurotoksiniu ir kardiotoksiniu šalutiniu poveikiu [1], [19], [176].

Siekėme įvertinti fiziologinių organizmo sąlygų (žmogaus kūno temperatūros) ilgalaikį poveikį doksorubicinui. Tuo tikslu doksorubicino hidrochlorido (2 mg/ml) tirpalas buvo laikomas 15 d., 120 d. arba 365 d. 37 °C temperatūroje *in vitro*.

Vaisto stabilumą, mielosupresinį aktyvumą, gebėjimą selektyviai jungtis prie ląstelės branduolio ir kitas savybes tyrėme naudodami konfokalinę mikroskopiją, HPLC, Ramano spektroskopiją, tėkmės citometriją ir kitus metodus.

3.3.1. Stabilumo tyrimas HPLC pagalba

120 d. 37 °C laikyto doksorubicino hidrochlorido tirpalo (2 mg/ml) (Dox-dgr) stabilumas buvo vertinamas didelio našumo skysčių chromatografijos (HPLC) metodu. Vidiniu standartu buvo naudojamas daunorubicino hidrochlorido (1 μ g/ml) DAU tirpalas, kurio pikas matomas ties 17,2 min. Šviežio doksorubicino atveju chromatogramose matomas vienas pikas (11,15 min). 37 °C temperatūroje laikyto doksorubicino Dox-dgr chromatogramoje be pagrindinio piko (11,15 min) matomi papildomi pikai (7 min., 8,5 min, 10,5 min, 16,49 min, 17,33 min), nebūdingi šviežiam doksorubicinui (Dox). Matomas 16,8 kartų mažesnis pagrindinis Dox-dgr pikas ties 11,15 min. rodo sumažėjusį, bet ne pilnai suirusį doksorubiciną po 120 d. temperatūrinio poveikio (19 pav.).



19 pav. Šviežio (A) ir 120 dienų 37 °C temperatūroje laikyto Dox (B,C) chromatogramos

Dox pikas – 11,15 min. A, B) Vidiniu standartu buvo naudojamas 1 µg/ml daunorubicino hidrochlorido (DAU) tirpalas. DAU pikas – 17,2 min. C) Vidinis standartas DAU nebuvo naudojamas, papildomi pikai (7 min; 8,5 min; 10,5 min, 16.49 min; 17.33 min) rodo prasidėjusią Dox degradaciją.

Fig. 19 Chromatograms of (A) fresh Dox (A) and (B, C) Dox, for 120 days stored at 37°C

Dox peak -11.15 min A, B) A 1 µg/ml solution of daunorubicin hydrochloride (DAU) was used as an internal standard. DAU peak - 17.2 min C) Internal standard DAU was not used, additional peaks (7 min, 8.5 min, 10.5 min, 16.49 min, 17.33 min) indicate onset of Dox degradation.

3.3.2. Doksorubicino sugerties ir fluorescencijos spektrų vertinimas



20 pav. paprasto A, B) ir liposominio C) Doksorubicino sugerties spektrai (normalizuoti)

A) Šviežio (dox) ir 365 dienas 37 °C temp. laikyto (dox-365) sugertis; B) Šviežio (dox) ir 120 dienas 37°C temp. inkubuoto (dox-120) vaisto sugertis; C) liposominio doksorubicino sugerties spektrai prieš (Caelyx) ir po 365 d. 37 °C temp. poveikio (Caelyx-dgr). X ašyje nurodytas bangos ilgis (nm), Y ašyje – normalizuota sugertis. Grafikai sukurti naudojant OriginPro 8.5 programinę įrangą.

Fig. 20 Absorption spectra of free A, B) and liposomal C) doxorubicin (normalized)

Absorption spectra of: A) fresh Dox and drug, 365 days incubated at 37°C (Dox-365); B) fresh Dox and drug, 120 days incubated at 37°C (Dox-120); C) Absorption liposomal doxorubicin before (Caelyx) and after 365 days temp. exposure (Caelyx-dgr). The X axis shows the wavelength (nm) while normalized absorption is shown on the Y axis. OriginPro 8.5 software.

Doksorubicino sugerties ir fluorescencijos spektrai buvo vertinami paruoštuose 20 µg/ml koncentracijos PBS tirpaluose. Šviežio doksorubicino sugerties spektras turėjo būdingą smailę (piką) ties 480 nm bangos ilgiu (20 pav. A).

Vertinant 37 °C temperatūros paveikto doksorubicino (Dox-365) sugerties spektrą gautas juostos išplėtimas su reikšmingu hipochromizmu spektro srityje tarp 415–540 nm ir silpnas hiperchromizmas spektrinėje srityje virš 540 nm lyginant su šviežio doksorubicino (Dox) spektru (20 pav. A). Tuo tarpu vidutinės (120 d.) trukmės inkubacija pasižymėjo ne tokiu reikšmingu poveikiu, lėmė ne tokį reikšmingą hipochromizmą 415–540 nm spektro srityje (20 pav. B).

Vertinant ilgalaikį (365 d.) žmogaus kūno fiziologinės temperatūros poveikį liposominio doksorubicino sugerties spektrui, buvo stebėtas mažesnis juostos išplatėjimas su silpnesniu hipochromizmu 415–540 nm bangos srityje lyginant su spektru paprasto doksorubicino atveju (20 pav. C). Tirtų antraciklinų daunorubicino ir epirubicino sugerties spektrai prieš ir po 37 °C temperatūros poveikio pavaizduoti priede C.

Reikšmingas doksorubicino fluorescencijos sumažėjimas po ilgalaikės inkubacijos 37 °C temperatūroje buvo stebimas tiek apšvietus mėginius mėlyna šviesa (21 pav. C), tiek vertinant vaisto fluorescencijos intensyvumą (21 pav. A). Nustatyti trys doksorubicino pikai ties 560 nm, 594 nm ir 638 nm bangos ilgiu. Didžiausias šviežio doksorubicino fluorescencijos intensyvumas ties 594 nm piku buvo lygus 68567, o tuo tarpu šilumos paveikto doksorubicino fluorescencijos intensyvumas intensyvumas matuojant ties tuo pačiu bangos ilgiu buvo 40 k. mažesnis (21 pav. A).

Sugerties spektro pokytis kartu su nustatytu fluorescencijos intensyvumo sumažėjimu doksorubicino PBS tirpaluose gali būti susijęs su vaisto agregacija ir (arba) dimerizacija [177].

Tiriant ilgalaikį fiziologinės žmogaus kūno temperatūros poveikį liposominio doksorubicino "Caelyx" fluorescencijai tirpale, priešingai nei paprasto doksorubicino bei kitų tirtų antraciklinų epirubicino ir daunorubicino atveju (priedas D), nustatytas fluorescencijos intensyvumo padidėjimas (21 pav. B).





21 pav. Šviežio (Dox) ir 365 dienas 37 °C temperatūroje laikyto (Dox-365) tirpalų (20 μg/ml PBS: A) fluorescencijos intensyvumas; C) vaizdinimas apšvietus plastikines kiuvetes mėlyna šviesa. 21 pav. A) Trys pikai ties 560 nm, 594 nm ir 638 nm bangos ilgiu; B) šviežio (Caelyx) ir 365 dienas 37 °C temperatūroje laikyto (Caelyx-365) liposominio doksorubicino fluorescencijos intensyvumas. OriginPro 8.5 programa.

Fig. 21. A) Fluorescence intensity of fresh (Dox) and 365 days at 37°C (Dox-365) solutions
(20 μg/ml) in PBS; C) imaging of plastic cuvettes with Dox and Dox-365 solutions exposed to blue light. Fig.21 A) Three peaks at 560 nm, 594 nm and 638 nm; B) Fluorescence intensity of fresh (Caelyx) and liposomal doxorubicin (Caelyx-365) stored at 37 °C for 365 days. OriginPro 8.5 software.

3.3.3. Chemoterapinių vaistų stabilumo tyrimai Ramano spektroskopijos metodu

Pastaraisiais metais Ramano spektroskopija užima vis svarbesnę nišą farmakologijoje, kur gali būti pritaikoma kuriamų vaistų aktyvumo, fizikinių ir cheminių savybių tyrimuose [178]. Nors nustatyti vaistų ir jų skilimo produktų analizės metodai daugiausia yra pagrįsti chromatografijos metodais (pvz., HPLC, LC-MS), jie yra brangūs ir reikalaujantys daug laiko. Mūsų duomenys rodo, kad norint greitai įvertinti antraciklinų degradaciją, galima taikyti Ramano spektroskopiją, kurios pagalba gauti duomenys gerai koreliuoja su HPLC analize.

Siekiant stebėti ilgalaikį 37 °C temperatūros sukeltą poveikį chemoterapiniams vaistams, buvo vertinami šviežių ir ilgą laiką (> 365 dienas) inkubuotų antraciklinų (doksorubicino, daunorubicino, epirubicino) Ramano spektrai. Poslinkis buvo nustatytas visų temperatūros paveiktų vaistų Ramano spektruose palyginus su jų šviežia kontrole. Remiantis gautais duomenimis, ilgalaikis 37 °C temperatūros poveikis lėmė visų tirtų antraciklinų struktūrinius pokyčius (22 pav. B). Vertinant skirtingos laiko trukmės (90 dienų ir > 365 dienas) temperatūros poveikį chemoterapiniam vaistui doksorubicinui matomi spektro pokyčiai ties 506 cm⁻¹, 1206 cm⁻¹, 1445 cm⁻¹ pikais jau po 90 d. inkubacijos (22 pav. A). Ilgesnį laiką (> 365 dienas) inkubuoto doksorubicino Ramano spektre matomi didesni šių pikų poslinkiai nei 90 d. inkubuoto dox atveju leidžia teigti, kad ilgesnė inkubacija temperatūroje lemia vaisto degradaciją. Šie duomenys sutapo su duomenimis, gautais atlikus HPLC, sugerties ir fluorescencijos analizę.



22 pav. A) Šviežio, 90 ir > 365 dienas 37 °C temperatūroje laikyto doksorubicino (atitinkamai "fresh", "1 yr 37 °C", "6 yrs 20 °C") Ramano spektrai

A) Poslinkis Ramano spektre ties 506 cm⁻¹, 1206 cm⁻¹, 1445 cm⁻¹ pikais; B) Šviežio ir >365 dienas
37 °C temperatūroje inkubuoto doksorubicino (Dox), epirubicino (Epi), daunorubicino (DNR) Ramano spektrai. c) Pt junginių (Cis-platinos, karboplatinos, oksaliplatinos) Ramano spektrai. Stabilūs 365 dienas 37 °C inkubuotos karboplatinos pikai ties 475 cm⁻¹, 545 cm⁻¹, 933 cm⁻¹, 957 cm⁻¹, 1445 cm⁻¹, 1620 cm⁻¹; stabilūs 5 mėnesius 20 °C temp. laikytos oksaliplatinos pikai ties 516 cm⁻¹, 534 cm⁻¹, 627 cm⁻¹, 849 cm⁻¹, 1262 cm⁻¹, 1409 cm⁻¹, 1704 cm⁻¹ ir stabilūs 6 metus RT laikytos cis-platinos pikai ties 930 cm⁻¹ ir 527 cm⁻¹ lyginant su šviežiais junginiais.

Fig. 22 (a) Raman spectra of fresh doxorubicin and drug, stored at 37°C for 90 and > 365 days or at RT for 6 years ('fresh', '1 yr 37°C', '6 yrs 20°C' respectively)

A) Shift in the Raman spectrum at 506 cm⁻¹, 1206 cm⁻¹, 1445 cm⁻¹ peaks; (B) Raman spectra of fresh doxorubicin (Dox), epirubicin (Epi), daunorubicin (DNR) incubated for > 365 days at 37°C; C) No shift was detected in Raman spectra of Pt compounds (Cisplatin, carboplatin, oxaliplatin. Stable peaks of carboplatin incubated for 365 days at 37°C at 475 cm⁻¹, 545 cm⁻¹, 933 cm⁻¹, 957 cm⁻¹, 1445 cm⁻¹, 1620 cm⁻¹; stable at 516 cm⁻¹, 534 cm⁻¹, 627 cm⁻¹, 849 cm⁻¹, 1262 cm⁻¹, 1409 cm⁻¹, 1704 cm⁻¹ of oxaliplatin stored for 5 months at 20°C and stable peaks at 930 cm⁻¹ and 527 cm⁻¹ of cisplatin stored for 6 years at RT compared to fresh compounds.

Skirtingai nei antraciklinai, nė vienas iš tirtų platinos junginių (cis-platina, karboplatina, oksaliplatina) Ramano spektro skirtumų, palyginti su šviežiu vaistu, neparodė (22 pav. C). Pavyzdžiui, po 6 metų laikymo kambario temperatūroje cis-platina parodė tas pačias smailes kaip ir šviežias vaistas

3.3.4. Chemoterapinio vaisto doksorubicino fluorescencijos vertinimas konfokalinės mikroskopijos metodu

Ilgalaikio 37 °C temperatūros poveikis doksorubicino fluorescencijai SL2 ląstelėse buvo vertinamas konfokaline mikroskopija ir tėkmės citometrijos metodu.



23 pav. Dox a) ir Dox-dgr b) fluorescencijos spektrai SL2 ląstelių branduoliuose (konfokalinė mikroskopija, 488 nm sužadinimas)

Fig. 23. Dox a) and Dox-dgr b) fluorescence spectra in SL2 cell nuclei (confocal microscopy, 488 nm excitation)

Matuojant šviežio (Dox) ir 365 dienas 37 °C inkubuoto (dox-365) doksorubicino fluorescenciją konfokaliniu mikroskopu dominančiuose regionuose (ROI – *region of interest*), nustatyta, kad branduolio fluorescencijos intensyvumas buvo 14 kartų mažesnis dox-365 mėginiuose (23 pav. B), palyginus su šviežio dox (23 pav. A) mėginiais. Abiejų medžiagų fluorescencijos spektruose buvo matyti 2 pikai ties 600 ir 660 nm bangos ilgiu. Šviežias doksorubicinas pasižymėjo branduolio selektyvumu. Jo fluorescencija branduolyje buvo 1200 kartų didesnė nei citoplazmoje (24 pav. A-C). Tuo tarpu > 365 dienų inkubacija 37 °C temperatūroje lėmė doksorubicino branduolio selektyvumo praradimą gyvose SL2 ląstelėse. Dox-365 buvo homogeniškai pasiskirstęs per visą ląstelę tarp citoplazmos ir branduolio (24 pav. D-F). Selektyvus doksorubicino kaupimasis branduolyje yra svarbus veiksnys vaisto gebėjimui interkaliuoti į DNR [179] ir slopinti ląstelių proliferaciją, kas lemia vaisto terapinį efektyvumą.



24 pav. Viduląstelinio dox (a-c) ir dox-dgr (d-f) fluorescencijos vertinimas konfokaline mikroskopija
Buvo gautas optinis (a, d), fluorescencijos (b, e) ir sulietas (c, f) SL2 ląstelių vaizdas po inkubacijos su 10 μg/ml vaisto. Branduolio fluorescencija dox atveju buvo apie 1200 kartų didesnė nei citoplazmoje. Tuo tarpu, dox-dgr nepasižymėjo branduolio selektyvumu ir buvo pasiskirstęs tolygiai per visą lastelę.

Fig. 24. Evaluation of intracellular Dox (a-c) and Dox-dgr (d-f) fluorescence by confocal microscopy

Optical (a, d), fluorescence (b, e) and merged (c, f) images of SL2 cells were obtained after incubation with 10 μ g/ml drug. Nuclear fluorescence of fresh Dox was about 1200-fold higher than in the cytoplasm. Meanwhile, Dox-dgr lacked nuclear selectivity and was evenly distributed

3.3.5. Ilgalaikio 37 °C temperatūros poveikio chemoterapinio vaisto doksorubicino fluorescencijai vertinimas tėkmės citometru

Žmogaus fiziologinės kūno temperatūros poveikis paprasto (Dox) ir liposominio doksorubicino (Caelyx) susikaupimui SL2 ląstelėse buvo vertinamas tėkmės citometru.

Tėkmės citometrijai SL2 ląstelės 30 minučių buvo inkubuotos 37 °C temperatūroje su šviežiais ir 15 dienų ir/arba 365 dienas 37 °C temperatūroje inkubuotais 10 μg/ml dox ir Caelyx tirpalais. 10 μg/ml koncentracija buvo pasirinkta, kadangi ji buvo veiksminga *in vivo* tyrime (3.2.2).

365 dienas inkubuotas doksorubicinas pasižymėjo reikšmingai silpnesne fluorescencija (dMCF = 3790) palyginus su šviežiu doksorubicinu (dMCF = 7134) ar tik 15 d. 37 °C temperatūroje inkubuotu vaistu (dMCF = 9083) (25 pav. A). Priešingai nei paprasto doksorubicino
atveju, liposominio doksorubicino fluorescencija SL2 ląstelėse po ilgalaikės inkubacijos 37 °C temperatūroje padidėjo (25 pav. B). 365 dienas inkubuoto Caelyx vidutinės fluorescencijos poslinkis PE kanale (dMCF) buvo 12286. Šviežio Caelyx dMCF buvo lygus 765, t. y. net 16 k. mažesnis. 10 µg/ml šviežio Caelyx įsisavinimas SL2 ląstelėse 9,3 karto mažesnis nei tokios pačios koncentracijos šviežio laisvo doksorubicino. Vidutinės PE kanalo fluorescencijos poslinkio (dMCF) rezultatai parodyti 3.4 lentelėje ir 25 pav.



v luutine TE Kanalo Huoresceneija (WEF)

25 pav. Ilgalaikio temp. poveikio šviežio ir liposominio doksorubicino fluorescencijai SL2 ląstelėse vertinimas tėkmės citometru

25 A) Šviežio (E), 15 dienų (D) ir 365 dienas (C) inkubuoto doksorubicino bei 25 B) šviežio (F) ir 365 dienas inkubuoto (G) liposominio doksorubicino Caelyx fluorescencija. X ašyje – vidutinė PE kanalo fluorescencija (MCF). Y ašyje – normalizuotas ląstelių skaičius. AF – autofluorescencija, nedažytos SL2 ląstelės.

Fig. 25. Evaluation of the effect of long-term temperature exposure for free and liposomal doxorubicin fluorescence in SL2 cells.

A) Fluorescence of fresh (E), for 15 days (D) and for 365 days (C) incubated doxorubicin; B) fluorescence of fresh (F) and 365 days incubated (G) liposomal doxorubicin Caelyx. X axis - mean PE channel fluorescence (MCF), Y axis - the normalized cell count. AF– autofluorescence, unstained SL2 cells.

| Mėginys | Vidutinės PE kanalo |
|--|----------------------------------|
| | fluorescencijos poslinkis (dMCF) |
| $SL2 + 10 \mu g/ml Dox$ | 7134 |
| $SL2 + 10 \ \mu g/ml \text{ Dox } 15 \text{ d.}$ | 9083 |
| SL2 + 10 μg/ml Dox 365 d. | 3790 |
| $SL2 + 10 \mu g/ml$ Caelyx | 765 |
| SL2 + 10 μg/ml Caelyx 365 d. | 12286 |

3.4. lentelė. Šviežio ir 37 °C inkubuoto doksorubicino fluorescencija

Table 3.4. Fluorescence of doxorubicin before and after incubation at 37°C

3.3.6. Liposominio ir paprasto doksorubicino fluorescencijos vertinimas tėkmės citometru permeabilizuotose SL2 ląstelėse



26 pav. Laisvo (Dox) ir liposominio doksorubicino Caelyx (CLX) fluorescencija permeabilizuotose SL2 ląstelėse

A) Šviežio Dox ir Caelyx (CLX) fluorescencija; B) Šviežio (CLX) ir 365 d. 37 °C temp. laikyto Caelyx (CLX-365) fluorescencija. AF – autofluorescencija, nedažytos SL2 ląstelės

Fig. 26 Fluorescence of free (Dox) and liposomal doxorubicin Caelyx (CLX) in permeabilized SL2 cells A) Fluorescence of fresh Dox and Caelyx (CLX); B) Fluorescence of fresh (CLX) and for 365 days at37°C incubated Caelyx (CLX-365). AF - autofluorescence, unstained SL2 cells

Siekiant įvertinti chemoterapinio vaisto gebėjimą prisijungti prie apoptuojančių ląstelių DNR, tėkmės citometru buvo tiriama šviežio ir liposominio doksorubicino fluorescencija iš anksto permeabilizuotose SL2 ląstelėse.

Buvo nustatyta, kad liposominio doksorubicino Caelyx (CLX) įsisavinimas permeabilizuotose SL2 ląstelėse 19,7 karto mažesnis lyginant su laisvo doksorubicino (Dox) susikaupimu. Vidutinis Caelyx fluorescencijos kanalo poslinkis (dMCF) buvo 367, laisvo Dox – 7248 (26 pav. A). Tuo tarpu vertinant 37 °C temperatūroje ilgą laiką (365 d.) laikyto Caelyx įsisavinimą permeabilizuotose ląstelėse nustatytas dMCF buvo lygus 5221 (26 pav. B). Iš histogramų matyti, kad tiek Caelyx, tiek Caelyx-365 prisijungimas prie apoptuojančių SL2 ląstelių DNR (subdiploidinė smailė) daug silpnesnis nei paprasto doksorubicino atveju (26 pav. A, Dox).

Caelyx buvo vienintelis iš tirtų antraciklinų (priedas B), kurio nustatyta fluorescencija gyvose ir permeabilizuotose ląstelėse buvo stipresnė po ilgalaikio temperatūros poveikio nei šviežio vaisto. Caelyx buvo vienintelis tirtas liposominis vaistas. Nustatytas Caelyx fluorescencijos intensyvumo padidėjimas po ilgalaikio temperatūrinio poveikio galėjo būti nulemtas liposomų irimo.

3.3.7. Liposominio doksorubicino Caelyx stabilumo vertinimas

Siekiant palyginti ilgalaikio (365 d.) žmogaus fiziologinės kūno temperatūros poveikio įtaką liposominio doksorubicino Caelyx liposomų stabilumui, liposomas vizualiai vertinome transmisijos elektronine mikroskopija (TEM), o jų dydį – Brauno judėjimu paremtu dinaminės šviesos sklaidos (DLS) metodu. Po ilgalaikio poveikio liposominio doksorubicino (Caelyx-365d.) liposomos pūslelės nebebuvo homogeniškos: liposominis apvalkalėlis suiro, apvalių pūslelių nebuvo matyti (27 pav. B), o DLS tyrimo metu gauti du pikai. Caelyx-365d. pūslelių pasiskirstymas pagal tūrį buvo 61,61 nm ir 318,7 nm (pikų plotis atitinkamai 8,84 nm, 47,87 nm), pasiskirstymas pagal intensyvumą – 63,03 nm ir 317,12 nm (pikų plotis 33,63 nm ir 6,16 nm atitinkamai) (28 pav. B).



