

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

MEDICINOS FAKULTETAS

**TVIRTINU:**

Medicinos fakulteto dekanas

Vardas Pavardė

Parašas

Data (metai, mėnuo, diena)

**DOMINYKAS SAMULIS**

**IMEGLIMINO IR METFORMINO POVEIKIO ŽMOGAUS INKSTŲ  
VĖŽINĖMS LĄSTELĖMS TYRIMAS**

**Bakalauro baigiamasis darbas**

Medicininė ir veterinarinė biochemija

6121DX001

Biochemija

**Darbo vadovas**

Dr. Kristina Škėmienė

Kaunas, 2024

**DOMINYKAS SAMULIS**

**IMEGLIMINO IR METFORMINO POVEIKIO ŽMOGAUS INKSTŲ  
VĖŽINĖMS LĄSTELĖMS TYRIMAS**

MA NEUROMOKSLŲ INSTITUTAS, BIOCHEMIJOS LABORATORIJA

**Darbo vadovas(-ė):** \_\_\_\_\_  
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

**Darbo konsultantas (-ė):** \_\_\_\_\_  
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

**Darbą atliko bakalaurantas:** \_\_\_\_\_  
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

Kaunas, 2024

# TURINYS

<b>SANTRAUKA</b>	4
<b>SUMMARY</b>	5
<b>SANTRUMPOS</b>	6
<b>ĮVADAS</b>	8
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b>	9
1.1 Inkstų vėžinių ląstelių ypatumai .....	9
1.2 Ląstelių mirtis .....	9
1.2.1 Ląstelių apoptozė .....	10
1.2.2 Ląstelių nekrozė .....	11
1.3 Naudojamų tiriamųjų medžiagų ypatumai .....	12
1.3.1 Metforminas .....	12
1.3.2 Imegliminas .....	13
1.3.3 LRRK-2 receptorių inhibitorius .....	14
<b>2. TYRIMO METODIKA</b>	15
2.1 Reagentai .....	15
2.2 Caki-2 ląstelių kultivavimas .....	15
2.3 Ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus įvertinimas .....	16
2.4 Vaizdinė duomenų analizė .....	17
2.5 Statistinė duomenų analizė .....	18
<b>3. REZULTATAI</b>	19
3.1 Antidiabetinių preparatų poveikis žmogaus inkstų vėžinėms ląstelėms .....	19
3.1.1 Metformino poveikis žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui .....	19
3.1.2 Imeglimino poveikis žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui .....	21
3.2 LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui .....	23
3.3 Sinergistinis antidiabetinių preparatų ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui .....	25
<b>4. REZULTATŲ APTARIMAS</b>	28
<b>5. IŠVADOS</b>	29
<b>6. LITERATŪROS SARAŠAS</b>	30
<b>7. PRIEDAI</b>	37

# SANTRAUKA

**Bakalauro baigiamojo darbo autorius:** Samuilis D.

**Tema:** Imeglimino ir metformino poveikio žmogaus inkstų vėžinėms ląstelėms tyrimas

**Mokslinis vadovas:** dr. Kristina Škėmienė;

**Atlikimo vieta:** Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, MA Neuromokslų institutas, Biochemijos laboratorija

**Santraukos turinys: Darbo tikslas:** Ištirti metformino ir imeglimino poveikį žmogaus inkstų vėžinių ląstelių kultūrose. **Darbo uždaviniai:** 1. Ištirti antidiabetinių preparatų poveikį žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui. 2. Nustatyti LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikį žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui. 3. Įvertinti antidiabetinių vaistų ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus sinergistinį poveikį žmogaus inkstų vėžinėms ląstelėms. **Tyrimo metodika:** Tirtos žmogaus inkstų vėžinės ląstelės Caki-2, jas kultivuojant, paveikiant imegliminu, metforminu ar LRRK-2 receptorių inhibitoriu. Gauti rezultatai išanalizuoti ir buvo ieškoma statistiškai reikšmingų sąsajų tarp nepaveiktų ląstelių ir paveiktų tiriamosiomis medžiagomis ląstelių. **Išvados:** 1. Imegliminas bei metforminas neturi poveikio žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui, tačiau metforminas mažina Caki-2 ląstelių gyvybingumą. 2. LRRK-2 receptorių inhibitorius neturi poveikio žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui, bet mažina Caki-2 ląstelių gyvybingumą. 3. Imegliminas ir LRRK-2 receptorių inhibitorius veikdami kartu mažina Caki-2 ląstelių skaičių bei gyvybingumą, o metforminas ir LRRK-2 receptorių inhibitorius slopina Caki-2 ląstelių gyvybingumą, bet neturi poveikio ląstelių skaičiui.

