

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Vaidotas Čėsna

***HIPERTERMINĖS CHEMOTERAPIJOS
POVEIKIO INTRAPERITONIŠKAI
PLINTANČIŲ VIRŠKINIMO SISTEMOS
NAVIKŲ LĄSTELĖMS TYRIMAI***

Daktaro disertacija

Medicinos ir sveikatos mokslai,

medicina (M 001)

Kaunas, 2019

Disertacija rengta 2015–2019 metais Lietuvos sveikatos mokslų universitete Medicinos akademijos Chirurgijos klinikoje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Antanas Gulbinas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

prof. dr. Arturas Inčiūra (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

prof. dr. Džilda Veličkienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Rasa Ugenskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011);

prof. dr. Mindaugas Andrulis (Ulmo universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija bus ginama viešame medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2019 m. gruodžio 6 d. 15 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Didžiojoje auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Eivenių g. 2, LT-50161 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Vaidotas Čėsna

***ANALYSIS OF HYPERTHERMIC
CHEMOTHERAPY IMPACT ON
INTRAPERITONEALLY DISSEMINATING
GASTROINTESTINAL TUMOR CELLS***

Doctoral Dissertation

Medical and Health Sciences,

Medicine (M 001)

Kaunas, 2019

Dissertation has been prepared at the Department of Surgery of Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2015–2019.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Antanas Gulbinas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Arturas Inčiūra (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Prof. Dr. Džilda Veličkienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Rasa Ugenskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biophysics – N 011);

Prof. Dr. Mindaugas Andrulis (Ulm University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council of Lithuanian University of Health Sciences on December 6th, 2019 at 3 p. m., in the Great Auditorium at the Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos.

Address: Eivenių 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
IVADAS	8
Darbo tikslas	9
Uždaviniai	9
Mokslinio darbo naujumas	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1 Skrandžio vėžys	12
1.2 Kasos vėžys	12
1.3 Storosios žarnos vėžys	13
1.4 Cisplatina	14
1.5 Hipertermijos poveikis ląstelei	17
1.6 Hiperterminė intraperitoninė chemoterapija (HIPEC)	19
1.7 Ląstelės apoptozė	22
1.8 Hemo oksigenazė 1 (HO-1)	24
1.9 Alavo protoporfirinas	26
1.10 Mitochondrijų energetiniai mechanizmai	27
2. TYRIMŲ METODAI	30
2.1 Intraperitoniškai plintančio vėžio ląstelių linijos	30
2.2 Eksperimentas ir jo rezultatų vertinimas	30
2.3 MTT	31
2.4 Izobologramos	31
2.5 Tėkmės citometrija	32
2.6 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)	32
2.7 Western blot	33
2.8 Viduląstelinė cisplatinos koncentracija	34
2.9 HO-1 raiškos slopinimas siRNR	34
2.10 HO-1 funkcijos slopinimas alavo protoporfirinu (SnPP)	34
2.11 Mitochondrijų kvėpavimo greičio nustatymas	34
2.12 Statistinė analizė	35
3. REZULTATAI	36
3.1 Temperatūros ir cisplatinos poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui	36
3.1.1 Temperatūros poveikis tiriamosioms ląstelėms	36

3.1.2 Cisplatinos poveikis vėžinėms ląstelėms	37
3.1.3 Kombinuotas temperatūros ir cisplatinos poveikis	38
3.1.4 Kombinuoto temperatūros ir cisplatinos poveikio matematinė analizė: sinergija ar antagonizmas?	39
3.2 Viduląstelinės cisplatinos koncentracijos pokyčiai	40
3.3 Cisplatinos ir temperatūros įtaka vėžinių ląstelių apoptozei ir viduląsteliniam kvėpavimui	41
3.3.1 Kombinuoto cisplatinos ir temperatūros poveikio įtaka apoptozei	41
3.3.2 Cisplatinos poveikis ląstelių kvėpavimo greičiui	43
3.3.3 Temperatūros įtaka ląstelių kvėpavimo greičiui	44
3.3.4 Kombinuoto temperatūros ir cisplatinos poveikio įtaka ląstelių kvėpavimo greičiui	45
3.4 HO-1 moduliacijos įtaka ląstelėms	46
3.4.1 HO-1 raiška	46
3.4.2 Slopinant <i>HO-1</i> mažėja AGS metabolinis aktyvumas	48
3.4.3 <i>HO-1</i> slopinimas skatina apoptozę, tačiau neveikia viduląstelinio kvėpavimo	49
3.4.4 Alavo protoporfirino (SnPP) poveikis AGS ląstelėms	50
4. REZULTATŲ APTARIMAS	52
4.1 Bendras intraperitoniškai plintančių navikų ląstelių atsakas į hiperterminę chemoterapiją	52
4.2 Energetiniai pokyčiai veikiant hiperterminę chemoterapiją	55
4.3 HO-1 ekspresijos ir funkcijos moduliacija kartu su hipertermija ir cisplatina	56
IŠVADOS	59
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	60
SUMMARY	61
LITERATŪROS SĄRAŠAS	70
STRAIPSNIAI, KURIUOSE PASKELBTI DISERTACINIO DARBO REZULTATAI	86
MOKSLINĖS KONFERENCIJOS, KURIOSE PRISTATYTI DARBO REZULTATAI	87
CURRICULUM VITAE	110
PADĖKA	111

SANTRUMPOS

HIPEC – hiperterminė intraperitoninė chemoperfūzija / hiperterminė intraperitoninė chemoterapija;
HO-1 – hemo oksigenazė 1;
SnPP – alavo protoporfirinas;
DNR – deoksiribonukleorūgštis;
RNR – ribonukleorūgštis;
siRNR – tildančioji RNR;
mM – milimoliai;
μmol – mikromoliai;
ATP – adenosino trifosfatas;
ADP – adenosino difosfatas;
ROS – aktyvūs deguonies junginiai;
NADPH - nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas;
NADH - nikotinamido adenino dinukleotidas;
FADH – flavino adenino dinukleotidas;
kDa – kilodaltonas;
AGS – skrandžio adenokarcinomos ląstelės;
Caco-2 – storosios žarnos adenokarcinomos ląstelės;
T3M4 – kasos adenokarcinomos ląstelės;
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas.

IVADAS

Pasaulyje piktybiniai navikai užima vieną iš pagrindinių mirties priežasčių. Didžiąją onkologinių susirgimų dalį sudaro virškinimo sistemos navikai, tokie kaip skrandžio, kasos ar storosios žarnos vėžys [1]. Retais atvejais jie būna diagnozuojami ankstyvose stadijose. Gana dažnai diagnozė nustatoma jau esant ligos išplitimui į pilvaplėvės ertmę – karcinomatozei [2]. Nustačius tokią būklę, kurią sukėlė storosios žarnos adenokarcinoma, pacientai vidutiniškai išgyvena nuo 3 iki 6 mėnesių [2], kasos – 7 mėnesius [3], negydomas skrandžio vėžys – 2 mėnesius [4]. Nustačius peritoninę karcinomatozę, dažniausiai skiriamas sisteminis gydymas – chemoterapija [5], kuri prailgina išgyvenamumą [6]. Kitas iš gana plačiai pasaulyje naudojamų išplitusių virškinamojo trakto navikų gydymo metodų – hiperterminė intraperitoninė chemoterapija (HIPEC) [7-9]. Šios procedūros metu, pašildytas chemopreparatas yra leidžiamas į pilvaplėvės ertmę, tikintis, kad šiluma padės chemopreparatui geriau įsiskverbti į pilvaplėvės ertmės audinius, taip gaunant geresnį efektą negu chemopreparatą leidžiant intraveniškai [10]. HIPEC gali būti taikoma dvejopai: vien tik HIPEC, arba kartu su citoredukcija – chirurginiu būdu pašalinant kaip įmanoma daugiau matomų makronavikinių židinių [11, 12].

HIPEC pranašumu prieš intraveninę chemoterapiją laikoma tai, jog galima naudoti aukštas chemopreparato koncentracijas. Tokiu atveju nuo per didelio toksiškumo apsaugo plazmos-peritoninis barjeras, kuris neleidžia chemopreparatui patekti į kraują. Taip pat nustatyta, kad HIPEC metu chemopreparatas į pilvaplėvės audinius penetruoja geriau negu jį leidžiant intraveniškai. Šiam vaisto įsiskverbimui į gilesnius audinių sluoksnius, didelės reikšmės turi hipertermija. Taip pat HIPEC metu, aukšta temperatūra pati veikia citotoksiškai, sąlygodama apoptotinius mechanizmus [13-16].

Koks chemopreparatas bus naudojamas hiperterminės intraoperacinės chemoterapijos metu, labai priklauso nuo pirminio naviko tipo, ligoninės, kurioje gydomas pacientas ir kitų aspektų. Dažniausiai naudojami chemopreparatai yra cisplatina, oksaliplatina, mitomycinas C [17]. Taip pat, priklausomai nuo gydymo centro, varijuoja ir procedūros laikas, bei naudojamas temperatūrinis režimas [18]. Neturint suvienodintų procedūros metodikų, apibrėžiančių laiką, temperatūrą, citotoksinį preparatą, labai sunku vertinti HIPEC naudą ir įtaką pacientų išgyvenamumui. Vienos studijos nurodo, kad HIPEC ženkliai prailgina išgyvenamumo rodiklius [6]. Kitose

studijose nurodoma, kad pacientų kuriems taikyta citoredukcija su HIPEC ar vien citoredukcija, išgyvenamumas nesiskiria [19]. Gaunant nevienalyčius rezultatus, ieškoma naujų gydymo metodikų, kurios pagerintų HIPEC procedūros sėkmę [20].

Karščio indukuojami baltymai – tai visa grupė viduląstelių medžiagų, tiesiogiai reaguojančių į įvairius aplinkos dirgiklius. Veikiant karščiui, chemopreparatams, ultravioletinei spinduliutei, jų viduląstelinis kiekis ženkliai didėja, siekiant apsaugoti ląsteles nuo dirgiklio pažaidos [21-24]. Yra nustatyta, kad vėžinės ląstelės pačios, be jokių dirgiklių išskiria padidintus baltymų kiekius [25]. Slopinant karščio indukuojamų baltymų sintezę, galima gerinti ląstelių atsaką į minėtus dirgiklius, taip pat ir kai kuriais atvejais veikti pačias vėžines ląsteles [26, 27]. Hemo oksigenazė – 1 (HO-1) jau keletą dešimtmečių žinoma kaip citoprotekcinis baltymas. Nustatyta, kad šio geno raiška padidėja vėžinėse ląstelėse. Tokiu būdu jis reaguoja į chemoterapijos sukeltą oksidacinį stresą, skatina ląstelių proliferaciją, bei slopina apoptozę ir autofagiją [28-30]. Šiuo metu bandoma slopinti HO-1 funkciją, taip gerinant vėžinių ląstelių atsaką į chemoterapiją. Tyrimų rezultatai rodo, kad HO-1 slopinimas atsaką gerina per naviko ląstelių mikroaplinką ir imuninę sistemą [31]. Vienas iš potencialių HO-1 slopinančių veiksnių – alavo protoporfirinas (SnPP). Buvo nustatyta, kad slopinant HO-1 funkciją SnPP, padidėja chemopreparato toksiškumas [32].

Yra atlikta daug tyrimų vertinant įvairių ląstelių atsaką į hipertermiją ir chemoterapiją [33, 34]. Tačiau studijų, kuriose būtų vertinama skirtingų virškinamojo trakto navikų atsako į šiuos veiksnius nėra. Taip pat nėra aišku, ar karščio indukuojamų baltymų funkcijos ir ekspresijos slopinimas gali gerinti hipertermijos su chemoterapija poveikį.

Darbo tikslas

Ištirti virškinimo sistemos (skrandžio, kasos ir storosios žarnos) navikinių ląstelių atsaką į hipertermiją bei cisplatiną ir citoprotekcinio geno HO-1 moduliacijos įtaką šiems procesams *in vitro*.

Uždaviniai

1. Įvertinti hipertermijos ir chemopreparato cisplatinos poveikį skrandžio, kasos ir storosios žarnos vėžinių ląstelių metaboliniam aktyvumui.

2. Nustatyti, ar hipertermija įtakoja chemopreparato patekimą į skrandžio, kasos ir storosios žarnos vėžines ląsteles.
3. Ištirti kaip hipertermija bei cisplatina (atskirai ir kartu) veikia skrandžio, kasos ir storosios žarnos vėžinių ląstelių apoptozės procesus ir viduląstelinio kvėpavimo parametrus.
4. Nustatyti kaip citoprotekcinio baltymo HO-1 raiškos moduliacija keičia vėžinių ląstelių atsaką į hipertermijos ir chemopreparato poveikį.

Mokslinio darbo naujumas

Naudojant inovatyvias diagnostikos metodikas, virškinimo sistemos navikai aptinkami vis anksčiau, tačiau išlieka gana daug atvejų, kuomet diagnozuojant, onkologinis procesas pažengęs ir išplitęs pilvaplėvės ertmėje. Tokiu atveju taikomas sisteminis gydymas chemoterapija, nes chirurginis gydymas nėra efektyvus [35-37]. Kitas iš gydymo pasirinkimų – hiperterminė intraoperacinė chemoterapija (HIPEC). Daugumoje studijų, analizuojančių HIPEC, nurodoma, kad ši procedūra prailgina išgyvenamumą [6], tačiau yra ir tokių, kurios nurodo, jog tai nėra veiksmingas būdas gydyti intraperitoniškai diseminavusius virškinimo trakto navikus [19]. Multicentriškai vertinti HIPEC rezultatus gana sunku, dėl labai skirtingų gydymo variacijų (skirtingas procedūros laikas, temperatūra, naudojamas chemopreparatas), taip pat ir pacientų atrinkimo gydymui kriterijų [38].

Tyrimų, kurie vertintų HIPEC poveikį ląstelėms nėra daug. Dažniausiai šios studijos vertina ląstelių atsaką remdamosi vien apoptozės ar metabolinio aktyvumo rodikliais. Iki šiol nėra tiksliai aiškūs mechanizmai, kurie įtakoja ląstelių atsaką į pašildyto chemopreparato veikimą. Yra teigiama, kad hipertermija gerina ląstelių atsaką vienoms ląstelėms daugiau kitoms mažiau. Studijų, kurios kompleksškai vertintų ląstelių atsaką metabolinio aktyvumo, apoptozės, viduląstelinės cisplatinos koncentracijos ir mitochondrijų kvėpavimo pokyčius veikiant HIPEC iki šiol nėra atlikta.

Besiskiriant baziniams tyrimų rezultatams, vertinant hipertermijos ir chemoterapijos įtaką, ieškoma būdų tobulinti HIPEC procedūrą [20]. Karščio indukuojami baltymai žinomi, kaip citoprotekciniai. Jų kiekis ženkliai didėja veikiant tokiems ląstelių stresoriams kaip chemoterapija, aukšta temperatūra. Jų padidintus kiekius išskiria vėžinės ląstelės. Vienas iš karščio indukuojamų baltymų - hemo oksigenazė – 1 (HO-1) yra citoprotekcinis genas, atsakingas

už vėžinių ląstelių rezistentiškumą chemoterapijai, bei apsaugą nuo tokių veiksmų, kaip hipertermija. Veikiant minėtiems dirgikliams, didėja viduląstelinis *HO-1* kiekis [29]. Šiame tyrime *HO-1* pasirinktas, kaip potencialus „taikiny“ galimai gerinantis kombinuoto cisplatinos ir hipertermijos poveikio rezultatus. Iki šiol nėra aišku ar *HO-1* raiškos ar funkcijos slopinimas gali gerinti ląstelių atsaką į hipertermijos ir chemoterapijos poveikį.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Skrandžio vėžys

Skrandžio vėžys užima penktą vietą, t.y. 6,8 % tarp visų onkologinių susirgimų. Vertinant mirtis sąlygotas vėžio, šie navikai užima trečiąją vietą [1]. Sergamumas pasaulyje pagal gyvenamą vietovę labai varijuoja, tačiau didžiausias susirgusiųjų skaičius fiksuojamas Azijos šalyse. Pastaraisiais metais mirtingumas sergant skrandžio vėžiu mažėja dėl išvystyto efektyvaus gydymo, tačiau suvaldyti šią ligą yra sunku, nes ji dažniausiai diagnozuojama III – IV stadijoje [39].

Vertinant navikų genų ekspresiją, galima išskirti du skrandžio vėžio tipus: I – difuzinį (nediferencijuotą) ir žarninį tipą (gerai diferencijuotą) [40]. Difuzinis skrandžio vėžys susijęs su blogesne prognoze, dėl greito augimo, bei metastazavimo. Žarninis vėžio tipas ne toks agresyvus, dažniausiai susijęs su *Helicobacter pylori* infekcija. Taip pat šio tipo vėžį gali sukelti rūkymas, alkoholio vartojimas, nutukimas ir augimo hormonų disbalansas [41]. Vertinant histologiškai, dažniausiai nustatoma papilinė, tubulinė, mucininė ar mišri skrandžio adenokarcinoma [40].

Nustačius ankstyvos stadijos skrandžio vėžį, optimaliausias gydymas – operacija. Tačiau, kaip minėta anksčiau, ši liga diagnozuojama III – IV stadijose, kuomet tikslinga skirti sisteminį – chemoterapinį gydymą. Tokiu atveju skiriama 5-fluoruracilas, kapecitabinas, karboplatina, cisplatina, docetakselis, oksaliplatina ir t.t. Pažengusiam procesui šie vaistai skiriami juos kombinuojant, pvz.: 5-fluoruracilas kartu su cisplatina (I A rekomendacija pirmo pasirinkimo gydymui). Nustačius HER2 receptorių skrandžio vėžinėse ląstelėse, taikoma taikinių terapija trastuzumabu [42].

Diagnozavus intraperitoniškai išplitusius skrandžio navikus, taip pat taikoma HIPEC. Šiuo atveju, procedūros laikas varijuoja nuo 30 min iki 90 min. Temperatūra - 42 °C. Chemopreparatai - mitomycinas C + cisplatina; oksaliplatina; doksorubicinas + cisplatina; arba vien tik cisplatina. Kai kuriais atvejais intraveniškai papildomai skiriamas 5-fluoruracilas [43].

1.2 Kasos vėžys

Išsivysčiusiose šalyse, kasos vėžys užima septintą vietą tarp mirčių susijusių su onkologiniais susirgimais. Vertinant sergamumą piktybiniais

navikais, ši liga vienuoliktoje vietoje. 2018 metais pasauliniu mastu, buvo nustatyta 458918 naujų kasos vėžio atvejų. Kadangi tai sunkiai gydomas ir blogos prognozės onkologinis susirgimas, statistika, nurodanti naujus ligos atvejus ir mirtis skiriasi nedaug. 2018 metais nustatyta viso 432242 mirtys (4,5 % visų vėžio sukeltų mirčių) [44, 45]. Vyrų ir moterų sergamumo rodikliai panašūs. Kasos vėžys dažniausiai diagnozuojamas vyresnio amžiaus žmonėms. Apie 80 % visų atvejų sudaro asmenys, kurių amžiaus vidurkis 71 metai [46].

Sunku vertinti veiksnius, sąlygojančius kasos vėžį. Tik apie 40 % atvejų galima priskirti žinomiems rizikos faktoriams, iš kurių 10 % paveldimi, kiti susiję su aplinka [47, 48]. BRCA 1/2 mutacija [49], Linčo sindromas [50], šeiminė polipozė [51], Peutzo-Jegerso sindromas [52], paveldimas kasos uždegimas [53] ir cistinė fibrozė [54] kasos vėžį įtakoja genetiškai. Aplinkos sukelti veiksniai gali būti rūkymas, alkoholio vartojimas, nutukimas, chroninis kasos uždegimas, cukrinis diabetas [55].

Vertinant histologiškai, dažniausiai nustatoma kasos adenokarcinoma. Retesniais atvejais diagnozuojama adenoskvamozinė, medulinė, bei koloidinė karcinomos [56]. Diagnozavus kasos vėžį, optimaliausias gydymo metodas – chirurginis, tačiau tik retais atvejais, tą techniškai pavyksta atlikti. Dažniausiai kaip ir skrandžio vėžys, kasos navikai nustatomi jau pažengusiose stadijose [57]. Tokiu atveju skiriamas neoadjuvantinis gydymas chemoterapija, tikintis sunaikinti cirkuliuojančias vėžines ląsteles, bei sumažinti naviko tūrį iki operabilumo. Kai kuriais atvejais įtraukiamas ir spindulinis gydymas. Neoadjuvantinei chemoterapijai dažniausiai naudojamas gemcitabinas arba FOLFIRINOX (oksaliplatina, leukovorinas, irinotekanas ir 5-fluoruracilas) shcema [58]. Retesniais atvejais pasirenkama cisplatina [59]. Kalbant apie pacientus, kuriems diagnozuotas išplitęs procesas, pirmo pasirinkimo sisteminis gydymas yra FOLFIRINOX [60].

Taikant HIPEC, diseminavusiu pilvaplėvės ertmėje kasos vėžiu sergantiems pacientams, procedūros laikas varijuoja nuo 30 min iki 60 min, temperatūra varijuoja nuo 41°C iki 43 °C. Dažniausiai naudojami platinos preparatai, kaip oksaliplatina, karbaplatina [61-63].

1.3 Storosios žarnos vėžys

Storosios žarnos vėžys – trečias pagal dažnumą naujai nustatomas piktybinis susirgimas ir antras pagal mirties priežastį tiek tarp vyrų, tiek tarp

moterų. 6,1 % visų naujų vėžio atvejų ir 9,2 % mirčių nuo onkologinių susirgimų sudaro storosios žarnos vėžys. 2018 metais buvo planuota 1,8 mln naujų ligos atvejų ir 881000 mirčių [1, 44, 64].

Ligos rizikos veiksnius galima išskirti į 2 grupes: keičiamus ir nekeičiamus. Keičiamiems galima priskirti žalingus įpročius, kaip rūkymas ir alkoholio vartojimas, nutukimą, raudoną mėsą. Nekeičiamiems priskiriama uždegiminės žarnyno ligos, amžius, ir šeiminė storosios žarnos vėžio anamnezė [65].

Histologiškai, apie 90 % visų storosios žarnos navikų – adenokarcinomos, besivystančios iš storosios žarnos epitelinių ląstelių [66]. Retesnes formas sudaro skvamosinė, adenoskvamosinė, neuroendokrininė, nediferencijuotos karcinomos [67]. Optimaliausias šių navikų gydymas – operacija. Priklausomai nuo tumor dydžio, pažeistų sritinių limfmazgių, gali būti taikomas spindulinis gydymas ir chemoterapija. Sisteminiame gydymui dažniausiai naudojamas 5-fluoruracilas [68, 69]. Neoadjuvantine chemoterapija gydant lokaliai pažengusią ligą, taip pat gali būti naudojamas 5-fluoruracilas, kai kuriais atvejais kartu su platinos preparatais. Šis derinys dar labiau pagerina patologinį naviko atsaką į gydymą. Neoadjuvantiniame gydyme, naudojant spindulinę terapiją kartu su chemoterapija, geriausias pasirinkimas – kapecitabinas [70]. Esant IV stadijos storosios žarnos vėžiui – 5 metų išgyvenamumas tesiekia 6 %. Negydant, išgyvenamumo mediana tesiekia 6 mėnesius. 5-fluoruracilas kartu su leukovorinu išgyvenamumo rodiklius padidina iki 12 mėnesių [71]. FOLFOX (5-fluoruracilas, leukovirinas, iririnotekanas ir oksaliplatina) padidina išgyvenamumo medianą iki 20 mėnesių [72].

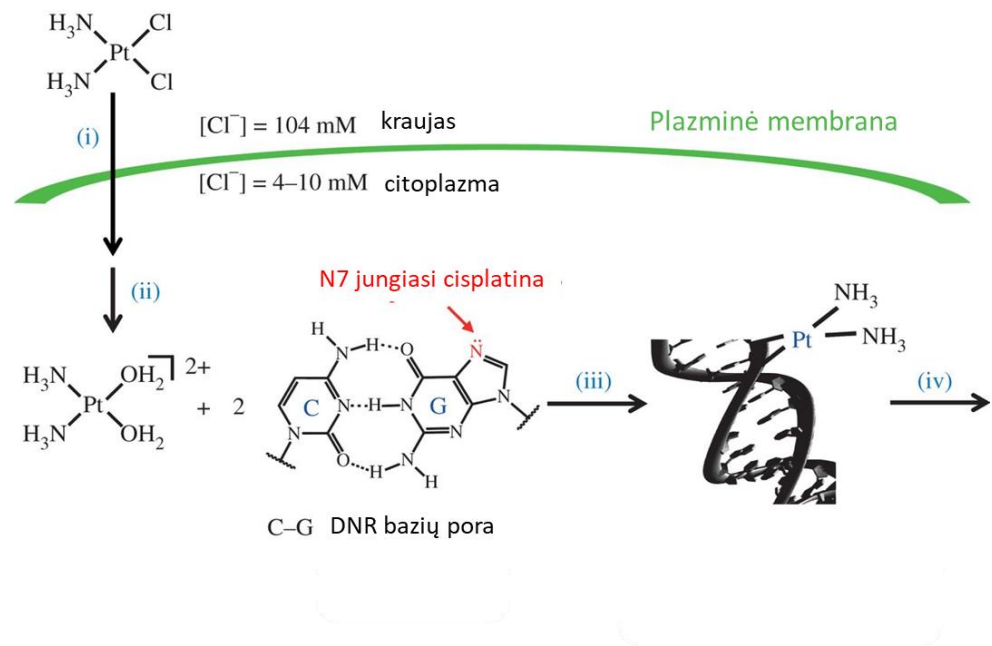
Taikant HIPEC dažnai būna skiriama ir intraveninė 5-fluoruracilo injekcija. Laikas būna panašus, kaip ir gydant intraperitoniškai išplitusį skrandžio ar kasos vėžį – 30 min. Intraperitonealiai leidžiamas chemopreparatas sušildytas iki 41 °C - 43 °C. Šio tipo vėžio gydymas HIPEC nesiskiria nuo anksčiau minėtų. Skiriama oksaliplatina, mitomycinas C, irinotekanas [73].

1.4 Cisplatina

Cisplatina buvo išrasta dar 1845 metais [74]. Kitaip šis preparatas vadinamas *cis*-diaminodichloroplatina. Cheminė formulė, apibūdinanti jos struktūrą - $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$. Cisplatina yra stabili substancija, kurios molekulinė masė 301,1 mg/mol, tankis – 3,74 g/cm³ [75].

Į cisplatiną, kaip priešvėžinį preparatą pradėta žiūrėti tada, kai Rosenbergas atrado jos antiproliferacinį poveikį ląstelėms [74]. Cisplatina pradėta taikyti klinikinėje praktikoje, tačiau buvo ir daug skepticizmo, nes nustatyta, kad ji sąlygoja sunkius šalutinis poveikius žmogaus organizmui. Tai pasireiškė nefrotoksiškumu, pykinimu, vėmimu, ototoksiškumu [76]. Tikintis sumažinti šiuos veiksnius, cisplatina buvo modifikuojama, kuriant naujus platinos derivatus, tokius kaip oksaliplatina, karboplatina [77-79]. Šis preparatas naudojamas plaučių vėžio adjuvantiniam gydymui [80]. Kiaušidžių vėžio gydyme cisplatina taip pat naudojama kaip vienas iš pagrindinių medikamentų, tačiau ligos atkryčio metu navikinės ląstelės įgauna rezistentiškumą šiam vaistui [81]. Krūties, sėklidžių, šlapimo pūslės, gimdos kaklelio karcinomos, ne Hodžkino limfoma taip pat gydoma cisplatina.

Cisplatinos poveikis ląstelei gali būti suskirstytas į 4 etapus (Pav. 1.4.1.). *I – cisplatinos patekimas į ląstelę.* Šiuo etapu, pasyvios pernašos pagalba, cisplatina patenka į ląstelės vidų. Tačiau yra studijų, kur teigiama, kad čia dalyvauja ir aktyvus membraninis transportas [82]. *II etapas - vandens prisijungimas/aktyvacija.* Ląstelės viduje vanduo pakeičia cisplatinos chlorido jonus. Chemopreparatas tampa hidrolizuotas, būtent tokia forma gali jungtis su amino rūgščių azotu. Šio proceso pusamžis ~ 2 val [83]. *III etapas – jungimasis su DNR.* Susijungime dalyvauja viena labiausiai nukleofiliškų DNR vietų – N7 pozicija *guanine*. Kartais *adeninas* taip pat gali prisijungti hidrolizuotus platinos preparatus [84]. *IV etapas – ląstelės atsakas.* Kuomet yra pažeidžiama DNR, pirmas veiksmas ką daro ląstelė – sustabdo savo ciklą, kad nevyktų dauginimasis, ir nepasigamintų paveiktų ląstelių klonų. DNR paveikus cisplatina, ląstelės ciklas sustoja ties G2 stadija [82]. Ciklo stabdymą skatina ATM ir ATR mediatoriai. Yra žinoma, kad ląstelės ciklo sustojimas G2 stadijoje sąlygoja apoptozę [85]. Įsijungia NER (nukleotidų pažaidos eksizijos sistema), kuri stengiasi pažeistą vienagrandės DNR dalį pašalinti. Nepavykus to padaryti, vyksta ląstelės inicijuojama apoptozė [86]. Dalis vėžinių ląstelių yra atsparios cisplatinai. Vienos iš tokių - Gliomos ir kai kurių kiaušidžių vėžio ląstelės. Veikiant jas hipertermija (40 °C), rezistentiškumas cisplatinai pranyksta, ir jos žūva [87]. Taip pat yra žinoma, kad veikiant daugumą ląstelių hipertermija, cisplatinos dozė gali būti mažinama, siekiant gauti toki patį efektą, kaip veikiant vien tik cispatina [88].



Pav. 1.4.1. Cisplatinos poveikis ląstelei.

I – patekimas į ląstelę. II – vandens prisijungimas/aktyvacija. III – jungimasis su DNR.
IV – ląstelės atsakas. Adaptuota iš Johnstone ir kt. [89].

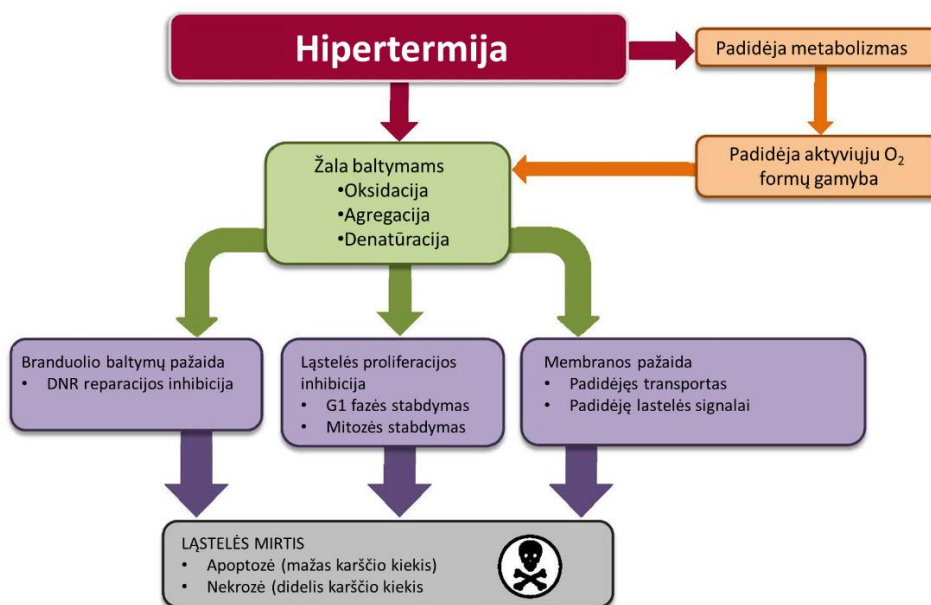
Cisplatina taip pat įtakoja viduląstelinius signalinius kelius. MAPK/JNK/ERK/p38, p53, c-Abl keliai yra įtakojami DNR pažeidos [90]. Yra žinoma, kad ląstelės jautrumas cisplatinos sukeltai apoptozei, tiesiogiai susijęs su c-Abl ekspresija. p53 baltymas atsakingas už ląstelės atsaką į gydymą cisplatina. Tai kaip mediatorius, tarp ląstelės ciklo stabdymo mechanizmo ir apoptozės inicijavimo [82]. Tačiau yra studijų, kur nerasta jokios p53 įtakos cisplatinos veikimui ląstelėje. Kaip šis baltymas sąveikauja su cisplatinos poveikiu priklauso nuo įvairių naviko genetinių mutacijų, pačio naviko ląstelių ir specifinių signalinių kelių. Žinoma, kad tokie baltymai, kaip BRCA1, ciklinas G, kurie susiję su p53 signaliniu keliu, taip pat įtakoja cisplatinos citotoksiškumą [91]. Ar vyks ląstelės apoptozė, ar nekrozė, daugiausiai sąlygoja viduląstelinė cisplatinos koncentracija. Atliekant tyrimus su pelių tubulinių ląstelių pirminėmis kultūromis, jas veikiant didele cisplatinos doze, ląstelės nekrotizavo po kelių valandų. Tuo tarpu apoptozę sukelia mažesnė cisplatinos koncentracija, kuri veikia ląstelę ilgesnį laiką [92, 93]. Viduląstelinis ATP kiekis taip pat sąlygoja apoptozę arba nekrozę [94, 95].

1.5 Hipertermijos poveikis ląstelei

Medicinoje, daugeliui ligų hipertermija ilgą laiką naudojama kaip pagrindinis gydymas, arba kaip gydymo sudedamoji dalis. Naudojant šilumą gali būti gydomos įvairios traumos. Dar 1989 metais karšto vandens aplikacijomis buvo gydomas gimdos kaklelio vėžys [96]. Atlikta ir daugiau tyrimų, keliant temperatūrą srityje, kurioje yra navikas, taip tikintis geresnio gydymo atsako [97]. Tačiau yra ir neigiamas šio poveikio aspektas. Ilgą laiką veikiant organizmą aukšta temperatūra, jis žalojamas [98].

Yra daugybė pasekmių, kurias sukelia hipertermija ląstelei, tokių kaip sulėtėjęs ląstelių dalijimasis, padidėjęs jautrumas radioterapijai. Hipertermijos dėka, padidėjus kraujo perfuzijai, vietiskai veikiant naviką, pagerinamas intraveninių vaistų patekimas. Taip pat padidėjusios temperatūros dėka, pagerėja oksigenacija, ko pasekoje pagerėja ląstelės atsakas į radioterapiją. Sulėtėjus ląstelės ciklui, jos nebegali taisyti spindulinio gydymo sukeltų pažeidimų [99, 100]. Tačiau aukšta temperatūra pradžioje didindama audinių oksigenaciją ir perfuziją, po tam tikro laiko sąlygoja kraujagyslių pažeidimą. Tuomet kraujo tėkmė mažėja, oksihemoglobino kiekis taip pat mažėja. Deguonies trūkumas didina navikų pH, kas sąlygoja ląstelių išemiją ir mirtį [100, 101]. Nėra vienodos temperatūros ir jos veikimo trukmės visų tipų ląstelėms, kuomet pradeda vystytis jų žūtis. Nustatyta, kad tokie temperatūriniai ir laiko parametrai, kurie veikia navikus, dar neveikia sveikų audinių [102]. Apskritai, pokyčiai kurie atsiranda aukštai temperatūrai veikiant ląstelę, atsiranda nuo jos pakitusių signalo kelių, bei jų įtakos DNR ir RNR baltymų sintezei [103]. Baltymų sintezė ląstelėse sustabdoma jas veikiant labai aukšta temperatūra, o veikiant vidutine hipertermija pradedami gaminti karščio indukuojami baltymai. Jie sąlygoja ląstelių toleranciją aukštai temperatūrai [104]. Grįžtant prie ląstelės pH pokyčių, reikia paminėti, jog temperatūra, kuri yra didesnė nei 42,5 °C sumažina pH lygį tiek ląstelės viduje tiek ir išorėje. Rūgštingumo padidėjimas taip pat pasitarnauja gydant navikus. Rūgšti terpė didina ląstelių jautrumą tiek chemoterapijai tiek ir jonizuojančiai spinduliuotei [105]. Dėl hipertermijos poveikio, sumažėjus pH lygiui, atsiranda patogeniniai viduląsteliniai mechanizmai, kurie dažniausiai gali būti grįžtami (nustojus veikti temperatūrai). Šie mechanizmai tai: pieno rūgšties kiekio padidėjimas, padidėjusi ATP hidrolizė, padidėjusi ketogenezė, CO₂ parcialinio slėgio padidėjimas, NA/H pernašos sistemos slopinimas [106].

Vertinant literatūroje pateiktus duomenis, temperatūra nuo 39 °C iki 42 °C laikoma hipertermija, > 42 °C - mirtina hipertermija. Tačiau aukštesnei temperatūrai tapti mirtina taip pat reikia, kad ji organizmą veiktų tam tikrą laiką [107]. Šiam aspektui didžiausios įtakos turi baltymų agregacija ir denatūracija. Po to įsijungiant ląstelės ciklo stabdymui, baltymų sintezės ir DNR reparacijos slopinimui [108]. Hipertermija keičia ir lipidų struktūrą, tačiau yra žinoma, jog tai grįžtamas mechanizmas [109]. Taip pat ląstelės homeostazės pokyčiai sąlygoja post-transliacines modifikacijas kaip glikozilinimą, acilinimą, fosforilinimą, DNR fragmentaciją [110-112]. Čia DNR pažeida turbūt įtakojama hipertermijos ne kaip pačios DNR, bet kaip branduolio baltymų, kurie yra agreguojami [109, 113] (Pav. 1.5.1.). Aukšta temperatūra sąlygoja aktyviųjų deguonies formų (ROS) gamybą, ko pasekoje sutrikdoma mitochondrijų kvėpavimo grandinė. Nustatyta, kad ROS didėja tiek esant 40 °C tiek ir esant aukštesnei nei 42 °C [114-117].



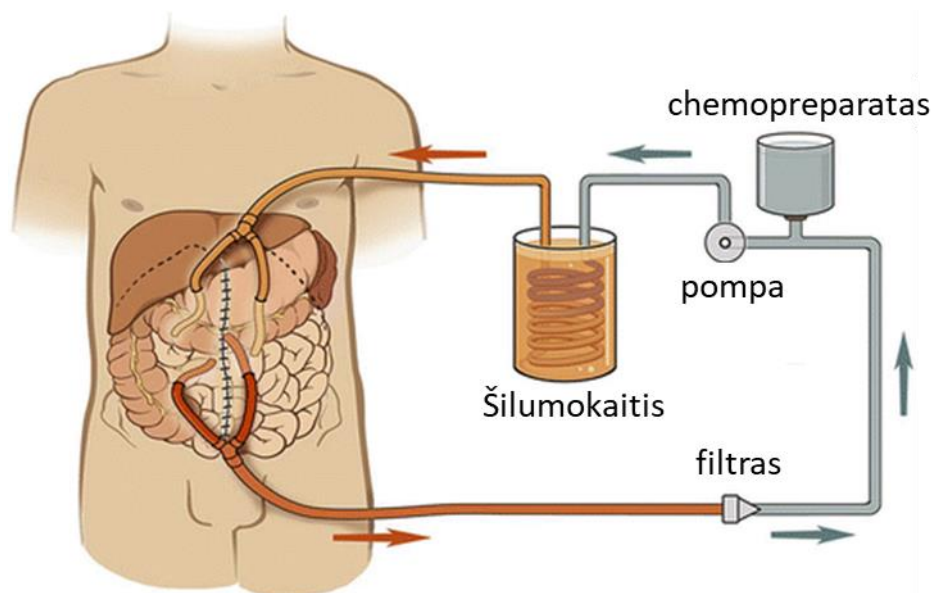
Pav. 1.5.1. Hipertermijos sukelti viduląsteliniai pokyčiai, sąlygojantys žūtį.

Adaptuota iš Bettaieb ir kt. [113].

