UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JAN GREGOREC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JAN GREGOREC

VPLIV OUABAINA NA PREŽIVETJE IN RAST ČLOVEŠKIH CELIC RAKA DOJKE MDA-MB-231 IN MCF-7 V CELIČNI KULTURI IN NA MODELU TUMORSKIH SFEROIDOV *IN VITRO*

EFFECTS OF OUABAIN ON SURVIVAL AND PROLIFERATION OF HUMAN BREAST CANCER CELL LINES MDA-MB-231 AND MCF-7 IN CELL CULTURE AND SPHEROID MODELS *IN VITRO*

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za elektrotehniko pod mentorstvom viš. znan. sod., doc. dr. Mojce Pavlin, univ. dipl. fiz. in doc. dr. Tomaža Bratkoviča, mag. farm. Praktično delo sem opravil v laboratoriju Skupine za nano in biotehnološke aplikacije, ki deluje v sklopu Laboratorija za biofiziko. Spektrofluorimetrične meritve, meritve na pretočnem citometru, mikroskopijo in druga merjenja sem opravil na Fakulteti za elektrotehniko v prostorih Infrastrukturnega centra *Celična elektrotehnika*.

ZAHVALA

Ob tej priložnosti bi se najprej zahvalil viš. znan. sod., doc. dr. Mojci Pavlin, univ. dipl. fiz. za vso pomoč, nasvete in napotke pri praktičnem delu ter za prijaznost in dostopnost. Zahvaljujem se tudi mentorju, doc. dr. Tomažu Bratkoviču, mag. farm. za vso pomoč pri izdelavi naloge. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Sergeju Pirkmajerju, dr. med za izhodišča povezana z ouabainom. Zahvalil bi se tudi celotnemu kolektivu Skupine za nano in biotehnološke aplikacije, za vso pomoč in nasvete pri nastanku tega dela, za odlično delovno ozračje, kot tudi za vse nasvete in pogovore, ki jih bom imel v mislih na moji profesionalni in osebni poti.

Na koncu pa bi se rad zahvalil vsem najbližjim za vso podporo v času študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom viš. znan. sod., doc. dr. Mojca Pavlin, univ. dipl. fiz. in doc. dr. Tomaža Bratkoviča, mag. farm. Naloga je del projekta ARRS (J3-6794: Celična energijska presnova kot tarča za zdravljenje raka - genski in farmakološki pristop/Cellular energy metabolism as a target for cancer therapy – genetic and pharmacological approach).

Jan Gregorec

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE I
KAZALO SLIK II
POVZETEK IV
ABSTRACT V
SEZNAM OKRAJŠAV VI
1. Uvod 1
1.1 Rak dojke 1
1.1.1 Zdravljenje raka dojke 2
1.2 Značilnosti rakavih celic 3
1.2.1 Spremenjeni ionski kanali 4
1.2.1.1 Na^+/K^+-črpalka 6
1.2.2 Spremenjen metabolizem rakavih celic 7
1.2.3 Mikrookolje pri raku 8
1.3 Učinkovine 10
1.3.1 Uporaba že odobrenih učinkovin za zdravljenje raka (Drug repurposing) ... 10
1.3.2 Kardiotonični glikozidi 11
1.3.2.1 Ouabain 12
1.3.3 Metformin in 2-deoksi glukoza 13
1.4 Večcelični tumorski sferoidi 15
2 Namen dela 16
3 Materiali in metode 17
3.1 Celice 17
3.1.1 MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) 17
3.1.2 MCF-7 (ATCC® HTB-22™) 17
3.2 Reagenti 17
3.3 Aparature 18
3.4 Oprema 18
3.5 Sestava gojišč 19
3.6 Fluorescenčna spektrofluorimetrija 19
3.7 Pretočna citometrija 19
3.8 Fluorescenčna mikroskopija 20

4 Eksperimentalno delo 21
4.1 Gojenje celic 21
4.2 Tretiranje 22
4.3 Spektrofluorimetrično določanje relativnega števila celic z barvanjem z barvilom Hoechst 23
4.4 Določanja preživetja celic na pretočnem citometru Attune^{TM} Nxt z barvilom PI ... 24
4.5 Vizualizacija morfologije in preživetja s fluorescenčno mikroskopijo 24
4.6 Priprava in gojenje večceličnih 3D sferoidov 24
5 Rezultati in razprava 26
5.1 Ugotavljanje vpliva ouabaina na rast in preživetje celic MDA-MB-231 in MCF-7 v celični kulturi s fluorescenčno spektrofluorimetrijo in pretočno citometrijo 26
5.1.1 Ugotavljanje vpliva ouabaina na rast celic MDA-MB-231 in MCF-7 s fluorescenčno spektrofluorimetrijo 26
5.1.2 Ugotavljanje vpliva ouabaina na preživetje celic MDA-MB-231 in MCF-7 s pretočno citometrijo in barvilom PI 28
5.2 Ugotavljanje vpliva načina priprave vzorca na določanje števila celic MDA-MB-231 in MCF-7 pri spektrofluorimetrični meritvi z barvilom Hoechst 30
5.3 Ocena deleža živih celic in določitev EC_{50} pri celicah MDA-MB-231 in MCF-7 .. 33
5.4 Vizualizacija vpliva ouabaina na morfologijo, gostoto, rast in umrljivost celic MDA-MB-231 in MCF-7 s svetlobno in fluorescenčno mikroskopijo. 35
5.5 Ugotavljanje vpliva ouabaina na celice MDA-MB-231 in MCF-7, gojene v napredni 3D kulturi večceličnih sferoidov 38
5.6 Test morebitnega sinergističnega delovanja ouabaina z metforminom in 2-DG 43
6 Sklepi 51
7 Literatura in viri 52

KAZALO SLIK

Slika 1: Groba letna incidenčna stopnja izbranih rakov v Sloveniji pri ženskah, s povprečno letno spremembo za zadnjih 10 let 2
Slika 2: Prikaz zgradbe Na^+/K^+-črpalke 6
Slika 3: Prikaz mikrookolja pri raku 9
Slika 4: Prikaz osnovnega skeleta strukture kardiotoničnih glikozidov 11
Slika 5: Prikaz strukture ouabaina 13
Slika 6: Prikaz presnovne poti razgradnje glukoze, povezava s signalnimi potmi pri raku ter tarče metformina in 2-deoksi-glukoze 14
Slika 7: Prikaz strukture sferoida 15
Slika 8: Prikaz spektrov barvil in filtrov, ki smo jih uporabili pri analizi 20

Slika 9: Prikaz mreže na hemocitometru. 22
Slika 10: Relativno število celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri celični liniji MDA-MB-231, gojeni v gojišču z različnima koncentracijama glukoze 27
Slika 11: Relativno število celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri celični liniji MCF-7 27
Slika 12: Delež PI-pozitivnih celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri celični liniji MDA-MB-231, gojeni v gojišču z različnima koncentracijama glukoze 29
Slika 13: Delež PI-pozitivnih celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri celični liniji MCF-7 30
Slika 14: Relativno število celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri vzorcih celične linije MDA-MB-231, pripravljenih po dveh različnih postopkih 31
Slika 15: Relativno število celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri vzorcih celične linije MCF-7, pripravljenih po dveh različnih postopkih 32
Slika 16: Delež živih celic MDA-MB-231 in MCF-7 v odvisnosti od koncentracije ouabaina po 72h tretiranju 33
Slika 17: Prikaz celic MDA-MB-231, posnetih z fluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina 35
Slika 18: Prikaz celic MCF-7, posnetih z fluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina 37
Slika 19: Prikaz sferoidov MDA-MB-231 pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina 39
Slika 20: Prikaz sferoidov MCF-7 pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina 40
Slika 21: Intenziteti fluorescence kalceina in propidijevega jodida ter površina sferoidov MDA-MB-231 v odvisnosti od koncentracije ouabaina 41
Slika 22: Intenziteti fluorescence kalceina in propidijevega jodida ter površina sferoidov MCF-7 v odvisnosti od koncentracije ouabaina 41
Slika 23 Relativno število celic v odvisnosti od dodanih koncentracij ouabaina, metformina, 2-DG in kombinacij pri vzorcih celične linije MDA-MB-231 43
Slika 24: Delež PI-pozitivnih celic MDA-MB-231 pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina, metformina in 2-DG, ter kombinacij 44
Slika 25: Relativno število celic v odvisnosti od dodanih koncentracij ouabaina, metformina, 2-DG in kombinacij pri vzorcih celične linije MCF-7 45
Slika 26: Delež PI-pozitivnih celic MCF-7 pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina, metformina in 2-DG, ter kombinacij. 46
Slika 27: Prikaz celic MDA-MB-231, posnetih s fluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, pri dodatku 5 mM metformina, 0,6 mM 2-DG ter kombinaciji 2-DG in ouabaina (50 nM in 100 nM) 47
Slika 28: Prikaz celic MCF-7, posnetih s fluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, pri dodatku 5 mM metformina, 0,6 mM 2-DG ter kombinaciji 2-DG in ouabaina (50 nM in 100 nM) 48

POVZETEK

Že nekaj časa je znano, da imajo rakave celice spremenjen metabolizem v primerjavi z normalnimi celicami. Prav tako je znano, da imajo tudi delno spremenjeno delovanje ionskih kanalov. Posledično lahko te spremembe v delovanju rakavih celic predstavljajo tarčo za zdravilne učinkovine, ki jih sicer uporabljamo za zdravljenje drugih bolezni. Ena takih je učinkovina ouabain - kardiotonični glikozid, ki vpliva na delovanje Na^+/K^+-črpalke.

Z našim delom smo želeli preveriti, kako ouabain vpliva na rast in preživetje celic dveh celičnih linij raka dojke (MDA-MB-231 in MCF-7) v kulturi *in vitro*, ter na modelu večceličnih sferoidov, ki lahko prestavljajo majhen *in vitro* model tumorja. Celice MDA-MB-231 so celice trojno negativnega raka dojke (HR-, HER2-), ki je najbolj invaziven, MCF-7 pa so celice hormonsko odvisnega raka dojke (HR+). V zaključku smo na omenjenih celičnih linijah testirali potencialen sinergistični učinek ouabaina z modulatorjema presnovnih poti (metformin in 2-deoksi-glukoza), kjer smo prav tako ocenili vpliv na rast in preživetje celic. Proliferacijo celic smo ocenjevali spektrofluorimetrično z barvilom Hoechst, preživetje celic pa smo ocenili s pretočno citometrijo z uporabo propidijevega jodida. Oboje smo spremljali tudi s fluorescenčno mikroskopijo. Sferoide smo analizirali s fluorescenčnim mikroskopom z barvili kalcein in propidijev jodid.

S poskusi na celičnih kulturah smo pokazali tako citostatične, kot tudi citotoksične učinke ouabaina na celice. Pri celični liniji MCF-7 so učinki vidni pri nekoliko nižji koncentraciji kot pri MDA-MB-231. Določili smo koncentracijo EC50 70 nM pri celicah MCF-7 in 100 nM pri MDA-MB-231. S povečanjem koncentracij se je učinek ouabaina sorazmerno povečeval, kar smo pokazali tudi s fluorescenčno mikroskopijo. Tudi s poskusi na večceličnih sferoidih smo pokazali učinke ouabaina na število celic in število mrtvih celic. Pri sferoidih MDA-MB-231 so se s povečanjem koncentracije ouabaina pokazali učinki na velikost oz. deagregacijo sferoidov, medtem ko tega pri sferoidih MCF-7 nismo zaznali. Pri testiranju kombinacije ouabaina z metforminom in 2-DG sinergističnega učinka nismo zaznali oz. dokazali, pokazala pa se je večja občutljivost celic MCF-7 na metformin in 2-DG v primerjavi s celicami MDA-MB-231.

Ključne besede: rak dojke, MDA-MB-231, MCF-7, Ouabain, sferoidi, preživetje in rast

ABSTRACT

It is known that cancer cells have altered metabolism compared to normal cells, as well as changes in cell signaling through ion channels. These changes in cancer cells present potential new targets for drugs, which are widely used as a therapy for some other diseases. Ouabain, a cardiotonic glycoside is that kind of drug, as it inhibits the sodium/potassium pump.

In this work, we aimed to analyze the effects of ouabain on proliferation and survival of two breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) in cell culture *in vitro* and on multicellular spheroids, that can be used as an *in vitro* tumor model. MDA-MB-231 is a triple-negative breast cancer cell line (HR-, HER2-), which is the most invasive and MCF-7 is hormone-responsive breast cancer cell (HR+). In the last part, we tested the possible synergic effect of ouabain and metabolism modulators metformin and 2-deoxyglucose by monitoring proliferation and survival of treated cells. Cell proliferation was analyzed by spectrofluorimetry with Hoechst staining, and cell survival was analyzed by flow cytometry and propidium iodide staining. We also presented effects on proliferation and survival with fluorescence microscopy. Spheroids were analyzed with fluorescence microscopy with calcein and propidium iodide staining and image analysis with computer software.

Experiments in cell culture have shown both, cytostatic and cytotoxic effects of ouabain on the analyzed cell lines. In MCF-7, effects of ouabain are present in slightly lower concentrations than in MDA-MB-231. The EC50 concentration was determined at 70 nM for MCF-7 and 100 nM for MDA-MB-231 cell line. Effects of ouabain were concentration dependent, which was also confirmed by fluorescence microscopy. Experiments on multicellular spheroids also showed effects of ouabaina on cell number and cell death. In MDA-MB-231 spheroids, effects on spheroid size and disaggregation were observed, in contrast to MCF-7. Sinergistic effect of ouabain with metformin and 2-DG was not confirmed, but we conclude that the MCF-7 cells are more sensitive to metformin and 2-DG compared to the MDA-MB-231 cell line.

Key words: breast cancer, MDA-MB-231, MCF-7, Ouabain, spheroids, survival and proliferation

SEZNAM OKRAJŠAV

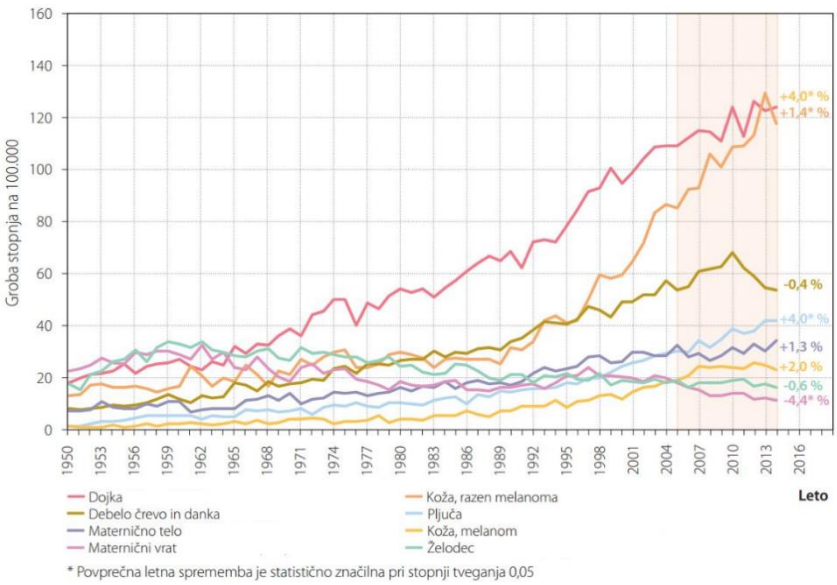
2-DG	2-deoksiglukoza
AMP	adenozin monofosfat
AMPK	z AMP aktivirana protein-kinaza
ATP	adenozin trifosfat
EGF	epidermalni rastni dejavnik
FBS	fetusni serum goveda
HER2	receptor za humani epidermalni rastni dejavnik tipa 2
HIF1	hipoksijo inducirajoč dejavnik 1
HR	hormonski receptor
IL-8	interlevkin 8
MAPK	družina protein kinaz, aktiviranih z mitogenom
MCF-7	humane celice raka dojke s prisotnimi hormonskimi receptorji
MDA-MB-231	humane celice trojno negativnega adenokarcinoma raka dojke
NF-κB	jedrni faktor kapa B
PI	propidijev jodid
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
RCF	relativna centrifugalna sila
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze alfa
VEGF	vaskularni endotelijski rastni dejavnik
V_m	mirovni membranski potencial

1. Uvod

Z besedo rak označujemo skupino bolezni, za katere je značilna nenadzorovana in nenormalna rast telesnih celic. Njihova največja značilnost so metastaze ali zasevki, ki s krvjo in limfo zaidejo v druge dele telesa, ali pa nastanejo s prodiranjem rakavih celic v okoliško tkivo. Med dejavnike tveganja za razvoj raka prištevamo dejavnike iz okolja, način življenja ter dedno nagnjenost. Rak je poligenska bolezen, ki jo delimo na sporadično in dedno obliko. Pri sporadični obliki raka gre za genske spremembe v somatskih celicah, kot so celice tkiv in organov. Pri dedni obliki raka pa gre za posledice sprememb v spolnih celicah (1,2).

1.1 Rak dojke

Rak dojke predstavlja drugo najpogostejšo obliko raka (najpogostejši je kožni rak) na svetu in najpogostejšo obliko pri ženskah (Slika 1). Po zadnjih podatkih letno za rakom dojke zboli 1,5 milijona žensk. V Sloveniji letno zboli okrog 1300 žensk, kar predstavlja petino vseh na novo odkritih rakavih obolenj, zbolijo pa lahko tudi moški. Rak dojke na splošno velja za dobro obvladljivega. V največ primerih na novo odkritih rakov dojke gre za zgodnjo obliko raka, v 20 % za napredovano obliko in v 5 – 10 % so prisotni že zasevki. Značilnost raka dojke je tudi ta, da se po operacijah zaseje, kar imenujemo sekundarno razsejan rak dojke, in sicer v 300 – 350 primerih letno (3,4). Rak dojke ima najvišjo incidenco med raki v zadnjih 50-ih letih, trenutno je obolelih okrog 16.000 žensk. Letno umre okrog 380 žensk in 3 moški (5). Ob diagnozi raka je imelo 494 (38,4 %) bolnic bolezen že razširjeno v regionalne bezgavke, 94 (7,3 %) pa sistemsko razsejano bolezen (oddaljene metastaze) (3,4).



Slika 1: Groba letna incidenčna stopnja izbranih rakov v Sloveniji pri ženskah, s povprečno letno spremembo za zadnjih 10 let, povzeto po (5).

Rak dojke ločimo na tri podtipe:

1. Hormonsko odvisen (70 %) – pozitivni hormonski receptorji – HR+ (estrogenski in/ali progesteronski) in brez prekomerne izraženosti gena in/ali receptorja za epidermalni rastni dejavnik tipa 2 (HER2-). Zdravimo ga s hormonsko terapijo.

2. Rak s prekomerno izraženostjo receptorja HER2 – HER2+ (15–20 %) – prisotna so protitelesa proti HER2. Zdravimo ga zdravimo z anti-HER-2 zdravili v kombinaciji s kemoterapijo.

3. Trojno negativen (15 %) – HR-, HER2-. Zdravimo ga s kemoterapijami.

Največji problem pri raku dojke so metastaze oz. zasevki. Rak dojke zaseva v kosti, jetra, pljuča in centralni živčni sistem (CŽS). Razsejan rak velja za neozdravljivega. Lahko ga imenujemo kronična bolezen, saj ga zaznamujejo leta remisij in relapsov. Remisije lahko trajajo tudi več mesecev ali let. Pri četrtini bolnic pride do razsoja bolezni kljub zdravljenju. Namen zdravljenja razsejane bolezni so izboljšanje kakovosti življenja, preprečevanje ali lajšanje simptomov bolezni in podaljšanje preživetja (3,4).

1.1.1 Zdravljenje raka dojke

Zdravljenje je sistemsko, dokler ni hujših neželenih učinkov, nato preostane samo še paliativno zdravljenje. Med hormonska zdravila, ki jih uporabljamo v praksi, spadajo:

- antiestrogeni (tamoksifen, fulvestrant),
- antagonisti receptorjev LHRH (luteinizirajoči hormon sproščujoč hormon) (goserelin),
- zaviralci aromataze (anastrazol, letrozol, eksemestan)
- progestini (megastrol).

Če ima tumor izražene tarče, lahko uporabimo tarčna zdravila, na primer monoklonska protitelesa (trastuzumab, pertuzumab ali trastuzumab ematizin), zaviralce tirozin kinaz - TKI (lepatinib, everolimus, ribociklib, palbociklib). Citostatiki, ki jih uporabljamo pri zdravljenju raka dojke, so antraciklini (doksorubicin, epirubicin), taksani (docetaksel, paklitaksel, paklitaksel-albumin), ciklofosfamid, metotreksat, 5-fluorouracil, vinorelbin ter gemcitabin in cisplatin.

Zdravljenje je v največji meri odvisno od biologije metastaz, predvsem od receptorjev HER. Srednje preživetje z razsejano boleznijo je 2 – 3 leta, po zadnjih podatkih iz prakse pa lahko že govorimo, da je ta doba najmanj 5 let. Preživetje HR+ je nekje 3 leta, HER2+ 5 let, pri trojno negativnem pa 1 leto (4).

1.2 Značilnosti rakavih celic

Rakave celice imajo, da bi si zagotovile maligno rast in neskončno delitev, spremenjene svoje biokemijske in biološke lastnosti. Tako rakave celice med procesom kancerogeneze pridobijo določene značilnosti, po katerih jih lahko razlikujemo od normalnih celic. Leta 2000 sta Hanahan in Weinberg objavila pregledni članek, kjer sta opisala šest ključnih značilnosti, ki so oz. naj bi bile prisotne pri vseh rakih. Označila sta jih z izrazom »*hallmarks of cancer*« (6). Te lastnosti so sposobnost za vzdrževanje lastnih stimulacijskih rastnih signalov, neobčutljivost na zaviralce rastnih dejavnikov, odpornost na celično smrt – apoptozo, zmožnost neskončnega razmnoževanja celic (omogočena podvojevalna nesmrtnost), spodbujanje angiogeneze – rasti novih žil iz že obstoječih in zmožnost zasevanja – metastaziranja.

Leta 2011 sta izdala nov pregleden članek, kjer sta obstoječim glavnim značilnostim dodala še spremenjen energijski metabolizem, genomsko nestabilnost in mutacije genoma, izogibanje delovanju imunskega sistem in aktivacijo vnetja (7). Od takrat se je pojavilo veliko člankov na temo iskanja novih značilnosti raka, ki bi lahko prestavljale tarčo za zdravljenje. Tako so ena od tarč, poleg spremenjenega metabolizma in imunskega sistema, postali tudi različni ionski kanali. V nalogi se bomo osredotočili predvsem na ionske kanale

in Na^+/K^+-črpalko z vidika potencialnih tarč za zdravljenje rakavih obolenj, omenili pa bomo tudi spremembe v presnovi glukoze.

1.2.1 Spremenjeni ionski kanali

Ionski kanali so proteinske molekule, ki omogočajo pasivni prehod določenih ionov skozi celično membrano, v celico in iz nje. Delovanje ionskih kanalov je povezano z membranskim potencialom in volumnom celic. Kanali sodelujejo pri znotrajceličnem signaliziranju in aktivaciji specifičnih celičnih odzivov (8). Imajo pomembno regulatorno vlogo, ki vpliva na lastnosti oz. obnašanje rakavih celic, kar posledično igra pomembno vlogo pri procesu kancerogeneze. Ionski kanali imajo vodilno vlogo pri več celičnih procesih, kot so na primer vzdrževanje mirovnega membranskega potenciala, depolarizacija in repolarizacija membranskega potenciala, regulacija celičnega volumna, diferenciacija, proliferacija, migracija in apoptoza ter metastaziranje. Pri različnih vrstah raka lahko opazimo, da je izražanje ionskih kanalov spremenjeno. Lahko so prekomerno, premalo ali pa napačno izraženi, kar lahko v prihodnosti, ob pravilni validaciji, predstavlja nove diagnostične biomarkerje (8–10).