## SUMMARY

**Author of the bachelor thesis:** Samuilis D.

**Title:** Study of the Effects of Imeglimin and Metformin on Human Renal Cancer Cells

**Scientific supervisor:** dr Kristina Škėmienė;

**Work was performed at:** Lithuanian University of Health Sciences, Institute of Neurosciences, Biochemistry Laboratory

**Summary: Aim of the the thesis:** To investigate the effects of metformin and imeglimin in human renal cancer cell cultures. **The objectives of the study:** 1. To investigate the effect of antidiabetic agents on the number and viability of human renal cancer cells. 2. To determine the effect of LRRK-2 receptor inhibitor on the number and viability of human renal cancer cells. 3. To evaluate the synergistic effect of antidiabetic drugs and LRRK-2 receptor inhibitor on human kidney cancer cells. **Methods:** Human Caki-2 renal cancer cells were cultured and treated with imeglimin, metformin or an LRRK-2 receptor inhibitor. The results obtained were analysed for statistically significant correlations between untreated and treated cells.

**Conclusions:** 1. Imeglimin and metformin have no effect on the number of human kidney cancer cells, but metformin reduces the viability of Caki-2 cells. 2. LRRK-2 receptor inhibitor has no effect on the number of human kidney cancer cells but decreases Caki-2 cell viability. 3. Imeglimin and an LRRK-2 receptor inhibitor work together to reduce the number and viability of Caki-2 cells, while metformin and an LRRK-2 receptor inhibitor inhibit the viability of Caki-2 cells, but have no effect on cell number.

## SANTRUMPOS

LRRK-2 – leucino turtinga kartotinė kinazė du  
HIF-1 $\alpha$  – Hipoksiją indukuojantis 1-alfa faktorius  
VHL – von Hippel-Lindau sindromas  
DNR – deoksiribonukleorūgštis  
MOMP – mitochondrijų išorinės membranos permeabilizaciją  
APAF-1 – apoptozės proteazę aktyvuojantis 1 faktorius  
CARD – kaspazės įdarbinimo domenas  
FAS – Fas ląstelių paviršiaus mirties receptorių  
DISC – mirtį sukeliantis signalinis kompleksas  
TNF – auglio nekrozės faktorius  
RIP1 – su receptoriais sąveikaujanti kinazė  
DD – mirties domenas  
cIAP – ląstelių apoptozės inhibitoriaus baltymas  
NF- $\kappa$ B – branduolinis faktorius kapa B  
MAP – mitogenu aktyvuotas baltymas  
GLP-1 – į gliukagoną panašus peptidas vienas  
PPAR- $\alpha$  – perioksomų proliferatoriaus aktyvuotas receptorių- $\alpha$   
ATP – adenzinotrifosfatas  
AMP – adenzinomonofosfatas  
AMPK – AMP aktyvuota baltymų kinazė  
MDR1 – geno mutacija, kuri sukelia atsparumą daugeliui vaistų  
IL-6 – interleukinas – 6  
ADP – adenzinodifosfatas  
iRNR – informacinė ribonukleorūgštis  
GTP – guanozino trifosfatas  
JNK – c-Jun N-terminalinės kinazės  
RCAN1 – kalcineurino reguliatorius  
MET – medžiagų apykaitos ekvivalentas  
TME – naviko mikroaplinka