1.6 Hiperterminė intraperitoninė chemoterapija (HIPEC)

Hiperterminės intraperitoninės chemoterapijos ištakos siekia 1934 metus, kuomet buvo atrasta, kad pašalinus didžiąją dalį navikinių masių, esančių pilvaplėvės ertmėje, yra atitolinami išplitusio vėžio simptomai. Šie simptomai tai žarnyno nepraeinamumas, ascitas, tuščiavidurių organų perforacija [118]. Šis gydymo metodas vėliau buvo kiek primirštas. 18 dešimtmetyje Griffiths nustatė, kad citoredukcinė operacija (šalinant makroskopiškai matomas navikines mases pilvaplėvės ertmėje) ir postoperacinė chemoterapija gerina žmonių, sergančių išplitusiu intraperitonealiai vėžiu išgyvenamumą [119, 120]. Pirmoji HIPEC procedūra, naudojant chemopreparatą Thiotepą, bei hipertermiją, buvo atlikta 1979 metais [121].

Dažniausiai HIPEC atliekama po intraperitoniškai išplitusio naviko citoredukcijos. Pačios procedūros tikslas – išplauti iš pilvaplėvės ertmės likusias plaukiojančias navikinės ląsteles, kartu leidžiant pašildytą chemopreparatą. Šildymo tikslas – gerinti chemopreparato penetraciją į audinius, bei didinti jo citotoksiškumą. Dažniausiai naudojama temperatūra yra 41 °C - 43 °C. Pačios procedūros metu atvėrus pilvaplėvės ertmę, į ją suvedamos žarnelės, pro vienas iš jų leidžiamas pašildytas chemopreparatas, pro kitas išleidžiamas (Pav. 1.6.1.) [122].



Pav. 1.6.1. HIPEC aparatūros schema.

Adaptuota iš Randle ir kt. [122].

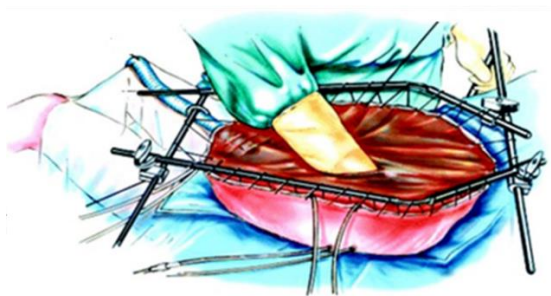
HIPEC gali būti atliekama dvejopai: uždara ir atvira metodika (Pav. 1.6.2.). Atvira HIPEC dar kitaip vadinama „Koliziejaus metodika“. Atvėrus pilvaplėvės ertmę ir suvedus įeinančio ir išeinančio chemopreparato vamzdelius, aplink visą pjūvį apsiuvama plėvelė, kad pati ertmė būtų uždara, tačiau per ją galima būtų atlikti manipuliacijas rankomis. Tokiu būdu aparatūra chemopreparatą palaiko 43°C - 45°C temperatūroje, kad intraperitoniškai būtų užtikrinta $\sim 41^{\circ}\text{C}$ - 43°C . Chemopreparatas leidžiamas 1 L/min greičiu, nuo 30 min iki 90 min. Atviros metodikos HIPEC privalumas yra tas, kad pilvaplėvės ertmėje geriau pasiskirsto šiluma. Trūkumas – sunku palaikyti reikiamą temperatūrą, bei didesnė rizika operacinės personalui įkvėpti chemopreparato [123].

Uždaros procedūros metu vamzdeliai taip pat įvedami į pilvaplėvės ertmę, tačiau po įvedimo ji sandariai užsiuvama. HIPEC metu, pilvas turi būti pastoviai spaudomas chirurgo rankomis, kad chemopreparatas tolygiau pasiskirstytų. Po to, vėl atidarius pilvaplėvės ertmę, ji išplaunama. Pagrindinis uždaros HIPEC privalumas - minimalus temperatūros praradimas. Hipertermija pasiekiamą greičiau, tikimybė personalui įkvėpti chemopreparato sumažėja. Esant uždarai pilvaplėvės ertmei, galima sukelti intraabdominalinį spaudimą, taip dar pagerinant chemopreparato penetraciją

į audinius. Šios metodikos trūkumas – sunku išlaikyti vienodą temperatūrą visoje pilvaplėvės ertmėje [123]. HIPEC metu anesteziologų komanda taip pat turi būti pasiruošusi. Reikia palaikyti adekvatų centrinį veninio spaudimo ir diurezės santykį. Mažą diurezę gali sąlygoti chemopreparato nefrotoksiškumas. Taip pat turi būti monitoruojama kūno temperatūra, kuri esofagaliai gali pasiekti daugiau nei 39 °C. Kaklas ir kirkšnių zonos turi būti šaldomos ledu [123].

Iki dabar nėra nustatyta nei kokie chemopreparatai, nei jų dozės turėtų būti naudojami HIPEC. Dažniausiai pasirenkamas vaistas – mitomycinas C. Jo dozuotė varijuoja nuo 12,5 mg/m² iki 35 mg/m² [124]. Kitas iš pasirinkimų – oksaliplatina. Tai trečios kartos platinos preparatas, kurį leidžiant į pilvaplėvės ertmę reikia skiesti su 5 % dekstrozės tirpalu. Tai sąlygoja hiperglikemiją ir hiponatremiją [125]. Irinotekanas - chemopreparatas neleidžiantis iš vienagrandės DNR sujungti į dvigrandę, taip pat naudojamas, dozuojant nuo 360 mg/m² iki 400 mg/m². Cisplatina HIPEC pasirenkama, tačiau daugelis vengia jos sukeltų komplikacijų, tokių kaip nefrotoksiškumas [126].

Atvira metodika



Uždara metodika



Pav. 1.6.2. Uždara ir atvira HIPEC metodika.

Atviros metodikos vaizdas adaptuotas iš Sugarbaker ir kt. [127], uždaros – Boutros ir kt. [128].

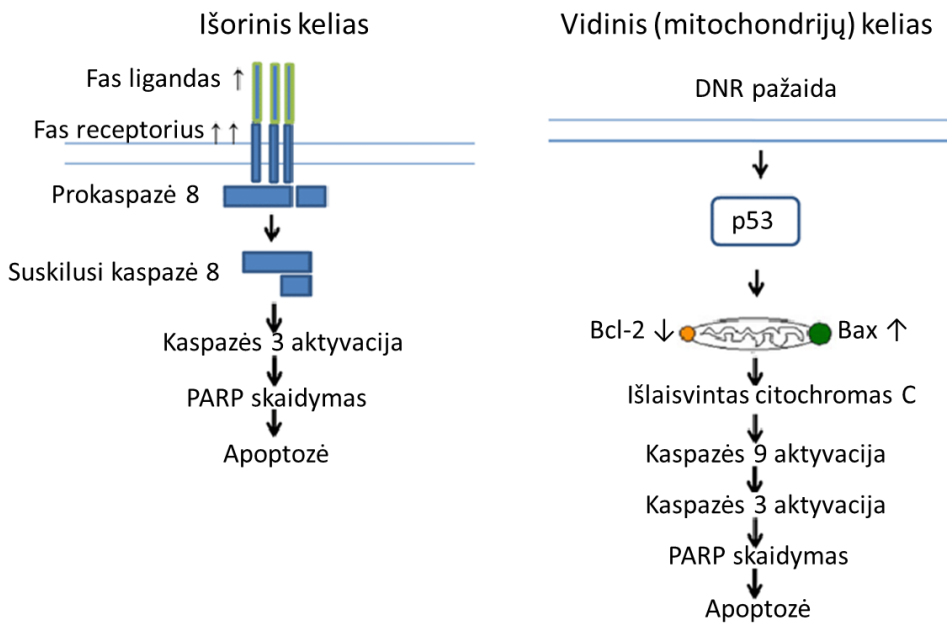
Kalbant apie pilvaplėvę ir jos ertmę, reikia pasakyti, kad pati pilvaplėvė labai plonas 5 sluoksnių mezotelinių ląstelių audinys. Jos storis 90 μm [124]. Nustatyta, kad HIPEC metu, chemopreparatas į audinius penetruoja tik 1 – 3 mm [129]. Pilvaplėvės ertmės – kraujo plazmos barjeras stabdo penetraciją, taip apsaugodamas organizmą nuo chemopreparato toksiškumo. Taip pat yra įrodyta, kad atliekant citoredukcinę operaciją ir pašalinus didžiąją dalį

pilvaplėvės, chemopreparato koncentracija pačiame organizme nedidėja [130].

1.7 Ląstelės apoptozė

Apoptozė - tai daugelio viduląstelių procesų išraiška, kurios metu ląstelė žūsta. Tai homeostazės mechanizmas, palaikantis normalų ląstelių skaičių organizme. Taip pat apoptozės mechanizmas naudojamas kartu su imuninėmis organizmo reakcijomis, kuomet ląstelės veikiamos virusų ar kitų veiksnių [131]. Radiacija ar įvairūs vaistai, naudojami chemoterapijoje, sąlygoja DNR pažeidimą daugelyje ląstelių. Ši pažeidima sąlygoja apoptozę, per p53 geną. Tačiau ji atsiranda tik tam tikrose ląstelėse. Ne visada lengva atskirti apoptozę nuo nekrozės. Šie procesai gali atsirasti atskirai, arba vienas po kito. Daugeliu atvejų ar vyks apoptozė ar nekrozė sąlygoja dirgiklio tipas arba jo laipsnis. Veikiant mažu radiacijos ar karščio kiekiu, taip pat mažomis chemopreparato dozėmis, sąlygojama apoptozė. Padidinus šių veiksnių parametrus – nekrozė [132, 133].

Pagal aktyvavimo kelią, galima išskirti 2 kelius, sąlygojančius apoptozę (Pav.1.7.1.). Tai išorinis ir vidinis. Išorinis kelias prasideda FAS ligandui prisijungus prie FAS receptoriaus. Tuomet aktyvuojama prokaspazė 8, kuri skyla į kaspazę 8, aktyvuojančią kaspazę 3. Minėta kaspazė skaido PARP, sukeliančią apoptozę. Vidinis kelias prasideda mitochondrijose po DNR pažeidos, kuomet pradeda kauptis p53 baltymas. Jo didelis kiekis sąlygoja antiapoptotinio baltymo Bcl-2 sumažėjimą. Tuomet Bax (proapoptotinis baltymas) įterpiamas į mitochondrijų membraną, sudarydamas kanalą, laidų citochromui C. Padidėjus citoplazmoje citochromo C kiekiui, aktyvuojama kaspazė 9, tuomet kaspazė 3. Kaspazė 3 skaido PARP, sukeldama apoptozę [134].



Pav. 1.7.1. Išorinis ir vidinis apoptozės aktyvavimo kelias.

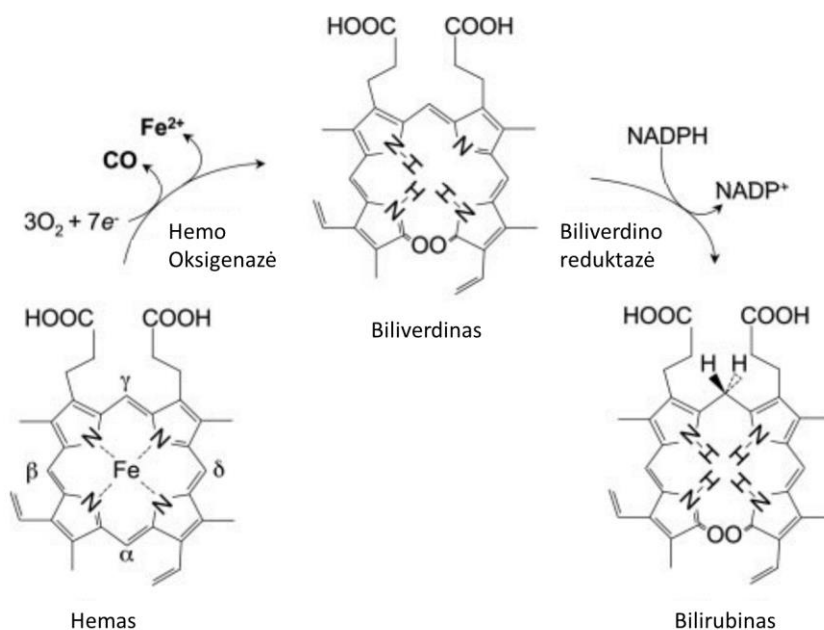
Adaptuota iš Kim ir kt. [134].

Pagal eigą apoptozę galima skirstyti į tris fazes: I – iniciacijos, kuomet viduje ląstelės yra kaupiami apoptozės dirgikliai (hormonai, ROS formos, neuromediatoriai, ir kt.); II – apsisprendimo, kurios metu dirgikliai aktyvuoja baltymus, kurie pažeidžia branduolį; III – sunaikinimo, kuomet morfologiškai kinta ląstelė. Pirmoji fazė dar gali būti grįžtamas procesas, antroji ir trečioji – ne [135].

Apoptozės metu žūvančios ląstelės traukiasi dėka citoskeleto trūkinėjimo. Šį procesą sąlygoja kaspazių veikla. Ląstelės tampa eozinofiliškos, o branduolys bazofiliškas. Ląstelės traukiasi, prarasdamos ryšį su aplink esančiomis. Vienas iš pagrindinių apoptozės etapų yra piknozė, kuomet traukiasi branduolys, chromatinas kondensuojasi. Branduolio membrana tampa nevienalytė, tuomet patekę endonukleazės „sukarpo“ DNR – tai karioreksė. Vėliau kondensuota citoplazma ir branduolys suskaldomas į mažus fragmentus, vadinamus apoptotiniais kūnais, kurie atitrūksta nuo ląstelės. Šiuos kūnus vėliau surenka makrofagai [136-138].

1.8 Hemo oksigenazė 1 (HO-1)

Hemo oksigenazė 1 (HO-1) yra baltymas, kuris priklauso karščio indukuojamų baltymų grupei. Šio baltymo funkcija - nevienalytė. HO-1 atlieka ne tik metabolinę, tačiau ir citoprotekcinę funkciją ląstelėse. Viena iš pagrindinių šio baltymo funkcijų – katalizuoti pirmąją ir hemo reguliuojančiąją degradacijos reakciją, po ko susidaro anglies monoksidas, laisva geležis ir biliverdinas. Toliau, dalyvaujant biliverdino reduktazei ir NADPH, biliverdinas gali būti paverstas į bilirubiną (Pav. 1.8.1.) [139].

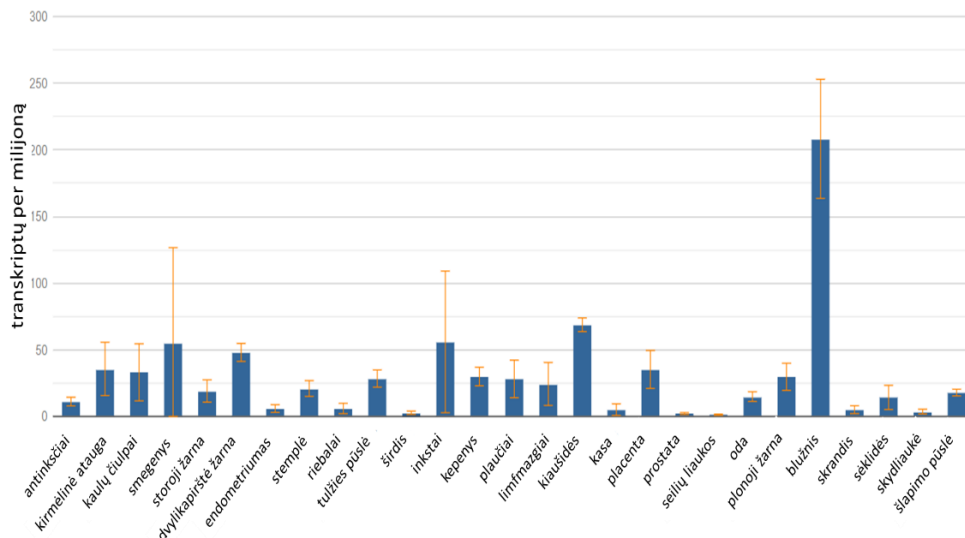


Pav. 1.8.1. Hemo degradacija ir virsmas į bilirubiną.

Adaptuota pagal Stocker ir kt. [139].

Pirminę *HO-1* struktūrą sudaro 288 aminorūgštys. Antrinė struktūra sudaryta iš 7 α spiralių, sąveikaujančių su hemu. Yra žinomos trys *HO-1* izoformos, iš kurių labiausiai ištirta – pirmoji [140]. *HO-1* geną koduoja 13854 bazių poros, esančios 22 chromosomoje q12.3 vietoje [30]. Baltymo svoris ~ 32 kDa. Tiriant ekspresiją sveikuose žmogaus audiniuose, nustatyta, kad didžiausias *HO-1* kiekis – blužnyje (Pav. 1.8.2.) [141]. Hemolizės metu, *HO-1* kiekis padidėja tiek kepenyse, inkstuose, tiek ir makrofaguose. Šiuos

pokyčius lemia padidintas hemoglobino kiekis [142]. Vertinant viduląstelinis HO-1 kiekius atskirose ląstelės dalyse, šio baltymo rasta endoplazminiame tinkle, vakuolėse, taip pat branduolyje ir mitochondrijose [30].



Pav. 1.8.2. HO-1 ekspresija sveikuose audiniuose.

Adaptuota pagal Fagerberg ir kt. [141].

Padidėjusią HO-1 ekspresiją gali sąlygoti daugelis faktorių. Tai kaip bendrinis daugelio organizmų, kaip žinduoliai, paukščiai, žuvis net ir augalai savigynos mechanizmas sąlygojantis vieno ar kito stresoriaus. Veikiant tokiam stresoriui, aktyvuojama *HO-1* geno transkripcija ir mRNR gamyba [143-145]. Vienas dažniausiai tyrinėjamų *HO-1* ekspresiją sąlygojančių veiksnių – hipertermija [146]. Kiti, nemažiau svarbūs faktoriai, kurie indukuoja HO-1 yra: vandenilio peroksidas, UV spinduliuotė, dietilmaleatas, kadmio chloridas, kobalto chloridas, hemo protoporfirinas, kobalto protoporfirinas, alavo protoporfirinas, hipoksija, hiperoksija, interleukinai, angiotenzinas II. Idomu tai, kad alavo ir cinko protoporfirinai skatina HO-1 transkripciją, tačiau tiek *in vivo* tiek *in vitro* slopina jo funkciją [30].

HO-1 tiesiogiai susijęs ir su tam tikromis ligomis. Yra žinoma, kad sumažėjęs *HO-1* kiekis žmogaus organizme tiesiogiai atsakingas už metabolinius

sutrikimus, individo žemą ūgį, sumažėjusį geležies pasisavinimą, anemiją, krešumo sutrikimus ir ankstyvą mirtį [147]. Pelių individai su *HO-1* deficitu turi didesnės apimties organus, jų audiniuose nustatomas didelis oksidacinio streso lygis. Manoma, kad jeigu šie individai gyventų ilgesnį laiką, jiems išsivystytų onkologiniai susirgimai, diabetas. *HO-1* ekspresija padidėja sergant daugeliu vėžio tipų, tačiau pačio baltymo funkcija ir vieta ląstelėje varijuoja (Lentelė 1.8.1.) [148]. Sergant prostatos karcinoma, branduolio *HO-1* ekspresija tiesiogiai koreliavo su naviko progresija [149]. Nustatyta, kad individai, kurių *HO-1* ekspresija nėra didelė, yra labiau linkę susirgti skrandžio ar plaučių adenokarcinoma, nei tie, kurie išskiria didesnę *HO-1* kiekį [150]. Slopinant *HO-1* kartu su EGF receptoriaus inhibitoriumi, kartu veikiant plaučių vėžio ląsteles cisplatina gerina pastarosios poveikį [151], padidina apoptozės lygį bei sustiprina ląstelių atsaką į spindulinio gydymo ir cisplatinos poveikį [152, 153].

Lentelė 1.8.1. *HO-1* reikšmė navikuose.

Vėžio tipas	<i>HO-1</i> vieta	Reikšmė
plaučių	citoplazma	susijęs su didesne stadija
prostatos	branduolys	susijęs su vėžio progresavimu
kasos	citoplazma	proangiogeninis
galvos/kaklo	branduolys	susijęs su vėžio progresavimu
glioma	makrofagai	proangiogeninis
storosios žarnos	citoplazma/makrofagai	susijęs su geresne prognoze
skrandžio	citoplazma/makrofagai	susijęs su geresne prognoze

Adaptuota pagal Wegiel ir kt. [148].

1.9 Alavo protoporfirinas

Alavo protoporfirinas (SnPP) - *HO-1* funkcijos slopiklis. Jo cheminė formulė - $C_{34}H_{32}N_4O_4Sn$. Molekulinė masė – 679,4 g/mol [154]. Yra žinoma, kad šis protoporfirinas hemo degradacijos keliu, hemą konvertuoja į biliverdiną. Įdomu tai, kad SnPP didina *HO-1* ekspresiją, tačiau slopina jo funkciją. Sergant gelta, jis mažina bilirubino kiekį plazmoje [155]. *HO-1* ir SnPP ryšys pradėtas tyrinėti dar 9 dešimtmetyje. Išsiaiškinta, kad SnPP mažina hemo oksigenazės mitochondrinės RNR kiekį. Negana to, gali slopinti navikų augimą, bei mažinti ciklino D1 ekspresiją, taip lėtinant B ląstelių leukemijos progresiją [156], taip pat gerinti organizmo reakciją į infekciją [157]. Klinikinėje praktikoje, buvo atliekami tyrimai, kur SnPP buvo naudojamas kūdikių hiperbilirubinemijos gydyme [158].

1.10 Mitochondrijų energetiniai mechanizmai

Mitochondrijos yra ląstelės plaučiai. Jos suvartoja apie 98 % viso gaunamo deguonies. Viduląstelinis mitochondrijų kiekis priklauso nuo ląstelės funkcijos. Daug energijos suvartojančiose ląstelėse galima priskaičiuoti kelis tūkstančius. Mažai energijos reikalaujančiose ląstelėse – kelis šimtus [159]. Mitochondrijose randama DNR ir ribosomų. Jose gaminami baltymai [160]. Pagrindinė mitochondrijų funkcija – energijos gamyba. Tačiau jos taip pat atsakingos už Ca^{2+} homeostazę, vidinius signalus, apoptozę, bei redokso būsenos palaikymą [160-162].

Energijos gamyba mitochondrijose vyksta oksidacinio fosforilinimo būdu, kuomet iš riebalų rūgščių ir angliavandenių gaunama ATP, kuri naudojama vykdyti viduląsteliniams procesams [163].

Oksidacinis fosforilinimas yra pagrindinis būdas ląstelei apsirūpinti energija. Šiame procese dalyvauja keturi kvėpavimo grandinės kompleksai, iš kurių trys veikia kaip protonų pompos ir perneša protonus iš matrikso į tarpmembraninę ertmę. Daugybė šių kompleksų, kuriuos jungia KoQ ir citochromas C kopijų yra išsidėstę vidinėje mitochondrijų membranoje [162, 164, 165]. Mitochondrijų kvėpavimo grandinė sukuria elektrocheminį protonų gradientą (Pav. 1.10.1.). Šį gradientą naudoja V kompleksas (ATP-azė), iš ADP ir Pi sintetindamas ATP [166].

I kompleksas – kitaip dar vadinamas NADH dehidrogenazė, susideda iš 45 baltyminių subvienetų ir sveriantis apie 1 mDa [164]. Ji yra L formos, sudaryta iš hidrofobinės ir hidrofilinės dalių. Pirmoji – membraninė dalis, kur randami kofaktoriai, atsakingi už NADH oksidaciją. Antroji – nustatoma mitochondrijų matrikse ir dalyvauja protonų pernašoje [165].

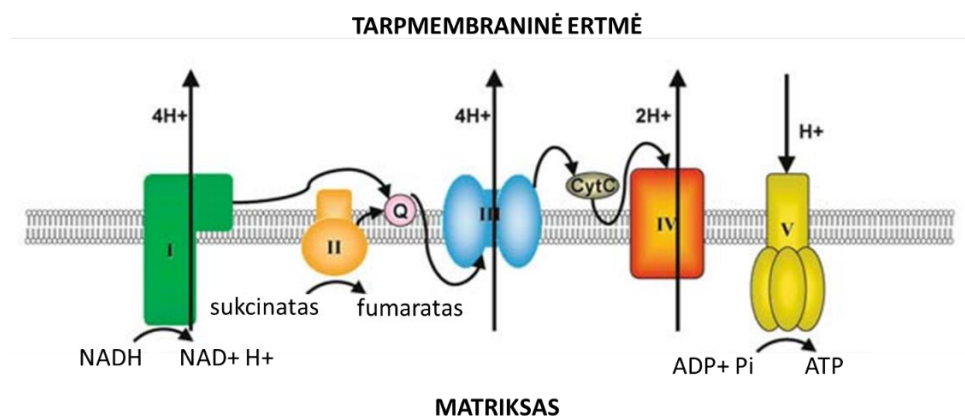
II kompleksas – sukcinato dehidrogenazė, žymiai didesnė už NADH dehidrogenazę. Jos svoris 123 kDa. Šis kompleksas taip pat randamas vidinėje mitochondrijų membranoje. Bei atkartojant pirmąjį, randama FAD prostetinė, bei Fe – S grupės. Įdomu tai, kad šį kompleksą koduoja DNR [165].

III kompleksas – citochromo c oksidoreduktazė, arba – citochromo bc₁ kompleksas, atliekantis svarbią funkciją ir apoptozės mechanizme. Svoris – 13 kDa. Ši kompleksą sudaro 2 dalys: citochromas c₁ su Fe-S grupe membranos išorėje, o citochromas b yra membranos viduje. Komplexas

veikia kaip katalizatorius, oksiduojant KoQH_2 iki KoQ . Taip pat katalizuojama citochromo redukcija [165].

IV kompleksas – citochromo c oksidazė, sudaryta iš 13 subvienetų. Tris iš jų koduoja genai, esantys mitochondriose, kitus 10 – esantys branduolyje [167, 168]. Dvi hemo grupės (a ir a_3), bei du Cu^{2+} centrai (A ir B) sudaro šį kompleksą. Citochromo c oksidazė katalizuoja O_2 redukciją, tam panaudodama citochromą c. IV komplekso struktūrą gali keisti tokios patologijos kaip vėžys ir cukrinis diabetas [168].

V kompleksas – ATP sintazė. Jį sudaro du domenai: F_0 ir F_1 . Pirmasis domenas randamas vidinėje mitochondrijų membranoje, o antrasis jį matrikse. Oksidacinio fosforilinimo metu ATP sintazė atsakinga už ATP gamybą. Dėl elektrocheminio vandenilio jonų gradiento, V kompleksas sintetina ATP iš ADP ir fosfatinės grupės (Pi) [165].



Pav. 1.10.1. Mitochondrijų kvėpavimo grandinė ir jos kompleksai.

I - NADH dehidrogenazė; II - sukcinato dehidrogenazė; III - citochromo c oksidoreduktazė; IV - citochromo c oksidazė; V – ATP sintazė. Adaptuota pagal Ros Kuperus ir kt. [169].

Visi šie kompleksai kartu su nešikliais dalyvauja oksidaciniame fosforiliniame. Energijos gamybai naudojami angliavandenių, riebalų rūgščių ir baltymų oksidacijos galutiniai produktai – piruvatas, acetil-KoA, aminorūgštys. Piruvatu gali būti gliukozė ar kiti angliavandeniai. Patekus šioms medžiagoms į matriksą, jos verčiamos acetil-KoA, kuris vėliau naudojamas Krebso cikle [160]. Glikolizės, Krebso ciklo ar riebalų rūgščių oksidacijos metu sintetinami NADH ir FADH_2 , kurie vėliau oksiduojami

kvėpavimo grandinėje. I ir II kompleksuose NADH ir FADH_2 atiduoda elektronus, kurie yra perdušami ant KoQ, kuris taip yra redukuojamas. Redukuotas KoQ, elektronus atiduoda III kompleksui. Citochromo c oksidazė elektronus gauna iš citochromo c ir kvėpavimo grandinė pabaigiama. Veikiant I, III ir IV kompleksams, iš matrikso į tarpmembraninę ertmę perdušami protonai. Šios pernašos dėka, tarpmembraninėje ertmėje susidaro protonų koncentracijos gradientas, ko pasėkoje atsiranda elektros krūvių skirtumas tarp abiejų mitochondrijos membranos pusių. Šį gradientą daugiausia naudoja V kompleksas ATP gamyboje [170, 171].

2. TYRIMŲ METODAI

2.1 Intraperitoniškai plintančio vėžio ląstelių linijos

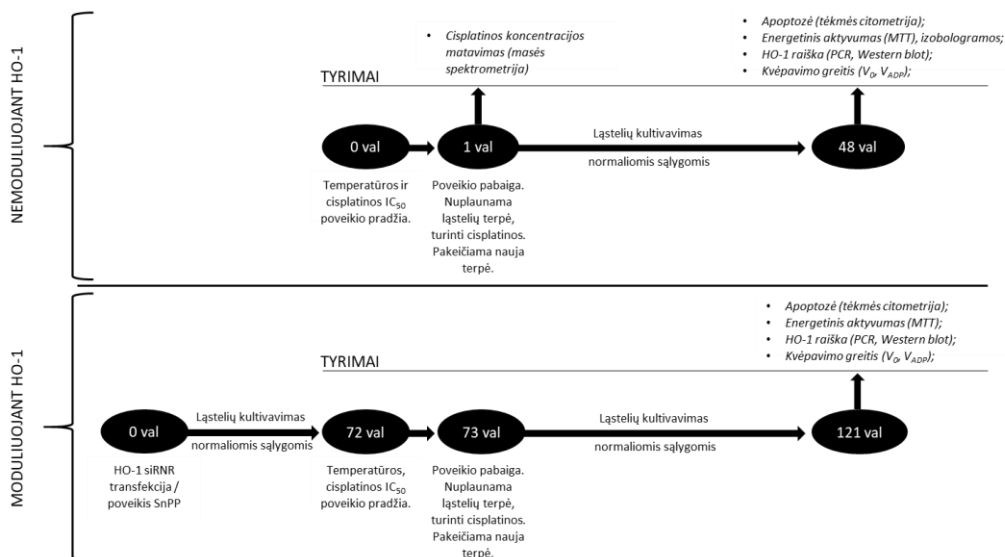
AGS ir Caco-2 ląstelės buvo įsigytos iš „American Type Cell Culture“ (ATCC; Manassas; VA; JAV). AGS ląstelių linija išskirta iš 54 metų moters, sergančios skrandžio adenokarcinoma. Prieš išskiriant šias ląsteles, jai nebuvo taikomas joks sisteminis gydymas. Caco-2 ląstelės išskirtos iš 72 metų vyro, sergančio storosios žarnos adenokarcinoma. T3M4 ląstelių liniją padovanojo „European Pancreas Centre“ (Heidelbergas; Vokietija). Šios ląstelės buvo išskirtos iš kasos duktalinė adenokarcinoma sergančios, japonų kilmės pacientės metastatinio limfmazgio. Yra žinoma, kad šios linijos ląstelės produkuoja karcinoembrioninį antigeną (CEA) ir turi *Kras* mutaciją.

Visos ląstelės buvo kultivuojamos RPMI terpėje (Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV), kartu su fetaliniu jaučio serumu (FBS; Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV), bei 1 % penicilino/streptomicino tirpalu (Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV). Konteineriai su ląstelėmis buvo laikomi drėgname inkubatoriuje, palaikant 37 °C ir 5 % CO₂.

2.2 Eksperimentas ir jo rezultatų vertinimas

Eksperimentą galima skirstyti į 2 dalis: nemoduliuojant HO-1; moduliuojant HO-1 raišką ir funkciją (Pav. 2.2.1.). *Pirmojoje* dalyje ląstelės buvo inkubuojamos 24 valandas, vėliau veiktos cisplatina ir temperatūra. IC₅₀ – 50 % mažinanti atitinkamos ląstelių linijos metabolinį aktyvumą, cisplatinos koncentracija, nustatyta titruojant dozę. Naudota temperatūra buvo: 37 °C (kontrolė), 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C ir 45 °C. Minėti 2 veiksniai naudoti atskirai, arba kartu. Atkartojant dažniausiai naudojimą HIPEC laiką, poveikis truko 1 val. Ląsteles veikiant tam tikru temperatūriniu režimu, pradžioje buvo matuojama ląstelių terpės temperatūra, pasiekus užsibrėžtą – pradėtas skaičiuoti eksperimento laikas. Praėjus valandai, ląstelių terpė pakeista nauja. Naudojant cisplatiną – keičiant terpę, papildomai 3 kartus lėkštelė buvo praplauta PBS tirpalu (Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV). Iš karto po eksperimento buvo matuojama viduląstelinė cisplatinos koncentracija. Praėjus 48 val. nuo eksperimento pradžios, atlikti MTT, apoptozės, energetikos ir *HO-1* raiškos tyrimai. *Antrojoje* eksperimento dalyje, pradžioje ląstelėms buvo inkorporuota *HO-1* tildanti RNR (siRNR), kitos buvo veiktos alavo protoporfirinu (SnPP).

Praėjus 72 val., veikta/neveikta cisplatinos IC₅₀ ir normotermija (37 °C) arba hipertermija (43 °C). Tuomet ląstelės kultivuotos dar 48 val. ir poveikio atsakas vertintas apoptozės, metabolinio aktyvumo, raiškos ir kvėpavimo greičio tyrimais.



Pav. 2.2.1. Tyrimų modelio grafinis vaizdavimas.

2.3 MTT

Ląstelių metabolinis aktyvumas buvo vertinamas MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-)-2,5-difeniltetrazolio bromidas) (Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV) metodika. Lėkštelės su paveiktomis ląstelėmis ir 5 mg/ml MTT buvo inkubuojamos 4 val. Vėliau terpė išsiurbta ir į šulinėlius įpilta DMSO (dimetilsulfoksidas) (Karl Roth GmbH; Karlsruhė; Vokietija), kuris ištirpino susidariusius formazano kristalus. Spalvos sugertis buvo matuojama 570 nm ir 650 nm bangos ilgyje. Tyrimui naudotas Sunrise spektrofotometras (Tecan Austria GmbH; Grodigas; Austrija). Rezultatai apdoroti MS Excel 365 programa (Microsoft; Redmondas; WA; JAV).

2.4 Izobologramos

Cisplatinos ir temperatūros bendro poveikio ląstelėms analizei buvo pasirinkta izobologramų metodika. Šiam tikslui buvo naudojami MTT

metabolinio aktyvumo duomenys, gauti veikiant 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, ir 45 °C temperatūroje, bei cisplatinos 25 µmol/L, 50 µmol/L, 100 µmol/L, 200 µmol/L, ir 400 µmol/L. Gautos nuo dozės priklausančios efektingos kreivės. Kombinuoto gydymo analizei buvo naudojama: 39 °C + 50 µmol/L; 39 °C + 100 µmol/L; 39 °C + 200 µmol/L; 40 °C + 50 µmol/L; 40 °C + 100 µmol/L; 40 °C + 200 µmol/L; 41 °C + 50 µmol/L; 41 °C + 100 µmol/L; 41 °C + 200 µmol/L; 42 °C + 50 µmol/L; 42 °C + 100 µmol/L; 42 °C + 200 µmol/L; 43 °C + 50 µmol/L; 43 °C + 100 µmol/L; 43 °C + 200 µmol/L; 44 °C + 50 µmol/L; 44 °C + 100 µmol/L ir 44 °C + 200 µmol/L. Duomenų analizei naudota Chou efekto medianos lygtis [172], rodanti kombinacinį 2 poveikių indeksą (CI). Šiam skaičiui esant <1 – poveikis vertinamas kaip sinergistinis; CI=1 – adityvus; >1 – antagonistinis. Skaičiavimams buvo pasitelkta CompuSyn programinė įranga (CompuSyn Inc; Panamusas; NJ; JAV).

2.5 Tėkmės citometrija

Apoptozės lygio pokytis buvo vertinamas tėkmės citometrijos metodika, praėjus 48 val., po cisplatinos ir hipertermijos poveikio. Ląstelės veiktos 2 ml 0,25 % tripsino (Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV) 37 °C ~ 7 min, kad jas atkelti nuo lėkštelių paviršiaus. Vėliau jos buvo praskiestos RPMI kultivavimo terpe. Analizei buvo naudojamas Guava Nexin Annexin V (Merck; Millipore; Burlingtonas; MA; JAV) gamykliškai paruoštas testo rinkinys, kurio pagrindiniai preparatai yra: Annexinas V-PE ir 7-aminoactinomycinas D. Priklausomai koku preparatu dažėsi ląstelės, buvo vertinama ar ji gyvybinga, ar ankstyvoje apoptozėje, ar vėlyvoje apoptozėje/nekrozėje. Visi tyrimo etapai atlikti pagal gamintojo nurodymus. Buvo naudojama Guava Personal Cell Analysis Flow Cytometer aparatinė įranga (Merck; Millipore; Burlingtonas; MA; JAV), bei to paties gamintojo CytoSoft programinė įranga (versija 2.1.4).

2.6 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

RNR buvo išgauta iš ląstelių naudojant PureLink® RNA Mini kit (Ambion; Austinas; TX; JAV), pagal gamintojo nurodymus. Šios RNR kiekis buvo išmatuotas naudojant UV spektrofotometriją (NanoDrop; Walthamas; MA; JAV). cDNR buvo paruošta naudojant 2 µg RNR, juos maišant su Super Script Vilo Master Mix tirpalu (Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV) pagal

gamintojo rekomendacijas. RNR amplifikacija atlikta 20 µl tūryje, naudojant 1 X Master Mix, pradmenis, bei 2 µg RNR šabloną. Pradinis kaitinimo etapas buvo vykdomas 95 °C, 10 min. Po to sekė denatūravimo etapas – 95 °C, 10 min. Grandinės ilginimo etapas truko 40 ciklų po 1 minutę, 72 °C. *HO-1* pradmenys buvo įsigyti iš Invitrogen (Karlsbadas; CA; JAV): *HO-1 fwd* - 5'-TGCTCAACATCCAGCTCTTTGAGGA-3' ir *HO-1 rev* - 5'-CAGGCAGAGAATGCTGAGTTC-3'. PGR produktų vizualizacijai buvo naudojamas 1,5 % agarozės gelis ir jo elektroforezė, veikiant 140 V, ~40 min. Etidžio bromidu nudažyti rezultatai veikti ultravioletine šviesa (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System; Bio-Rad Laboratories, Inc.; Herculesas; CA; JAV). Analizė atlikta to paties gamintojo, ImageLab programine įranga (versija 6.0.0).

2.7 Western blot

Paruošus ląstelių lizatus radioimunoprecipitacijos buferiu (Abcam; Kembridžas; JK), su proteazių inhibitoriais (Roche Diagnostics; Baselis; Šveicarija) bei naudojant baltymų kiekio nustatymo rinkinį (Thermo Fischer Scientific; Waltamas; MA; JAV), buvo nustatyta baltymų koncentracija. 50 µg, 5 min pašildytų 95 °C mėginių buvo perkelta į 4 % - 12 % SDS-PAGE gelį. Veikiant gelį 30 V 50 min., mėginiai perkelti ant polivinilideno fluorida membranos. Tuomet sumažinti nespecifiniam rezultatui, membranos veiktos blokavimo buferiu (WesternBreeze Blocker/Diluent; Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV) 1 val. kambario temperatūroje. Vėliau, 4 °C temperatūroje parą laiko veikti pirminiais antikūniais. *HO-1* antikūnis – anti *HO-1*, išgautas iš triušio (kat.nr. EP1391Y; 1:2000; Abcam; Kembridžas; JK), taip pat naudotas ir kontrolinis antikūnis – GAPDH, išgautas iš pelės (kat.nr. AM4300; Ambion; Austinas; TX; JAV). Toliau, mėginiai veikti 1 val. kambario temperatūroje antriniais antikūniais: prieš triušio antikūnius (kat.nr. WP20007; Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV), bei prieš pelės (kat.nr. WP20006 Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV). Vizualizuoti rezultatus, buvo naudojamas chemiliuminescuojantis substratas (CDP-Star; Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV) su ChemiDoc sistema (Bio-Rad Laboratories, Inc.; Herculesas; CA; JAV). ImageJ (versija 1.48; National Institutes of Health; Betezda; MD; JAV) programinė įranga buvo naudojama vaizdinį rezultatą paversti skaitiniu.