Ionski kanali imajo pomembno vlogo pri patofiziologiji raka v več različnih mehanizmih. Ca^{2+}, Na^+ in K^+ kanali imajo vpliv na proliferacijo celic preko regulacije več signalnih poti, ki so pomembne za preživetje in regulacijo membranskega potenciala. Ko rakava celica prehaja skozi različne faze celičnega cikla, pride do spremembe njenega volumna, kar uravnavajo prav kalcijevi, kalijevi, natrijevi in kloridni kanali (11,12). Vloga K^+ in Cl^- kanalov pri metastaziranju je velika zaradi zmožnosti celic, da spreminjajo obliko in volumen, zaradi česar lahko prehajajo čez ozke zunajcelične prostore. Z blokado teh kanalov bi lahko zmanjšali sposobnost metastaziranja (8).

Kalijevi kanali predstavljajo najbolj raznoliko vrsto ionskih kanalov, saj jih kodira več kot 75 različnih genov. V telesu imajo vlogo pri vzdražnosti živcev in mišic, vplivajo na izločanje inzulina in nevrotransmiterjev in so tudi modulatorji imunskega odziva (9,13). Kalijevi kanali vzdržujejo mirovni membranski potencial (V_m) in so prisotni na vseh celicah. Vključeni so v regulacijo celične prostornine in z različnimi izmenjevalci, kot sta Na^+/H^+- in Na^+/K^+-črpalka, prispevajo k regulaciji znotrajceličnega pH. Aktivnost kalijevih kanalov se spreminja skozi različne faze celičnega cikla, zato ima njihovo zaviranje antiproliferativne učinke. Običajno imajo rakave celice manjši V_m od normalnih, zato je potrebno večje

izražanje kalijevih kanalov, da se zagotovi začasna hiperpolarizacija kot odziv na različne spreminjajoče dejavnike v celičnem ciklu (8). Tudi izogibanje celični smrti lahko v veliki meri pripišemo kalijevim kanalom. Pri apoptozi je značilno zmanjšanje koncentracije kalija znotraj celice. Pri rakavih celicah pa so ugotovili, da so sposobne vzdrževati znotrajcelično koncentracijo preko regulacije kalijevih kanalov. Zato pri več rakih opazimo večji mitohondrijski membranski potencial in zmanjšano izražanje določenih kalijevih kanalov. Kalijevi kanali so povezani tudi z regulacijo sinteze VEGF, ki je pomembna pri angiogenezi (8).

Že dolgo je znano, da je privzem Ca^{2+} ključen za celično rast. Ugotovili so, da so pri različnih rakavih celicah najpogosteje izraženi napetostno odvisni kalcijevi kanali**,** ki spadajo v družino 3 - Ca_v3. Povečano izražanje teh kanalov je povezano s fazo S celičnega cikla, za katero je znana visoka transkripcijska aktivnost. Pri normalnih celicah je število delitev omejeno zaradi dolžine telomer, ki se pri vsaki celični delitvi skrajšajo, mehanizmi za podaljševanje pa so strogo zavrti. Pri rakavih celicah se s povečanim privzemom Ca^{2+} preko napetostno odvisnih kalcijevih kanalov in TRP (ang. *transient receptor potential*) kanalov poveča aktivnost telomeraze, ki katalizira sintezo in podaljšanje telomerne DNA in s tem nesmrtnost. Tudi povezava morfoloških in adhezijskih sprememb, ki so jih opazili med migracijo, naj bi bila povezana s spremembami znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} (8).

Pri raku dojke so ugotovili, da izražanje t.i. velikih kalijevih kanalov (ang. *B(ig)K chanells*) korelira z izražanjem estrogenskih receptorjev in da je aktivnost kalijevih kanalov višja v primerih, ko so prisotne metastaze v možganih. Podobno je izražanje kanalov $K_{ir}3.1$ koreliralo s prisotnostjo metastaz v limfi (9). Ugotovili so povečano izražanje in aktivnost napetostno odvisnih natrijevih kanalov pri metastatskih rakih dojke, prostate, materničnega vratu in tudi na celičnih linijah. Ugotovili so, da naj bi povečana aktivnost kanakov $Na_v1.5$ lahko spodbujala metastaziranje. Zaradi tega je razširjeno mnenje, da bi lahko ta kanal predstavljal dobro specifično tarčo pri zdravljenju raka dojke. Zaviranje teh kanalov i*n vitro* je vodilo v zmanjšano zmožnost migracije pri visoko metastazirajočih celičnih linijah (8,9,14).

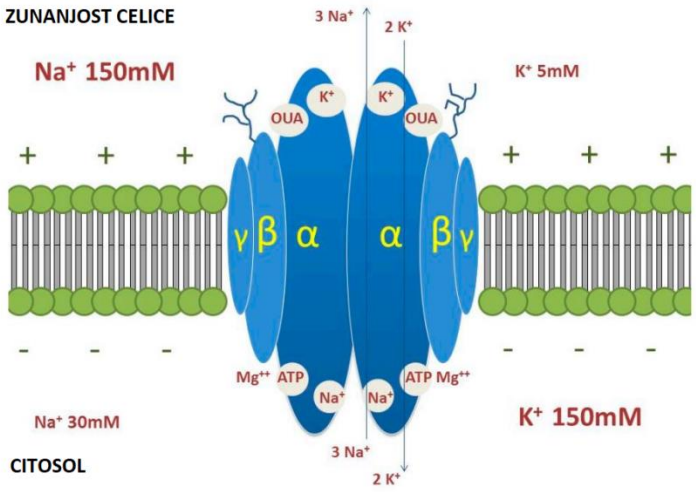
Kanali v večini primerov niso rakavo specifični, temveč so prisotno tudi v ostalih tkivih, zato selektivno tarčno delovanje na kanale predstavlja veliko oviro pri vpeljavi terapevtske uporabe. Najprej je potrebno dognati, kakšna je narava kanalov, pri katerih tipih raka je kanal

drugače izražen, na katere procese in značilnosti vpliva, kakšne so endogene signalne poti pri aktivaciji kanala in kako specifičen je kanal za določen tip neoplazme (8).

1.2.1.1 Na^+/K^+-črpalka

Na^+/K^+-ATP-aza ali krajše Na^+/K^+-črpalka (v nadaljevanju črpalka) je membranski proteinski kompleks, ki je v celicah zadolžen za prenos natrija in kalija skozi celično membrano, pri čemer uporablja energijo, ki je skladiščena v obliki molekul ATP. S transportom ionov se vzdržuje membranski potencial in omogoča vzdražnost mišičnih, živčnih in žleznih celic. Črpalka deluje tudi kot prenašalec signalov. Reagira z različnimi signalnimi proteini v kaveoli, kot so tirozin kinaza Src, protein kinaza A (PKA), protein kinaza C (PKC), fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K) in receptor za epidermalni rastni dejavnik (EGFR) (15). Črpalka ima vodilno vlogo pri adheziji celic in je udeležena pri procesu razvoja oz. napredovanja raka. Služi kot raznovrstni prenašalec signalov in je tarča številnih hormonov, vključno z estrogeni. Njeno spremenjeno izražanje je povezano tudi z razvojem in napredovanjem raka dojke (16).

Na^+/K^+-črpalka je sestavljena iz več podenot (Slika 2): katalitične podenote α, regulatorne podenote β in modulatorne podenote γ, ki predstavljajo ključne enote pri energijskih procesih v celici (17). Podenota α se deli naprej na štiri izooblike (α1, α2, α3 in α4), β na tri (β1, β2 in β3), γ pa na sedem izooblik (16, 17).



Slika 2: Prikaz zgradbe Na^+/K^+-črpalke. Prirejeno po (19). Hidroliza ATP omogoča ionski transport, ki je odvisen od koncentracij posameznih ionov znotraj in zunaj celice. Prikazane so α- podenote z mesti za vezavo Na, K, ATP in kardiotoničnih glikozidov - Ouabain (OUB), β-podenoti (glikoproteina) ter γ-podenoti.

Različne izooblike se izražajo pri različnih rakih oz. v različnih tkivih. Vemo, da je izooblika α1 prekomerno izražena pri celicah glioblastoma, ki predstavlja najbolj pogosto obliko možganskega tumorja. Verjetno je odgovorna za procese signaliziranja med potekom apoptoze. Izooblika α1 je prekomerno izražena tudi pri drugih tipih rakov, kot so rak pljuč, ledvic in melanom, medtem ko prenizko izraženost α1 lahko zaznamo pri karcinomu prostate. Pri karcinomu debelega črevesja pa je prekomerno izražena podenota α3. Pri velikem številu meduloblastomov (možganski tumorji pri majhnih otrocih) je prisotno prekomerno izražanje tako podenot α1 in α3 (20). Prekomerno izraženost podenot α1 in/ali α3 so ugotovili pri več različnih tipov raka, zato je verjetno, da bi lahko selektivna vezava učinkovin na te podenote predstavljala še en način zdravljenja raka (21). Spremenjena izraženost podenote beta je tudi prisotna pri rakih. Pri različnih epitelijskih rakih so zaznali premalo izraženo podenoto β1, kar bi naj bilo povezano s povečano invazivnostjo rakavih celic (20).

Raziskovalci so opazili različno izraženost podenot α in β pri karcinomu mehurja. Ugotovili so, da je pri bolnikih z visoko izraženostjo podenote α in hkrati prenizko izraženostjo podenote β večja možnost relapsa bolezni, kot pri bolnikih z obratno izraženostjo podenot. Tako so v patentni prijavi predlagali, da lahko detekcija izraženosti podenot služi kot diagnostično orodje pri napovedovanju poteka bolezni in spremljanju uspešnosti zdravljenja. Podobno so ugotovili pri raku na materničnem vratu. Razmerje izražanja podenot α/β naj bi kazalo na stopnjo displazije, kar se je izkazalo kot potencialno uporaben biomarker pri displaziji materničnega vratu (20).

Lastnost črpalke, da deluje kot prenašalec signalov, je porodilo idejo raziskovalcem, da bi lahko kardiotonični glikozidi predstavljali protirakave učinkovine. Aktivnost črpalke se spreminja že v začetnih stopnjah nastanka tumorja, še preden zaznamo morfološke spremembe. Dokazan je učinek kardiotoničnih glikozidov na črpalko in uporaba glikozidov za zdravljenje kardiovaskularnih obolenj. Različne študije so pokazale tudi učinkovitost teh učinkovin pri zdravljenju nekaterih rakavih obolenj, še posebej pri ženskah z rakom dojke (9).

1.2.2 Spremenjen metabolizem rakavih celic

Spremenjen metabolizem oz. prilagoditve v metabolizmu rakavih celic predstavljajo eno od značilnosti rakavih celic (*hallmark*), ki je bila sprejeta v zadnjem desetletju. Rakave celice

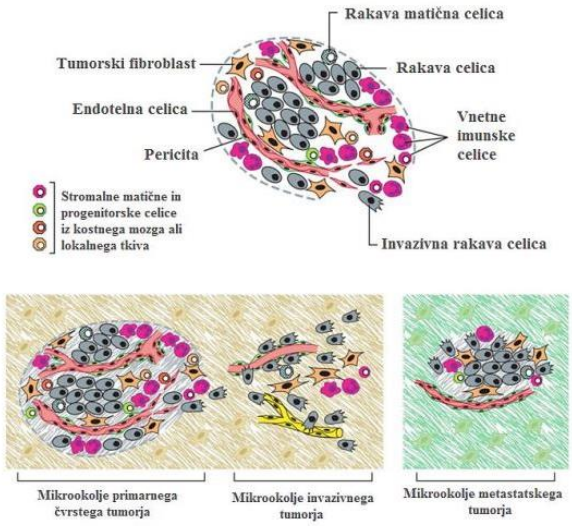
morajo, da dosežejo nekontrolirano rast, prilagoditi presnovo, s čimer zagotovijo hranila za vse novo nastajajoče celice (7,22).

Leta 1927 je Otto Warburg objavil ugotovitev, da rakave celice porabljajo glukozo s precej večjo hitrostjo kot normalne celice. To naredijo z regulacijo glukoznih transporterjev (predvsem GLUT1), zaradi česar se poveča vnos glukoze v citoplazmo, kar je moč opaziti pri različnih vrstah tumorjev (7,23). Pri presnovi glukoze večino ogljika izločijo v obliki laktata in ga ne oksidirajo do konca z oksidativno fosforilacijo, kot to naredijo normalne celice. Kljub prisotnosti kisika uporabljajo aerobno glikolizo. Ta pojav je danes splošno znan kot Warburgov pojav. Kasneje so ugotovili, da je aerobna glikoliza značilna za rakave celice samo določenih tipov raka, pri katerih je okvarjena oksidativna kapaciteta (24,25). Tako se je pojavilo vprašanje, zakaj rakave celice za pridobitev energije v obliki ATP uporabljajo te presnovne poti, glede na to, da je za delitev potrebno veliko energije (9,26). Čeprav je proizvodnja ATP z aerobno glikolizo energijsko potraten proces (nastaneta samo 2 molekuli ATP) v primerjavi z oksidativno fosforilacijo (nastane 36 molekul ATP), se lahko s povečanim privzemom glukoze močno poveča nastanek ATP. Tako lahko proizvodnja ATP z glikolizo celo preseže tisto z oksidativno fosforilacijo, predvsem zaradi večje hitrosti samega procesa (24). Reakcija razgradnje glukoze z aerobno glikolizo do laktata je 10-100-krat hitrejša od popolne razgradnje v mitohondriju, zato je količina nastalega ATP pri obeh procesih primerljiva (9,27,28). Poleg tega pa pri razgradnji glukoze nastanejo intermediati, ki so potrebni za nekatere biosintezne poti, na primer za izgradnjo riboznih sladkorjev za nukleotide, glicerola in citrata za lipide, neesencialnih aminokislin in NADPH. Tako Warburgov efekt pozitivno učinkuje na energijske in biosintezne procese (24,29).

1.2.3 Mikrookolje pri raku

Pomemben dejavnik za razumevanje raka ter preučevanja različnih učinkovin je tumorsko mikrookolje. Tumor je skupek več tipov celic (Sika 3), ki na različne načine prispevajo k razvoju in napredovanju tumorja. Jedro tumorja predstavljajo tumorske celice, ki se skozi razvoj razdelijo na več podpopulacij, ki se lahko med seboj razlikujejo po stopnji diferenciacije, proliferacije, vaskularnosti, vnetja in invazivnosti. V zadnjem času so opredelili tudi rakave matične celice, katerih vloga in izvor še nista v celoti pojasnjena (7). Predvidevajo, da so matične celice prisotne znotraj populacij rakavih celic pri vseh vrstah tumorjev in so odporne proti kemoterapiji. Zaradi tega se lahko po zdravljenju diferencirajo

v različne vrste celic, kar je povezano s ponovnimi relapsi bolezni (30). Endotelijske celice so zelo pomembne pri procesu angiogeneze, saj vemo, da se v tumorjih razvijejo mreže novonastalih žil, s čimer se v tumorju zagotovi večja količina hranil za nekontrolirano delitev. Periciti so mezenhimske celice, ki se prilepijo na endotelijske celice krvnih žil, s čimer pripomorejo, da stena žil zdrži hidrostatski tlak krvnega toka. Pomembne so tudi pri procesih signaliziranja. Vnetne imunske celice predstavljajo levkociti, ki delujejo antagonistično, a tudi agonistično na razvoj tumorja. Vnetne celice so pomembne tudi zaradi izločanja signalnih molekul, kot so rastni dejavniki (EGF, VEGF), ki spodbujajo rast tumorja. Mednje štejemo tudi makrofage in nevtrofilce, ki so zadolženi za celjenje ran in odstranjevanje ostankov mrtvih celic. Tumorski fibroblasti so ena od najpomembnejših tumorskih celic in jih delimo na miofibroblaste in fibroblastom podobne celice, ki imajo strukturno vlogo pri epitelijskih tkivih. Ugotovili so, da rakave celice spodbujajo aerobno glikolizo v tumorski fibroblastih, kar so poimenovali obratni Warburgov pojav (31). Fibroblasti s svojim katabolizmom glukoze prestavljajo pomemben vir energije in bioloških intermediatov za rast in preživetje anabolnih rakavih celic (32). Izločanje laktata pa igra pomembno vlogo pri kisanju mikrookolja. Predvidevajo, da je prehod H^+, ki iz rakavega mikrookolja prehajajo v okoliški prostor, povezan s povečanjem invazivnosti raka. Prisotnih je tudi več vrst stromalnih celic, ki izvirajo pretežno iz kostnega mozga (7,32).



Slika 3: Prikaz mikrookolja pri raku. Prirejeno po (7). Na sliki lahko vidimo shemo sestave mikrookolij, skozi različne faze metastaziranja.

1.3 Učinkovine

1.3.1 Uporaba že odobrenih učinkovin za zdravljenje raka (Drug repurposing)

Spoznali smo že, kakšen je pomen ionskih kanalov in spremenjenega metabolizma pri rakavih celicah z vidika potencialne tarče za zdravljenje bolezni. Glede na to, da so to relativno nove ugotovitve, ni veliko na novo odkritih učinkovin z namenom zdravljenja rakavih obolenj. Lahko pa uporabimo že razvite učinkovine s ciljnim delovanjem na ionske kanale ali presnovo. Ker so na trgu zdravila, ki jih uporabljajo na primer za zdravljenje hipertenzije, psiholoških motenj, sladkorne bolezni, lahko uporabimo t.i princip *drug repurposing*, kar pomeni iskanje novih indikacij za zdravila, ki so že na tržišču. Se pravi, da uporabimo zdravilo oz. učinkovino, ki se uporablja za zdravljenje neke druge bolezni in raziščemo njeno uporabnost za zdravljenje novih bolezni. Tako uporabimo zdravila, ki so že dalj časa na trgu, z znanim varnostnim profilom, s čimer lahko privarčujemo denar za razvoj in klinične raziskave (11,33).

Uporaba tega načela ima veliko prednosti. Te so:

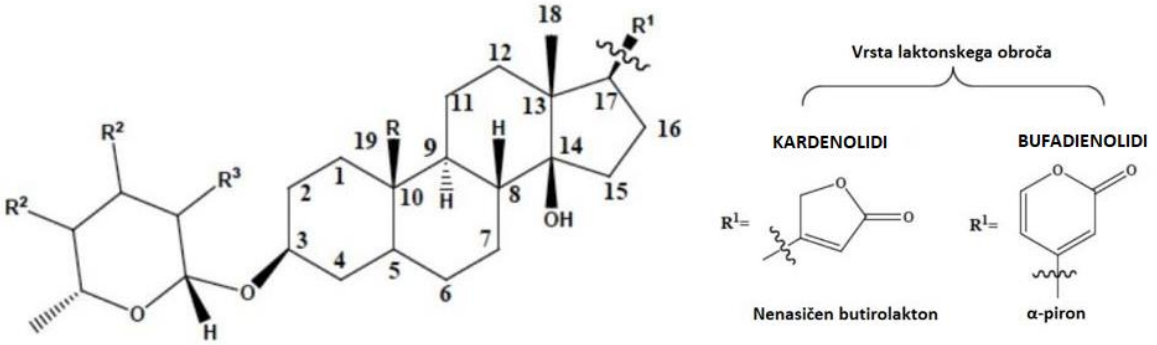
1. Poznamo varnostni profil zdravila.
2. Poznamo farmakokinetiko pri ljudeh.
3. Zmanjšamo prihod zdravila na trg iz 10-17 let na 3-12 let.
4. Cenovna učinkovitost, saj prihranimo veliko denarja, ki bi ga porabili v prvih fazah razvoja zdravila.
5. Lažje pritegnemo investitorje, saj takšno zdravilo potrebuje manj časa, da pride na trg.

Znani so primeri učinkovin s preventivnim delovanjem pri raku, kot so na primer acetilsalicilna kislina (ASA), metformin, statini in raloksifen. Jemanje ASA naj bi bilo povezano z zmanjšanjem tveganja za razvoj kolorektalnega raka. V več študijah so pokazali, da obstaja povezava med razvojem raka in vnetnimi procesi, ki so pri nekaterih rakih gonilna sila kancerogeneze (npr. kolorektalni rak, karcinom jeter). Uporaba statinov naj bi bila povezana s zmanjšanjem pojavnost gastrointestinalnih rakov, z jemanjem modulatorjev estrogenskih receptorjev, kot je raloksifen (uporabljamo ga pri zdravljenju osteoporoze), se je zmanjšala pojavnost raka dojke, jemanje metformina (zdravljenje sladkorne bolezni tip 2) pa so povezali z zmanjšanjem pojavnosti več različnih rakov (33,34).

1.3.2 Kardiotonični glikozidi

Kardiotonični glikozidi so skupina molekul, ki delujejo na Na^+/K^+-črpalko. Uporabljajo jih za zdravljenje srčnih bolezni, kot sta srčno popuščanje in aritmija. Povečajo znotrajcelično koncentracijo natrija in kalcija ter znižujejo kalij. Povečana koncentracija kalcija spodbuja mišično kontrakcijo, s čimer se poveča kontraktilna sila srca (35).

Delimo jih na dve skupini (Slika 4), na kardenolide, katerih tipični predstavniki so digoksin, digitoksin, ouabain in oleandrin, in pa bufadienolide, med katere spadata bufalin in helebrin. Večina kardenolidov izkazuje večjo afiniteto do izooblik α2 in α3, bufadienolidi pa imajo večjo afiniteto do izooblike α1. Pri strukturi molekule jim je skupno steroidno jedro z laktonskim obročem na C-17 in hidroksilno skupino na C-14 (36).



Slika 4: Prikaz osnovnega skeleta strukture kardiotoničnih glikozidov. Povzeto po (37). Na desni strani sta prikazani dve različni funkcionalni skupini, na podlagi katerih delimo kardiotonične glikozide na kardenolide in bufadienolide.

Molekule so se izkazale kot potencialne protirakave učinkovine, zato je v zadnjih letih moč zaslediti povečano število raziskav, kjer so preiskovali njihovo učinkovitost na celičnih in mišjih modelih. *In vitro* študije so pokazale, da bi lahko z zaviralci črpalke sprožili apoptozo in avtofagijo, povečali proizvodnjo reaktivnih kisikovih radikalov (ROS) in zaustavili celični cikel ter tako uničili rakave celice. Pokazala se je vloga kardiotoničnih glikozidov pri modulaciji signalnih poti, ki vplivajo na preživetje celic in celično smrt, kar pripomore k antiproliferativnim lastnostim takih učinkovin (18). Učinki so bili neodvisni od stanja estrogenskih receptorjev, in tako so spojine izkazale potencialno uporabnost pri zdravljenju hormonsko odvisnih in neodvisnih rakov dojke. V člankih navajajo nižjo pojavnost rakavih obolenj pri bolnikih, ki so jemali kardiotonične glikozide zaradi težav s srcem, ni pa še veliko raziskav, ki bi ovrednotili njihovo protirakavo delovanje na ljudeh (36,38).