Mφ – įgimtos imuninės sistemos ląstelės

PBS – fosfatu buferizuotas fiziologinis tirpalas

FBS – fetalinis galvijų serumas

## IVADAS

Inkstų ląstelių karcinoma – dažna ir grėsminga piktybinė liga, kuriai gydyti reikia nuolat ieškoti naujų metodų, kad pagerėtų pacientų gydymo rezultatai. Šiose paieškose tampa svarbu išbandyti farmacinius preparatus, kurie neapsiriboja įprastais kovos su vėžiu modeliais. Šiame tyrime daugiausia dėmesio skiriama trimis skirtingiems junginiams. Tai imegliminas bei metforminas, žinomi dėl savo medžiagų apykaitą moduluojančių savybių [1], ir LRRK-2 receptorių inhibitoriai, kurie patraukė dėmesį dėl savo galimo poveikio vėžio signaliniams keliams [2]. Imegliminas, naujas geriamasis antidiabetinis vaistas, ir metforminas, seniai išbandytas antidiabetinis vaistas, pasirodė esą perspektyvūs reguliuojant vėžio progresavimą lemiančius ląstelinius procesus [3]. Be šių vaistų nuo diabeto, tyrime taip pat buvo nagrinėjama LRRK-2 receptorių inhibitorių sritis. LRRK-2 yra baltymas, dalyvaujantis įvairiose ląstelės funkcijose, o šio baltymo suaktyvėjimas siejamas su vėžio vystymusi [2]. LRRK-2 aktyvumo slopinimas tapo potencialia gydymo strategija, todėl šiuo tyrimu siekta ištirti jo slopinimo poveikį žmogaus inkstų vėžio ląstelėms. Atliekant kruopščius eksperimentus ir analizę, buvo tikimasi įrodyti, kad imegliminas ir metforminas, gali būti naudojami kaip potencialios inkstų ląstelių karcinomos gydymo priemonės, taip atveriant naujus kelius terapinėms intervencijoms kovoje su inkstų ląstelių vėžiu.

**Darbo tikslas:** Ištirti metformino ir imeglimino poveikį žmogaus inkstų vėžinių ląstelių kultūrose

**Darbo uždaviniai:**

1. Ištirti antidiabetinių preparatų poveikį žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui
2. Nustatyti LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikį žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui
3. Įvertinti antidiabetinių vaistų ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus sinergistinį poveikį žmogaus inkstų vėžinėms ląstelėms



# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Inkstų vėžinių ląstelių ypatumai

Vėžys pasireiškia nekontroliuojamu ląstelių, kurios sėkmingai apeina vidinius reguliavimo mechanizmus, augimu. Šias ligų grupes sudaro daugiau nei šimtas genetiškai skirtingų būklių, kurių molekuliniai mechanizmai ir medžiagų apykaitos pokyčiai turi nemažai bendrų bruožų [4]. Dėl pastarųjų technologijų pasiekimų dabar galima greitai ir išsamiai ištirti įvairių vėžio tipų molekulinę struktūrą. Nuolat augančios žinios apie vėžio vystymąsi ir progresavimą suteikia galimybę kurti tiksliau orientuotas diagnostikos priemones bei veiksmingesnius ir mažiau žalingus vėžio gydymo metodus.

Inkstų ląstelių karcinoma yra trečias pagal paplitimą urologinis vėžys [5]. Inkstų vėžio ląstelės, sudarančios 3,8 % visų naujų vėžio atvejų, pasižymi dideliu proliferacijos ir metastazavimo lygiu [5]. Vyraujantis potipis - šviesiųjų ląstelių inkstų ląstelių karcinoma - sudaro apie 70-75 % visų atvejų [6].

Inkstų ląstelių karcinomai būdingi požymiai yra von Hippel-Lindau naviką slopinančio geno mutacija, lemianti hipoksiją indukuojančio veiksnio HIF-1 $\alpha$  baltymo hiperekspresiją [7]. Nuolatinė HIF-1 $\alpha$  aktyvacija yra susijusi su ląstelių proliferacija, angiogeneze ir epitelio-mezenchiminiu perėjimu, todėl prisideda prie inkstų ląstelių karcinomos progresavimo ir metastazavimo į kitus organus [8]. Taip pat, VHL būklė turi įtakos inkstų vėžinių ląstelių jautrumui įvairiems vaistų terapijos būdams, tačiau yra duomenų, kad prie skirtingų ląstelių jautrumo vaistams gali prisidėti ir papildomi molekuliniai skirtumai [9].

Šiame tyrime buvo pasirinkta Caki-2 ląstelės, tai žmogaus šviesiųjų ląstelių, inkstų ląstelių karcinomos linija, pasižyminti epitelio morfologija ir auganti adherentinėje kultūroje.

Buvo nustatyta, kad Caki-2 ląstelės, palyginti su Caki-1 ląstelėmis, yra jautresnės metforminui, o tai gali būti susiję su skirtinga HIF-1 $\alpha$  raiška [10].