2.8 Viduląstelinė cisplatinos koncentracija

Iškart po cisplatinos/hipertermijos poveikio, buvo vertinama viduląstelinė cisplatinos koncentracija. Naudojant 2.7 skyriuje nurodytą metodiką, ląstelės buvo lizuotos, o lizatai praskiesti 10 kartų. Koncentracija buvo matuojama masės spektrometru (NexION™ 300D; Perkin Elmer; Waltham; MA; JAV), turinčiu nikelio kūgius ir kvarcinę cikloninę preparato purškimo kamerą. Norint pašalinti poliatominius trikdžius, naudotos 99,999 % Helio dujos. Kalibracinėms kreivėms gauti, buvo naudojamas Multi-Element calibration standart 4 (Perkin Elmer; Waltham; MA; JAV).

2.9 HO-1 raiškos slopinimas siRNA

72 val. prieš cisplatinos ir hipertermijos poveikį, HO-1 raiška buvo slopinama slopinančia siRNA, įsigyta iš Ambion (Austinas; TX; JAV), turinčią sekančią nukleotidų seką: 5'-UGAACACUCUGGAGAUGAC-3'. Kadangi buvo naudojama 30 nM HO-1 siRNA, toks pats kiekis panaudotas ir kontrolinės siRNA (AllStars NegativeControl; Qiagen; Hildenas; Vokietija), kurios nukleotidų seka - 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'. Siekiant siRNA patekti į ląstelės vidų, buvo didinamas membranos pralaidumas. Tam naudotas Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV) bei Opti-MEM™ terpė (Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV), pagal gamintojo rekomendacijas. Nutildymo efektyvumas vertintas Western blot metodika.

2.10 HO-1 funkcijos slopinimas alavo protoporfirinu (SnPP)

72 val. prieš HIPEC *in vitro* simuliaciją, ląstelės buvo veikiamos 20 nM SnPP. Praėjus valandai, terpė buvo nupilama. 3 kartus lėkštelė buvo praplauta PBS tirpalu (Invitrogen; Karlsbadas; CA; JAV) ir ląstelės buvo kultivuojamos normaliomis sąlygomis drėgname inkubatoriuje, palaikant 37 °C ir 5 % O₂, iki kito eksperimento etapo.

2.11 Mitochondrijų kvėpavimo greičio nustatymas

Analizuojant kvėpavimo greičio pokyčius ląstelėse, naudota Oxygraph-2k (Oroboros; Insbrukas; Austrija) poliarografinė sistema. Tyrimas vyko 37 °C, naudojant Klark O₂ elektrodą. Tyrimui naudota terpė sudaryta iš: 0,5 mmol/l EGTA, 3 mmol/l MgCl₂, 60 mmol/l K-laktobionato, 20 mmol/l taurino, 10 mmol/l KH₂PO₄, 20 mmol/l HEPES, 110 mmol/l sukrozės. Ląstelių

membranos pralaidumo didinimui buvo naudojama 8 µg/ml digitonino. Bazinis – mitochondrijų kvėpavimo greitis 2-oje metabolinėje būsenoje (V_0), buvo matuojamas terpėje, kartu su substratais 5 mmol/l glutamatu + 2 mmol/l malatu. V_{ADP} – trečioji metabolinė mitochondrijų būseną vertinti į terpę įterpant 1 mM ADP. V_0 – mitochondrijų kvėpavimo greitis 2-oje metabolinėje būsenoje, esant terpėje prisotintoje substrato ir deguonies, V_{ADP} – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje, maksimaliai aktyvuojant ADP priedu (1mmol/l ADP), esant substrato ir deguonies [173]. Duomenų vertinimui naudotas kvėpavimo kontrolės koeficientas (KKK). Jis apskaičiuojamas pagal formulę: $KKK = V_{ADP}/V_0$. Kuo KKK didesnis, tuo efektyvesnis kvėpavimas. Kuo šis koeficientas mažesnis, tuo didesni oksidacinio fosforilinimo sutrikimai mitochondrijose. Rezultatų apipavidalinimui pasitelkta Matlab 5 (Oroboros; Insbrukas; Austrija) programinė įranga. 1 mln ląstelių/ 2 ml terpės buvo naudojama kiekvienam kvėpavimo matavimui, o duomenys pateikti pmol/s/0,5mln ląstelių.

2.12 Statistinė analizė

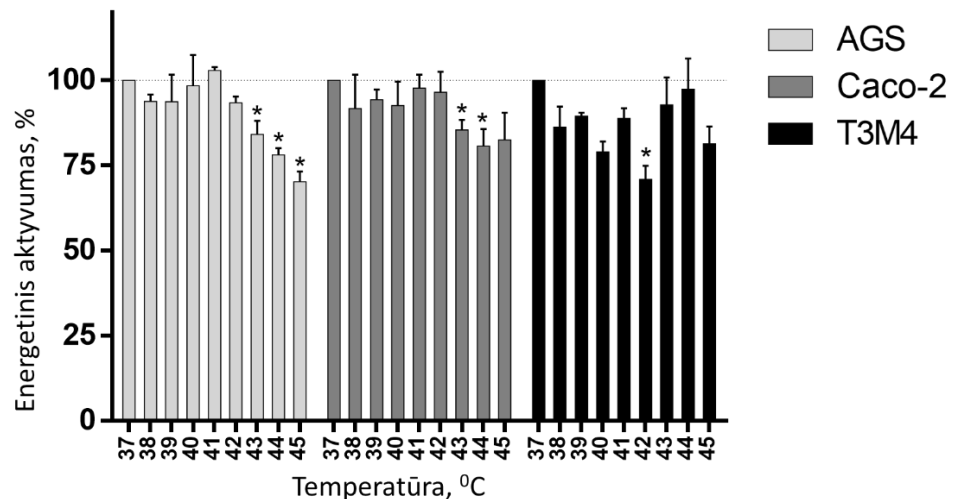
Statistinė SPSS (versija 21.0; IBM, Armonkas; NY; JAV) programa, bei grafinė - GraphPad (versija 6.01; GraphPad Software; La Jolla; CA; JAV) buvo pasitelktos duomenų vertinimui ir atvaizdavimui. Skirtumo tarp tiriamųjų grupių statistiniam patikimumui vertinti buvo pasirinkta Mann-Whitney ir One-Way ANOVA statistiniai testai. Grafikuose vaizduojama vidurkis ± standartinis nuokrypis iš 3 atskirų eksperimentų. $P < 0,05$ nustatyta kaip statistiškai patikima reikšmė.

3. REZULTATAI

3.1 Temperatūros ir cisplatinos poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui

3.1.1 Temperatūros poveikis tiriamosioms ląstelėms

AGS, Caco-2 ir T3M4 ląstelės buvo veikiamos atitinkama temperatūra, vieną valandą. Viena ląstelių grupė, kaip kontrolė buvo veikama 37 °C. Kitos ląstelių grupės veikiamos 38 °C, 39 °C, 45 °C. Skirtingos temperatūros poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui buvo vertinamas MTT tyrimu.



Pav. 3.1.1.1. Skirtingas ląstelių atsakas į temperatūrą

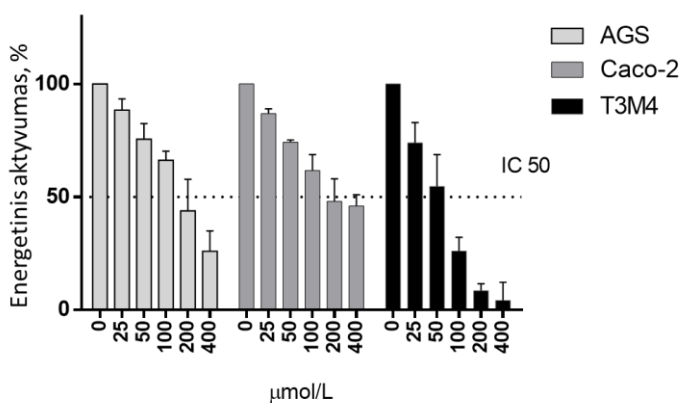
AGS ir Caco-2 ląstelių metabolinis aktyvumas mažėjo hipertermijos sąlygomis, tuo tarpu T3M4 – sumažėjo veikiant 42 °C, o veikiant aukštesnei temperatūrai, buvo panašus į kontrolės. Metabolinio aktyvumo duomenys prilyginti atitinkamos ląstelių linijos kontrolinės grupės aktyvumui (37 °C) – 100%. * - $p < 0,05$.

Visos ląstelių linijos į temperatūrą reagavo skirtingai. Jautriausios hipertermijai buvo AGS ląstelės. Jos į temperatūros kilimą reagavo adekvačiai. Kylant temperatūrai nuo 37 °C iki 41 °C aktyvumas nekito. Nuo 41 °C iki 45 °C, jų metabolinis aktyvumas sumažėjo 30 %. Lyginant su kontrole (37 °C), 43 °C sumažino aktyvumą 16 %, 44 °C - 22 %, 45 °C - 30 % ($p < 0,05$). Caco-2 ląstelių metabolinis aktyvumas nekito temperatūros intervale nuo 37 °C iki 42 °C. Veikiant ląsteles 43 °C ir 44 °C, jų aktyvumas sumažėjimo atitinkamai 15 % ir 20 % ($p < 0,05$). 45 °C temperatūra taip pat

mažino ląstelių metabolinį aktyvumą, tačiau statistiškai reikšmingo pokyčio nenustatyta. T3M4 ląstelėms temperatūra aiškaus poveikio nedarė ir aktyvumas nekito. Išsiskyrė tik 42 °C, kur statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo metabolinis aktyvumas 30 %. Tačiau veikiant aukštesne temperatūra, ląstelių aktyvumas vėl buvo panašus į kontrolinės grupės (Pav. 3.1.1.1.). Didinant temperatūrą atitinkamai mažėjo metabolinis aktyvumas AGS ląstelėse. Caco-2 - aktyvumas sumažėjo tik veikiant 43 °C ir 44 °C, o T3M4 - 42 °C. Veikiant aukštesnėmis temperatūromis Caco-2 ir T3M4 ląstelės, metabolinis aktyvumas buvo panašus į kontrolinių grupių.

3.1.2 Cisplatinos poveikis vėžinėms ląstelėms

Virškinimo sistemos vėžinės ląstelės buvo veiktos cisplatina ir tirtas jų metabolinis aktyvumas MTT metodika (Pav. 3.1.2.1.). Nustatyta kiekvienai ląstelių linijai cisplatinos IC₅₀ dozė, t.y. preparato kiekis, kurio užtenka sumažinti ląstelių metabolinį aktyvumą 50 %. Visų ląstelių aktyvumas mažėjo, tačiau jam sumažinti reikalinga skirtingu preparato dozių. Skrandžio vėžinėms ląstelėms cisplatinos IC₅₀ – 182 μmol/l, storosios žarnos – 194 μmol/l ir kasos – 48 μmol/l.



Pav. 3.1.2.1. Ląstelės skirtingai reaguoja į cisplatiną.

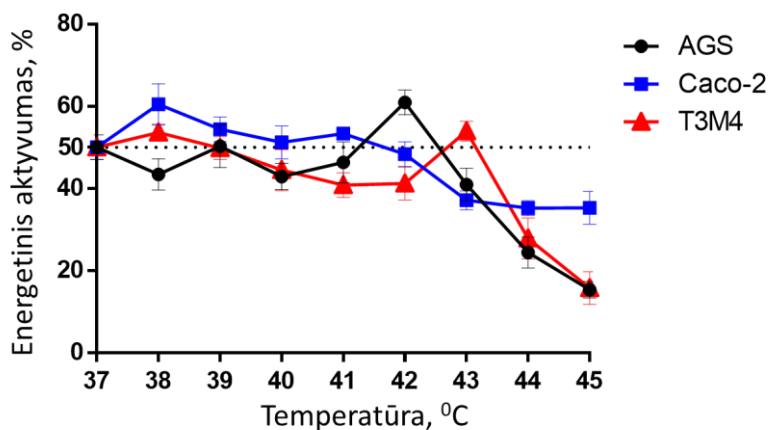
T3M4 – jautriausiai reaguoja į cisplatinos poveikį. Metabolinio aktyvumo duomenys prilyginti atitinkamos ląstelių linijos kontrolinei grupei (neveikiant cisplatina). Punktyrinė linija atitinka IC₅₀.

Vertinant gautus rezultatus, T3M4 ląstelės buvo jautriausios cisplatinos poveikiui. Mažiausiai jautrios – Caco-2. Remiantis šiuo tyrimu buvo

pasirinktos atitinkamos IC₅₀ cisplatinos koncentracijos kiekvienai ląstelių linijai ir naudotos tolimesniuose tyrimų etapuose.

3.1.3 Kombinuotas temperatūros ir cisplatinos poveikis

Imituojant *in vitro* hiperterminės intraperitoninės chemoperfuzijos sąlygas, ląstelės buvo veiktos tiek skirtingomis temperatūromis, tiek specifine cisplatinos IC₅₀ koncentracija. Tyrimas atliktas naudojant MTT metodiką. Šiuo eksperimentu norėta išsiaiškinti kaip temperatūra, keičia cisplatinos citotoksiškumą, kuris vertintas per ląstelių metabolinį aktyvumą.



Pav. 3.1.3.1. Cisplatinos ir temperatūros poveikio kombinacija išskiria 2 ląstelių grupes.

AGS ir T3M4 ląstelės veikiamos cisplatinos IC₅₀ veikiant tam tikrais temperatūriniais režimais gali būti suaktyvintos, didėjant jų metaboliniam aktyvumui. Aktyvumo duomenys prilyginti atitinkamos ląstelių linijos kontrolinei grupei (veikiant cisplatina 37°C).

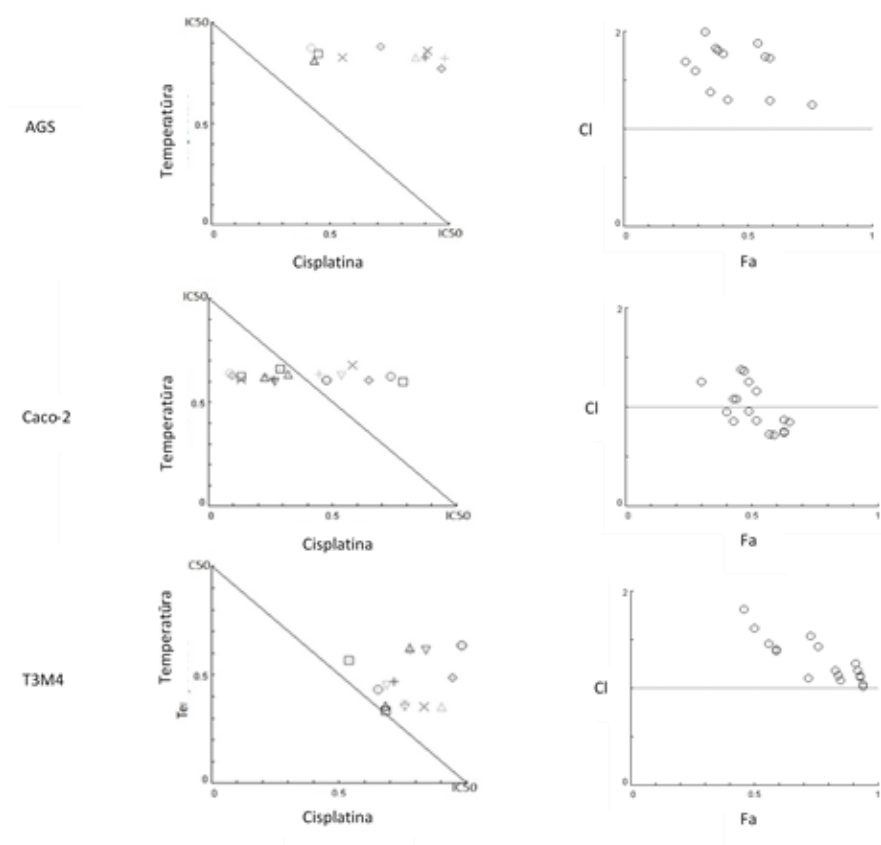
Punktyrinė linija atitinka IC₅₀ metabolinį aktyvumą.

Temperatūriniai režimai nuo 37 °C iki 41 °C neturėjo jokios įtakos cisplatinos poveikiui. Keista, tačiau ties tam tikra temperatūra, buvo stebėtas metabolinio aktyvumo padidėjimas lyginant su ląstelėmis veiktomis cisplatina 37 °C. 42 °C didino cisplatina veiktų AGS ląstelių aktyvumą 33 %. T3M4 aktyvumas padidėjo 32 % veikiant 43 °C. Vertinant aukštesnės nei 43 °C poveikį, buvo stebimas jo mažėjimas AGS ir T3M4 ląstelių linijose, tačiau jis nekito Caco-2. Čia 43 °C - 45 °C intervale metabolinis aktyvumas, lyginant su kontrole buvo sumažėjęs 30 %. Tuo tarpu veikiant cisplatina AGS ir T3M4 ląsteles ir 45 °C, aktyvumas sumažėjo atitinkamai 70 % ir 76 %. Apibendrinant

rezultatus galima išskirti 2 temperatūros poveikio grupes: I – Caco-2, kuomet kylant temperatūrai, palaipsniui krenta cisplatina veiktų ląstelių metabolinis aktyvumas; II – AGS ir T3M4, kuomet veikiant tam tikrais temperatūriniais režimais aktyvumas gali padidėti (Pav. 3.1.3.1.). Panašu, kad veikiant hipertermine intraperitonine chemoterapija navikines ląsteles, kuomet tam tikra temperatūra gali padidinti aktyvumą, būtina atsižvelgti į temperatūrinį režimą, nes galima sulaukti priešingo rezultato nei tikėtasi.

3.1.4 Kombinuoto temperatūros ir cisplatinos poveikio matematinė analizė: sinergija ar antagonizmas?

Įvertinti bendrą cisplatinos ir temperatūros poveikį ląstelėms, buvo pasirinkta izobologramų matematinė skaičiavimo metodika. Analizė atlikta naudojant metabolinio aktyvumo duomenis. Nustatyta, kad visos tirtos temperatūros ir cisplatinos koncentracijos veikia antagonistiskai AGS ląsteles. Caco-2 ląstelėms kombinuotas poveikis buvo trejopas: sinergistinis (40 °C su 50 µmol/L ir 100 µmol/L cisplatinos; 43 °C su 50 µmol/L, 100 µmol/L, ir 200 µmol/L cisplatinos; 44 °C su 50 µmol/L, 100 µmol/L, ir 200 µmol/L cisplatinos); adityvus (39 °C su 100 µmol/L cisplatinos; 41 °C su 100 µmol/L cisplatinos ir 42 °C su 50 µmol/L ir 100 µmol/L cisplatinos); bei antagonistinis (39 °C su 200 µmol/L cisplatinos; 40 °C su 200 µmol/L cisplatinos, 41 °C su 50 µmol/L ir 200 µmol/L cisplatinos; 42 °C su 200 µmol/L cisplatinos). T3M4 ląstelėms buvo nustatytas adityvus (41 °C su 200 µmol/L cisplatinos, 42 °C su 50 µmol/L cisplatinos, 44 °C su 100 µmol/L ir 200 µmol/L cisplatinos) ir antagonistinis (visos kitos tirtos temperatūros ir cisplatinos kombinacijos) poveikis (Pav. 3.1.4.1.).



Pav. 3.1.4.1. Izobologramos. Trilypis cisplatinos ir temperatūros poveikis.

Linijos, jungiančios trikampiuose esančius IC_{50} taškus, bei diagramose esančiose dešinėje atspindi kombinacijos indeksą ($CI = 1$). Visi taškai, kurie yra žemiau linijos – rodo kombinacinio poveikio synergizmą, ant linijos – adityvumą, virš linijos – antagonizmą.

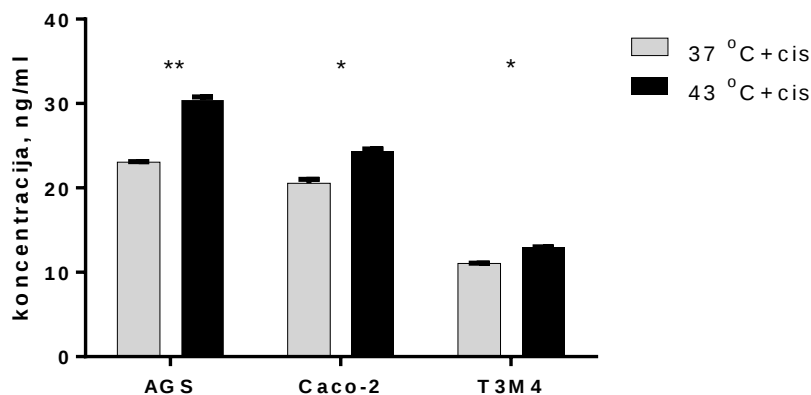
Taškai, esantys labai nutolę nuo linijos (antagonizmas) grafike nerodomi. Naudojami matematiškai apskaičiuoti IC_{50} : AGS - 51 °C su 159 $\mu\text{mol/L}$ cisplatinos; Caco-2 – 66 °C su 328 $\mu\text{mol/L}$; T3M4 – 61 °C su 0 $\mu\text{mol/L}$.

Apibendrinant, matematinė kombinuoto poveikio analizė parodė synergistinę ryšį tik Caco-2 ląstelėse, o adityvų Caco-2 ir T3M4. Skrandžio vėžio ląstelėms poveikis buvo tik antagonistinis.

3.2 Viduląstelinės cisplatinos koncentracijos pokyčiai

Veikiant atitinkama ląstelių linijai cisplatinos IC_{50} , tirta koks chemopreparato kiekis patenka į ląstelės vidų. Analizuoti duomenys tiek normotermijos tiek hipertermijos sąlygomis (Pav. 3.2.1.). Didžiausia

cisplatinos koncentracija rasta AGS ląstelėse – 23 ng/ml, mažiausia T3M4– 11 ng/ml. Tuo tarpu Caco-2– 20 ng/ml. Hipertermija esamą koncentraciją patikimai didino: AGS – 30 % ($p<0.01$); Caco-2 – 20 % ($p<0.05$) ir T3M4 – 18 % ($p<0.05$).



Pav. 3.2.1. Hipertermijos įtaka viduląstelinei cisplatinos koncentracijai.

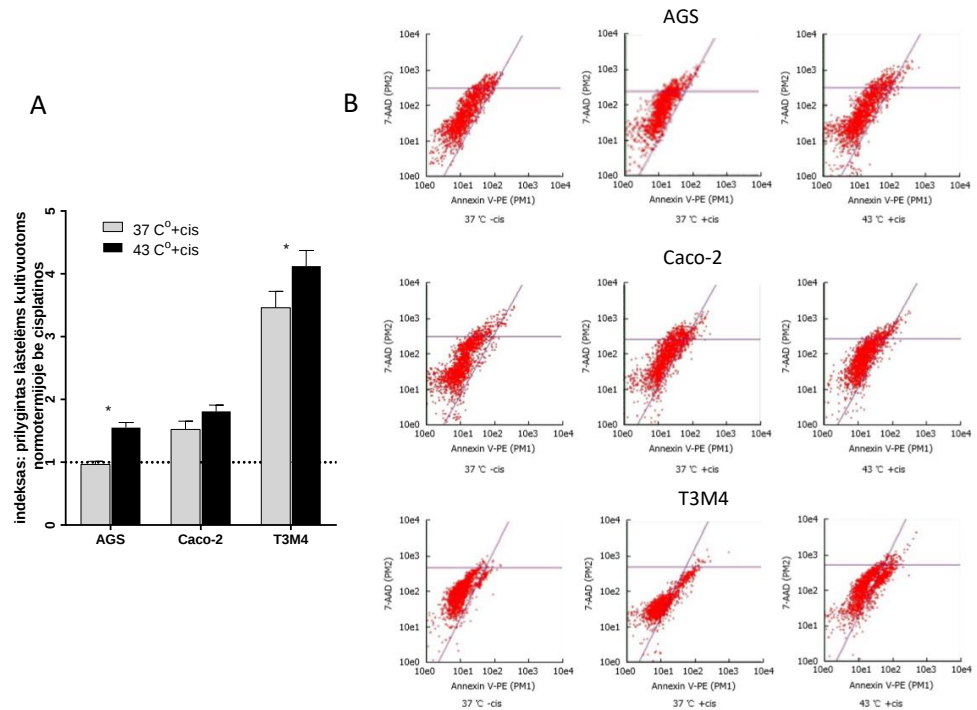
Cisplatinos koncentracija demonstruojama ng/ml vienetais. Mann-Whitney testas naudotas rasti statistškai reikšmingus skirtumus tarp grupių, kur * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$. „+cis“ – cisplatina veiktos ląstelės; „-cis“ – neveiktos.

3.3 Cisplatinos ir temperatūros įtaka vėžinių ląstelių apoptozei ir viduląsteliniam kvėpavimui

3.3.1 Kombinuoto cisplatinos ir temperatūros poveikio įtaka apoptozei

Hipertermijos poveikio į cisplatinos citotoksiškumą analizei taip pat buvo pasitelkta tėkmės citometrijos metodika, matuojant ankstyvą, vėlyvą apoptozę ir žuvusias ląsteles (Pav. 3.3.1.1.). Daugiausiai dėmesio skirta ankstyvai apoptozei, nes šis tyrimas buvo atliekamas 48 val. po eksperimento. Įvertinus prieš tai atliktų tyrimų rezultatus, pasirinkta optimaliausia veikianti temperatūra – 43 °C (hipertermija). Cisplatina sąlygojo apoptozės padidėjimą Caco-2 ir T3M4 ląstelėse atitinkamai 1,5 ir 3,4 karto ($p<0,05$). Tuo tarpu vėlyvos apoptozės/negyvybingų ląstelių nustatyta atitinkamai 0,5 % ir 2,9 %. Lyginant hipertermijos (43 °C) poveikį, cisplatina veiktoms ląstelėms su kontroline grupe (veiktos cisplatina normotermijoje – 37 °C), nustatyta, kad hipertermija paskatino apoptozę 20 % (1% vėlyvos apoptozės/žuvusių ląstelių) Caco-2 ir 19 % (3,9 % vėlyvos apoptozės/žuvusių ląstelių) T3M4

($p < 0,05$). Vien tik cisplatina AGS ląstelių apoptozės normotermijoje neįtakojo, kuri buvo panaši į kontrolinės grupės (ląstelių neveiktų cisplatina ir kultivuotų normotermijoje). Tačiau hipertermija ženkliai paskatino ankstyvą apoptozę AGS, ją padidindama 61 % (0,4 % vėlyvos apoptozės/žuvusių ląstelių) ($p < 0,05$).



Pav. 3.3.1.1. Hipertermijos įtaka ankstyvai apoptozei.

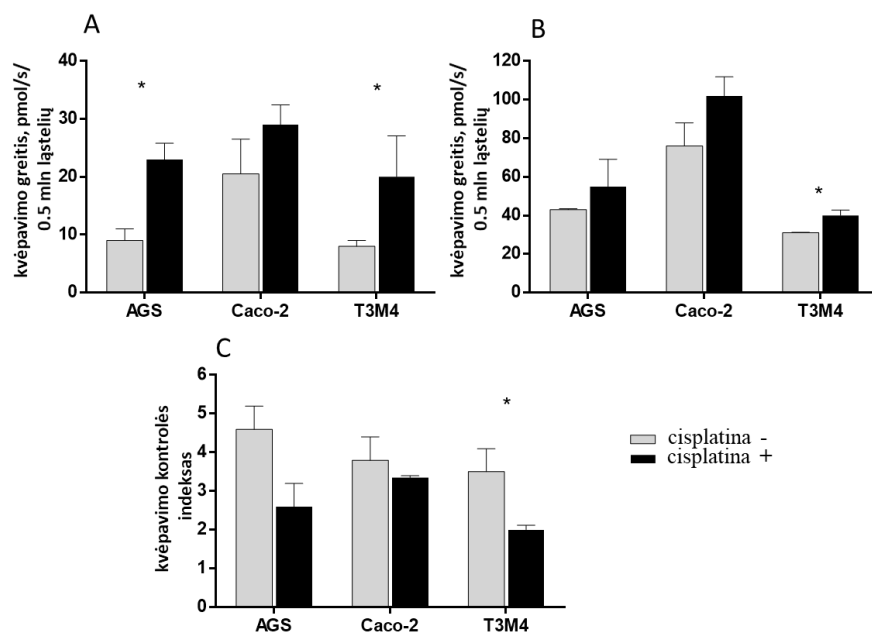
Hipertermija įtakojo ankstyvą apoptozę AGS ir T3M4 ląstelėse, Caco-2 – įtakos neturėjo. A – punktyrinė linija rodo kontrolinės grupės (normotermijoje be cisplatinos kultivuotų ląstelių) ankstyvos apoptozės lygį, pagal kurį rodomi duomenys grafike. Mann-Whitney testas naudotas rasti statistiškai reikšmingus pokyčius tarp grupių, kur * - $p < 0,05$.

B – Apoptozės duomenys pavaizduoti taškiniame grafike. „+cis“ – cisplatina veiktos ląstelės; „-cis“ – neveiktos.

Apoptozės analizė išryškino T3M4 ląsteles, kaip labiausiai jautrias hipertermijos sąlygotam cisplatinos citotoksiškumui. Skrandžio vėžio ląstelėms hipertermija taip pat didino cisplatinos citotoksiškumą, o Caco-2 poveikio nebuvo.

3.3.2 Cisplatinos poveikis ląstelių kvėpavimo greičiui

Atlikus įvadinę temperatūros ir cisplatinos poveikio ląstelių metaboliniam aktyvumui analizę, tirta kaip cisplatina ir temperatūra veikia viduląstelinį kvėpavimą (deguonies sunaudojimą mitochondrijose). Šiam tikslui naudotas glutamatas/malatas kaip kvėpavimo substratai. Vertinant mitochondrijų kvėpavimo greitį 2-ojoje metabolinėje būsenoje – V_0), nustatyta kad cisplatina jį patikimai reikšmingai didino AGS ir T3M4, atitinkamai 2,44 ir 2,34 karto ($p < 0,05$). Caco-2 greitis taip pat didėjo 1,42 karto, tik statistškai nereikšmingai (Pav. 3.3.2.1.A.). Vertinant mitochondrijų kvėpavimo greitį 3-ojoje kvėpavimo būsenoje - V_{ADP} , stebėtas jos padidėjimas su T3M4 – 37 % ($p < 0,05$). AGS ir Caco-2 kvėpavimo greitis augo 34 % ir 35 %, tačiau šis pokytis nebuvo statistškai patikimas (Pav. 3.3.2.1.B.). Kvėpavimo kontrolės indeksas (Pav. 3.3.2.1.C.) AGS, Caco-2 ir T3M4 ląstelėse mažėjo atitinkamai 44 %, 16 % ir 40 % ($p < 0,05$).



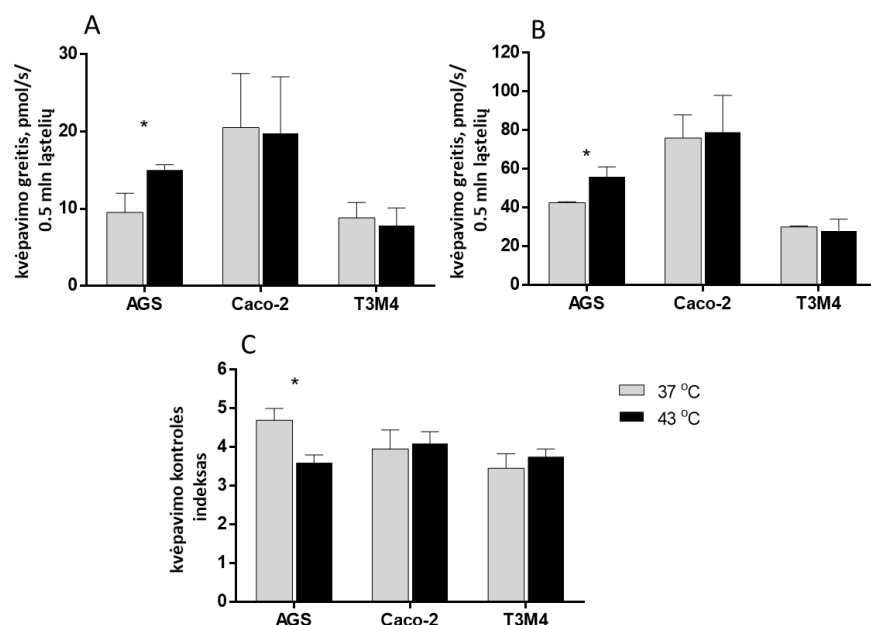
Pav. 3.3.2.1. Cisplatinos poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiui.

Glutamatas/malatas naudoti kaip substratai. A – mitochondrijų kvėpavimo greitis 2-oje metabolinėje būsenoje – V_0 . B – mitochondrijų kvėpavimo greitis 3-oje metabolinėje būsenoje, pridėjus 1mM ADP - V_{ADP} . C – kvėpavimo kontrolės indeksas, apskaičiuojamas: V_{ADP}/V_0 . * - $p < 0,05$ patikimas pokytis tarp kontrolės ir atitinkamos cisplatinos veiktos ląstelių grupės.

Apibendrinant cisplatinos poveikio mitochondrijų kvėpavimo greičiui, tik T3M4 ląstelėse chemopreparatas reikšmingai jį didino II ir III metabolinėje būsenoje.

3.3.3 Temperatūros įtaka ląstelių kvėpavimo greičiui

Hipertermija (43 °C) nekeitė mitochondrijų kvėpavimo greičio nei antoje, nei trečioje metabolinėse būsenose Caco-2 ir T3M4 ląstelėse (Pav. 3.3.3.1.A.; Pav. 3.3.3.1.B.), atitinkamai nepakito ir kvėpavimo kontrolės indeksas (Pav. 3.3.3.1.C.). Tuo tarpu AGS mitochondrijų kvėpavimo greitis V_0 padidėjo 1,64 karto ($p < 0,05$). Hipertermija didino ir kvėpavimo greitį trečioje metabolinėje būsenoje (V_{ADP}) 30 % ($p < 0,05$). Atitinkamai, 27 % sumažėjo kvėpavimo kontrolės indeksas ($p < 0,05$).



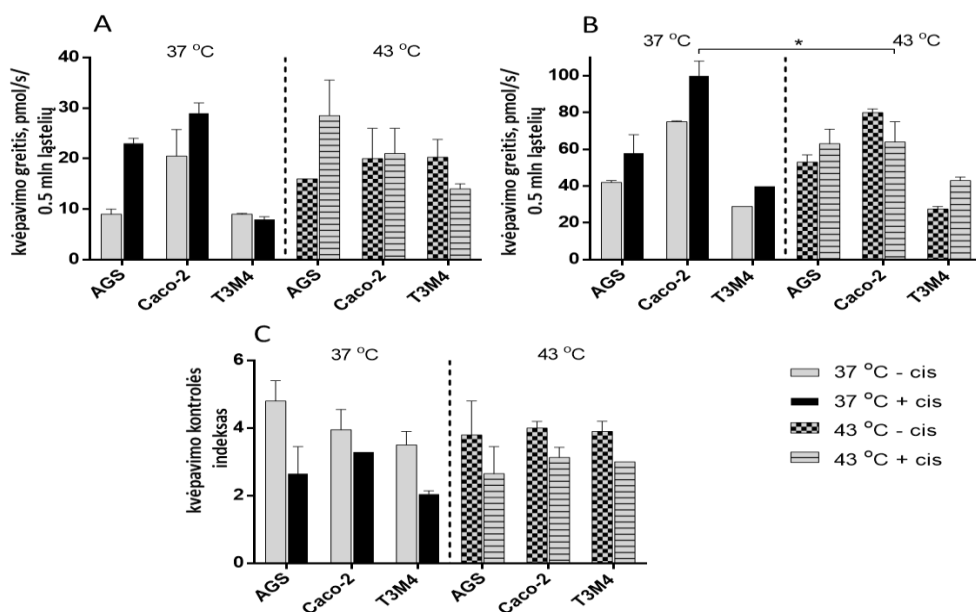
Pav. 3.3.3.1. Temperatūros poveikis mitochondrijų kvėpavimo greičiui.

Glutamatas/malatas naudoti kaip substratai. A – mitochondrijų kvėpavimo greitis 2-oje metabolinėje būsenoje – V_0 . B – mitochondrijų kvėpavimo greitis 3-oje metabolinėje būsenoje, pridėjus 1mM ADP – V_{ADP} . C – kvėpavimo kontrolės indeksas, apskaičiuojamas: V_{ADP}/V_0 . * - $p < 0,05$ patikimas pokytis tarp kontrolės ir atitinkamos temperatūra veiktos ląstelių grupės.

AGS ląstelėse hipertermija patikimai didino mitochondrijų kvėpavimo greitį tiek II, tiek ir III metabolinėse būsenose. Nei Caco-2 nei T3M4 – poveikio nebuvo.

3.3.4 Kombinuoto temperatūros ir cisplatinos poveikio įtaka ląstelių kvėpavimo greičiui

Kvėpavimo greitis vertintas ne tik atskirai veikiant cisplatina ar hipertermija, tačiau ir kombinuotai – veikiant kartu. Nepastebėta jokio pokyčio AGS ir T3M4 ląstelėse (Pav. 3.3.4.1.A.; Pav. 3.3.4.1.B.; Pav. 3.3.4.1.C.). Cisplatina veikiant Caco-2 ląsteles hipertermijoje, kvėpavimo greitis sumažėjo 36 % trečioje metabolinėje būsenoje ($p < 0,05$). Nei antroje metabolinėje būsenoje, nei kvėpavimo kontrolės indekso statistiškai reikšmingų pokyčių nebuvo nustatyta.



Pav. 3.3.4.1. Mitochondrijų kvėpavimo greičio analizė veikiant temperatūra ir cisplatina.

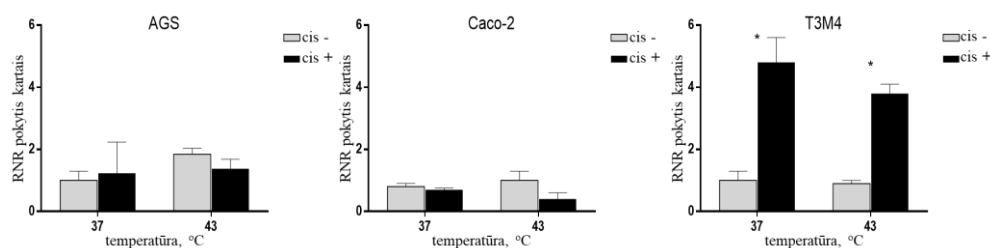
Glutamas/malatas naudoti kaip substratai. A – mitochondrijų kvėpavimo greitis 2-oje metabolinėje būsenoje – V_0 . B – mitochondrijų kvėpavimo greitis 3-oje metabolinėje būsenoje, pridėjus 1mM ADP - V_{ADP} . C – kvėpavimo kontrolės indeksas, apskaičiuojamas: V_{ADP}/V_0 . * - $p < 0,05$ patikimas pokytis tarp kontrolės ir atitinkamos temperatūra veiktos ląstelių grupės. Punktyrine linija atskirtos skirtinga temperatūra veiktos ląstelės. „+cis“ – cisplatina veiktos ląstelės; „-cis“ – neveiktos.

Hipertermija didinant cisplatinos citotoksiškumą, nestebėta jokių reikšmingų viduląstelinio kvėpavimo pokyčių, vertinant kartu II ir III metabolinę būseną.