Z interakcijo kardiotoničnih glikozidov in črpalke pride do aktivacije signalnih poti, kot so aktivacija kinaze Src, transaktivacija receptorja za epidermalni rasni dejavnik (EGFR), aktivacija kaskade Ras-Raf-MAPK in P42/p44 – protein kinaze, aktivirane z mitogenom. Trije najpomembnejši predstavniki družine MAPK so zunajcelična s signalom regulirana kinaza (Erk), c-jun N-končna kinaza (JNK) in p38. Aktivirana Erk nadzoruje proliferacijo in diferenciacijo celic, signaliziranje JNK in p38 pa ima vlogo pri proliferaciji, metastaziranju, preživetju, migraciji, apoptozi in ustavitvi rasti. Kardiotonični glikozidi spodbudijo znotrajcelično signaliziranje, ki pa je odvisno od vrste celic, koncentracije in časa izpostavljenosti učinkovine. Kardiotonični glikozidi zavirajo nastanek IL-8, modulirajo aktivnosti NF-κB in TNF-α in lahko povečajo proizvodnjo ROS (15,39).

Kardiotonični glikozidi regulirajo tudi fibroblastni rastni dejavnik 2 (FGF-2), ki spodbuja angiogenezo (40). Ouabain, digoksin in proscilaridin posredno zavirajo topoizomerazo II, kar vodi do fragmentacije DNA, tipične značilnosti pri apoptozi. Kardiotonični glikozidi spodbudijo apoptozo pri celicah MDA-MB-231 tako, da povečajo koncentracijo prostega citosolnega kalcija in aktivirajo kaspazo-3. Študije so pokazale, da digoksin in ouabain pri mikromolarnih koncentracijah spodbudita apoptozo preko aktivacije kaspaze 3 in proizvajanje ROS (36).

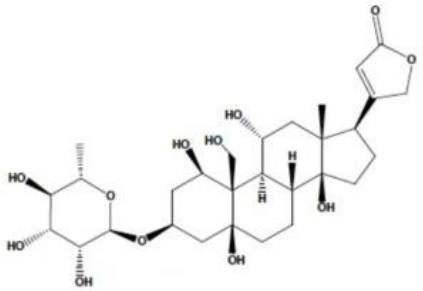
Na področju Na^+/K^+-črpalke kot tarče pri zdravljenju raka so podelili več patentov. Predstavljene so metode za ugotavljanje izraženosti posameznih podenot in različnih zaviralcev črpalke. To so največkrat kardiotonični glikozidi, pojavijo se tudi nekateri zaviralci signalnih poti, kot so na primer zaviralci kinaz Src (20).

Najdemo lahko tudi nekaj kliničnih študij kjer so preiskovali oz. preiskujejo vpliv kardiotoničnih glikozidov pri rakavih bolnikih. Pri večini kliničnih študij so uporabljali digoksin (18), v zadnjem času pa novih študij nismo zasledili.

1.3.2.1 Ouabain

Ouabain (Slika 5) je poznan tudi pod imenom g-strofantin in ga najdemo v semenih afriške rastline *Strophanthus gratus* in v lubju *Acokanthera ouabaio*. Uporabljamo ga pri zdravljenju srčnih obolenj. Veže se na podenoto α1 Na^+/K^+-črpalke in deluje inhibitorno (37). Njegovo protirakavo delovanje se kaže v zmanjšanju proliferacije in migracije celic, zmožen pa je tudi senzitizacije kemorezistentnih celic (19). Potencialna uporabnost pri nevroblastomih je v tem, da bi lahko v povezavi s kemoterapevtiki zmanjšali rast tumorja. Z

zaviranjem črpalke se zviša citosolna koncentracija Ca^{2+}, ki povzroči zmanjšanje mitohondrijskega potenciala in aktivacije ROS, kar vodi do apoptoze (37).



Slika 5: Prikaz strukture ouabaina (37)

1.3.3 Metformin in 2-deoksi glukoza

Metformin je dobro uveljavljen antidiabetik, ki kaže potencialno uporabnost pri zdravljenju raka. Trenutno poteka nekaj kliničnih študij, kjer ocenjujejo uporabnost metformina kot dopolnilno terapijo ob kemoterapijah. Nekatere študije na sladkornih bolnikih so pokazale, da lahko metformin podaljša preživetje pri nekaterih tipih rakov dojke. Metformin izboljša homeostazo glukoze, kar zmanjša koncentracije inzulina, ki je znan mitogen pri celicah raka dojke, občutljivih na inzulin. Na rakave celice lahko učinkuje tudi neposredno, z vezavo na kompleks I dihalne verige in s tem zavre oksidativno fosforilacijo. Spodbuja tudi reduktivno karboksilacijo glutamina oz. glukoze, s čimer se poveča odvisnost celic od metabolizma glukoze oz. glikolize (41,42).

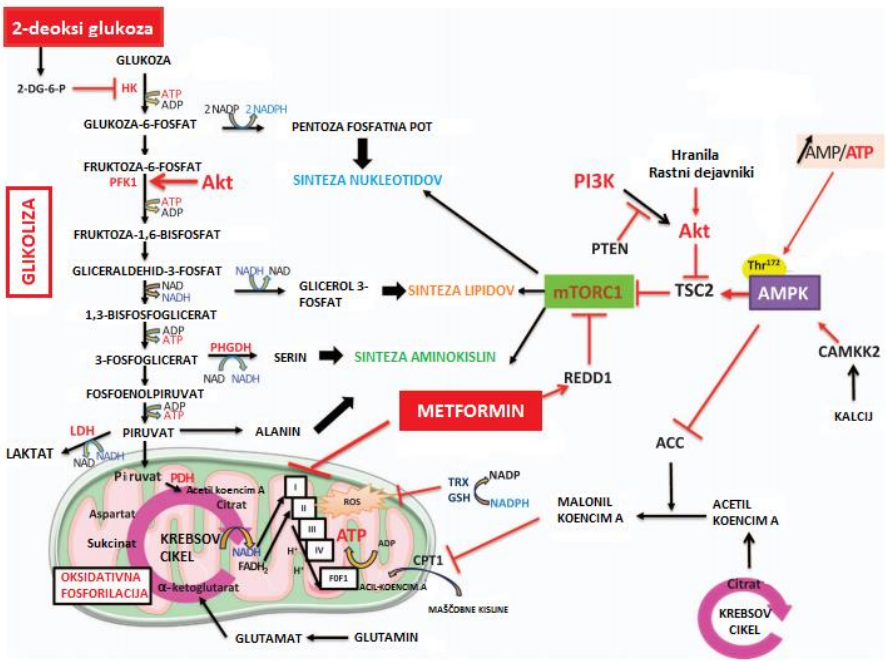
Metformin izboljša homeostazo glukoze po vsaj dveh mehanizmih. Prvi je aktivacija z AMP aktivirane protein kinaze (AMPK). S tem se poveča pridobivanje energije preko katabolnih procesov in upočasnitvijo anabolnih procesov. AMPK je glavni regulator energijskega metabolizma. Metformin aktivira AMPK posredno preko aktivacije kompleksa I v mitohondrijski dihalni verigi (Slika 6). Drug mehanizem je neodvisen od AMPK in zajema zaviranje mitohondrijske glicerofosfat dehidrogenaze. Omenjena mehanizmoma zmanjšata hiperglikemijo in hiperinzulinemijo, ki sta ena od pomembnih dejavnikov razvoja raka dojke pri bolnikih z sladkorno boleznijo tipa 2 (43). Dokazali so tudi, da metformin selektivno uniči CD44-pozitivne, CD24-negativne rakave celice (30).

V študijah lahko najdemo več primerov, kjer so pri miših uporabili metformin v kombinacijami z drugimi učinkovinami (44,45). Recimo v kombinaciji z mikroRNA-200 in doksorubicinom naj bi dosegli selektivno ubijanje rakavih matičnih celic in s tem zmanjšali

rast tumorja in podaljšali stanje remisije (30). V kombinaciji s cisplatinom so pri miših z rakom jajčnikov zavrli proliferacijo kot tudi angiogenezo in metastaziranje (39).

Tudi 2-deoksi glukoza (2-DG) izkazuje potencialno protirakavo delovanje, predvsem zaradi njenega mehanizma zaviranja glikolize (Slika 6). 2-DG je zaviralec heksokinaze (HK), s čimer zavira prvo reakcijo glikolize in popolnoma prepreči privzem glukoze. Heksokinaza fosforilira 2-DG do 2-deoksi-D-gukoza-6-fosfata (2-DG-6-P), ki se ne presnovi z glikolizo, temveč se kopiči in zavira heksokinazo. Zaviranje glikolize zmanjša nastajanje več glikolitičnih intermediatov, kot so glukoza-6-fosfat, gliceraldehid-3-fosfat in 3-fosfoglicerat, ki so prekurzorji nukleinskih kislin, fosfolipidov in serina. 2-DG zmanjša tudi antioksidativno kapaciteto rakavih celic, vpliva na N-glikozilacijo proteinov in povzroči porušeno energetsko stanje zaradi izčrpavanja ATP. V *in vitro* poskusih ga uporabljamo predvsem za posnemanje stanja glukoznega stradanja (35,40–42).

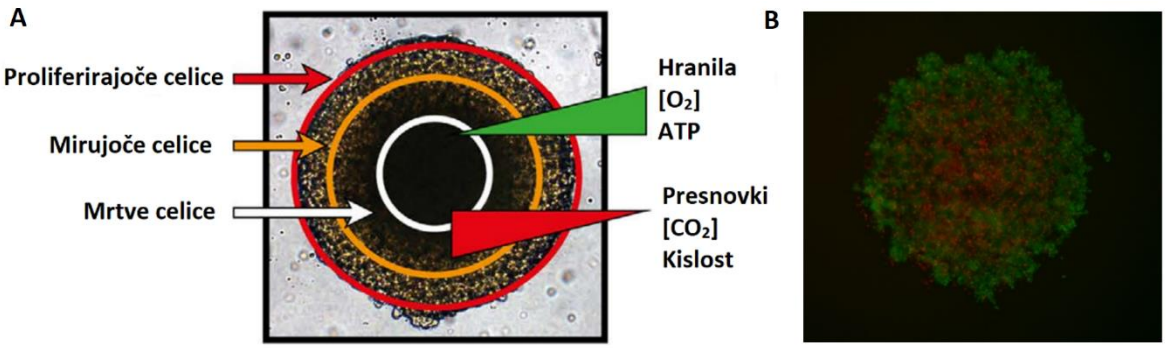
S kombinacijo metformina in 2-DG lahko pri celicah ustvarimo energijsko krizo, poveča se koncentracija AMP in pride do aktivacije AMPK. Izkazalo se je, da ob sočasni izpostavitvi učinkovinama *in vitro* pride do upočasnitev proliferacije celic, ne pa tudi citotoksičnega delovanja (42).



Slika 6: Prikaz presnovne poti razgradnje glukoze, povezav s signalnimi potmi pri raku ter tarč metformina in 2-deoksi-glukoze. Prirejeno po (47).

1.4 Večcelični tumorski sferoidi

Sferoidi (Slika 7) so napredna 3D celična kultura in predstavljajo *in vitro* približek tumorja. Veliki so med 200 in 500 µm in njihove morfološke in funkcionalne značilnosti so podobne tumorjem. V primerjavi z običajnimi celičnimi kulturami je njihova prednost v tem, da bolje simulirajo celične interakcije in posnemajo mikroarhitekturo oz. mikrookolje tumorja, kar nam da fiziološko in biološko bolj relevantne rezultate. Bolje posnemajo tudi ostale *in vivo* lastnosti tumorjev, kot so hipoksija, penetracija učinkovine, odziv in odpornost proti učinkovini ter odlaganje zunajceličnega matriksa (50). Celice lahko *in vitro* rastejo v vse smeri in niso omejene na ploskev, na katero so pritrjene v 2D kulturi (51). Pri sferoidih lahko opazimo nekrotično sredico, gradiente kisika, hranil in metabolitov. Ker mora učinkovina prodreti v sferoid, lahko uporabnost učinkovine predvidimo bolje kot pri celicah v kulturi (52). Splošno mnenje raziskovalcev je, da sferoidi predstavljajo model, ki se mora uveljaviti kot podpora konvencionalnim *in vitro* poskusom v celični kulturi, katerim sledi testiranje na živalih. (50,51).



Slika 7: **A:** Prikaz strukture sferoida. Prirejeno po (50). Na sliki so vidne različne skupine celic, prav tako je prikazan koncentracijski gradient različnih snovi, ki predstavlja razliko med zunanjostjo in notranjostjo sferoida. **B:** Sferoid, slikan s fluorescenčnim mikroskopom. Z zelenim barvilom so označene žive celice, z rdečim pa mrtve.

2 Namen dela

Rak je eden od vodilnih vzrokov smrti na svetu. Iz leta v leto se počasi veča razumevanje patofiziologije raka in s tem prepoznavanje vedno več značilnosti, ki bi lahko v prihodnosti predstavljale tarče pri zdravljenju raka. Ker pa še vedno primanjkuje učinkovin, ki bi dovolj specifično delovale le na rakave celice, je pomembno ugotoviti in analizirati vpliv že uveljavljenih učinkovin z drugačnimi primarnimi terapevtskimi indikacijami na rakave celice. Pomembno skupino tovrstnih učinkovin predstavljajo kardiotonični glikozidi, ki delujejo na Na^+/K^+-črpalko.

V magistrski nalogi bomo na dveh človeških celičnih linijah raka dojke (MDA-MB-231 in MCF-7) analizirali vpliv ouabaina na preživetje in na rast celic v celični kulturi ter vpliv ouabaina na modelu tumorskih sferoidov. Želimo preveriti, ali se z večanjem koncentracije ouabaina zmanjša proliferacija in/ali poveča umrljivost rakavih celic v kulturi. Pri tem bomo kot detekcijske metode uporabili spektrofluorimetrijo, pretočno citometrijo in fluorescenčno mikroskopijo.

V nadaljevanju bomo učinke ouabaina preverili na tumorskih sferoidih, ki predstavljajo napredno celično kulturo oz. *in vitro* model tumorja s 3D strukturo. S fluorescenčnimi barvili bomo z mikroskopom analizirali živost in mrtvost celic ter v vidnem območju na mikroskopu ovrednotili vpliv povečanja koncentracij ouabaina na površino oz. deagregacijo sferoidov. S poskusi na sferoidih želimo tudi preučiti možno optimizacijo samega protokola za nadaljnje poskuse.

Na koncu bomo preverili tudi morebitno sinergistično delovanje ouabaina z modulatorjema presnove glukoze, metforminom in 2-DG, s čimer bomo zajeli dve značilnosti rakavih celic, ki lahko v prihodnosti predstavljata tarče za zdravljenje raka.

Naloga je del projekta ARRS (J3-6794: Celična energijska presnova kot tarča za zdravljenje raka - genski in farmakološki pristop/ Cellular energy metabolism as a target for cancer therapy – genetic and pharmacological approach) in del raziskav skupine za nano in biotehnološke aplikacije. Vodja projekta je viš. znan. sod., doc. dr. Mojca Pavlin, univ. dipl. fiz. Projekt so skupaj prijavile Fakulteta za elektrotehniko, Medicinska fakulteta in Kemijski inštitut. Presoja etične komisije ni potrebna.

3 Materiali in metode

3.1 Celice

Vse poskuse smo izvedli s celičnima linijama MDA-MB-231 in MCF-7. Celice smo gojili v inkubatorju v navlaženem okolju pri 37 °C in 5 % CO_2 v gojiščih RPMI 1640 in MEM M5650.

3.1.1 MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)

MDA-MB-231 so celična linija človeških celic raka dojke oz. metastatskega adenokarcinoma, pridobljene leta 1976 iz plevralnega izliva 51-letne belke. Kratica MDA pomeni M.D. Anderson (inštitut, kjer so odkrili te celice), MB pa Metastatic Breast cancer (tip raka). Prestavljajo celice trojno negativnega raka dojke, ki je najagresivnejša oblika. So ena od najpogosteje uporabljenih celičnih linij v raziskovalnih laboratorijih. MDA-MB-231 je dobro uveljavljena celična linija pri raziskovanju kostnih metastaz (53).

Zamrznjene celice so imele pasažo 39, za poskuse smo uporabili pasaže od 43 do 49.

3.1.2 MCF-7 (ATCC® HTB-22™)

MCF-7 je celična linija, ki so jo pridobili leta 1970 iz plevralnega izliva 69-letne belke. Kratica MCF je akronim za Michigan Cancer Foundation, kjer so odkrili te celice. Predstavljajo celice neinvazivnega raka dojke s prisotnimi estrogenskimi in progesteronskimi receptorji in odsotnimi receptorji HER2.

Zamrznjene celice so imele pasažo 5, za poskuse smo uporabili pasaže od 7 do 15.

3.2 Reagenti

- 200 mM L-glutamin (Sigma, Nemčija)
- 2-deoksi-D-glukoza, založna raztopina pripravljena v PBS (Sigma, Nemčija)
- 70-odstotni etanol, popolno denaturiran, za razkuževanje površine (Itrij, Slovenija)
- Absolutni etanol (Honeywell, ZDA)
- Fetusni serum goveda – FBS (Sigma, Nemčija)
- Glukoza v prahu za pripravo 1 M glukoze (Sigma, Nemčija)
- Gojišče MEM M5650 (Sigma, Nemčija)
- Gojišče RPMI 1640 (Genaxxon, Nemčija)
- Hoechst 33342 (Promega, ZDA)
- Kalcein AM, 1 mg/mL v DMSO (Invitrogen, ZDA)

- Metformin, založna raztopina, pripravljena v PBS (Merck Millipore, ZDA)
- Natrijev klorid (Braun, Nemčija)
- Ouabain – Ouabain oktahidrat - O3125 (Sigma, Nemčija)
- PBS (Sigma, Nemčija)
- Propidijev jodid – (Sigma, Nemčija)
- Pufer 50 mM TRIS-HCl + 100 mM NaCl (pH = 8,25)
- Sterilna voda (Braun, Nemčija)
- Tripsin-EDTA - 25200072 (Sigma, Nemčija)

3.3 Aparature

- Centrifuga Centric 350 (Tehtnica, Slovenija)
- Digestorij MC 18-2 (Iskra PIO, Slovenija)
- Fluorescenčni mikroskop Zeiss Axiovert 200 (Zeiss, Nemčija)
- Mikroskop AE2000 (Motic, Kitajska)
- Mikroskop DFC450 C (Leica, Nemčija)
- Pretočni citometer Attune^{TM} NTX (Termo Fisher Scientific, ZDA)
- Spektrofluorimeter Tecan Infinite 200 (Tecan, Švica)

3.4 Oprema

- 3D stresalnik (Biosan, Latvija)
- Analitska tehtnica (Methler Toledo, ZDA)
- Črpalka za odsesavanje (3A, Velika Britanija)
- Filter za sterilizacijo gojišč (TPP, Švica)
- Epruvete (Eppendorf, Nemčija)
- Hemocitometer – Neubauerjeva komora (Sigma, Nemčija)
- Hladilnik (Gorenje, Bosch, Slovenija, Nemčija)
- ImageJ 1.51k (NIH, ZDA)
- Inkubator (Kambič, Slovenija)
- Krovna stekla (Sigma, Nemčija)
- Mikrocentrifugirke (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL in 5 mL) (Sarstedt, Nemčija)
- Mikrotitrska plošča za sferoide Cell CarrierTM-96 (PerkinElmer, ZDA)
- Mikrotitrske plošče za celične kulture z 12, 24 in 96 vdolbinicami (TPP, Švica)
- Pipete (0,5–10 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL) (Eppendorf, Nemčija)
- Pipete (0,5–10 µL, 10–200 µL, 100–1000 µL) (Biohit, Finska)
- Pipetni nastavki (do 10, 200 ali 1000 µL) (Sarstedt, Nemčija)
- Pipetor (Gilson, Francija)
- Polipropilenske centrifugirke (15 mL, 50 mL) (Sarstedt, Nemčija)
- Posode za gojenje celičnih kultur (T25 cm^2, in T50 cm^2) (TPP, Švica)
- Programska oprema Attune® Cytometric Sofware (Termo Fisher Scientific, ZDA)
- Programska oprema Leica Application Suite (Leica, Nemčija)
- Programska oprema za Tecan Magellan^{TM} (Tecan Group, Švica)
- Programska oprema Microsoft Excel 365 (Microsoft, ZDA)

- Ročni potisni števec za štetje celic (Sigma, Nemčija)
- Serološke pipete 5 mL, 10 mL, 25 mL (Sarstedt, Nemčija)
- Steklenice (Kimble, ZDA)
- Vibracijski mešalnik (Ika, Nemčija)
- Zamrzovalna skrinja Vip plus (Panasonic, Japonska)

3.5 Sestava gojišč

Sestava osnovnih gojišč:

MDA-MB-231		MCF-7
Gojišče s 4,5 g/L glukoze	Gojišče z 1,0 g/L glukoze	Gojišče z 1,0 g/L glukoze
RPMI 1640	RPMI 1640	MEM M5650
10 % FBS	10 % FBS	10 % FBS
1 % glutamina	1 % glutamina	1 % glutamina
2,5 % 1 M glukoze	0,556 % 1 M glukoze	

RPMI-1640 (Genaxxon): C4113.0500, z 1,5 g/L $NaHCO_3$, z 10 mM HEPES, steriliziran s filtracijo. MEM (Sigma): M5650, Earlove soli (5 % CO_2), $NaHCO_3$, 1,0 g/L glukoze, s fenol rdečim, steriliziran s filtracijo.

Tako pripravljena gojišče smo uporabljali največ 1 mesec zaradi nestabilnosti govejega seruma in glutamina.

3.6 Fluorescenčna spektrofluorimetrija

Fluorescenčna spektrofluorimetrija je metoda, s katero analiziramo fluorescenco vzorca. Vzorec oz. celice označimo s fluorescenčnim barvilom (fluoroforom), ki ima različno ekscitacijsko in emisijsko valovno dolžino. Svetloba potuje preko ekscitacijskega monokromatorja in zrcal skozi vzorec s fluoroforom. Fluorofor preide v vzbujeno stanje in odda svetlobni signal z znano valovno dolžino. Svetloba potuje preko zrcal na emisijski monokromator, kjer detektor zajame signal. Intenziteta prejetega signala na detektorju je premo sorazmerna s količino vezanega fluorofora v preiskovanem vzorcu. V našem primeru se je barvilo Hoechst vezalo na celično DNA, zato lahko intenziteto fluorescence povežemo s številom celic v vzorcu.