## 1.2 Ląstelių mirtis

Ląstelių mirtis yra pagrindinis visų gyvų organizmų procesas, vykstantis įvairiais mechanizmais. Pagrindinės užprogramuotos ląstelių mirties rūšys yra apoptozė, piroptozė ir nekroptozė, kurių kiekviena apima sudėtingus molekulinis ir ląstelinius procesus. Nors kiekvienas kelias pasižymi skirtingais mechanizmais ir rezultatais, tačiau yra ir bendrų komponentų bei savybių. Daugialąsčiuose organizmuose vykstant vystymuisi, audinių homeostazei ir šeiminingo gynybai, ląstelės nuolat formuojasi, todėl ląstelių

mirties keliai yra labai svarbūs senstančioms ir pažeistoms ląstelėms pašalinti, kad būtų išlaikyta sveika pusiausvyra [11]. Programuotos ląstelių mirties keliai skirstomi į dvi grupes: liziniai ir neliziniai. Lizinis reguliuojamos ląstelių mirties tipas atsiranda dėl membranos vientisumo pažeidimo, kuris sukelia vandens antplūdį, membranos potencialo praradimą ir ląstelės išbrinkimą, kuris baigiasi ląstelės plyšimu, tačiau priešingai, nelizinė užprogramuotos ląstelių mirties forma paprastai yra imunologiškai nebyli [11]. Šiame tyrime bus apžvelgiami 2 būdai iš šių 3 pateiktų būdų tai ląstelių apoptozė bei nekrozė.

### 1.2.1 Ląstelių apoptozė

Apoptozė yra nelizinė ląstelių mirties forma, kai mirstančios ląstelės turinys yra apoptozės kūneliuose. Laikas nuo apoptozės pradžios iki visiško ląstelės sunaikinimo gali užtrukti kelias valandas ar net dienas [12]. Be to, apoptozę sukeliančio mechanizmo, stimulo koncentracijos ir ląstelių tipo skirtumai gali sutrumpinti apoptozės laiką [13]. Apoptozę sukelia įvairūs fiziologiniai ir patogenų sukelti stimulai ir sąlygos, tačiau paprastai ji inicijuojama vidiniu arba išoriniu keliu.

Vykstant vidinei apoptozei, dar vadinamai mitochondrijų apoptozės keliu, ląstelė pajunta viduląstelinį stresą (t. y. augimo veiksnių ar maistinių medžiagų trūkumą, DNR pažeidimą ir endoplazminio tinklo stresą) ir žūsta pati per procesą, kuris apima mitochondrijų išorinės membranos permeabilizaciją (MOMP) [11]. Kai įvyksta MOMP, mitochondrijos iš tarpmembraninės erdvės į citoplazmą išskiria citochromą c [14]. Citochromas C prisijungia ir skatina apoptozės proteazę aktyvuojančio 1 faktoriaus (APAF-1) oligomerizaciją į heptamerinę formą. APAF-1 turi kaspazės įdarbinimo domeną (CARD), kuris sąveikauja su pro-kaspazės-9 CARD ir sudaro apoptosomą - didžiulį kompleksą, sudarytą iš citochromo c, APAF-1 ir pro-kaspazės-9 [15]. Apoptosomoje apoptozės iniciatorius pro-kaspazė-9 aktyvuojasi į kaspazę-9 ir suskaldo pro-kaspazę-3 ir pro-kaspazę-7, taip išlaisvindamas jų apoptozės vykdytojų funkcijas [16]. Apoptozė prasideda, kai promirtiniai signalai nusveria progyvenimo signalus [11].

Išorinis kelias yra antroji apoptozės grandis. Išorinės apoptozės metu ekstraląsteliniai signalai atpažįsta plazminėje membranoje esantys mirties receptoriai ir sukelia mirtį. Šis inicijuojantis signalas gali ateiti iš aplinkos, imuninės sistemos arba kaimyninių ląstelių [17]. Mirties ligandus, atpažįsta atitinkami specifiniai ląstelių paviršiaus mirties receptoriai, šių mirties receptorių viduląstelinė sritis, prisijungus atitinkamiems ligandams, įtraukia adapterio molekulę FAS [11]. FAS turi mirties domenų, o šių domenų homotipinė sąveika (taip pat esanti pro-kaspazėje-8) dalyvauja įdarbinant pro-kaspazę-8 į mirtį sukelti signalinį kompleksą (DISC), kuriame ji aktyvuojama [18]. Aktyvuota kaspazė-8 tiesiogiai skaldo kaspazės-

3 ir kaspazės-7 proformas, aktyvuodama šias kaspazes, kad jos įvykdytų ląstelės mirtį [19].