3.4 *HO-1* moduliacijos įtaka ląstelėms

3.4.1 *HO-1* raiška

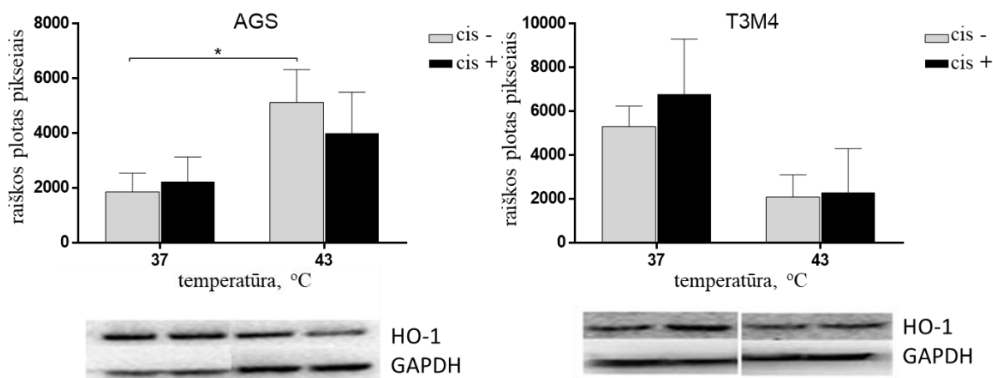
HO-1 raiška buvo vertinta PGR metodika. Nustatyta, kad storosios žarnos vėžio ląstelėse nei temperatūra, nei cisplatinos poveikis neturėjo jokios įtakos *HO-1* geno pokyčiams. Todėl tolimesniuose tyrimuose, susijusiuose su *HO-1* šios ląstelių linijos buvo atsisakyta (Pav. 3.4.1.1.). Skrandžio vėžio (AGS) ląstelėse buvo stebima, jog hipertermija padidina *HO-1* ekspresiją, nors ir statistiškai nereikšmingai. Didžiausias *HO-1* raiškos pokytis buvo stebimas T3M4. Tačiau, šį pokytį lėmė cisplatinos poveikis, bet ne hipertermija. Cisplatina *HO-1* ekspresiją padidino 4,8 karto normotermijos ir 3,8 karto hipertermijos sąlygomis ($p < 0,05$).



Pav. 3.4.1.1. *HO-1* RNR ekspresija, veikiant ląsteles cisplatina ir hipertermija.

Temperatūros ar cisplatinos poveikis stebimas tik AGS ir T3M4 ląstelėse. * - $p < 0,05$ patikimas pokytis tarp toje pačioje temperatūroje veiktų/neveiktų cisplatina grupių. „+cis“ – cisplatina veiktos ląstelės; „-cis“ – neveiktos.

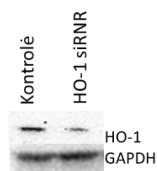
HO-1 baltymo raiškos tyrime naudojome tik AGS ir T3M4 ląsteles (Pav. 3.4.1.2.). Nustatyta, kad vien tik hipertermija veikiant skrandžio vėžio ląsteles *HO-1* baltymo raiška padidėjo 2,75 karto ($p < 0,05$). Vien tik cisplatinos poveikis normotermijos sąlygomis raišką didino 1.2 karto, tačiau tai nebuvo statistiškai patikima. Hipertermijos sąlygomis cisplatina paveiktų AGS ląstelių raiška buvo mažesnė 8 %, tačiau tai nebuvo statistiškai reikšmingas rezultatas. T3M4 ląstelėse *HO-1* baltymo raiškos rezultatai buvo kitokie negu RNR. Cisplatina neveikė nei normotermijoje nei hipertermijoje, o aukšta temperatūra turėjo tendenciją mažinti *HO-1* baltymo kiekį.



Pav. 3.4.1.2. *HO-1* baltymo ekspresija, ląsteles veikiant cisplatina ir hipertermija.

Temperatūra įtakoja *HO-1* baltymo raišką tik AGS ląstelėse. Grafikuose pavaizduotas Western blot rezultatų kiekybinis vertinimas ImageJ programa. * - $p < 0,05$ patikimas pokytis tarp grupių. „+cis“ – cisplatina veiktos ląstelės; „-cis“ – neveiktos. Apačioje pateikslo grafinis Western blot rezultatų atvaizdavimas. GAPDH – kontrolinis baltymas.

RNR ir baltymų ekspresija tarp tų pačių ląstelių linijų išsiskyrė. *HO-1* baltymas – kaip funkcinė medžiaga, kurios gamybai reikalinga RNR. Fiksuojant tik *HO-1* baltymų kiekio pokyčius, kuriuos įtakoja hipertermija, ir nenustatant panašaus *HO-1* RNR kiekio kitimo, galima daryti prielaidą, kad ne visas *HO-1* RNR kiekis nustatomas PGR metodika. Todėl remtasi baltymų ekspresijos duomenimis ir tolimesnei *HO-1* funkcijos ląstelėse analizei nuspręsta naudoti skrandžio vėžio ląstelių liniją – AGS.



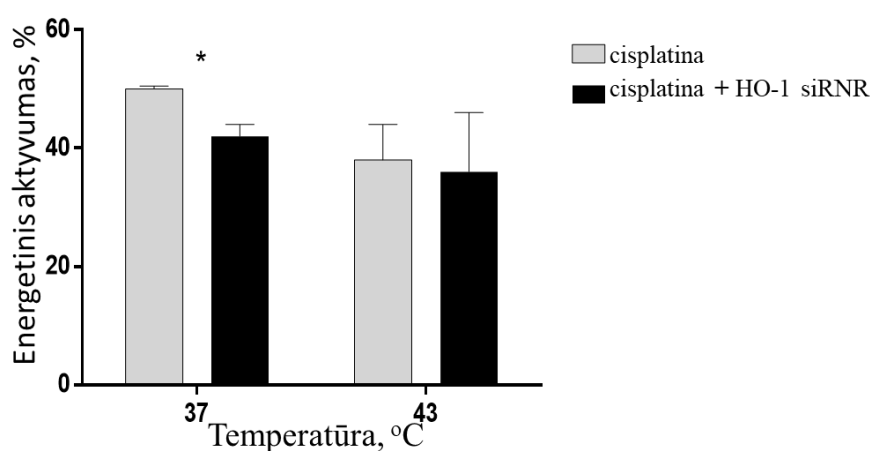
Pav. 3.4.1.3. *HO-1* geno slopinimas siRNR.

HO-1 tildanti RNR užslopina baltymo ekspresiją. GAPDH – kontrolinis baltymas.

Tolimesniuose tyrimuose, planuojant slopinti citoprotekcinio geno raišką, tirta *HO-1* geną slopinanti RNR (siRNR). Kadangi ją paveikus AGS ląsteles, buvo stebimas *HO-1* baltymo kiekio sumažėjimas, lyginant su kontrole (Pav. 3.4.1.3.), nuspręsta, kad ši siRNR yra veiksminga ir ją galima moduluoti ląsteles.

3.4.2 Slopinant *HO-1* mažėja AGS metabolinis aktyvumas

Užslopinus *HO-1* raišką, bei veikiant ląsteles hipertermija ir cisplatina buvo tirtas AGS metabolinis aktyvumas MTT metodika (Pav. 3.4.2.1.). Nustatyta, kad normotermijos sąlygomis aktyvumas sumažėjo 16 % ($p < 0,05$). Veikiant 43 °C, metabolinis aktyvumas buvo mažesnis nei kontrolinėje grupėje (veikiant tik cisplatina normotermijoje), tačiau statistškai reikšmingo pokyčio nebuvo.



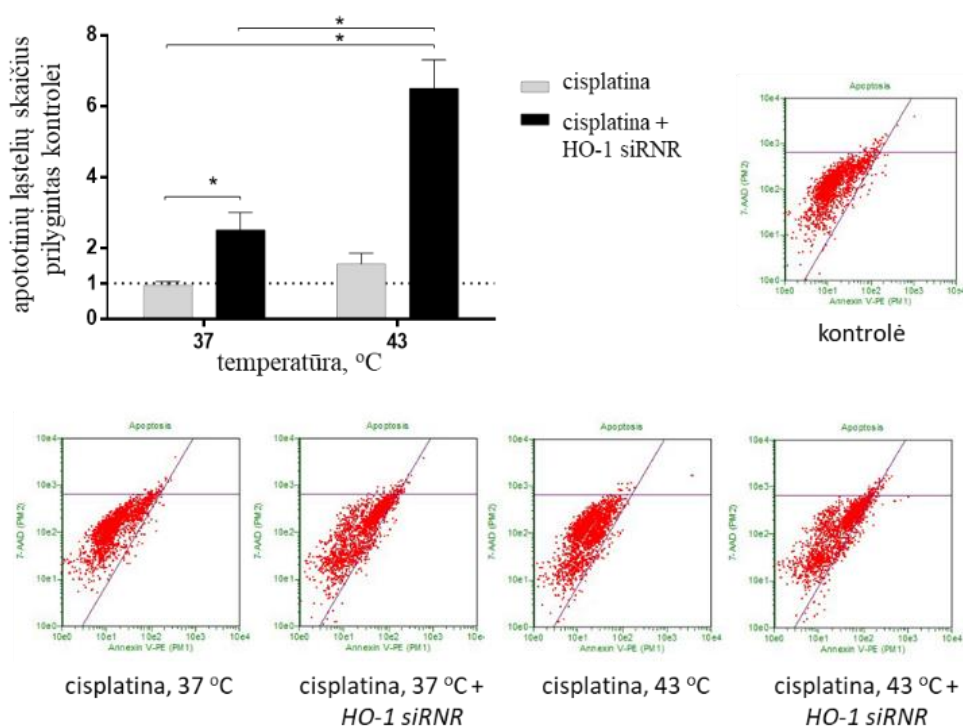
Pav. 3.4.2.1. AGS metabolinis aktyvumas, slopinant *HO-1* raišką.

HO-1 slopinimas normotermijoje sumažino metabolinį aktyvumą. * - $p < 0,05$ patikimas pokytis tarp normotermijoje veiktų grupių.

HO-1 slopinimas AGS ląstelių metabolinį aktyvumą mažina tik normotermijos sąlygomis.

3.4.3 *HO-1* slopinimas skatina apoptozę, tačiau neveikia viduląstelinio kvėpavimo

Tėkmės citometrijos pagalba buvo tirta *HO-1* įtaka AGS apoptozei (Pav. 3.4.3.1.). Slopinant *HO-1* normotermijoje ir veikiant cisplatina, ankstyva apoptozė padidėjo 2,63 karto ($p < 0,05$). Hipertermijoje šis pokytis buvo dar ryškesnis – 4,19 karto ($p < 0,05$). Lyginant apoptozę, cisplatina ir *HO-1* siRNR veiktų ląstelių normotermijoje su veiktų hipertermijoje, stebima, kad pastarojoje ankstyva apoptozė buvo 2,6 karto didesnė.

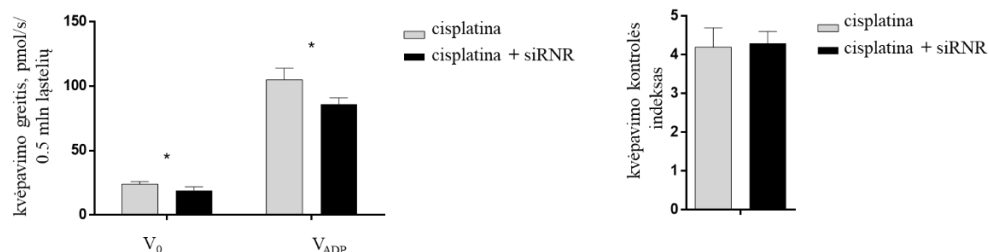


Pav. 3.4.3.1. Ankstyvos apoptozės pokyčiai, slopinant *HO-1* raišką.

HO-1 slopinimas didina AGS apoptozę. Duomenys grafike prilyginti kontrolei (ląstelėms kultivuotoms normotermijoje be cisplatinos ir siRNR). Vertikali punktyrinė linija rodo kontrolinės grupės apoptozę. * - $p < 0,05$ statistiškai patikimas pokytis tarp grupių, nurodytų linijomis. Taškinės grafos vizualiai atspindi lentelėje pateiktus duomenis.

Jeigu vertintume ląstelių žūties pokyčius tarp kontrolės (normotermijoje kultuotų ląstelių, be cisplatinos ir *HO-1* slopinimo) ir ląstelių veiktų hipertermija, cisplatina ir slopinant *HO-1* raišką, gautume 6,5 karto geresnį rezultatą ($p < 0,05$). Vertinant energetinius pokyčius, slopinant *HO-1*

ekspresiją, mitochondrijų kvėpavimo greitis mažėjo 2-oje metabolinėje būsenoje 21 % ($p < 0,05$), o 3-oje - 19 % ($p < 0,05$). Kvėpavimo kontrolės indeksas išliko panašus abiejose grupėse, dėl panašaus greičio kitimo abiejose metabolinėse būsenose (Pav. 3.4.3.2.).



Pav. 3.4.3.2. HO-1 slopinimas ir kvėpavimo greitis.

Mitochondrijų kvėpavimo greitis 2-oje metabolinėje būsenoje – V_0 . Mitochondrijų kvėpavimo greitis 3-oje metabolinėje būsenoje, pridėjus 1mM ADP - V_{ADP} .

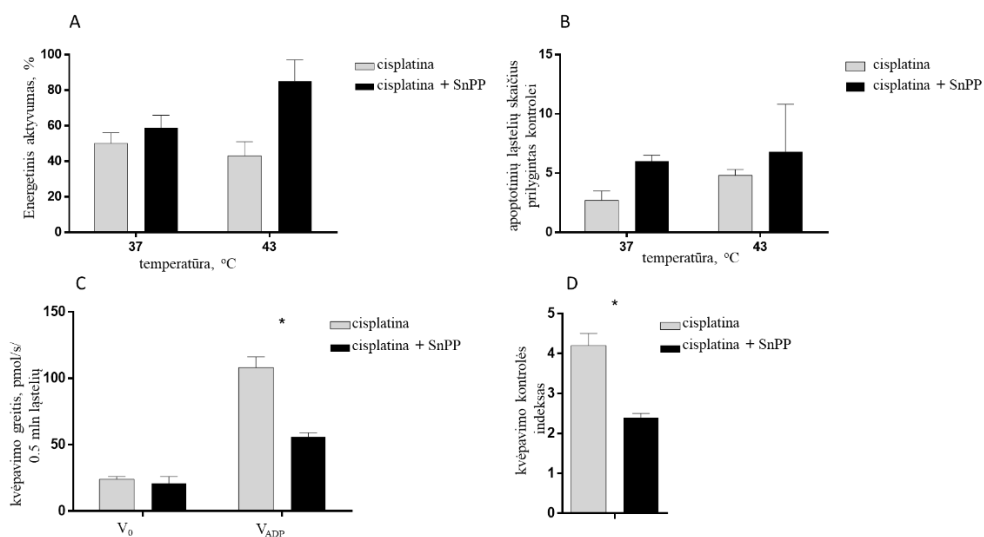
Veikiant AGS ląsteles cisplatina ir slopinant HO-1 ekspresiją didėja apoptozės lygis, kurį dar padidina hipertermija. HO-1 slopinimas mažina mitochondrijų kvėpavimo greitį.

3.4.4 Alavo protoporfirino (SnPP) poveikis AGS ląstelėms

Žinant, kad Alavo protoporfirinas (SnPP) slopina HO-1 citoprotekcinę funkciją [174], AGS ląstelės veiktos 20 μ M šios medžiagos, hiperterminės intraperitoninės chemoterapijos sąlygomis (Pav. 3.4.4.1.A.). Jokių pokyčių veikiant cisplatina ir SnPP normotermijoje nenustatyta, tačiau hipertermijoje, AGS metabolinis aktyvumas padidėjo 1,7 karto, bet šis rezultatas nebuvo statistiškai patikimas. SnPP taip pat turėjo tendenciją didinti ir apoptotinių ląstelių aktyvumą, tačiau rezultatuose statistiškai reikšmingų pokyčių nebuvo nustatyta (Pav. 3.4.4.1.B.).

Tiriant SnPP įtakojamus pokyčius buvo nustatyta, kad slopinant HO-1 funkciją, sumažėjo kvėpavimo greitis 2-oje metabolinėje būsenoje 13 % ir 49 % 3-oje metabolinėje būsenoje (V_{ADP}) ($p < 0,05$), bei 43 % sumažėjo kvėpavimo kontrolės indeksas. Šie energetiniai rezultatai rodo, kad SnPP

slopinant HO-1 funkciją, mitochondrijų funkcinę būklę blogėja, to pasekoje AGS tampa jautresnės cisplatinai (Pav. 3.4.4.1.C.; Pav. 3.4.4.1.D.).



Pav. 3.4.4.1. HO-1 funkcijos slopinimas alavo protoporfirinu.

Slopinant SnPP bei kartu veikiant cisplatinai ir hipertermija buvo tirta: A- metabolinis aktyvumas; B – ankstyvos apoptozės pokyčiai (duomenys B grafike prilyginti kontrolei - ląstelėms kultivuotoms normotermijoje be cisplatinos ir siRNR). C ir D grafikuose duomenys rodomi tik hipertermijos (43 °C) sąlygomis, kur tirtas mitochondrijų kvėpavimo greitis. V_0 - antra metabolinė mitochondrijų kvėpavimo būsenė. V_{ADP} - trečia metabolinė būsenė. D – kvėpavimo kontrolės indeksas. * - $p < 0,05$ statistiškai patikimas pokytis tarp grupių.

Apibendrinant HO-1 funkcijos slopinimo rezultatus SnPP, galima teigti, kad ši medžiaga turėjo tendenciją didinti tiek AGS metabolinį aktyvumą, tiek skatinti apoptotinius procesus, bei III metabolinės būsenos aktyvumą.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1 Bendras intraperitoniškai plintančių navikų ląstelių atsakas į hiperterminę chemoterapiją

Nors šiais laikais randama daug vėžio atvejų ankstyvose stadijose, vis dar išlieka gana didelė problema diagnozavus išplitusį vėžį [1]. Skrandžio, kasos ir storosios žarnos navikai - vieni iš dažniausiai nustatomų pilvaplėvės ertmėje išplitusių onkologinių susirgimų. Tokiu atveju gydymo galimybės dažnai būna labai ribotos. Vienas iš gydymo metodų yra HIPEC. Yra žinoma, kad ši procedūra didina pacientų išgyvenamumą sergant skrandžio [175, 176] ir storosios žarnos [177, 178] adenokarcinoma, bei sergančių mezotelioma ar kiaušidžių vėžiu [179]. Minėto gydymo metu tiek laisvai plaukiojančios vėžinės ląstelės, tiek ir pilvaplėvės paviršius yra veikiami aukštos temperatūros ir chemopreparato. Čia jau vien hipertermija gali veikti į ląstelių membranas, citoskeletą, mitochondrijas ir branduolį, bei jame vykstančius DNR reparacijos mechanizmus [180].

Vėžinės ląstelės yra skirtingos tiek savo kilme, tiek genotipu, tiek ir fenotipu, todėl nėra logiška taikyti vienodą gydymą, visų tipų navikams ir klinikinėms situacijoms, kurias jie sukelia. Iki šiol gydymo parametrus ir rezultatus, tiek hipertermijos režimus, tiek ir chemopreparato pasirinkimą bei procedūros laiką, bei naviko tipą vertinti neįmanoma. Nėra konkrečių gydymo gairių, gydymo parametrai varijuoja priklausomai nuo ligoninės, kur jie taikomi. Šiame tyrime buvo pasirinktas 1 val. poveikio laikas, kaip dažniausiai naudojamas klinikinėje praktikoje, o poveikio rezultatai buvo vertinami praėjus 48 val., nes turimais tyrimų duomenimis, tiriant dar vėlesniame laikotarpyje jokių pokyčių nebuvo pastebėta.

Šiame tyrime buvo pasirinktos 3 skirtingų lokalizacijų virškinimo sistemos navikų ląstelių linijos. Žinant, kad to pačio vėžio tipo ląstelės tarpusavyje skiriasi tiek savo išskiriamais biožymenimis, funkcija, tiek ir apoptozės mechanizmais, bei kitais aspektais [181], tyrimo tikslas buvo geriau suprasti bendrą skrandžio, kasos ir storosios žarnos vėžinių ląstelių atsaką į hiperterminę chemoterapiją, bandant jį pagerinti. Vertinant literatūrą, tyrime naudojamos skrandžio (AGS) ir storosios žarnos (Caco-2) ląstelių linijos yra gana gerai ištirtos. Žinoma, kad AGS ląstelėse iš 516 tirtų genų, 40 iš jų – mutavę. Čia randamos tokios mutacijos kaip KRAS, WNK1 ir WNK2 [182]. Taip pat šios ląstelės išskiria padidintus HER-2, VEGF, EGFR biožymenų

kiekius [183]. Caco-2 nustatytos SMAD4 ir TP53 genų mutacijos. Taip pat išskiriamas padidėjęs ILF3 ir TIMP3 kiekis [184-186]. Labai mažai duomenų apie pasirinktą kasos vėžio ląstelių liniją – T3M4. Žinoma tik tiek, kad šiose ląstelėse nenustatyta mutacijų, tačiau išskiriami padidinti kiekiai įvairių augimo faktorių [187]. Vertinant *HO-1* raišką skrandžio, kasos ir storosios žarnos vėžinėse ląstelėse, nustatomas panašus šio geno kiekis. *HO-1* RNR kiekis sveikos storosios žarnos ląstelėse 3 kartus viršija kasos ir skrandžio sveikų ląstelių RNR kiekį [188, 189].

Eksperimentiškai nustatyti skirtumai tarp ląstelių linijų, vien tik hipertermijos poveikyje. Nėgana to, hipertermija didina kasos vėžinių ląstelių metabolinį aktyvumą. Tai galima būtų paaiškinti karščio indukuojamų baltymų aktyvacija. Guo Yang ir kt. tirdamas kasos vėžio ląsteles ir veikdamas gemcitabinu, stebėjo panašų rezultatą. Savo studijoje ištyrė, kad karščio indukuojami baltymai buvo aktyvuoti per ląstelės S fazės stabdymą ir apoptotinius mechanizmus [190]. Veikiant 43 °C hipertermija Caco-2 ir AGS ląstelių linijas, buvo stebimas ženklus metabolinio aktyvumo sumažėjimas. Kudo ir kt. tirdamas storosios žarnos vėžio - Colon 26 ląsteles, taip pat gavo panašius rezultatus [191]. Tiriant 2 val. 48 °C temperatūros poveikį Caco-2 ląstelėms, nustatyta, kad metabolinis aktyvumas sumažėja 80 %, tačiau gyvybingų ląstelių išlieka [192]. Vertinant mūsų tyrimo rezultatus, veikiant Caco-2 ląsteles 1 val. 43 °C temperatūra, aktyvumas sumažėjo tik 14 %.

Šiame tyrime cisplatina buvo pasirinkta, kaip darbinis chemopreparatas. Vertinant literatūroje skelbiamus rezultatus, cisplatina ir jos derivatai naudojami gydyti daugelį navikų. Tai taip pat stabilus ir plačiai naudojamas preparatas *in vitro* eksperimentuose.

Vertinant bendrą hipertermijos ir cisplatinos poveikį, žinoma, kad aukšta temperatūra didina cisplatinos citotoksiškumą [193, 194]. Rui Tangas ir kt. tirdamas cisplatinos ir hipertermijos poveikį šešioms skrandžio vėžio ląstelių linijoms, nustatė sinergistinį poveikį tarp abiejų veiksnių [195]. Taip pat kombinuotas gydymas, skrandžio vėžio ląstelėse didina cisplatinos citotoksiškumą, apoptozės lygį ir MicroRNR-218 viduląstelinį kiekį [196]. Tuo tarpu mūsų tyrime, tik 43 °C temperatūra ir didesnė, kartu veikiant cisplatina veikė ląsteles, mažinant jų metabolinį aktyvumą. Ši poveikį vertinant izobologramų metodika AGS ląstelėse, stebėjome antagonizmą. 42 °C poveikis sumažino ląstelių aktyvumą net 33 %. Poveikio temperatūros skirtumas – 1 °C, tačiau aktyvumo skirtumas labai ryškus. Šie rezultatai

parodo, kaip svarbu klinikinėje praktikoje parinkti tinkamą temperatūrą, nes poveikis gali būti atvirkščias negu tikėtasi. Temperatūra gali padidinti viduląstelinius procesus, taip mažindama cisplatinos citotoksiškumą. Vertinant apoptozę, kurią sukelia cisplatina AGS ląstelėse, nebuvo stebima jokio reikšmingo pokyčio, tačiau pridėjus hipertermijos (43 °C) poveikį, apoptozės lygis padidėjo 61 %. Šie rezultatai įrodo, kad nevisais mechanizmais cisplatina ir temperatūra veikia antagonistiskai, kaip nustatyta izobologramomis.

Analizuojant kitų autorių atliktus tyrimus ir vertinant storosios žarnos vėžio ląstelių atsaką į chemopreparatų ir hipertermijos poveikį, galima teigti, kad jis priklauso nuo pačių ląstelių tipo. Vertinant Colon 26 ląstelių atsaką vien tik į cisplatiną, buvo gautas geras atsakas – metabolinis aktyvumas sumažėjo [191], o hipertermija padidino citotoksiškumą [197]. Tai buvo patvirtinta ir kituose tyrimuose. CX-1 ląsteles veikiant 1 val. chemopreparatu ir 42 °C temperatūra, pastaroji stiprino citotoksiškumą [198]. Veikiant 41 °C ir 42 °C HCT116+ch2 (MMR-) ląsteles, nebuvo stebima jokio jos poveikio. Atvirkščiai, šios ląstelės tapo 1,42 karto atsparios cisplatinai [199]. Karščio indukuojamų baltymų sukeliamą citoprotekciją, galėtų būti vienas iš tokių rezultatų paaiškinimų. Tuo tarpu mūsų tyrime hipertermija kartu su cisplatiną nežymiai mažino Caco-2 ląstelių metabolinį aktyvumą, tačiau 26 % padidino apoptozės lygį. Tiriant aktyvumo rezultatus izobologramomis, stebėtas ~50 % tirtų kombinacijų sinergistinis poveikis. Tyrimai su Caco-2 ląstelėmis, dalinai atkartoja AGS ląstelių rezultatus. Galima teigti, kad veikiant ląsteles tam tikromis cisplatinos ir temperatūros kombinacijomis, gydymo efektą galima pagerinti.

Tiriant kasos vėžio ląsteles, autoriai nurodo, kad hipertermija gali padidinti gemcitabino citotoksiškumą, bei inicijuoti didesnę apoptozės lygį [200, 201]. Mūsų tyrimų rezultatai atskleidė, kad tik didesnė nei 43 °C temperatūra, kartu su cisplatiną sąlygojo funkcinius ląstelių pokyčius. Titruojant cisplatiną, siekiant nustatyti IC₅₀, buvo konstatuota, kad T3M4 ląstelės yra labai jautrios jos poveikiui. Cisplatina apoptozės lygį padidino net 3.4 karto, o temperatūra pakėlė dar 19 %. Vertinant skirtingas cisplatinos ir temperatūros kombinacijas izobologramomis, stebėta, panašūs rezultatai, kaip ir AGS ląstelėse. Dauguma kombinacijų buvo antagonistinės, ir tik keletas poveikis – adityvus. Vertinant bendrai šių ląstelių atsaką į kombinuotą gydymą, galima teigti, kad AGS ir Caco-2 ląstelių rezultatai skyrėsi nuo T3M4. Loggia

Brainas ir kt. nurodo, kad kombinuotas gydymas efektyvesnis neagresyviems navikams [202].

4.2 Energetiniai pokyčiai veikiant hipertermine chemoterapija

Kitas šioje disertacijoje analizuojamas aspektas – kaip cisplatinos ir hipertermijos poveikis veikia ląstelių mitochondrijas ir jų kvėpavimo greitį. Yra žinoma, kad vėžinėse ląstelėse energijos gamyba mitochondrijose ir jų funkcija užima gana svarbią vietą, jas aprūpindamos energija ir sąlygojančios metabolinį aktyvumą ir proliferaciją. Cisplatina ir hipertermija įtakoja mitochondrijų veiklą, kuri keičia ląstelės gyvavimo procesus. Vertinant literatūroje pateiktus rezultatus, nėra susijusios informacijos su analizuojamų ląstelių energetiniais pokyčiais, jas veikiant cisplatinos ir hipertermijos kombinacija. Apibendrinant šio tyrimo energetinių eksperimentų rezultatus, galima teigti, kad vien tik cisplatina didina mitochondrijų vidinės membranos laidumą ir mažina energijos gamybą jose (mažėja kvėpavimo koeficientas). Tuo tarpu hipertermija didina tik AGS kvėpavimą. Caco-2 ir T3M4 ląstelėse pokyčių nestebima. Vertinant kombinacinį poveikį, nepastebėta, kad hipertermija didintų cisplatinos poveikį energetiniame lygmenyje. Šie rezultatai tik dar kartą įrodo, kad vienas svarbiausių aspektų – tinkamas ląstelių/naviko pasirinkimas šiam gydymui.

Panašūs rezultatai yra aptariami ir kitų mokslininkų, tiriančių cisplatinos poveikį mitochondrijų funkcijai. Chosė Kustodio ir kt. tyrinėjo žiurkių kepenų mitochondrijas. Veikiant cisplatina, kurios koncentracija 20 mmol/mg, buvo stebimas kalcio koncentracijos pokyčių sąlygotas mitochondrijų brinkimas, bei mitochondrijų membranos depoliarizacija. 40 mmol/mg koncentracija stimulavo mitochondrijų kvėpavimo antrą ir ketvirtą būseną, t.y. didino vidinės mitochondrijų membranos laidumą, mažindama trečiąją, substratu naudojant sukcinatą. Cisplatinos poveikis taip pat mažino kvėpavimo kontrolės koeficientą (V_{ADP}/V_0) ir ADP fosforilinimą. Kustodio apibendrindamas savo tyrimo rezultatus teigia, kad cisplatina, didindama mitochondrijų vidinės membranos pralaidumą protonams, keičia jų bioenergetiką [203]. Bibiana Ortega-Dominges ir kt. tirdama žiurkių inkstų energetinius procesus vykstančius mitochondrijose, veikdama 5mg/kg cisplatiną, pastebėjo 50 % sumažėjusį deguonies suvartojimą trečioje metabolinėje būsenoje (substratas glutamatas/malatas), tačiau jokių pokyčių nebuvo ketvirtoje. Taip pat 40 % sumažėjo kvėpavimo kontrolės koeficientas.

Autoriai nurodo, kad cisplatina slopino I kompleksą ir ATP sintazę, tačiau neveikė sukcinato oksidacijos trečioje metabolinėje būsenoje. Ketvirta metabolinė būseną cisplatinos poveikyje sumažėjo 28 %, o kvėpavimo kontrolės koeficientas – 20 % [204]. Kaip minėta anksčiau, energetinių tyrimų, vertinančių skrandžio kasos ar storosios žarnos vėžio ląsteles nėra daug. Tačiau tiriant stemplės vėžio ląsteles OE19, bei veikiant jas cisplatina ir 5-fluoruracilu, buvo pastebėta, jog šie medikamentai didina mitochondrijų membranos vientisumą [205]. Kirkas Tacka ir kt. tyrinėjo Jurkat ląsteles, kurias veikė 0 μ M - 25 μ M cisplatinos. Jis nepastebėjo jokių pokyčių viduląstelinio kvėpavimo procesuose praėjus 3 val. nuo poveikio pradžios. Tačiau praėjus 24 val. tiek ląstelių metabolinis aktyvumas, tiek ir deguonies suvartojimas mažėjo proporcingai didėjant cisplatinos koncentracijai. Įdomu tai, kad tokiais pat sąlygomis veikiant jaučio širdies mitochondrijas, jokių pokyčių nebuvo [206].

Taip pat buvo vertinta hipertermijos, bei hipertermijos ir cisplatinos poveikyje įtaka energetiniams procesams. Apibendrinus duomenis, galima teigti, jog hipertermija jokios įtakos nedarė nei Caco-2, nei T3M4 ląstelių energetikai. AGS ląstelių deguonies suvartojimas antroje metabolinėje būsenoje padidėjo, o kvėpavimo kontrolės koeficientas sumažėjo. Šie rezultatai sutampa su vien cisplatinos poveikio rezultatais, tik hipertermijos poveikis buvo 30 % mažesnis. Vertinant viduląstelinio kvėpavimo atsaką į kombinuoto gydymo (cisplatina + hipertermija) poveikį, jokių akivaizdžių skirtumų nestebėta nei AGS, nei Caco-2 nei T3M4 ląstelėse.

4.3 *HO-1* ekspresijos ir funkcijos moduliacija kartu su hipertermija ir cisplatina

Veikiant cisplatina ir/ar hipertermija AGS, Caco-2 ir T3M4 ląsteles, bei tiriant *HO-1* tiek geno tiek baltymo ekspresiją, galima teigti, kad jos visos elgiasi skirtingai. AGS ląstelėse *HO-1* kiekis ženkliu nekito RNR lygmenyje, nors hipertermija jį kiek padidino. Baltymo koncentracija didėjo 43 °C temperatūroje. Jokių RNR pokyčių nestebėta Caco-2 ląstelėse, todėl šios ląstelių linijos atsisakėme vykdydami *HO-1* moduliacijos tyrimus. T3M4 ląstelių *HO-1* RNR kiekis buvo pats didžiausias iš tirtų ląstelių. Jis didėjo tik cisplatinos dėka, o baltymo lygmenyje cisplatina neįtakojė jokių ekspresijos pokyčių, o hipertermija ją ženkliai sumažino. Analizuojant šiuos rezultatus, nuspręsta *HO-1* moduliaciją atlikti tik su skrandžio vėžio ląstelėmis.

Iš visų eksperimentuose naudotų ląstelių, T3M4 *HO-1* kiekis buvo didžiausias. Kasos adenokarcinoma – agresyvesnė nei skrandžio ar storosios žarnos vėžys. Zao su bendraautoriais tirdamas kiaušidžių karcinomos ląsteles ir navikų audinius nustatė, kad kuo agresyvesnis navikas, tuo nustatoma didesnė *HO-1* ekspresija. Taip pat buvo atrasta, kad *HO-1* kiekis koreliuoja su ligos prognoze. Kuo daugiau šio baltymo, tuo prognozė blogesnė [207]. Ekspresijos nesutapimus tarp ląstelių linijų poveikio sąlygomis vertinti sunku. Tačiau žinant, kad vien to paties naviko ląstelės skiriasi tiek funkcija, tiek fenotipu, o šiame tyrime vertintos skirtingų navikų ląstelės, toks nesutapimas tikrai įmanomas [181]. AGS ląstelių metabolinio aktyvumo ir apoptozės rezultatai išsiskyrė. *HO-1* slopinimas, nedavė jokio efekto hipertermijoje, nors normotermijoje aktyvumas sumažėjo. *HO-1* slopinimas siRNR apoptozę veikė tiek normotermijoje tiek ir hipertermijoje. Poveikis atitinkamai buvo 2,6 ir 6,5 karto geresnis nei kontrolėje. Panašu, kad nors ląstelės metabolinis aktyvumas pradinėse fazėse ir nesikeičia, tačiau stipriai inicijuojami apoptotiniai mechanizmai. Lv Ksinas ir kt. tirdamas gerklų vėžio ląsteles, stebėjo cisplatiną nežymiai didinant *HO-1* kiekį. Papildomai šios ląstelės veiktos heminu – *HO-1* aktyvatoriumi. Nustatyta, jog *HO-1* kiekis stipriai padidėjo, kas sąlygojo apoptozę. Veikiant cinko protoporfirinu (ZnPPIX), *HO-1* ekspresija mažėjo, kartu mažėjo ir apoptozės lygis [208]. Veikiant dirgikliui – cisplatinai, įjungiami ląsteles prieš oksidacinį stresą saugantys mechanizmai, įskaitant geležies jonus, anglies dvideginį ir biliverdiną [209]. *HO-1* slopinimas mažino mitochondrijų kvėpavimo greitį skrandžio vėžio ląstelėse. Panašūs rezultatai gauti ir slopinant *HO-1* ekspresiją HEK293 ląstelėse [210]. Tiriant pelių hepatocitus išsiaiškinta, kad mitochondrijos išskiria hemo oksigenazę 2 (*HO-2*), o ne *HO-1*. Padidėjęs deguonies ir aktyviųjų deguonies formų (ROS) suvartojimas buvo susijęs su pakitusiu *HO-2* kiekiu. Šio geno ekspresija susijusi su HIF-1α ir JNK signaliniais keliais. Slopinant *HO-1* ekspresiją jokių pokyčių nebuvo pastebėta. Užslopinus *HO-2* ekspresiją pelėse, buvo skatinamas sisteminis uždegiminis organizmo atsakas, audinių hipoksija ir šokas [211].

Alavo protoporfirinas, veikiant cisplatinai normotermijoje AGS metabolinio aktyvumo nekeitė, tačiau kartu veikiant hipertermijai – ląstelės buvo gyvybingesnės. Veikiant SnPP trečioje metabolinėje būsenoje kvėpavimo greitis mažėjo, taip pat sumažėjo ir kvėpavimo kontrolės koeficientas. Waltzas su bendraautoriais tirdami oksigenazių įtaka hepatocitams, hemoraginio šoko metu, nustatė, kad tiek *HO-1* siRNR tiek ir SnPP, vienodai

slopino *HO-1* [211]. Hooda ir kt. vertindami plaučių vėžio ląstelių energetinius procesus, nustatė, kad slopinant hemo biosintezę, mažėjo deguonies suvartojimas, ląstelių proliferacija bei kolonijų formavimas [212]. Pibiri ir kt. slopindami *HO-1* funkciją SnPP, nustatė, kad sumažėjusi *HO-1* raiška, skatino hepatocitų regeneraciją, didino uždegiminių mediatorių raišką [213]. Converso ir kt. veikdami SnPP žiurkių mitochondrijas, nenustatė jokių pokyčių trečioje ir ketvirtoje metabolinėse būsenose [214]. Tiriant *HO-1* raišką ir funkciją *Mycobacterium abscessus* bakterijose, nustatyta, kad padidėjęs biliverdino ir bilirubino kiekis naikino SnPP funkcijos slopinimą per intraląstelinį ROS kiekį [215]. Šių autorių rezultatai dalinai sutampa su disertacijos, tačiau pastarojoje, energetinių procesų pokyčiai nebuvo tokie akivaizdūs.

IŠVADOS

1. Cisplatina veikiamos skirtingos vėžinės ląstelės į hipertermiją reagavo nevienodai, tačiau 42 °C - 43 °C intervale stebėtas metabolinio aktyvumo padidėjimas skrandžio ir kasos vėžio ląstelių linijose. Matematiniam modelyje, daugelyje cisplatinos ir hipertermijos poveikio kombinacijų nustatytas antagonizmas.
2. Hipertermija didino cisplatinos koncentraciją tirtose ląstelių linijose. Didžiausias hipertermijos sukeltas viduląstelinės cisplatinos koncentracijos padidėjimas stebėtas skrandžio vėžio ląstelėse.
3. Hipertermija turėjo didžiausią įtaką cisplatina paveiktų kasos vėžio ląstelių apoptozei. Hipertermija didino kasos vėžio, o cisplatina – skrandžio vėžio ląstelių mitochondrijų kvėpavimo greitį. Kombinuotas cisplatinos ir hipertermijos poveikis kvėpavimo greičiui įtakos neturėjo nei vienoje ląstelių linijoje.
4. Tik skrandžio vėžio ląstelėse stebimas hipertermijos sukeltas HO-1 baltymo ekspresijos padidėjimas. Slopinant HO-1 ekspresiją, aktyvėjo apoptozė ir mažėjo kvėpavimo greitis. Slopinant HO-1 funkciją, stebėta tendencija didinti metabolinį aktyvumą, skatinti apoptotinius procesus, bei viduląstelinio kvėpavimo III metabolinės būsenos aktyvumą.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Hipertermine chemoterapija gydant skirtingus intraperitoniškai išplitusius navikus, turėtų būti pasirinktas atitinkamas hipertermijos lygis, tačiau jis neturėtų būti žemesnis nei 43 °C. Priešingu atveju gali būti skatinamas metabolinis aktyvumas ir aktyvuojama HO-1 baltymo sintezė, siekiant apsaugoti vėžines ląsteles. Slopinant HO-1 funkciją ar raišką galima gerinti atsaką į hipertermiją ir chemoterapiją.