- 27 pav. Transmisijos elektroniniu mikroskopija (TEM) Tecnai G2 F20 X-TWIN mikroskopu
- A) Šviežias liposominis doksorubicinas Caelyx, 30 min. inkubuotas 37 °C temperatūroje;
 B) 365 dienas 37 °C temperatūroje laikytas liposominis doksorubicinas (Caelyx-dgr)

Fig. 27. Transmission electron microscopy (TEM) with a Tecnai G2 F20 X-TWIN microscope

A) Fresh liposomal doxorubicin Caelyx, 30 min incubated at 37°C; B) Liposomal doxorubicin (Caelyx-dgr) stored at 37°C for 365 days

Palyginimui, trumpalaikė 30 min. ląstelių inkubacija 37 °C temperatūroje nelemia šviežio Caelyx vaisto liposominių apvalkalėlių irimo (27 pav. A). Transmisijos elektronine mikroskopija gautose nuotraukose (27 pav. A) matome homogeniškas apvalias liposomų pūsleles. DLS metodu gautas vienas pikas taip pat rodo pūslelių homogeniškumą. DLS nustatytas Caelyx pūslelių pasiskirstymas pagal tūrį buvo 93,74 nm (piko plotis 21,74 nm), pagal intensyvumą – 105,00 nm (piko plotis 22,22 nm) (28 pav. A).



28 pav. Liposominio doksorubicino Caelyx A) ir Caelyx-dgr B) dalelių vertinimas dinaminės šviesos sklaidos metodu (intensyvumas)

Fig. 28. Evaluation of liposomal doxorubicin Caelyx A) and Caelyx-dgr B) particles by dynamic light scattering method (intensity)

Liposominio doksorubicino Caelyx pūslelės taip pat parodytos kriogeninės transmisijos elektroninės mikroskopijos (cryo-TEM) metodu (priedas E).

3.3.8. Mielosupresinio chemoterapinio vaisto doksorubicino poveikio vertinimas

Tiriant šviežio (Dox), 120 dienų (Dox-120) ir 365 dienas (Dox-365) 37 °C temperatūroje inkubuoto doksorubicino mielosupresinį poveikį DBA/2 pelėse, pelių periferinis kraujas automatiniu CBC analizatoriumi buvo tiriamas praėjus 48 val. po 15 mg/kg vaisto injekcijos į retro-orbitalinį rezginį.

Vertinant DBA/2 pelių kraujo hemoglobino (HGB), trombocitų (PLT) ir granulocitų (GR) kiekį, vidutinio eritrocitų (MCV) ir trombocitų (MPV) tūrio bei eritrocitų (RDW) ir trombocitų (PDW) pasiskirstymo ploto rodiklius skirtingomis sąlygomis veiktą vaistą gautų pelių kraujyje jokių reikšmingų skirtumų nenustatyta.

Priešingai, praėjus 48 val. po šviežio doksorubicino suleidimo nustatytas reikšmingas leukocitų, limfocitų ir monocitų sumažėjimas palyginus su kontrole. Leukocitų, limfocitų ir monocitų skaičius kontrolinėse pelėse buvo atitinkamai $7,30 \pm 0,59*10^9$ /L, $5,20 \pm 1,43*10^9$ /L,

 $1,33 \pm 0,38*10^{9}$ /L. Po Dox injekcijos šie rodikliai atitinkamai sumažėjo iki $2,8 \pm 0,65*10^{9}$ /L (p < 0,0001, n = 5), $1,86 \pm 0,59*10^{9}$ /L (p = 0,0131, n = 5) ir $0,58 \pm 0,33*10^{9}$ /L (p = 0,0204, n= 5).

Reikšmingas limfocitų ir monocitų sumažėjimas nei po Dox-120, nei po Dox-365 injekcijos nebuvo nustatytas. Monocitų ir leukocitų skaičiaus kraujyje sumažėjimas rodo išliekamąjį mielosupresinį aktyvumą (29 pav.).

Pelių, kurioms buvo suleistas dox-120, buvo nustatytas tik leukocitų sumažėjimas. Praėjus 48 val. po vaisto injekcijos leukocitų kiekis sumažėjo nuo $7,3 \pm 0,59*10^9$ /L iki $4,66 \pm 1,9*10^9$ /L (p = 0,0332, n = 5). Nei limfocitų, nei monocitų reikšmingo (p < 0,5) kiekio sumažėjimo nebuvo nustatyta.

Ilgą laiką (365 dienas) 37 °C temperatūroje laikytas doksorubicinas prarado mielosupresinį aktyvumą ir leukopenijos nesukėlė. Praėjus 2 dienoms po dox-365 injekcijos leukocitų sk. pelių kraujyje buvo 7,1 \pm 1,4*10⁹/L (p = 0,8324). Reikšmingas limfocitų sumažėjimas šiose pelėse po dox-365 injekcijos taip pat nebuvo nustatytas.

Vertindami liposominio doksorubicino mielosupresinį efektyvumą 48 val. po vaisto injekcijos DBA/2 pelėms nustatėme, kad liposominio doksorubicino Caelyx DBA/2 pelių kraujo rodikliams daug silpnesnis nei laisvo doksorubicino atveju. Praėjus 48 val. po 15 mg/kg Caelyx injekcijos, buvo nustatytas minimalus, nors reikšmingas leukocitų sumažėjimas nuo 7,3 \pm 0,59*10⁹/L iki 6,0 \pm 0,66*10⁹/L (p = 0,0113). Dox atveju leukocitų skaičius sumažėjo iki 2,8 \pm 0,65*10⁹/L (p < 0,0001) (30 pav.).



29 pav. Sisteminio hematologinio dox, dox-120 ir dox-365 poveikio vertinimas po 48 val. po injekcijos (15 $mg/kg \ dozė$) DBA/2 pelėms (n = 5)

Nustatyti reikšmingi leukocitų (WBC) kiekio skirtumai po Dox ir Dox-120 injekcijų, limfocitų (LY) ir monocitų (MO) skaičiaus sumažėjimas po Dox injekcijos. Dox-365 leukopenijos nesukėlė. Kontrolė – Dox injekcijos negavusios DBA/2 pelės. Apdorota GraphPad Prism 9 programa. *p < 0,5, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001

Fig. 29. Evaluation of systemic haematological effects of dox, dox-120 and dox-365 48 h after IV 15 mg/kg Dox injection into DBA/2 mice (n = 5)

Significant decrease of leukocyte (WBC) counts was observed after Dox and Dox-120 injections. A reduced number of lymphocytes (LY) and monocytes (MO) was observed only after fresh Dox injection. Dox-365 had no myelosuppressive effect. 'Kontrole' – untreated DBA/2 mice. GraphPad Prism 9 software was used for data analysis. *p < 0.5, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

WBC



30 pav. Sisteminis hematologinis poveikis praėjus 48 val. po 15 mg/kg Dox ir Caelyx suleidimo DBA/2 pelėse (n = 5) Nustatytas leukocitų sk. sumažėjimas nuo 7,30 ± 0,59*10°/L iki 2,8 ± 0,65*10°/L (p < 0,0001) po Dox injekcijos. Po Caelyx injekcijos leukocitų sk. sumažėjo iki 6,0 ± 0,66*10°/L (p = 0,0113). Hemoglobino

(HGB), trombocitų (PLT) kiekio pokytis nenustatytas nei po Dox, nei po Caelyx injekcijos. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

Fig. 30. Systemic haematological effects 48 h after IV 15 mg/kg Dox and Caelyx injection into DBA/2 mice (n = 5)

A significant decrease of leukocyte count from $7.30 \pm 0.59 \times 10^9/L$ to $2.8 \pm 0.65 \times 10^9/L$ (p < 0.0001) after Dox injection was observed. After injection of Caelyx the number of leukocytes decreased to $6.0 \pm 0.66 \times 10^9/L$ (p = 0.0113). No change in haemoglobin (HGB), platelet count (PLT) was observed after either Dox or Caelyx injection. p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001, p < 0.001

3.3.9. Apibendrinimas

Trumpalaikė (15 dienų) doksorubicino (Dox-15 d.) inkubacija 37 °C temperatūroje neturėjo jokio poveikio stabilumui. Vaisto sugerties ir fluorescencijos spektrai, susikaupimas SL2 ląstelėse, mielosupresinis selektyvumas nesiskyrė nuo šviežio doksorubicino. Tuo tarpu vertinant vidutinės trukmės (120 dienų) 37 °C poveikį doksorubicinui (dox-120d.) HPLC metodu, nustatytas pagrindinės smailės chromatogramoje ties 11,15 min. 16,8 k. sumažėjimas rodo, nors, mažesnį, bet išlikusį pagrindinį junginį. Papildomi pikai chromatogramoje rodo atsirandančius doksorubicino skilimo degradacijos produktus. Po ilgalaikio (365 dienų) 37 °C temperatūros poveikio doksorubicinas (Dox-365 d.) pasižymėjo silpnesne fluorescencija vandeniniame tirpale ir ląstelėse, prarado mielosupresinį aktyvumą, gebėjimą selektyviai jungtis prie ląstelės branduolio. Remiantis Dox-365 d. sugerties spektrais galima įtarti medžiagos dimerizaciją ir

agregaciją. Poslinkis Ramano spektre palyginus su šviežiu vaistu taip pat nurodo doksorubicino skilimą. Ilgalaikė inkubacija neturėjo jokio poveikio platinos junginių stabilumui. Liposominis doksorubicinas Caelyx pasižymėjo silpnesniu mielosupresiniu aktyvumu ir silpnesniu gebėjimu jungtis prie permeabilizuotų ląstelių DNR lyginant su standartiniu Dox.

REZULTATŲ APTARIMAS

Ikiklinikiniuose farmakokinetiniuose tyrimuose naujų vaistinių junginių kūrimui ir esamų terapinių schemų tobulinimui plačiai paplitęs pelių modelių taikymas. Pelių modeliai – tai patogus būdas vaistų efektyvumui, toksiškumui vertinti, sąveikai su kitais vaistais tirti, jų taikiniams identifikuoti [159]. Ląstelėse sukaupto chemoterapinio vaisto doksorubicino įsisavinimui ir sulaikymui vertinti pasirinkome EL4 ascitinį T limfomos modelį ir ascitinį SL2 T limfomos modelį atitinkamai C57BL6/NCr ir DBA/2 pelėse.

Vertindami chemoterapinio vaisto doksorubicino plazmos koncentracija, nustatėme, kad po suleidimo didžioji doksorubicino dalis dėl didelio pasiskirstymo tūrio [180] pasišalina iš DBA/2 kraujo. Vertinant doksorubicino farmakokinetiką po 15 mg/kg vaisto dozės injekcijos, DBA/2 pelių kraujo plazmoje nustatytas greitas doksorubicino pašalinimas iš kraujo plazmos. Didžiausia nustatyta koncentracija C_{max} buvo lygi 1,33 µg/ml, terminalinė eliminacijos pusėjimo trukmė – 28,8 val., po 72 val. vaisto koncentracija plazmoje buvo žemiau aptikimo ribos. Mūsų duomenys atitinka kitų autorių parodytą didžiausią doksorubicino koncentraciją plazmoje (1-4 µg/ml). Doksorubicino kiekio C57BL6/NCr peliu kraujo plazmoje 60 min. po 15 mg/kg injekcijos vertinimas neparodė jokių vaisto koncentracijos sasajų su terapiniu poveikiu tiriamose pelių grupėse. Tyrimai, analizuojantys vaisto farmakokinetiką, vertina vaisto pokyčius organizme per pirmąsias 24 valandas po injekcijos. Vėlesniu laikotarpiu farmakokinetiniai tyrimai mažai informatyvūs, nes vaisto kraujyje beveik nelieka ir šis "likutinis" vaisto kiekis neturi sąsajų su terapiniu ar pašaliniu poveikiu [14]. Kitokia situacija stebima audiniuose. Yra keletas pranešimų, kad ilgą laiką (daugiau nei 10 metų) sėklidžių vėžiu sergančių pacientų audiniuose, šlapime ir kraujyje buvo randama platinos likučių [15], [19]. Didesnės platinos junginių koncentracijos prieš operaciją paimtuose biopsijos mėginiuose buvo siejamos su geresniais pacientų, sergančių nesmulkialąsteliniu plaučių ar šlapimo pūslės vėžiu, gydymo rezultatais [16], [32]. Remiantis 2017 metais Wang ir kolegu atliktais tyrimais, kurių metu buvo naudojamos radioaktyvios vaisto mikrodozės (1/100 terapinės dozės), taikant masių spektrometrijos metodą nustatyta, kad susidarę radioaktyvios [¹⁴C]karboplatinos-DNR aduktai koreliavo su cisplatinos ir karboplatinos citotoksiniu poveikiu tirtose nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ląstelių linijose [94]. Šis tyrimas nuteikia optimistiškai, bet pats metodas nėra lengvai įgyvendinamas klinikinėje praktikoje. Priešingai, chemoterapinio vaisto doksorubicino, kaip ir kitų antraciklinų, susikaupimas leukocituose dėl jų fluorescuojančių savybių gali būti tiriamas paprastu tėkmės citometrijos metodu.

Doksorubicino viduląstelinės koncentracijos stebėjimas, farmakokinetinių parametrų vertinimas būtų daug lengviau pritaikomas metodas klinikinėje praktikoje lyginant su platinos turinčiais junginiais. Nustatyta, kad šio vaisto susikaupimas audiniuose iki 100 kartų didesnis palyginus su didžiausia vaisto koncentracija plazmoje [14].

Tirdami C57BL/NCr pelių EL4 limfomos modelį parodėme, kad, priešingai nei plazmoje, būtent ląstelėse sukaupto chemoterapinio vaisto doksorubicino kiekis ir jo sulaikymo trukmė tiesiogiai koreliavo su terapiniu vaisto efektyvumu ir gydymo atsaku. Tokios pačios 15 mg/kg doksorubicino dozės suleidimas 3-ą dieną po 5*10⁴ EL4 ląstelių implantacijos lėmė reikšmingai didesnį vaisto susikaupimą pilvaplėvės ertmės ir naviko ląstelėse 60 min. po injekcijos, lėtesnį pašalinimą ir didesnį AUC_{0-10d} palyginus su vaisto suleidimu 5-ą ar 9-ą dieną. Vaisto farmakokinetikos naviko ląstelėse vertinimas parodė, kad 3 dieną gavusių ("išgydytų") pelių grupė pilnai išgijo, 9 dieną Dox gavusių ("atsparių") pelių išgyvenamumas nesiskyrė nuo negydytų pelių grupės, o 5 dieną suleista dox dozė lėmė tarpinius išgyvenamumo rezultatus ("atkryčio" grupė). Skirtumai buvo vertinami tik ankstyvojoje avaskulinėje fazėje (nuo 3 iki 9 dienos po naviko ląstelių suleidimo), nes vėlyvosios stadijos navikai pasireiškia hemoraginiu ascitų tūrio didėjimu, lemiančiu sisteminį toksiškumą.

Nedidelis EL4 ląstelių skaičiaus ir ląstelių tankio padidėjimas ankstyvojoje avaskulinėje fazėje (1–9 dienomis) lėmė reikšmingą doksorubicino AUC_{0-10d} sumažėjimą ir atsako į gydymą pablogėjimą.

Sumažėjęs doksorubicino įsisavinimas esant didesniam naviko ląstelių tankiui pelių pilvaplėvės ertmėje gali būti paaiškintas inokuliaciniu efektu (anglų k. *inocular effect*), aprašytu Kobayashi ir kolegų 1992 metais. Autoriai parodė, kad doksorubicino ir vinikristino citotoksinis poveikis silpnėjo didėjant ūminės limfoblastinės leukemijos (ALL) ląstelių linijos Molt-3 ląstelių skaičiui *in vitro* [181]. Neigiamos ląstelių skaičiaus ir vaisto citotoksinio poveikio sąsajos parodytos tiriant kito antraciklino daunorubicino efektyvumą leukemijos ląstelių linijos HL60 tyrimuose [38] ir tyrimuose su chemoterapiniu vaistu paklitakseliu [39] *in vitro*. Neigiama koreliacija tarp leukocitų skaičiaus ir plazmos daunorubicino koncentracijos taip pat parodyta *in vivo* [13]. Nepaisant minėtų tyrimų, siejančių naviko dydį ir vaisto poveikį, šiuolaikinė koncepcija daugiau dėmesio skiria genetinėms vėžio mutacijoms. Pavyzdžiui, bloga ūmine leukemija sergančių pacientų su dideliu leukocitų skaičiumi gydymo prognozė, teigiama, yra nulemiama didesniu mutacijų skaičiumi, lemiančiu ligos agresyvumą [182]. Su bloga chemoterapinio gydymo

prognoze taip pat siejami daugiavaisčio atsparumo baltymai [4], dėl kurių vyksta chemoterapinių vaistų pašalinimas (*efflux*). Pavyzdžiui, MDR1 padidėjusi raiška svarbi pradiniam ir įgytam chemoterapiniam atsparumui [183]. Mūsų tyrime su EL4 limfomos modeliu vaisto pašalinimas iš naviko ir pilvaplėvės ertmės ląstelių vyko gana pastoviu greičiu ilgesnį laiką *in vivo*. Naviko dydis ir tankis pelių pilvaplėvės ertmėje buvo vieninteliai veiksniai, kurie turėjo įtakos doksorubicino susikaupimui, sulaikymui, ląsteliniam AUC. Šis reiškinys galėtų būti paaiškintas inokuliaciniu efektu *in vivo*.

Nors EL4 limfomos ląstelių skaičius eksperimento metu didėjo eksponentiškai, naviko ląstelių masė terminalinėje stadijoje sudarė tik 0,2 g. Šis padidėjimas nebuvo toks reikšmingas palyginus su gyvūno svorio padidėjimu (plius ~ 13 g) dėl ascitinio skysčio kaupimosi terminalinėje naviko augimo stadijoje, kurį gali lemti kraujagyslių hiperpralaidumas [163], [184]. Skirtingai nuo ascito, panašaus dydžio (0,2 g) solidiniai EL4 navikai pelėms nebuvo mirtini. Ascitiniai navikai auga kaip lastelių suspensija pilvaplėvės skystyje, kai nėra jungiamojo audinio stromos, būdingos kietiems navikams. Paprastai daroma prielaida, kad ascitinis skystis kaupiasi daugiausia dėl padidėjusio kraujagyslių, kurios iškloja serozines ertmes, pralaidumo [163], [184]. Padidėjęs plazmos baltymų pralaidumas progresuojant navikui [184] leidžia tikėtis, kad vėlesnėje naviko stadijoje doksorubicino prasiskverbimas per pilvaplėvės kraujagysles bus padidėjęs. Remiantis tirtu EL4 limfomos modeliu, vaisto susikaupimas didesnių (vėlesnės stadijos) navikų, ląstelėse buvo mažesnis lyginant su mažesnio dydžio (ankstesnės stadijos) navikais. Didesnio dydžio navikai taip pat pasižymėjo padidėjusiu ląstelių tankiu. Per 12 dienų nuo EL4 naviko progresavimo ascitinio skysčio tūris padidėjo 48,5 karto (nuo 0,2 ml iki 9,7 ml), o naviko ląstelių skaičius padidėjo daugiau nei 400 kartu. Navikinių lastelių tankis pilvaplėvės ertmėje padidėjo apie 10 kartų greičiau nei pelių svoris ar ascito tūris. Keleto publikacijų duomenimis, individuali doksorubicino kinetika kraujyje gali būti svarbiu veiksniu, apsprendžiančiu ne tik terapinį efektą, bet ir vaisto mielotoksiškumą, kardiotoksiškumą, ar sąveiką su kitais kartu naudojamais preparatais.

EL4 limfomos modelyje, priešingai nei viduląstelinis doksorubicinas ir jo ląstelinis AUC, vaisto sukeliamas sisteminis poveikis nekoreliavo su terapiniu efektyvumu ir naviko atkryčiu. Visoms tirtoms C57BL6/NCr pelėms praėjus 48 val. po 15 mg/kg doksorubicino injekcijos buvo nustatytas reikšmingas leukocitų, limfocitų ir monocitų skaičiaus sumažėjimas palyginus su kontrole. Nepriklausomai nuo EL4 naviko dydžio ir tankio vaisto suleidimo dieną, vaisto mielosupresinio poveikio skirtumų pelių grupėse nebuvo nustatyta.

Dažnai siūloma mielosupresinį toksiškumą vertinti kaip tinkamą rodiklį efektyviai vaisto dozei nustatyti [74], [78]. Visgi gauti duomenys rodo, kad doksorubicino gebėjimas sukelti mielosuspresiją, priešingai nei jo sulaikymas audiniuose, neturėjo jokių sąsajų su terapiniu poveikiu mūsų tyrime.

Viduląstelinio doksorubicino pašalinimas tiesiogiai koreliavo su vėžio recidyvu tirtame EL4 limfomos modelyje. Dėl to vaisto susikaupimo naviko ląstelėse galėtų būti daug tikslesnė priemonė nei hematologinis toksiškumas. Tikėtina, kad antraciklinų stebėjimas limfocituose tėkmės citometrijos metodu dėl junginių fluorescencinių savybių bei metodo atlikimo patogumo galėtų būti naudingas klinikinėje praktikoje gydymo atsakui įvertinti. Tiesa, reiktų įvertinti, ar vaisto koncentracija limfocituose yra patikimas rodiklis vaisto koncentracijos naviko audinyje vertinimui. Visgi gana džiuginančiais atrodo platinos-DNR leukocituose aduktų tyrimai, paremti prielaida, kad leukocitų-platinos aduktų susidarymas periferinio kraujo mėginiuose atspindi vaisto kaupimosi paciento audiniuose profilį [185]–[187]. Šie tyrimai parodė teigiamas šių aduktų kiekio sąsajas su chemoterapijos atsaku į platinos preparatus [185]–[190]. Visgi nepaisant optimistinių rezultatų, platinos-DNR kompleksų vertinimas dėl savo specifinės metodikos naudojant radioaktyvius platinos junginius yra sudėtingiau įgyvendinamas klinikinėje praktikoje nei tyrimai naudojant tėkmės citometriją.