## 1.2.2 Ląstelių nekrozė

Skirtingai nuo apoptozės, nekrozė yra alternatyvi nekontroliuojama ląstelių žūties forma, kurią sukelia išorinė žala, pavyzdžiui, hipoksija arba uždegimas [20]. Šis procesas dažnai susijęs su įvairių prouždegiminių baltymų ir junginių, tokių kaip branduolinio faktoriaus reguliacija, todėl plyšta ląstelės membrana ir ląstelės turinys išsilieja į aplinkines sritis, sukeldamas uždegimo ir audinių pažeidimo kaskadą, tačiau priešingai nei apoptozė, nekrozė yra nuo energijos nepriklausoma ląstelių mirties forma, kai ląstelė dėl staigaus šoko (radiacijos, karščio, cheminių medžiagų, hipoksijos ir kt.) taip stipriai pažeidžiama, kad nebegali funkcionuoti [21]. Paprastai ląstelės negali palaikyti homeostazės su aplinka ir į tai reaguoja patinimu.

Nekrozinė ląstelių mirtis taip pat gali įvykti per apibrėžtas biochemines programas, tam tikrose ląstelių linijose, kai šios ląstelės buvo veikiamos auglio nekrozės faktoriumi alfa (TNF- $\alpha$ ) buvo stebimos ir apoptozinės, ir nekrozinės mirties formos [22]. Apoptozinę ląstelių mirtį gali slopinti kaspazės inhibitorius. Gydytas kaspazės inhibitoriumi neišgelbėjo TNF apdorotų ląstelių nuo žūties; veikiau toks gydymas pakeitė pusiausvyrą nuo apoptozės link nekrozinės mirties [23]. Su receptoriais sąveikaujanti kinazė 1 (RIP1, dar žinoma kaip RIPK1) buvo pirmoji signalinė molekulė, identifikuota kelyje, kontroliuojančiame kaspazės slopinamą nekrozinę ląstelių mirtį [24]. RIP1 reikalingumas nekrozinėi ląstelių mirčiai buvo dar kartą patvirtintas atlikus tyrimą, kurio metu buvo iširtas cheminis RIP1 kinazės aktyvumo inhibitorius, autorių pavadintas nekrostatinu-1, blokuojantis šią nekrozės formą [25].

Išanalizavus užprogramuotos nekrozės viduląstelinio signalo perdavimą, paaiškėjo, kad egzistuoja bendras signalo perdavimo mechanizmas, kuris prasideda nuo RIP kinazių aktyvacijos [23]. Užprogramuota nekrozė gali būti aktyvuota, kai ląstelės veikiamos TNF šeimos citokinais [24]. Aktyvuoti receptoriai sąveikauja su RIP1 per homofilinę sąveiką tarp jų karboksilo mirties domeno (DD) ir RIP1 DD domeno ir įdarbina ląstelių apoptozės inhibitoriaus baltymus (cIAP), kad stabilizuotų RIP1 turintį su plazmine membrana susijusį kompleksą, kuris aktyvuoja NF- $\kappa$ B ir mitogenu aktyvuotų baltymų (MAP) kinazes [26]. Ši RIP1 funkcija sukelia uždegimą ir nukreipia ląsteles į išgyvenimo programas.

### 1.3 Naudojamų tiriamųjų medžiagų ypatumai

Šiame tyrime Caki-2 ląstelių kultūros yra paveikiamos metforminu, imegliminu bei LRRK-2 receptorių inhibitoriu.

#### 1.3.1 Metforminas

Dėl sėslaus gyvenimo būdo ir kaloringos mitybos 2 tipo cukrinio diabeto paplitimas sparčiai didėja ir yra laikomas pasauline visuomenės sveikatos problema [27]. Nors diabeto ir kraujagyslių komplikacijų ryšys yra plačiai žinomas, apie diabeto ir vėžio ryšį žinoma mažiau. Vėžys ir cukrinis diabetas yra dažnos ligos, todėl cukrinio diabeto ir vėžio bendras pasireiškimas pacientui nėra retas [28]. Vis dėlto daugelis stebėjimo tyrimų rodo, kad vėžio ir cukrinio diabeto bendras pasireiškimas pasitaiko dažniau, nei būtų galima tikėtis dėl atsitiktinumo. Plačiai pripažįstama, kad diabeto diagnozė yra svarbus daugelio vėžinių susirgimų rizikos veiksnys, nepriklausomai nuo jo ryšio su nutukimu [29].