SUMMARY

INTRODUCTION

Cancer is one of the leading causes of death, worldwide. The most commonly diagnosed malignant diseases are gastric, pancreatic and colorectal cancer [1]. Rarely they are diagnosed in early cases. Usually the diagnosis is set, when the tumor is already disseminated into the peritoneal cavity [2]. Median survival time for patients with colorectal carcinomatosis is from 3 to 6 months [2], pancreatic – 7 months [3]. Untreated patients with carcinomatosis of gastric cancer origin approximately survive for 2 months [4]. Chemotherapy prolongs survival time and is the main treatment option for intraperitoneally disseminated gastrointestinal cancer [5, 6]. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) is used for treatment of peritoneal carcinomatosis [7-9]. During the procedure, heated chemotherapy drug is introduced into abdominal cavity. It is thought that high temperature should improve penetration of the drug into the tissue [10]. Treatment of peritoneal carcinomatosis can be applied using only HIPEC, or HIPEC with cytoreductive surgery, when macroscopically seen tumors are removed in a surgical manner [11, 12].

The usage of high chemotherapy concentration is advantage of HIPEC against intravenous chemotherapy, where treatment concentrations are low. In HIPEC, plasma-peritoneal barrier does not let the drug to enter a bloodstream and protects against its toxicity. High temperature itself plays a cytotoxic role and initiates apoptotic mechanisms [13-16].

The choice of HIPEC chemotherapy drug depends on primary tumor type, hospital where the treatment is given and other aspects. Cisplatin, oxaliplatin and mitomycin C are the most common drugs, used in the treatment [17]. Temperature regimen and time of the procedure varies, depending on the hospital where treatment is been given [18]. It is very hard to evaluate the results of the treatment, when settings of the procedure differ. Trials show benefit of HIPEC, which prolongs survival time [6]. While comparing cytoreduction with cytoreduction accompanied by HIPEC, there are studies, where no benefits of hyperthermic chemotherapy are found [19]. Having controversial results, scientists are seeking for new treatment approaches, that could improve HIPEC [20].

Heat-induced proteins protect cells by many triggers. Increase of these substances are induced by heat, chemotherapy drugs, UV light and others [21-24]. For past two decades Heme oxygenase – 1 (*HO-1*) is known as a cytoprotective heat-induced protein. Increased levels of *HO-1* are found in cancer cells. It reacts to chemotherapy induced oxidative stress, induces proliferation and suppresses apoptosis and autophagy [28-30]. Due to *HO-1* cellular role, scientists try to gain better cellular response to chemotherapy, by suppressing its function. This suppression enhances response to chemotherapy by cellular microenvironment and immune system [31]. Tin protoporphyrin (SnPP) is known as a *HO-1* suppressing substance, which increases cytotoxicity of chemotherapy [32].

Number of studies, evaluating cellular response to combined hyperthermia and chemotherapy has been performed [33, 34]. There is no data about different gastrointestinal tract tumor cell response to combined treatment. It is still unclear if suppression of heat-induced protein function, can enhance the effect of hyperthermia and chemotherapy.

Aim of the study

To evaluate the response of gastrointestinal system (gastric, pancreatic and colorectal) tumor cells to hyperthermia and cisplatin treatment and to analyze the influence of *HO-1* modulation to these processes *in vitro*.

Objectives of the study

1. To evaluate the changes in metabolic activity of gastric, pancreatic and colorectal cancer cells, after hyperthermia and cisplatin treatment.
2. To evaluate if hyperthermia influences intracellular cisplatin concentration of gastric, pancreatic and colorectal cancer cells.
3. To evaluate the changes in apoptosis and intracellular oxygen consumption of gastric, pancreatic and colorectal cancer cells, after hyperthermia and/or cisplatin treatment.
4. To evaluate the changes in metabolic activity, apoptosis and intracellular oxygen consumption after *HO-1* modulation in hyperthermia and cisplatin treated cancer cells.

Novelty of the study

Nowadays, gastrointestinal cancer can be detected at early stages, due to innovative diagnostics. Still there are a lot of cases when cancer has already spread to peritoneal surface. In such case, surgical treatment is not effective and systemic treatment – chemotherapy is administered for the patient [35-37]. Another option is – hyperthermal intraoperative chemotherapy (HIPEC). It is known to prolong patient survival [6]. Controversary data is also present, where HIPEC shows no benefit in peritoneally disseminating gastrointestinal cancer treatment [19]. It is nearly impossible to evaluate results of the treatment, due to various treatment options as different timing of the procedure, various temperature regimens and chemotherapy drugs, as well different criteria of patient recruitment [38].

Not many studies that evaluate impact of HIPEC to the cells are performed. Mostly they are backed up by apoptosis or metabolic activity data only. Until now, the mechanisms influencing cellular response to hyperthermia and chemotherapy treatment are not clear. It is known that hyperthermia enhances cisplatin cytotoxic effects not equally for all cancer cells. There are no studies, evaluating different gastrointestinal cancer cell response to HIPEC in a manner of metabolic activity, apoptosis, intracellular cisplatin concentration and mitochondria respiration rate change.

While the basic results of cellular response to HIPEC vary, new approaches, which could enhance this treatment are needed [20]. Heat-induced proteins are known to have cytoprotective function. Cells overexpress these substances due to environmental triggers as chemotherapy and hyperthermia. Heat-induced proteins are found overexpressed in cancer cells too. Heme oxygenase 1 (*HO-1*) is known as heat-induced protein, which is responsible for resistance to chemotherapy and cellular protection against the hyperthermia. In this study, *HO-1* is selected as a potential target, because its cellular expression increases due to hyperthermia and cisplatin treatment. Until now it is not clear if downregulation of *HO-1* can benefit in hyperthermia and chemotherapy treatment.

METHODS

Cancer cells and the experiment

AGS (gastric adenocarcinoma), T3M4 (pancreatic adenocarcinoma) and Caco-2 (colorectal adenocarcinoma) cells were selected. They were cultivated in RPMI media, containing FBS and 1 % penicillin/streptomycin. Cells were kept in humid incubator at 37 °C and 5 % CO₂. The experiment can be separated into 2 parts. In the *first* part (*HO-1* is not modulated) cells were incubated for 24 hours, then they were treated with IC₅₀ of cisplatin and temperature. Temperature range was: 37 °C (control), 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C or 45 °C. Cisplatin and temperature treatment was performed separately or in combination. To mimic HIPEC timing, cells were treated for one hour. Then the media was washed away, and new growing media was administered. Immediately after experiment intracellular concentration of cisplatin was measured. 48 hours after experiment MTT, apoptosis, respiration rate and *HO-1* expression evaluations were conducted. In the *second* part of experiment (modulation of *HO-1*) *HO-1* silencing RNA (siRNA) was incorporated or cells were treated with tin protoporphyrin (SnPP). After 72 hours cells were treated with cisplatin IC₅₀ in normothermia (37 °C) and hyperthermia (43 °C) for one hour. Media was changed and cells were kept for 48 hours. Then the results of the treatment were evaluated by the means of apoptosis, metabolic activity, expression and respiration rate.

MTT

Cells were incubated for 4 hours at 37 °C with 5mg/ml MTT reagent. Then the media was changed and DMSO was added. The absorbance read was performed at 570 nm and 650 nm using Sunrise spectrophotometer.

Isobolograms

Isobologram analysis was performed using MTT data, to identify the limits of the additivity action of hyperthermia and cisplatin treatment. Selected temperature data points were: 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, or 45 °C. Cisplatin data points were: 25 µmol/L, 50 µmol/L, 100 µmol/L, 200 µmol/L, or 400 µmol/L. Points for combined treatment analysis were: 39 °C + 50 µmol/L; 39 °C + 100 µmol/L; 39 °C + 200 µmol/L; 40 °C + 50 µmol/L; 40 °C + 100 µmol/L; 40 °C + 200 µmol/L; 41 °C + 50 µmol/L; 41 °C + 100 µmol/L; 41 °C + 200 µmol/L; 42 °C + 50 µmol/L; 42 °C + 100 µmol/L;

42 °C + 200 µmol/L; 43 °C + 50 µmol/L; 43 °C + 100 µmol/L; 43 °C + 200 µmol/L; 44 °C + 50 µmol/L; 44 °C + 100 µmol/L and 44 °C + 200 µmol/L. Chou median equation was used to analyze the data [172].

Flow cytometry

48 hours after experiment, changes in apoptosis rate were determined by flow cytometer Guava Nexin Annexin V assay. Procedures were performed according manufacturer's requirements. Measurements were performed using Guava PCA Flow cytometer and CytoSoft software.

Western blot

Lysates were prepared using lysis buffer which contains protease inhibitors. 50 µg of protein samples were set into 4–12% SDS-PAGE and transferred on PVDF membranes using 30 V for 50 min. Later membranes were blocked using a blocking buffer at room temperature and incubated with primary antibodies: rabbit anti-*HO-1* (dilution 1:2,000) and mouse anti-GAPDH (dilution 1:1,000) at 4°C overnight. Next day membranes were incubated with anti-rabbit/mouse secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Using a chemiluminescence substrate and ChemiDoc imaging system results were visualized. ImageJ software was used for quantification.

PCR

Sample RNA was extracted using PureLink RNA Mini kit and verified for purity using ultraviolet spectrophotometry. Super Script Vilo Master Mix with 2 µg of RNA was used to generate cDNA. Thermocycling conditions were selected as following: initial step at 95°C for 10 min, denaturation - 95°C for 15 sec, annealing/extending - 60°C for 1 min (40 cycles), and final extension step at 72°C for 2 min. *HO-1* primers were: forward, 5'-TGCTCAACATCCAGCTCTTTGAGGA-3'; and reverse, 5'-CAGGCAGAGAATGCTGAGTTC-3'. All products were loaded to agarose gel. Ethidium bromide and UV light were used for visualization.

Intracellular cisplatin concentration

Cell lysate samples were diluted ten times immediately after experiment. Concentration of intracellular cisplatin was analyzed by mass spectrometer (ICP-MS) NexION™ 300D. The calibration graphs of Platinum were

prepared in the range of 0-50 ng/mL using Pure Plus 10 mg/L Multi-Element calibration standard 4.

siRNA *HO-1* silencing

HO-1 small interfering RNA were sense 5'-UGAACACUCUGGAGAUGAC-3', and antisense 5'-GUCAUCUCCAGAGUGUCCA-3' and AllStars Negative Control siRNA; sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3' and antisense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3'). Lipofectamine® and Opti-MEM™ media were used as described by manufacturer. The efficiency of transfection was verified using BLOCK-iT Alexa Fluor. Western blot was used to determine the efficiency of the knockdown.

***HO-1* inhibition by tin protoporphyrin (SnPP)**

72 hours before cisplatin and hyperthermia treatment, cells were affected by 20 nM of SnPP. Cell media was changed after 1 hour and cells were kept in normal conditions.

Measurement of mitochondrial respiration rate

Oxygraph-2 k was used to measure mitochondrial oxygen consumption. Measurements were performed at 37 °C medium containing 0.5 mmol/l EGTA, 3 mmol/l MgCl₂, 60 mmol/l K-lactobionate, 20 mmol/l taurine, 10 mmol/l KH₂PO₄, 20 mmol/l HEPES, 110 mmol/l sucrose. Digitonin (8 mg/ml) was used to permeabilize cellular membrane. State 2 respiration rate (V_0), was measured with addition of substrate 5 mmol/l glutamate and 2 mmol/l malate. State 3 respiration rate (V_{ADP}) was measured with addition of 1 mmol/l ADP. Respiratory control index was calculated as a ratio: V_{ADP}/V_0 . Datlab 5 software was used for data analysis.

Statistical analysis

SPSS statistics (version 21.0) and GraphPad was used for data analysis and visualization. Mann-Whitney and One-Way ANOVA tests were used to determine the difference between the groups. Data in figures is shown as average $\pm$ standard deviation of three independent experiments. $P < 0,05$ is set as a statistically significant value.

RESULTS

The influence of temperature and cisplatin treatment to metabolic activity

Increasing temperature adequately reduced metabolic activity in AGS cells which were the most sensitive to hyperthermia. In Caco-2 cells activity was reduced at 43 °C and 44 °C. T3M4 metabolic activity was reduced at 42 °C. Higher temperatures in T3M4 and Caco-2 cells did not influence cellular activity and it was like control (37 °C). Cisplatin induced metabolic activity in all cancer cell lines. Pancreatic cancer cells were the most sensitive to the treatment. IC₅₀ dose was determined for all cell lines according metabolic activity data. IC₅₀ of gastric cancer cells was 182 µmol/l, colorectal cancer – 194 µmol/l and pancreatic cancer – 48 µmol/l.

Particular IC₅₀ doses together with temperature were used to determine the effect of combined treatment. All cell lines reacted in different manner. Temperature range from 37 °C to 41 °C had no effect to cisplatin cytotoxicity. Interestingly, metabolic activity peaks were observed in gastric and pancreatic cancer cell lines. In AGS cells metabolic activity was increased by 33 % (as compared to 37 °C) at 42 °C, in T3M4 by 32 % at 42 °C.

Isobolograms were constructed to evaluate if the combined hyperthermia and cisplatin treatment is synergistic, antagonistic or additive. All analyzed data points were antagonistic for AGS cells. For Caco-2 cells it was: synergistic (at 40 °C with 50 µmol/L and 100 µmol/L of cisplatin, at 43 °C with 50 µmol/L, 100 µmol/L, and 200 µmol/L cisplatin, at 44 °C with 50 µmol/L, 100 µmol/L, and 200 µmol/L of cisplatin), additive (at 39 °C with 100 µmol/L of cisplatin, at 41 °C with 100 µmol/L cisplatin, and at 42 °C with 50 µmol/L and 100 µmol/L of cisplatin), and antagonistic (at 39 °C with 200 µmol/L of cisplatin, at 40 °C with 200 µmol/L cisplatin, at 41 °C with 50 µmol/L and 200 µmol/L cisplatin, and at 42 °C with 200 µmol/L of cisplatin). For T3M4 cells it was additive (at 41 °C with 200 µmol/L cisplatin, at 42 °C with 50 µmol/L cisplatin, and at 44 °C with 100 µmol/L and 200 µmol/L of cisplatin) and all other evaluated data points were antagonistic.

Intracellular cisplatin concentration

Immediately after cisplatin and hyperthermia exposure, cells were analyzed for changes in intracellular cisplatin concentration. We selected two

temperature regimens: normothermia (37 °C) and hyperthermia (43 °C). Hyperthermia increased intracellular cisplatin concentration in gastric, pancreatic and colorectal cancer cell lines by 30 %, 20 % and 18 % respectively.

The influence of temperature and cisplatin treatment to apoptosis and mitochondrial respiration rate

Flow cytometry was performed to evaluate the rates of early apoptosis. Cisplatin induced apoptosis in Caco-2 and T3M4 cells by 1,5 and 3,4-fold respectively. Hyperthermia boosted this effect by 20 % and 19 % respectively. In AGS cells cisplatin did not increase the apoptosis rate significantly, but hyperthermia increased this rate by 61 %.

Mitochondrial respiration rate was measured using glutamate/malate as substrates. Mitochondrial state 2 (V_0 – substrate glutamate/malate) and state 3 (V_{ADP} – 1mM ADP) were evaluated. Cisplatin increased V_0 and V_{ADP} in T3M4 cells by 2,34-fold and 37 % significantly. Temperature increased V_0 and V_{ADP} respiratory rates by 1,64-fold and 30 %. We observed no significant changes while evaluating combined temperature and cisplatin treatment influence to mitochondrial respiration rate, except hyperthermia significantly increased cisplatin effect for Caco-2 cells in V_{ADP} .

***HO-1* modulation and its influence on the cells**

Results of *HO-1* RNA and protein expression differed. Hyperthermia slightly increased RNA levels in AGS cells. In T3M4 cells we observed cisplatin determined increase of *HO-1* RNA level. There were no hyperthermia/cisplatin induced RNA changes in Caco-2 cells. Due to RNA expression results, only AGS and T3M4 cells were selected for *HO-1* protein expression evaluation. Hyperthermia significantly increased *HO-1* expression in AGS cells only. For further *HO-1* experiments gastric cancer cell line was selected.

Treating with cisplatin and hyperthermia, we induced *HO-1* expression by siRNA. Metabolic activity decreased by 16 % and apoptosis increased by 2,63-fold in cisplatin treated, *HO-1* silenced cells in normothermia. Hyperthermal conditions increased this result by 6,5-fold. *HO-1* knockdown decreased mitochondrial state 2 and 3 respiration rates by 21 % and 19 % significantly. Suppressing *HO-1* function by SnPP in hyperthermia, tended to

increase metabolic activity of cisplatin treated cells by 1,7-fold. No significant SnPP induced changes were observed in apoptosis. Suppression of HO-1 function, reduced mitochondrial state 2 and 3 respiration rates by 13 % and 49 % significantly.

CONCLUSIONS

1. Response of different cells to hyperthermia was uneven, but at the interval of 42 °C - 43 °C, gastric and pancreatic cancer cells had a peak in metabolic activity. Mathematic antagonism is determined in most of hyperthermia and cisplatin treatment combinations.
2. Cisplatin concentration was elevated by hyperthermia in all cancer cells. The highest hyperthermia induced cisplatin concentration was observed in gastric cancer cells.
3. Hyperthermia mostly influenced apoptosis for cisplatin treated pancreatic cancer cells. Mitochondrial respiration rate was increased by hyperthermia in pancreatic cancer cells and by cisplatin, in gastric cancer cells. Combined treatment of hyperthermia and cisplatin had no significant influence on mitochondrial oxygen consumption.
4. Hyperthermia induced HO-1 protein overexpression was observed in gastric cancer cells only. *HO-1* RNA silencing increased apoptosis rate and decreased mitochondrial oxygen consumption. By suppressing the HO-1 function, metabolic activity and apoptosis rates tended to increase, also mitochondrial state 3 respiration rate increased.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

Right temperature regimens need to be chosen, while using hyperthermia and chemotherapy for intraperitoneally disseminating cancer treatment. The temperature should not be lower than 43 °C. Otherwise metabolic activity and HO-1 protein expression can increase due to cellular self-protection. The cellular response to hyperthermia and chemotherapy can be improved by HO-1 suppression.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
2. Shariff U, Seretis C, Youssef H. Management of colorectal cancer patients at high risk of peritoneal metastases. *J BUON.* 2015;20 Suppl 1:S71-9.
3. Alberghina N, Sanchez-Montes C, Tunon C, Maurel J, Araujo IK, Ferrer J, et al. Endoscopic ultrasonography can avoid unnecessary laparotomies in patients with pancreatic adenocarcinoma and undetected peritoneal carcinomatosis. *Pancreatology.* 2017;17(5):858-64.
4. Tan HL, Chia CS, Tan GH, Choo SP, Tai DW, Chua CW, et al. Gastric peritoneal carcinomatosis - a retrospective review. *World journal of gastrointestinal oncology.* 2017;9(3):121-8.
5. Hutanu I, Timofte D, Scripcariu V, Diaconu C. [Treatment of peritoneal carcinomatosis of gastro-intestinal origin--a retrospective study of 203 cases]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2012;116(1):150-6.
6. Boerner T, Graichen A, Jeiter T, Zemmann F, Renner P, Marz L, et al. CRS-HIPEC Prolongs Survival but is Not Curative for Patients with Peritoneal Carcinomatosis of Gastric Cancer. *Annals of surgical oncology.* 2016;23(12):3972-7.
7. Sugarbaker PH. Peritoneal Metastases from Gastrointestinal Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2018;20(8):62.
8. Deraco M, Kusamura S, Corbellini C, Guaglio M, Paviglianiti C, Baratti D. Treatment principles for peritoneal surface malignancies. *Minerva Chir.* 2016;71(2):124-45.
9. Coccolini F, Gheza F, Lotti M, Virzi S, Iusco D, Ghermandi C, et al. Peritoneal carcinomatosis. *World journal of gastroenterology.* 2013;19(41):6979-94.
10. Honore C, Souadka A, Goere D, Dumont F, Deschamps F, Elias D. HIPEC for peritoneal carcinomatosis: does an associated urologic procedure increase morbidity? *Annals of surgical oncology.* 2012;19(1):104-9.
11. Spiliotis J, Vaxevanidou A, Sergouniotis F, Lambropoulou E, Datsis A, Christopoulou A. The role of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of recurrent advanced ovarian cancer: a prospective study. *J BUON.* 2011;16(1):74-9.
12. Scaringi S, Leo F, Canonico G, Batignani G, Ficari F, Tonelli F. The role of cytoreductive surgery alone for the treatment of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. A retrospective analysis with regard to multimodal treatments. *Hepatogastroenterology.* 2009;56(91-92):650-5.
13. Sugarbaker PH, Graves T, DeBruijn EA, Cunliffe WJ, Mullins RE, Hull WE, et al. Early postoperative intraperitoneal chemotherapy as an adjuvant therapy to surgery for peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer: pharmacological studies. *Cancer Res.* 1990;50(18):5790-4.

14. Katz MH, Barone RM. The rationale of perioperative intraperitoneal chemotherapy in the treatment of peritoneal surface malignancies. *Surg Oncol Clin N Am*. 2003;12(3):673-88.
15. Sun X, Li XF, Russell J, Xing L, Urano M, Li GC, et al. Changes in tumor hypoxia induced by mild temperature hyperthermia as assessed by dual-tracer immunohistochemistry. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2008;88(2):269-76.
16. Petrillo M, De Iaco P, Cianci S, Perrone M, Costantini B, Ronsini C, et al. Long-Term Survival for Platinum-Sensitive Recurrent Ovarian Cancer Patients Treated with Secondary Cytoreductive Surgery Plus Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC). *Annals of surgical oncology*. 2016;23(5):1660-5.
17. Pandiyan SD, Friedman SJ, Ceelen WP. Toxicities and doses of chemotherapy drugs in hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(15_suppl):e13524-e.
18. Morano WF, Khalili M, Chi DS, Bowne WB, Esquivel J. Clinical studies in CRS and HIPEC: Trials, tribulations, and future directions-A systematic review. *J Surg Oncol*. 2018;117(2):245-59.
19. Quenet F, Elias D, Roca L, Goéré D, Ghouti L, Pocard M, et al. A UNICANCER phase III trial of Hyperthermic Intra-peritoneal Chemotherapy (HIPEC) for Colorectal Peritoneal Carcinomatosis. *PRODIGE 7. European Journal of Surgical Oncology*. 2019;45(2):e17.
20. Roy P, Canet-Jourdan C, Annereau M, Zajac O, Gelli M, Broutin S, et al. Organoids as preclinical models to improve intraperitoneal chemotherapy effectiveness for colorectal cancer patients with peritoneal metastases: Preclinical models to improve HIPEC. *Int J Pharm*. 2017;531(1):143-52.
21. Hahn GM, Li GC. Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. *Radiation Research*. 1982;92(3):452-7.
22. Hahn GM, Li GC. 4 Thermotolerance, Thermoresistance, and Thermosensitization. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*. 1990;19:79-100.
23. Mailhos C, Howard M, Latchman D. Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience*. 1993;55(3):621-7.
24. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jäättelä M, et al. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(3):926-33.
25. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(2):86-103.
26. Chatterjee S, Burns TF. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(9):1978.

27. Podkalicka P, Mucha O, Józkowicz A, Dulak J, Łoboda A. Heme oxygenase inhibition in cancers: possible tools and targets. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2018;22(1A):23-32.
28. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(17):3221-47.
29. Nitti M, Piras S, Marinari UM, Moretta L, Pronzato MA, Furfaro AL. HO-1 Induction in Cancer Progression: A Matter of Cell Adaptation. *Antioxidants*. 2017;6(2).
30. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*. 2006;86(2):583-650.
31. Kim SH, Zhong X, Gwak S-Y, Muna IA, Park S-A, Cha Y-N, et al. Abstract 69: Chemotherapy-induced cancer cell death diminishes therapeutic efficacy through heme oxygenase-1-mediated inactivation of M1-like tumor associated macrophages. *Cancer Research*. 2018;78(13 Supplement):69-.
32. Schaaf GJ, Maas RF, de Groene EM, Fink-Gremmels J. Management of oxidative stress by heme oxygenase-1 in cisplatin-induced toxicity in renal tubular cells. *Free Radic Res*. 2002;36(8):835-43.
33. Teicher BA, Holden SA, Liu CJ, Ara G, Herman TS. Minocycline as a modulator of chemotherapy and hyperthermia in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 1994;82(1):17-25.
34. Itoh Y, Yamada Y, Kazaoka Y, Ishiguchi T, Honda N. Combination of chemotherapy and mild hyperthermia enhances the anti-tumor effects of cisplatin and adriamycin in human bladder cancer T24 cells in vitro. *experimental and therapeutic medicine*. 2010;1(2):319-23.
35. Hultman B, Lind P, Glimelius B, Sundbom M, Nygren P, Haglund U, et al. Phase II study of patients with peritoneal carcinomatosis from gastric cancer treated with preoperative systemic chemotherapy followed by peritonectomy and intraperitoneal chemotherapy. *Acta Oncol*. 2013;52(4):824-30.
36. Van Lierde S, Denys H, Peeters M. Systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from non colorectal origin. *Cancer treatment and research*. 2007;134:441-8.
37. Folprecht G, Kohne CH, Lutz MP. Systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Cancer treatment and research*. 2007;134:425-40.
38. Cascales PA, Gil J, Galindo PJ, Machado F, Frutos IM, Paricio PP. Heterogeneity in patients and methods. A problem for hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in ovarian carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;158(2):361-2.
39. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J*. 2016;39(1):14-23.

40. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2012;3(3):251-61.
41. Goral V. Etiopathogenesis of Gastric Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(6):2745-50.
42. Bilici A. Treatment options in patients with metastatic gastric cancer: current status and future perspectives. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(14):3905-15.
43. Yarema R, Mielko J, Fetsych T, Ohorchak M, Skorzevska M, Rawicz-Pruszyński K, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in combined treatment of locally advanced and intraperitoneally disseminated gastric cancer: A retrospective cooperative Central-Eastern European study. *Cancer Med*. 2019;8(6):2877-85.
44. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
45. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-53.
46. Gold EB, Goldin SB. Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 1998;7(1):67-91.
47. Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(32):11182-98.
48. Gordon-Dseagu VL, Devesa SS, Goggins M, Stolzenberg-Solomon R. Pancreatic cancer incidence trends: evidence from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) population-based data. *Int J Epidemiol*. 2018;47(2):427-39.
49. Moran A, O'Hara C, Khan S, Shack L, Woodward E, Maher ER, et al. Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer*. 2012;11(2):235-42.
50. Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, et al. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA*. 2009;302(16):1790-5.
51. Giardiello FM, Offerhaus GJ, Lee DH, Krush AJ, Tersmette AC, Booker SV, et al. Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut*. 1993;34(10):1394-6.
52. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1447-53.
53. LaRusch J, Whitcomb DC. Genetics of pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011;27(5):467-74.

54. Maisonneuve P, Marshall BC, Lowenfels AB. Risk of pancreatic cancer in patients with cystic fibrosis. *Gut*. 2007;56(9):1327-8.
55. Capasso M, Franceschi M, Rodriguez-Castro KI, Crafa P, Cambie G, Miraglia C, et al. Epidemiology and risk factors of pancreatic cancer. *Acta Biomed*. 2018;89(9-S):141-6.
56. Mostafa ME, Erbarut-Seven I, Pehlivanoglu B, Adsay V. Pathologic classification of "pancreatic cancers": current concepts and challenges. *Chin Clin Oncol*. 2017;6(6):59.
57. Demir IE, Jager C, Schlitter AM, Konukiewicz B, Stecher L, Schorn S, et al. R0 Versus R1 Resection Matters after Pancreaticoduodenectomy, and Less after Distal or Total Pancreatectomy for Pancreatic Cancer. *Ann Surg*. 2018;268(6):1058-68.
58. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(19):1817-25.
59. Zhan HX, Xu JW, Wu D, Wu ZY, Wang L, Hu SY, et al. Neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Cancer Med*. 2017;6(6):1201-19.
60. Mahaseth H, Brutcher E, Kauh J, Hawk N, Kim S, Chen Z, et al. Modified FOLFIRINOX regimen with improved safety and maintained efficacy in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2013;42(8):1311-5.
61. Balescu I, Godoroja D, Gongu M, Tomulescu V, Copaescu C. Laparoscopic HIPEC for Peritoneal Carcinomatosis from Gastric Cancer - Technique and Early Outcomes of Our First Cases. *Chirurgia (Bucur)*. 2017;112(6):714-25.
62. Graziosi L, Cantarella F, Mingrone E, Gunnellini M, Cavazzoni E, Liberati M, et al. Preliminary results of prophylactic HIPEC in patients with locally advanced gastric cancer. *Ann Ital Chir*. 2013;84(5):551-6.
63. Tang L, Mei LJ, Yang XJ, Huang CQ, Zhou YF, Yonemura Y, et al. Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves survival of gastric cancer with peritoneal carcinomatosis: evidence from an experimental study. *J Transl Med*. 2011;9:53.
64. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177-93.
65. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 2013;24(6):1207-22.
66. Klimstra D, Arnold R, Capella C, Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds): *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon, IARC. 2010.
67. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2012;3(3):153-73.
68. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(17):1731-40.

69. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, Matzdorff A, Laechelt S, Hartmann JT, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(6):579-88.
70. Rodel C, Liersch T, Becker H, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with fluorouracil and oxaliplatin versus fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: initial results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(7):679-87.
71. Petrelli N, Douglass HO, Jr., Herrera L, Russell D, Stablein DM, Bruckner HW, et al. The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma: a prospective randomized phase III trial. Gastrointestinal Tumor Study Group. *J Clin Oncol.* 1989;7(10):1419-26.
72. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004;22(2):229-37.
73. Glocksien G, Gerken M, Lang SA, Klinkhammer-Schalke M, Piso P, Schlitt HJ. Oxaliplatin-based versus irinotecan-based hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with peritoneal metastasis from appendiceal and colorectal cancer: a retrospective analysis. *BMC Cancer.* 2014;14:807.
74. Arnesano F, Natile G. Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coordination Chemistry Reviews.* 2009;253(15-16):2070-81.
75. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573-84.
76. Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs.* 2000;59(4):9-17.
77. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(1):9-23.
78. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother.* 2003;4(6):889-901.
79. Misset JL, Bleiberg H, Sutherland W, Bekradda M, Cvitkovic E. Oxaliplatin clinical activity: a review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;35(2):75-93.
80. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 2008;26(21):3552-9.
81. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(7):502-16.
82. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-20.
83. Canovese L, Cattalini L, Chessa G, Tobe ML. Kinetics of the displacement of cyclobutane-1, 1-dicarboxylate from diammine (cyclobutane-1, 1-

- dicarboxylato) platinum (II) in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. 1988(8):2135-40.
84. Sherman SE, Lippard SJ. Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. *Chemical Reviews*. 1987;87(5):1153-81.
 85. Sorenson CM, Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer research*. 1988;48(16):4484-8.
 86. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 20):4077-85.
 87. Raaphorst GP, Doja S, Davis L, Stewart D, Ng CE. A comparison of hyperthermia cisplatin sensitization in human ovarian carcinoma and glioma cell lines sensitive and resistant to cisplatin treatment. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1996;37(6):574-80.
 88. Ohtsubo T, Saito H, Tanaka N, Matsumoto H, Sugimoto C, Saito T, et al. Enhancement of cisplatin sensitivity and platinum uptake by 40 °C hyperthermia in resistant cells. *Cancer Letters*. 1997;119(1):47-52.
 89. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2015;373(2037):20140185.
 90. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007;7(1):3-18.
 91. Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3644-54.
 92. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol*. 2001;59(4):657-63.
 93. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol*. 1996;270(4 Pt 2):F700-8.
 94. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*. 1997;57(10):1835-40.
 95. Gomez-Ruiz S, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Kaluderovic GN. On the discovery, biological effects, and use of Cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. *Bioinorg Chem Appl*. 2012;2012:140284.
 96. Westermarck F. Über die Behandlung des Ulcerierenden Cervixcarcinoms mittels konstanter warme. *Zentralblatt für Gynäkologie*. 1898;22:1335-7.
 97. Moyer HR, Delman KA. The role of hyperthermia in optimizing tumor response to regional therapy. *Int J Hyperthermia*. 2008;24(3):251-61.
 98. Jones E, Thrall D, Dewhirst MW, Vujaskovic Z. Prospective thermal dosimetry: the key to hyperthermia's future. *Int J Hyperthermia*. 2006;22(3):247-53.

99. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;43(1):33-56.
100. Vidair CA, Dewey WC. Two distinct modes of hyperthermic cell death. *Radiat Res*. 1988;116(1):157-71.
101. Horsman M, Overgaard J. Hot Topic: Can mild hyperthermia improve tumour oxygenation? *International journal of hyperthermia*. 1997;13(2):141-7.
102. Hegyi G, Szigeti GP, Szasz A. Hyperthermia versus Oncothermia: Cellular Effects in Complementary Cancer Therapy. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:672873.
103. Laszlo A. The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function. *Cell Prolif*. 1992;25(2):59-87.
104. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* (1985). 2002;92(5):2177-86.
105. Vaupel PW, Kelleher DK. Pathophysiological and vascular characteristics of tumours and their importance for hyperthermia: heterogeneity is the key issue. *Int J Hyperthermia*. 2010;26(3):211-23.
106. Vaupel P, Kelleher D. *Thermoradiotherapy and Thermochemotherapy: Biology, Physiology. Physics* Berlin: Springer Berlin Heidelberg. 1995:157-76.
107. Dewey WC, Hopwood LE, Sapareto SA, Gerweck LE. Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. *Radiology*. 1977;123(2):463-74.
108. Lepock JR. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperthermia*. 2005;21(8):681-7.
109. Sugahara T, van der Zee J, Kampinga HH, Vujaskovic Z, Kondo M, Ohnishi T, et al. Kadota Fund International Forum 2004. Application of thermal stress for the improvement of health, 15-18 June 2004, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan. Final report. *Int J Hyperthermia*. 2008;24(2):123-40.
110. Bensaude O, Bellier S, Dubois MF, Giannoni F, Nguyen VT. Heat-shock induced protein modifications and modulation of enzyme activities. *EXS*. 1996;77:199-219.
111. Kuhl NM, Kunz J, Rensing L. Heat shock-induced arrests in different cell cycle phases of rat C6-glioma cells are attenuated in heat shock-primed thermotolerant cells. *Cell Prolif*. 2000;33(3):147-66.
112. Lui JC, Kong SK. Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. *FEBS Lett*. 2007;581(1):109-17.
113. Ahmed Bettaieb PKWaDAA-B. *Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond*. Rangel L, editor: IntechOpen; 2013.
114. Pallepati P, Averill-Bates DA. Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(6):667-79.

115. Flanagan SW, Moseley PL, Buettner GR. Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett.* 1998;431(2):285-6.
116. Moriyama-Gonda N, Igawa M, Shiina H, Urakami S, Wada Y, Terashima M. Heat-induced cellular damage and tolerance in combination with adriamycin for the PC-3 prostate cancer cell line: relationships with cytotoxicity, reactive oxygen species and heat shock protein 70 expression. *Eur Urol.* 2000;38(2):235-40.
117. Katschinski DM, Robins HI, Schad M, Frede S, Fandrey J. Role of tumor necrosis factor alpha in hyperthermia-induced apoptosis of human leukemia cells. *Cancer Res.* 1999;59(14):3404-10.
118. Meigs JV. Tumors of the female pelvic organs: Macmillan; 1934.
119. Griffiths CT, Parker LM, Fuller JA. Role of cytoreductive surgical treatment in the management of advanced ovarian cancer. *Cancer treatment reports.* 1979;63(2):235-40.
120. Griffiths CT. Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian carcinoma. *National Cancer Institute Monograph.* 1975;42:101-4.
121. Spratt JS, Adcock RA, Muskovic M, Sherrill W, McKeown J. Clinical Delivery System for Intraperitoneal Hyperthermic Chemotherapy. *Cancer Research.* 1980;40(2):256-60.
122. Randle RW, Votanopoulos KI, Shen P, Levine EA, Stewart JH. Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. In: Chu QD, Gibbs JF, Zibari GB, editors. *Surgical Oncology: A Practical and Comprehensive Approach.* New York, NY: Springer New York; 2015. p. 491-512.
123. Gonzalez-Moreno S, Gonzalez-Bayon LA, Ortega-Perez G. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Rationale and technique. *World journal of gastrointestinal oncology.* 2010;2(2):68-75.
124. Deraco M, Glehen O, Helm C, Morris D, Van der Speeten K. Cytoreductive surgery and perioperative chemotherapy for peritoneal surface malignancy. Canada: Textbook and video atlas Cine-med. 2013.
125. De Somer F, Ceelen W, Delanghe J, De Smet D, Vanackere M, Pattyn P, et al. Severe hyponatremia, hyperglycemia, and hyperlactatemia are associated with intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion with oxaliplatin. *Peritoneal dialysis international.* 2008;28(1):61-6.
126. Markman M, Bundy BN, Alberts DS, Fowler JM, Clark-Pearson DL, Carson LF, et al. Phase III Trial of Standard-Dose Intravenous Cisplatin Plus Paclitaxel Versus Moderately High-Dose Carboplatin Followed by Intravenous Paclitaxel and Intraperitoneal Cisplatin in Small-Volume Stage III Ovarian Carcinoma: An Intergroup Study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology.* 2001;19(4):1001-7.
127. Sugarbaker PH, Yu W, Yonemura Y. Gastrectomy, peritonectomy, and perioperative intraperitoneal chemotherapy: the evolution of treatment strategies for advanced gastric cancer. *Semin Surg Oncol.* 2003;21(4):233-48.

128. Boutros C, Somasundar P, Espat NJ. Early results on the use of biomaterials as adjuvant to abdominal wall closure following cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *World journal of surgical oncology*. 2010;8(1):72.
129. MacArthur KM, Nicholl MB. Principles and Innovations in Peritoneal Surface Malignancy Treatment. *World J Oncol*. 2013;4(3):129-36.
130. Pillai K, Akhter J, Chua TC, Morris DL. A formulation for in situ lysis of mucin secreted in pseudomyxoma peritonei. *Int J Cancer*. 2014;134(2):478-86.
131. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2001;41:367-401.
132. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, et al. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*. 1997;15(13):1573.
133. Zeiss C. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary pathology*. 2003;40(5):481-95.
134. Kim KH, Seo HS, Choi HS, Choi I, Shin YC, Ko SG. Induction of apoptotic cell death by ursolic acid through mitochondrial death pathway and extrinsic death receptor pathway in MDA-MB-231 cells. *Arch Pharm Res*. 2011;34(8):1363-72.
135. Lesauskaitė V, Ivanovienė L. Programuota ląstelių mirtis: molekuliniai mechanizmai ir jų nustatymo metodai. *Medicina*. 2002;38(9):869-75.
136. Ghaforui-Fard S, Taheri M. Growth arrest specific transcript 5 in tumorigenesis process: An update on the expression pattern and genomic variants. *Biomed Pharmacother*. 2019;112:108723.
137. Cikla-Suzgun P, Kucukguzel SG. Recent advances in apoptosis: The role of hydrazones. *Mini Rev Med Chem*. 2019.
138. Hu SJ, Jiang SS, Zhang J, Luo D, Yu B, Yang LY, et al. Effects of apoptosis on liver aging. *World J Clin Cases*. 2019;7(6):691-704.
139. Stocker R, Perrella MA. Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation*. 2006;114(20):2178-89.
140. McCoubrey WK, Jr., Ewing JF, Maines MD. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch Biochem Biophys*. 1992;295(1):13-20.
141. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2014;13(2):397-406.
142. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med*. 1970;75(3):410-21.