C57BL6/NCr pelių EL4 limfomos modelyje, įvertinę ląstelių kiekio ir tankio sąsajas su doksorubicino įsisavinimu ir sulaikymu ląstelėse bei šių rodiklių sąsajas su gydymo atsaku, iškėlėme hipotezę, kad audiniuose sukauptas citotoksinis vaistas galėtų būti susijęs su vėžinių ląstelių palaikymu "ramybės" (*dormancy*) būsenoje ir remisijos po chemoterapinio trukme. Siekiant įvertinti, kaip atitinkamo doksorubicino kiekio susikaupimas ląstelėse su jų proliferacijos slopinimu ir gebėjimu atsinaujinti, buvo sukurtas specialus dviejų žingsnių ramybės/atsinaujinimo *in vitro* \rightarrow *in vivo* TSDR modelis, paremtas trumpalaike (iki 30 min.) SL2 T limfomos ląstelių inkubacija su skirtingomis doksorubicino koncentracijomis ir jų tolesniu vertinimu *in vivo* DBA/2 pelių pilvaplėvės ertmėje.

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad SL2 limfomos ląstelės, iš anksto inkubuotos su 10 μ g/ml Dox koncentracija, prarado gebėjimą proliferuoti DBA/2 pelėse. Mažesnės šio vaisto koncentracijos (0,05–1,0 μ g/ml) nebuvo pakankamos naviko ląstelių sulaikymui "ramybės" būsenoje. 10 μ g/ml doksorubicino koncentracija, atrodo, gana didelė ir gali kelti tam tikrų abejonių dėl pritaikymo klinikoje. Mūsų parodyta veiksminga 10 μ g/ml Dox koncentracija plazmoje nebuvo pasiekta. Didžiausia plazmos doksorubicino koncentracija tyrimų metu siekė 1,33 μ g/ml. Šis rezultatas prilyginamas kitų autorių duomenims, kurių metu nustatyta didžiausia doksorubicino koncentracija C_{max}siekė 1–4 μ g/ml. Reiktų pažymėti, kad dėl techninių apribojimų ir patogumo anksčiausias pasirinktas laiko momentas citostatiko koncentracijos vertinimui buvo 5 minutės po vaisto suleidimo, dėl to techniškai nėra galimybės įvertinti, ar ankstesniu momentu, pvz. per pirmas 5 s po injekcijos, kai vaisto kiekis plazmoje didžiausias, 10 μ g/ml koncentracija plazmoje nebuvo pasiekta. Pasirinkta 10 μ g/ml doksorubicino koncentracija taip pat buvo naudojama kitų autorių tyrimuose, kuriuose buvo vertinamas 5 dienų trukmės vaisto poveikis MCF-7 krūties vėžio ląstelių linijai [191]. Net 100 kartų didesnės doksorubicino koncentracijos buvo naudotos klinikinėje praktikoje ir buvo laikomos saugiomis. Pavyzdžiui, 1000 µg/ml doksorubicino koncentracija buvo taikyta šlapimo pūslės karcinomos gydymui 60–120 minučių lašinant vaistą tiesiai į šlapimo pūslę [192], o iki 1500 µg doksorubicino turinčios injekcijos (vienam akies vokui) buvo naudojamos blefarospazmui gydyti [22]. Darbe taikytą 30 minučių 10 µg/ml Dox poveikį galima būtų laikyti saugiu.

Vertinant net tik absoliutų doksorubicino kiekį, bet ir poveikio trukmę, buvo vertinamas plotas po vaisto koncentracijos kreive AUC. Apskaičiuotas Dox AUC_{0-0,5} SL2 ląstelėse dėl trumpos ląstelių inkubacijos su vaistu buvo lygus 5,0 μ g*h/ml ir nebuvo daug didesnis nei apskaičiuotas plazmos doksorubicino AUC₀₋₇₂ (3,6 μ g*h/ml) po 15 mg/kg injekcijos.

Panašūs tyrimai taip pat buvo atlikti su SUM159 krūties vėžio ląstelių linija *in vitro*, kai buvo taikyta 48 valandų inkubacija ir 1 µg/ml doksorubicino koncentracija [24]. Mes savo tyrimams pasirinkome 0,05–10 µg/ml Dox koncentracijas ir trumpesnę 30 min. inkubaciją, nes tokia trukmė labiausiai atitinka vaisto plazmos farmakokinetiką *in vivo*. Be to, autoriai [24] 48 val. inkubaciją savo tyrime vykdė tik *in vitro*, kur deguonies prisotinimas, pH, ląstelių tankis, vaisto šalinimo ypatumai ir kiti parametrai skiriasi nuo fiziologinių sąlygų. Šiame darbe naudotas sukurtas dviejų žingsnių ramybės/atsinaujinimo modelis TSDR turi pranašumų, kadangi jis yra paremtas su vaistu preinkubuotų ląstelių suleidimu pelėms ir tolesniu viduląstelinio doksorubicino vertinimu terapiniam efektyvumui būtent *in vivo*. Klinikinėje praktikoje pasiūlytas TSDR modelis galėtų būti patogi priemonė papildomam efektyvios chemoterapinio vaisto dozės įvertinimui, pavyzdžiui, nustatyti efektyvią doksorubicino dozę urotelio karcinomų gydymui prieš suleidžiant vaistą savaime irstančiais (biodegraduojamais) [23] kateteriais į šlapimo takus. Ši sistema taip pat tiktų ne tik kaip doksorubicino, bet ir bet kokio kito citotoksinio vaisto, efektyvios koncentracijos įvertinimo priemonė.

Kiti autoriai pažymi priešvėžinių vaistų gebėjimą išsilaikyti audiniuose mėnesius ar net metus po pasibaigusios chemoterapijos [15], [16], [103], [175]. Remiantis literatūra, ilgalaikis citotoksinių vaistų, įskaitant doksorubiciną, susilaikymas audiniuose yra siejamas su šalutiniais reiškiniais, tokiais kaip neurotoksiškumas, kardiotoksiškumas, spengimas ausyse ir kt. [15], [58], [103], [193], [194]. Visgi ilgalaikis vaisto audiniuose sulaikymas galėtų būti svarbus veiksnys, nulemiantis naviko ląstelių buvimą "ramybės" (*dormancy*) būsenoje, jų proliferacijos slopinimą, ilgesnę remisiją. Užsilaikę audiniuose, citostatikai turėtų būti veikiami fiziologinių organizmo sąlygų (žmogaus kūno temperatūra, fermentai, pH svyravimai ir kt.). Kad imituotume fiziologinės žmogaus kūno temperatūros poveikį audiniuose sukaupto vaisto stabilumui ir citotoksiniam aktyvumui, vertinome ilgalaikės (iki 365 dienų) inkubacijos 37 °C temperatūroje įtaką doksorubicinui. Remiantis gautais rezultatais, trumpalaikė (2 savaičių) inkubacija 37 °C temperatūroje neturėjo jokio poveikio doksorubicino stabilumui. Vidutinės (120 dienų) trukmės inkubacija 37 °C temperatūroje jau lėmė produkto tam tikrą degradaciją (naujų pikų, nebūdingų šviežiam doksorubicinui, HPLC chromatogramoje atsiradimas). Pagrindinis doksorubicino pikas, nors 16,8 k. mažesnis, rodė dar išlikusį nedidelį pagrindinio doksorubicino frakcijos kiekį, kuris sudarė apie 5,95 % šviežio doksorubicino kiekio. Šiuo atveju mūsų naudojama 15 mg/kg Dox-120 d. injekcijos dozė sudarytų apie 0,9 mg/kg šviežio doksorubicino kiekį. Visgi net toks nedidelis doksorubicino kiekis sukėlė leukopeniją DBA/2 pelėse. Tai rodo, kad po 120 d. temperatūrinio poveikio vaistas dar išlaiko likutinį mielosupresinį aktyvumą.

Po ilgalaikio (365 dienų) 37 °C temperatūros poveikio doksorubicinas (Dox-365 d.) pasižymėjo silpnesne fluorescencija vandeniniame tirpale ir ląstelėse, prarado mielosupresinį aktyvumą, gebėjimą selektyviai jungtis prie ląstelės branduolio. Remiantis Dox-365 d. sugerties ir fluorescencijos spektrais galima įtarti įvykusią doksorubicino agregaciją ir/ar dimerizaciją. Fluorescencijos signalo sumažėjimą amplitudės sumažėjimą daugiausia lemia statinis/dinaminis gesinimas (anglų k. *quenching*), įskaitant savaiminį, bei monomerų agregacija į ne fluorescuojančius dimerus. Taip pat žinoma, kad agregacija lemia doksorubicino pagrindinės absorbcijos juostos praplatėjimą, reikšmingą hipochromizmą spektro srityje ties 415–540 nm bangos ilgiu ir silpną hiperchromizmą spektrinėje srityje virš 540 nm [177], [195].

Visgi verta paminėti, kad net šviežio doksorubicino hidrochlorido 10 µM (apie 5,4 µg/ml) PBS tirpale gali spontaniškai susidaryti farmakologiškai neaktyvūs dimerai [177].

Poslinkis Ramano spektre palyginus su šviežiu vaistu taip pat nurodo doksorubicino skilimą. Skirtingai nuo doksorubicino ir kitų antraciklinų, tirti platinos junginiai pasižymėjo išskirtiniu stabilumu. Karboplatinos Ramano spektrai prieš ir po 37 °C temperatūros poveikio buvo visiškai identiški. Po 6 metų palaikymo RT (kambario temperatūroje) cis-platina pasižymėjo identišku spektru kaip ir šviežias vaistas. Platinos (Pt) junginiai organizme išlieka iki 20 metų po gydymo nutraukimo [15]. Platina, randama pooperacinėje medžiagoje iki 72 dienų po neoadjuvantinės chemoterapijos pabaigos, tiesiogiai koreliavo su geresniu skrandžio vėžiu sergančių pacientų gydymo atsaku [173]. Nustatytas ryšys tarp ilgalaikės Pt cirkuliacijos ir ilgalaikių vėlyvesnių vaisto šalutinių poveikių, pavyzdžiui, parestezijos, hipogonadizmo, padidėjusio MTL cholesterolio kiekio ir hipertenzijos [19]. Ilgalaikis organizme esančių platinos junginių poveikis gydymo veiksmingumui *in vivo* kitų autorių nebuvo tirtas. Platinos junginių stabilumas net po ilgalaikio kūno temperatūros poveikio galėtų būti svarbus veiksnys potencialiam vaisto panaudojimui lokaliai terapijai.

Kadangi visų tirtų citotoksinių junginių stabilumas vertintas tik po *in vitro* temperatūros poveikio laikant juos originalioje pakuotėje, negalime atmesti galimybės, kad su DNR interkaliuoti antraciklinai fiziologinėmis žmogaus kūno temperatūros sąlygomis galėtų geriau

išlaikyti antiproliferacinį aktyvumą nei laikomi originalioje pakuotėje *in vitr*o. Teoriškai su DNR susijungęs doksorubicinas neturėtų formuoti neaktyvių agregatų. Dėl to ateityje būtų prasminga vertinti audiniuose sukauptų vaistų stabilumą ir antiproliferacinį veiksmingumą.

Taip pat reiktų paminėti, kad šio darbo tikslas buvo ne susidariusių po doksorubicino degradacijos produktų identifikavimas, bet būtent bendras likutinio stabilumo, mielotoksinio aktyvumo vertinimas. Dėl šios priežasties šalutiniai doksorubicino produktai nebuvo nustatinėjami.

Selektyvesniam antraciklinų pateikimui vėžio ląstelėms daug dėmesio buvo skirta specifinių vaistinių medžiagų nešiklių sukūrimui [196]. Liposomos yra labiausiai ištirtos vaistinių preparatų pernašos sistemos, naudojamos klinikinėje praktikoje onkologinių ligų gydymui.

Pegilintas liposominis doksorubicinas Caelyx patvirtintas 1995 m., yra taikomas Kaposi sarkomos ir atsinaujinančio kiaušidžių vėžio gydymui. Lyginant su laisvu doksorubicinu, vaistas pasižymi mažesniu pasiskirstymo tūriu V_d, ilgesne eliminacijos pusėjimo trukme t_{1/2}, dėl to ilgiau cirkuliuoja kraujotakoje [146]. Visgi Caelyx nėra plačiai taikomas klinikinėje praktikoje, kaip buvo tikėtasi iš pradžių. Vykdant liposominio doksorubicino Caelyx fluorescenciją SL2 ląstelėse nustatytas 19,7 karto mažesnis vaisto įsisavinimas lyginant su laisvo doksorubicino (Dox) susikaupimu tiek gyvose, tiek permeabilizuotose ląstelėse. Liposominis Caelyx jungiasi silpniau prie degradavusios DNR permeabilizuotose ląstelėse ir pasižymi mažesniu mielotoksiniu aktyvumu lyginant su šviežiu Dox. Įdomu, kad Caelyx buvo vienintelis iš tirtų antraciklinų, kurio nustatyta fluorescencija gyvose ir permeabilizuotose ląstelėse buvo stipresnė po ilgalaikio temperatūros poveikio nei šviežio vaisto. Nustatytas Caelyx fluorescencijos intensyvumo padidėjimas po ilgalaikio temperatūrinio poveikio galėjo būti nulemtas laisvo doksorubicino išėjimu iš suirusių liposomų. Liposomų suirimas po ilgalaikio temperatūrinio poveikio matomas gautose elektroninės mikroskopijos nuotraukose.

Nors kai kurių autorių buvo parodytas padidėjęs liposominio doksorubicino įsisavinimas kai kuriuose navikuose lyginant su nelaisva šio vaisto forma [152], kiti tyrėjai nenustatė geresnio liposominio vaisto terapinio poveikio lyginant su paprastu doksorubicinu [153], [154]. Liposominio doksorubicino Caelyx priešvėžinis aktyvumas ir toksiškumas paprastai siejamas tik su jo farmakokinetika kraujyje [166], [167] ir, manoma, nulemtas lėto laisvo Dox ištekėjimo iš pūslelių vaistui cirkuliuojant kraujotakoje. Visgi dėl didelio laisvo doksorubicino pasiskirstymo tūrio iš cirkuliuojančių liposomų ištekėjęs nedidelis vaisto kiekis yra labai greitai pašalinamas iš kraujo. Tuo tarpu naviko mikroaplinkoje, lėtas vaisto ištekėjimas iš pūslelių galėtų netiesiogiai slopinti aktyvų citotoksinio vaisto išmetimą (efluksą – anglų k. *efflux*) iš naviko ląstelių. Tokiu būdu, tikėtina, liposominio doksorubicino priešvėžinis aktyvumas nulemtas ne ilgalaikio vaisto buvimo kraujotakoje, bet lėtu vaisto ištekėjimu audiniuose jau pasibaigus chemoterapijai.

IŠVADOS

- Didesnis naviko dydis ir vėžinių ląstelių tankis vaisto suleidimo dieną lėmė blogesnį doksorubicino įsisavinimą pilvaplėvės ertmės (PerC) ir naviko ląstelėse bei reikšmingai mažesnį AUC. Blogesnis doksorubicino įsisavinimas ir trumpesnis sulaikymas ląstelėse tiesiogiai koreliavo su naviko atkryčiu ir ligos progresavimu EL4 modelyje.
- Nei naviko dydis, nei vėžinių ląstelių tankis vaisto suleidimo dieną neturėjo įtakos doksorubicino plazmos farmakokinetikai ir sisteminei mielosupresijai. Doksorubicino sukeliamo sisteminio mielotoksinio poveikio sąsajos su terapiniu efektyvumu nenustatytos.
- SL2 ląstelės, inkubuotos su 10 μg/ml Doksorubicinu, pilnai prarado gebėjimą proliferuoti DBA/2 pelėse, tuo tarpu kai mažesnės (0,05–1,0 μg/ml) Dox koncentracijos nebuvo veiksmingos.
- Dėl ilgalaikio žmogaus fiziologinės kūno temperatūros poveikio sumažėja chemoterapinio vaisto doksorubicino stabilumas, mielotoksinis ir antiproliferacinis efektyvumas, gebėjimas selektyviai prisijungti prie branduolio struktūrų.
- 5. Liposominio chemoterapinio vaisto doksorubicino Caelyx įsisavinimas gyvose ir permeabilizuotose ląstelėse, priešingai nei laisvo doksorubicino atveju, po ilgalaikio žmogaus fiziologinės kūno temperatūros poveikio didėjo, galimai dėl liposomų irimo.

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Introduction

Doxorubicin (Dox) is one of the anthracycline antibiotics widely used in the treatment of breast, ovarian, prostate, brain, pancreatic, lung cancer, as well as acute lymphocytic leukaemia and myelogenous leukaemia and Hodgkin's lymphoma [1]. Although the drug has excellent cytostatic efficacy in both haematological and solid tumours the severe side effects of doxorubicin and the frequent development of resistance to chemotherapy limit its applicability in oncology [2], [3]. The most frequently mentioned factors causing chemotherapeutic resistance are the multidrug resistance proteins MDR1, MRP1, BCRP [4]; increased expression of oncogenes that inhibit cellular apoptosis and promote proliferation, the ability of the tumour to elicit an immune response, stimulate angiogenesis, etc. [5]. According to other studies, the anticancer drugs showed reduced uptake and cytotoxicity as cell density increased. This process, first observed in vitro, is called the 'inocular effect' [6], [7]. This phenomenon could lead to increased treatment resistance in acute leukaemia with elevated leukocyte counts. In this case, higher therapeutic doses could be expected to lead to better therapeutic results. Unfortunately, the influence of chemotherapeutic dose and plasma concentrations on the response to treatment is not sufficiently understood [33]. Higher plasma concentrations do not necessarily lead to higher tumour uptake or better response to treatment. The application of therapeutic drug monitoring (TDM), which is successfully used in clinical practice to individualize doses for various drugs, is very limited in oncology [10], [33]. The widely used body surface area (BSA) based drug calculation method does not take into account the individual characteristics of the elimination of the cytostatic agents from the body, which may lead to overdose or underdosing. As a result, patients' plasma concentrations can vary by a factor of 10 to 100, even though patients receive the same dose per m^2 . [11]-[13] The situation is exacerbated by the large volume of distribution and short plasma elimination half-lives of cytotoxic compounds, which result in rapid plasma clearance and tissue accumulation at much higher than peak plasma concentrations [12], [14]. In the case of platinum compounds, tissue uptake up to 20 years after completion of treatment is associated with longer remission duration and better survival in non-small

cell lung cancer patients [15], [16]. Not only the amount of drug accumulated in the tissues but also its retention time in the tissues is considered to be important. In this case, the calculation of the area under the tissue concentration-time curve (AUC) could be an important criterion for evaluating the efficacy of chemotherapy. Ascites tumour models could be a convenient tool to evaluate the uptake of the chemotherapeutic drug doxorubicin, its retention time and to look for correlations with the therapeutic efficacy and tumour recurrence. The identification of such correlations would allow to development of the monitoring of drug uptake and its accumulation in tumour cells and, if necessary, to adjust the treatment regimen or dose. Studies of the long-term effects of temperature on the stability of doxorubicin would help to assess the effect of physiological temperature on the ability of the drug accumulated in tissues to inhibit cancer cell proliferation and tumour recurrence after a long period of remission.

AIM AND TASKS

The aim of this dissertation was to investigate the role of the cytotoxic drug doxorubicin uptake and retention in the development of chemotherapeutic resistance and tumour recurrence in mouse lymphoma models.

To achieve this goal, the following tasks were set:

- To determine the influence of tumour size and cell density and the duration of doxorubicin uptake and retention time in the tumour cell of the experimental mouse lymphoma cell line as well as to evaluate the correlations between these parameters and tumour recurrence and resistance to chemotherapy
- To determine the influence of tumour size and cell density on the systemic effect of doxorubicin in the experimental mouse lymphoma cell line and to evaluate the correlations between this effect and the effectiveness of chemotherapy
- To evaluate the correlations between intracellular doxorubicin concentration and tumour survival using the designed in *vitro* → *in vivo* TSDR two step dormancy/recurrence experimental mouse lymphoma cell line model

- 4. To evaluate the long-term effect of physiological human body temperature on the stability, myelosuppressive and antiproliferative activity of the chemotherapeutic drug doxorubicin
- 5. To evaluate the myelosuppressive activity and accumulation of liposomal doxorubicin Caelyx in living and permeabilized cells before and after long-term exposure to physiological human body temperature

STATEMENTS

- 1. Even a small increase in the number and density of cancer cells results in a significant deterioration in the uptake, retention time, and response to treatment of the chemotherapeutic drug doxorubicin. Drug uptake in cells of tumours with increased size or density is significantly worse compared to smaller tumours.
- 2. The local uptake of doxorubicin and the duration of its retention in tumour cells, in contrast to its systemic effects, correlate with the therapeutic efficacy of the drug and tumour recurrence.
- 3. The long-term effect of physiological human body temperature results in a decrease of the myelosuppressive and antiproliferative activity of free chemotherapeutic drug doxorubicin and significantly reduces the drug capability of selective binding to the cell nucleus. In contrast to liposomal doxorubicin, the fluorescence of free doxorubicin decreases significantly after long-term exposure at human body temperature.
- 4. Compared to free doxorubicin, cellular uptake of the liposomal chemotherapeutic drug doxorubicin is slower. The liposomal doxorubicin is likely to exhibit its antiproliferative effect during drug retention in tissues after the cessation of chemotherapy rather than the long-term presence in the circulation.

NOVELTY

In this work, the influence of the AUC (area under the concentration curve) of the chemotherapeutic drug doxorubicin on tissue chemotherapeutic efficacy was investigated for the first time. Previous studies have been limited to detecting changes in plasma.

According to many authors, high levels of doxorubicin may accumulate in tissues and persist there for a long time, even 8-240 days, after the cessation of treatment [17]. Tissuebound doxorubicin levels may reach up to 550-fold drug amount compared to plasma [18], [19]. However, the effect of this drug on tissue AUC to therapeutic efficacy or side effects has not been previously studied to the author's knowledge.

The stability of the chemotherapeutic drug doxorubicin has been studied under a variety of conditions: hydrolysis, peroxide oxidation at 80°C, photolysis, microwave irradiation [22], [23]. To the author's knowledge, the long-term (365 days) effect of human body temperature on doxorubicin stability has not been evaluated.

A special *in vitro* \rightarrow *in vivo* TSDR (two-step dormancy/recurrence) model was developed to evaluate the association of doxorubicin accumulation in cells with tumour recurrence. In contrast to other authors [24], our model is based on short-term (up to 30 min) incubation of tumour cells with the chemotherapeutic drug and the further evaluation of these cells not *in vitro*, but *in vivo* in the peritoneal cavity of mice.