Metforminas, biguanidas, daugelyje nacionalinių ir tarptautinių rekomendacijų laikomas pirmos eilės 2 tipo diabeto gydymo priemone [30]. Šis vaistas taip pat turi nustatytą klinikinį veiksmingumą tokioms būklėms, kurioms būdinga hiperinsulinemija, kaip policistinių kiaušidžių sindromas, gestacinis diabetas, nealkoholinis steatohepatitas ir priešdiabetinė būklė [31]. Taip pat be antihiperглиkeminio poveikio metforminas turi ir daug pleotropinių poveikių, kurie gali būti svarbūs klinikiniu požiūriu.

Bendras metformino poveikis – pagerėja jautrumas insulinui ir sumažėja gliukozės išsiskyrimas kepenyse, todėl sumažėja insulino ir gliukozės kiekis. Siūlomi keli metformino veikimo mechanizmai. Jautrumo insulinui pagerėjimą gali lemti padidėjusi insulino receptorių raiška ir tirozinkinazės aktyvumas, taip pat per inkretinų kelią [32]. Taip pat, metforminas didina į gliukagoną panašaus peptido-1 (GLP-1) sekreciją, taip pat didina beta ląstelių GLP-1 receptorių raišką, per perioksomų proliferatoriaus aktyvuoto receptoriaus- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) tarpininkaujamą kelią.

Patekęs į ląstelę, metforminas daugiausia veikia mitochondrijose. Metforminas yra teigiamai įkrauta molekulė ir dėl neigiamo krūvio sąveikauja su mitochondrijų membrana, patekęs į mitochondriją, metforminas slopina mitochondrijų elektronų pernašos sistemą, todėl ląstelėje sumažėja adenozintrifosfato (ATP) ir padidėja adozinmonofosfato (AMP/ATP) santykis [27]. Daugelį metų šio slopinimo mechanizmas buvo nežinomas, tačiau dabar pripažįstama, kad AMP aktyvuotos baltymų kinazės (AMPK) aktyvavimas, atrodo, yra susijęs su metformino poveikiu ląstelėms [33]. AMPK atlieka pagrindinį vaidmenį ląstelių energijos homeostazėje energijos trūkumo sąlygomis ir aktyvuojasi padidėjus AMP/ATP santykiui

[27]. Suaktyvėjusi AMPK paverčia ląstelę iš anabolinės būsenos į katabolinę, išjungdama ATP vartojimą ir atkurdamą ląstelės homeostazę [24]. Dėl to slopinama baltymų, lipidų ir gliukozės sintezė ir padidėja gliukozės ir riebalų rūgščių pasisavinimas ląstelėje, todėl pasiekiamas ląstelės energijos balansas [27].

AMPK turi centrinį vaidmenį kaip daugelio procesų reguliatorius ląstelėje, ir jo disreguliacija gali atlikti svarbų vaidmenį vėžio patogenezėje [34]. AMPK aktyvavimas turi daugybę svarbių poveikių vėžio ląstelių metabolizmui, įskaitant ląstelių dalijimosi mitozės būdu slopinimą, kuris lemia dalijimosi praradimą [34]. Dėl savo AMPK aktyvacijos, metforminas atrodo, kad sukelia G1 fazės ląstelių ciklo sustabdymą lemiantį dauginimosi praradimą, nors nesukeliantį apoptozės [35]. Metforminas taip pat gali skatinti daugiarūšio vaistų atsparumo 1 (MDR1) geno aktyvaciją, siūlydamas, kad metforminas gali būti naudinga kaip pagalbinė terapija siekiant sumažinti vaistų nesėkmę vėžio chemoterapijoje [36].