143. Alam J, Shibahara S, Smith A. Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(11):6371-5.
144. Keyse SM, Applegate LA, Tromvoukis Y, Tyrrell RM. Oxidant stress leads to transcriptional activation of the human heme oxygenase gene in cultured skin fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 1990;10(9):4967-9.
145. LIN JH-C, VILLALON P, MARTASEK P, ABRAHAM NG. Regulation of heme oxygenase gene expression by cobalt in rat liver and kidney. *European Journal of Biochemistry*. 1990;192(3):577-82.
146. Subjeck JR, Shyy TT. Stress protein systems of mammalian cells. *Am J Physiol*. 1986;250(1 Pt 1):C1-17.
147. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*. 1999;103(1):129-35.
148. Wegiel B, Nemeth Z, Correa-Costa M, Bulmer AC, Otterbein LE. Heme oxygenase-1: a metabolic nuke. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(11):1709-22.
149. Sacca P, Meiss R, Casas G, Mazza O, Calvo JC, Navone N, et al. Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *British journal of cancer*. 2007;97(12):1683-9.
150. Lo SS, Lin SC, Wu CW, Chen JH, Yeh WI, Chung MY, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with risk of gastric adenocarcinoma and lymphovascular tumor invasion. *Annals of surgical oncology*. 2007;14(8):2250-6.
151. Degese MS, Mendizabal JE, Gandini NA, Gutkind JS, Molinolo A, Hewitt SM, et al. Expression of heme oxygenase-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinical data. *Lung Cancer*. 2012;77(1):168-75.
152. Kim HR, Kim S, Kim EJ, Park JH, Yang SH, Jeong ET, et al. Suppression of Nrf2-driven heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of lung cancer A549 cells toward cisplatin. *Lung Cancer*. 2008;60(1):47-56.
153. Zhang W, Qiao T, Zha L. Inhibition of heme oxygenase-1 enhances the radiosensitivity in human nonsmall cell lung cancer a549 cells. *Cancer Biother Radiopharm*. 2011;26(5):639-45.
154. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1):D1102-D9.
155. Cornelius CE, Rodgers PA. Prevention of neonatal hyperbilirubinemia in rhesus monkeys by tin-protoporphyrin. *Pediatr Res*. 1984;18(8):728-30.
156. La P, Fernando AP, Wang Z, Salahudeen A, Yang G, Lin Q, et al. Zinc protoporphyrin regulates cyclin D1 expression independent of heme oxygenase inhibition. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(52):36302-11.

157. Carasi P, Rodriguez E, da Costa V, Frigerio S, Brossard N, Noya V, et al. Heme-Oxygenase-1 Expression Contributes to the Immunoregulation Induced by *Fasciola hepatica* and Promotes Infection. *Front Immunol.* 2017;8:883.
158. STEVENSON DK, VREMAN HJ. Sn-Protoporphyrin: A Consideration of the First Clinical Trial in Human Neonates. *Pediatrics.* 1988;81(6):881-2.
159. Fernandez-Vizarra E, Enriquez JA, Perez-Martos A, Montoya J, Fernandez-Silva P. Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion.* 2011;11(1):207-13.
160. Vafai SB, Mootha VK. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature.* 2012;491(7424):374-83.
161. Mitra K, Lippincott-Schwartz J. Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches. *Current protocols in cell biology.* 2010;Chapter 4:Unit 4 25 1-1.
162. Wysocka-Kapcinska M, Kucharczyk R. [Structure, biogenesis and mechanism of function of the mitochondrial ATP synthase complex]. *Postepy biochemii.* 2012;58(3):344-52.
163. Cooper GM. *The cell : a molecular approach.* Washington, D.C.; Sunderland, Mass.: ASM Press ; Sinauer Associates; 2000.
164. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2012;26(6):711-23.
165. Winge DR. Sealing the mitochondrial respirasome. *Mol Cell Biol.* 2012;32(14):2647-52.
166. Barrientos A, Fontanesi F, Diaz F. Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Current protocols in human genetics.* 2009;Chapter 19:Unit19 3.
167. Srinivasan S, Spear J, Chandran K, Joseph J, Kalyanaraman B, Avadhani NG. Oxidative stress induced mitochondrial protein kinase A mediates cytochrome c oxidase dysfunction. *PloS one.* 2013;8(10):e77129.
168. Srinivasan S, Avadhani NG. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(6):1252-63.
169. Cuperus R, Leen R, Tytgat GA, Caron HN, van Kuilenburg AB. Fenretinide induces mitochondrial ROS and inhibits the mitochondrial respiratory chain in neuroblastoma. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(5):807-16.
170. Bellance N, Lestienne P, Rossignol R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:4015-34.
171. Chaffey N. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular biology of the cell.* 4th edn. Ann Bot. 2003;91(3):401-.
172. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):621-81.

173. Chance B, Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation I. Kinetics of oxygen utilization. *Journal of Biological Chemistry*. 1955;217(1):383-94.
174. Berberat PO, Dambrauskas Z, Gulbinas A, Giese T, Giese N, Kunzli B, et al. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(10):3790-8.
175. Yonemura Y, Endou Y, Sasaki T, Hirano M, Mizumoto A, Matsuda T, et al. Surgical treatment for peritoneal carcinomatosis from gastric cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2010;36(12):1131-8.
176. Seshadri RA, Glehen O. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in gastric cancer. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(3):1114-30.
177. Simkens GA, Rovers KP, Nienhuijs SW, de Hingh IH. Patient selection for cytoreductive surgery and HIPEC for the treatment of peritoneal metastases from colorectal cancer. *Cancer Manag Res*. 2017;9:259-66.
178. Simkens GA, van Oudheusden TR, Nieboer D, Steyerberg EW, Rutten HJ, Luyer MD, et al. Development of a Prognostic Nomogram for Patients with Peritoneally Metastasized Colorectal Cancer Treated with Cytoreductive Surgery and HIPEC. *Annals of surgical oncology*. 2016;23(13):4214-21.
179. Kepenekian V, Elias D, Passot G, Mery E, Goere D, Delroeux D, et al. Diffuse malignant peritoneal mesothelioma: Evaluation of systemic chemotherapy with comprehensive treatment through the RENAPE Database: Multi-Institutional Retrospective Study. *European journal of cancer*. 2016;65:69-79.
180. van de Vaart PJ, van der Vange N, Zoetmulder FA, van Goethem AR, van Tellingen O, ten Bokkel Huinink WW, et al. Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin-DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines. *European journal of cancer*. 1998;34(1):148-54.
181. Li Q, Wennborg A, Aurell E, Dekel E, Zou JZ, Xu Y, et al. Dynamics inside the cancer cell attractor reveal cell heterogeneity, limits of stability, and escape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(10):2672-7.
182. Zang ZJ, Ong CK, Cutcutache I, Yu W, Zhang SL, Huang D, et al. Genetic and structural variation in the gastric cancer kinome revealed through targeted deep sequencing. *Cancer Res*. 2011;71(1):29-39.
183. Jin Z, Jiang W, Wang L. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review). *Oncol Lett*. 2015;9(4):1502-8.
184. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M, et al. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2013;73(2):725-35.

185. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2:e71.
186. Tremblay E, Auclair J, Delvin E, Levy E, Menard D, Pshezhetsky AV, et al. Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J Cell Biochem*. 2006;99(4):1175-86.
187. Shah RN, Ibbitt JC, Alitalo K, Hurst HC. FGFR4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1alpha. *Oncogene*. 2002;21(54):8251-61.
188. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
189. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjostedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357(6352).
190. Guo Y, Ziesch A, Hocke S, Kampmann E, Ochs S, De Toni EN, et al. Overexpression of heat shock protein 27 (HSP27) increases gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells through S-phase arrest and apoptosis. *J Cell Mol Med*. 2015;19(2):340-50.
191. Kudo M, Asao T, Hashimoto S, Kuwano H. Closed continuous hyperthermic peritoneal perfusion model in mice with peritoneal dissemination of colon 26. *Int J Hyperthermia*. 2004;20(4):441-50.
192. Kirstein MN, Root SA, Moore MM, Wieman KM, Williams BW, Jacobson PA, et al. Exposure-response relationships for oxaliplatin-treated colon cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2008;19(1):37-44.
193. Bergs JW, Franken NA, Haveman J, Geijssen ED, Crezee J, van Bree C. Hyperthermia, cisplatin and radiation trimodality treatment: a promising cancer treatment? A review from preclinical studies to clinical application. *Int J Hyperthermia*. 2007;23(4):329-41.
194. Gabano E, Colangelo D, Ghezzi AR, Osella D. The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *J Inorg Biochem*. 2008;102(4):629-35.
195. Tang R, Zhu ZG, Qu Y, Li JF, Ji YB, Cai Q, et al. The impact of hyperthermic chemotherapy on human gastric cancer cell lines: preliminary results. *Oncol Rep*. 2006;16(3):631-41.
196. Zhang XL, Shi HJ, Wang JP, Tang HS, Wu YB, Fang ZY, et al. MicroRNA-218 is upregulated in gastric cancer after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and increases chemosensitivity to cisplatin. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(32):11347-55.
197. Muenyi CS, States VA, Masters JH, Fan TW, Helm CW, States JC. Sodium arsenite and hyperthermia modulate cisplatin-DNA damage responses and enhance platinum accumulation in murine metastatic ovarian cancer xenograft after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *J Ovarian Res*. 2011;4:9.

198. Yoo J, Lee YJ. Effect of hyperthermia and chemotherapeutic agents on TRAIL-induced cell death in human colon cancer cells. *J Cell Biochem.* 2008;103(1):98-109.
199. Sottile ML, Losinno AD, Fanelli MA, Cuello-Carrion FD, Montt-Guevara MM, Vargas-Roig LM, et al. Hyperthermia effects on Hsp27 and Hsp72 associations with mismatch repair (MMR) proteins and cisplatin toxicity in MMR-deficient/proficient colon cancer cell lines. *Int J Hyperthermia.* 2015;31(5):464-75.
200. Vertrees RA, Das GC, Popov VL, Coscio AM, Goodwin TJ, Logrono R, et al. Synergistic interaction of hyperthermia and Gemcitabine in lung cancer. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(10):1144-53.
201. Adachi S, Kokura S, Okayama T, Ishikawa T, Takagi T, Handa O, et al. Effect of hyperthermia combined with gemcitabine on apoptotic cell death in cultured human pancreatic cancer cell lines. *Int J Hyperthermia.* 2009;25(3):210-9.
202. Loggie BW, Thomas P. Gastrointestinal Cancers With Peritoneal Carcinomatosis: Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Oncology (Williston Park).* 2015;29(7):515-21.
203. Custodio JB, Cardoso CM, Santos MS, Almeida LM, Vicente JA, Fernandes MA. Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: prevention by thiol group protecting agents. *Toxicology.* 2009;259(1-2):18-24.
204. Ortega-Dominguez B, Aparicio-Trejo OE, Garcia-Arroyo FE, Leon-Contreras JC, Tapia E, Molina-Jijon E, et al. Curcumin prevents cisplatin-induced renal alterations in mitochondrial bioenergetics and dynamic. *Food Chem Toxicol.* 2017;107(Pt A):373-85.
205. Aichler M, Elsner M, Ludyga N, Feuchtinger A, Zangen V, Maier SK, et al. Clinical response to chemotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients is linked to defects in mitochondria. *J Pathol.* 2013;230(4):410-9.
206. Tacka KA, Dabrowiak JC, Goodisman J, Penefsky HS, Souid AK. Effects of cisplatin on mitochondrial function in Jurkat cells. *Chem Res Toxicol.* 2004;17(8):1102-11.
207. Zhao Z, Xu Y, Lu J, Xue J, Liu P. High expression of HO-1 predicts poor prognosis of ovarian cancer patients and promotes proliferation and aggressiveness of ovarian cancer cells. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico.* 2018;20(4):491-9.
208. Lv X, Song DM, Niu YH, Wang BS. Inhibition of heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell cancer Hep-2 cells to cisplatin. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death.* 2016;21(4):489-501.
209. Was H, Dulak J, Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Current drug targets.* 2010;11(12):1551-70.

210. D'Amico G, Lam F, Hagen T, Moncada S. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 11):2291-8.
211. Waltz PK, Kautza B, Luciano J, Dyer M, Stolz DB, Loughran P, et al. Heme Oxygenase-2 Localizes to Mitochondria and Regulates Hypoxic Responses in Hepatocytes. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2018;2018:2021645-.
212. Hooda J, Cadinu D, Alam MM, Shah A, Cao TM, Sullivan LA, et al. Enhanced heme function and mitochondrial respiration promote the progression of lung cancer cells. *PloS one.* 2013;8(5):e63402.
213. Pibiri M, Leoni VP, Atzori L. Heme oxygenase-1 inhibitor tin-protoporphyrin improves liver regeneration after partial hepatectomy. *Life sciences.* 2018;204:9-14.
214. Converso DP, Taillé C, Carreras MC, Jaitovich A, Poderoso JJ, Boczkowski J. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *The FASEB Journal.* 2006;20(8):1236-8.
215. Abdalla MY, Ahmad IM, Switzer B, Britigan BE. Induction of heme oxygenase-1 contributes to survival of Mycobacterium abscessus in human macrophages-like THP-1 cells. *Redox Biol.* 2015;4:328-39.

**STRAIPSNIAI, KURIUOSE PASKELBTI
DISERTACINIO
DARBO REZULTATAI**

1. Trumbeckaite S, Cesna V, Jasukaitiene A, Baniene R, Gulbinas A. Different mitochondrial response to cisplatin and hyperthermia treatment in human AGS, Caco-2 and T3M4 cancer cell lines. *J Bioenerg Biomembr.* 2018;50(5):329-38.
2. Cesna V, Sukovas A, Jasukaitiene A, Naginiene R, Barauskas G, Dambrauskas Z, et al. Narrow line between benefit and harm: Additivity of hyperthermia to cisplatin cytotoxicity in different gastrointestinal cancer cells. *World journal of gastroenterology.* 2018;24(10):1072-83.

KITI STRAIPSNIAI

1. Sukovas A, Cesna V, Jasukaitiene A, Barauskas G, Nadisauskiene RJ, Dambrauskas Z, et al. Response of OVCAR-3 Cells to Cisplatin and Hyperthermia: Does Hyperthermia Really Matter? *Anticancer research.* 2017;37(9):5011-8.
2. Cesna V, Sukovas A, Jasukaitiene A, Silkuniene G, Paskauskas S, Dambrauskas Z, et al. Stimulated upregulation of HO-1 is associated with inadequate response of gastric and ovarian cancer cell lines to hyperthermia and cisplatin treatment. *Oncology Letters.* 2019;18(2):1961-8.
3. Cesna V, Baniene R, Maziukiene A, Kmieliute K, Trumbeckaite S, Venclauskas L, et al. Effects of Cyanidin-3-O-glucoside on Synthetic and Metabolic Activity of Ethanol Stimulated Human Pancreatic Stellate Cells. *Phytother Res.* 2015;29(12):1894-900.

MOKSLINĖS KONFERENCIJOS, KURIOSE PRISTATYTI DARBO REZULTATAI

1. Čėsna Vaidotas, Sukovas Artūras, Jasukaitienė Aldona, Naginienė Rima, Barauskas Giedrius, Dambrauskas Žilvinas, Paškauskas Saulius, Gulbinas Antanas. **HIPEC in GI cancers. Is Hyperthermia Friend or Foe?** Stendinis pranešimas. Europos Gastroenterologų savaitė (UEG Week). 2017 spalio 28 – lapkričio 1 d. Barselona, Ispanija.
2. Čėsna Vaidotas, Sukovas Artūras, Jasukaitienė Aldona, Šilkūnienė Giedrė, Paškauskas Saulius, Dambrauskas Žilvinas, Gulbinas Antanas. **The Cytotoxic Effect of Hyperthermia in Addition to Cisplatin is Enhanced by Prior HO-1 Silencing in Ovarian, but not Gastric Cancer Cells.** Stendinis pranešimas. Europos Gastroenterologų savaitė (UEG Week). 2018 spalio 20 – 24 d. Viena, Austrija.
3. Antanas Gulbinas, Čėsna Vaidotas, Sukovas Artūras, Jasukaitienė Aldona, Naginienė Rima, Barauskas Giedrius, Dambrauskas Žilvinas, Paškauskas Saulius. **Narrow Line Between Benefit and Harm: Additivity of Hyperthermia to Cisplatin Cytotoxicity in Different Gastrointestinal Cancer Cells.** Stendinis pranešimas. 9-asis Baltijos šalių chirurgų asociacijos kongresas. 2018 gegužės 10-12 d. Klaipėda.
4. Jasukaitienė Aldona, Čėsna Vaidotas, Sukovas Artūras, Dambrauskas Žilvinas, Paškauskas Saulius, Gulbinas Antanas. **Stimulated Upregulation of HO-1 is Linked to Inadequate Response of Gastric and Ovarian Cancer Cell Lines to Hyperthermia and Cisplatin Treatment.** Stendinis pranešimas. 9-asis Baltijos šalių chirurgų asociacijos kongresas. 2018 gegužės 10-12 d. Klaipėda.

Basic Study

Narrow line between benefit and harm: Additivity of hyperthermia to cisplatin cytotoxicity in different gastrointestinal cancer cells

Vaidotas Cesna, Arturas Sukovas, Aldona Jasukaitiene, Rima Naginiene, Giedrius Barauskas, Zilvinas Dambrasukas, Saulius Paskauskas, Antanas Gulbinas

Vaidotas Cesna, Giedrius Barauskas, Department of Surgery, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas LT-50161, Lithuania

Arturas Sukovas, Saulius Paskauskas, Department of Obstetrics and Gynecology, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas LT-50161, Lithuania

Aldona Jasukaitiene, Zilvinas Dambrasukas, Antanas Gulbinas, Institute for Digestive Research, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas LT-50161, Lithuania

Rima Naginiene, Neuroscience Institute, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas LT-50161, Lithuania

ORCID number: Vaidotas Cesna (0000-0003-4719-8483); Arturas Sukovas (0000-0001-7007-3959); Aldona Jasukaitiene (0000-0002-4606-1963); Rima Naginiene (0000-0001-5770-2618); Giedrius Barauskas (0000-0002-4321-7280); Zilvinas Dambrasukas (0000-0003-2173-1294); Saulius Paskauskas (0000-0001-9930-4124); Antanas Gulbinas (0000-0002-6683-1339).

Author contributions: Cesna V, Sukovas A analyzed the data and drafted the manuscript; Jasukaitiene A performed most of experiments; intracellular cisplatin concentration analysis was performed by Naginiene R; Barauskas G, Paskauskas S and Gulbinas A designed and coordinated the research; Gulbinas A and Dambrasukas Z revised the manuscript for important intellectual content; all authors have read and approved the final version to be published.

Supported by the Research Council of Lithuania, No. SEN-01/2015.

Institutional review board statement: The study was reviewed and approved by the Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee.

Conflict-of-interest statement: All authors have nothing to disclose.

Data sharing statement: No additional data are available.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Unsolicited manuscript

Correspondence to: Zilvinas Dambrasukas, MD, PhD, Lecturer, Professor, Surgeon, Lithuanian University of Health Sciences, Institute for Digestive Research, Eiveniu str., 4, Kaunas LT-50161, Lithuania. zilvinas.dambrasukas@ismuni.lt
Telephone: +370-68-669255
Fax: +370-37-326179

Received: December 2, 2017

Peer-review started: December 2, 2017

First decision: December 27, 2017

Revised: January 2, 2018

Accepted: January 16, 2018

Article in press: January 16, 2018

Published online: March 14, 2018

Abstract**AIM**

To investigate the response to hyperthermia and chemotherapy, analyzing apoptosis, cytotoxicity, and cisplatin concentration in different digestive system cancer cells.

METHODS

AGS (gastric cancer cell line), Caco-2 (colon cancer cell line) and T3M4 (pancreatic cancer cell line) were

treated by cisplatin and different temperature setting (37 °C to 45 °C) either in isolation, or in combination. Treatment lasted for one hour. 48 h after the treatment viability was evaluated by MTT, cell apoptosis by Annexin V-PE and 7ADD flow cytometry. Intracellular cisplatin concentration was measured immediately after the treatment, using mass spectrometry. Isobologram analysis was performed to evaluate the mathematical combined effect of temperature and cisplatin.

RESULTS

AGS cells were the most sensitive to isolated application of hyperthermia. Hyperthermia, in addition to cisplatin treatment, did not provoke a synergistic effect at intervals from 37 °C to 41 °C in neither cancer cell line. However, a temperature of 43 °C enhanced cisplatin cytotoxicity for Caco-2 cells. Moreover, isobologram analysis revealed mathematical antagonistic effects of cisplatin and temperature combined treatment in AGS cells; variations between synergistic, additive, and antagonistic effects in Caco-2 cells; and additive and antagonistic effects in T3M4 cells. Combined treatment enhanced initiation of cell apoptosis in AGS, Caco-2, and T3M4 cells by 61%, 20%, and 19% respectively. The increase of intracellular cisplatin concentration was observed at 43 °C by 30%, 20%, and 18% in AGS, Caco-2, and T3M4 cells, respectively.

CONCLUSION

In addition to cisplatin, hyperthermia up to 43 °C does not affect the viability of cancer cells in a synergistic manner.

Key words: Hyperthermal intraperitoneal chemotherapy; Cisplatin; Hyperthermia; Isobolograms; Gastric cancer; Pancreatic cancer; Colon cancer

© The Author(s) 2018. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Hyperthermal intraperitoneal chemotherapy is widely used as a standard treatment option for peritoneum invading gastrointestinal cancer. Our *in vitro* results suggest that optimal temperature has to be taken into consideration for achieving optimal therapeutic effect. In addition to cisplatin, hyperthermia up to 43 °C does not affect the viability of AGS, Caco-2, and T3M4 cells in a synergistic manner. However, some regimens of hyperthermia and cisplatin treatment are beneficial regarding an increase in intracellular cisplatin concentration and enhancement apoptosis of gastrointestinal cancer cells.

Cesna V, Sukovas A, Jasukaitiene A, Naginiene R, Barauskas G, Dambrauskas Z, Paskauskas S, Gulbinas A. Narrow line between benefit and harm: Additivity of hyperthermia to cisplatin cytotoxicity in different gastrointestinal cancer cells. *World J Gastroenterol* 2018; 24(10): 1072-1083 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v24/i10/1072.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v24.i10.1072>

INTRODUCTION

For the past two decades, hyperthermal intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) has been considered as a treatment option for peritoneum invading gastrointestinal cancers^[1]. Various studies have demonstrated improved survival rates for gastric^[2] and colorectal cancers^[3-5]. The clinical application of hyperthermia is based on the assumption that it may enhance the effect of the chemotherapy, especially cisplatin-based treatments^[6-8]. There are some experimental studies providing evidence that hyperthermia can affect cell membranes, cytoskeletons, synthesis of macromolecules, increase drug-induced DNA damage, and inhibit the repair of drug-induced DNA damage^[9]. Hyperthermia may provide higher local cisplatin concentrations in tissues, indicating the pharmacokinetic advantage of its use and reduction of systemic toxicity^[10]. Hyperthermia-induced PARP blockade can increase chemotherapy-induced damage in BRCA-competent cells of ovarian and colon cancer^[11].

However, the results of available studies on the synergy of hyperthermia and cisplatin chemotoxicity, initiation of apoptosis, and intracellular accumulation of cisplatin in different gastrointestinal cancer cells are controversial. The opposite effect of hyperthermia on cisplatin sensitivity was observed in mismatch repair deficiency and mismatch repair proficiency in colon cancer cell lines^[12]. Isolated hyperthermia only temporarily inhibited cell proliferation without cytotoxic effects on gastric cancer cell lines. However, a synergistic effect of hyperthermia and chemotherapy on inhibiting proliferation and induction of cell death via the apoptotic pathway was reported^[13]. Interestingly, the hyperthermia-mediated increase of cellular accumulation of cisplatin and persistent DNA damage in gastric cancer cells was observed only with the addition of tumor necrosis factor^[14]. The expression of heat shock genes and proteins provides an adaptive mechanism for stress tolerance, allowing cells to survive non-physiologic conditions. However, the same adaptive mechanism can ultimately favor malignant transformation by interfering with pathways that regulate cell growth and apoptosis. Cytoprotection and thermotolerance raised the concern that heat-treated tumor cells might also be resistant to attack by immune effector mechanisms^[15]. Data on the additive effect of hyperthermia in terms of enhanced chemo-cytotoxicity in cancer cells of pancreatic origin are scarce.

Therefore, the aim of this study was to analyze the additivity of hyperthermia to cisplatin effects in gastric, pancreatic, and colorectal cancer cell lines evaluating cell cytotoxicity, apoptosis, and intracellular cisplatin concentration.

MATERIALS AND METHODS

Human cancer cell lines

The AGS and Caco-2 cell lines were purchased from

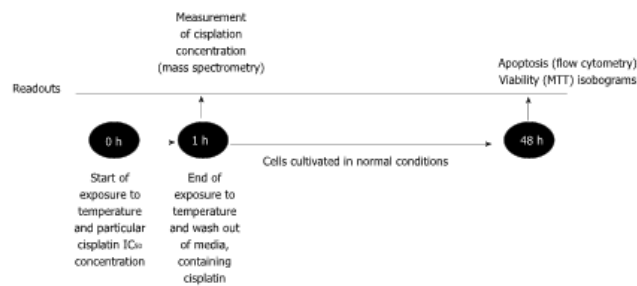


Figure 1 Design of experiment.

American Type Cell Culture (ATCC Manassas, VA, United States). AGS cell line is derived from a gastric adenocarcinoma of the stomach of a 54 year-old Caucasian female with no prior anti-cancer treatment. Caco-2 cells were isolated from a primary colonic tumor in a 72-year-old Caucasian male using the explant culture technique. Forms moderately well differentiated adenocarcinomas consistent with colonic primary grade II, in nude mice. T3M4 cell line was obtained as a gift from the European Pancreas Center (Heidelberg, Germany). This cell line was derived from a lymph node metastasis of the Japanese male patient, diagnosed with pancreatic ductal adenocarcinoma. It is characterized as pancreatic adenocarcinoma producing CEA, K-ras activated, and with slow cell growth. Cells were grown in RPMI medium (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) with the addition of 10% fetal bovine serum (Gibco/Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin solution (Gibco/Invitrogen). Flasks with cells were cultured in a humid incubator with a CO₂ level of 5% and temperature of 37 °C.

Design of experiment

Cancer cells were cultivated for 24 h in the conditions described above. Afterwards, cells were treated by one of two separate factors: temperature (37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C) or IC₅₀ dose of cisplatin, which was specifically determined for each cell line. Moreover, the combination of hyperthermia and cisplatin treatment was applied (Figure 1). The duration of treatment was 1 h as it reflected the treatment time under the clinical conditions of HIPEC. Cells were heated in humid incubators at particular temperature regimens. When temperature of the media reached desired level, we started the countdown of one hour exposure. Medium temperature was controlled by the electronic thermometer. Following the treatment, the medium was changed, and cells were cultivated for 48 h under the conditions as previously described. Afterwards, MTT and flow cytometry were performed (see "MTT assay" and "Cell apoptosis"). All experiments were repeated at least

three times.

MTT assay

Cytotoxicity of cisplatin or/and hyperthermia was determined by MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] (Gibco/Invitrogen) assay. The plate was incubated for 4 h at 37 °C after 5 mg/mL of the MTT reagent was added to the wells. Then the supernatant was removed, and DMSO (dimethyl sulfoxide) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) was added to solubilize the resulting formazan crystals. Absorbance measurements were made at 570 nm on the Sunrise spectrophotometer (Tecan GmbH, Grodig, Austria).

Cell apoptosis

The changes in apoptosis were evaluated after treatment of the cells by hyperthermia (43 °C) and the previously determined IC₅₀ of cisplatin (specific for particular cell line). Untreated cisplatin cells and normothermia (37 °C) cultivated cells were defined as controls. Forty-eight hours after the experiment (Figure 1), the rate of apoptosis was determined by flow cytometer Guava Nexin Annexin V Assay (Merck, Millipore United States and Canada). All the procedures were performed according to the manufacturer's instructions. Samples were measured using a Guava Personal Cell Analysis (PCA) Flow Cytometer (Merck, Millipore) and CytoSoft software.

Intracellular concentration of cisplatin

Immediately after the experiment, the cell lysate samples were diluted ten times with high purity deionized water. Concentration of total intracellular cisplatin was analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) NexION™ 300D (PerkinElmer, United States) equipped with nickel cones and a quartz cyclonic spray chamber as a sample introduction system and using collision mode kinetic energy discrimination (KED) with helium gas (purity ≥ 99.999%) to remove polyatomic interferences.

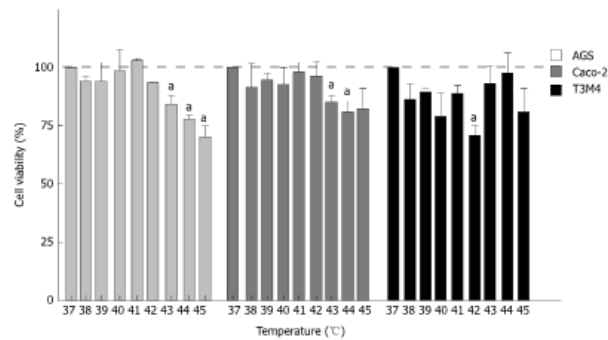


Figure 2 The different effect of the temperature on cancer cell viability. Following a one-hour exposure of AGS, Caco-2, and T3M4 cells to temperatures ranging from 37 °C to 42 °C, there were no significant viability changes. Starting at 43 °C, viability gradually decreased in AGS and Caco-2 cells. Activation of viability was evident in T3M4 cells at temperatures of 43 °C and 44 °C. All data were compared with a control group (viability of cells at temperature of 37 °C set as 100%). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test comparing selected groups to the control. * $P < 0.05$ vs control.

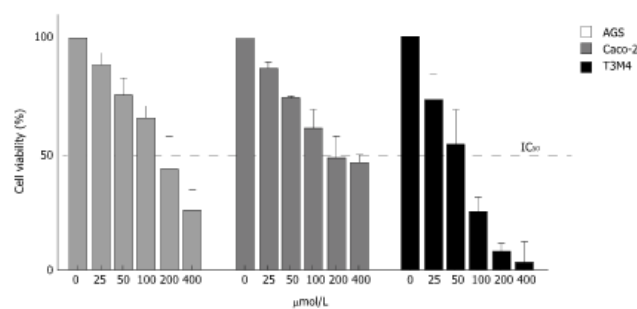


Figure 3 The influence of different cisplatin doses on cancer cell viability. Exposure to gradually increasing doses of cisplatin resulted in a linear decrease of viability in all cancer cell lines. T3M4 cells were the most sensitive to cisplatin, followed by Caco-2 and AGS cells. All data were compared with the control group (viability of cells at 37 °C set as 100%). Data are presented as the mean $\pm$ SE from ≥ 3 replicates.

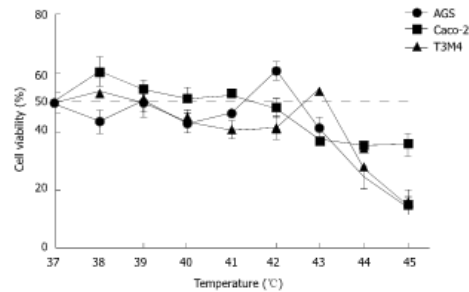


Figure 4 Effect of temperature and cisplatin (IC_{50}) combinations on cancer cell viability. The increase of temperature had no significant additional effect on cancer cell viability with the exception of extreme hyperthermia (44 °C–45 °C). Peaks of enhanced viability were observed in AGS and T3M4 cells at temperatures of 42 °C and 43 °C. Data are equalized to control (untreated cells) as 100% and shown in percentages. Dashed line shows IC_{50} .

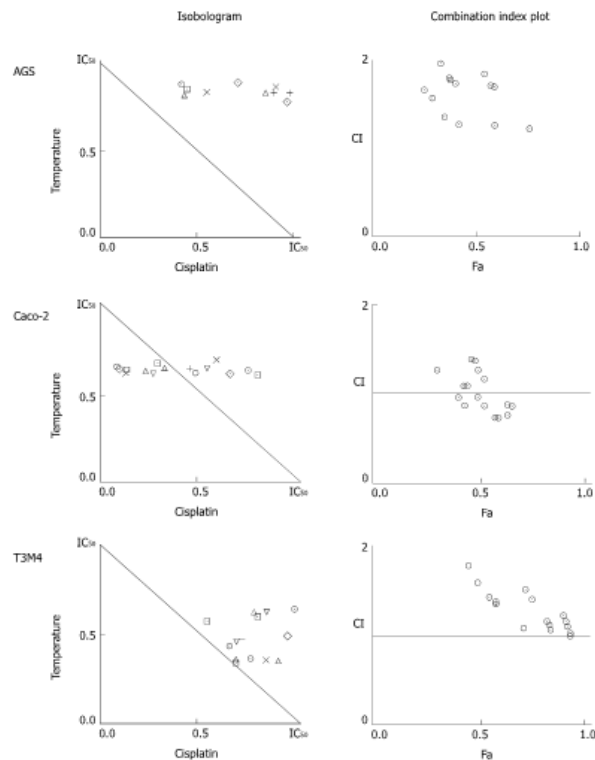


Figure 5 Interaction of temperature and cisplatin using the isobologram method for cancer cell viability. Mathematically revealed combined effects of hyperthermia and cisplatin differ in AGS, Caco-2, and T3M4 cell lines. The isobologram represents the interaction between cisplatin and temperature resulting in inhibition of cancer cell growth. The solid line in the diagram (Combination Index = 1) indicates the alignment of theoretical values of an additive interaction between two effectors and represents calculated conditions required to inhibit cell growth by 50%. Mathematically calculated IC₅₀ for AGS cells: temperature 51 °C, cisplatin 159 μmol/L; Caco-2 cells: temperature 66 °C, cisplatin 328 μmol/L; T3M4 cells: temperature 61 °C, cisplatin 0 μmol/L. Treatment combination points falling above the line indicate mathematical antagonism (below synergism, on the line additivity). Combination points that are distant from the line are not shown. Tables on the right represent the CI of selected combinations.

The calibration graphs for determination of Platinum by ICP-MS were prepared in the range of 0-50 ng/mL using Pure Plus 10 mg/L Multi-Element calibration standard 4 (PerkinElmer, United States). The working conditions of the spectrometer were optimized daily in order to obtain the maximal sensitivity and stability.

Isobologram analysis

To identify the confidence limits for the additive action of hyperthermia and cisplatin, isobologram analysis was applied. Data for analysis was obtained from the MTT test (Figure 4). Temperature data points of 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, and 45 °C, and

cisplatin concentration data points of 25 μmol/L, 50 μmol/L, 100 μmol/L, 200 μmol/L, and 400 μmol/L were used to define the dose effect curve for temperature and cisplatin, respectively. For combined treatment analysis, the following combinations of factors were used: 39 °C + 50 μmol/L; 39 °C + 100 μmol/L; 39 °C + 200 μmol/L; 40 °C + 50 μmol/L; 40 °C + 100 μmol/L; 40 °C + 200 μmol/L; 41 °C + 50 μmol/L; 41 °C + 100 μmol/L; 41 °C + 200 μmol/L; 42 °C + 50 μmol/L; 42 °C + 100 μmol/L; 42 °C + 200 μmol/L; 43 °C + 50 μmol/L; 43 °C + 100 μmol/L; 43 °C + 200 μmol/L; 44 °C + 50 μmol/L; 44 °C + 100 μmol/L; 44 °C + 200 μmol/L. The Chou median effect equation was used^[18]. It provides

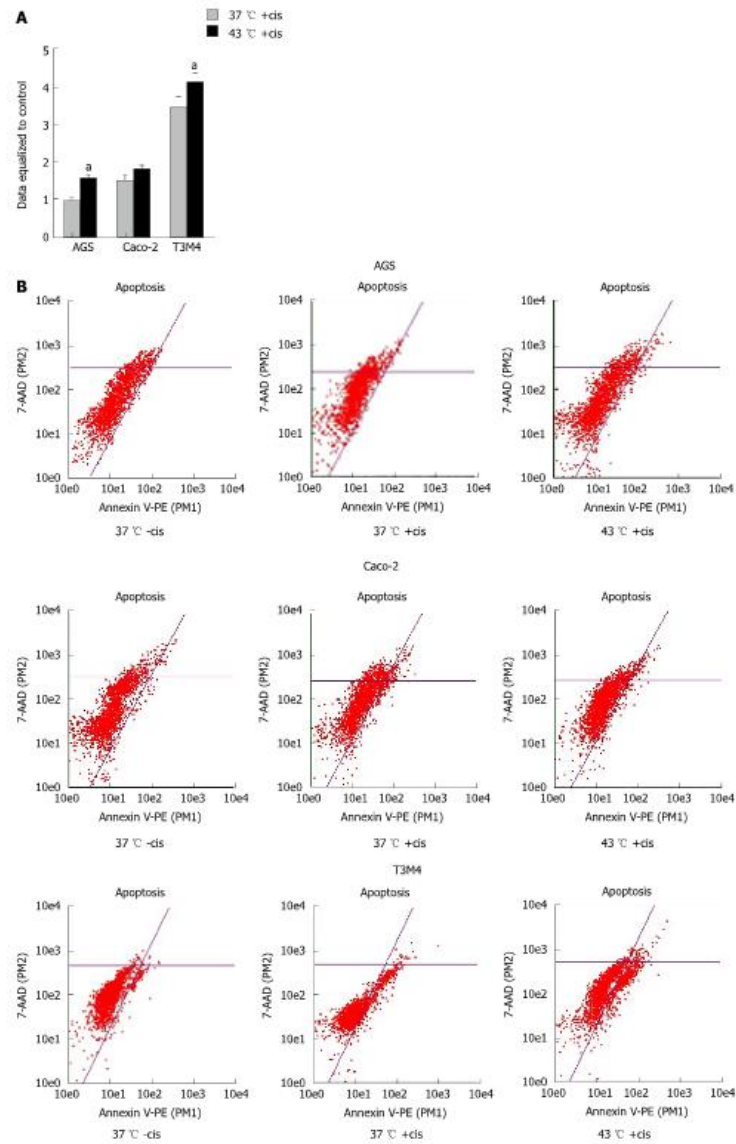


Figure 6 Apoptotic effect of temperature and cisplatin in cancer cells. A: Early apoptosis was significantly induced by hyperthermia in cisplatin-treated cells, with the exception of Caco-2 cells, where temperature had no significant role. The dashed line represents control rates of apoptosis in untreated cells. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test. * $P < 0.05$. B: Dot plots presenting change of apoptosis in cisplatin untreated/treated cells and cultivated in hyperthermia. "-cis": Cisplatin untreated cells; "+cis": Cisplatin treated cells.

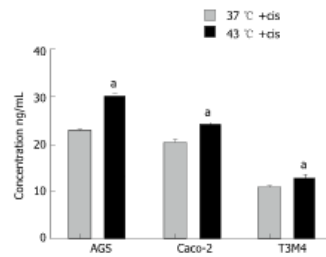


Figure 7 The change of the intracellular cisplatin concentration. Temperature of 43 °C significantly increased the intracellular concentration of cisplatin in all analyzed cell lines. Data are shown as concentrations of ng/mL. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test. * $P < 0.05$. "a": Cisplatin treated cells.

the theoretical basis for the combination index (CI), which enabled quantification of drug interaction effects defining synergism ($CI < 1$), additivity ($CI = 1$), or antagonism ($CI > 1$). The CompuSyn software (CompuSyn, Inc., Paramus, NJ, United States) was used for calculations.

RESULTS

Different cell lines have specific responses to hyperthermia

To evaluate the effect of hyperthermia *per se* on different cancer cells *in vitro*, we examined the response of the AGS, Caco-2, and T3M4 cell lines to temperature using a stepwise increase of one degree ranging from 37 °C to 45 °C. Cell viability was determined by MTT assay. Every cell line demonstrated a different pattern of response to hyperthermia (Figure 2). AGS cells were the most sensitive one to hyperthermia, where a temperature rise from 41 °C to 45 °C gradually decreased its viability by 30%. In the 37 °C to 41 °C interval, the viability stayed constant. Cells affected by 43 °C, 44 °C, and 45 °C dropped their viability rate by 16%, 22%, and 30%, respectively, as compared to the control (37 °C). A temperature increase from 37 °C to 42 °C had no significant effect on Caco-2 cells, but at 43 °C and 44 °C, its viability dropped by 14% and 20%, respectively, but stayed constant at higher temperatures. The response of T3M4 cells to the changes of temperature was different. Temperatures from 37 °C to 42 °C decreased its viability by 30%. At 43 °C, the viability of T3M4 cells sharply increased by 20% and stayed at this level in higher temperatures. Overall, only the AGS cell line responded to hyperthermia as implied, with gradual inhibition of cell viability.