BACKGROUND

Therapeutic drug monitoring

Nowadays it is important to change the existing treatment practice while all patients are provided with a uniform, strictly standardized treatment algorithm. Unquestionably, new modern techniques which will enable the accessibility of individualized treatment regimen for each patient is necessary. Therapeutic drug monitoring (TDM), the process of measuring and monitoring the amount of a drug in the blood or plasma to individualize the dosage and/or schedule to improve the efficacy of the drug as well as to reduce its possible side effects, has already revealed its importance in monitoring the course of treatment of various diseases. For instance, since its introduction to clinical practice in the 1960s TDM has played an important role in providing valuable guidance for the dose adjustment for several classes of drugs, including antibiotics, antiepileptics, antiviral HIV treatment and immunosuppressive agents [10]. It is therefore difficult to explain why TDM is not practically used in oncology monitoring of cytotoxic drugs [9] while

cytotoxic agents meet the features, required for TDM application such as narrow therapeutic index and a wide pharmacokinetic variability among individuals.

Perhaps the obstacle for limited TDM use is high heterogeneity of cancer diseases with their different perfusion within the tumour which may impact the drug delivery thus determine the unique patient specific pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) properties. Moreover, the common use of not individual drugs but their combinations complicate the defining of the concentration-effect for individual agent. The active moieties for each drug also should be determined in each case.

Nevertheless, the concentration-effect relationship, which is one of key prerequisites for TDM, is well-defined for several drugs: 5-fluorouracil, mercaptopurine, and methotrexate. The latter remains the only anticancer drug for which TDM is routinely used in clinical practice [81].

Another obstacle for successful TDM application for traditional chemotherapy agents is a relatively short half-life of the drugs and the administration by intermittent intravenous injections. In this setting, in order to accurately define systemic exposure, inconvenient and impractical serial collections of blood samples are required [10].

Although number of limitations for TDM use for anticancer drugs still exist, new modern chemotherapy administration regimens, such as continuous intravenous infusion, allow to reach the steady-state drug plasma concentration (Css) and thus facilitate the calculation of AUC and, as a result, estimate systemic exposure more accurately. The emergence of advanced methods of drug administration allows to expect that in long term TDM will be applied for routine practice. This assumption is supported by a number of studies with 5-fluoruracil showing promising TDM advantages in evaluating systemic drug exposure compared to traditional body surface (BSA)-based method.

In oncological practice, downward dose adjustments are regularly performed, e.g., when severe (haematologic) toxicity has been encountered during a previous chemotherapy course. Furthermore, reductions of doses are also generally made in patients with significant renal or hepatic dysfunction for drugs that are eliminated through these organs. Initial doses may also be decreased in high-risk patients, including elderly, bedridden or heavily pre-treated patients. Guidelines for dose adjustment in these situations are, however, often imprecise and empirical [73], [74], [197]. However, for dosage

individualization based on monitored drug concentrations, well-designed dose adaptation strategies are needed to be able to achieve a predefined target. Different strategies have been developed and can be used to adapt doses during therapy, dependent on the individualized cancer chemotherapy available techniques, computer programs and knowledge and skills of the pharmacokinetics [76].

Chemotherapy resistance

Chemotherapy resistance is one of the main factors leading to worse anticancer treatment outcomes and is associated with a poorer prognosis and a higher risk of death of oncology patients [25]. According to the nature of its occurrence tumour resistance can be acquired, i.e., developed during anti-cancer therapy, or internal, i.e., congenital, cellular resistance [26]. The development of tumour cells resistance to cytostatic agents may be due to gene mutations, increased efflux due to overexpression of multidrug resistance proteins (MDR1, MRP1, BCRP), miRNA, exosomes, cancer-associated fibroblasts (CAF), tumour microenvironment (TME), activation of alternative signalling pathways (Fig. 1).

The concept of 'drug-resistant mutations' has been used since the 1950s [27]. Since then, many cancer-related genes, such as a mutation in the APC (*adenomatous polyposis coli*) gene, associated with persistent polyps and an increased risk of colon cancer [28], [29], KRAS gene as a predictive marker of response to cetuximab in colorectal cancer treatment [29], [30], HER2 oncogene, associated with 20–25% of all breast cancer cases [29], [31]. In solid tumours, resistance to chemotherapy may be due to the inability of the chemotherapeutic drug to penetrate the deeper layers of the tumour. Only superficial doxorubicin uptake was observed in tumour cell spheroids [37]. Similarly, a significant decrease of drug concentration in the central part of the breast tumour has been observed [40]. Solid tumour size has been proposed as a major factor for doxorubicin penetration into deeper tumour layers [37], [40].

Although a majority of cancer resistance studies are focused on genomic factors, mutations are not the only neither key factor determining the tumour cells resistance [58], [59]. Many recent studies have focused on non-genomic factors: drug concentration gradient [40], regions of hypoxia [60], abnormalities in tumour vasculature [61], the abundance of cell debris [62], tumour-induced immunosuppression, and some other

phenomena. It is often assumed that increasing the dose of the drug will result in a more favourable prognosis for chemotherapy. However, the relationship between the administered dose, plasma concentrations and response to treatment is poorly understood [8]. One of the reasons for the ineffectiveness of treatment may be that it is not always possible to ensure adequate access of the chemotherapeutic drug to the tumour tissue. Moreover, a convenient clinical method to evaluate drug uptake and retention in body tissues has not been developed yet. According to other researches, the therapeutic efficacy of doxorubicin of each patient may be determined by the individual pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters, i.e., its individual metabolic rate, elimination efficiency, plasma protein binding, uptake in tumour entry, slow release from surrounding tissues, etc. [40], [60]-[62]. According to several publications, the individual kinetics of doxorubicin in the blood may be an important factor in determining not only the therapeutic effect, but also the myelotoxicity, cardiotoxicity, or drug interaction with other concomitant drugs [1], [63]–[65]. However, tissues show much higher levels of doxorubicin and extremely long retention of drug compared to blood. Despite the many blood AUC studies, the effect of tissue AUC on drug therapeutic efficacy or side effects has not yet been studied.

Local drug therapy strategies

Doxorubicin (Dox, Adriamycin) is one of anthracycline antibiotics, widely used for treating various cancers, in particular breast, ovarian, leukaemia, prostate, brain and lung cancers. In addition, doxorubicin is one of the frontline drugs currently used for adjuvant chemotherapy treatment of advanced breast cancer. Despite all the benefits, doxorubicin is responsible for various serious adverse effects including cardiotoxicity, hepatotoxicity and testicular toxicity.

Local chemotherapy could be an appropriate method to reduce the toxicity of doxorubicin as well as improve the therapeutic effect. Nanoparticles, liposomes, polymeric micelles and polymer conjugates, and other techniques have been used for the more accurate drug delivery to the tumour site. Some of these methods, e.g., paclitaxel-loaded liposomes, were associated with better therapeutic activity. The effectiveness of nanoparticles is achieved due to their ability to circulate in the blood for a long time and their enhanced retention in the tumour microenvironment, caused by the phenomenon, known as Enhanced Permeability and Retention (EPR) [135]–[138]. In order to protect nanoparticles from the reticuloendothelial system and increase their elimination half-life (t_{1/2}) is to coat them with polyethene glycol (PEG) [136], [139], [140]. One well-known example of a pegylated liposome, approved for clinical use, is Doxil® (or Caelyx®), a PEGylated liposome-coated doxorubicin. Caelyx® has shown a longer circulating time compared to free doxorubicin and up to a 60-fold higher plasma AUC compared to the free drug [136], [142]–[144] and was confirmed for the treatment of advanced ovarian cancer, metastatic breast cancer and AIDS-related Kaposi's sarcoma [145].

Murine lymphoma models

One of the key steps in optimizing nanocarrier-based drug delivery systems is the evaluation of drug pharmacokinetics *in vivo* using animal models, especially rats and mice [156], [157]. Mice, as a model organism, are widely used in lymphoma studies to assess disease progression and drug therapeutic efficacy and are the most advanced preclinical technologies for drug development [159]–[161].

S49, A20, BL3750, H11, EL4, cell lines are commonly used for syngeneic lymphoma models, one of the oldest preclinical models in lymphoma studies that allow the assessment of lymphoma in the presence of an intact immune system [161], [162]. Application of murine ascites tumour models is a convenient tool to evaluate the pharmacokinetic/pharmacodynamic properties of chemotherapeutic compounds, e.g., doxorubicin, as well as analyse drug accumulation and elimination patterns and their relationship to treatment efficacy [159].

METHODS

Mice

Female DBA/2 and C57BL/6 mice at the age of 8–14 weeks were obtained from the local breeding facility at the State Research Institute for Innovative Medicine, Vilnius, Lithuania. All animal procedures were performed following the 2010 September 22

Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council on the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63 / EU, 2010). All study protocols were also approved by the Institutional Animal Welfare Committee. Animals had *ad libidum* access to pelleted feed, food supplements, and water. When necessary, mice were sacrificed using cervical dislocation.

Drugs

Doxorubicin hydrochloride (2 mg/ml) was purchased from Ebewe (Unterach, Austria). Daunorubicin hydrochloride (2 mg/ml) was purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Pegylated liposomal doxorubicin hydrochloride Caelyx® (2 mg/ml) (Janssen Pharmaceutical NV, Belgium) was obtained from the hospital pharmacy. Drug stocks were stored following the manufacturer's recommendations or, if it was required, following the experiment design. Drug solutions in the PBS were prepared fresh on the experiment day.

Cells

Syngeneic T cell EL4 lymphoma cell line was purchased from the ATCC (American Type Culture Collection, USA). The SL2 lymphoma cell line was obtained from Utrecht University Medical Centre (The Netherlands).

EL4 and SL2 cells were cultivated in DMEM (*Thermo Fisher Scientific, USA*) or RPMI-1640 (*Thermo Fisher Scientific, USA*) medium respectively. Both media were supplemented with 10% FBS (calf serum), 2 mM L-Glutamine and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin). Cells from both lines were grown in sterile 75 cm² plastic flasks (*Thermo Fisher Scientific, USA*) in a CO₂ incubator with 5% CO₂ at 37°C. Prior to experiments cells were cultured for at least 48 hours to achieve > 90%.

Tumour model and in vivo treatment

On Day 0 of the experiment C57BL/6 or DBA/2 mice were inoculated intraperitoneally (IP) with 0.2 ml of pooled fresh ascitic fluid ($5 \cdot 10^4$ EL4 or $5 \cdot 10^5$ SL2 cells respectively)

under aseptic conditions. If required, before the inoculation cells were preincubated with or w/o different Doxorubicin concentrations for 30 minutes at 37°C.

EL4 lymphoma model

According to the experiment design, intravenous injection of doxorubicin at a dose of 15 mg/kg was given to C57BL/6 tumour bearing mice (TBM) on day 3, day 5 or day 9 after EL4 transplantation. The treatment efficacy of doxorubicin was observed for 60 days. All mice that had survived during this period were considered cured.

SL2 TSDR (two step dormancy / recurrence) lymphoma model

Prior to implantation to DBA/2 mice SL2 cells were incubated for 30 min at 37°C in freshly prepared RPMI-1640 medium, containing different (0.00; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 10 μ g/ml) concentrations of doxorubicin. After the incubation SL2 cells were washed from the medium, suspended with cold saline to a final concentration of 5x10⁵ cells/0.2 ml and injected intraperitoneally (IP) to DBA/2 mice. For control, SL2 cells were incubated in a doxorubicin-free RPMI-1640 medium. All mice that had survived during the 60 days were considered cured.

Immunophenotyping

For Flow Cytometry analysis cell samples containing 10^6 cells per 100 µl of FACS buffer (*Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ 07417, USA*) were prepared. In order to eliminate nonspecific antibody binding, cells were incubated for 20 min at 4°C with anti-CD16/CD32 (Fc γ R III/II) antibody (clone 93) (1 µg/10⁶ cells) and then labelled with the following antibodies: 0.4 µg anti-CD3-APC (clone 17A2); 0.5 µg anti-CD4-FITC (clone GK1.5); 0.5 anti-CD8a-PerCP (clones 53-6.7); 0.02 µg anti-CD44-PE (IM7 clone); 2 µg anti-CD45-Pacific Blue (clone 30-F11). After staining, cells were incubated for 20 minutes at +4°C, washed with FACS buffer and analysed with a FACS-LSRII flow cytometer (*Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA*) and FlowJo v10.7 software (*Tree Star, Ashland, OR, USA*).

Doxorubicin intracellular uptake analysis by flow cytometry

Doxorubicin uptake was analysed using a 488 nm laser. At least 20000 cells per sample were used for the assay. The evaluation of intracellular doxorubicin accumulation was based on the shift of mean channel fluorescence intensity (dMCF). Where necessary, cell apoptosis was confirmed with Annexin V reagent [167]. Data were analysed using FlowJo v10.7 software.

Estimation of total ascites volume

Before sacrifice, mice were weighed on an analytical balance. After cervical dislocation, the peritoneal cavity of the mouse was opened and, after collecting all the liquid with a syringe, gently and thoroughly dried with a cotton sponge and then weighed again to determine the 'dry' body weight. The ascites' fluid content in grams (g) was calculated by subtracting the 'dry' weight from the animal weight before the death and converted to the volume of liquid in millilitres (ml).

Injection into a retro-orbital plexus

Doxorubicin injection into mice was performed according to the methodology described by Yardeni and colleagues [168]. This method is based on the administration of the drug not into the tail vein but into the retroorbital plexus behind the eye of the mouse using 1 ml sterile insulin syringes with an integrated 29G x 12.7 mm needle (*Yangzhou Goldenwell Medical Devices Factory, China*). The procedure was performed using anaesthesia with diethyl ether.

Blood sampling

Blood samples of 125 μ l volume were taken from the retroorbital plexus of treated mice at several time points (5 min, 30 min, 60 min, 6h, 12h, 48h, 72h) after drug administration and collected to EDTA-coated 'Microcuvette' tubes. Each sample was gently inverted several times to ensure complete mixing with EDTA as the anticoagulant. After centrifugation at 5000 x g for 10 min, plasma samples were separated and stored at -20°C until analysis. Complete blood count (CBC) was performed using Hematology Analyzer ABX Micros EV60 (*Horiba, Japan*).

Pharmacokinetics

The intracellular doxorubicin accumulated in the cells from the peritoneal cavity was measured daily for 10 days (240 hours) after drug injection. Measurements of peripheral blood drug content were performed during the 72-hours post-injection period. Data analysis and visualization were performed with GraphPad Prism 9.0.2 and Origin Pro 8.5 Software. The AUC (area under the concentration curve) calculation was based on the Linear Trapezoidal Method (2) using GraphPad Prism 9.0.2 software.

HPLC

HPLC analysis was performed on a Perkin Elmer system consisting of a Flexar binary LC pump, a Kit of Flexar 3-channel vacuum (3 CHNL VAC) degasser, a Flexar LC autosampler and Flexar fluorescence detector (Xenon lamp). The chromatography separation was performed on a Brownlee Bio C18 column (4.6×150 mm, 5 µm particle size, Perkin Elmer, Shelton, USA). Samples were delivered via isocratic flow at a rate of 0.25 mL/min. The column temperature was maintained at 37°C and excitation and emission wavelengths were set at 475 and 555 nm respectively.

The chromatography data were acquired and analysed by Chromera software (*Perkin Elmer, Shelton, USA*).

Confocal microscopy

The localization of the drug in the cells was examined with a Nikon Eclipse TE2000-U C1 Plus laser confocal microscope equipped with a 488 nm argon laser (*Nikon, Japan*) using a 60×1.4 NA objective (*Nikon, Japan*). Cell morphology was assessed by light microscopy. A 515/30 transmittance filter (*Semrock Inc., USA*) was used to determine the fluorescence of fresh (Dox) or thermally exposed drug doxorubicin (Dox-dgr). Fluorescence spectra were analysed both in individual cells and in their internal structures. Fluorescence was measured in specific regions of interest ROI. Images were further processed using EZ-C1 v3.91 (*Nikon, Japan*) and ImageJ v1.53a software (*NIH, USA*). The absorption and fluorescence spectra of 20 µg/ml doxorubicin solution in PBS

were measured with a Varian Cary Win UV (*Varian Inc., Australia*) spectrophotometer and FLS920 spectrofluorometer (*Edinburgh Instruments, Livingston, UK*) and further analysed using Origin 8.5 software.

Transmission electron microscopy (TEM)

For transmission electron microscopy (TEM) analysis, samples were diluted 50x with distilled water. Then 6.5 µl of the sample was directly applied to the Holey carbon-coated copper grid (*Agar Scientific*) and stained with two drops of 2% uranyl acetate (pH 4.5). After drying, samples were examined with Tecnai G2 F20 X-TWIN transmission electron microscope (*FEI, Japan*), operating at 200 kV.

Size analysis by Dynamic light scattering (DLS)

The particle size and size distribution of liposomal doxorubicin Caelyx was measured using dynamic light scattering by a Zetasizer Nano-ZS analyser (*Malvern Panalytical., UK*) operating a 4 mW He–Ne laser. The measurement was performed for 50 seconds at 316,000 photons per second (316.0 kcps) at an average light scattering intensity at 25°C.

Statistical Data Analysis

The chromatographic data were acquired by Chromera software from Perkin Elmer. Flow cytometry results were analysed by BD FACSDiva Software and FlowJoTM 10 Software. Images obtained by confocal microscopy were processed using EZ-C1 v3.91 (*Nikon, Japan*) and ImageJ v1.53a software (*NIH, USA*). OriginPro 8.5 software (*OriginLab Software, USA*) was used to display the data as well as for statistical analysis. Where applicable, quantitative data were presented as a mean \pm standard deviation. The area under the drug concentration curve (AUC) was calculated using the trapezoidal formula (2). For normally distributed data a two-tailed unpaired Student's t-test was used. In other cases, the Mann-Whitney U test was performed. Kaplan-Meier survival curves were plotted using OriginPro 8.5 software to assess survival. The median survival, p-value and hazard ratio (HR) of the tested animals were analysed using OriginPro 8.5 and GraphPad Prism 9.0.2 using the Log-rank test.

For data with normal distribution, statistical significance was determined using a twotailed unpaired Student's t-test. The Kaplan-Meier survival curves and hazard ratios were analysed with a Log-rank test. Statistically significant results in some charts are encoded as *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

RESULTS

Evaluation of the chemotherapeutic drug doxorubicin uptake and retention in EL4 T lymphoma cells and its therapeutic efficacy with tumour size

Survival studies of C57BL6/NCr mice

For doxorubicin uptake and retention analysis, EL4 T cell lymphoma model in female C57BL/6NCr mice was used. According to the experiment design (fig.4), on day 0 all mice were weighed and injected with $5*10^4$ EL4 lymphoma cells into the peritoneal cavity (IP) and then, except control group, were intravenously (IV) injected with a single 15 mg/kg Dox dose on day 3, 5, or 9 for Dox 3, Dox 5, and Dox 9 respectively. The tumour size of $0.15 \cdot 10^6 \pm 0.03$, $0.6 \cdot 10^6 \pm 0.07$ and $22.7 \cdot 10^6 \pm 3.89$ EL4 cells was determined on days 3, 5 or 9 respectively.

Interestingly, even the modest changes in tumour size on the day of Dox administration led to significant differences in therapeutic outcomes.

The median survival of untreated TBM (control group) was 14.5 days. During the first 9 days after EL4 cell administration, neither a significant increase in body weight nor in tumour volume was observed in untreated mice. In contrast to the early stage, the later stage of tumour growth (days 10–13) showed a significant increase in animal body weight up to 34.4 ± 1.52 g on day 13 as well as the rapid EL4 ascites volume increase up to 9.7 ml until day 13 (Fig. 6). While EL4 tumour ascites exhibited a 48.5-fold volume increase, tumour cell number reached up to 4060-fold amount up to $2.03 \cdot 10^8$ on Day 13 compared to the beginning of the experiment (fig. 7).

Dox 3 TBM group showed the most effective treatment outcome: 60% of this group survived more than 60 days (fig.5) with no sign of residual tumour. Any significant changes in animal body weight or ascitic volume weren't observed either. Moreover, the highest drug content in tumour cells 60 min after drug administration as well a strong drug cytotoxic effect was detected in this group. EL4 cells were no longer detected in the peritoneal cavity of TBM 72 hours post-injection.

Meanwhile, a group of Dox 9 mice were completely resistant to treatment. The median survival time of those mice was -14.5 days and did not differ from that of untreated mice (p = 0.8949, HR = 1.089). Any differences in body weight increase or ascitic fluid accumulation weren't observed either.

Although not considered to be cured, Dox 5 group exhibited signs of remission with a significant increase of survival rate up to 25 days (p < 0.0001, HR = 0.2245) in comparison to untreated mice. The amount of EL4 cells dramatically decreased in the peritoneal cavity 72 hours after Dox administration. During 12-days period after drug administration, cellular Dox content was gradually decreasing in the PerC cells of these mice.

Based on the data Dox 3, Dox 5 and Dox 9 mice groups were renamed to 'cure', 'elapse' and 'resistant' mice respectively (see fig. 5).

The study evaluated the dynamics not only of the absolute number of EL4 cells but also of the density of these cells in the peritoneal cavity. The changes in EL4 cell density negatively correlated with intracellular drug doxorubicin concentration and therapeutic outcome (table 3.1).

Pharmacokinetics

To determine the intracellular chemotherapeutic drug doxorubicin in PerC and tumour cells, the flow cytometry analysis of the cells from the peritoneal cavity was performed at 60 min, 48 h, 96 h, 144 h, 240 h time points after injection. Then the intracellular drug content, as well as drug half-life ($t_{1/2}$), were evaluated. Cytostatic levels in PerC cells of cure, relapse and resistant groups of mice were as follows: 10.75 ± 0.35 ng/mg, 8.7 ± 0.42 ng/mg and 6.3 ± 0.99 ng/mg respectively. Meanwhile, mean fluorescence channel shift (dMCF) in EL4 cells of cure, relapse and resistant mice 60 min post-injection was 85 ± 2.2 , 58 ± 1.7 , 11 ± 2.5 respectively (Fig. 9, Table 3.2). The cure TBM displayed a significantly higher (824.18 ± 57.2 ng·h/mg) AUC_{0-10d} of cellular Dox as compared to relapse 456.83 ± 26.8 ng·h/mg or resistant (157.55 ± 23.3 ng·h/mg) TBM. Dox half-life ($t_{1/2}$) was also significantly reduced in resistant mice (9.5 h) in comparison to the cure (43.4 h) and relapse (39.3 h) group (Fig. 10). A negative correlation (R= -0.86), found between tumour size and drug content in cancer cells, suggests that the size of the tumour

on the day of injection affects the accumulation of the drug in the cells and corresponds to the treatment outcome (Fig. 11). We hypothesized that the rapid increase of cell density at the early avascular stage of tumour growth can govern the reduction of cellular drug uptake, retention and eventually to drug susceptibility. This phenomenon is similar to the 'inoculum effect' reported to tumour cells exposed to cytotoxic drugs *in vitro*.