AMPK aktyvavimas taip pat slopina lipogeninius fermentus, įskaitant riebalų rūgščių sintezę ir acetilo CoA karboksilazę, dėl ko sumažėja riebalų rūgščių prieinamumas naviko ląstelėms [27]. AMPK aktyvavimas taip pat pasirodo, kad turi priešuždegiminį poveikį, lemiantį sumažėjimą prouždegiminiais citokiniais, tokiais kaip naviko nekrozės faktorius alfa, interleukinas-6 ir 8 ir vaskulinis endotelinio augimo faktorius. IL-6 gamyba aktyvuoja signalo pernešimo ir aktyvacijos baltymą, lemiantį ląstelių dauginimąsi, todėl IL-6 slopinimas sumažins ląstelių dauginimąsi [37].

Taip pat, su metforminu tyrimai jau yra atlikti stebint plaučių vėžį, kolorektalinį vėžį, prostatos vėžį, krūties vėžį bei kasos vėžį.

### **1.3.2 Imegliminas**

Priešingai nei metforminas, imegliminas yra ciklinė molekulė, turinti triazino žiedą, tačiau, kaip ir metforminas, imegliminas taip pat yra bazinė maža molekulė [38]. Imegliminas sintezuojamas iš metformino kaip pirmtako per vieną cheminį reakcijos žingsnį. Naujesni mechanizmo tyrimai rodo, kad imegliminas gerina mitochondrijų funkciją [39]. Taip pat, imegliminas mažina tiek ATP/ADP santykį, tiek gliukozės gamybą kultūruotose hepatocitose, kaip ir metforminas, tačiau, skirtingai nei metforminas, imegliminas neslopino respiracinio grandininio komplekso I aktyvumo hepatocitose, vietoj to, gydant imegliminu padidėjo respiracinio grandininio komplekso III fermentų iRNR kiekis ir aktyvumas kepenyse [39].

### 1.3.3 LRRK-2 receptorių inhibitorius

LRRK-2 yra daug domenų turintis didelis baltymas, turintis GTPazės ir kinazės aktyvumą. Daugybė įrodymų rodo, kad LRRK2 yra susijęs su Parkinsono liga ir su imuninėmis ligomis, įskaitant uždegimines žarnyno ligas, raupus ir tuberkuliozę [40,41]. Pastaruoju metu daugelyje tyrimų buvo tiriamas LRRK-2 raiškos modelis įvairiuose navikuose ir nustatyta, kad LRRK-2 yra susijęs su vėžiniais susirgimais. Tačiau dėl audinių tipui būdingos genų tinklo struktūros LRRK-2 daro įtaką naviko augimui priklausomai nuo vėžio tipo. [2]. In vitro modeliai neseniai parodė, kad LRRK-2 mažinimas slopina cholangiokarcinomos ląstelių augimą [42] ir mažina papilinės skydliaukės karcinomos proliferaciją [43]. Kita vertus, per didelė LRRK-2 ekspresija aktyvuoja melanocitų ir melanomos ląstelių išlikimo ir proliferacijos signalus [44]. LRRK-2 gali atlikti naviko slopinimo funkciją, dėl p53 fosforilinimo ir p21 indukcijos [44], JNK aktyvinimo [45] ir RCAN1 fosforilinimo [46]. Priešingai, LRRK-2 taip pat atlieka potencialiai onkogeninį vaidmenį aktyvuojant MET signalą [47]. Naudojant kelių genų testavimo grupes, nustatyta, kad LRRK-2 turi prognostinę reikšmę įvairių tipų vėžiui [48].

Plėtojant gydymo strategiją, kuria grindžiamas LRRK-2 vaidmuo vėžio procesuose, labai praverstų visos vėžio grupės analizė. Vėžio ląstelės navikinio vystymosi metu patiria potencialiai selektyvų spaudimą, kurį sukelia imunologiškai instinktyvi aplinka, tai reiškia, kad tik greitai mutuojančios vėžio ląstelės, kurių imunogeniškumas sumažėjęs, yra tinkamesnės išgyventi, formuojant imunosupresinę naviko mikroaplinką (TME) ir taip skatinant naviko vystymąsi [2]. LRRK-2, labai išreikšta imuninėse ląstelėse, ypač Mφ ir dendritinėse ląstelėse, prisideda prie Mφ uždegiminių citokinų gamybos [49] ir reguliuoja dendritinių ląstelių migraciją bei antigeno pateikimą [50,51], o tai rodo, kad LRRK-2 vaidmuo įgimtame imunitete yra esminis.