Different cell lines respond to cisplatin in a comparable linear pattern but with specific sensitivity

Cisplatin induced a dose-dependent suppressor effect

on cancer cell viability, with a similar linear response in the AGS, Caco-2, and T3M4 cell lines. Pancreatic cancer cells (T3M4) were the most sensitive, revealing cisplatin IC_{50} at 48 $\mu\text{mol/L}$. The IC_{50} for Caco-2 was 194 $\mu\text{mol/L}$, and for AGS, it was 182 $\mu\text{mol/L}$ (Figure 3).

Insufficient temperature regimens can be detrimental in combined hyperthermic chemotherapy

Previously determined IC_{50} doses of cisplatin were used for particular cell lines during this experiment. Simultaneous exposure of cells to hyperthermic conditions and cisplatin triggered different response in AGS, Caco-2, and T3M4 cells (Figure 4). Overall, temperatures ranging from 37 °C to 41 °C had no detectable additive effect to cisplatin cytotoxicity. Interestingly, we observed peaks of viability in AGS (42 °C, increase by 33%) and T3M4 (43 °C, increase by 32%) cells. Higher temperatures, in addition to cisplatin exposure, inhibited cell growth dramatically; AGS viability dropped by 70% and T3M4 dropped by 76% at 45 °C. Application of hyperthermia in addition to cisplatin in the Caco-2 cell line gradually improved the cytotoxic effect and decreased the viability of cells by one-fourth from 43 °C to 45 °C. In summary, application of hyperthermia (43 °C and higher) in addition to cisplatin might enhance its cytotoxic effect in the Caco-2 cell line. However, lower (*e.g.*, < 43 °C) temperature regimens may even promote cell proliferation and worsen expected hyperthermal chemotherapy effects in AGS and T3M4 cell lines.

Isobologram analysis: Unpredictable response of the cells to hyperthermia and cisplatin

We constructed isobolograms to reveal if the combined application of hyperthermia and cisplatin had synergistic, antagonistic, or additive effects. Combination of temperature and cisplatin was strongly antagonistic for AGS cells in all studied data points. Combined application of hyperthermia and cisplatin was tripled in Caco-2 cells: synergistic (at 40 °C with 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ of cisplatin, at 43 °C with 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, and 200 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin, at 44 °C with 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, and 200 $\mu\text{mol/L}$ of cisplatin), additive (at 39 °C with 100 $\mu\text{mol/L}$ of cisplatin, at 41 °C with 100 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin, and at 42 °C with 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ of cisplatin), and antagonistic (at 39 °C with 200 $\mu\text{mol/L}$ of cisplatin, at 40 °C with 200 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin, at 41 °C with 50 $\mu\text{mol/L}$ and 200 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin, and at 42 °C with 200 $\mu\text{mol/L}$ of cisplatin). Combined treatment of T3M4 at 41 °C with 200 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin, at 42 °C with 50 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin, and at 44 °C with 100 $\mu\text{mol/L}$ and 200 $\mu\text{mol/L}$ of cisplatin had an additive effect. The remaining combinations were antagonistic (Figure 5).

Hyperthermia addition to cisplatin enhances rates of early apoptosis

Annexin V-PE flow cytometry analysis was performed to evaluate rates of early apoptosis. Cisplatin induced early

Table 1 Overview of results

Cell line	Effect of temperature at 43 °C on cancer cells viability	IC ₅₀ dose of cisplatin	Combined effect of temperature, at 43 °C and IC ₅₀ dose of cisplatin on cancer cells viability	Effect of temperature in addition to IC ₅₀ dose of cisplatin on cancer cell apoptosis	Effect of temperature on intracellular cisplatin concentration
AGS	↓↓	182	↓	↑	↑↑↑
Caco-2	↓	194	↓↓	-	↑↑
T3M4	-	48	-	↑	↑

The number of the arrows represents strength of effect.

apoptosis in Caco-2 and T3M4 cells 1.5-fold and 3.4-fold, respectively. The number of dead/late apoptotic cells was insignificant in the following groups: 0.5% of Caco-2 cells and 2.9% of T3M4 cells. Hyperthermia of 43 °C in addition to cisplatin induced early apoptosis as compared to cells treated in normothermia by 20% in Caco-2 (1% of dead cells) and 19% (3.9% dead cells) in T3M4, respectively. Interestingly, early apoptosis was not significantly induced by isolated cisplatin treatment in AGS cells. Rates of AGS early apoptosis were not significantly induced by an isolated cisplatin treatment. However, application of combined treatment with hyperthermia and cisplatin increased early apoptosis by 61% (0.4% dead cells) (Figure 6).

Hyperthermia increases intracellular cisplatin concentration

Hypothesizing that hyperthermia promotes delivery of cisplatin to cancer cells, we aimed to measure intracellular cisplatin concentrations. Analysis was performed immediately following a one-hour exposure to the IC₅₀ of cisplatin at 37 °C and 43 °C. Overall, 43 °C promoted an increase of intracellular cisplatin concentration. The concentration was significantly increased in AGS, Caco-2, and T3M4 cells by 30%, 20%, and 18%, respectively (Figure 7).

DISCUSSION

Hyperthermal intraperitoneal chemotherapy has been applied to treat peritoneal carcinomatosis for gastric^[17-19], colorectal^[20], ovarian^[21], and peritoneal mesothelioma^[22] and has aided in prolonged long-term survival in selected patients^[23-26]. In HIPEC, intraperitoneal free cancer cells and the serous surface of the bowel and peritoneum are exposed to high concentrations of chemotherapy agents. Hyperthermia itself may affect cell cytoskeletons, cell membranes, synthesis of macromolecules, and DNA repair mechanisms^[9].

As the origin, genotypes, and phenotypes of free cancer cells may be quite different, it seems unreasonable to treat all peritoneal metastases the same way. Until now, basic information regarding the contribution of hyperthermia to intraperitoneal chemotherapeutic agents in different gastrointestinal cancers is poor and controversial. In this *in vitro* study, we have applied hyperthermia and chemotherapy

for 1 h in order to mimic clinical conditions. We have performed our aimed readouts at 48 h following the experiment as the earlier readouts have not proven any changes.

We have chosen three most common peritoneum invading GI cancers in our study, selecting one cancer cell line per cancer type. It is known that various cancer cells of same cancer type are different in the manner of apoptosis, biomarker expression etc.^[27]. This study is an overview, which leads to a better knowledge of gastric, pancreatic and colorectal cancer cell response to simultaneous hyperthermia and cisplatin treatment.

Until now, our analyzed cells are well examined in various aspects. AGS cells in 516 analyzed genes, have 40 mutations, like KRAS, WNK1 and WNK2^[28]. Overexpression of HER-2, EGFR, VEGF, Bcl-2 biomarkers was investigated in gastric cancer cells^[29]. Mutations of *SMAD4* and *TP53* genes and overexpression of *ILF3*, *TIMP3* genes are present in Caco-2 cells^[30-32]. T3M4 are the least examined cells. No known gene mutations were found^[33] and they are known to overexpress growth factors as FGFR4^[34].

Our experiments revealed the differences of cell viability in response to isolated hyperthermia. We even observed positive effects of isolated hyperthermia on the viability of pancreatic cancer cells. We hypothesize that this effect could be related to the activation of the cytoprotective heat shock proteins (HSP), an effect described in other studies^[35]. It is known that higher temperatures can enhance thermotolerance by activating HSPs^[36]. However, gastric cancer cells (AGS) and colon cancer cells (Caco-2) responded to hyperthermia with a significant drop of viability at 43 °C. One study demonstrated that hyperthermia alone can significantly reduce viability of the Colon 26 cancer cells^[37]. The investigation of the effect of local heat used for ablation of tumor nodules showed that exposing cultured Caco-2 cells to 48 °C for 2 h resulted in an approximately 80% reduction of cell viability^[38]. However, in our study, the viability of Caco-2 cells decreased only by 14% after exposure to 43 °C for 1 h.

Hyperthermia may enhance the effect of chemotherapy, especially cisplatin-based treatments^[6-8]. Ferraro *et al.*^[39] studied the effects of hyperthermia and cisplatin on model protein hen eggs and revealed that increased temperature enhanced cisplatin cytotoxicity.

Tang *et al.*^[12] have shown a synergistic effect of hyperthermia and chemotherapy inhibiting

proliferation in six gastric cancer cell lines, including AGS, in a certain range of chemoagent (cisplatin) concentration. Moreover, hyperthermia, in addition to chemotherapy, induced cell apoptosis as the major type of death. MicroRNA-218 upregulation and increased chemosensitivity were observed in gastric cancer cells after exposing them to hyperthermal conditions^[40]. However, in our study, only temperatures higher than 43 °C in addition to cisplatin exposure inhibited cell growth. In the isobologram analysis, the combination of temperature and cisplatin was antagonistic for AGS cells. On the contrary, AGS cells showed an increased viability of 33% at 42 °C. This is an important observation as it may highlight the possibility that technically incorrect temperature regimens may activate metabolism of cancer cells and increase their resistance to chemotherapy. Interestingly, we observed that application of cisplatin to gastric cancer (AGS) cells for one h had no significant impact on cell apoptosis. However, the combination of cisplatin and hyperthermia (43 °C) increased the effect by 61%. Our results suggest that temperature and cisplatin are not always acting in synergy as was shown by isobolograms.

Previous *in vitro* investigations have revealed that the response of the colon cancer cells to hyperthermia and chemotherapeutic drug differ by cell type. Some authors have shown that hyperthermia alone significantly decreased the viability of the Colon 26 cancer cells^[37], and the cytotoxic effect of cisplatin^[41] was enhanced at hyperthermal conditions. After exposure to 43 °C, the activity of oxaliplatin markedly and rapidly increased, indicating its inhibiting potential in Colon 26 cells^[42]. Significant synergy of hyperthermia and chemotherapy was detected in CX-1 cells^[43] in similar experimental conditions (42 °C for 1 h). Some authors described similar results in HCT116+ch2 (MMR-) cells that were resistant to heat treatment at temperatures of 41 °C and 42 °C^[12]. The exposition of the colon carcinoma cell lines CX-1 and HTC 116 to 42 °C for 1 h revealed no change in cell viability^[13,43]. Moreover, HCT116+ch2 (MMR-) cells exposed to a mild heat were 1.42-fold more resistant to cisplatin^[12]. We observed that the addition of hyperthermia to cisplatin treatment had a slight positive influence on Caco-2 cell viability. At 43 °C, cisplatin had an insignificant effect regarding apoptosis, whereas intracellular cisplatin concentration was elevated by 26% as compared to the control. Isobologram analysis showed approximately 50% of selected cisplatin and temperature treatment combinations acted in a synergistic manner, indicating that some of hyperthermic chemotherapy regimens might be useful.

Recent studies reported that hyperthermia increased sensitivity to gemcitabine^[44] and enhanced gemcitabine-related apoptotic cell death in pancreatic cancer cells^[45]. Moreover, the improved drug delivery and antitumor effects in combination with mild hyperthermia were reported^[46].

The combined cytotoxic effect of cisplatin and

hyperthermia in T3M4 cells was evident only when the temperature was higher than 43 °C. These cells were the most sensitive to cisplatin with the lowest IC₅₀. Cisplatin amplified apoptosis by 3.4-fold and hyperthermia increased the effect by 19%; however, it was 3-fold less in the gastric cancer cell line. Similar to AGS cells, T3M4 isobologram analysis revealed that the combination of treatments acted in an antagonistic manner in most of the selected combinations; however, in few of them, the additive effect of the two agents was revealed. An extremely limited increase of intracellular cisplatin concentration in hyperthermia could be observed in pancreatic cancer cells. Our experiments elucidated that the response of T3M4 cells differs from other studied gastrointestinal cancer cells (AGS and Caco-2). A review by Loggie *et al.*^[47] postulated that hyperthermia combined with chemotherapy is probably beneficial for less aggressive tumors and should be the standard of care for appendiceal and colorectal cancers.

Caco-2 cell results varied from the other cells in our study. In some cases, they acted in unpredictable manner. One of the possible explanations for this discrepancy, would be that Caco-2 cells can differentiate their phenotype prior to post-confluence stage, and lead to the change of morphology, degree of differentiation etc^[48].

In summary, we have proven that the role of hyperthermia in addition to cisplatin is different in gastric, colonic, and pancreatic cancer cells. The overview of the basic results is shown in Table 1. Different cancer cells respond to combined treatments in different manners, and temperature-induced apoptosis is initiated by various pathways^[49].

In conclusion, hyperthermia up to 43 °C in addition to cisplatin does not influence AGS, Caco-2, and T3M4 cell viability in a synergistic manner. However, some regimens of hyperthermia and cisplatin treatment are beneficial regarding the apoptotic response and an increase of intracellular cisplatin concentration.

ARTICLE HIGHLIGHTS

Research background

Hyperthermal intraperitoneal chemotherapy is an option to treat peritoneum invading gastrointestinal cancer. Until now the results of hyperthermal intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) treatment are controversial, needing unification in selected parameters of the treatment. In different cancer centers, the procedure varies in time setting, hyperthermia level and different chemotherapy drugs are used.

Research motivation

As HIPEC is widely used in clinical practice, still there is a lack of studies, analyzing the impact of hyperthermia and cisplatin to cancer cells. The cellular response to the treatment is still not clear. There is no clear data defining optimal timing and temperature of the procedure.

Research objectives

Our objective was to analyze gastric, pancreatic and colorectal cancer cells response to hyperthermia and cisplatin treatment regarding viability, change of intracellular cisplatin concentration and apoptosis rate.

Research methods

We used AGS (gastric cancer), T3M4 (pancreatic cancer) and Caco-2 (colorectal cancer) cells. Mimicking HIPEC procedure, cells were treated with specific to each cell line IC₅₀ dose of cisplatin at the temperature regimens ranging from 37 °C to 45 °C. Treatment lasted for one hour. Later cells were harvested in normothermia, changing cisplatin containing media to fresh one. Immediately after experiment, intracellular cisplatin concentration was measured, using mass spectrometer analysis. For other readouts cells were harvested for 48 hours in normal conditions. MTT test was performed for cellular viability evaluation and isobologram analysis. We used flow cytometry to determine apoptosis change of hyperthermia and cisplatin treatment.

Research results

Cells responded to hyperthermia (ranging from 38 °C to 45 °C) in a different manner. Viability of AGS cells was the most hyperthermia-dependent, decreasing by 30% (from 41 °C to 45 °C). Caco-2 cell viability had no change in the interval from 38 °C to 42 °C. Higher temperature regimens dropped its viability rate by 14%-20%. T3M4 cells reacted differently. Viability dropped until 42 °C, but at higher temperature regimens, we observed increase of viability. While in simultaneous hyperthermia and cisplatin treatment, we observed no change of viability until 41 °C in all cancer cells. Higher temperatures inhibited cell growth. Interestingly, we observed peaks of viability in AGS (42 °C, increase by 33%) and T3M4 (43 °C, increase by 32%) cells. Putting all MTT data to isobologram analysis, we observed synergistic, antagonistic, or additive effects of combined treatment. Hyperthermia and cisplatin treatment was strongly antagonistic in AGS cells. In Caco-2 cells we observed synergistic, additive and antagonistic effects of simultaneous treatment. Few combined treatment regimens were additive for T3M4 cells, and remaining antagonistic. Cisplatin induced early apoptosis in Caco-2 and T3M4 cells 1.5-fold and 3.4-fold, respectively. Hyperthermia of 43 °C in addition to cisplatin induced early apoptosis as compared to cells treated in normothermia by 20% in Caco-2 and 19% in T3M4, respectively. Hyperthermia strongly decreased intracellular cisplatin concentration in AGS, Caco-2, and T3M4 cells by 30%, 20%, and 18%, respectively.

Research conclusions

Our data suggest that HIPEC conditions have to be cancer type dependent and well revised. Particular temperature regimens can do more harm, than benefit, by activating cell division and growth.

Research perspectives

To get better knowledge of hyperthermia and cisplatin treatment effects, future studies should include more cancer cell lines per cancer type. Also, in vivo vehicle should be established.

REFERENCES

- Glehen O, Mohamed F, Gilly FN. Peritoneal carcinomatosis from digestive tract cancer: new management by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemohyperthermia. *Lancet Oncol* 2004; **5**: 219-228 [PMID: 15050953 DOI: 10.1016/S1470-2045(04)01425-1]
- Coccolini F, Cotte E, Glehen O, Lotti M, Poiasina E, Catena F, Yonemura Y, Ansaloni L. Intraperitoneal chemotherapy in advanced gastric cancer. Meta-analysis of randomized trials. *Eur J Surg Oncol* 2014; **40**: 12-26 [PMID: 24290371 DOI: 10.1016/j.ejso.2013.10.019]
- Bloemendaal AL, Verwaal VJ, van Ruth S, Boot H, Zoetmulder FA. Conventional surgery and systemic chemotherapy for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a prospective study. *Eur J Surg Oncol* 2005; **31**: 1145-1151 [PMID: 16084051 DOI: 10.1016/j.ejso.2005.06.002]
- Glehen O, Cotte E, Schreiber V, Sayag-Beaujard AC, Vignal J, Gilly FN. Intraperitoneal chemohyperthermia and attempted cytoreductive surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Br J Surg* 2004; **91**: 747-754 [PMID: 15164446 DOI: 10.1002/bjs.4473]
- Chua TC, Esquivel J, Pelz JO, Morris DL. Summary of current therapeutic options for peritoneal metastases from colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2013; **107**: 566-573 [PMID: 22688776 DOI: 10.1002/jso.23189]
- Bergs JW, Franken NA, Haveman J, Geijsen ED, Crezee J, van Bree C. Hyperthermia, cisplatin and radiation trimodality treatment: a promising cancer treatment? A review from preclinical studies to clinical application. *Int J Hyperthermia* 2007; **23**: 329-341 [PMID: 17558732 DOI: 10.1080/02656730701378684]
- Alvarez-Berrios MP, Castillo A, Mendez J, Soto O, Rinaldi C, Torres-Lugo M. Hyperthermic potentiation of cisplatin by magnetic nanoparticle heaters is correlated with an increase in cell membrane fluidity. *Int J Nanomedicine* 2013; **8**: 1003-1013 [PMID: 23493492 DOI: 10.2147/IJN.S38842]
- Gabano E, Colangelo D, Ghezzi AR, Osella D. The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *J Inorg Biochem* 2008; **102**: 629-635 [PMID: 18037490 DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2007.10.006]
- van de Vaart PJ, van der Vange N, Zoetmulder FA, van Goethem AR, van Tellingen O, ten Bokkel Huinink WW, Beijnen JH, Bartelink H, Begg AC. Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin-DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1998; **34**: 148-154 [PMID: 9624250 DOI: 10.1016/S0959-8049(97)00370-5]
- Ried M, Potzger T, Braune N, Diez C, Neu R, Szklavari Z, Schälke B, Hofmann HS. Local and systemic exposure of cisplatin during hyperthermic intrathoracic chemotherapy perfusion after pleurectomy and decortication for treatment of pleural malignancies. *J Surg Oncol* 2013; **107**: 735-740 [PMID: 23386426 DOI: 10.1002/jso.23321]
- Schaaf L, Schwab M, Ulmer C, Heine S, Mürdter TE, Schmid JO, Sauer G, Aulitzky WE, van der Kuip H. Hyperthermia Synergizes with Chemotherapy by Inhibiting PARP1-Dependent DNA Replication Arrest. *Cancer Res* 2016; **76**: 2868-2875 [PMID: 27013194 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2908]
- Sotile ML, Losinno AD, Fanelli MA, Cuello-Carrión FD, Montt-Guevara MM, Vargas-Roig LM, Nadin SB. Hyperthermia effects on Hsp27 and Hsp72 associations with mismatch repair (MMR) proteins and cisplatin toxicity in MMR-deficient/proficient colon cancer cell lines. *Int J Hyperthermia* 2015; **31**: 464-475 [PMID: 26043026 DOI: 10.3109/02656736.2015.1026848]
- Tang R, Zhu ZG, Qu Y, Li JF, Ji YB, Cai Q, Liu BY, Yan M, Yin HR, Lin YZ. The impact of hyperthermic chemotherapy on human gastric cancer cell lines: preliminary results. *Oncol Rep* 2006; **16**: 631-641 [PMID: 16865266 DOI: 10.3892/or.16.3.631]
- Buell JF, Reed E, Lee KB, Parker RJ, Venzon DJ, Amikura K, Arnold S, Fraker DL, Alexander HR. Synergistic effect and possible mechanisms of tumor necrosis factor and cisplatin cytotoxicity under moderate hyperthermia against gastric cancer cells. *Ann Surg Oncol* 1997; **4**: 141-148 [PMID: 9084851 DOI: 10.1007/BF02303797]
- Milani V, Noessner E. Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; **55**: 312-319 [PMID: 16151807 DOI: 10.1007/s00262-005-0052-3]
- Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 621-681 [PMID: 16968952 DOI: 10.1124/pr.58.3.10]
- Seshadri RA, Glehen O. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2016; **22**: 1114-1130 [PMID: 26811651 DOI: 10.3748/wjg.v22.i3.1114]
- Yonemura Y, Canbay E, Li Y, Coccolini F, Glehen O, Sugarbaker PH, Morris D, Moran B, Gonzalez-Moreno S, Deraco M, Piso P, Elias D, Ballett D, Ishibashi H, Mizumoto A, Verwaal V, Mahtem H. A comprehensive treatment for peritoneal metastases from gastric cancer with curative intent. *Eur J Surg Oncol* 2016; **42**: 1123-1131 [PMID: 27160355 DOI: 10.1016/j.ejso.2016.03.016]

- 19 Yuan M, Wang Z, Hu G, Yang Y, Lv W, Lu F, Zhong H. A retrospective analysis of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Mol Clin Oncol* 2016; **5**: 395-399 [PMID: 27446587 DOI: 10.3892/mco.2016.918]
- 20 Simkens GA, van Oudheusden TR, Braam HJ, Wiersema MJ, Nienhuijs SW, Rutten HJ, van Ramshorst B, de Hingh IH. Cytoreductive surgery and HIPEC offers similar outcomes in patients with rectal peritoneal metastases compared to colon cancer patients: a matched case control study. *J Surg Oncol* 2016; **113**: 548-553 [PMID: 27110701 DOI: 10.1002/jso.24169]
- 21 Spiliotis J, Halkia E, Lianos E, Kalantzi N, Grivas A, Efsthathiou E, Giassas S. Cytoreductive surgery and HIPEC in recurrent epithelial ovarian cancer: a prospective randomized phase III study. *Ann Surg Oncol* 2015; **22**: 1570-1575 [PMID: 25391263 DOI: 10.1245/s10434-014-4157-9]
- 22 Kepenekian V, Elias D, Passot G, Mery E, Goere D, Delroeuux D, Quenet F, Ferron G, Pezet D, Guilloit JM, Meus P, Pocard M, Bereder JM, Abboud K, Arvieux C, Brigand C, Marchal F, Classe JM, Lorimier G, De Chaisemartin C, Guyon F, Mariani P, Ortega-Deballon P, Isaac S, Maurice C, Gilly FN, Glehen O, French Network for Rare Peritoneal Malignancies (RENAPE). Diffuse malignant peritoneal mesothelioma: Evaluation of systemic chemotherapy with comprehensive treatment through the RENAPE Database: Multi-Institutional Retrospective Study. *Eur J Cancer* 2016; **65**: 69-79 [PMID: 2742649 DOI: 10.1016/j.ejca.2016.06.002]
- 23 Michalakos J, Georgatos SD, de Bree E, Poliodaki H, Romanos J, Georgoulas V, Tsiatsis DD, Theodoropoulos PA. Short-term exposure of cancer cells to micromolar doses of paclitaxel, with or without hyperthermia, induces long-term inhibition of cell proliferation and cell death in vitro. *Ann Surg Oncol* 2007; **14**: 1220-1228 [PMID: 17206477 DOI: 10.1245/s10434-006-9305-4]
- 24 Zhang XL, Hu AB, Cui SZ, Wei HB. Thermotherapy enhances oxaliplatin-induced cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 646-653 [PMID: 22363135 DOI: 10.3748/wjg.v18.i7.646]
- 25 Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; **5**: 85-91 [PMID: 422420 DOI: 10.1016/0360-3016(79)90044-0]
- 26 Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Slooten GW, van Tinteren H, Boot H, Zoetmulder FA. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 3737-3743 [PMID: 14551293 DOI: 10.1200/JCO.2003.04.187]
- 27 Li Q, Wennborg A, Aurell E, Dekel E, Zou JZ, Xu Y, Huang S, Ernberg I. Dynamics inside the cancer cell attractor reveal cell heterogeneity, limits of stability, and escape. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; **113**: 2672-2677 [PMID: 26929366 DOI: 10.1073/pnas.1519210113]
- 28 Zang ZJ, Ong CK, Cutcutache I, Yu W, Zhang SL, Huang D, Ler LD, Dykema K, Gan A, Tao J, Lim S, Liu Y, Futreal PA, Grabsch H, Furge KA, Goh LK, Rozen S, Teh BT, Tan P. Genetic and structural variation in the gastric cancer genome revealed through targeted deep sequencing. *Cancer Res* 2011; **71**: 29-39 [PMID: 21097718 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1749]
- 29 Jin Z, Jiang W, Wang L. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review). *Oncol Lett* 2015; **9**: 1502-1508 [PMID: 25788990 DOI: 10.3892/ol.2015.2959]
- 30 Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandswaran A, Palmieri M, Day F, Li S, Tsui C, Lipton L, Desai J, Jones IT, McLaughlin S, Ward RL, Hawkins NJ, Ruszkiewicz AR, Moore J, Zhu HJ, Mariadason JM, Burgess AW, Busam D, Zhao Q, Strausberg RL, Gibbs P, Sieber OM. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res* 2013; **73**: 725-735 [PMID: 23139211 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2706]
- 31 Ahmed D, Eide PW, Ellertsen JA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Løthe RA. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2013; **2**: e71 [PMID: 24042735 DOI: 10.1038/oncsis.2013.35]
- 32 Tremblay E, Auclair J, Delvin E, Levy E, Ménard D, Pshezhetsky AV, Rivard N, Seidman EG, Sinnott D, Vachon PH, Beaulieu JF. Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J Cell Biochem* 2006; **99**: 1175-1186 [PMID: 16795037 DOI: 10.1002/jcb.21015]
- 33 Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, Gress T, Bassi C, Klöppel G, Kalihoff H, Ungefroren H, Lühr M, Scarpa A. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* 2001; **439**: 798-802 [PMID: 11787853 DOI: 10.1007/s004280100474]
- 34 Shah RN, Ibbitt JC, Alitalo K, Hurst HC. FGFR4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1alpha. *Oncogene* 2002; **21**: 8251-8261 [PMID: 12447688 DOI: 10.1038/sj.onc.1206020]
- 35 Gao Y, Ziesch A, Hocke S, Kampmann E, Ochs S, De Toni EN, Göke B, Gallmeier E. Overexpression of heat shock protein 27 (HSP27) increases gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells through S-phase arrest and apoptosis. *J Cell Mol Med* 2015; **19**: 340-350 [PMID: 25331547 DOI: 10.1111/jcmm.12444]
- 36 Liu T, Ye YW, Zhu AL, Yang Z, Fu Y, Wei CQ, Liu Q, Zhao CL, Wang GJ, Zhang XF. Hyperthermia combined with 5-fluorouracil promoted apoptosis and enhanced thermotolerance in human gastric cancer cell line SGC-7901. *Oncol Targets Ther* 2015; **8**: 1265-1270 [PMID: 26064061 DOI: 10.2147/OTT.S78514]
- 37 Kudo M, Asao T, Hashimoto S, Kuwano H. Closed continuous hyperthermic peritoneal perfusion model in mice with peritoneal dissemination of colon 26. *Int J Hyperthermia* 2004; **20**: 441-450 [PMID: 15204523 DOI: 10.1080/02656730310001637352]
- 38 Kirstein MN, Root SA, Moore MM, Wieman KM, Williams BW, Jacobson PA, Marker PH, Tuttle TM. Exposure-response relationships for oxaliplatin-treated colon cancer cells. *Anticancer Drugs* 2008; **19**: 37-44 [PMID: 18043128 DOI: 10.1097/CAD.0b013e3282f07791]
- 39 Ferraro G, Pica A, Russo Krauss I, Pane F, Amoresano A, Merlino A. Effect of temperature on the interaction of cisplatin with the model protein hen egg white lysozyme. *J Biol Inorg Chem* 2016; **21**: 433-442 [PMID: 27040953 DOI: 10.1007/s00775-016-1352-0]
- 40 Zhang XL, Shi HJ, Wang JP, Tang HS, Wu YB, Fang ZY, Cui SZ, Wang LT. MicroRNA-218 is upregulated in gastric cancer after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and increases chemosensitivity to cisplatin. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 11347-11355 [PMID: 25170221 DOI: 10.3748/wjg.v20.i32.11347]
- 41 Muenyi CS, States VA, Masters JH, Fan TW, Helm CW, States JC. Sodium arsenite and hyperthermia modulate cisplatin-DNA damage responses and enhance platinum accumulation in murine metastatic ovarian cancer xenograft after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *J Ovarian Res* 2011; **4**: 9 [PMID: 21696631 DOI: 10.1186/1757-2215-4-9]
- 42 Okayama T, Kokura S, Ishikawa T, Adachi S, Hattori T, Takagi T, Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. Antitumor effect of pretreatment for colon cancer cells with hyperthermia plus geranylgeranylacetone in experimental metastasis models and a subcutaneous tumor model of colon cancer in mice. *Int J Hyperthermia* 2009; **25**: 141-149 [PMID: 19337914 DOI: 10.1080/02656730802631783]
- 43 Yoo J, Lee YJ. Effect of hyperthermia and chemotherapeutic agents on TRAIL-induced cell death in human colon cancer cells. *J Cell Biochem* 2008; **103**: 98-109 [PMID: 17520700 DOI: 10.1002/jcb.21389]
- 44 Vertrees RA, Das GC, Popov VL, Coscio AM, Goodwin TJ, Logrono R, Zwischenberger JB, Boer PJ. Synergistic interaction of hyperthermia and Gemcitabine in lung cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; **4**: 1144-1153 [PMID: 16138007 DOI: 10.4161/cbt.4.10.2074]
- 45 Adachi S, Kokura S, Okayama T, Ishikawa T, Takagi T, Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. Effect of hyperthermia combined with

- gemcitabine on apoptotic cell death in cultured human pancreatic cancer cell lines. *Int J Hyperthermia* 2009; **25**: 210-219 [PMID: 19437237 DOI: 10.1080/02656730802657036]
- 46 **Kirui DK**, Celia C, Molinaro R, Bansal SS, Cosco D, Fresta M, Shen H, Ferrari M. Mild hyperthermia enhances transport of liposomal gemcitabine and improves in vivo therapeutic response. *Adv Healthc Mater* 2015; **4**: 1092-1103 [PMID: 25721343 DOI: 10.1002/adhm.201400738]
- 47 **Loggie BW**, Thomas P. Gastrointestinal Cancers With Peritoneal Carcinomatosis: Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Oncology (Williston Park)* 2015; **29**: 515-521 [PMID: 26178339]
- 48 **Ferraretto A**, Gravaghi C, Donetti E, Cosentino S, Donida BM, Bedoni M, Lombardi G, Fiorilli A, Tettamanti G. New methodological approach to induce a differentiation phenotype in Caco-2 cells prior to post-confluence stage. *Anticancer Res* 2007; **27**: 3919-3925 [PMID: 18225551]
- 49 **Ahmed K**, Tabuchi Y, Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis* 2015; **20**: 1411-1419 [PMID: 26354715 DOI: 10.1007/s10495-015-1168-3]
- P-Reviewer:** Caboclo JL, Zhu YL **S-Editor:** Gong ZM
L-Editor: A **E-Editor:** Ma YJ





Different mitochondrial response to cisplatin and hyperthermia treatment in human AGS, Caco-2 and T3M4 cancer cell lines

Sonata Trumbeckaite^{1,2} · Vaidotas Cesna³ · Aldona Jasukaitiene⁴ · Rasa Baniene^{1,5} · Antanas Gulbinas⁴

Received: 22 January 2018 / Accepted: 15 June 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Gastrointestinal cancers (gastric, pancreatic and colorectal) are life-threatening diseases, which easily spread to peritoneal cavity (Juhl et al. in *Int J Cancer* 57:330–335, 1994; Schneider et al. in *Gastroenterology* 128:1606–1625, 2005; Geer and Brennan in *Am J Surg* 165:68–72, 1993). Application of hyperthermal intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) is one of the choices treating these malignancies and prolonging patient survival time. Despite numbers of clinical trials showing positive effects of HIPEC against various types of cancer, the question whether hyperthermia significantly potentiate the cytotoxicity of cisplatin remains unanswered. Little information is available on the HIPEC effect at the level of mitochondria. To define the effect of hyperthermia (40 °C and 43 °C) to cisplatin treated human gastric AGS, pancreatic T3M4 and colorectal Caco-2 cancer cells, we established an in vitro experiment, which mimics clinical HIPEC conditions. Giving the importance of mitochondrial energy metabolism in cancer, we investigated the effect of cisplatin and hyperthermia on mitochondrial Complex-I (glutamate/malate) and complex-II (succinate) dependent respiratory rates, the coupling of oxidative phosphorylation, the proton permeability of mitochondrial inner membrane and on the integrity of mitochondrial outer membrane in Caco-2, AGS and T3M4 cancer cell lines. Our main findings are: 1) treatment of cells with cisplatin causes the impairment of mitochondrial functions – the increase in the proton permeability of mitochondrial inner membrane and decrease in the oxidative phosphorylation efficiency in Caco-2, AGS and T3M4 cancer cells; 2) hyperthermia (40 °C and 43 °C) increased state 2 respiration rate only in AGS cells without any effects on Caco-2 and T3M4 cells; 3) hyperthermia in combination with cisplatin doesn't enhance cisplatin effect neither in Caco-2 and T3M4 nor in AGS cells. Thus, our results show the different mitochondrial response of gastric AGS, pancreatic T3M4 and colorectal Caco-2 cancer cells to cisplatin or/and hyperthermia treatment. Further studies are needed to find the mechanisms of cell line - specific mitochondrial response to cisplatin and hyperthermia.

Keywords Cancer · AGS · T3M4 · Caco-2 · Cisplatin · Hyperthermia · Mitochondria · Oxidative phosphorylation

✉ Sonata Trumbeckaite
sonata.trumbeckaite@ismuni.lt

¹ Neuroscience Institute, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu str. 4, LT-50161 Kaunas, Lithuania

² Department of Pharmacognosy, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu str. 13, LT-50166 Kaunas, Lithuania

³ Department of Surgery, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu str. 4, LT-50161 Kaunas, Lithuania

⁴ Institute for Digestive Research, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu str. 4, LT-50161 Kaunas, Lithuania

⁵ Department of Biochemistry, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu str. 4, LT-50161 Kaunas, Lithuania

Introduction

Advanced gastrointestinal cancer has a high probability to invade a surface of peritoneum, resulting carcinomatosis. This condition is leaded by a poor patient prognosis (Koppe et al. 2006). Peritoneal carcinomatosis (PC) occurs synchronous with the primary tumour in about 14–43% of patients with gastric cancer (Boerner et al. 2016; Bartos et al. 2015). In pancreatic cancer, peritoneal carcinomatosis undetectable by preoperative computer tomography examination can be found up to 30% during surgical exploration (Sottile et al. 2015) and 4–7% of patients with colon cancer have PC at the time of diagnosis (Segelman et al. 2012; Lemmens et al. 2011). One of PC treatment options – hyperthermal intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) is being performed in nu-

merous centers (Verwaal et al. 2008; Elias et al. 2009; Glehen et al. 2006).

Hyperthermia is thought can augment the cytotoxicity of chemotherapeutic agent and increase its penetration depth (Elias et al. 2000). Numbers of clinical trials are published, defining HIPEC as a treatment modality, which prolongs patient survival time (Boerner et al. 2016; Bartos et al. 2015; Mulier et al. 2012; Votanopoulos et al. 2013). HIPEC has been applied to treat peritoneal carcinomatosis for gastric cancer. It is known to reduce frequent paracentesis need (Seshadri and Glehen 2016; Yonemura et al. 2016; Yuan et al. 2016). HIPEC can prolong pancreatic cancer patients survival rates, accompanied with pancreatic surgery in high-volume centres. (Schwarz et al. 2016). Colon as well as rectal cancer with peritoneal metastases present, can be equally treated by cytoreductive surgery, accompanied by HIPEC (Simkens et al. 2016). Despite numerous clinical studies and even basic research analyzing benefit of hyperthermia as an additive to chemotherapy, there is a lack of basic studies on mitochondrial response to cisplatin-treatment in combination with hyperthermia in various cancer cell lines. There is an increasing evidence now on importance of mitochondrial alterations in cancer development. Mitochondria are responsible for ATP production through oxidative phosphorylation and are implicated in cell death pathways, generate reactive oxygen species that deans as second messengers, regulate Ca^{2+} homeostasis, modulate cellular redox status (Wallace 2012) etc. Investigation of mitochondrial functions in cancer cells are an important step, because it provides an additional information on treatment efficiency as mitochondria play a crucial role in cellular processes and might be a therapeutical target for cancer therapy. Cancer cells are very heterogeneous and some of them have high levels of oxidative phosphorylation while others are relatively glycolytic (Wallace 2012), therefore the mitochondrial response and resistance of various cancer cell lines to hyperthermia and chemotherapy could be different and require detailed investigations. To understand the role of mitochondria in cancer treatment, we analyzed in vitro the cancer cell lines specific response of mitochondria to HIPEC. The aim of this work was to investigate and compare: 1) the effects of cisplatin and hyperthermia (40 °C and 43 °C) alone on mitochondrial oxidative phosphorylation in AGS (human gastric), Caco-2 (colorectal) and T3M4 (pancreatic ductal) adenocarcinoma cell lines and 2) the effect of hyperthermia in combination with cisplatin on mitochondrial functions in Caco-2, T3M4 and AGS cells.

Materials and methods

Chemicals

Succinic acid, glutamic acid, cytochrome c from bovine heart, adenosine-5'-diphosphate sodium salt (ADP), malic acid,

KH_2PO_4 , ethylene glycol-bis-(b-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), MgCl_2 , lactobionic acid, taurine, Tris, carboxyatractyloside potassium salt were obtained from "Sigma". Sucrose, HEPES, MgCl_2 , were obtained from "Carl Roth".

Gastrointestinal cancer cell lines

Gastric adenocarcinoma cancer (AGS) and colorectal adenocarcinoma cancer (Caco-2) cell lines were obtained from American Type Cell Culture (ATCC Manassas, VA, United States). Metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (T3 M4) cell line was a kind gift of European Pancreas Centre (Heidelberg, Germany). Cells were maintained in RPMI medium (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, United States), supplementing 10% of fetal bovine serum (Gibco/Invitrogen Carlsbad, CA, United States), and 1% penicillin/streptomycin (Gibco/Invitrogen Carlsbad, CA, United States). All cells were cultivated at 37 °C in 5% CO_2 humidity.

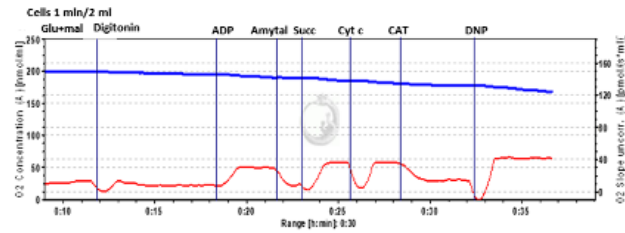
Design of experiment

Cells were incubated for 24 h maintaining conditions described above. After incubation cancer cells were treated by two agents separately or in combination: temperature (37 °C, 40 °C and 43 °C) and particular for each cell line IC_{50} of cisplatin (AGS – 182 μM , Caco-2 – 194 μM and T3M4 – 48 μM). IC_{50} for each cell line was detected experimental manner by the means of MTT. To mimic clinical HIPEC conditions cells were incubated for 1 h at 37 °C, 40 °C and 43 °C. After that, incubation media was changed and cells were harvested in normal conditions for next 48 h until the evaluation of cell energetics. Time point of 48 h was chosen taking into account, that cisplatin affects cell proliferation and DNA replication. Various cells need particular period of time to get affected. Our results of early and late apoptosis (data not shown) suggested, that time period of 48 h is required to evaluate cellular changes due to cisplatin treatment.