The systemic effect of Doxorubicin

To evaluate the systemic effects of doxorubicin complete blood count (CBC) was performed. All mice, regardless of the day of Dox injection, showed a significantly reduced number of leukocytes, lymphocytes and monocytes 48 hours post-injection compared to untreated mice (Fig. 12). No significant differences in leukocyte, lymphocyte, and monocyte counts were observed between the treated groups, regardless of the treatment regimen. The effect of doxorubicin on granulocyte, platelet and haemoglobin levels was not determined (Fig. 12). Reassessment of blood analysis at day 10 after doxorubicin injection showed complete recovery of blood counts. (Table 3.3). According to some studies, mean erythrocyte volume (MCV) and mean platelet volume (MPV) play an important role in the response to chemotherapy [65], [170]–[172]. In our study, no differences were found between MPV and MCV.

Furthermore, no association of plasma drug concentrations with tumour size, density or overall treatment efficacy was observed (table 3.2). It can be assumed that it is not the plasma drug tissue drug content plays a key role in determining anticancer activity.

SL2 lymphoma TSDR model

Studies in the EL4 lymphoma model of doxorubicin C57BL6/NCr mice have shown the correlation between tumour size and cellular accumulation the role of this correlation to the therapeutic efficacy. Studies by other authors show that residues of some cytostatic (e.g., platinum) compounds are found in tissues after a long time after cessation of the treatment and are associated with side effects of treatment [17], [173]. However, tissue accumulation of chemotherapeutic drugs may be associated not only with side effects but also with dormancy and remission of tumour cells. Therefore, the further release of

cytotoxic compounds from tumour cells may lead to tumour recurrence even after a long period of remission.

To demonstrate the role of cellular drug internalization on tumour recurrence rates, we designed two-step dormancy/recurrence (TSDR) murine model. According to the experiment design, viable SL2 lymphoma cells preloaded with various doxorubicin concentrations (up to 10 μ g/ml) for 30 min at 37°C were implanted intraperitoneally (i.p.) into DBA/2 mice. Although low Dox concentrations (0.01-1.0 μ g/ml) resulted in tumour recurrence and worse survival outcomes, SL2 cells exposed with 10 μ g/ml doxorubicin concentration were not able to resume proliferation and recurrence thus had no adverse effect on the survival rate of DBA/2 compared to intact mice. DBA/2 mice receiving SL2 cells incubated with this amount of drug survived for more than 60 days (p = 0.0004, HR = 0.09486, n = 6) and were considered cured. SL2 incubation with a medium concentration (1 μ g/ml or 0.5 μ g/ml) of doxorubicin resulted in 19.5 days (p = 0.0615, HR = 0.4761, n = 6) and 19 days (p = 0.4711, HR = 0.4761, n = 3) survival median. Low concentrations (0.1 μ g/ml, and 0.05 μ g/ml) of the drug showed no differences compared to untreated mice with median survival equal to 16 days (Fig. 17).

Stability studies of the chemotherapeutic drug doxorubicin

To simulate body indwelling drug decay, Dox was kept at 37°C in darkness in the original vial for 120 days (medium-term) and 365 days (long term) and later analysed by HPLC, spectrometry, confocal microscopy and CBC analyser.

The HPLC analysis of doxorubicin after medium-term (120-days) exposure at 37°C revealed the significant (16.8-fold) reduction of the main Dox peak (11.15 min) compared to fresh Dox sample. Daunorubicin was used as an internal standard (retention time 17.2 min).

Also, few additional peaks at 7 min, 8.5 min, 10.5 min, 16.49 min, 17.33 min were detected (see Fig. 19)

Evaluation of the absorption spectrum of doxorubicin exposed at 37°C resulted in band broadening with significant hypochromism in the spectral range between 415–540 nm and weak hyperchromism in the spectral range above 540 nm compared to the fresh dox spectrum (Fig. 20). This change in the absorption spectrum, together with the observed

decrease in fluorescence intensity in dox aqueous solutions (Fig. 21), may be related to drug aggregation and/or dimerization [177].

The uptake of incubated for 365 days at 37°C (Dox-365) in SL2 cells measured by both flow cytometry and confocal microscopy showed dim but still detectable fluorescence in SL2 cells compared to fresh Dox. The intensity of nuclear fluorescence was found to be 14-fold lower in Dox-365 samples than in fresh samples (Fig. 23). Moreover, Dox-365 lost its nuclear selectivity in viable cells and was distributed among all cell compartments (Fig. 24).

Raman spectra of fresh and long-term (> 365 days) incubated anthracyclines (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin) were evaluated to monitor the long-term effects of 37°C on chemotherapeutic drugs. The shift was determined in the Raman spectra of all temperature-affected drugs compared to their fresh control. Based on the obtained data, the long-term effect of 37°C temperature led to the structural changes of all studied anthracyclines (Fig. 22 a). Assessing the effect of different time durations (90 days and > 365 days) on the chemotherapeutic drug doxorubicin, changes in the spectrum can be seen at the peaks of 506 cm⁻¹, 1206 cm⁻¹, 1445 cm⁻¹ after 90 days incubation (Fig. 22 b). The Raman spectrum of doxorubicin incubated for a longer period (> 365 days) shows greater shifts in these peaks than Dox spectrum after 90-days incubation. According to our results the prolonged incubation at temperature leads to drug degradation. These data were consistent with the absorption and fluorescence analysis of the data obtained by HPLC.

Evaluation of the stability of the liposomal drug doxorubicin Caelyx

To compare the effect of long-term (365 days) effects of human physiological body temperature on the stability of liposomal doxorubicin Caelyx liposomes, liposomes were visually analysed by transmission electron microscopy (TEM) and their size by dynamic light scattering (DLS). The electron micrographs of fresh Caelyx showed homogenous oval particles. Homogeneity of the particles was also recorded by DLS analysis revealing a single peak. In contrast, long-term exposure led to reduced homogeneity and disintegration of drug liposomes (Fig. 27 B) as well as the occurrence of two peaks of Caelyx-365d. (Fig. 28 B).

Flow Cytometry analysis of Doxorubicin uptake in SL2 cells

The effect of long-term exposure at 37° C temperature on the accumulation of standard (Dox) and liposomal doxorubicin (Caelyx) in SL2 cells was analysed by flow cytometry. A concentration of 10 µg/ml of drug was chosen because it was effective in our *in vivo* study. Doxorubicin incubated for 365 days (Dox-365) showed significantly lower fluorescence (dMCF = 3790) compared to fresh doxorubicin (dMCF = 7134) or drug incubated at 37° C for 15 days (Dox-15) (dMCF = 9083). In contrast to standard doxorubicin, the fluorescence of liposomal doxorubicin in SL2 cells increased after long-term (365 days) incubation at 37° C. The shift in fluorescence intensity (dMCF) of Caelyx-365 was 16-fold higher compared to dMCF of fresh Caelyx (Table 3.4, Fig. 25). The increase of fluorescence of liposomal doxorubicin, uncommon to any other anthracyclines, i.e., daunorubicin, epirubicin, tested, might be the result of degradation of liposome particles leading to extrusion of the drug doxorubicin.

Evaluation of the myelosuppressive effect of doxorubicin

To investigate the myelosuppressive effect of fresh (Dox) and incubated for 120 days (Dox-120) or 365 days (Dox-365) at 37°C doxorubicin peripheral blood from DBA/2 mice was analysed by CBC analyser 48 hours after 15 mg/kg drug dose injection into the retro-orbital plexus.

A significant decrease in leukocytes, lymphocytes, and monocytes was observed compared to untreated mice. The average count of leukocytes, lymphocytes and monocytes of untreated mice was $7.30 \pm 0.59 \cdot 10^9/L$, $5.20 \pm 1.43 \cdot 10^9/L$, $1.33 \pm 0.38 \cdot 10^9/L$ respectively. Dox injection caused the significant decrease of these values to $2.8 \pm 0.65 \cdot 10^9/L$ (p < 0.0001, n = 5), $1.86 \pm 0.59 \cdot 10^9/L$ (p = 0.0131, n = 5) and $0.58 \pm 0.33 \cdot 10^9/L$ (p = 0.0204, n = 5) respectively. No significant decrease in lymphocytes and monocytes count was observed neither after Dox-120 nor after Dox-365 injection (Fig. 29). However, reduced leukocyte count equals to $4.66 \pm 1.9 \cdot 10^9/L$ (p = 0.0332, n = 5) was shown after Dox-120 injection. Long-term (365 days) exposure at 37° C resulted in the loss of myelosuppressive activity of doxorubicin. Dox-365 did not cause leukopenia in any treated mice. Liposomal doxorubicin Caelyx showed a much weaker myelosuppressive effect compared to free doxorubicin. 15 mg/kg Caelyx injection

was followed by leukocyte decrease to $6.0 \pm 0.66 \cdot 10^9/L$ (p = 0.0113) compared to $2.8 \pm 0.65 \cdot 10^9/L$ (p < 0.0001, n = 5) after free drug dose (Fig. 30).

DISCUSSION

The use of murine models for the development of new drug compounds and the improvement of existing therapeutic regimens is common in preclinical studies. These models are a convenient way to evaluate the efficacy and toxicity of drugs as well as to study their interactions with other compounds [159]. The EL4 T lymphoma and SL2 T lymphoma models in C57BL6/NCr and DBA/2 mice, respectively, were used to evaluate the uptake and retention of the chemotherapeutic drug doxorubicin. The analysis of doxorubicin pharmacokinetics in plasma revealed the rapid plasma elimination of the drug following a 15 mg/kg dose due to the large distribution volume of the anthracycline. The determined plasma Dox C_{max} in our study was 1.33 µg/ml which is comparable to the 1-4 µg/ml showed by others. 72 hours post-injection plasma drug content was below the detection limit. Plasma levels of doxorubicin in C57BL6/NCr mice observed 60 min postinjection did not show any relationship between plasma drug concentration and therapeutic effect. The majority of pharmacokinetic studies analyse drug changes in the body during the first 24 hours after injection. At a later stage, pharmacokinetic studies are limited since the drug is almost non-existent in the circulation and its residual amount has no association with therapeutic or side effects of the treatment [14]. A different situation is observed in the tissues though. There have been several reports revealing the occurrence of platinum residues in urine and blood of patients with testicular cancer more than 10 years after cessation of chemotherapy 15], [19]. Higher concentrations of platinum compounds in preoperative biopsy specimens have been associated with better treatment outcomes in patients with non-small cell lung or bladder cancer [16], [32]. According to Wang et al., mass spectroscopy analysis of radioactive [14C] carboplatin-DNA adducts showed the correlation with cytotoxic effects of cisplatin and carboplatin in non-small cell lung cancer cells in vitro. Despite the interesting and optimistic results, the method itself is not easily implemented in clinical practice. In contrast, the content of chemotherapeutic drug doxorubicin due to its fluorescent properties might be examined by a simple flow cytometry method. Monitoring of the intracellular doxorubicin and

evaluating pharmacokinetic parameters of the drug would be a more convenient method to apply in clinical practice compared to platinum compounds. The doxorubicin accumulation in tissues was found to be up to 100-fold higher than the maximum plasma concentration [14]. According to our EL4 lymphoma model in C57BL/NCr mice, the amount of intracellular, but not plasma, doxorubicin and its retention time correlates with the therapeutic efficacy and treatment response. Administration of the same dose of 15 mg/kg doxorubicin on day 3 after implantation of $5 \cdot 10^4$ EL4 cells resulted in significantly higher drug accumulation in peritoneal and tumour cells 60 min postinjection, slower drug elimination and significantly higher AUC_{0-10d} compared to drug injection on day 5 or 9 after tumour implantation. Differences in the pharmacokinetics of the drug in tumour cells resulted in complete recovery in the Day 3 ('cure') group of mice, resistance of Day 9 ('resistant') and intermediate results of Day 5 ('relapse') group). The analysis was performed only in the early stage (days 3-9) of cancer to avoid the effect of systemic toxicity as a result of increase in haemorrhagic ascites volume, common to latestage tumours. Small changes in EL4 cell number and cell density in the early avascular phase (days 1-9) resulted in a significant decrease in doxorubicin AUC_{0-10d} and a deterioration in response to treatment. Decreased Dox uptake at higher tumour cell densities in the peritoneal cavity of mice can be explained by the 'inocular' effect described by Kobayashi and colleagues in 1992 [7]. The authors showed that the cytotoxic effects of doxorubicin and vincristine were attenuated by the increasing number of Molt-3 cells in the acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cell line in vitro [181]. Negative correlations also between the treatment efficacy and cell number have been demonstrated in both daunorubicin [13] and paclitaxel [39] studies in vitro.

In our study tumour size and density in the peritoneal cavity of mice were the only factors that influenced doxorubicin accumulation, retention, and cellular AUC. This phenomenon could be explained by the inoculation effect *in vivo*. Although the number of EL4 lymphoma cells increased exponentially during the experiment, the mass of tumour cells at the terminal stage was only 0.2 g. This increase was less significant compared to the animal weight gain of 13 g due to ascites fluid accumulation in the terminal stage of tumour growth. In contrast to ascites, solid EL4 tumours of similar size (0.2 g) were not lethal to mice. Within 12 days of EL4 tumour progression, the volume of ascites fluid increased 48.5-fold (from 0.2 ml to 9.7 ml) and the tumour cell count increased > 400-
fold. Tumour cell density in the peritoneal cavity increased about 10-fold faster than mouse weight or ascites volume. According to several publications, the individual blood kinetics of doxorubicin may be an important factor in determining not only the therapeutic effect but also the myelotoxicity, cardiotoxicity, or interaction of the drug with other concomitant medications. In our EL4 lymphoma model, the drug-induced significant reduction of leukocyte, lymphocyte and monocyte counts did not correlate with therapeutic efficacy or tumour recurrence. Regardless of EL4 tumour size and density on the day of drug injection, no differences in myelosuppressive effects were observed between groups of mice. The data obtained suggest that the ability of doxorubicin to induce myelosuppression had no association with the therapeutic effect in our EL4 lymphoma model. We hypothesize that evaluation of the intracellular drug content would be a much more accurate measure than evaluation of haematological toxicity.

The study using our developed TSDR dormancy/recurrence model demonstrated that SL2 lymphoma cells preincubated with 10 µg/ml Dox lost their ability to proliferate in peritoneal cavity of DBA/2 mice. Lower Dox concentrations (0.05–1.0 µg / ml) were not sufficient to retain tumour cells at dormancy. Concentrations of 10 µg/ml Dox appear to be quite high and might raise some doubt on the clinical application because the plasma concentration of 10 µg/ml doxorubicin has not been reached. The maximum plasma Dox concentration in our studies was 1.33 µg/ml. However, due to the short (30 min) incubation of the cells with Dox, the calculated cellular AUC_{0-0.5h} in tumour cells was 5.0 μ g*h/ml and was not much higher than the drug AUC_{0-72h} of 3.6 μ g*h/ml, estimated in plasma. Similar studies were performed with the SUM159 breast cancer cell line in vitro. Otherwise, the authors chose 48 hours incubation and 1 µg/ml doxorubicin concentration [24]. We chose a Dox concentration of 0.05-10 µg/ml and a shorter 30 min incubation for our studies, as this duration is the most consistent with the in vivo plasma pharmacokinetics. According to many publications, anticancer drugs can persist in tissues for months or even years after the end of chemotherapy [15], [16], [103], [175]. According to the literature, long-term tissue retention of cytotoxic drugs, including Dox, is associated with side effects such as neurotoxicity, cardiotoxicity, tinnitus, etc. [15], [58], [103], [193], [194]. We hypothesize that long-term retention of the drug in the tissues could be an important factor in determining the presence of tumour cells in a state of 'dormancy', inhibition of proliferation and longer remission after therapy.

Once retained in tissues, cytostatic should be exposed to physiological body conditions (human body temperature, enzymes, pH fluctuations, etc.). To simulate the effect of physiological human body temperature on tissue-stored drug stability and cytotoxic activity, we investigated the effect of long-term (up to 365 days) incubation at 37°C on chemotherapeutic drug doxorubicin. According to the results, short-term (2 weeks) incubation at 37°C did not affect the stability of doxorubicin. Medium (120 days) incubation at 37°C has already led to some degradation of the product (appearance of new peaks uncharacteristic to fresh doxorubicin in the HPLC chromatogram). The major peak of doxorubicin, although 16.8-fold lower, showed a small but still noticeable amount of the main doxorubicin product, which was equal to about 5.95% of the fresh doxorubicin. Medium-term (120 days) exposure of the Dox of temperature exposure still retains residual myelosuppressive activity.

Long-term exposure at 37°C resulted in weaker doxorubicin fluorescence in both aqueous solution and cells. Doxorubicin also lost its myelosuppressive activity, the ability to selectively bind to the cell nucleus. Absorption and fluorescence spectra also suggest that aggregation and/or dimerization of doxorubicin has occurred. The decrease in amplitude of the fluorescence signal is mainly due to static/dynamic quenching, including spontaneous quenching, and the aggregation of monomers into non-fluorescent dimers. Aggregation is also known to result in broadening of the major absorption band of doxorubicin (significant hyperchromism) at 415–540 nm, and weak hyperchromism in the range above 540 nm [177], [195]

In recent years, Raman spectroscopy has become a potential application within drug discovery and development. In pharmacology, this technique might be promising to investigate the activity of drugs and to establish a drug's physicochemical properties [178]. To observe the long-term exposure-induced effect on chemotherapeutic drugs, Raman spectra were obtained. The shift in the Raman spectrum compared to the fresh drug also indicates the degradation of doxorubicin. According to the results, long-term exposure structural changes occurred in all anthracyclines (doxorubicin, epirubicin and daunorubicin) tested. These data coincide with those gathered from HPLC, absorbance and fluorescence analyses. Unlike anthracyclines, none of platin-containing s tested (cisplatin, carboplatin, oxaliplatin) showed any differences in Raman spectrum compared to fresh drugs. Even after 6 years keeping it at RT, cis-platin demonstrated the same peaks

as a fresh drug. Interestingly platinum compounds are shown to remain in the body up to 20 years after cessation of the therapy [173]. The relationship between long-term circulating Pt levels and well-known long-term and late effects, such as paraesthesia, hypogonadism, higher LDL-cholesterol levels and hypertension [19]. Otherwise, no long-term body indwelling drug effect on treatment efficacy has been studied. The stability data gathered imply that the Pt compound might keep the residual antiproliferative activity of the drug even after many years of body indwelling.

All tested compounds (both doxorubicin and platinum compounds) were stored in the original manufacturer's packaging. All studies were performed in vitro. DNA-associated cytostatic drugs are likely to retain antiproliferative efficacy. It would therefore make sense to evaluate the stability and antiproliferative activity of tissue-bound compounds.

Pegylated liposomal doxorubicin Caelyx, approved in 1995, is used to treat Kaposi's sarcoma and recurrent ovarian cancer. Compared to free doxorubicin, the drug has a lower volume of distribution V_d, a longer elimination half-life t_{1/2}, resulting in a longer circulating circulation compared to the standard Dox [160]. However, Caelyx is not widely used in clinical practice as originally expected. The antitumor activity and toxicity of Caelyx are generally associated only with its blood pharmacokinetics [198], [199]. Liposomal doxorubicin Caelyx fluorescence in SL2 cells showed a 19.7-fold lower drug uptake compared to free doxorubicin (Dox) accumulation in both living and permeabilized cells. Liposomal Caelyx binds less to degraded DNA in permeabilized cells and has lower myelotoxic activity compared to fresh Dox. Interestingly, Caelyx was the only anthracycline tested to show stronger fluorescence in living and permeabilized cells after prolonged exposure to temperature than fresh drugs. The observed increase in Caelyx fluorescence intensity after prolonged exposure to temperature could be due to the release of free dox from the degraded liposome particles after long-term exposure at 37°C, determined by transmission electronic microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS).

Although long-term body temperature exposure dramatically affected both cytotoxic and myelosuppressive capacity of the free drug, further studies of body indwelling drug interaction with surrounding tissue and its effect on drug antitumor activity are needed. Our suggested TSDR model might be a convenient tool to study the effect of tissue-bound drugs on the dormancy and remission.