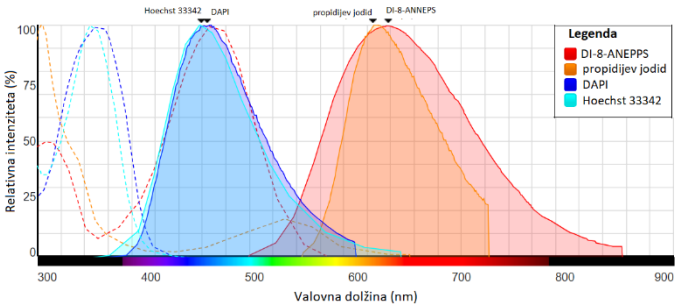
3.7 Pretočna citometrija

S pretočno citometrijo merimo lastnosti posameznih delcev, med tem ko prehajajo čez laserski žarek. Delci oz. celice se morajo po injiciranju razporediti v tok posameznih delcev. Pri akustičnem fokusiranju poleg hidrodinamskega fokusiranja uporabljamo akustični

radiacijski tlak, kar omogoči večje zmogljivosti pretočnega citometra pri hitrejši analizi in večji občutljivosti. Celice se ločijo po fizikalnih lastnosti glede na nosilni medij. Akustično fokusiranje je v primerjavi s hidrodinamskim manj stresno za celice. Kapilara za fokusiranje pri takšnem citometru deluje pri frekvenci nad 1 MHz, kjer je verjetnost, da pride do kavitacij zelo zmanjšana. Zaradi majhne energije, potrebne za delovanje, je zmanjšana tudi možnost poškodb celic. Citometer upošteva Poissonovo statistiko, ki predvideva število celic, ki jih laserski žarek zajame. Po prehodu celice skozi laserski žarek, aparat izmeri sipanje svetlobe z dvema fotodetektorjema. Prvi – *forward scatter* zajame prednje sipanje svetlobe in je postavljen za žarek in drugi – *side scatter* je postavljen pod pravim kotom glede na laserski žarek. Prednje sipanje nam da podatke o velikosti celic, stransko sipanje pa o zrnatosti in strukturni kompleksnosti celic. S fluorescenčnimi detektorji pa lahko merimo tudi fluorescenco. Ti detektirajo emitirano svetlobo določene valovne dolžine, ki je značilna za posamezno barvilo. V našem primeru je to propidijev jodid, ki prodre skozi membrane mrtvih celic, kar nam da oceno odstotka mrtvih celic.

3.8 Fluorescenčna mikroskopija

Fluorescenčna mikroskopija je optična mikroskopija, ki jo najpogosteje uporabljamo v celični biologiji in z njo opazujemo preparate, v katerih so prisotne molekule, ki fluorescirajo. Uporabimo invertni mikroskop, kar pomeni da preparat osvetljujemo od zgoraj. Objektiv tako opravlja funkcijo kondenzorja in objektiva. Med halogensko žarnico in objektivom se nahaja vzbujevalni filter. Mikroskop nato fluorescentno svetlobo preko zrcal usmeri v okular, vzbujevalno pa nazaj v objektiv. Zaporni filter omogoči, da samo fluorescentna svetloba prehaja v goriščno ravnino okularja, zato je je vidno polje temno, na preparatu pa zaznamo le strukture, ki fluorescirajo. Pri analizi s fluorescenčnim mikroskopom moramo izbrati takšne fluorofore in filtre, da se spektri pokrivajo (Slika 8).



Slika 8: Prikaz spektrov barvil in filtrov, ki smo jih uporabili pri analizi. S prekinjenimi črtami so prikazana območja ekscitacije uporabljenih fluorescenčnih barvil, s polnimi črtami pa območja emisije uporabljenih fluorescenčnih barvil. Prirejeno po (54).

4 Eksperimentalno delo

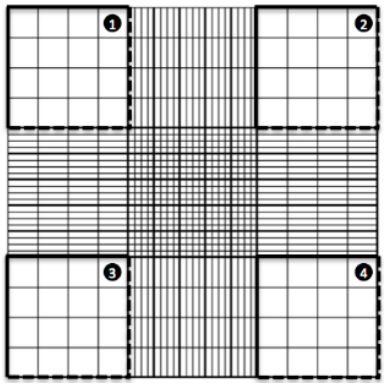
Pri delu s celicami je treba upoštevati vsa pravila za delo v sterilnem oz. aseptičnem okolju. Delovna površina in pribor, ki smo ga uporabljali, smo sterilizirali oz. razkužili s 70 % etanolom. Delo je vedno potekalo v laminariju, uporabljali smo zaščitne rokavice, pred posegom v laminariju smo razkuževali roke. Pri delu smo pokrovčke reagentov v laminariju vedno odlagali navzdol, prav tako smo pazili, da z rokami ali delovnim materialom nismo prečkali odprtih steklenic, posod in plošč.

4.1 Gojenje celic

V prvi fazi smo odmrznili celice, ki so bile shranjene pri –80 °C ali pri –196 °C v tekočem dušiku. Vialo s celicami smo direktno iz skrinje prenesli v kopel, segreto na 37 °C, za 2 minuti. Vialo smo nato razkužili z etanolom in jo prenesli v laminarij, kjer smo celice suspendirali v 5 mL segretega gojišča. Delali smo v 15 mL centrifugirki. Nato smo odmrznjene celice centrifugirali 5 min pri 250 rcf (relativna centrifugalna sila) ali 1000 vrt./min, pri čemer je DMSO prešel v supernatant, ki smo ga nato odsesali. Usedlino (posedle celice) smo nato suspendirali v gojišču in ga prenesli v posodo za gojenje celičnih kultur (T25 cm^2). Ko se celice začnejo deliti, jim je potrebno dvakrat na teden zamenjati gojišče in jih razredčiti oz. presaditi. Ker se celice prilepijo na spodnjo površino posode, jih je potrebno tripsinizirati, pri čemer se celice odlepijo od površine. Pred prvimi poskusi smo celice po odmrzovanju tripsinizirali vsaj dvakrat. Celice smo presadili, ko so dosegle največ 90 % konfluentnost. Celice smo gojili v inkubatorju v navlaženem okolju pri 37 °C in 5 % CO_2.

Posodo s celicami (T25 cm^2 oz. T50 cm^2) smo iz inkubatorja prenesli v laminarij, kjer smo odsesali gojišče in plavajoče celice. Na zgornjo površino smo dodali 5-6 oz. 12-15 mL sterilne 0,9-% raztopine NaCl in jo previdno razporedili po spodnji površini s celicami. Nato smo NaCl odsesali in na celice dodali 1,5 oz. 2,5 mL raztopine tripsina, ga razporedili po površini. Posodo smo nato postavili v inkubator za 2 minuti pri MDA-MB-231 celicah in za 3 minute pri celicah MCF-7. Celicam smo nato dodali vsaj dvakratno količino gojišča, segretega na 37 °C, s čimer smo ustavili delovanje tripsina. Celice smo dobro suspendirali s 5 mL pipeto in 10 µL gojišča s celicami prenesli na hemocitometer. Celice smo ročno prešteli pod mikroskopom s števno komoro po Neubauerjevi metodi (Slika 9). Štetje je potekalo tako, da smo celice prešteli v vseh označenih štirih kvadratih, pri čemer smo vključili tudi

robne celice na dveh stranicah kvadrata. Število preštetih celic smo delili s 4 in pomnožili z 10.000. Tako smo dobili število celic v 1 mL gojišča.



Slika 9: Prikaz mreže na hemocitometru. S številkami so označeni kvadrati, v katerih preštejemo celice, s polno črto so označene stranice kvadratov, kjer vključimo robne celice, in s črtkano črto so označene stranice, kjer robnih celic ne vključimo v štetje. Povzeto po (55).

Sledilo je nasajanje celic na mikrotitrsko ploščo z 12 ali 24 vdolbinicami. Na ploščo z 12 vdolbinicami smo nasadili 80.000 celic v 1 mL gojišča, na ploščo s 24 vdolbinicami pa 60.000 celic v 0,5 mL gojišča. Ploščo smo nato večkrat pretresli v smereh levo-desno in naprej-nazaj, s čimer smo dosegli, da se celice niso zgostile v sredini vdolbinice, ampak so se razporedile po celotni površini. Plošče smo prenesli v inkubator do naslednjega dne. Celice so se pritrdile in pričele deliti.

4.2 Tretiranje

Naslednji dan smo plošče prenesli v laminarij, zamenjali gojišče in dodali različne koncentracije učinkovin z upoštevanjem faktorjev redčenja. Celice MDA-MB-231 smo po tretiranju gojili 72 ur v gojiščih z 1,0 g/L glukoze ali s 4,5 g/L glukoze. V primeru gojenja v gojišču z 1,0 g/L glukoze smo količino gojišča potrojili, da je zadoščala količina hranil za 72 ur. Pri celicah MCF-7 smo uporabljali samo eno gojišče (MEM), ki je že vsebovalo glukozo v koncentraciji 1,0 g/L, in smo glede na rast celic ocenili, da trikratna količina gojišča pri MCF-7 v 72-urnih poskusih ni potrebna. Po 72 urah smo pri kontrolnih – netretiranih vzorcih dosegli konfluentnost (največjo gostoto celic).

4.3 Spektrofluorimetrično določanje relativnega števila celic z barvanjem z barvilom Hoechst

a) Metoda z liziranjem in barvanje z barvilom Hoechst: Celicam smo po 72 urah odsesali gojišče in ploščo s celicami zamrznili v zamrzovalniku. Zamrznili smo jih za najmanj 30 min, če smo meritev opravljali isti dan, v nasprotnem primeru pa lahko tako zamrznjene celice počakajo tudi več tednov. Ploščo smo odmrznili in v vsako vdolbinico dodali 500 µL (plošča z 12 vdolbinicami) ali 300 µL (plošča s 24 vdolbinicami) 0,04 % raztopine SDS (natrijev lavril sulfat) v sterilni vodi, s čimer smo celice lizirali. Ploščo smo 30 minut inkubirali pri sobni temperaturi, vmes smo jo večkrat pretresli, ali pa jo inkubirali na stresalniku. V tri vdolbinice na plošči s 96 vdolbinicami smo odpipetirali po 90 µL raztopine SDS, kar nam je prestavljalo ozadje oz. slepi vzorec. V preostale vdolbinice smo odpipetirali po 90 µL lizata tako, da smo na koncu za vsak vzorec dobili vsaj tri paralele. Pufru 50 mM TRIS-HCl + 100 mM NaCl (pH = 8,25) smo dodali barvilo Hoechst, tako da je bila končna koncentracija barvila v pufru 5 µg/mL. 90 µL pufra z barvilom smo dodali k slepemu vzorcu in k celičnim lizatom. Nato smo ploščo prenesli v škatlo – temen prostor in pred meritvijo inkubirali vsaj 10 min, da se je barvilo Hoechst vezalo na DNA. Pri tej metodi smo s spektrofluorimetrom izmerili intenziteto fluorescence v posamezni točki.

b) Direktna metoda brez liziranja: Celicam smo po 72 urah v gojišče dodali 1 µL barvila Hoechst s koncentracijo 2 µg/µL. Plošče smo inkubirali 30 minut v laminariju pri sobni temperaturi, nato smo celicam zamenjali gojišče. S tem smo odstranili tudi plavajoče celice, ki predstavljajo odlepljene žive celice in mrtve celice. Enak postopek smo naredili tudi s ploščami, na katere nismo nasadili celic in so nam predstavljale slepo meritev. Pri tej metodi smo s spektrofluorimetrom izmerili intenziteto fluorescence po celotni površini vdolbinice oz. v 49 točkah.

Za obe metodi (a, b) smo določili intenziteto fluorescence pri ekscitaciji 350 nm in emisiji 461 nm na spektrofluorimetru Tecan Infinite 200.

Premo sorazmerno odvisnost med številom celic in intenziteto fluorescence smo predpostavili pri obeh metodah (a, b). Fluorescenco ozadja smo odšteli od vsakega vzorca. Relativno število celic smo podali kot odstotek intenzitete fluorescence tretiranih vzorcev, glede na kontrolni vzorec, ki je predstavljal netretirane celice (43).

4.4 Določanja preživetja celic na pretočnem citometru Attune^{TM} Nxt z barvilom PI

Po 72 urah gojenja v inkubatorju smo gojišče s celicami iz plošče odpipetirali v 5-mL epruvete. V vdolbinice na plošči smo dodali 0,5 mL NaCl in vsebino odpipetirali v isto epruveto. Nato smo v vdolbinico dodali 200 µL tripsina in inkubirali 1,5 minute pri celicah MDA-MB-231 in 3 minute pri celicah MCF-7 in nato dodali 1 mL gojišča. Celice smo dobro suspendirali in jih prenesli v epruvete. Vse epruvete z vzorci smo centrifugirali 6 minut pri 300 rcf. Supernatant po centrifugiranju smo previdno odlili in k usedlini dodali 300 µL PBS. Pred meritvijo smo v epruveto dodali 30 µL propidijevega jodida (PI) s koncentracijo 1 mg/mL in epruveto dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Pri tem so se posedle celice resuspendirale, PI je prešel skozi poškodovane membrane mrtvih ali umirajočih celic. Sledila je meritev na pretočnem citometru Attune^{TM} Nxt. Pri analiziranju smo zajeli signal propidijevega jodida s filtrom BL3-H (574/26). Za vsak parameter smo prešteli 20.000 dogodkov oz. celic.

Pri tej metodi priprave vzorca smo v analizo vključili tako pritrjene, kot tudi plavajoče celice. Čeprav je splošno prepričanje, da *in vitro* plavajoče celice predstavljajo mrtve celice, so nekatere raziskave pokazale, da je dober delež teh celic v resnici še živih (42).

4.5 Vizualizacija morfologije in preživetja s fluorescenčno mikroskopijo

S fluorescentnim mikroskopom Zeiss smo optično ocenili rast, preživetje in morfologijo celic. Celicam smo po 72 urah tretiranja dodali 1 µL barvila Hoechst v koncentraciji 2 µg/µL in plošče inkubirali 20 minut v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO_2. Poslikali smo vidno polje ter vidno polje pri rdečem (ANEPPS) in modrem (DAPI) filtru. Slike smo posneli na mikroskopu Zeiss Axiovert 200, pri 20-kratni povečavi. Za vsak vzorec smo posneli vsaj tri naključne slike.

4.6 Priprava in gojenje večceličnih 3D sferoidov

a) Priprava oz. formiranje sferoidov. Za pripravo sferoidov smo 150 µL gojišča s 10.000 celicami nasadili na ploščo za sferoide z ultra nizko adhezijo. Plošče imajo 96 vdolbinic, ki so v obliki črke U in so prevlečene s polimerom, ki preprečuje, da bi se celice pritrdile na dno vdolbinice. Prevleka omogoča, da se konsistentno tvorijo okrogli sferoidi (tj. celice se povezujejo med sabo) in da se prepreči satelitska rast. Celice MDA-MB-231 smo gojili v gojišču RPMI s 4,5 g/L glukoze, MCF-7 pa v gojišču MEM. Plošče smo po nasajanju takoj

centrifugirali 2 minuti pri 1000 rcf. Ploščo smo nato 1 dan pustili v inkubatorju, da so se sferoidi dokončno formirali in nato sferoide tretirali z različnimi koncentracijami ouabaina in pustili v inkubatorju še nadaljnjih 48 ur. Pri dodajanju ouabaina v gojišče smo bili zelo previdni, saj smo, da ni prišlo do razbitja sferoida, pipetirali počasi ter ob steno vdolbinice.

b) Analiza velikosti in preživetja celic. Po koncu tretiranja, brez menjave gojišča, smo sferoidom previdno (počasi in ob steno vdolbinice) dodali 20 µL kalceina in 18 µL propidijevega jodida in jih poslikali na mikroskopu. Kalcein smo dodali približno 15 minut pred meritvijo, propidijev jodid pa 10 minut prej. Zajeli smo slike v vidnem območju in z zelenim in rdečim filtrom. Slike smo posneli na mikroskopu Leica (DFC450 C), pri 10-kratni povečavi in za vsako vdolbinico oz. vzorec zajeli eno sliko pri posameznem filtru. Izpostavitev je bila 1 sekundo. S programom ImageJ smo na posnetih slikah ovrednotili velikost oz. površino sferoidov ter intenziteto zelenega in rdečega signala.

5 Rezultati in razprava

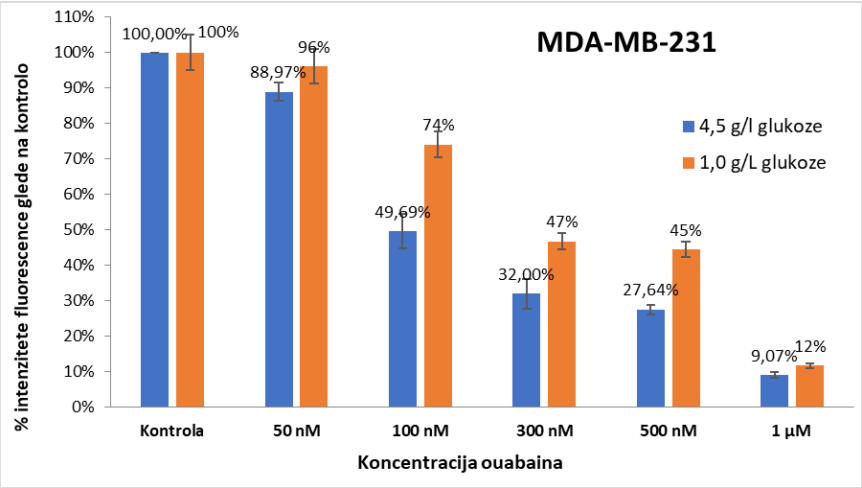
Vpliv ouabaina na rast in preživetje celic *in vitro* smo preverili na dveh človeških celičnih linijah raka dojke, MDA-MB-231 in MCF-7. MDA-MB-231 predstavljajo celice trojno negativnega raka dojke, MCF-7 pa celice raka dojke s prisotnimi estrogenskimi in progesteronskimi receptorji in odstotnimi receptorji HER2. Pri celični liniji MDA-MB-231 smo uporabili gojišči z različnima koncentracijama glukoze. Koncentracija 1,0 g/L glukoze predstavlja fiziološko koncentracijo, 4,5 g/L pa koncentracijo, ki jo standardno uporabljamo v *in vitro* poskusih.

Najprej smo preverili delovanje ouabaina v celični kulturi in na modelu večceličnih sferoidov. Na koncu smo preverili še potencialno sinergijo z drugimi učinkovinami, ki vplivajo na celično presnovo.

5.1 Ugotavljanje vpliva ouabaina na rast in preživetje celic MDA-MB-231 in MCF-7 v celični kulturi s fluorescenčno spektrofluorimetrijo in pretočno citometrijo

5.1.1 Ugotavljanje vpliva ouabaina na rast celic MDA-MB-231 in MCF-7 s fluorescenčno spektrofluorimetrijo

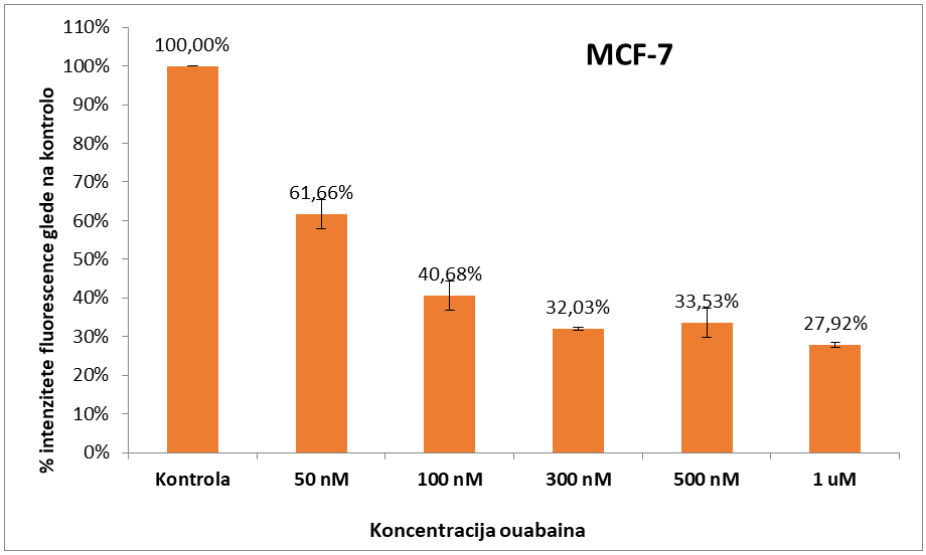
Celice MDA-MB-231 smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah in prisotnosti gojišč RPMI z dvema različnima koncentracijama glukoze. Vzorcem smo dodali barvilo Hoechst in intenziteto fluorescence izmerili na spektrofluorimetru. Ker se uporabljeno fluorescenčno barvilo Hoechst veže na DNA živih celic, je intenziteta fluorescence sorazmerna s številom celic. Tako dobimo informacijo o rasti oz. proliferaciji celic; rezultati so prikazani na Sliki 10.



Slika 10: Relativno število celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri celični liniji MDA-MB-231, gojeni v gojišču z različnima koncentracijama glukoze. Na y-osi je podana relativna vrednost fluorescence barvila Hoechst. Intenziteta fluorescence smo normalizirali glede na kontrolni vzorec, ki so ga predstavljale netretirane celice. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah in prisotnosti gojišč RPMI z dvema različnima koncentracijama glukoze. Za vsako koncentracijo smo izvedli 3 biološke ponovitve z dvema tehničnima paralelama. Pri obdelavi meritev smo od vsake meritve odšteli tudi vrednost slepega vzorca. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost ± standardni odklon (SD) (n=3).

Na Sliki 10 lahko vidimo, da smo s povečanjem koncentracije ouabaina dobili koncentracijsko odvisno padajoče intenzitete fluorescence v posameznih vzorcih. Ker se uporabljeno fluorescenčno barvilo Hoechst veže na DNA živih celic, lahko sklepamo, da ouabain v koncentraciji nad 100 nM močno vpliva na število živih celic, kar je predvsem posledica zmanjšanja proliferacije celic.

Celice MCF-7 smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah in gojišču MEM z 1,0 g/L glukoze. Vzorcem smo dodali barvilo Hoechst in intenziteto fluorescence izmerili na spektrofluorimetru. Intenziteto fluorescence smo normalizirali glede na kontrolni vzorec, ki je predstavljal netretirane celice; rezultati so prikazani na Sliki 11.



Slika 11: Relativno število celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri celični liniji MCF-7. Na y-osi je podana relativna vrednost fluorescence barvila Hoechst. Intenziteto fluorescence barvila smo normalizirali glede na kontrolni vzorec, ki so ga predstavljale netretirane celice. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah. Za vsako koncentracijo ouabaina smo izvedli 3 biološke ponovitve z dvema tehničnima paralelama. Pri obdelavi meritev smo od vsake meritve odšteli tudi vrednost slepega vzorca. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost ± SD (n=3).

Na Sliki 11 vidimo, da smo podobno kot pri celicah MDA s povečanjem koncentracije ouabaina dobili koncentracijsko odvisno padajoče intenzitete fluorescence v posameznih vzorcih. Iz rezultatov lahko sklepamo, da ouabain že pri zelo nizkih koncentracijah močno

vpliva na število živih celic, kar je predvsem posledica proliferacije celic. Iz diagrama lahko sklepamo, da pri koncentraciji okrog 300 nM dosežemo plato, saj se pri večanju koncentracije ouabaina nad 300 nM intenziteta fluorescence bistveno več ne spreminja.

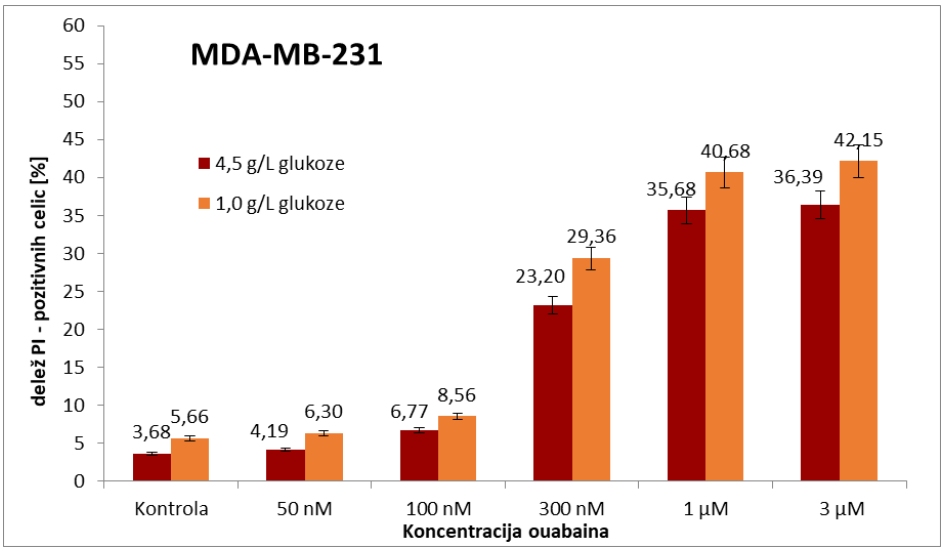
Če primerjamo rezultate obeh celičnih liniji, lahko sklepamo da ouabain pri celični liniji MCF-7 na proliferacijo vpliva pri nižjih koncentracijah kot pri liniji MDA-MB-231. Poleg tega pri MDA-MB-231 nismo opazili plato učinka in je le-ta prisoten pri višjih koncentracijah.