Measurement of mitochondrial function in cancer cells

Mitochondrial respiration (oxygen consumption) rate was measured using an Oxygraph-2 k (OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria) at 37 °C in the medium containing 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl_2 , 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM sucrose (pH 7.1 at 37 °C). Temperature was kept at 37 °C under stirring at 750 rpm. Respirometric investigation of mitochondrial function was performed by sequential multiple substrate-inhibitor titration (Fig. 1). Digitonin (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added in order to permeabilize cell membrane. The mitochondrial state 2 respiration (V_0) rate was recorded in the medium

Fig. 1 Representative respiration curve in cells. Mitochondrial respiration (oxygen consumption) in cells was measured as described in Methods



supplemented with cells and 5 mM glutamate +2 mM malate as substrates. The state 3 respiration rate (V_{ADP}) was determined following the addition of 1 mM ADP. Then the Complex I was inhibited by the adding of 2 mM amytal and Complex II dependent respiration was registered in the presence of 15 mM succinate. The effect of cytochrome c on respiration rate (indicating mitochondrial outer membrane integrity) was determined by adding 32 μ M cytochrome c ($V_{ADP+cyt\ c}$) to mitochondria respiring in State 3. Then the respiration was inhibited with 0.75 μ M carboxyatractyloside, an inhibitor of ADP/ATP translocator (V_{CAT}). Changes in carboxyatractyloside - inhibited and state 2 respiration rates indicates the changes in the proton permeability of mitochondrial inner membrane. The respiratory control index (RCI) for glutamate/malate was calculated as the ratio between V_{ADP}/V_0 respiration rate and for succinate as the ratio V_{ADP}/V_{CAT} . Cytochrome c effect was calculated as the ratio between $V_{ADP+cyt\ c}/V_{ADP}$. Datlab 5 software (Oroboros Instruments) was used for real-time data acquisition and data analysis. For each measurement of oxygen consumption we used 1 mln cells/2 ml and respiration rate was expressed as pmol/s/0.5 mln cells.

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM of at least 3–4 separate experiments. Statistical analysis was performed using the software package SPSS version 16.0 for Windows. $P < 0.05$ was taken as the level for significance.

Results

Effect of cisplatin on mitochondrial function in gastric (AGS), colorectal (Caco-2) and pancreatic ductal (T3M4) adenocarcinoma cells

The effect of cisplatin on mitochondrial bioenergetics in cancer cells (37 $^{\circ}$ C) was evaluated by measuring mitochondrial respiration rate with glutamate/malate and succinate as

substrates. Cisplatin caused the uncoupling of oxidative phosphorylation, i.e. induced the increase in state 2 (V_0) respiration rate (Fig. 2a) by 1.42, 2.44 and 2.34 folds (substrate glutamate/malate) in Caco-2, AGS and T3M4 cells, respectively ($p < 0.05$). Furthermore, mitochondrial state 3 (V_{ADP}) respiration rate was also increased by 35%, 34 and 37%, respectively (Fig. 2b). The respiratory control index (RCI) after treatment with cisplatin tended to decrease by 16% in Caco-2 cells and by 44% (AGS) and 40% (T3M4), $p < 0.05$ (Fig. 2c).

The data with succinate as substrate are shown in Fig. 3. Thus, cisplatin caused the increase in the state 4 respiration (V_{CAT}) by 1.63, 1.94 and 2.64 folds (Fig. 3a) in Caco-2, AGS and T3M4 cell lines as compared to untreated cells ($p < 0.05$), showing the mitochondrial uncoupling of oxidative phosphorylation. Mitochondrial state 3 (V_{ADP}) respiration rate was also increased by 46%, 37 and 72%, respectively (Fig. 3b). The respiratory control index (RCI) after pre-treatment with cisplatin decreased by 14% in Caco-2, by 21% in AGS and by 25% in T3 M4 cells (Fig. 3c).

It is important to note, that cisplatin at 37 $^{\circ}$ C had no effect on the integrity of mitochondrial outer membrane in Caco-2 cells as the cytochrome c effect ($V_{ADP+cyt\ c}/V_{ADP}$ ratio after addition of external cytochrome c in State 3) remained unchanged (Fig. 4) as compared to untreated group. An increase in cytochrome c effect after treatment with cisplatin was observed in AGS cells (1.11 ± 0.10 vs control 1.03 ± 0.04) and in T3M4 cells (1.12 ± 0.10 vs control 1.00 ± 0.003), $p < 0.05$, respectively (Fig. 4).

Effect of hyperthermia on mitochondrial function in gastric (AGS), colorectal (Caco-2) and pancreatic ductal (T3M4) adenocarcinoma cells

Hyperthermia (40 $^{\circ}$ C and 43 $^{\circ}$ C) had no effect neither on the state 2 (V_0) nor on state 3 (V_{ADP}) respiration rates in Caco-2 and T3M4 cell lines neither with glutamate/malate (Fig. 5a and b) nor with succinate (Fig. 6) as substrates. The respiratory control index (RCI) remained also unchanged (Figs. 5 and 6c).

However, in AGS cells, the increase in temperature led to the uncoupling of oxidative phosphorylation, thus the state 2 (V_0) respiration rate with glutamate/malate increased by 1.32

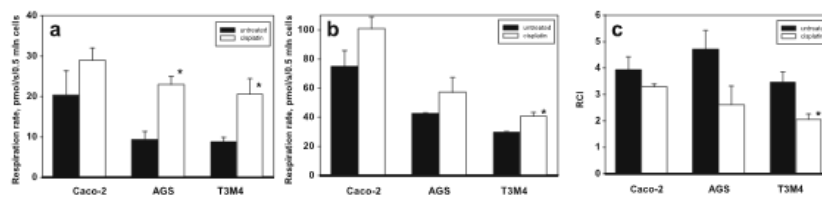


Fig. 2 Effect of cisplatin on mitochondrial function in AGS, Caco-2 and T3M4 cells (substrate glutamate/malate) at 37 °C. Mitochondrial respiration rate was measured as described in Methods using 5 mM glutamate + 2 mM malate as substrates. **a** State 2 respiration rate. **b** State 3 respiration rate. **c** Respiratory control index (RCI). Digitonin (8 µg/ml) was added in order to permeabilize cell membrane. The mitochondrial state 2 respiration rate (V_0) was recorded in the medium

supplemented with cells and 5 mM glutamate + 2 mM malate as substrates. The state 3 respiration rate (V_{ADP}) was determined following the addition of 1 mM ADP. Mitochondrial respiratory control index (RCI), i.e. the ratio between oxygen uptake rates in state 3 and state 2 ($RCI = V_3/V_0$). Each column represents the mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments; * $p < 0.05$ vs. control (i.e. untreated) group

(at 40 °C) and by 1.64-fold (at 43 °C), $p < 0.05$ (Fig. 5a). As consequence, RCI (Fig. 5c) tended to decrease by 16% (at 40 °C) and by 27% (at 43 °C), despite the slight increase of mitochondrial State 3 (V_{ADP}) respiration rate by 14% (at 40 °C) and by 30%, $p < 0.05$ (at 43 °C) (Fig. 5b). Hyperthermia also increased the State 4 respiration (V_{CAT}) with succinate as substrate by 1.11 and by 1.32 folds ($p < 0.05$) (Fig. 6a) in AGS cells, showing the increase in proton permeability of mitochondrial inner membrane. However, hyperthermia had no effect on the integrity of mitochondrial outer membrane as the cytochrome c effect ($V_{ADP+cyt c}/V_{ADP}$ ratio) by increasing the temperature remained unchanged as compared to respective control group in both, cisplatin-untreated and treated groups, Fig. 7a and b).

Effect of hyperthermia combined with cisplatin (HIPEC) on mitochondrial function in gastric (AGS), colorectal (Caco-2) and pancreatic ductal (T3M4) adenocarcinoma cell lines

Combination of hyperthermia (40 °C and 43 °C) and cisplatin (HIPEC) had no additional effect (Figs. 8 and 9) on

mitochondrial respiration rates in AGS and T3M4 cells as compared to cisplatin alone for both substrates, i.e. mitochondrial state 2 (V_0) (Figs. 8a, g and 9a, g), state 3 (V_{ADP}) respiration rates (Figs. 8b, h and 9b, h) and RCI (Figs. 8c, i and 9c, i) remained unchanged as compared to respective control group (at 37 °C).

In Caco-2 cells addition of hyperthermia had a tendency to suppress V_{ADP} with both, glutamate/malate and succinate as substrates (by 24 and 26%, respectively at 40 °C and by 36 and 40%, respectively at 43 °C, $p < 0.05$, Figs. 8a, b and 9a, b) whereas RCI remained unchanged (Figs. 8c and 9c). Cytochrome c effect in AGS, Caco-2 and T3M4 cells after HIPEC remained unchanged (Fig. 7b). Thus, addition of hyperthermia to cisplatin treatment had no effect on the integrity of mitochondrial outer membrane.

Discussion

Gastrointestinal cancers (gastric, pancreatic and colorectal) are life-threatening diseases, which easily spread to peritoneal cavity (Juhl et al. 1994; Schneider et al. 2005; Geer and

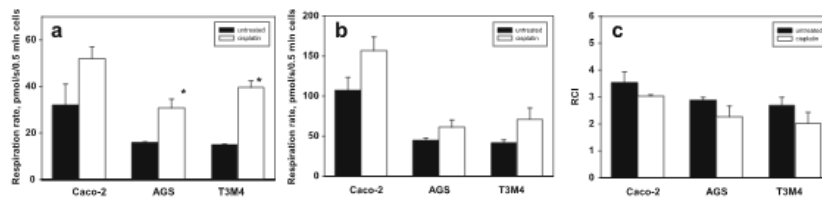


Fig. 3 Effect of cisplatin on mitochondrial function in AGS, Caco-2 and T3M4 cells (substrate succinate) at 37 °C. Mitochondrial respiration rate was measured as described in Methods. **a** V_{CAT} respiration rate. **b** State 3 respiration rate. **c** Respiratory control index (RCI). The state 3 respiration rate (V_{ADP}) with 15 mM succinate mM (+

2 mM amytal) was determined following the addition of 1 mM ADP. The respiratory control index (RCI) for succinate was calculated as the ratio V_{ADP}/V_{CAT} . Each column represents the mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments; * $p < 0.05$ vs. control (i.e. untreated) group

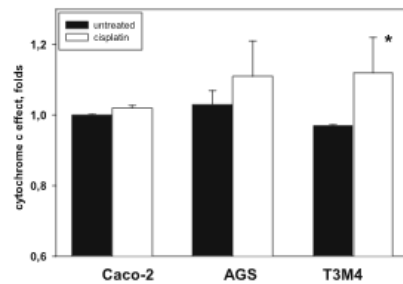


Fig. 4 Effect of cisplatin on the permeability of mitochondrial outer membrane (cytochrome c test) in AGS, Caco-2 and T3M4 cells at 37 °C. Digitonin (8 µg/ml) was added in order to permeabilize cell membrane. The state 3 respiration rate (V_{ADP}) with 5 mM succinate mM (+ 2 mM amytal) was determined following the addition of 1 mM ADP. The effect of cytochrome c on respiration rate was determined by adding 32 µM cytochrome c ($V_{ADP+cyt c}$) to mitochondria respiring in State 3, * $p < 0.05$ vs. control (i.e. untreated) group

Brennan 1993). Cisplatin is the most widely used chemotherapeutic drug for the treatment of PC. Despite the fact that cisplatin is successfully used in chemotherapy for more than 25 years, the tissue specific mechanisms of its action, particularly on the mitochondrial bioenergetics in cancer cells is poorly described. On the other hand, combination of hyperthermia and chemotherapy, i.e. HIPEC is one of the choices treating these malignancies and prolonging patient survival time (Glehen et al. 2004; Yang et al. 2011; Kuijpers et al. 2013; Sugarbaker 2017). Despite numbers of clinical trials showing positive effects of HIPEC against various types of cancer, the question whether hyperthermia significantly potentiate the cytotoxicity of cisplatin remains controversial. There is a growing evidence suggesting that in cancer mitochondria play an important role for supplying cancer cells with energy and survival. Therefore, the modulation of

mitochondrial function by various therapeutic agents (including hyperthermia and chemotherapy) may affect tumor cells. As little information is available on the HIPEC effect at the subcellular level in tumor cells, in order to define the influence of hyperthermia (40 °C and 43 °C) to cisplatin treated Caco-2, T3M4 and AGS cells, we established an in vitro experiment, which mimics clinical HIPEC conditions. We investigated the effect of cisplatin and hyperthermia on mitochondrial Complex-I (glutamate/malate) and complex-II (succinate) dependent respiratory rates, the coupling of oxidative phosphorylation, the proton permeability of mitochondrial inner membrane and on the integrity of mitochondrial outer membrane in Caco-2, AGS and T3M4 cancer cell lines.

We revealed, that mitochondria in Caco-2, AGS and T3M4 cancer cell lines have been functionally affected by using cisplatin or hyperthermia treatment. Our main findings are that: 1) cisplatin alone leads to increase in proton permeability of mitochondrial inner membrane and decrease in oxidative phosphorylation in Caco-2, AGS and T3M4 cancer cell lines; 2) hyperthermia (40 °C and 43 °C) increased state 2 respiration rates only in AGS cells without any effects on Caco-2 and T3M4 cells; 3) hyperthermia in combination with cisplatin doesn't enhance cisplatin effect neither in Caco-2 and T3M4 nor in AGS cells. Thus, our results show the cancer cell lines-specific mitochondrial response to cisplatin and hyperthermia.

It is interesting to remark that similar effects of cisplatin were observed in studies with mitochondria isolated from various tissues. Thus, Custodio et al. in experiments with rat liver mitochondria showed that pre-treatment of mitochondria with cisplatin at concentration 20 nmol/mg protein induced calcium dependent swelling of mitochondria, depolarization of mitochondrial membrane. At higher concentration (up to 40 nmol/mg protein), cisplatin stimulated state 2 and state 4 respiration rates and slightly reduced state 3 respiration rate with succinate as substrate. The respiratory control index, ADP/O ratios, mitochondrial membrane potential, and the ADP phosphorylation rate were also depressed. Thus, authors

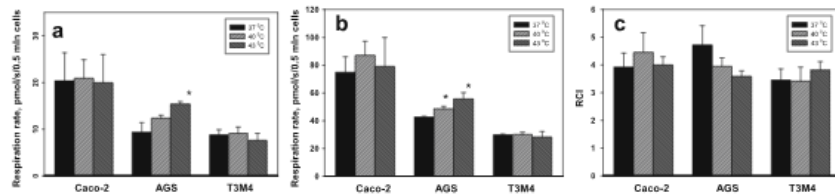


Fig. 5 Effect of hyperthermia on mitochondrial function in AGS, Caco-2 and T3M4 cells (substrate glutamate/malate). Mitochondrial respiration rate was measured as described in Methods using 5 mM glutamate + 2 mM malate as substrates. **a** State 2 respiration rate. **b** State 3 respiration rate. **c** Respiratory control index. Digitonin (8 µg/ml) was added in order to permeabilize cell membrane. The mitochondrial state 2 respiration rate (V_0) was recorded in the medium supplemented

with cells and 5 mM glutamate + 2 mM malate as substrates. The state 3 respiration rate (V_{ADP}) was determined following the addition of 1 mM ADP. Mitochondrial respiratory control index (RCI), i.e. the ratio between oxygen uptake rates in state 3 and state 2 ($RCI = V_3/V_0$). Each column represents the mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments; * $p < 0.05$ vs. control (i.e. untreated) group

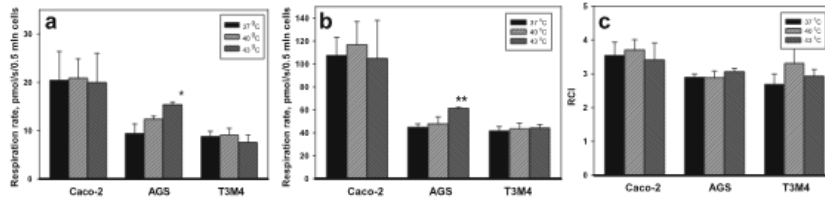


Fig. 6 Effect of hyperthermia on mitochondrial function in AGS, Caco-2 and T3M4 cells (substrate succinate). Mitochondrial respiration rate was measured as described in Methods. **a** V_{CAT} respiration rate. **b** State 3 respiration rate. **c** Respiratory control index (RCI). The state 3 respiration rate (V_{ADP}) with 15 mM succinate mM (+

2 mM amytal) was determined following the addition of 1 mM ADP. The respiratory control index (RCI) for succinate was calculated as the ratio V_{ADP}/V_{CAT} . Each column represents the mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments; * $p < 0.05$ vs. control (i.e. untreated) group

conclude that cisplatin interferes with mitochondrial bioenergetics by increasing permeability of mitochondrial inner membrane to protons (Custodio et al. 2009).

In study with rat kidney mitochondria was shown that cisplatin (5 mg/kg) inhibited mitochondrial oxygen consumption in state 3 (substrate glutamate/malate) by 50% whereas state 4 respiration rate remained unchanged (Ortega-Dominguez et al. 2017). The RCI was also decreased by 40%. Authors showed that cisplatin induced a decrease in complex I and the ATP synthase activities and promoted opening of mitochondrial permeability transition pore (with glutamate - malate as substrate). Interestingly, they revealed that cisplatin did not affected succinate oxidation in state 3, whereas state 4 respiration was increased by about 28% causing the decrease in RCI by 20% (Ortega-Dominguez et al. 2017).

There is a little of data on the effects of cisplatin on mitochondria in cancer cells, in particular from colorectal, gastric

and pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Aichler et al. in vitro experiments with others - oesophageal adenocarcinoma cell line OE19 showed that cisplatin/5-FU treatment altered the integrity of mitochondria of cells (Aichler et al. 2013). Tacka et al. revealed that pretreatment of human T-cell lymphoma line, Jurkat cells with 0–25 μ M of cisplatin for 3 h had no immediate effect on mitochondrial oxygen consumption, however, 24 h after exposure to cisplatin, the cell viability and cellular mitochondrial oxygen consumption decreased proportionally to cisplatin concentration and DNA fragments showed signs of apoptosis. Interestingly, they revealed that the same concentration of cisplatin had no effect on mitochondria from beef heart 0–24 h after exposure of drug. Thus, authors assume, that in Jurkat cells changes in mitochondrial function is secondary effect of cisplatin cytotoxicity (Tacka et al. 2004).

Another study of Santandreu et al. (Santandreu et al. 2010), indicated that in human colon carcinoma HT-29 and SW-

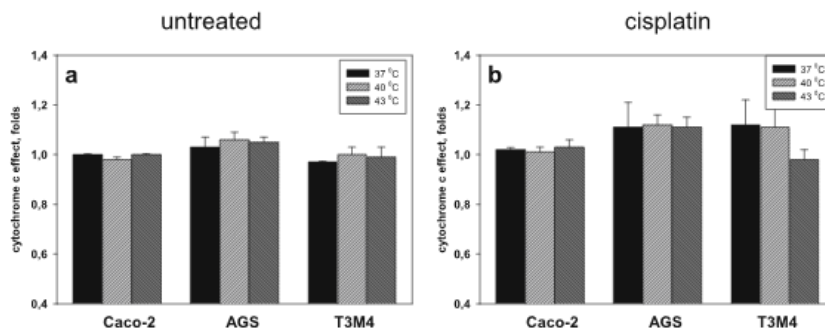


Fig. 7 Effect of hyperthermia on the integrity of mitochondrial outer membrane (cytochrome c test) in AGS, Caco-2 and T3M4 cells. Digitonin (8 μ g/ml) was added in order to permeabilize cell membrane. The state 3 respiration rate (V_{ADP}) with 5 mM succinate mM (+ 2 mM

amytal) was determined following the addition of 1 mM ADP. The effect of cytochrome c on respiration rate was determined by adding 32 μ M cytochrome c ($V_{ADP+cyt c}$) to mitochondria respiring in State 3

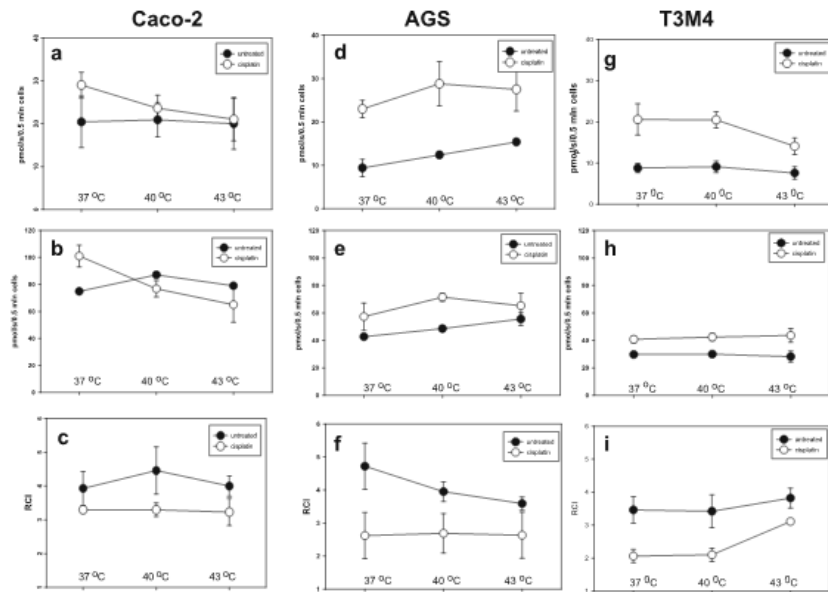


Fig. 8 Effect of hyperthermia and cisplatin on mitochondrial function in AGS, Caco-2 and T3M4 cells (substrate glutamate/malate). Mitochondrial respiration rate was measured as described in Methods using 5 mM glutamate +2 mM malate as substrates. a, d, g State 2 respiration rate; b, e, h. State 3 respiration rate; c, f, i Respiratory control index (RCI). Digitonin (8 μ M/ml) was added in order to permeabilize cell membrane. The mitochondrial state 2 respiration rate

(V_0) was recorded in the medium supplemented with cells and 5 mM glutamate +2 mM malate as substrates. The state 3 respiration rate (V_{ADP}) was determined following the addition of 1 mM ADP. Mitochondrial respiratory control index (RCI), i.e. the ratio between oxygen uptake rates in State 3 and state 2 ($RCI = V_3/V_0$). Each column represents the mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments

620cells cisplatin (10 μ M/ml for 48 h) suppressed respiration in state 4, increased in ROS generation and decreased activities of mitochondrial respiratory chain complexes: complex I (NADH dehydrogenase) by 30%, complex II + III – by 50%, Complex IV (cytochrome oxidase) – by 70% and complex V (ATP synthase) – by 30%. However, it is difficult to compare results since various cancer cells lines, dose of cisplatin, exposition time etc. were used. In our experiments cells were treated using specific for each cell line IC50 of cisplatin. For AGS cells it was 182 μ M and for Caco-2 cells - 194 μ M. IC50 for T3 M4 was much lower (48 μ M) as compared to other cells but mitochondria in T3M4 cells were the most sensitive to cisplatin treatment. Thus, our data showed that mitochondria, despite cell line differences, are one of the targets for cisplatin treatment. By using cytochrome c test we also revealed that cisplatin diminished the integrity of mitochondrial outer membrane in AGS (caused slight cytochrome c effect) and T3M4 cells (moderate effect) while mitochondrial outer

membrane in Caco-2 cells remained intact. The increase in permeability of mitochondrial outer membrane may induce release of cytochrome c as sign for apoptosis. Our unpublished data showed that cisplatin induced apoptosis in T3M4 cells, however had no effect in AGS and Caco-2 cells.

Additionally, we investigated the effect of normothermia (37 °C) and hyperthermia (40 °C and 43 °C, commonly used in clinical practice) in untreated and cisplatin - treated cells. Our data revealed the cancer cells specific sensitivity to heating: hyperthermia (40 °C and 43 °C) had no effect on mitochondrial respiration rates in Caco-2 and T3M4 cells whereas in AGS cells induced increase in state 2 respiration rate and decrease in RCI with glutamate - malate, thus, affected the same mitochondrial parameters as cisplatin, however in about 30% lesser extent. Nowadays radiotherapy has attracted increasing attention as a method for treating of various cancers showing positive effects and success as a therapeutic approach. However, the effects of hyperthermia at

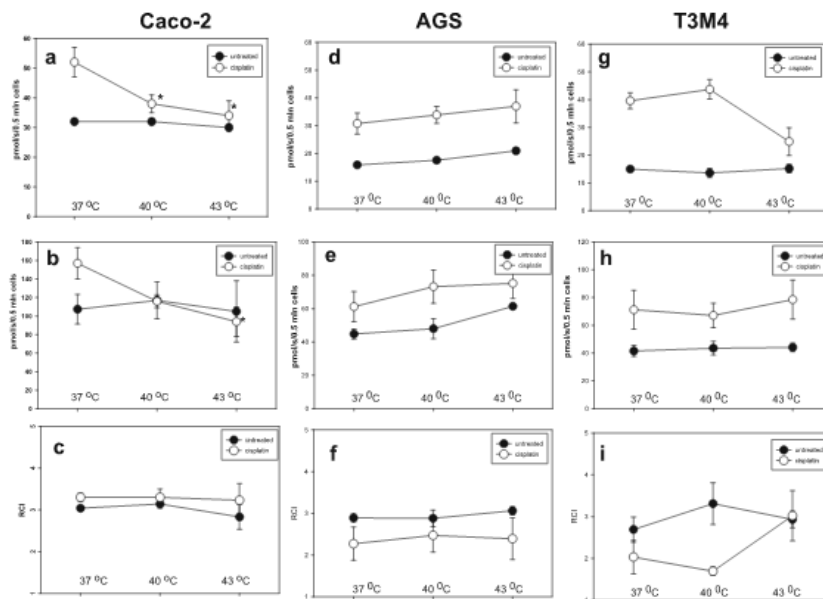


Fig. 9 Effect of hyperthermia and cisplatin on mitochondrial function in AGS, Caco-2 and T3M4 cells (substrate succinate). Mitochondrial respiration rate was measured as described in Methods. **a, d, g** V_{CAT} respiration rate. **b, e, h** State 3 respiration rate. **c, f, i** Respiratory control index (RCI). The state 3 respiration rate (V_{ADP})

with 15 mM succinate mM (+ 2 mM amylal) was determined following the addition of 1 mM ADP. The respiratory control index (RCI) for succinate was calculated as the ratio $V_{\text{ADP}}/V_{\text{CAT}}$. Each column represents the mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments; * $p < 0.05$ vs. control (i.e. untreated) group

subcellular level are mainly investigated in the mitochondria from healthy organs. Zukiene et al. revealed, that 40 °C temperature only slightly activates rat heart mitochondrial function whereas higher temperature (42 °C and 45 °C) causes the decrease in mitochondrial membrane potential and decrease in ATP synthesis (Zukiene et al. 2010). Hyperthermia (above 41 °C) progressively increased permeability of inner mitochondrial membrane and caused complete uncoupling at 45 °C in heart mitochondria whereas in liver mitochondria they observed moderate increase (Zukiene et al. 2010). In addition, state 3 respiration rate was inhibited at 43 – 45 °C in rat liver mitochondria (Nauciene et al. 2012). Jarmuszkiewicz et al. showed that hyperthermia (42 °C) caused the decrease in mitochondrial membrane potential, oxidative phosphorylation efficiency and H_2O_2 production in skeletal mitochondria from rats (Jarmuszkiewicz et al. 2015). Mitov et al. using colorectal cancer cell lines showed that hyperthermia (42 °C) affected mitochondrial functions and glycolysis (Mitov et al. 2017). There is lack of studies

on the effect of hyperthermia at mitochondrial level in other cancer cells. Therefore, any study providing new results are important for better understanding of mechanism of their action.

It is well known that cisplatin is often used in combination with hyperthermia since it enhances the anti-cancer effects (Muenyi et al. 2011). The promising clinical results of HIPEC in the treatment of carcinomatosis as well as different response of mitochondria from various cancer cell lines encouraged us to test whether addition of hyperthermia (40 °C and 43 °C) to cisplatin treatment can cause additional (synergistic) effects to mitochondrial functions and if are there any differences between mitochondrial response to combined hyperthermia and cisplatin treatment in various cancer cells. Interestingly, the combination of hyperthermia with cisplatin was not more efficient than cisplatin alone in suppression of mitochondrial function. Our data revealed that hyperthermia (40 °C and 43 °C for 60 min) didn't potentiate the cytotoxic effects of cisplatin on mitochondria and didn't lead to additive effects in AGS, Caco-2 and T3M4 cell lines. Sukovas et al. investigating the viability

and apoptosis in Ovcar-3 cells showed that hyperthermia up to 42 °C did not increase the effect of cisplatin (Sukovas et al. 2017), therefore they critically dispute the benefit of hyperthermia in ovarian cancer treatment.

In conclusion, our results showed the difference in mitochondrial response to cisplatin or/and hyperthermia in AGS, T3M4 and Caco-2 cancer cells and the importance of mitochondria as a possible target for cancer treatment. As there are no data from others to compare our results obtained at mitochondrial level, further more detailed studies are needed to test the response of mitochondria to HIPEC in other cell lines for better understanding of mechanism of their action.

Acknowledgements This research was funded by a grant (No. SEN-01/2015) from the Research Council of Lithuania.

Compliance with ethical standards

Competing interests The authors confirm that this article content has no conflict of interests.

References

- Aichler M, Elsner M, Ludyga N, Feuchtinger A, Zangen V, Maier SK, Balluff B, Schone C, Hierber L, Braselmann H, Meding S, Rauser S, Zischka H, Aubele M, Schmitt M, Ferth M, Hauck SM, Ueffing M, Langer R, Kuster B, Zitzelsberger H, Hofer H, Walch AK (2013) Clinical response to chemotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients is linked to defects in mitochondria. *J Pathol* 230:410–419
- Bartos A, Bartos DM, Breazu C, Hosu M, Stoian R, Iancu C (2015) Cytoreductive surgery (CR) followed by hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC): a chance of survival for patients with advanced colorectal cancer. *J Gastrointest Liver Dis* 24:392–393
- Boerner T, Graichen A, Jeiter T, Zemann F, Renner P, Marz L, Soeder Y, Schlitt HJ, Piso P, Dahlke MH (2016) CRS-HIPEC prolongs survival but is not curative for patients with peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 23(12):3972–3977
- Custodio JB, Cardoso CM, Santos MS, Almeida LM, Vicente JA, Fernandes MA (2009) Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: prevention by thiol group protecting agents. *Toxicology* 259:18–24
- Elias D, Antoun S, Goharin A, Otman AE, Puizillout JM, Lasser P (2000) Research on the best chemohyperthermia technique of treatment of peritoneal carcinomatosis after complete resection. *Int J Surg Invest* 1:431–439
- Elias D, Lefevre JH, Chevalier J, Brouquet A, Marchal F, Classe JM, Ferron G, Guilloit JM, Mecus P, Goere D, Bonastre J (2009) Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *J Clin Oncol* 27:681–685
- Geer RJ, Brennan MF (1993) Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 165:68–72
- Glehen O, Kwiatkowski F, Sugarbaker PH, Elias D, Levine EA, De Simone M, Barone R, Yonemura Y, Cavaliere F, Quenet F, Gutman M, Tentes AA, Lorimier G, Bernard JL, Bereder JM, Porcheron J, Gomez-Portilla A, Shen P, Deraco M, Rat P (2004) Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study. *J Clin Oncol* 22:3284–3292
- Glehen O, Cotte E, Lefante JC, Arvieux C, Moles N, Brigand C, Beaujard AC, Francois Y, Gilly FN (2006) Peritoneal carcinomatosis in digestive cancers: cytoreductive surgery combined with intraperitoneal chemohyperthermia. *Acta Chir Belg* 106:285–290
- Jarmuszkiewicz W, Woyda-Ploszczyca A, Kozel A, Majerczak J, Zoladz JA (2015) Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med* 83:12–20
- Juhl H, Stritzel M, Wroblewski A, Henne-Bruns D, Kremer B, Schmigel W, Neumaier M, Wagener C, Schreiber HW, Kalthoff H (1994) Immunocytological detection of micrometastatic cells: comparative evaluation of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients. *Int J Cancer* 57:330–335
- Koppe MJ, Boerman OC, Oyen WJ, Bleichrodt RP (2006) Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. *Ann Surg* 243:212–222
- Kuijpers AM, Mirck B, Aalbers AG, Nienhuijs SW, de Hingh IH, Wiersema MJ, van Ramshorst B, van Ginkel RJ, Havenga K, Beemers AJ, de Wilt JH, Te Velde EA, Verwaal VJ (2013) Cytoreduction and HIPEC in the Netherlands: nationwide long-term outcome following the Dutch protocol. *Ann Surg Oncol* 20:4224–4230
- Lemmens VE, Klaver YL, Verwaal VJ, Rutten HJ, Coebergh JW, de Hingh IH (2011) Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a population-based study. *Int J Cancer* 128:2717–2725
- Mitov MI, Harris JW, Alstott MC, Zaytseva YY, Evers BM, Butterfield DA (2017) Temperature induces significant changes in both glycolytic reserve and mitochondrial spare respiratory capacity in colorectal cancer cell lines. *Exp Cell Res* 354:112–121
- Muenyi CS, States VA, Masters JH, Fan TW, Helm CW, States JC (2011) Sodium arsenite and hyperthermia modulate cisplatin-DNA damage responses and enhance platinum accumulation in murine metastatic ovarian cancer xenograft after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *J Ovarian Research* 4:9
- Muller S, Claes JP, Dierckx V, Amiel JO, Pahaut JP, Marcelis L, Bastin F, Vanderbeeken D, Finet C, Cran S, Velu T (2012) Survival benefit of adding Hyperthermic Intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) at the different time-points of treatment of ovarian cancer: review of evidence. *Curr Pharm Des* 18:3793–3803
- Nauciene Z, Zukiene R, Degutyte-Fomins L, Mildaziene V (2012) Mitochondrial membrane barrier function as a target of hyperthermia. *Medicina (Kaunas)* 48:249–255
- Ortega-Dominguez B, Aparicio-Trejo OE, Garcia-Arroyo FE, Leon-Contreras JC, Tapia E, Molina-Jijon E, Hernandez-Pando R, Sanchez-Lozada LG, Barrera-Oviedo D, Pedraza-Chavez J (2017) Curcumin prevents cisplatin-induced renal alterations in mitochondrial bioenergetics and dynamic. *Food Chem Toxicol* 107:373–385
- Santandreu FM, Roca P, Oliver J (2010) Uncoupling protein-2 knock-down mediates the cytotoxic effects of cisplatin. *Free Radic Biol Med* 49:658–666
- Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM (2005) Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 128:1606–1625
- Schwarz L, Votanopoulos K, Morris D, Yonemura Y, Deraco M, Piso P, Moran B, Levine EA, Tuech JJ (2016) Is the combination of distal pancreatectomy and cytoreductive surgery with HIPEC reasonable?: results of an international multicenter study. *Ann Surg* 263:369–375
- Segelman J, Granath F, Holm T, Machado M, Mahteme H, Martling A (2012) Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg* 99:699–705
- Seshadri RA, Glehen O (2016) Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 22:1114–1130

- Simkens GA, van Oudheusden TR, Braam HJ, Wiezer MJ, Nienhuijs SW, Rutten HJ, van Ramshorst B, de Hingh IH (2016) Cytoreductive surgery and HIPEC offers similar outcomes in patients with rectal peritoneal metastases compared to colon cancer patients: a matched case control study. *J Surg Oncol* 113:548–553
- Sottile ML, Losinno AD, Fanelli MA, Cuello-Carrion FD, Montt-Guevara MM, Vargas-Roig LM, Nadin SB (2015) Hyperthermia effects on Hsp27 and Hsp72 associations with mismatch repair (MMR) proteins and cisplatin toxicity in MMR-deficient/proficient colon cancer cell lines. *Int J Hyperth* 31:464–475
- Sugarbaker PH (2017) Strategies to improve local control of resected pancreas adenocarcinoma. *Surg Oncol* 26:63–70
- Sukovas A, Cesna V, Jasukaitiene A, Barauskas G, Nadisauskiene RJ, Dambraskas Z, Paskauskas S, Gulbinas A (2017) Response of OVCAR-3 cells to cisplatin and hyperthermia: does hyperthermia really matter? *Anticancer Res* 37:5011–5018
- Tacka KA, Dabrowiak JC, Goodman J, Penefsky HS, Souid AK (2004) Effects of cisplatin on mitochondrial function in Jurkat cells. *Chem Res Toxicol* 17:1102–1111
- Verwaal VJ, Bruin S, Boot H, van Slooten G, van Tinteren H (2008) 8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 15:2426–2432
- Votanopoulos KI, Newman NA, Russell G, Ihemelandu C, Shen P, Stewart JH, Levine EA (2013) Outcomes of cytoreductive surgery (CRS) with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients older than 70 years: survival benefit at considerable morbidity and mortality. *Ann Surg Oncol* 20:3497–3503
- Wallace DC (2012) Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 12:685–698
- Yang X, Huang CQ, Suo T, Mei LJ, Yang GL, Cheng FL, Zhou YF, Xiong B, Yonemura Y, Li Y (2011) Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves survival of patients with peritoneal carcinomatosis from gastric cancer: final results of a phase III randomized clinical trial. *Ann Surg Oncol* 18:1575–1581
- Yonemura Y, Canbay E, Li Y, Coccolini F, Glehen O, Sugarbaker PH, Morris D, Moran B, Gonzalez-Moreno S, Deraco M, Piso P, Elias D, Ballett D, Ishibashi H, Mizumoto A, Verwaal V, Mahtem H (2016) A comprehensive treatment for peritoneal metastases from gastric cancer with curative intent. *Eur J Surg Oncol* 42:1123–1131
- Yuan M, Wang Z, Hu G, Yang Y, Lv W, Lu F, Zhong H (2016) A retrospective analysis of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Mol Clin Oncol* 5:395–399
- Zukiene R, Nauciene Z, Ciapaitis J, Mildaziene V (2010) Acute temperature resistance threshold in heart mitochondria: febrile temperature activates function but exceeding it collapses the membrane barrier. *Int J Hyperth* 26:56–66

CURRICULUM VITAE

Name Surname: Vaidotas Čėsna

Work address: Department of Surgery
Lithuanian University of Health
Sciences Hospital
Kaunas Clinics
Eivenių str.2, Kaunas
LT-50009

E-mail: vaidotas.cesna@lsmuni.lt

Education: 1992-2004 m
Kaunas Jesuit Gymnasium
2004-2010 m
Master of Medicine sciences,
Kaunas University of Medicine
2010-2015 m
General Surgery residency
Department of Surgery
Lithuanian University of Health
Sciences Hospital
Kaunas Clinics

Work experience: 2012-2013 m
European Pancreas Centre
Heidelberg University
Heidelberg, Germany
2015 – until now
Surgeon
Department of Surgery
Lithuanian University of Health
Sciences Hospital
Kaunas Clinics

PADĖKA

Dėkoju moksliniam vadovui, ir draugui prof. dr. Antanui Gulbinui už idėjas, pamokymus ir daugelį suteiktų galimybių tobulėjimui.

Dėkoju prof. dr. Žilvinui Dambrauskui, prof. dr. Sauliui Paškauskui už patarimus ir pagalbą.

Taip pat labai dėkoju prof. dr. Rasai Banienei ir prof. dr. Sonatai Trumbeckaitei už pagalbą, narpliojant sunkius, bet labai įdomius ląstelių energetikos kelius.

Dėkoju prof. dr. Rimai Naginienei už pagalbą tiriant viduląstelinę cisplatinos koncentraciją.

Nuoširdžiai dėkoju dr. Aldonai Jasukaitienei, Artūriui Sukovui, Giedrei Šilkūnienei, Mantui Šilkūnui už visapusišką pagalbą Virškinimo sistemos tyrimų instituto, Chirurginėje gastroenterologijos laboratorijoje.