CONCLUSIONS

- Higher tumour size and cancer cell density on the day of drug administration resulted in poorer uptake of doxorubicin in peritoneal (PerC) and tumour cells and significantly lower AUC. Poorer doxorubicin uptake and shorter cell retention were directly correlated with tumour recurrence and disease progression in the EL4 model.
- Neither tumour size nor cancer cell density on the day of drug administration affected the plasma pharmacokinetics and systemic myelosuppression of doxorubicin. No association of doxorubicin-induced systemic myelotoxicity with therapeutic efficacy has been identified.
- SL2 cells incubated with 10 μg/ml doxorubicin completely lost the ability to proliferate in DBA/2 mice. Lower (0.05-1.0 μg/ml) Dox concentrations were not effective.
- 4. Long-term exposure to human physiological body temperature reduces the stability, myelotoxic and antiproliferative efficacy of the chemotherapeutic drug doxorubicin, and the ability to selectively bind to nuclear structures.
- 5. The uptake of the liposomal chemotherapeutic drug doxorubicin Caelyx in living and permeabilized cells, in contrast to free doxorubicin, increased after prolonged exposure to human physiological body temperature, possibly due to liposome degradation.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- C. Tacar, O. Sriamornsak, P. Dass, Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems, *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 65, no. 2, pp. 157–170, 2013, doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
- R. Thorn, CF. Oshiro, C. Marsh, S. Hernandez-Boussard, T. McLeod, H. Klein, T.E. Altman, Doxorubicin pathways, *Pharmacogenet. Genomics*, vol. 21, no. 7, pp. 440–446, 2011, doi: 10.1097/fpc.0b013e32833ffb56.
- [3] E. Alexieva, B. Sainova, I. Pavlova, V. Markova, T.Z. Valkova, I. Nikolova, Insights into Mechanisms of Doxorubicin Cardiotoxicity, *J. Pysiology Pharmacol.*, vol. 4, no. March 2014, pp. 342–348, 2014.
- [4] Z. Chen, T. Shi, L.Zhang, M. Deng, C. Huang, T. Hu, L. Jiang, J. Li, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade, *Cancer Lett.*, vol. 370, no. 1, pp. 153–164, 2015, doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.010.
- [5] R. Yigit, L.F.A.G. Massuger, C.G. Figdor, R. Torensma, Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination, *Gynecol. Oncol.*, vol. 117, no. 2, pp. 366–372, 2010, doi: 10.1016/j.ygyno.2010.01.019.
- [6] T. Ohnuma, H. Arkin, J.F. Holland, Effects of cell density on drug-induced cell kill kinetics in vitro (Inoculum effect), *Br. J. Cancer*, vol. 54, no. 3, pp. 415–421, 1986, doi: 10.1038/bjc.1986.192.
- H. Kobayashi, Y. Takemura, T. Ohnuma, Relationship between tumor cell density and drug concentration and the cytotoxic effects of doxorubicin or vincristine: mechanism of inoculum effects, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 31, no. 1, pp. 6–10, 1992, doi: 10.1007/BF00695987.
- [8] C. Bardin, G. Veal, A. Paci, E. Chatelut, A. Astier, D. Leveque, N.Widmer, J. Beijnen, Therapeutic drug monitoring in cancer - Are we missing a trick?, *Eur. J. Cancer*, vol. 50, no. 12, pp. 2005–2009, 2014, doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.013.
- [9] A. Paci, G. Veal, C. Bardin, D,Leveque, N. Widmer, J. Beijnen, A. Astier, E. Chatelut, Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1 - Cytotoxics, *Eur. J. Cancer*, vol. 50, no. 12, pp. 2010–2019, 2014, doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.014.
- B. Gao, S. Yeap, A. Clements, B. Balakrishnar, M. Wong, H. Gurney, Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies, *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 32, pp. 4017–4025, 2012, doi: 10.1200/JCO.2012.43.5362.

- [11] C. Siebel, G. Würthwein, C. Lanvers-Kaminsky, N. André, F. Berthold, I. Castelli, P. Chastagner, F. Doz, et *al.*, Can we optimise doxorubicin treatment regimens for children with cancer? Pharmacokinetic simulations and a Delphi consensus procedure, *BMC Pharmacol. Toxicol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1186/s40360-020-00417-2.
- B-M Frost, S. Eksborg, O. Bjork, J. Abrahamsson, M. Behrendtz, A. Castor, E. Forestier,
 G. Lonnerholm, Pharmacokinetics of doxorubicin in children with acute lymphoblastic
 leukemia: Multi-institutional collaborative study, *Med. Pediatr. Oncol.*, vol. 38, no. 5,
 pp. 329–337, 2002, doi: 10.1002/mpo.10052.
- [13] A. Bogason A.L. Quartino, P. Lafolie, M. Masquellier, M.O. Karlsson, C. Paul, A. Gruber, S. Vitols, Inverse relationship between leukaemic cell burden and plasma concentrations of daunorubicin in patients with acute myeloid leukaemia, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 71, no. 4, pp. 514–521, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03894.x.
- [14] P.A.J. Speth, P.C.M. Linssen, R.S.G. Holdrinet, C.Haanen, Plasma and cellular Adriamycin concentrations in patients with myeloma treated with ninety-six-hour continuous infusion, *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 41, no. 6, pp. 661–665, 1987, doi: 10.1038/clpt.1987.92.
- [15] L.V. Hjelle, P.O.M. Gundersen, R. Hellesnes, M. Sprauten, M. Brydøy, T. Tandstad, T. Wilsgaard, S.D. Fosså, J. Oldenburg, R.M. Bremnes, H.S. Haugnes, Long-term serum platinum changes and their association with cisplatin-related late effects in testicular cancer survivors, *Acta Oncol. (Madr).*, vol. 57, no. 10, pp. 1392–1400, 2018, doi: 10.1080/0284186X.2018.1473641.
- [16] E.S. Kim, J.J. Lee, G. He, C.W. Chow, J. Fujimoto, N. Kalhor, S.G. Swisher, I.I. Wistuba et al., Tissue platinum concentration and tumor response in non-small-cell lung cancer, J. Clin. Oncol., vol. 30, no. 27, pp. 3345–3352, 2012, doi: 10.1200/JCO.2011.40.8120.
- [17] D.J. Stewart, D. Grewaal, R M. Green, N. Mikhael, R. Goel, V.A. Montpetit, M.D.
 Redmond, Concentrations of doxorubicin and its metabolites in human autopsy heart and other tissues, *Anticancer Res.*, vol. 13, no. 6 A, pp. 1945–1952, 1993.
- [18] P. Gunvén, N.O. Theve, C. Peterson, Serum and tissue concentrations of doxorubicin after IV administration of doxorubicin or doxorubicin-DNA complex to patients with gastrointestinal cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 17, no. 2, pp. 153–156, 1986, doi: 10.1007/BF00306745.
- [19] H. Boer, J. H. Proost, J.Nuver, S. Bunskoek, J.Q. Gietema, B.M. Geubels, R. Altena, N. Zwart et al., Long-term exposure to circulating platinum is associated with late effects of treatment in testicular cancer survivors, *Ann. Oncol.*, vol. 26, no. 11, pp. 2305–2310, 2015, doi: 10.1093/annonc/mdv369.

- [20] S. Ren, C. Li, Y. Dai, N. Li, X. Wang, F. Tian, S. Zhou, Z. Qiu, Y. Lu, D. Zhao, X. Chen, D. Chen, Comparison of pharmacokinetics, tissue distribution and pharmacodynamics of liposomal and free doxorubicin in tumour-bearing mice following intratumoral injection, *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 66, no. 9, pp. 1231–1239, 2014, doi: 10.1111/jphp.12257.
- [21] K.M. Laginha, S. Verwoert, G.J.R. Charrois, T.M. Allen, Determination of Doxorubicin Levels in Whole Tumor and Tumor Nuclei in Murine Breast Cancer Tumors, *Clin Cancer Res*, vol. 11, no. 19, pp. 6944–6949, 2005, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0343.
- J.D. Wirtschafter, Clinical Doxorubicin Chemomyectomy: An Experimental Treatment for Benign Essential Blepharospasm and Hemifacial Spasm, *Ophthalmology*, vol. 98, no. 3, pp. 357–366, 1991, doi: 10.1016/S0161-6420(91)32288-7.
- [23] H. Shan, Z. Cao, C. Chi, J. Wang, X. Wang, J. Tian, B. Yu, Advances in Drug Delivery via Biodegradable Ureteral Stent for the Treatment of Upper Tract Urothelial Carcinoma *Front. Pharmacol.*, vol. 11, no. March, pp. 1–7, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00224.
- [24] S. Li, M. Kennedy, S. Payne, K. Kennedy, V.L Seewaldt, S.V. Pizzo, R.E Bachelder, Model of tumor dormancy/recurrence after short-term chemotherapy, *PLoS One*, vol. 9, no. 5, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0098021.
- [25] R. Pokhriyal, R. Hariprasad, L. Kumar, G. Hariprasad, Chemotherapy Resistance in Advanced Ovarian Cancer Patients, *Biomark. Cancer*, vol. 11, p. 1179299X1986081, 2019, doi: 10.1177/1179299x19860815.
- S. Hussain, A. Singh, S.U. Nazir, S. Tulsyan, A. Khan, R. Kumar, N. Bashir, P. Tanwar, R. Mehrotra, Cancer drug resistance: A fleet to conquer, J. Cell. Biochem., vol. 120, no. 9, pp. 14213–14225, 2019, doi: 10.1002/jcb.28782.
- [27] H.E. Skipper, F.M. Schabel, M.Bell, J.R. Thomson, S. Johnson, On the Curability of Experimental Neoplasms I. A-Methopterin and Mouse Leukemias, *Cancer Res.*, vol. 17, no. 7, pp. 717–726, 1957.
- [28] B.A. Talseth-Palmer, The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes, *Hered. Cancer Clin. Pract.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–7, 2017, doi: 10.1186/s13053-017-0065-x.
- [29] J. Jackson, S.E. Chester, Personalised cancer medicine, *Int J Cancer*, vol. 137, no. 2, pp. 262–266, 2015.
- [30] C.S. Karapetis, S. Khambata-Ford, D.J. Jonker, C.J. O'Callaghan, D. Tu, N.C. Tebbutt, R.J. Simes, H. Chalchali, J.D. Shapiro, S. Robitaille, J. Price, L. Shepherd, H.U. Au, C. Langer, M.J. Moore, J.R. Zalcberg, K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer, *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 17, pp. 1757–1765, 2008, doi: 10.1056/nejmoa0804385.
- [31] C. Gutierrez, R. Schiff, HER2: Biology, detection, and clinical implications, Arch.

Pathol. Lab. Med., vol. 135, no. 1, pp. 55-62, 2011, doi: 10.5858/2010-0454-rar.1.

- [32] J Bellmunt, L. Paz-Ares, M Cuello, F.L. Cecere, S. Albiol, V. Guillem, E. Gallardo, J. Carles, P. Mendez, J.J de la Cruz, M. Taron, R. Rosell, J. Baselga, Spanish Oncology Genitourinary Group, Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy, *Ann. Oncol.*, vol. 18, no. 3, pp. 522–528, 2007, doi: 10.1093/annonc/mdl435.
- [33] N. Widmer, C. Bardin, E. Chatelut, A. Paci, J. Beijnen, D. Levêque, G. Veal, A. Astier, Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two - Targeted therapies, *Eur. J. Cancer*, vol. 50, no. 12, pp. 2020–2036, 2014, doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.015.
- [34] A.S. Baras, N. Gandhi, E. Munari, S. Faraj, L. Shultz, Identification and Validation of Protein Biomarkers of Response to Neoadjuvant Platinum Chemotherapy in Muscle Invasive Urothelial Carcinoma, *PLoS One*, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0131245.
- [35] C.P.N. Dinney, D. Hansel, D. McConkey, W. Shipley, M. Hagan, R. Dreicer, S. Lerner, B. Czerniak *et al.*, Novel neoadjuvant therapy paradigms for bladder cancer : Results from the National Cancer Center Institute Forum, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 32, no. 8, pp. 1108–1115, 2014, doi: 10.1016/j.urolonc.2013.10.021.
- [36] Y. Zhu, T. Brettin, Y.A Evrard, F. Xia, A. Partin, M. Shukla, H. Yoo, J.H. Doroshow,
 R.L Stevens, Enhanced Co-Expression Extrapolation (COXEN) Gene Selection Method for Building Anti-Cancer Drug Response Prediction Models, *Genes (Basel).*, vol. 11, no. 1070, pp. 1–13, 2020.
- [37] J.H. Zheng, C.T. Chen, J.L.S. Au, M.G. Wientjes, Time- and concentration-dependent penetration of doxorubicin in prostate tumors, *AAPS J.*, vol. 3, no. 2, 2001, doi: 10.1208/ps030215.
- [38] M. Masquelier, S. Vitols, Drastic effect of cell density on the cytotoxicity of daunorubicin and cytosine arabinoside, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 67, no. 9, pp. 1639–1646, 2004, doi: 10.1016/j.bcp.2003.12.034.
- [39] H.J. Kuh, S.H. Jang, M.G. Wientjes, Computational model of intracellular pharmacokinetics of paclitaxel, *Pharmacol Exp Ther.*, vol. 293, no. 3, pp. 761–770, 2000.
- [40] J. Lankelma, H. Dekker, R.F. Luque, S. Luykx, K. Hoekman, P. Van Der Valk, P.J. Van Diest, H.M. Pinedo, Doxorubicin gradients in human breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, vol. 5, no. 7, pp. 1703–1707, 1999.
- [41] M.M. Nelson, D.L. Lehninger, A.L. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5 edition.W. H. Freeman & Co;, 2008.
- [42] V. Vasiliou, K. Vasiliou, D.W. Nebert, Human ATP-binding cassette (ABC) transporter

family, Hum. Genomics, vol. 3, no. 3, pp. 281-290, 2009.

- [43] N. Ji, Y. Yang, C.Y. Cai, Z.N. Lei, J.Q. Wang, P. Gupta, Q.X. Teng, Z.S. Chen, D. Kong, D.H. Yang, VS-4718 Antagonizes Multidrug Resistance in ABCB1- and ABCG2 Overexpressing Cancer Cells by Inhibiting the Efflux Function of ABC Transporters, *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. October, pp. 1–12, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01236.
- [44] H. Lage, An overview of cancer multidrug resistance: A still unsolved problem, *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, no. 2008, pp. 3145–3167, 2008, doi: 10.1007/s00018-008-8111-5.
- [45] D. Drach, S. Zhao, J. Drach, R. Mahadevia, C. Gattringer, H. Huber, M. Andreeff, Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype, *Blood*, vol. 80, no. 11, pp. 2729–2734, 2017, doi: 10.1182/blood.v80.11.2729.bloodjournal80112729.
- [46] Y. Chen, M.M. Bieber, N.N.H. Teng, Hedgehog signaling regulates drug sensitivity by targeting ABC transporters ABCB1 and ABCG2 in epithelial ovarian cancer, *Mol. Carcinog.*, vol. 53, no. 8, pp. 625–634, 2013, doi: 10.1002/mc.22015.
- [47] S.V. Ambudkar, S. Dey, C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan,
 M.M. Gottesman, Biochemical, Cellular, and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 39, no. 1, pp. 361–398, 1999, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361.
- [48] L W. Han, C. Gao, Q. Mao, An update on expression and function of p-gp/abcb1 and bcrp/ abcg2 in the placenta and fetus, *Expert Opin Drug Metab Toxiicol*, vol. 14, no. 8, pp. 817–829, 2018, doi: 10.1080/17425255.2018.1499726.
- [49] B. Gao, A. Russel, J. Beesley, X.Q. Chen, S. Healey, M. Henderson, M. Wong, C. Emmanuel, L. Galletta, S.E. Johnatty, D. Bowtell, Australian, M. Haber, M. Norris, P. Harnett, Paclitaxel sensitivity in relation to ABCB1 expression, efflux and single nucleotide polymorphisms in ovarian cancer, *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1038/srep04669.
- [50] R. Januchowski, P. Zawierucha, M. Rucinski, M. Andrzejewska, K. Wojtowicz, M. Nowicki, M. Zabel, Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line, *Biomed. Pharmacother.*, vol. 68, no. 4, pp. 447–453, 2014, doi: 10.1016/j.biopha.2014.02.002.
- [51] T. Boyer, F. Gonzales, A. Barthélémy, A. Marceau-Renaut, P. Peyrouze, S. Guihard, Pascale Lepelley, A. Plesa, Clinical significance of ABCB1 in acute myeloid leukemia: A comprehensive study, Cancers (Basel)., vol. 11, no. 9, pp. 1–15, 2019, doi: 10.3390/cancers11091323.
- [52] S.D. Undevia, G. Gomez-Abuin, M.J. Ratain, Pharmacokinetic variability of anticancer

agents, Nat. Rev. Cancer, vol. 5, no. 6, pp. 447-458, 2005, doi: 10.1038/nrc1629.

- [53] K. Natarajan, Y. Xie, M.R. Baer, D.D. Ross, Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 83, no. 8, pp. 1084–1103, 2012, doi: 10.1016/j.bcp.2012.01.002.
- [54] O.M. Woodward, A. Köttgen, M. Köttgen, ABCG transporters and disease, *FEBS J.*, vol. 278, no. 18, pp. 3215–3225, 2011, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08171.x.
- [55] M. Munoz, M. Henderson, M. Haber, M. Norris, Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer, *IUBMB Life*, vol. 59, no. 12, pp. 752–757, 2007, doi: 10.1080/15216540701736285.
- [56] F. Sullivan, D. Villanueva, S. Amenta, J. Alvarez, N. Hait, The Expression Progression of Drug Resistance of Human Prostate Gene Products Cancer, *Clin. Cancer Res.*, vol. 4, pp. 1393–1403, 1998.
- [57] J. Zalcberg, X.F. Hu, A. Slater, J. Parisot, S. El-Osta, P. Kantharidis, S.T. Chou, J.D. Parkin, MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 3, no. 2, pp. 66–75, 2000, doi: 10.1038/sj.pcan.4500394.
- [58] A.O. Pisco, S. Huang, Non-genetic cancer cell plasticity and therapy-induced stemness in tumour relapse: 'What does not kill me strengthens me,' *Br. J. Cancer*, vol. 112, no. 11, pp. 1725–1732, 2015, doi: 10.1038/bjc.2015.146.
- [59] N.R. Patel, B.S. Pattni, A.H. Abouzeid, V. Torchilin, Nanopreparations to overcome multidrug resistance in cancer, *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 65, no. 0, pp. 1–36, 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.08.004.
- [60] J.K. Saggar, I.F. Tannock, Activity of the hypoxia-activated pro-drug TH-302 in hypoxic and perivascular regions of solid tumors and its potential to enhance therapeutic effects of chemotherapy, *Int. J. Cancer*, vol. 134, no. 11, pp. 2726–2734, 2014, doi: 10.1002/ijc.28595.
- [61] D.W. Siemann, The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents, *Cancer Treat. Rev.*, vol. 37, no. 1, pp. 63–74, 2011, doi: 10.1016/j.ctrv.2010.05.001.
- [62] J. Chang, S.S. Bhasin, D.R. Bielenberg, V.P. Sukhatme, M. Bhasin, S. Huang, M.W. Kieran, D. Panigrahy, Chemotherapy-generated cell debris stimulates colon carcinoma tumor growth via osteopontin, *FASEB J.*, vol. 33, no. 1, pp. 114–125, 2019, doi: 10.1096/fj.201800019RR.
- [63] M.S. Franco, M.C. Roque, A.L.B. de Barros, J. de Oliveira Silva, G.D. Cassali, M.C. Oliveira, Investigation of the antitumor activity and toxicity of long-circulating and

fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in a murine breast cancer animal model, *Biomed. Pharmacother.*, vol. 109, pp. 1728–1739, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.011.

- [64] A.W. El-Kareh, T.W. Secomb, Two-mechanism peak concentration model for cellular pharmacodynamics of doxorubicin, *Neoplasia*, vol. 7, no. 7, pp. 705–713, 2005, doi: 10.1593/neo.05118.
- [65] B.J. Jank, M. Haas, D. Dunkler, N.J. Campion, F.F. Brkic, G. Heidushka, L. Kadletz, Analysis of Perioperative Platelet Indices and Their Prognostic Value in Head and Neck Cancer Patients Treated with Surgery and Postoperative Radiotherapy: A Retrospective Cohort Study, J. Clin. Med., vol. 8, no. 11, p. 1858, 2019, doi: 10.3390/jcm8111858.
- [66] D. Pinkel, The Use of Body Surface Area as a Criterion of Drug Dosage in Cancer Chemotherapy, *Cancer Res.*, vol. 18, no. 7, pp. 853–856, 1958.
- [67] M. Sawyer, M.J. Ratain, Body surface area as a determinant of pharmacokinetics and drug dosing, *Invest. New Drugs*, vol. 19, no. 2, pp. 171–177, 2001, doi: 10.1023/A:1010639201787.
- [68] B. Shuter, A. Aslani, Body surface area: Du Bois and Du Bois revisited, *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 82, no. 3, pp. 250–254, 2000, doi: 10.1007/s004210050679.
- [69] B. Gao, H.J. Klumpen, H. Gurney, Dose calculation of anticancer drugs, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 4, no. 10, pp. 1307–1319, 2008, doi: 10.1517/17425255.4.10.1307.
- [70] J. Verbraecken, P. Van De Heyning, W. De Backer, L. Van Gaal, Body surface area in normal-weight, overweight, and obese adults. A comparison study, *Metabolism.*, vol. 55, no. 4, pp. 515–524, 2006, doi: 10.1016/j.metabol.2005.11.004.
- [71] A. Felici, J. Verweij, A. Sparreboom, Dosing strategies for anticancer drugs: The good, the bad and body-surface area, *Eur. J. Cancer*, vol. 38, no. 13, pp. 1677–1684, 2002, doi: 10.1016/S0959-8049(02)00151-X.
- [72] G. Hempel, S. Flege, G. Wurthwein, J. Boos, Peak plasma concentrations of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma, *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 49, pp. 133–141, 2002, doi: 10.1007/s00280-001-0392-4.
- [73] B.D. Kahan, P. Keown, G.A. Levy, A. Johnston, Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice, *Clin. Ther.*, vol. 24, no. 3, pp. 330–350, 2002, doi: 10.1016/S0149-2918(02)85038-X.
- [74] R.N. Eskander, K.S. Tewari, Impact of chemotherapy-induced neutropenia on survival in patients with breast, ovarian and cervical cancer: a systematic review, *J. Hematol. Malig.*, vol. 2, no. 3, pp. 63–73, 2012, doi: 10.5430/jhm.v2n3p63.