Ob pregledu z mikroskopom smo s povečanjem koncentracij ouabaina opazili povečanje števila plavajočih celic. Plavajočih celic s spektrofluorimetrijo nismo zajeli. Ker lahko plavajoče celice predstavljajo žive odlepljene ali pa mrtve celice, smo izvedli poskuse s pretočno citometrijo in fluorescenčno mikroskopijo.

5.1.2 Ugotavljanje vpliva ouabaina na preživetje celic MDA-MB-231 in MCF-7 s pretočno citometrijo in barvilom PI

Z meritvijo deleža PI-pozitivnih celic smo ugotavljali vpliv ouabaina na preživetje celic MDA-MB-231in MCF-7, ki smo jih gojili v gojiščih z različnima koncentracijama glukoze. Ker propidijev jodid prodre samo skozi poškodovane celične membrane in se veže na DNA, nam meritve s pretočnim citometrom dajo realne rezultate o številu oz. deležu mrtvih celic. Za določanje števila mrtvih celic v vzorcu, smo skupaj zbrali pritrjene in plavajoče celice ter analizirali preživetje na pretočnem citometru Attune^{TM} Nxt.

Celice MDA-MB-231 smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah in gojiščih RPMI z dvema različnima koncentracijama glukoze. Po 72 urah smo celice iz plošč prenesli v epruvete dodali propidijev jodid in izmerili delež PI-pozitivnih celic na pretočnem citometru. Kontrolni vzorec je predstavljal netretirane celice; rezultati so prikazani na Sliki 12.

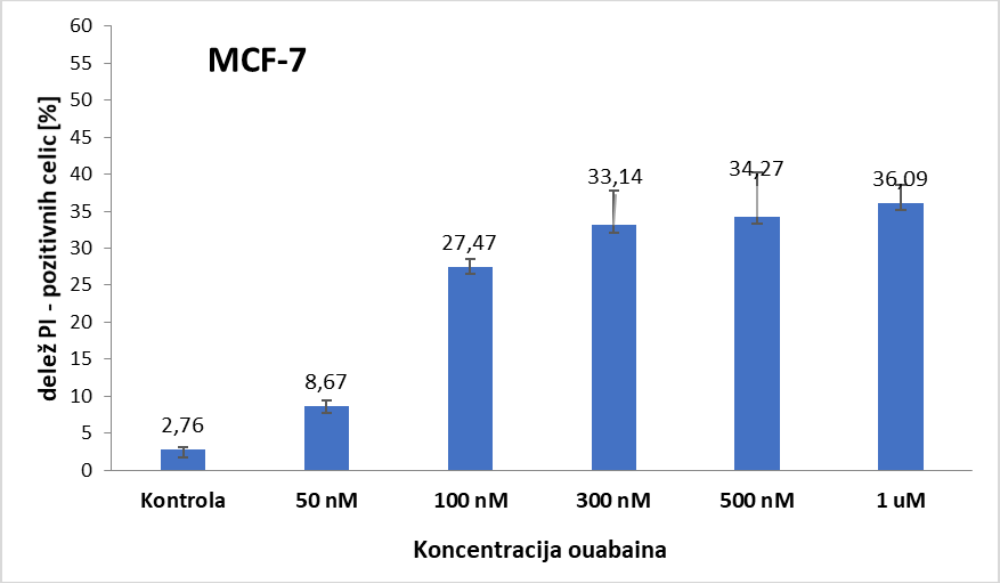


Slika 12: Delež PI-pozitivnih celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri celični liniji MDA-MB-231, gojeni v gojišču z različnima koncentracijama glukoze. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah in gojiščih RPMI z dvema različnima koncentracijama glukoze. Kontrolni vzorec so predstavljale netretirane celice. Za vsako koncentracijo smo izvedli 3 biološke ponovitve z dvema tehničnima paralelama. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost ± SD (n=3).

Na podlagi rezultatov iz Slike 13 vidimo, da smo s povečanjem koncentracije ouabaina dosegli povečanje deleža PI-pozitivnih celic v vzorcu. Iz rezultatov lahko sklepamo, da ouabain vpliva na mehanizme, ki poškodujejo membrano celic in/ali povzročijo celično smrt. Iz rezultatov vidimo rahlo večji delež PI-pozitivnih celic v vzorcih, kjer smo celice gojili v gojišču z 1,0 g/L glukoze. Sklepamo, da bi ti rezultati bili lahko posledica zmanjšanje koncentracije glukoze, ki celicam predstavlja glavno hranilo.

Če primerjamo diagrame intenzitete fluorescence barvila Hoechst (slika 10) in deleža PI-pozitivnih celic (slika 12), lahko sklepamo, da je razlog za manjšo intenziteto fluorescence barvila Hoechst večja umrljivost. Govorimo lahko o citotoksičnem (zmanjšanje proliferacije) in citostatičnem (neposredna smrt dela celic) delovanju ouabaina na celice MDA-MB-231. Tudi, ko je delež PI-pozitivnih celic zanemarljiv (pri koncentracijah 50 nM in 100 nM), lahko že opazimo padec števila celic oz. učinek na proliferacijo celic.

Tudi pri celicah MCF-7 smo podobno ugotavljali vpliv ouabaina na preživetje celic. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah in gojišču MEM z 1,0 g/L glukoze. Po 72 urah smo celice iz plošč prenesli v epruvete dodali propidijev jodid in izmerili delež PI-pozitivnih celic na pretočnem citometru. Kontrolni vzorec je predstavljal netretirane celice; rezultati so prikazani na Sliki 13.



Slika 13: Delež PI-pozitivnih celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri celični liniji MCF-7. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah. Kontrolni vzorec so predstavljale netretirane celice. Za vsako koncentracijo ouabaina smo izvedli 3 biološke ponovitve z dvema tehničnima paralelama. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost ± SD (n=3).

Iz rezultatov sklepamo, da pride do signifikantnega povečanja umrljivosti celic že pri nizkih koncentracijah (50 nM), pri višjih koncentracijah pa je viden oz. nakazan plato učinek. Ko primerjamo rezultate z diagramom meritve števila celic (Slika 11), vidimo da se je število celic zmanjšalo delno zaradi večje umrljivosti celic, delno pa zaradi neposrednega vpliva ouabaina na proliferacijo. Pri 50 nM koncentraciji je število celic padlo na 60 %, delež PI-pozitivnih celic pa je za 6 % večji, kot pri kontrolnem vzorcu.

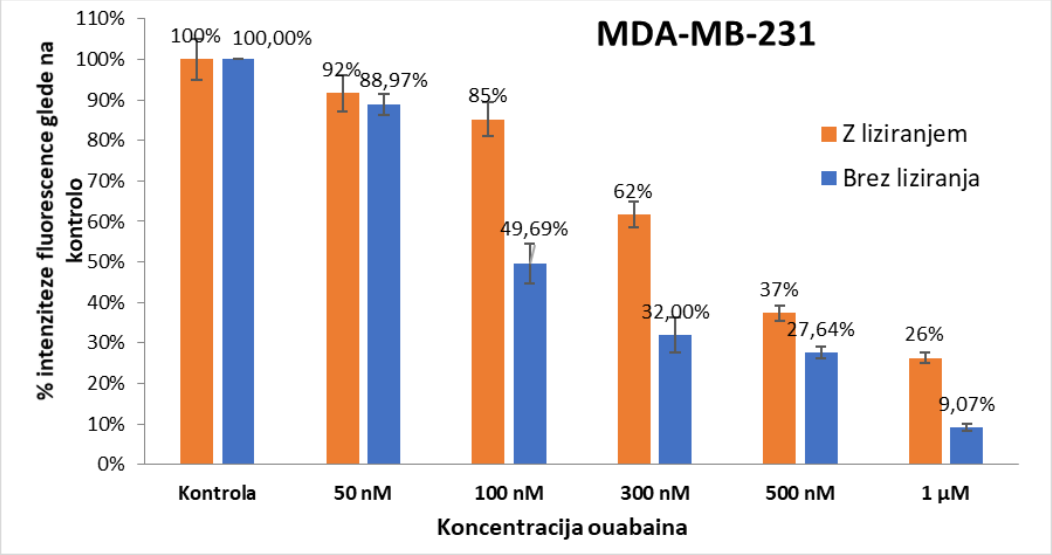
Če primerjamo obe celični liniji, vidimo, da ouabain pri celicah MCF-7 deluje citotoksično že pri nižjih koncentracijah.

5.2 Ugotavljanje vpliva načina priprave vzorca na določanje števila celic MDA-MB-231 in MCF-7 pri spektrofluorimetrični meritvi z barvilom Hoechst

Ker je postopek priprave vzorcev z liziranjem zamuden in obstaja večja možnost napake zaradi večjega števila korakov, smo preverili še, ali je pri tretiranju celic z ouabainom in spektrofluorimetrično meritvijo intenzitete fluorescence barvila Hoechst, primerna še direktna metoda brez liziranja. Pri pripravi vzorcev po metodi brez liziranja, smo Hoechst dodali direktno v gojišča s celicami po 72 urah, nato smo plošče, prekrite z aluminijasto folijo inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Gojišča smo zamenjali s svežimi in izvedli meritev na spektrofluorimetru. Pri pripravi vzorcev z liziranjem smo po 72 urah celicam

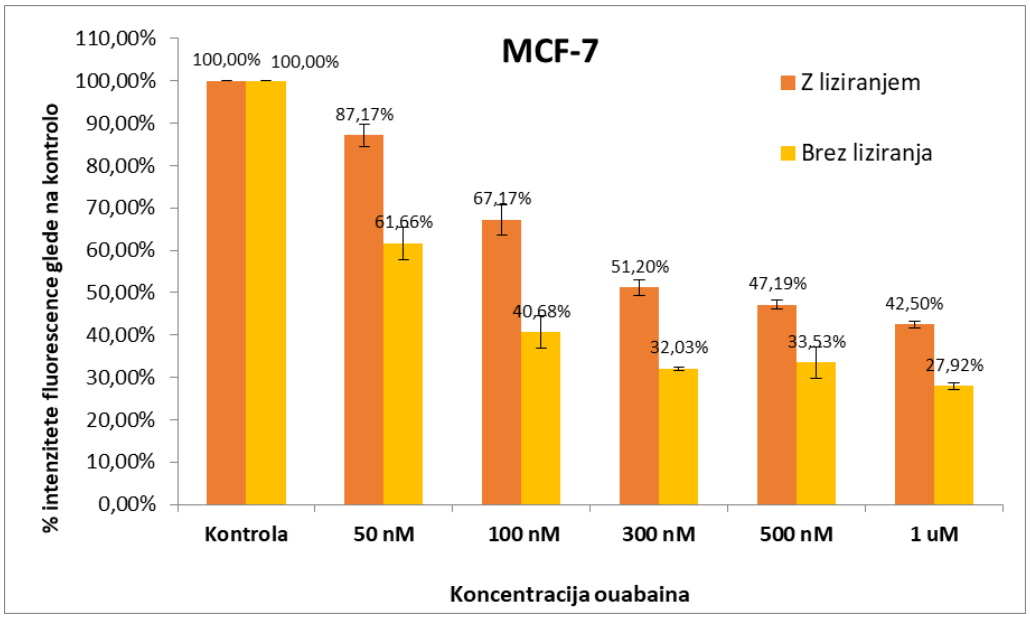
odsesali gojišče in plošče zamrznili. Po 30 minutah v zamrzovalniku smo na celice dodali 0,04 % raztopino SDS in celice lizirali 30 minut na stresalniku. Nato smo lizate prenesli na ploščo s 96 vdolbinicami in k lizatom dodali barvilo Hoechst v pufru 50 mM TRIS-HCl + 100 mM NaCl (pH = 8,25). Nato smo izvedli meritev na spektrofluorimetru.

Celice MDA-MB-231 smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah in gojišču RPMI s 4,5 g/L glukoze. Nato smo vzorce celic pripravili po opisanih postopkih in izmerili intenziteto fluorescence na spektrofluorimetru. Intenziteto fluorescence smo normalizirali glede na kontrolni vzorec, ki je predstavljal netretirane celice; rezultati so prikazani na Sliki 14.



Slika 14: Relativno število celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri vzorcih celične linije MDA-MB-231, pripravljenih po dveh različnih postopkih. Na y-osi je podana relativna vrednost fluorescence barvila Hoechst. Intenziteto fluorescence smo normalizirali glede na kontrolni vzorec, ki so ga predstavljale netretirane celice. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah v gojišču RPMI s 4,5 g/L glukoze. Izvedli smo 3 biološke ponovitve z dvema tehničnima paralelama. Pri obdelavi meritev smo od vsake meritve odšteli tudi vrednost slepega vzorca. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost ± SD (n=3).

Podobno analizo smo izvedli tudi na celicah MCF-7. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah in gojišču MEM z 1,0 g/L glukoze. Nato smo vzorce celic pripravili po opisanih postopkih in izmerili intenziteto fluorescence na spektrofluorimetru; rezultati so prikazani na Sliki 15.



Slika 15: Relativno število celic v odvisnosti od koncentracije ouabaina pri vzorcih celične linije MCF-7, pripravljenih po dveh različnih postopkih. Na y-osi je podana relativna vrednost fluorescence barvila Hoechst glede na kontrolni vzorec. Intenziteto fluorescence smo normalizirali glede na kontrolni vzorec, ki so ga predstavljale netretirane celice. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah v gojišču MEM z 1,0 g/L glukoze. Izvedli smo 3 biološke ponovitve z dvema tehničnima paralelama. Pri obdelavi meritev smo od vsake meritve odšteli tudi vrednost slepega vzorca. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost ± SD (n=3).

Primerjali smo vpliv dveh različnih priprav vzorca na meritev intenzitete fluorescence na spektrofluorimetru. Iz rezultatov je razvidno, da so vrednosti intenzitete fluorescence višje po pripravi vzorca z liziranjem. Menimo, da je za takšne rezultate kriva priprava vzorcev. Postopek na rezultate vpliva, saj je so v protokolu, ki zajema lizo celic prisotni številni vmesni koraki. Metoda z liziranjem je primerna za spektroflurimetrično meritev v eni točki. Kjer pa merimo z napravo, ki omogoča skeniranje celotne površine vzorca (*"multiple reads per well"*), je primernejša direktna metoda.

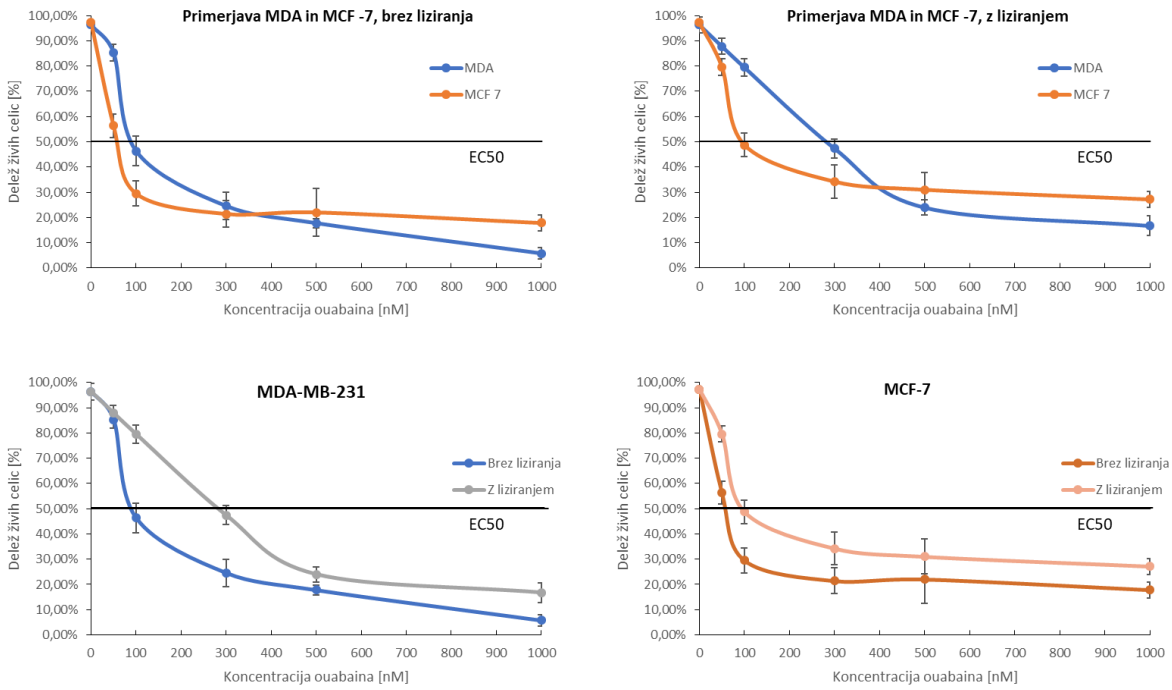
Brez neodvisne, tretje metode, bi težko trdili, katera metoda je bolj natančna. Število celic bi lahko preverili še s tretjo, neodvisno metodo. Metoda ovrednotenja števila živih celic z mikroskopom (rezultati meritev poskusov znotraj skupine) da povsem primerljive rezultate z vrednostmi z metodo brez liziranja. Iz tega lahko sklepamo, da nam direktna metoda da bolj natančne rezultate.

Zato menimo, da je postopek priprave vzorca brez liziranja celic primeren in uporaben pri tovrstnih poskusih. Postopek je hitrejši, zaradi manjšega števila korakov je manjša tudi možnost človeške napake in rezultati so glede na trend padanja fluorescence primerljivi z metodo z liziranjem, zato smo zgoraj omenjeni postopek priprave uporabljali tudi v

nadaljnjih poskusih preizkušanja sinergističnega delovanja ouabaina z metforminom in 2-DG.

5.3 Ocena deleža živih celic in določitev EC_{50} pri celicah MDA-MB-231 in MCF-7

Združili smo meritve intenzitete fluorescence barvila Hoechst in deleža PI-pozitivnih celic pri posameznih meritvah. Pri MDA-MB-231 smo uporabili rezultate, izmerjene na celicah, ki smo jih gojili ob prisotnosti gojišča RPMI s 4,5 g/L glukoze. Standardne odklone smo sešteli. Delež živih celic smo določili tako, da smo relativno število celic pri posamezni koncentraciji ouabaina, pomnožili z deležem PI-negativnih celic, ki je predstavljal celotno relativno število celic v vzorcu (100 %), zmanjšano za delež PI-pozitivnih celic pri posamezni koncentraciji ouabaina (% živih celic = % števila celic × (100 % - % PI-pozitivnih celic). Iz grafa, ki prikazuje delež živih celic v odvisnosti od uporabljene koncentracije ouabaina, smo ocenili koncentracijo, pri kateri je bilo 50 % celic živih oz. koncentracijo, ki je izzvala 50 % maksimalnega učinka (EC_{50}).



Slika 16: Delež živih celic MDA-MB-231 in MCF-7 v odvisnosti od koncentracije ouabaina po 72h tretiranju. Združili smo meritve intenzitete fluorescence barvila Hoechst in deleža PI-pozitivnih celic pri posameznih meritvah. Pri MDA-MB-231 smo uporabili rezultate za celice, ki smo jih gojili ob prisotnosti gojišča RPMI s 4,5 g/L glukoze. Standardne odklone smo sešteli. Delež živih celic smo določili tako, da smo deleže kontrole intenzitete barvila Hoechst pomnožili s faktorjem živih celic, ki je predstavljal delež kontrole barvila Hoechst, zmanjšan za delež PI-pozitivnih celic. Pri deležu živih celic 50 % smo narisali črto, s katero smo ocenili koncentracijo, pri kateri je bilo 50 odstotkov živih celic (EC_{50}).

Iz rezultatov sklepamo, da je koncentracija ouabaina, pri kateri je 50 odstotkov celic živih (EC_{50}), ob pripravi vzorcev za merjenje intenzitete fluorescence barvila Hoechst po metodi brez liziranja pri celicah MDA-MB-231 približno 100±10 nM, pri MCF-7 pa približno 70±10 nM. Pri metodi priprave vzorcev z liziranjem je EC_{50} približno 280 nM pri celični liniji MDA-MB-231 in približno 100 nM pri celični liniji MCF-7.

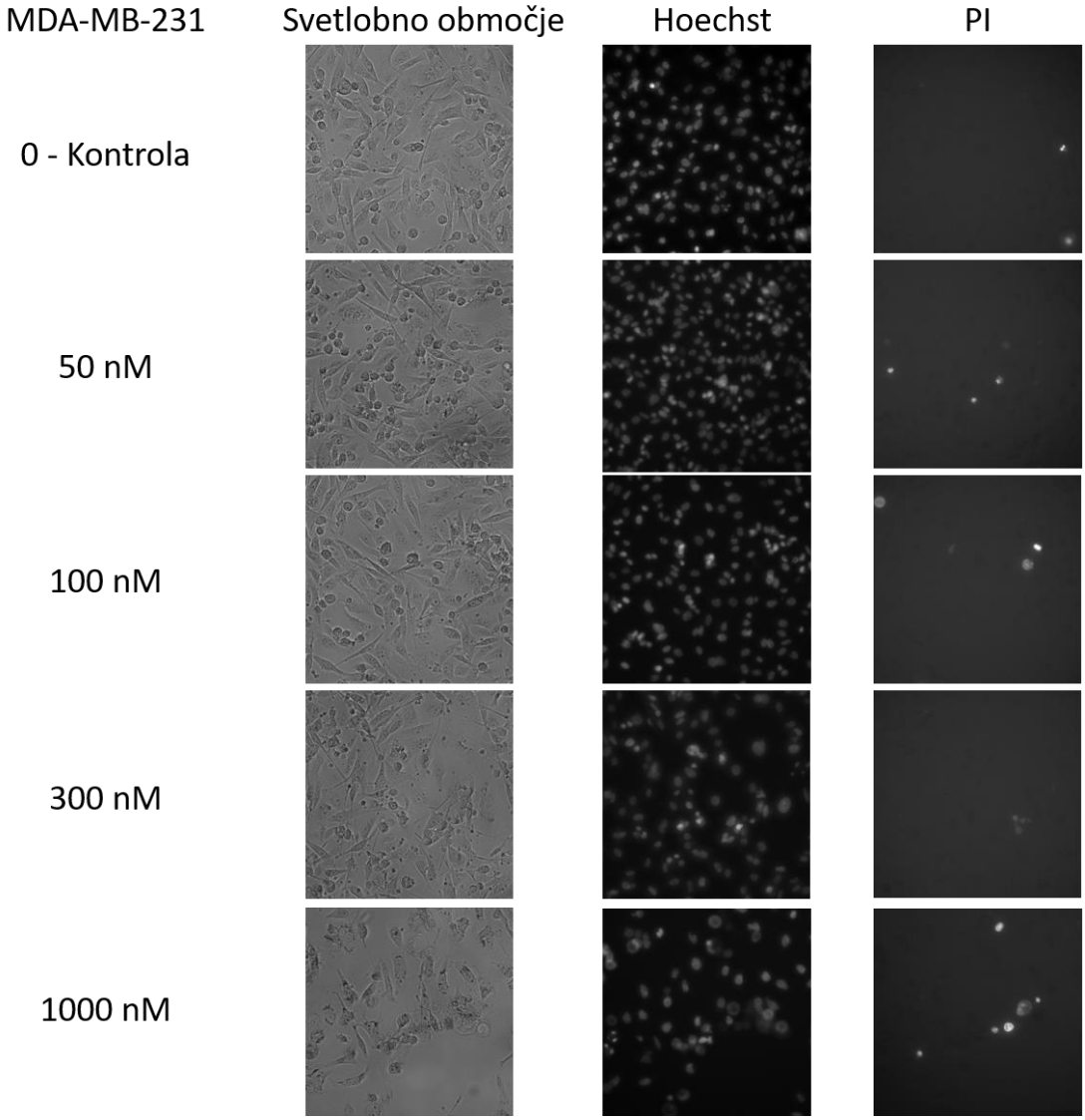
Razlogi za citotoksično in citostatično delovanje ouabaina so v mehanizmu delovanja kardiotoničnih glikozidov. Ouabain in ostali kardiotonični glikozidi delujejo tako, da zavirajo Na^+/K^+-črpalko, pri čemer se povečata znotrajcelični koncentraciji natrija in posredno kalcija ter zniža znotrajcelična koncentracija kalija. Ouabain se veže na podenoto α1 Na^+/K^+-črpalke. Z zaviranjem črpalke zviša citosolno koncentracijo Ca^{2+}, ki povzroči zmanjšanje mitohondrijskega potenciala in aktivacije ROS, kar vodi do apoptoze. Ouabain zavira tudi topoizomerazo II, kar vodi do fragmentacije DNA, ki je tipična značilnosti pri apoptozi. Apoptozo spodbudi tudi preko aktivacije kaspaze 3. Pri interakciji kardiotoničnih glikozidov in črpalke pride do aktivacije različnih signalnih poti in kaskad, ki imajo pomembno vlogo pri proliferaciji, metastaziranju, preživetju, migraciji in apoptozi. Med pomembnejše sodijo aktivacije kinaze Src, Ras-Raf-MAPK in P42/p44 (37,39).

Naši rezultati so primerljivi z literaturnimi podatki. Vrednosti EC_{50} so primerljive, kot tudi trend padanja števila celic z naraščajočimi koncentracijami ouabaina. Navedene koncentracije EC_{50} lahko zasledimo v dveh člankih iz let 2007 in 2008, kjer so Winnicka in sodelavci navedli naslednje EC_{50}: 130±2 nM pri MCF-7 in 150±2 oz. 90±2 nM pri MDA-MB-231, a z drugačnim protokolom in 48 urnim tretiranjem (35,36).

Nismo pa zasledili člankov, kjer bi z enakimi barvili oz. podobnimi protokoli ovrednotili vpliv ouabaina na rast in preživetje celic raka dojke ob sočasni primerjavi obeh celičnih linij MDA-MB-231 in MCF-7.

5.4 Vizualizacija vpliva ouabaina na morfologijo, gostoto, rast in umrljivost celic MDA-MB-231 in MCF-7 s svetlobno in fluorescenčno mikroskopijo.

Celice MDA-MB-231 smo 72 ur izpostavili različnim koncentracijam ouabaina v gojišču RPMI s 4,5 g/L glukoze. Po 72 urah smo vzorcem dodali barvili Hoechst in propidijev jodid. Slike smo posneli v vidnem območju, z modrim filtrom in z rdečim filtrom. Za vsak vzorec in vsak filter smo posneli več slik, pri čemer smo naključno izbrali območja in se izognili slikanju na robu vdolbinice.



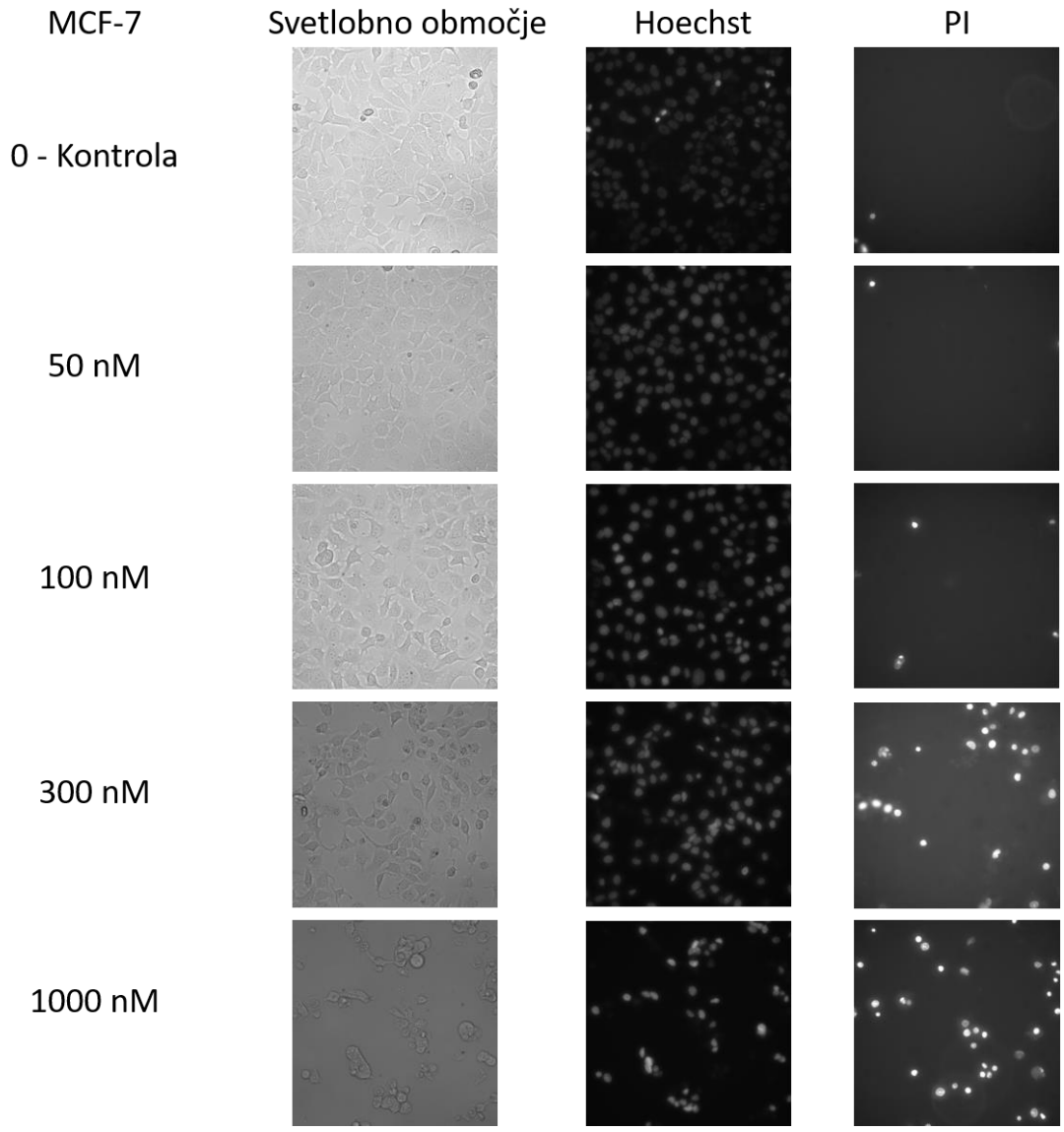
Slika 17: Prikaz celic MDA-MB-231, posnetih s fluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina. Po 60.000 celic v 500 µL gojišča RPMI s 4,5 g/L glukoze smo nasadili v vdolbinice plošče s 24 vdolbinicami. Naslednji dan smo gojišče zamenjali s svežim ter dodali različne koncentracije ouabaina, tako da so končne koncentracije znašale 50 nM, 100 nM, 300 nM in 1000 nM. Kontrolni vzorec so predstavljale netretirane celice. Po 72 urah tretiranja v inkubatorju, smo celicam dodali 1 µL barvila Hoechst (2 µg/µL). Približno 5 min pred meritvijo smo dodali 50 µL PI (1 µg/µL). Posneli smo slike v vidnem območju, z modrim (Hoechst) in z rdečim filtrom (PI).

Na slikah, posnetih v vidnem območju, lahko vidimo, da se je z večanjem koncentracije ouabaina spreminjala gostota celic. Celice vretenaste oblike predstavljajo pritrjene, celice okrogle oblike pa plavajoče celice. Pri višjih koncentracijah lahko opazimo tudi morfološke spremembe celic.

Pri slikanju z modrim filtrom, kjer smo spremljali fluorescenco barvila Hoechst, lahko ob večanju koncentracij ouabaina opazimo zmanjšanje števila živih celic. Pri slikanju z rdečim filtrom vidimo, da se je delež mrtvih celic v vzorcih s povečanjem koncentracije ouabaina v povprečju večal.

Na podlagi rezultatov spektrofluorimetrije, pretočne citometrije in fluorescenčne mikroskopije lahko ugotovimo, da se rezultati med seboj ujemajo in dopolnjujejo. Na podlagi rezultatov ugotavljamo, da je opažen predvsem citostatičen, delno pa tudi citotoksičen učinek.

Podobno smo izvedli vizualizacijo celic MCF-7; te smo 72 ur izpostavili različnim koncentracijam ouabaina v gojišču MEM z 1,0 g/L glukoze. Slikali smo območja, kjer so bile celice razporejene čez celotno vidno polje in ni bilo prisotnih otočkov brez celic.



Slika 18: Prikaz celic MCF-7, posnetih s fluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina. Po 60.000 celic v 500 µL gojišča MEM smo nasadili v vdolbinice plošče s 24 vdolbinicami. Naslednji dan smo gojišče zamenjali s svežim ter dodali različne koncentracije ouabaina, tako da so končne koncentracije znašale 50 nM, 100 nM, 300 nM in 1000 nM. Kontrolni vzorec so predstavljale netretirane celice. Po 72 urah tretiranja v inkubatorju, smo celicam dodali 1 µL barvila Hoechst (2 µg/µL). Približno 5 min pred meritvijo smo dodali 50 µL PI (1 µg/µL). Posneli smo slike v vidnem območju, z modrim (Hoechst) in z rdečim filtrom (PI).

Na slikah, posnetih v vidnem območju, lahko vidimo, da se je z večanjem koncentracije ouabaina izrazito spreminjala gostota celic. Pri višjih koncentracijah lahko opazimo podobno kot pri celicah MDA-MB-231 tudi morfološke spremembe celic.

Pri slikanju z modrim filtrom, kjer smo spremljali fluorescenco barvila Hoechst, lahko ob večanju koncentracij ouabaina opazimo zmanjšanje števila živih celic. Pri slikanju z rdečim filtrom vidimo, da se je delež mrtvih celic v vzorcih s povečanjem koncentracije ouabaina večal.

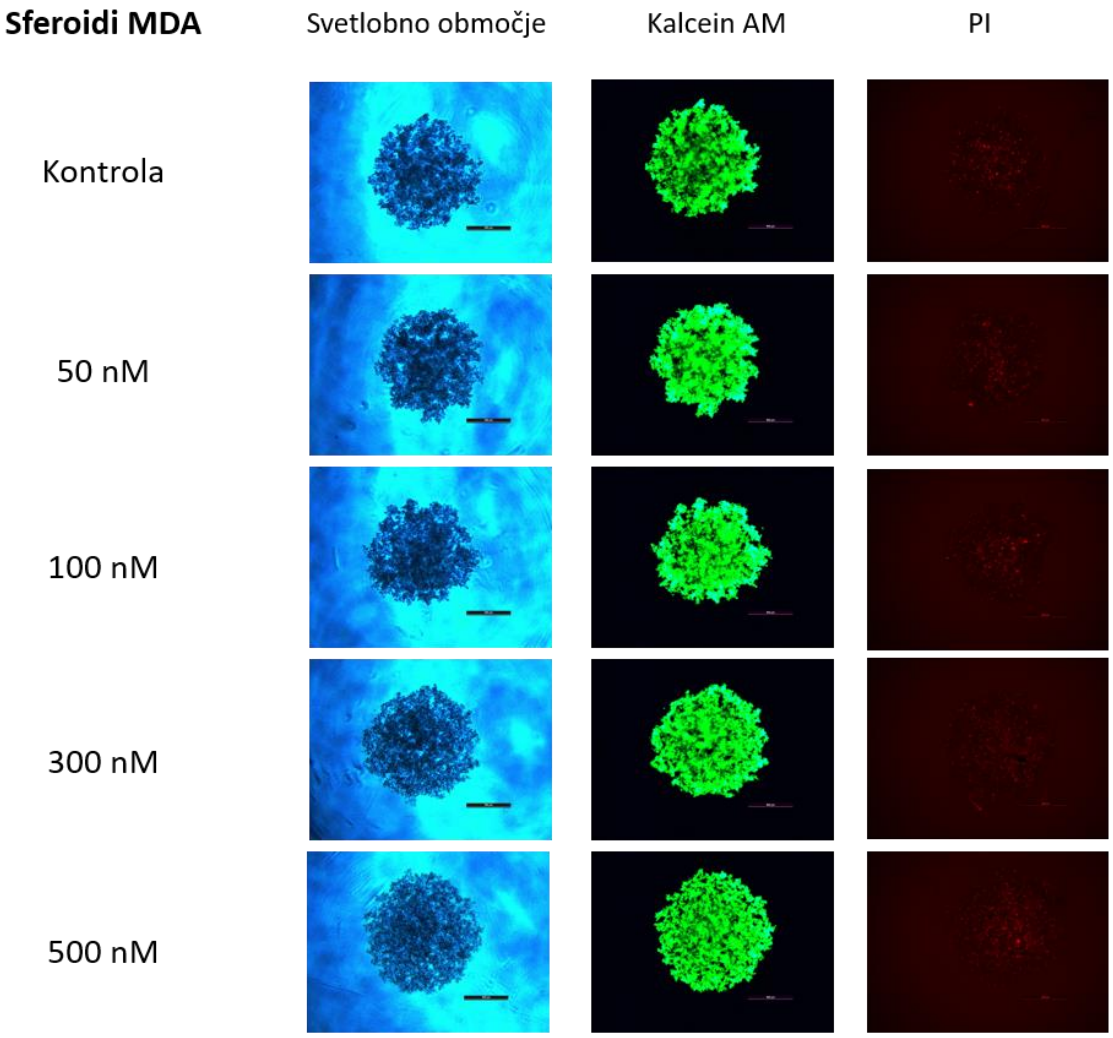
Na podlagi rezultatov spektrofluorimetrije, pretočne citometrije in fluorescenčne mikroskopije lahko govorimo o citotoksičnih učinkih ouabaina *in vitro*, saj se rezultati med seboj ujemajo in dopolnjujejo.

Pri taki analizi celične kulture zajamemo tako pritrjene, kot tudi plavajoče celice. Čeprav je splošno prepričanje, da *in vitro* plavajoče celice predstavljajo mrtve celice, so nekatere raziskave pokazale, da je precejšen delež teh celic v resnici še živih (42).

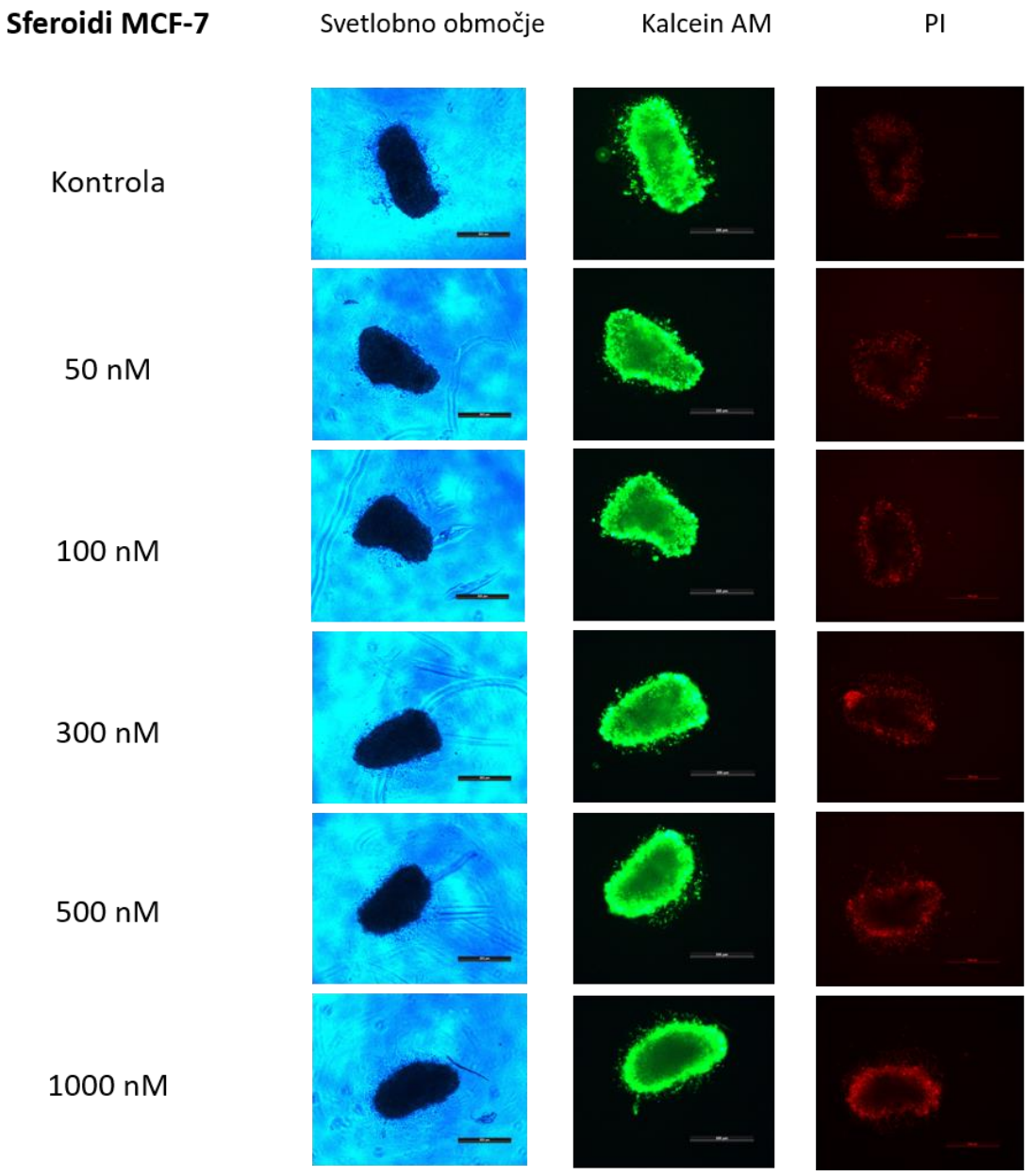
5.5 Ugotavljanje vpliva ouabaina na celice MDA-MB-231 in MCF-7, gojene v napredni 3D kulturi večceličnih sferoidov

Večcelični sferoidi v primerjavi s celično kulturo predstavljajo boljši *in vitro* model tumorja, saj bolje simulirajo celične interakcije in mikrookolje tumorja. Želeli smo preveriti, ali bomo z večanjem koncentracij ouabaina tudi na modelu sferoidov opazili spremembe v proliferaciji (velikosti sferoidov) in številu živih ter mrtvih celic.

Nasadili smo 10.000 celic v 150 µL gojišča na vdolbinico plošče s 96 vdolbinicami. Ploščo smo centrifugirali 2 minuti pri 1000 rcf. Drugi dan smo dodali različne koncentracije ouabaina. Kontrolni vzorec je predstavljal netretiran sferoid. Četrti dan smo sferoidom dodali fluorescenčni barvili kalcein in propidijev jodid in posneli slike s fluorescenčnim mikroskopom Leica (DFC450 C). Sferoide smo izpostavili ouabainu za 48-ur, saj zaradi nevarnosti poškodovanja sferoidov in odsesanja celic nismo menjavali gojišča. Prav tako je potrebno biti zelo pazljiv pri dodajanju ouabaina in barvil, ker lahko hitro povzročimo razbitje sferoida.

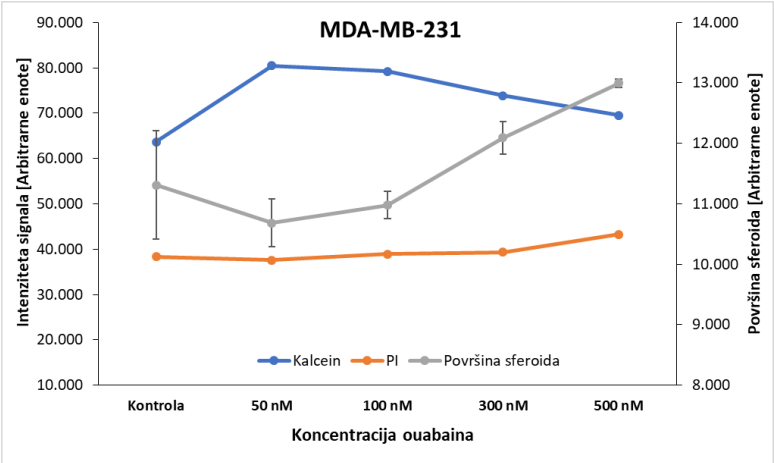


Slika 19: Prikaz sferoidov MDA-MB-231 pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina. Nasadili smo po 10.000 celic v 150 µL gojišča RPMI s 4,5 g/L glukoze na vdolbinico plošče s 96 vdolbinicami. Ploščo smo centrifugirali 2 minuti pri 1000 rcf. Drugi dan smo dodali različne koncentracije ouabaina tako, da so končne koncentracije znašale 50 nM, 100 nM, 300 nM, 500 nM. Kontrolni vzorec je predstavljal netretiran sferoid. Pred meritvijo smo dodali 18 µL kalceina AM (1 µg/µL) in 18 µL propidijevega jodida (1 µg/µL). Slike smo posneli v vidnem območju, pod zelenim (kalcein) in rdečim filtrom (PI). Slike sferoidov smo posneli s fluorescenčnim mikroskopom Leica po 72-urah (48-h tretiranja z ouabainom). Merilna skala, ki je prikazana na sliki, je velika 500 µm.