- [75] K.D. Tew, Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance, *Cancer Res.*, vol. 76, no. 1, pp. 4313–4320, 1994, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3143.
- [76] M.E. De Jonge, A.D.R. Huitema, J.H.M. Schellens, S. Rodenhuis, J.H. Beijnen, Individualised cancer chemotherapy: Strategies and performance of prospective studies on therapeutic drug monitoring with dose adaptation: A review, *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 44, no. 2, pp. 147–173, 2005, doi: 10.2165/00003088-200544020-00002.
- [77] H. Gurney, How to calculate the dose of chemotherapy, *Br. J. Cancer*, vol. 86, no. 8, pp. 1297–1302, 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600139.
- [78] Y. Lalami, J. Klastersky, Impact of chemotherapy-induced neutropenia (CIN) and febrile neutropenia (FN) on cancer treatment outcomes: An overview about well-established and recently emerging clinical data, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 120, no. November, pp. 163–179, 2017, doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.005.
- [79] D.R. Newell, Getting the right dose in cancer chemotherapy Time to stop using surface area?, *Br. J. Cancer*, vol. 86, no. 8, pp. 1207–1208, 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600226.
- [80] L. Alnaim, Therapeutic drug monitoring of cancer chemotherapy, J. Oncol. Pharm. Pract., vol. 13, no. 4, pp. 207–221, 2007, doi: 10.1177/1078155207081133.
- [81] Y.Y. Hon, W.E. Evans, Making TDM work to optimize cancer chemotherapy: A multidisciplinary team approach, *Clin. Chem.*, vol. 44, no. 2, pp. 388–400, 1998, doi: 10.1093/clinchem/44.2.388.
- [82] S. Vodenkova, T. Buchler, K. Cervena, P. Vodicka, V. Vymetalkova, 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future, *Pharmacol. Ther.*, p. 107447, 2019, doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107447.
- [83] K. P. Smith, J.E. Kirby, The inoculum effect in the era of multidrug resistance: Minor differences in inoculum have dramatic effect on MIC Determination, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 62, no. 8, 2018, doi: 10.1128/AAC.00433-18.
- [84] A.R. Curreri, F. Ansfield, F.Mciver, H. Waisman, Clinical Studies with 5-Fluorouracil, *Cancer Res.*, vol. 18, pp. 478–484, 1958.
- [85] R.B. Diasio, B.E. Harris, Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil, *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 16, no. 4, pp. 215–237, 1989, doi: 10.2165/00003088-198916040-00002.
- [86] K. Morawska, F. Goirand, L. Marceau, M. Devaux, A. Cueff, A. Bertaut, J. Vincent, L. Bengrine-Lefevre, F. Ghiringhelli, 5-FU therapeutic drug monitoring as a valuable option to reduce toxicity in patients with gastrointestinal cancer, *Oncotarget*, vol. 9, no. 14, pp. 11559–11571, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24338.
- [87] A.A. More LA, Lane S, "5-FU Cardiotoxicity: Vasospasm, Myocarditis, and Sudden Death," *Curr Cardiol Rep*, vol. 23, no. 3, p. 17, 2021, doi: 10.1007/s11886-021-01441-2.

- [88] K. Miura, M. Kinouchi, K. Ishida, W. Fujibuchi, T. Naitoh, H. Ogawa, T. Ando, N. Tazaki, K. Watanabe, S. Haneda, C. Shibata, I. Sasaki, 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs, *Cancers (Basel).*, vol. 2, no. 3, pp. 1717–1730, 2010, doi: 10.3390/cancers2031717.
- [89] J.J. Lee, J.H. Beumer, D.A.B.T., E. Chu, Therapeutic Drug Monitoring of 5-Fluorouracil, *Cancer Chemother Pharmacol.*, vol. 78, no. 13, pp. 447–464, 2016, doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- [90] B.L. Hillcoat, P.B. Mccullocht, A.T. Figueredot, Clinical response and plasma levels of 5-Fluoruracil in patients with colonic cancer treated by drug infusion, *Br. J. Cancer*, vol. 38, pp. 719–724, 1978.
- [91] J.F. Seitz, J.P. Cano, J.P. Rigault, C. Aubert, Chemotherapy of extensive digestive cancers with 5-fluorouracil: relation between the clinical response and plasma clearance of the drug, *Gastroenterol Clin Biol*, vol. 7, pp. 374–380, 1983.
- [92] J.J. Lee, J.H. Beumer, D.A.B.T., E. Chu, Therapeutic Drug Monitoring of 5-Fluorouracil, *Cancer Chemother Pharmacol.*, vol. 78, no. 13, pp. 447–464, 2016, doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- [93] P. Canal, E. Chatelut, S. Guichard, Practical treatment guide for dose individualisation in cancer chemotherapy, *Drugs*, vol. 56, no. 6, pp. 1019–1038, 1998, doi: 10.2165/00003495-199856060-00006.
- [94] S.S. Wang, M. Zimmermann, H. Zhang, T.Y. Lin, M. Malfatti, K. Haack, K.W. Turteltaub, G.D. Cimino, A diagnostic microdosing approach to investigate platinum sensitivity in non-small cell lung cancer, *Int. J. Cancer*, vol. 141, no. 3, pp. 604–613, 2017, doi: 10.1002/ijc.30747.
- [95] S. Dasari, P.B. Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur J Pharmacol.*, vol. 740, pp. 364–378, 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.Cisplatin.
- [96] M.M. Gottesman, O. Lavi, M.D. Hall, J.P. Gillet, Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 56, no. October 2015, pp. 85–102, 2016, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103111.
- [97] S. Ghosh, Bioorganic Chemistry Cisplatin : The first metal based anticancer drug, *Bioorg. Chem.*, vol. 88, no. March, p. 102925, 2019, doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.
- [98] D. Chan *et al.*, "Phase II study of gemcitabine and carboplatin in metastatic breast cancers with prior exposure to anthracyclines and taxanes," *Invest New Drugs*, vol. 28, pp. 859– 865, 2010, doi: 10.1007/s10637-009-9305-x.
- [99] N. Shekar, P. Mallya, D.V. Gowda, V. Jain, Triple-negative breast cancer: Challenges and

treatment options, Int. J. Res. Pharm. Sci., vol. 11, no. 2, pp. 1977–1986, 2020, doi: 10.26452/ijrps.v11i2.2127.

- [100] N. Robert, B. Leyland-Jones, L. Asmar, R. Belt, D. Ilegbodu, D. Loesch, R. Raju, E. Valentine *et al.*, Randomized Phase III Study of Trastuzumab , Paclitaxel , and Carboplatin Compared With Trastuzumab and Paclitaxel in Women With HER-2 Overexpressing Metastatic Breast Cancer, *J. Clin. Oncol.*, vol. 24, no. 18, 2006, doi: 10.1200/JCO.2005.04.1764.
- [101] G. Pentheroudakis, E. Razis, A. Athanassiadis, N. Pavlidis, G. Fountzilas, Paclitaxel Carboplatin Combination Chemotherapy in Advanced Breast Cancer, *Med. Oncol.*, vol. 23, no. 2, pp. 147–160, 2006.
- [102] F.C. Kischkel, C. Meyer, J. Eich, M. Nassir, M. Mentze, I. Braicu, A. Kopp-Schneider, J. Sehouli *et al.*, Prediction of clinical response to drugs in ovarian cancer using the chemotherapy resistance test (CTR-test), *J. Ovarian Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1186/s13048-017-0365-9.
- [103] J.H. Hohnloser, R. Schierl, B. Hasford, B, Cisplatin based chemotherapy in testicular cancer patients: long term platinum excretion and clinical effects, *Eur J Med Res*, vol. 1, no. 11, pp. 509–514, 1996.
- [104] H. Van den Berg, J.N. van den Anker, J.H. Beijnen, Cytostatic drugs in infants: A review on pharmacokinetic data in infants, *Cancer Treat. Rev.*, vol. 38, no. 1, pp. 3–26, 2012, doi: 10.1016/j.ctrv.2011.03.005.
- [105] D. Kilari, K.A. Iczkowski, C. Pandya, A.J. Robin, E.M. Messing, E. Guancial, E.S Kim, Copper Transporter-CTR1 Expression and Pathological Outcomes in Platinum-treated Muscle-invasive Bladder Cancer Patients, *Anticancer Res.*, vol. 502, pp. 495–501, 2016.
- [106] H. H. W. Chen, J.J. Yan, W.C. Chen, M.T. Kuo, Y.H. Lai, W.W. Lai, H.S. Liu, W. C. Su, Predictive and prognostic value of human copper transporter 1 (hCtr1) in patients with stage III non-small-cell lung cancer receiving first-line platinum-based doublet chemotherapy, *Lung Cancer*, vol. 75, no. 2, pp. 228–234, 2012, doi: 10.1016/j.lungcan.2011.06.011.
- [107] J.N. Barreto, K.B. McCullough, L.L. Ice, J.A. Smith, Antineoplastic agents and the associated myelosuppressive effects: A review, *J. Pharm. Pract.*, vol. 27, no. 5, pp. 440– 446, 2014, doi: 10.1177/0897190014546108.
- [108] G.P. Bodey, M. Buckley, Y.S. Sathe, Quantitative Relationships Between Circulating Leukocytes and Infection in Patients with Acute Leukemia, *Ann. Intern. Med.*, vol. 64, no. 2, p. 328, Feb. 1966, doi: 10.7326/0003-4819-64-2-328.
- [109] L.S. Elting, E.B. Rubenstein, C.G. Martin, D. Kurtin, S. Rodriguez, E. Laiho, K.

Kanesan, S.B. Cantor, R.S. Benjamin, Incidence, Cost, and Outcomes of Bleeding and Chemotherapy Dose Modification Among Solid Tumor Patients With Chemotherapy-Induced Thrombocytopenia, *J. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 4, pp. 1137–1146, Feb. 2001, doi: 10.1200/JCO.2001.19.4.1137.

- [110] R.M. Ma, C.Z. Chen, W. Zhang, J. You, D.P. Huang, G.L. Guo, Prognostic value of chemotherapy-induced neutropenia at the first cycle in invasive breast cancer, *Med. (United States)*, vol. 95, no. 13, p. e3240, 2016, doi: 10.1097/MD.0000000003240.
- [111] Y. Kishida, M. Kawahara, S. Teramukai, K. Kubota, K. Komuta, K Minato, T. Mio, Y. Fujita *et al.*, Chemotherapy-induced neutropenia as a prognostic factor in advanced non-small-cell lung cancer: Results from Japan Multinational Trial Organization LC00-03, *Br. J. Cancer*, vol. 101, no. 9, pp. 1537–1542, 2009, doi: 10.1038/sj.bjc.6605348.
- [112] A. K. Agrawal, J. Feusner, Supportive Care of Patients with Cancer, Lanzkowsky's Manual Of Pediatric Hematology And Oncology, pp 620-655, 2016.
- [113] L. Rambach, A. Bertaut, J. Vincent, V. Lorgis, S. Ladoire, F. Ghiringhelli, Prognostic value of chemotherapy-induced hematological toxicity in metastatic colorectal cancer patients, *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 6, pp. 1565–1573, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i6.1565.
- [114] Z. Chen, W. Chen, J. Wang, M. Zhu, Z. Zhuang, Pretreated baseline neutrophil count and chemotherapy-induced neutropenia may be conveniently available as prognostic biomarkers in advanced gastric cancer, *Intern. Med. J.*, vol. 45, no. 8, pp. 854–859, 2015, doi: 10.1111/imj.12786.
- [115] M. Di Maio, C. Gridelli, C. Gallo, F. Shepherd, F.V. Piantedosi, S. Cigolari, L. Manzione,
 A. Illiano, *et al.*, Chemotherapy-induced neutropenia and treatment efficacy in advanced non-small-cell lung cancer: A pooled analysis of three randomised trials, *Lancet Oncol.*, vol. 6, no. 9, pp. 669–677, 2005, doi: 10.1016/S1470-2045(05)70255-2.
- [116] A.M. Aliper, V.P. Frieden-Korovkina, A. Buzdin, S.A. Roumiantsev, A. Zhavoronkov, A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers, *Cancer Med.*, vol. 3, no. 4, pp. 737– 746, 2014, doi: 10.1002/cam4.239.
- [117] L.C. Pelosof, D.E. Gerber, Paraneoplastic syndromes: An approach to diagnosis and treatment, *Mayo Clin. Proc.*, vol. 85, no. 9, pp. 838–854, 2010, doi: 10.4065/mcp.2010.0099.
- [118] R. Cabry, S. Ballyamanda, M. Kraft, E. Hong, Understanding paraneoplastic syndromes in athletes, *Curr. Sports Med. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 33–40, 2013, doi: 10.1249/JSR.0b013e31827fdd47.
- [119] J.L. Davis, R.T. Ripley, T.L. Frankel, I. Maric, J.N. Lozier, Paraneoplastic granulocytosis

in metastatic melanoma, *Melanoma Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 326–329, 2010, doi: 10.1038/jid.2014.371.

- [120] N. Kanaji, N. Watanabe, N. Kita, S. Bandoh, A. Tadokoro, T. Ishii, H. Dobashi, T. Matsunga, Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer, *World J. Clin. Oncol.*, vol. 5, no. 3, pp. 197–223, 2014, doi: 10.5306/wjco.v5.i3.197.
- [121] M.T. McClelland, Paraneoplastic syndromes related to lung cancer, *Clin. J. Oncol. Nurs.*, vol. 14, no. 3, pp. 357–364, 2010, doi: 10.1188/10.CJON.357-364.
- [122] C.M. Gutschalk, C.C. Herold-Mende, N.E. Fusenig, M.M. Mueller, Granulocyte colonystimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo, *Cancer Res.*, vol. 66, no. 16, pp. 8026–8036, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0158.
- [123] B. Schniewind, M. Christgen, A. Hauschild, R. Kurdow, H. Kalthoff, H.J. Klomp, Paraneoplastic leukemoid reaction and rapid progression in a patient with malignant melanoma: Establishment of KT293, a novel G-CSF-secreting melanoma cell line, *Cancer Biol. Ther.*, vol. 4, no. 1, pp. 30–34, 2004, doi: 10.4161/cbt.4.1.1447.
- [124] T. Yamanaka, S. Matsumoto, S. Teramukai, R. Ishiwata, Y. Nagai, M. Fukushima, Predictive value of chemotherapy-induced neutropenia for the efficacy of oral fluoropyrimidine S-1 in advanced gastric carcinoma, *Br. J. Cancer*, vol. 97, no. 1, pp. 37– 42, 2007, doi: 10.1038/sj.bjc.6603831.
- [125] Y. Wang, Y. Chen, H. Yin, X. Gu, Y. Shi, G. Dai, Timing of chemotherapy-induced neutropenia is a prognostic factor in patients with advanced gastric cancer undergoing first-line chemotherapy with oxaliplatin and capecitabine: a retrospective study, *Cancer Med.*, vol. 7, no. 4, pp. 997–1005, 2018, doi: 10.1002/cam4.1308.
- [126] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologie developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.*, vol. 56, no. 2, pp. 185–229, 2004, doi: 10.1124/pr.56.2.6.
- [127] E. Alexieva, B. Sainova, I. Pavlova, V. Markova, T.Z. Valkova, I. Nikolova, Insights into mechanisms of doxorubicin cardiotoxicity, *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 4, no. 3, pp. 342– 348, 2014.
- [128] J.B. Wolinsky, Y.L. Colson, M.W. Grinstaff, Local Drug Delivery Strategies for Cancer Treatment: Gels, Nanoparticles, Polymeric Films, Rods, and Wafers, *J. Control Release*, vol. 159, no. 1, pp. 14–26, 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.11.031.Local.
- [129] M. Daeihamed, A. Haeri, S. Dadashzadeh, A simple and sensitive HPLC method for fluorescence quantitation of doxorubicin in micro-volume plasma: Applications to pharmacokinetic studies in rats, *Iran. J. Pharm. Res.*, vol. 14, no. December 2014, pp. 33–

42, 2015, doi: 10.22037/ijpr.2015.1710.

- [130] S.A. Abraham, D.N. Waterhouse, L.D. Mayer, P.R. Cullis, T.D. Madden, The liposomal formulation of doxorubicin., *Methods Enzym.*, vol. 391, pp. 71–97, 2005.
- [131] L.M. Kaminskas, V.M. McLeod, B.D. Kelly, G. Sberna, B.J. Boyd, M. Williamson, D.J. Owen, A comparison of changes to doxorubicin pharmacokinetics, antitumor activity, and toxicity mediated by PEGylated dendrimer and PEGylated liposome drug delivery systems, *Nanomed.*, vol. 8, pp. 103–111, 2012.
- [132] R. Pan, X, Lee, Construction of anti-EGFR immunoliposomes via folate-folate binding protein affinity, *Int. J. Pharm.*, vol. 336, pp. 276–283, 2007.
- [133] T.G. Yoo, H.S, Park, Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer, J. Control. Release., vol. 70, pp. 63–70, 2001.
- [134] T. Yang, F.D. Cui, M.K. Choi, J.W. Cho, S.J. Chung, C.K. Shim, D.D. Kim, Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *In vitro* and *in vivo* evaluation, *Int. J. Pharm.*, vol. 338, no. 1–2, pp. 317–326, 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.02.011.
- [135] D. Kalyane, N. Raval, R. Maheshwari, V. Tambe, K. Kalia, R. K. Tekade, Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 98, no. August 2018, pp. 1252–1276, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.01.066.
- [136] E. Gullotti, Y. Yeo, Extracellularly activated nanocarriers: A new paradigm of tumor targeted drug delivery, *Mol. Pharm.*, vol. 6, no. 4, pp. 1041–1051, 2009, doi: 10.1517/13543776.9.11.1499.
- [137] T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science (80).*, vol. 303, no. 5665, pp. 1818–1822, 2004, doi: 10.1126/science.1095833.
- [138] E.S. Lee, K.T. Oh, D. Kim, S.Y. Youn, Y.H. Bae, Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(L-lactic acid)-b- poly(ethylene glycol)-b-poly(L-histidine), *J Control Release.*, vol. 123, no. 1, pp. 19–26, 2007, [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf.
- [139] D.E. Owens, N.A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, vol. 307, no. 1, pp. 93–102, 2006, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
- [140] N. Oku, Y. Tokudome, T. Asai, H. Tsukada, Evaluation of Drug Targeting Strategies and Liposomal Trafficking, *Curr. Pharm. Des.*, vol. 6, no. 16, pp. 1669–1691, 2005, doi: 10.2174/1381612003398816.
- [141] L.E. Van Vlerken, T.K. Vyas, M.M. Amiji, Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery, *Pharm. Res.*, vol. 24, no. 8, pp. 1405–1414,

2007, doi: 10.1007/s11095-007-9284-6.

- [142] G.T. Colbern, A.J. Hiller, R.S. Musterer, E. Pegg, I.C. Henderson, P.K. Working, Significant increase in antitumor potency of doxorubicin HCl by its encapsulation in pegylated liposomes, *J. Liposome Res.*, vol. 9, no. 4, pp. 523–538, 1999, doi: 10.3109/08982109909035551.
- [143] A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz, Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: Review of animal and human studies, *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 42, no. 5, pp. 419–436, 2003, doi: 10.2165/00003088-200342050-00002.
- [144] A. Gabizon, H. Shmeeda, S. Zalipsky, Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting, *J. Liposome Res.*, vol. 16, no. 3, pp. 175–183, 2006, doi: 10.1080/08982100600848769.
- [145] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, pp. 751–760, 2007, doi: 10.1038/nnano.2007.387.
- [146] P. Mishra, B. Nayak, R.K. Dey, PEGylation in anti-cancer therapy: An overview, Asian J. Pharm. Sci., vol. 11, no. 3, pp. 337–348, 2016, doi: 10.1016/j.ajps.2015.08.011.
- [147] S. Mishra, P. Webster, M.E. Davis, PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles, *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 83, no. 3, pp. 97–111, 2004, doi: 10.1078/0171-9335-00363.
- [148] K. Remaut, B. Lucas, K. Braeckmans, J. Demeester, S.C. De Smedt, Pegylation of liposomes favours the endosomal degradation of the delivered phosphodiester oligonucleotides, *J. Control. Release*, vol. 117, no. 2, pp. 256–266, 2007, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.10.029.
- [149] T.O. Harasym, P.R. Cullis, M.B. Bally, Intratumor distribution of doxorubicin following i.v. administration of drug encapsulated in egg phosphatidylcholine/cholesterol liposomes, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 40, no. 4, pp. 309–317, 1997, doi: 10.1007/s002800050662.
- [150] E. Chen, B.M. Chen, Y.C. Su, Y.C. Chang, T.L. Cheng, Y. Barenholz, S.R. Roffler, Premature Drug Release from Polyethylene Glycol (PEG)-Coated Liposomal Doxorubicin via Formation of the Membrane Attack Complex, *ACS Nano*, vol. 14, no. 7, pp. 7808–7822, 2020, doi: 10.1021/acsnano.9b07218.
- [151] A.L.B. Seynhaeve, B.M. Dicheva, S. Hoving, G.A. Koning, T.L.M. ten Hagen, Intact Doxil is taken up intracellularly and released doxorubicin sequesters in the lysosome: Evaluated by in vitro/in vivo live cell imaging, *J. Control. Release*, vol. 172, no. 1, pp. 330–340, 2013, doi: 10.1016/j.jconrel.2013.08.034.

- [152] S. Stewart, K.J. Harrington, The Biodistribution and Pharmacokinetics of Stealth Liposomes in Patients with Solid Tumors, *Oncology*, vol. 11, no. 10 SUPPL. 12, pp. 33– 37, 1997.
- [153] R. McMenemin, G. Macdonald, L. Moffat, D. Bissett, A phase II study of CaelyxTM (liposomal doxorubicin) in metastatic carcinoma of the prostate: Tolerability and efficacy modification by liposomal encapsulation, *Invest. New Drugs*, vol. 20, no. 3, pp. 331–337, 2002, doi: 10.1023/A:1016225024121.
- [154] M. Sharpe, S.E. Easthope, G.M. Keating, H.M. Lamb, Polyethylene glycol-liposomal doxorubicin: A review of its use in the management of solid and haematological malignancies and AIDS-related Kaposi's sarcoma, *Drugs*, vol. 62, no. 14, pp. 2089–2126, 2002, doi: 10.2165/00003495-200262140-00012.
- [155] C. de L Davies, L.M. Lundstrøm, J. Frengen, L. Eikenes, Ø.S. Bruland, O. Kaalhus, M.H.B Hjelstuen, Radiation Improves the Distribution and Uptake of Liposomal Doxorubicin (Caelyx) in Human Osteosarcoma Xenografts, *Cancer Res.*, vol. 64, no. 2, pp. 547–553, 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0576.
- [156] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, H. Ashrafi, A Pharmacokinetic Overview of Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems: An ADME-Oriented Approach, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 30, no. 5, pp. 435–467, 2013, doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013007419.
- [157] S.X Peng, B.A Rockafellow, T.M Skedzielewski, N.D Huebert, Improved Pharmacokinetic and Bioavailability Support of Drug Discovery Using Serial Blood Sampling in Mice, J. Pharm. Sci., vol. 98, no. 5, pp. 2271–2280, 2009, doi: 10.1002/jps.
- [158] N. Rosenthal, S. Brown, The mouse ascending: Perspectives for human-disease models, *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 993–999, 2007, doi: 10.1038/ncb437.
- [159] J.N. Noble, A. Mishra, Development and Significance of Mouse Models in Lymphoma Research, *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, 2019, doi: 10.1007/s11899-019-00504-0.
- [160] R. Kohnken, P. Porcu, A. Mishra, Overview of the use of murine models in leukemia and lymphoma research, *Front. Oncol.*, vol. 7, no. FEB, 2017, doi: 10.3389/fonc.2017.00022.
- [161] S. Donnou, C. Galand, V. Touitou, C. Sautès-Fridman, Z. Fabry, S. Fisson, Murine models of B-Cell lymphomas: Promising tools for designing cancer therapies, *Adv. Hematol.*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/701704.
- [162] T. Chi-ping, D. Merlino, G. Van Dyke, Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges, *Cell*, vol. 163, no. 1, pp. 39–53, 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.08.068.
- [163] D.R. Senger, L. Van de Water, L.F. Brown, J.A. Nagy, K.T. Yeo, Vascular permeability

factor (VPF, VEGF) in tumor biology, *Cancer Metastasis Rev*, vol. 12, pp. 303–324, 1993.