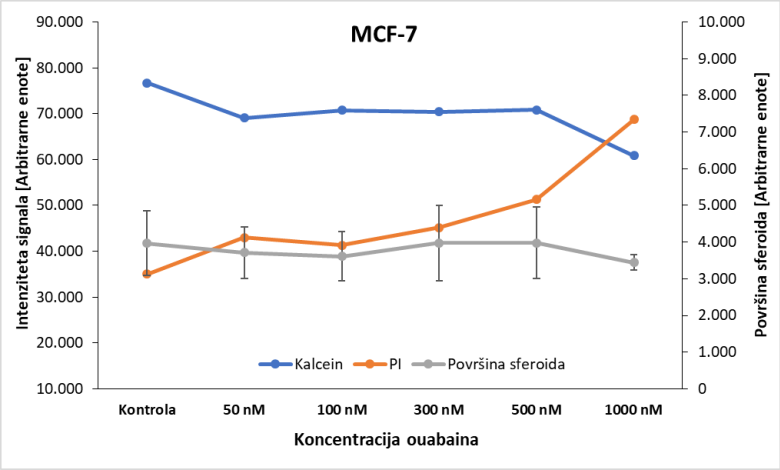


Slika 20: Prikaz sferoidov MCF-7 pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina. Nasadili smo po 10.000 celic v 150 µL gojišča MEM z 1,0 g/L glukoze na vdolbinico plošče s 96 vdolbinicami. Ploščo smo centrifugirali 2 minuti pri 1000 rcf. Drugi dan smo dodali različne koncentracije ouabaina tako, da so končne koncentracije v 150 µL gojišča znašale 50 nM, 100 nM, 300 nM, 500 nM in 1 µM. Kontrolni vzorec je predstavljal netretiran sferoid. Pred meritvijo smo dodali 18 µL kalceina AM (1 µg/µL) in 18 µL propidijevega jodida (1 µg/µL). Slike smo posneli v vidnem območju, pod zelenim (kalcein) in rdečim filtrom (PI). Slike sferoidov smo posneli s fluorescenčnim mikroskopom Leica po 72-urah (48-h tretiranja z ouabainom). Merilna skala, ki je prikazana na sliki, je velika 500 µm.

V programu ImageJ smo iz posnetih slik ovrednotili površino sferoida in intenziteto fluorescenc kalceina in propidijevega jodida. Program poda rezultate meritev v arbitrarnih enotah. Površino sferoida poda na podlagi ročno označenega območja, intenziteto fluorescence pa poda tako, da znotraj označenega območja izračuna vrednost fluorescence v dani točki, na podlagi razlike s temnim ozadjem.



Slika 21: Intenziteti fluorescence kalceina in propidijevega jodida ter površina sferoidov MDA-MB-231 v odvisnosti od koncentracije ouabaina. Posnetke sferoidov na Sliki 19 smo ovrednotili s programom ImageJ. Vsak sferoid smo v programu prostoročno obkrožili in območje analizirali. Program poda vrednosti površine, povprečja signala fluorescence ter minimume in maksimume signala. Površino sferoida smo določili glede na povprečje treh meritev površine pri posamezni koncentraciji ouabaina. Intenziteto signala kalceina in PI smo določili glede na vrednost povprečja signala ene meritve.



Slika 22: Intenziteti fluorescence kalceina in propidijevega jodida ter površina sferoidov MCF-7 v odvisnosti od koncentracije ouabaina. Posnetke sferoidov na Sliki 20 smo ovrednotili s programom ImageJ. Vsak sferoid smo v programu prostoročno obkrožili in območje analizirali. Program poda vrednosti površine, povprečja signala fluorescence ter minimume in maksimume signala. Površino sferoida smo določili glede na povprečje treh meritev površine pri posamezni koncentraciji ouabaina. Intenziteto signala kalceina in PI smo določili glede na vrednost povprečja signala ene meritve.

Iz slik 21 in 22 lahko vidimo, da se površine sferoidov MDA-MB-231 ob povečanju koncentracij ouabaina večajo, kar nakazuje na deagregiranje sferoida, zaradi zmanjšanja števila medceličnih stikov ali povečane umrljivosti celic. Povečanje velikosti pri teh sferoidih v večji meri pripisujemo porušenju medceličnih povezav, ne pa povečanju števila celic. Ob naraščajočih koncentracijah smo opazili trend padanja intenzitete fluorescence kalceina in naraščanja trenda intenzitete propidijevega jodida. Takšne rezultate pripisujemo zmanjšanju števila živih celic in povečanju števila mrtvih celic.

Pri sferoidih MCF-7 učinkov povečanja koncentracij ouabaina na povečanje površine sferoidov nismo zaznali, smo pa opazili spreminjanje intenzitete fluorescence kalceina in propidijevega jodida.

Takoj po pripravi sferoidov in centrifugiranju so bili sferoidi iz obeh celičnih linij podobni med seboj, po 24-urni inkubaciji oz. dokončni formaciji sferoidov pred tretiranjem pa so sferoidi MCF-7 postali manjši in na pogled bolj zbiti. Pri barvanju z barvili smo pri MCF-7 opazili barvanje v obročih, kar smo pripisali njihovi obliki. Menimo, da smo pri obeh dobili 3D-strukture, ki pa jih z optičnim mikroskopom težko vidimo, oz. le z uporabo filtrov lahko vidimo, da so celice naložene ena na drugo. Za boljšo kvantifikacijo bi morali uporabiti kakšno od 3D-tehnik, kot je priprava sferoidov z uporabo sistema rotirajoče celične kulture (RCCS) in 3D-rekonstrukcija sferoidov s programom, kot je ReViSP (50). Nekateri raziskovalci sferoide, kot smo jih dobili pri celicah MDA-MB-321, označujejo kot agregate, saj niso tako zbiti (56).

Posnete slike sferoidov v vidnem območju in pri zelenem filtru predstavljajo isto tehnično ponovitev, sliko z rdečim filtrom pa smo posneli pri drugi tehnični ponovitvi. Ker moramo slike zajeti v primerljivem času po dodatku propidijevega jodida, smo se odločili, da za kvantifikacijo slik uporabimo ponovitve, kjer smo barvali samo s propidijevim jodidom. Pri poskusih smo večkrat opazili, da v vdolbinicah, v katere smo dodali obe barvili (kalcein AM in PI), nismo zmeraj videli signala propidijevega jodida po enakem času oz. v primerljivih časovnih intervalih. Ker se valovni dolžini oz. spektra obeh barvil razlikujeta dovolj, da ne bi smeli medsebojno vplivati ena na drugo, nismo našli razloga za takšne težave oz. smo jih pripisali slabši kvaliteti mikroskopa oz. predvsem kamere. Slik nismo mogli posneti na mikroskopu Zeiss, ki smo ga uporabili v drugih poskusih pri slikanju, saj ne omogoča slikanje v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami U-oblike.

V člankih lahko zasledimo, da pri sami formaciji sferoidov uporabljajo tudi druge postopke priprave sferoidov, kot je na primer večdnevna oz. celo večtedenska priprava sferoidov brez centrifugiranja z več menjavami gojišča. Pri poskusih s sferoidi se raziskovalci srečujejo s težavami, kot so razpad sferoidov, sferoidi so neprimerljivih oblik, kot tudi težave pri kvantifikaciji rezultatov, predvsem zaradi omejitev vpeljanih tehnik pri analizi 3D-struktur.

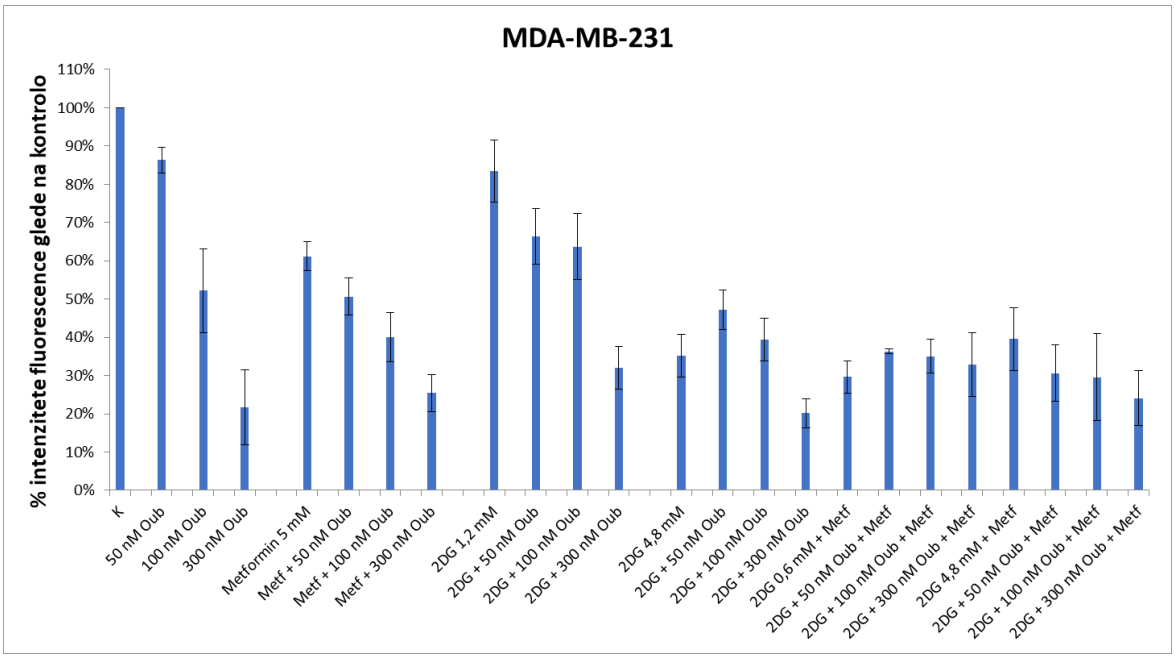
Menimo, da uporaba sferoidov kot *in vitro* modela prinaša veliko prednosti kot tudi izzivov v prihodnje. Menimo, da smo raziskovalci omejeni predvsem na tehnike, ki jih niso razvili

primarno za kvantifikacijo 3D-modelov, zato je potrebno več dela vložiti v samo analizo sferoidov. Ena izmed možnosti je analiza s pretočno citometrijo, pri čemer bi morali vzorec pripraviti tako, da bi sferoid deagregirali in analizirali posamezne celice. S tem bi se verjetno dvignila primerljivost poskusov, kot tudi relevantnost rezultatov.

5.6 Test morebitnega sinergističnega delovanja ouabaina z metforminom in 2-DG

Na koncu nas je zanimalo, ali lahko s sočasnim tretiranjem z ouabainom in metforminom oz. 2-DG dosežemo morebiten sinergistični učinek učinkovin. Najprej smo tretirane celice označili z barvilom Hoechst in izmerili intenziteto fluorescence s spektrofluorimetrom, nato smo vzorce potencialnih kombinacij učinkovin analizirali še s pretočnim citometrom in fluorescenčno mikroskopijo.

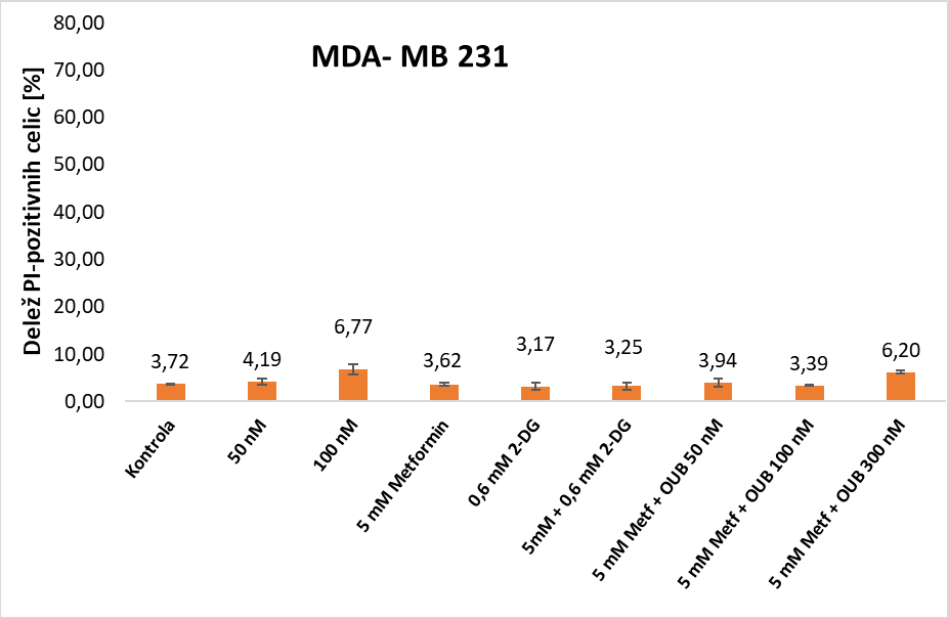
Celice MDA-MB-231 smo za 72 ur izpostavili ouabainu, metforminu in 2-DG v gojišču RPMI s 4,5 g/L glukoze. Vzorce smo pripravili z metodo brez liziranja, dodali barvilo Hoechst in izmerili intenziteto fluorescence s spektrofluorimetrom. Izvedli smo 3 biološke ponovitve z dvema tehničnima paralelama. Pri obdelavi meritev smo od vsake meritve odšteli tudi vrednost slepega vzorca; rezultati so prikazani na Sliki 23.



Slika 23: Relativno število celic v odvisnosti od dodanih koncentracij ouabaina, metformina, 2-DG in kombinacij pri vzorcih celične linije MDA-MB-231. Na y-osi je podana relativna vrednost fluorescence barvila Hoechst. Intenziteto fluorescence smo normalizirali glede na kontrolni vzorec, ki so ga predstavljale netretirane celice. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah, 5 mM metforminu, 0,6 mM ter 4,8 mM 2-DG in gojišču RPMI s 4,5 g/L glukoze. Vzorce smo pripravili z metodo brez liziranja. Izvedli smo 3 biološke ponovitve z dvema tehničnima paralelama. Pri obdelavi meritev smo od vsake meritve odšteli tudi vrednost slepega vzorca. S parnim t-testom smo primerjali rezultate vzorcev, kjer smo dodali samo ouabain

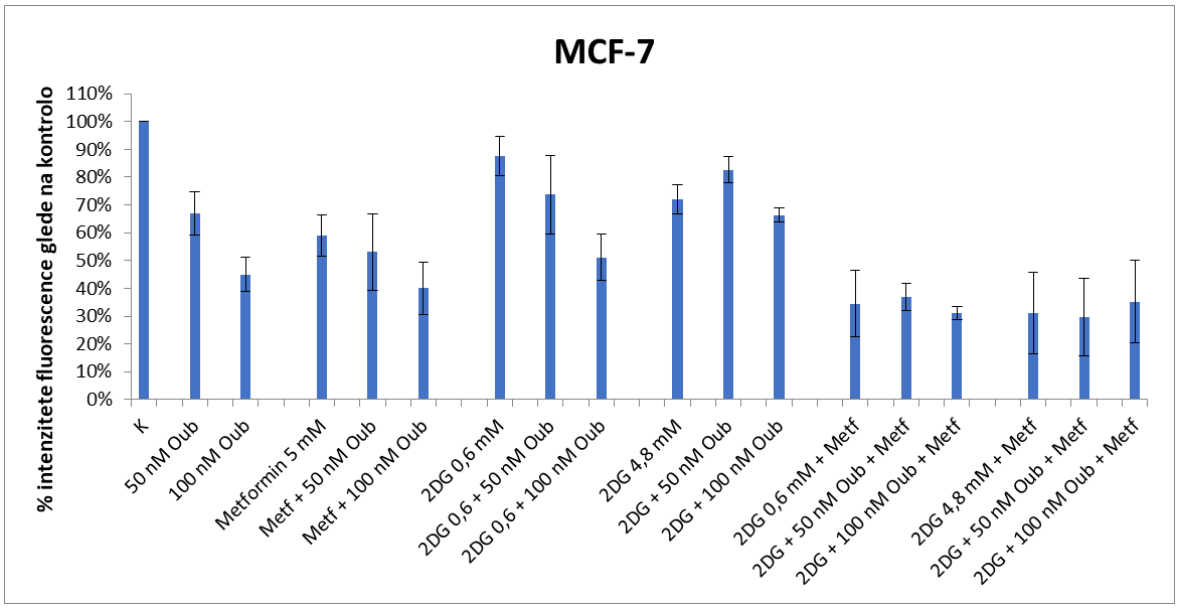
z rezultati vzorcev, kjer smo dodali kombinacijo ouabaina in metformina ali 2-DG. S statistično analizo nismo pokazali statistično značilne razlike.

Nato smo celice po poskusih z različnimi kombinacijami učinkovin analizirali še s pretočnim citometrom. Celice MDA-MB-231 smo za 72 ur izpostavili ouabainu v koncentracijah 50 nM in 100 nM, 5 mM metforminu, 0,6 mM 2-DG ter kombinacijam v gojišču RPMI s 4,5 g/L glukoze. Po 72 urah smo celice iz plošč prenesli v epruvete, dodali propidijev jodid in izmerili delež PI-pozitivnih celic. Kontrolni vzorec so predstavljale netretirane celice; rezultati so prikazani na sliki 24.



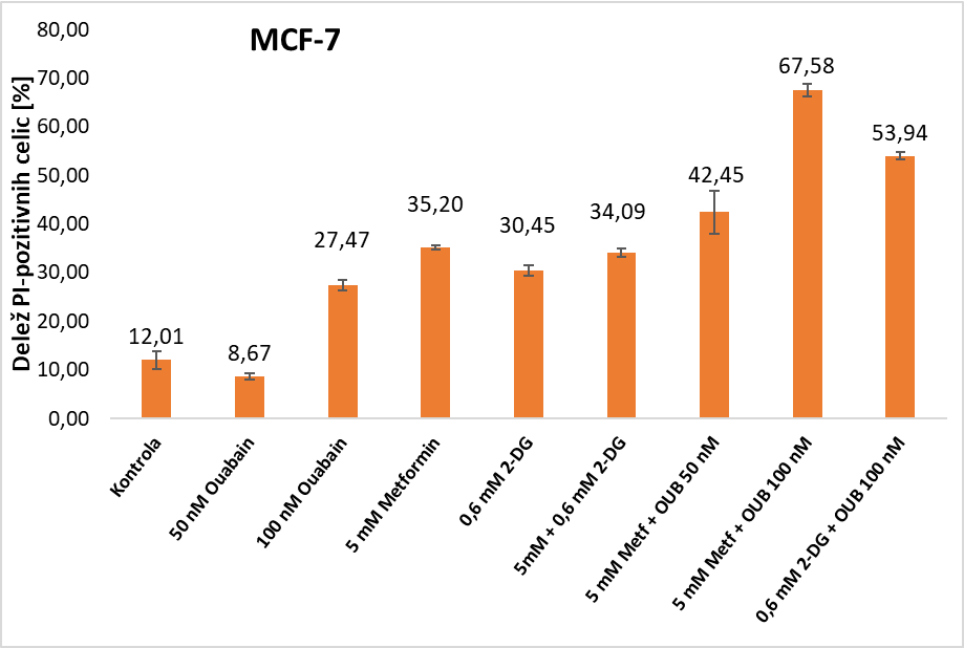
Slika 24: Delež PI-pozitivnih celic MDA-MB-231 pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina, metformina in 2-DG, ter kombinacij. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah, 5 mM metforminu, 0,6 mM 2-DG ter kombinacijam v gojišču RPMI s 4,5 g/L glukoze. Po 72 urah smo celice iz plošč prenesli v epruvete, dodali propidijev jodid in izmerili delež PI-pozitivnih celic s pretočnim citometrom. Kontrolni vzorec so predstavljale netretirane celice. Izvedli smo en poskus z dvema tehničnima paralelama. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost ± SD (n=2).

Podobno analizo smo izvedli na celicah MCF-7. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu, metforminu in 2-DG v gojišču MEM z 1,0 g/L glukoze ter določili število celic s spektrofluorimetrijo in barvilom Hoechst ter pripravo vzorcev z metodo brez liziranja; rezultati so prikazani na sliki 25.



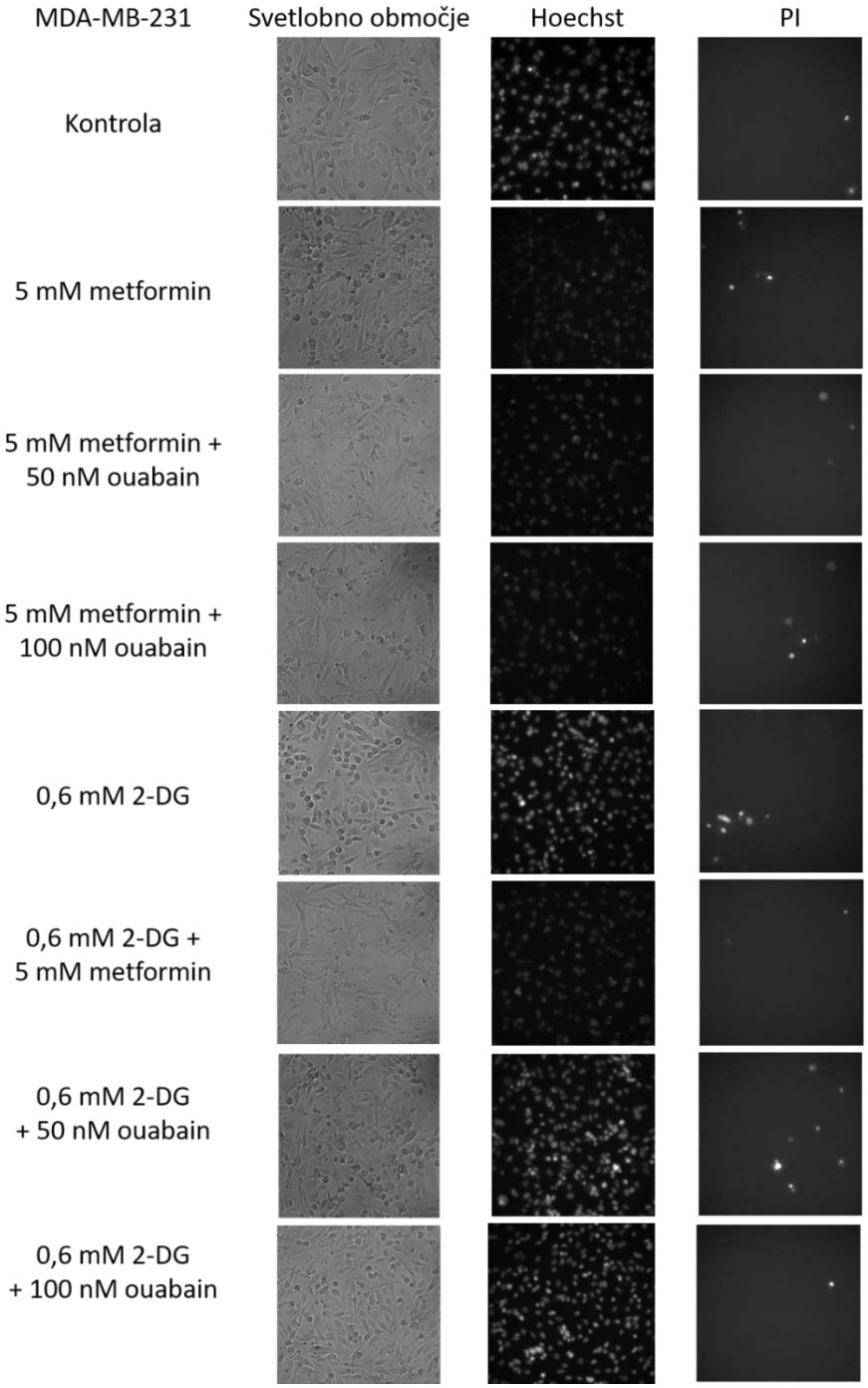
Slika 25: Relativno število celic v odvisnosti od dodanih koncentracij ouabaina, metformina, 2-DG in kombinacij pri vzorcih celične linije MCF-7. Na y-osi je podana relativna vrednost fluorescence barvila Hoechst. Intenziteto fluorescence smo normalizirali glede na kontrolni vzorec, ki so ga predstavljale netretirane celice. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah, 5 mM metforminu, 0,6 mM ter 4,8 mM 2-DG in gojišču MEM. Vzorce smo pripravili z metodo brez liziranja. Izvedli smo 3 biološke ponovitve z dvema tehničnima paralelama. Pri obdelavi meritev smo od vsake meritve odšteli vrednost slepega vzorca. S parnim t-testom smo primerjali rezultate vzorcev, kjer smo dodali samo ouabain z rezultati vzorcev, kjer smo dodali kombinacijo ouabaina in metformina ali 2-DG. S statistično analizo nismo pokazali statistično značilne razlike.

Nato smo poskuse s različnimi kombinacijami učinkovin izvedli še s pretočno citometrijo (slika 25). Celice MCF-7 smo za 72 ur izpostavili ouabainu v koncentracijah 50 nM in 100 nM, 5 mM metforminu, 0,6 mM 2-DG ter kombinacijam v gojišču MEM z 1,0 g/L glukoze; rezultati so prikazani na sliki 26.

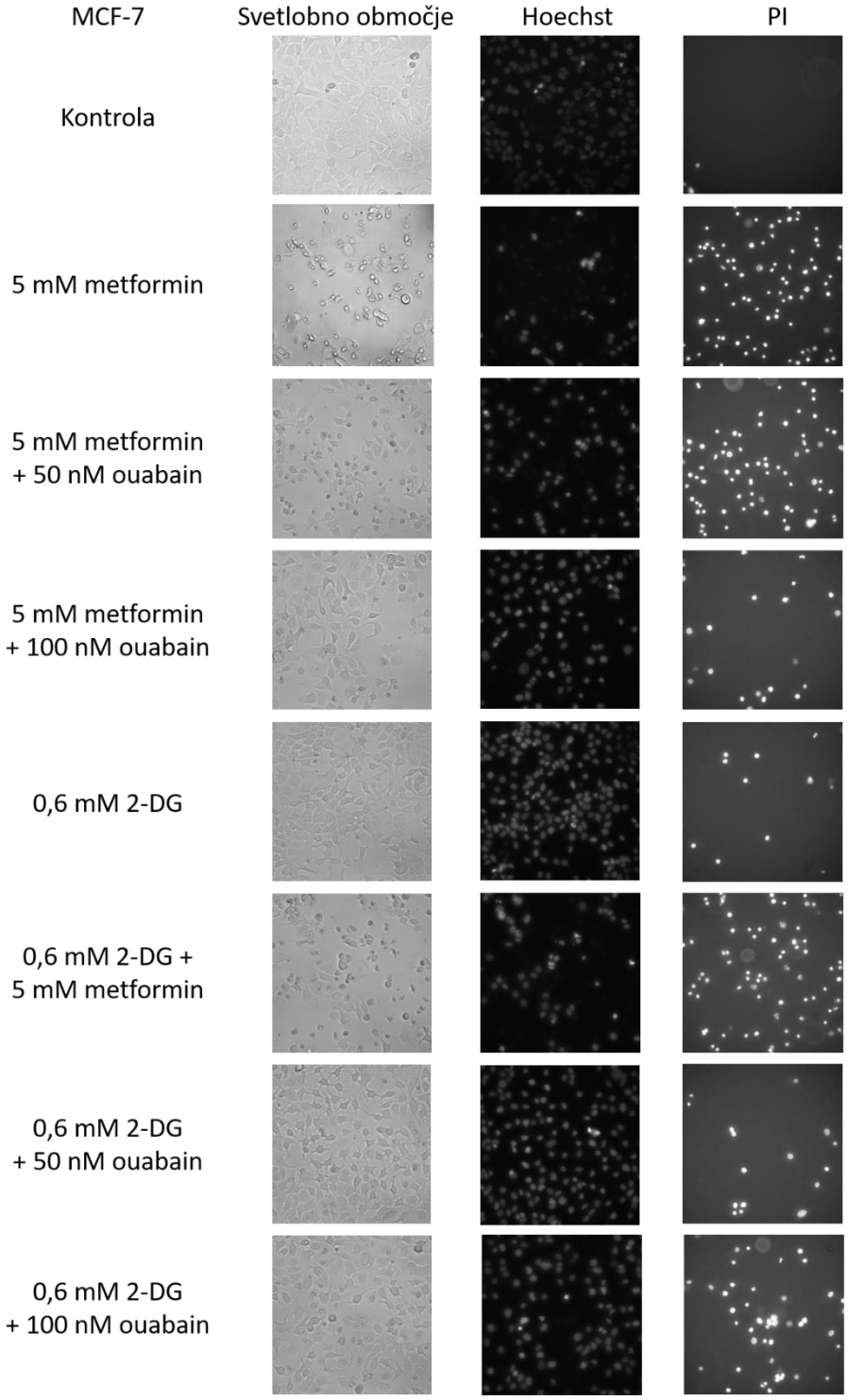


Slika 26: Delež PI-pozitivnih celic MCF-7 pri dodanih različnih koncentracijah ouabaina, metformina in 2-DG, ter kombinacij. Celice smo za 72 ur izpostavili ouabainu v različnih koncentracijah, 5 mM metforminu, 0,6 mM 2-DG ter kombinacijam v gojišču MEM. Po 72 urah smo celice iz plošč prenesli v epruvete dodali propidijev jodid in izmerili delež PI-pozitivnih celic na pretočnem citometru. Kontrolni vzorec so predstavljale netretirane celice. Izvedli smo en poskus z dvema tehničnima paralelama. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost ± SD (n=2).

Nato smo celice obeh celičnih linij analizirali še z mikroskopijo (Sliki 27 in 28).



Slika 27: Prikaz celic MDA-MB-231, posnetih s fluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, pri dodatku 5 mM metformina, 0,6 mM 2-DG ter kombinaciji 2-DG in ouabaina (50 nM in 100 nM). Po 60.000 celic v 500 µL gojišča RPMI s 4,5 g/L glukoze smo nasadili v vdolbinice plošče s 24 vdolbinicami. Naslednji dan smo gojišče zamenjali s svežim ter dodali različne koncentracije 2-DG, metformina ter ouabaina, tako da so končne koncentracije bile 0,6 mM 2-DG, 5 mM metformin ter 50 nM in 100 nM ouabain. Kontrolni vzorec so predstavljale netretirane celice. Po 72-urah tretiranja v inkubatorju smo celicam dodali 1 µL barvila Hoechst v koncentraciji 2 µg/µL. Približno 5 min pred meritvijo smo dodali 50 µL PI (1 µg/µL). Slike smo posneli v vidnem območju, z modrim (Hoechst) in z rdečim filtrom (PI).



Slika 28: Prikaz celic MCF-7, posnetih s fluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axiovert 200, pri dodatku 5 mM metformina, 0,6 mM 2-DG ter kombinaciji 2-DG in ouabaina (50 nM in 100 nM). Po 60.000 celic v 500 µL gojišča MEM smo nasadili v vdolbinice plošče s 24 vdolbinicami. Naslednji dan smo gojišče zamenjali s svežim ter dodali različne koncentracije 2-DG, metformina ter ouabaina, tako da so končne koncentracije bile 0,6 mM 2-DG, 5mM metformin ter 50 nM in 100 nM ouabain. Kontrolni vzorec so predstavljale netretirane celice. Po 72-urah tretiranja v inkubatorju smo celicam dodali 1 µL barvila Hoechst v koncentraciji 2 µg/µL. Približno 5 min pred meritvijo smo dodali 50 µL PI (1 µg/µL). Slike smo posneli v vidnem območju, z modrim (Hoechst) in z rdečim filtrom (PI).

Pri rezultatih slik 23 in 25, smo naredili parni t-test, s katerim smo želeli pokazati morebitni sinergistični učinek. Primerjali smo rezultate vzorcev, kjer smo dodali samo ouabain, z rezultati vzorcev, kjer smo dodali kombinacijo ouabaina in metformina ali 2-DG. Ker s parnimi t-testi nismo pokazali statistično značilne razlike, sklepamo, da o sinergističnih učinkih ouabaina z metforminom in 2-DG pri naših poskusih ne moremo govoriti. Sinergističnega učinka ouabaina z metforminom in 2-deoksi glukozo nismo dokazali, smo pa pokazali, da je vpliv modulatorjev presnove glukoze večji na celicah MCF-7 kot MDA-MB-231.

Marinello in sodelavci (57) navajajo, da je pri celični liniji MCF-7 prišlo do zmanjšanja metabolne aktivnosti, povečanega oksidativnega stresa in poškodb DNA že pri nizkih koncentracijah metformina (6 μM in 30 μM), vpliv metformina na proliferacijo in smrt celic MCF-7 pa so opazili le pri višjih koncentracijah (1 mM in 5 mM). Pri celični liniji MDA-MB-231 so omenjene učinke metformina opazili v splošnem le pri višjih koncentracijah. Ugotovili so tudi, da je metformin zmanjšal aktivnost kinaz ERK1 in 2 ter proteinske kinaze B in povečal izražanje transformirajočega rastnega dejavnika beta in transkripcijskega dejavnika p53. Za p53 je znano, da zavira tumorogenezo ter signalno pot mTOR in regulira transkripcijo številnih genov, ki nadzorujejo celično rast, apoptozo in translacijo proteinov. Metformin deluje tudi tako, da poveča proizvodnjo ROS, kar vodi v poškodovanje DNA ter apoptozo. Znano je, da imajo celice MDA-MB-231 mutiran gen za p53, celice MCF-7 pa divji tip, kar ima lahko za posledico povečano občutljivost celic MCF-7 na metformin v primerjavi z MDA-MB-231. Takšne zaključke najdemo lahko tudi v več člankih. Metformin uporabljamo kot adjuvantno terapijo pri zdravljenju trojno negativnega raka dojke.

2-deoksi glukoza je zaviralec heksokinaze, s čimer zavira prvo reakcijo glikolize in popolnoma prepreči privzem glukoze. Zaviranje glikolize zmanjša nastajanje več glikolitičnih intermediatov, kot so glukoza-6-fosfat, gliceraldehid-3-fosfat in 3-fosfoglicerat, ki so prekurzorji nukleinskih kislin, fosfolipidov in serina. Pokazali so, da je prav povečana sinteza serina in povečano izražanje 3-fosfoglicerat-dehidrogenaze ključno pri razvoju določenih rakov dojke. S tem ko 2-DG zavre glikolizo, povzroči pomanjkanje NADPH, saj namesto dveh molekul NADPH preko pentoza fosfatne poti nastane le ena. S tem se zmanjša antioksidativna kapaciteta rakavih celic in poveča občutljivost na oksidativni stres, ki ga povzročimo s kemoterapijo in radioterapijo. Sodeč po nekaterih študijah, lahko toksične lastnosti 2-DG pripišemo tudi zaviranju glikozilacije proteinov in porušenju energetskega

stanja zaradi izčrpavanja ATP. Zaradi zavrte glikolize nastane manj piruvata, s čimer vpliva na oksidativno fosforilacijo (47).

Bizjak in sodelavci (42) so pokazali, da s kombinacijo metformina in 2-DG zavremo proliferacijo celic MDA-MB-231 in MCF-7, poveča se tudi delež plavajočih celic, ki so v večini žive. S tem so pokazali, da je prepričanje, da je večina plavajočih celic *in vitro* mrtvih, napačno. Celice, tretirane z metforminom, morajo povečati raven glikolize, kar pa ni mogoče, če glukoze v gojišču ni več prisotne. Tako je na rezultate lahko vplivalo tudi, da nismo zamenjali gojišč in vzdrževali ravni glukoze. To bi lahko prispevalo k dodatnemu zmanjšanju proliferacije, celični smrti in spremembam v obliki celic.

Z vizualizacijo s fluorescenčno mikroskopijo smo želeli pokazati vpliv metformina, 2-DG, ter kombinacij z ouabainom, na celice MDA-MB-231 (Slika 27) ter MCF-7 (Slika 28) v celični kulturi. Na slikah 27 in 28 lahko vidimo, da so učinki modulatorjev presnove glukoze metformina in 2-deoksi glukoze na celice večji pri celični liniji MCF-7. Na slikah v svetlobnem območju je ob enakih tretmajih pri MCF-7 vidna manjša gostota celic, opazni so večji učinki na proliferacijo z barvanjem z Hoechstom ter večje število PI-pozitivnih celic.

Če povzamemo, intrinzične lastnosti celične linije zelo vplivajo na njihovo odzivnost na modulatorje celične presnove in učinkovine, ki delujejo na ionske kanale. Posledično je potrebno vsako potencialno zanimivo sinergistično delovanje učinkovin preveriti na izbrani celični liniji v pogojih *in vitro* ter za končen prenos v klinično uporabo tudi v pogojih *in vivo*. Pri tem tumorski sferoidi predstavljajo zanimiv vmesen model, ki pa predstavlja tudi svoje izzive pri delu in interpretaciji rezultatov.

6 Sklepi

1. Učinki ouabaina na proliferacijo in preživetje celic so vidni že pri relativno nizkih koncentracijah. Pri celični liniji MCF-7 so učinki ouabaina vidni že pri nekoliko nižji koncentraciji kot pri MDA-MB-231. Določili smo koncentraciji EC_{50} pri 70 nM za MCF-7 in pri 100 nM za MDA-MB-231.

2. S pripravo vzorcev za merjenje števila celic z liziranjem, dobimo višje vrednosti intenzitete fluorescence barvila Hoechst kot s pripravo vzorcev z direktno metodo brez liziranja. O večji točnosti katere od metod ne moremo govoriti, je pa metoda z liziranjem daljša, ima več vmesnih korakov, zaradi česar lahko pride do večje možnosti napake. Pomemben je tudi način meritve na spektrofluorimetru.

3. Pri pripravi večceličnih tumorskih sferoidov s centrifugiranjem 2 minuti pri 1000 rcf so sferoidi MCF 7 manjši in bolj zbiti od sferoidov MDA-MB-231. Njihova oblika vpliva na barvanje z barvili, kot sta kalcein in propidijev jodid. Pri sferoidih MCF-7 je z mikroskopom vidno barvanje v obročih, medtem ko sta barvili pri sferoidih MDA-MB-231 prodrli v notranjost. Pri obeh celičnih linijah se je na modelu večceličnih sferoidov z večanjem koncentracij ouabaina pokazal učinek na povečanje umrljivosti ter zmanjšanje živosti celic.

4. Pri sferoidih MDA-MB-231 se je pri vseh poskusih z večanjem koncentracije ouabaina večala tudi površina sferoida, kar kaže na porušenje medceličnih povezav. Pri MCF-7 ta učinek ni bil viden, predvidevamo, da zaradi same oblike sferoidov.

5. Sinergističnega učinka ouabaina z metforminom in 2-deoksi glukozo na proliferacijo in preživetje rakavih celic v naših poskusih nismo dokazali, smo pa pokazali večjo občutljivost celic MCF-7 na metformin in 2-deoksi glukozo v primerjavi s celicami MDA-MB-231.

7 Literatura in viri

1. Rak. Dostopno na: http://www.nijz.si/sl/rak. Dostopano: 16. 8. 2018
2. Onkološki inštitut Ljubljana - Sporadične oblike raka. Dostopno na: https://www.onko-i.si/dejavnosti/zdravstvena_dejavnost/diagnosticna_dejavnost/oddelek_za_molekularno_diagnostiko/sporadicne_oblike_raka. Dostopano: 16.8.2018.
3. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H: Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. Asian Pac. J. Cancer Prev. 2016; 17: 43–6.
4. Zbornik prispevkov, 2. študentski kongres o reproduktivnem zdravju: rak dojk 2017. Dostopno na: https://issuu.com/dsms/docs/pvr_rak_dojk. Dostopano: 3. 5. 2018.
5. Rak v Sloveniji. Register raka 2014. Dostopno na: https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2014.pdf. Dostopano: 3. 5. 2018.
6. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100, 57–70.
7. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 2011; 144, 646–674.
8. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y: Ion channels and the hallmarks of cancer. Trends Mol. Med. 2010; 16, 107–121.
9. Leanza L, Managò A, Zoratti M, Gulbins E, Szabo I: Pharmacological targeting of ion channels for cancer therapy: In vivo evidences. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res 2016; 1863: 1385–1397.
10. Arcangeli A, Becchetti A: Novel perspectives in cancer therapy: Targeting ion channels. Drug Resist. 2015; Updat. 21–22, 11–19.
11. Kale VP, Amin SG, Pandey MK: Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr 2015; 1848: 2747–2755.

12. Lastraioli E, Iorio J, Arcangeli A: Ion channel expression as promising cancer biomarker. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2015; 1848: 2685–2702.
13. Comes N, et al.: Involvement of potassium channels in the progression of cancer to a more malignant phenotype. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2015; 1848: 2477–2492.
14. Stock C, Schwab A: Ion channels and transporters in metastasis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 2015; 1848: 2638–2646.
15. Garcia DG, et al.: Na/K-ATPase as a target for anticancer drugs: studies with perillyl alcohol. Mol. Cancer 2015; 14.
16. Chen JQ, et al.: Sodium/potasium ATPase (Na+, K+-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: a new paradigm for development of anti-breast cancer drugs? Breast Cancer Res. Treat. 2006; 96: 1–15.
17. Dimas K, et al.: Steroidal cardiac Na+/K+ ATPase inhibitors exhibit strong anti-cancer potential in vitro and in prostate and lung cancer xenografts in vivo. Anti-Cancer Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents 2014; 14: 762–770.
18. Durlacher CT, et al.: Targeting Na^+/K^+-translocating adenosine triphosphatase in cancer treatment. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2015; 42: 427–443.
19. Felippe Gonçalves-de-Albuquerque C, Ribeiro Silva A, Ignácio da Silva C, Caire Castro-Faria-Neto H, Burth P: Na/K Pump and Beyond: Na/K-ATPase as a Modulator of Apoptosis and Autophagy. Molecules 2017; 22: 578.
20. Mijatovic T, Dufrasne F, Kiss R: Na^+/K^+-ATPase and cancer. Pharm. Pat. Anal. 2012; 1: 91–106.
21. Wang HYL, O'Doherty GA: Modulators of Na/K-ATPase: a patent review. Expert Opin. Ther. Pat. 2012; 22: 587–605.

22. Samarasinghe B Samarasinghe B: The Hallmarks of Cancer 9: Reprogramming Energy Metabolism. Sci. Am. Blog Netw. https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/the-hallmarks-of-cancer-9-reprogramming-energy-metabolism/ Dostopano: 3. 5. 2018.
23. Bensinger SJ, Christofk HR: New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. Semin. Cell Dev. Biol. 2012; 23: 352–361.
24. Ward PS, Thompson CB: Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. Cancer Cell 2012: 21, 297–308.
25. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB: The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. Cell Metab. 2008; 7: 11–20.
26. Seyfried TN, Shelton LM: Cancer as a metabolic disease. Nutrition & Metabolism 2010; 7:7.
27. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB: Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Science 2009; 324: 1029–1033.
28. Liberti MV, Locasale JW: The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends Biochem. Sci. 2016; 41: 211–218.
29. Yizhak K, et al.:A computational study of the Warburg effect identifies metabolic targets inhibiting cancer migration. Mol. Syst. Biol. 2014; 10: 744–744.
30. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K: Metformin Decreases the Dose of Chemotherapy for Prolonging Tumor Remission in Mouse Xenografts Involving Multiple Cancer Cell Types. Cancer Res. 2011; 71: 3196–3201.
31. Golpour M, et al.: Human Fibroblast Switches to Anaerobic Metabolic Pathway in Response to Serum Starvation: A Mimic of Warburg Effect. Int. J. Mol. Cell. Med. 2014; 3: 74–80.

32. Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP: Cancer Metabolism: New Validated Targets for Drug Discovery. Oncotarget 2013; 4.
33. Verbaanderd C, Meheus L, Huys I, Pantziarka P: Repurposing Drugs in Oncology: Next Steps. Trends Cancer 2017; 3: 543–546.
34. Sleire L, et al.: Drug repurposing in cancer. Pharmacol. Res. 2017; 124: 74–91.
35. Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A, Miltyk W: Apoptosis-mediated cytotoxicity of ouabain, digoxin and proscillaridin A in the estrogen independent MDA-MB-231 breast cancer cells. Arch. Pharm. Res. 2007; 30: 1216–1224.
36. Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A, Surażyński A: Antiproliferative activity of derivatives of ouabain, digoxin and proscillaridin A in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. Biol. Pharm. Bull.2008; 31: 1131–1140.
37. Alevizopoulos K, Calogeropoulou T, Lang F, Stournaras C: Na+/K+ ATPase inhibitors in cancer. Curr. Drug Targets 2014; 15: 988–1000.
38. Kepp O, et al.: Anticancer activity of cardiac glycosides: At the frontier between cell-autonomous and immunological effects. OncoImmunology 2012; 1: 1640–1642.
39. Slingerland M, Cerella C, Guchelaar HJ, Diederich M, Gelderblom H: Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. Invest. New Drugs 2013; 31: 1087–1094.
40. Kaushik V, Azad N, Yakisich JS, Iyer AKV: Antitumor effects of naturally occurring cardiac glycosides convallatoxin and peruvoside on human ER+ and triple-negative breast cancers. Cell Death Discov. 2017; 3: 17009.
41. Jiralerspong S, et al.:Metformin and Pathologic Complete Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Diabetic Patients With Breast Cancer. J. Clin. Oncol. 2009; 27: 3297–3302.

42. Bizjak M, et al.: Combined treatment with Metformin and 2-deoxy glucose induces detachment of viable MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. Sci. Rep. 2017; 7.
43. Rajh M, Dolinar K, Miš K, Pavlin M, Pirkmajer S: Medium Renewal Blocks Anti-Proliferative Effects of Metformin in Cultured MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. PLOS ONE 2016; 11.
44. Janjetovic K. et al.: Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of Akt. Eur. J. Pharmacol 2011; 651: 41–50.
45. Rocha GZ, et al: Metformin Amplifies Chemotherapy-Induced AMPK Activation and Antitumoral Growth. Clin. Cancer Res. 2011; 17: 3993–4005.
46. Rattan R, Graham RP, Maguire JL, Giri S, Shridhar V: Metformin Suppresses Ovarian Cancer Growth and Metastasis with Enhancement of Cisplatin Cytotoxicity In Vivo. Neoplasia 2011; 13: 483.
47. Bost F, Decoux-Poullot AG, Tanti JF, Clavel S: Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? Oncogenesis 2016; 5: e188.
48. Ben Sahra I, et al.: Targeting Cancer Cell Metabolism: The Combination of Metformin and 2-Deoxyglucose Induces p53-Dependent Apoptosis in Prostate Cancer Cells. Cancer Res. 2010; 70: 2465–2475.
49. Ralser M, et al.: A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. Proc. Natl. Acad. Sci. 2008; 105: 17807–17811.
50. Zanoni M, et al.: 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. Sci. Rep. 2016; 6.
51. User's guide to cell carrier spheroid ULA microplates. PerkinElmer. Dostopno na: http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/GDE_3D_Culture_User_Guide.pdf. Dostopano: 28. 5. 2018.

52. Carver K, Ming X, Juliano RL: Multicellular Tumor Spheroids as a Model for Assessing Delivery of Oligonucleotides in Three Dimensions. Mol. Ther. - Nucleic Acids 2014; 3: e153.

53. MDA-MB-231 Cell line profile. Dostopno na: https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf. Dostopano: 29. 5. 2018.

54. Fluorescence SpectraViewer - SI. Dostopno na: https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html. Dostopano: 11. 6. 2018.

55. Hemocytometer: squares to count. Dostopno na: https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-protocol/hemocytometer-squares-to-count/. Dostopano: 27. 5. 2018.

56. Froehlich K. et al.: Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 2016; **21:** 89–98.

57. Marinello PC. et al.: Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor β1 induction. Tumor Biol. 2016; 37: 5337–46.