- [164] M. Moghaddam, S.M. Amini, A. Morris, D.L. Pourgholami, Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer, *Cancer Metastasis Rev*, vol. 31, pp. 143–162, 2012.
- [165] A. Gossmann, T.H. Helbich, S. Mesiano, D.M. Shames, M.F. Wendland, T.P. Roberts, N. Ferrara, R.B. Jaffe, RC. Brasch, Magnetic resonance imaging in an experimental model of human ovarian cancer demonstrating altered microvascular permeability after inhibition of vascular endothelial growth factor, *Am J Obs. Gynecol*, vol. 183, pp. 956–963, 2000.
- [166] W.G. Telford, L.E. King, P.J. Fraker, Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry, *Cytometry*, vol. 13, no. 2, pp. 137–143, 1992, doi: 10.1002/cyto.990130205.
- [167] I. Lakshmanan, S. Batra, Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method, *Bio-Protocol*, vol. 3, no. 6, 2013, doi: 10.21769/bioprotoc.374.
- [168] T. Yardeni, M. Eckhaus, H.D. Morris, M. Huizing, S. Hoogstraten-Miller, Retro-orbital injections in mice, *Lab Anim. (NY).*, vol. 40, no. 5, pp. 155–160, 2011, doi: 10.1038/laban0511-155.
- [169] N.H. Urrunaga, A.G. Singal, J.A. Cuthbert, D.C. Rockey, Hemorrhagic ascites. Clinical presentation and outcomes in patients with cirrhosis, *J. Hepatol.*, vol. 58, no. 6, pp. 1113– 1118, 2013, doi: 10.1016/j.jhep.2013.01.015.
- [170] J. Chang, G. Lin, M. Ye, D. Tong, J Zhao, D. Zhu, Q. Yu, W. Zhang, W. Li, Decreased mean platelet volume predicts poor prognosis in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy: Results from mCRC biomarker study, *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1186/s12885-018-5252-2.
- [171] H.A. Jung, H.J. Kim, C.H. Maeng, S.H Park, J. Lee, J.O. Park, Y.S. Park, H.Y. Lim, W.K. Kang, Changes in the mean corpuscular volume after capecitabine treatment are associated with clinical response and survival in patients with advanced gastric cancer, *Cancer Res. Treat.*, vol. 47, no. 1, pp. 72–77, 2015, doi: 10.4143/crt.2013.172.
- [172] M. Omar, O. Tanriverdi, S. Cokmert, E. Oktay, O Yersal, K.N. Pilanc, S. Menekse, M. Kocar, C.A Sen, C. Ordu, G. Goksel, N. Meydan, Role of increased mean platelet volume (MPV) and decreased MPV/platelet count ratio as poor prognostic factors in lung cancer, *Clin. Respir. J.*, vol. 12, no. 3, pp. 922–929, 2018, doi: doi: 10.1111/crj.12605.
- [173] Y. Cao, Q. Chang, M. Cabanero, W. Zhang, S. Hafezi-Bakhtiari, D. Hedley, G. Darling,F. Quereshy *et al.*, Tumor Platinum Concentrations and Pathological Responses

Following Cisplatin-Containing Chemotherapy in Gastric Cancer Patients, *J. Gastrointest. Cancer*, vol. 50, no. 4, pp. 801–807, 2019, doi: 10.1007/s12029-018-0153-9.

- [174] H.F. Dullens, J. Hilgers, B.J. Spit, E. De Heer, R.A. De Weger, C.D. Van Basten, W. Den Otter, Staging, growth properties and metastatic behaviour of a transplantable murine T-cell lymphoma, *Int J Tissue React*, vol. 4, no. 1, pp. 15–25, 1982.
- [175] E.E.M. Brouwers, A.D.R. Huitema, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin, *BMC Clin. Pharmacol.*, vol. 8, pp. 1–10, 2008, doi: 10.1186/1472-6904-8-7.
- [176] M. Fiallo, A. Laigle, M.N. Borrel, A. Garnier-Suillerot, Accumulation of degradation products of doxorubicin and pirarubicin formed in cell culture medium within sensitive and resistant cells, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 45, no. 3, pp. 659–665, 1993, doi: 10.1016/0006-2952(93)90140-R.
- [177] P. Changenet-Barret, T. Gustavsson, D. Markovitsi, I. Manet, S. Monti, Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 8, pp. 2937–2944, 2013, doi: 10.1039/c2cp44056c.
- [178] U. Gala, H. Chauhan, Principles and applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical drug discovery and development, *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 10, no. 2, pp. 187–206, 2015, doi: 10.1517/17460441.2015.981522.
- [179] S. Yang, F, Teves, SS, Kemp, CJ, Henikoff, Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics, *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1845, no. 1, pp. 84–89, 2014, doi: 10.1016/j.bbcan.2013.12.002.Doxorubicin.
- [180] A. Rahman, M. Harris, Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin (DX) entrapped in cardiolipin liposomes, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. VOL. 26, no. May, pp. 2295–2299, 1985.
- [181] Y. Takemura, H. Kobayashi, H. Miyachi, K. Hayashi, S. Sekiguchi, T. Ohnuma, The influence of tumor cell density on cellular accumulation of doxorubicin or cisplatin in vitro, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 27, no. 6, pp. 417–422, 1991, doi: 10.1007/BF00685154.
- [182] H.J.M. de Jonge, P.J.M.Valk, E.S. de Bont, J.J. Schuringa, G. Ossenkoppele, E. Vellenga, G. Huls. Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: Relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD, *Haematologica*, vol. 96, no. 9, pp. 1311–1317, 2011, doi: 10.3324/haematol.2011.040592.
- [183] A.K. Nanayakkara, C.A. Follit, G. Chen, N.S. Williams, P.D. Vogel, J.G. Wise, Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug

resistant tumor cells, *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–18, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-19325-x.

- [184] J.A Nagy, E.M. Masse, K.T. Herzberg, M.S. Meyers, K.T. Yeo, T.K. Yeo, T.M. Sioussat,
 H. Dvorak, Pathogenesis of Ascites Tumor Growth: Vascular Permeability Factor,
 Vascular Hyperpermeability, and Ascites Fluid Accumulation, *Cancer Res.*, vol. 55, no.
 2, pp. 360–368, 1995.
- [185] A.C. Pieck, A. Drescher, K.G. Wiesmann, J. Messerschmidt, G. Weber, D. Strumberg,
 R.A. Hilger, M E. Scheulen, U. Jaehde, Oxaliplatin-DNA adduct formation in white
 blood cells of cancer patients, *Br. J. Cancer*, pp. 1959–1965, 2008, doi:
 10.1038/sj.bjc.6604387.
- [186] J. H. M. Schellens, J. Ma, A.S. Planting, M.E. van der Burg, E. van Meerten, M. de Boer-Dennert, P.I. Schmitz, G. Stoter, J. Verweij, Relationship between the exposure to cisplatin, DNA-adduct formation in leucocytes and tumour response in patients with solid tumours, *Br. J. Cancer*, no. July 1995, pp. 1569–1575, 1996.
- [187] E. Reed, R.F. Ozols, R. Tarone, S.H. Yuspa, M.C. Poirier, Platinum-DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian cancer patients receiving platinum-based chemotherapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 14, pp. 5024– 5028, 1987, doi: 10.1073/pnas.84.14.5024.
- [188] M.C. Poirier, M.J. Egorin, A.M. Fichtinger-Schepman, S.H. Yuspa, DNA adducts of cisplatin and carboplatin in tissues of cancer patients, *IARC Sci Publ*, vol. 89, pp. 313 – 320, 1988.
- [189] S. Wang, M. Zimmermann, H. Zhang, T.Y. Lin, M. Malfatti, K. Haack, K.W. Turteltaub, G.D Cimino *et al.*, A Diagnostic Microdosing Approach to Investigate Platinum Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer, *Int J Cancer.*, vol. 141, no. 3, pp. 604–613, 2018, doi: 10.1002/ijc.30747.
- [190] E. Reed, S.H. Yuspa, L.A. Zwelling, R.F. Ozols, M.C. Poirier, Quantitation of cisdiamminedichloroplatinum II (cisplatin)-DNA-intrastrand adducts in testicular and ovarian cancer patients receiving cisplatin chemotherapy, *J. Clin. Investig. Inc.*, vol. 77, no. February, pp. 545–550, 1986.
- [191] Y.W. Eom, M.A. Kim, S.S. Park, M. J. Goo, H.J. Kwon, S. Sohn, W.H. Kim *et al.*, Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: Apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype, *Oncogene*, vol. 24, no. 30, pp. 4765–4777, 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208627.
- [192] Y. Matsumura, Y. Ozaki, H. Ohmori, Intravesical Adriamycin chemotherapy in bladder cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 11, no. S1, Nov. 1983, doi:

10.1007/BF00256723.

- [193] R. Anand, S. Ottani, F. Manoli, I. Manet, S. Monti, A close-up on doxorubicin binding to γ-cyclodextrin: An elucidating spectroscopic, photophysical and conformational study, *RSC Adv.*, vol. 2, no. 6, pp. 2346–2357, 2012, doi: 10.1039/c2ra01221a.
- [194] D. Kaushik G. Bansal, Four new degradation products of doxorubicin: An application of forced degradation study and hyphenated chromatographic techniques, *J. Pharm. Anal.*, vol. 5, no. 5, pp. 285–295, 2015, doi: 10.1016/j.jpha.2015.05.003.
- [195] N.S.H. Motlagh, P. Parvin, F. Ghasemi, F. Atyabi, Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin, *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 6, p. 2400, 2016, doi: 10.1364/boe.7.002400.
- [196] J.B. Wolinsky, Y.L. Colson, M.W. Grinstaff, Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers, *J. Control. Release*, vol. 159, no. 1, pp. 14–26, 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.11.031.
- [197] N. Arnold, H, Bourseaux, F, Brock, Chemotherapeutic Action of a Cyclic Nitrogen Mustrad Phosphamide Ester (B 518-ASTA) in Experimental Tumours of the Rat, *Nature*, vol. 181, no. 4613, p. 931, 1958, doi: 10.1038/181931a0.
- [198] M.J. Boers-Sonderen, C.M.L. van Herpen, W.T.A. van der Graaf, I. M.E Desar, M. G.W. van der Logt, Y.M. de Beer, P.B. Ottevanger *et al.*, Correlation of toxicity and efficacy with pharmacokinetics (PK) of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) (Caelyx®), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 74, no. 3, pp. 457–463, 2014, doi: 10.1007/s00280-014-2514-9.
- [199] A. Lyass, O. Uziely, B. Ben-Yosef, R. Tzemach, D. Heshing, N.I. Lotem, M. Brufman,
 G. Bagizon, Correlation of Toxicity with Pharmacokinetics of Breast Carcinoma, *Cancer*,
 vol. 89, no. 5, pp. 1037–1047, 2000.

PUBLIKACIJOS

Publikacijos, tiesiogiai susijusios su daktaro disertacija

Atspausdinta

Doxorubicin uptake in ascitic lymphoma model: resistance or curability is governed by tumor cell density and prolonged drug retention

Autoriai: Zaleskis G., <u>Garberyte S.</u>, Pavliukeviciene B., Valincius G., Characiejus D., Mauricas M., Kraśko J., Zilionyte K., Zvirblė M., Pasukoniene V. Journal of Cancer. 2020; 11(22): 6497–6506. doi: 10.7150/jca.46066

Comparative evaluation of cellular uptake of free and liposomal doxorubicin following short term exposure.

Autoriai: Zaleskis G., <u>Garberytė S.</u>, Pavliukevičienė, Kraśko J. A., Skapas M., Talaikis M., Darinskas A., Žibutytė L., Pašukonienė V. Anticancer Research. 2021; 41(5): 2363–2370. doi: 10.21873/anticanres.15011

Įteikta

A model of chemotherapy-induced tumor dormancy: doxorubicin retention and degradation defines resumed growth *in vivo*?.

Autoriai: Zaleskis G., <u>Garberytė S.</u>, Pavliukevičienė, Characiejus D., Žilionytė K., Kraśko J. A., Karabanovas V., Matusevičienė N., Kučinskaitė V. B., Rotomskis R., Pašukonienė V.

Publikacijos, tiesiogiai nesusijusios su daktaro disertacija

Atspausdinta

Human articular chondrocytes with higher Aldehyde dehydrogenase activity have stronger expression of COL2A1 and SOX9

Authors: Unguryte A., Bernotiene E., Bagdonas E., Garberyte S, Porvaneckas N., Jorgensen C. Osteoarthritis and Cartilage, 2015

Chemokine profiling in serum from patients with ovarian cancer reveals candidate biomarkers for recurrence and immune infiltration

Authors: Mlynska A., Salciuniene, G., Zilionyte K., <u>Garberyte S</u>., Strioga M., Intaite B., Barakauskiene A., Lazzari G., Dobrovolskiene N., Kraśko J., Pasukoniene V. Oncology Reports, 2019.

PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

Pranešimai, tiesiogiai susiję su daktaro disertacijos tema:

1. Tarptautinė konferencija Vita Scientia 2020 (2020 m. sausio mėn. 3 d. Vilnius, Lietuva)

"Intracellular doxorubicin kinetics in lymphoma cells and lymphocytes infiltrating the tumor area in vivo" (pranešimas žodžiu)

Autoriai: Garberyte S., Zvirble M., Mlynska A., Matuseviciene N., Pavliukeviciene B.

2. 14th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference, Slovakia) (atšaukta dėl COVID-19)

"Doxorubicin cellular retention patterns correlate with therapeutic response in ascitic lymphoma bearing mice" (stendinis pranešimas)

Autoriai: Garberyte S., Zvirble M., Zilionyte K., Kraśko J., Matuseviciene N., Pavliukeviciene B., Zaleskis G., Pasukoniene V.

 <u>63rd International Conference for Students of Physics and Natural Sciences Open</u> Readings 2020 (2020 m. kovo mėn. 17-20 d.d., Vilnius, Lietuva) (atšaukta dėl COVID-19)

"Doxorubicin cellular retention patterns correlate with therapeutic response in ascitic lymphoma bearing mice" (stendinis pranešimas)

Autoriai: **Sima Garberytė**, Margarita Žvirblė, Karolina Žilionytė, Jan Aleksander Kraśko, Nijolė Matusevičienė, Božena Pavliukevičienė, Gintaras Zaleskis

<u>8th Summer School of Immunology</u>, 2021 metų gegužės 24-27 d. d. (virtualiai)
 "Doxorubicin retention and degradation define resumed growth *in vivo*" (stendinis pranešimas)

Autoriai: **Sima Garberyt**ė, Božena Pavliukevičienė, Vitalijus Karabanovas, Vakarė Barbora Kučinskaitė, Lavija Žibutytė, Gintaras Zaleskis, Vita Pašukonienė

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju NVI Imunologijos laboratorijos vedėjai, disertacijos darbo vadovei dr. Vitai Pašukonienei už galimybę atlikti disertacijos darbą jos vadovaujamoje laboratorijoje, už suteiktus vertingus patarimus, nuoširdų rūpestį, pagalbą ir nuolatinį palaikymą atliekant šį darbą.

Labai dėkoju disertacijos darbo konsultantui dr. Gintarui Zaleskiui už puikių idėjų generavimą, nuolatinį palaikymą, vertingus patarimus ir palaikymą ruošiant šį darbą.

Esu dėkinga pirmam doktorantūros vadovui dr. Mariui Striogai už galimybę pradėti doktorantūros studijas jo vadovaujama tema.

Labai dėkoju VU GMC vadovui dr. Gintarui Valinčiui ir dr. Boženai Pavliukevičienei už galimybę atlikti chromatografijos analizę ir pagalbą analizuojant rezultatus.

Esu labai dėkinga NVI Biomedicininės fizikos laboratorijos vedėjui prof. habil. dr. Ričardui Rotomskiui už galimybę naudotis jo vadovaujamos laboratorijos resursais. Nuoširdžiai dėkoju dr. Vitalijui Karabanovui už konfokalinės mikroskopijos tyrimus ir pagalbą vertinant rezultatus.

Dėkoju dr. Gediminui Niaurai už galimybę atlikti tyrimus jo vadovaujamoje FTMC Spektroelektrochemijos laboratorijoje ir dr. Martynui Talaikiui už atliktus Ramano spektroskopijos tyrimus.

Labai dėkoju FTMC Medžiagų struktūrinės analizės skyriaus mokslo darbuotojui dr. Martynui Skapui už elektroninę mikroskopiją, NVI Laboratorinių tyrimų skyriaus medicinos biologei doktorantei Margaritai Žvirblei už tepinėlių mikroskopiją.

Esu dėkinga studentams Mariui Pavlovui, Vakarei Barborai Kučinskaitei ir Lavijai Žibutytei už pagalbą atliekant eksperimentus.

Nuoširdžiai dėkoju doktorantei jaunesniajai mokslo darbuotojai Karolinai Žilionytei ir dr. Janui Kraśko už svarbų indėlį atliekant citometrijos tyrimus, patarimus ir palaikymą.

Atskirai norėčiau padėkoti žmonėms, padėjusiems žengti pirmus žingsnius mokslo srityje: pirmai mokslinei vadovei dr. Aušrai Ungurytei už suteiktas teorines žinias ir praktinius įgūdžius ruošiant bakalauro darbą, magistro darbo konsultantei kolegei dr. Agatai Mlynskai už kantrybę, pagalbą, vertingus patarimus ruošiant magistro darbą, geranoriškumą ir palaikymą disertacijos darbo metu.

Nuoširdi padėka visam NVI laboratorijos kolektyvui už palaikymą, pagalbą ir puikią atmosferą laboratorijoje.

Esu labai dėkinga šeimai, draugams ir artimiesiems už palaikymą, supratingumą ir buvimą šalia.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Sima Garberytė (1989-01-10)

El. paštas: <u>sima.garberyte@gmail.com</u> Mob. tel: +370 613 81473

LinkedIn: <u>https://www.linkedin.com/in/sima-garberytė-449a06a8</u> Researchgate: <u>https://www.researchgate.net/profile/Sima-Garberyte</u> ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6069-2086

Išsilavinimas:

- 2015–2020 m. Biologijos mokslo krypties doktorantūros studijos Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras (Vilnius, Lietuva) Darbo tema: Citotoksinių vaistų įsisavinimo ir sulaikymo organizme sąsąjų su chemoterapiniu atsparumu ir naviko atkryčiu įvertinimas
- 2012–2014 m. Biochemijos magistras, Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
 Darbo tema: Prediktyvinių žymenų vertinimas naviko mikroaplinkoje ir periferiniame kraujyje
- 2008–2012 m. Biochemijos bakalauras, Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
 Darbo tema: Iš kremzlės išskirtų ląstelių išskirstymas tėkmės citometru-skirstytuvu ir šių ląstelių tyrimas

Mokslinio darbo patirtis:

- 2015–2020 m. Doktorantė, Nacionalinio vėžio institutas (Vilnius, Lietuva)
- 2012–2014 m. Mokslinė laboratorinė praktika ruošiant magistro baigiamąjį darbą Nacionalinis vėžio institutas (Vilnius, Lietuva)
- 2011–2012 m. Mokslinė laboratorinė praktika ruošiant bakalauro baigiamąjį darbą
 Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras (Vilnius, Lietuva)
- 2011 m. Laborantė, Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras (Vilnius, Lietuva)

Stažuotė:

 2018–2019 m. Mokslinė išvyka atlikti tiriamąjį darbą Arielio Universitetas (Arielis, Izraelis)

Mokslinė produkcija:

- 4 publikacijos
- 7 tarptautinės konferencijos

CURRICULUM VITAE

Sima Garberytė (1989-01-10)

Email: <u>sima.garberyte@gmail.com</u> Tel: +370 613 81473

LinkedIn: <u>https://www.linkedin.com/in/sima-garberytė-449a06a8</u> Researchgate: <u>https://www.researchgate.net/profile/Sima-Garberyte</u> ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6069-2086

Education:

 PhD studies in biology, State Research Institute Centre for Innovative Medicine, 2015–2020

Thesis: Evaluation of pattern of chemotherapy resistance and tumour relapse related to cytotoxic drug uptake and retention

- Biochemistry, M.Sc, Vilnius University, 2012–2014
 Thesis: Evaluation of predictive markers in tumour microenvironment and peripheral Blood
- Biochemistry, B.Sc, Vilnius University, 2008–2012 Thesis: *Flow sorting and analysis of cells, isolated from cartilage*

Research experience:

- PhD Student at National Cancer Institute, 2015–2020
- Scientific laboratory practice at National Cancer Institute, 2012–2014
- Scientific laboratory practice at State Research Institute Centre for Innovative Medicine, 2011
- Laboratory technician, State Research Institute Centre for Innovative Medicine, 2011
- Foreign internship in Ariel University (Israel), 2018–2019

Scientific production:

- 4 publications
- 7 international conferences

PRIEDAI





Priedas B. Antraciklinų daunorubicino, epirubicino tėkmės citometrijos analizė. Ilgalaikio (365 d.) 37 °C poveikio vertinimas





Priedas C. Antraciklinų epirubicino ir daunorubicino sugerties spektrai. Ilgalaikio (365 d.) 37 °C poveikio vertinimas



Priedas D. Antraciklinų epirubicino ir daunorubicino fluorescencijos spektrai. Ilgalaikio (365 d.) 37 °C poveikio vertinimas



Priedas E. Liposominio doksorubicino "Caelyx" kriogeninė transmisijos elektroninė mikroskopija





Priedas F. Platinos vaistų cheminė struktūra [95]
Sima GARBERYTĖ

CITOTOKSINIŲ VAISTŲ ĮSISAVINIMO IR SULAIKYMO ORGANIZME SĄSAJŲ SU CHEMOTERAPINIU ATSPARUMU IR NAVIKO ATKRYČIU ĮVERTINIMAS

Mokslo daktaro disertacija

Redakcija autorės

Spausdino – Vytauto Didžiojo universitetas K. Donelaičio g. 58, LT-44248 Kaunas Užsakymo Nr. K21-048. Tiražas 15 egz. 2021 08 10. Nemokamai.