## 2. TYRIMO METODIKA

### 2.1 Reagentai

Metformino naudojamos koncentracijos buvo 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 5 mM, jos gaunamos praskiedžiant motininį metformino tirpalą. Taip pat buvo naudojama 10 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  imeglimino koncentracijos, bei 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ir 10  $\mu\text{M}$  LRRK-2 receptorių inhibitoriaus koncentracijos. Fosfatu buferizuotas fiziologinis tirpalas (PBS) buvo naudojamas metforminui skiesti bei ląstelėms praplauti. McCoy's 5A (modifikuota) terpė su 10% fetaliniu galvijų serumu (FBS) buvo naudojami ląstelių auginimui bei TripLE Express tripsinas fermentiniam ląstelių atkėlimui persėjimo procedūros metu.

### 2.2 Caki-2 ląstelių kultivavimas

Svarbiausia viską daryti laminare, kad ląstelių kultūra neužsiterštų. Iš 25 cm<sup>2</sup> ląstelių auginimo flakono jau esančio su ląstelėmis nusiurbama terpė. Tada, ląstelės praplaunamos 1 ml PBS tirpalu, užpilama ant ląstelių 400  $\mu\text{l}$  tripsino. Flakonas su ląstelėmis ir tripsinu inkubuojamas inkubatoriuje, kuriame yra 5 % CO<sub>2</sub> ir 20% O<sub>2</sub>, 37 °C temperatūroje 5 minutes. Po to, nusiurbta terpė gražinama atgal, pavartoma, kad visos ląstelės atkibtų nuo auginimo flakono paviršiaus, ir supilama į 15 mililitrų mėgintuvėlį. Mėgintuvėlis centrifuguojamas 7 minutes, 125 apsisukimų / min greičiu. Po centrifugavimo skystis nupilamas ir likusios ląstelės užpilamos 1 ml auginimo terpės ir resuspenduojamos, 50% ląstelės suspensijos supilama į naują flakoną su auginimo terpe ir dedama inkubuotis inkubatoriuje, kuriame yra 5 % CO<sub>2</sub> ir 20% O<sub>2</sub>, 37 °C temperatūroje, 48 valandas iki kito persėjimo.

Iš likusio 50% ląstelių suspensijos užsėjama 8-10 šulinėlių, 96 šulinėlių lėkštelėje.

Apskaičiuojama kiek tiksliai yra ląstelių 1 mililitre trypano mėlio dažymo metodu. Trypano mėlynasis yra vienas iš kelių rekomenduojamų dažiklių naudoti dažų išskyrimo procedūrose gyvybingoms ląstelėms skaičiuoti. Šis metodas pagrįstas principu, kad gyvos (gyvybingos) ląstelės nelaiko tam tikrų dažiklių, o negyvos (negyvybingos) ląstelės juos laiko. Dažymas palengvina ląstelių morfologijos vizualizaciją. Taip pat šiame metode yra naudojama hemacytometras kuriame ir yra skaičiuojama ląstelių kiekis. Tai yra daroma, paimant 20 mikrolitrų suspensijos ir sumaišant su 20 mikrolitrų tripano mėliu ependorfe. Sumaišius, 20 mikrolitrų idėti į hemacytometrą ir suskaičiuoti kiek ląstelių matosi 4 laukuose (vienas laukas yra 1/10000 ml). Visų suskaičiuotų ląstelių suma padaugini iš 2 x 4 x 5000

Toliau, žinant kad vienam šulinėliui reikia 8000 ląstelių ir žinant kad bendras vieno šulinėlio tūris yra 200 mikrolitrų apskaičiuoti kiek tiksliai reikės ląstelių suspensijos idėti į šulinėlį, kitą dalį užpilti auginimo terpe, pavyzdžiui gauname kad per 4 laukelius yra 27 ląstelės reiškiasi viename mililitre yra 1080000 ląstelių, jeigu mes sėjame 8-10 šulinėlių mums reikia 80000 padalinti iš 1080000 ląstelių kad sužinotume koks tikslus tūris suspensijos mums reikalingas.

Lėkštelė su ląstelėmis dedama inkubuotis 37 °C temperatūroje 24 valandas. Po 24 valandų ląstelės paveikiamos tiriamosiomis medžiagomis, vieno šulinėlio nepaveikiant kaip kontrolės.

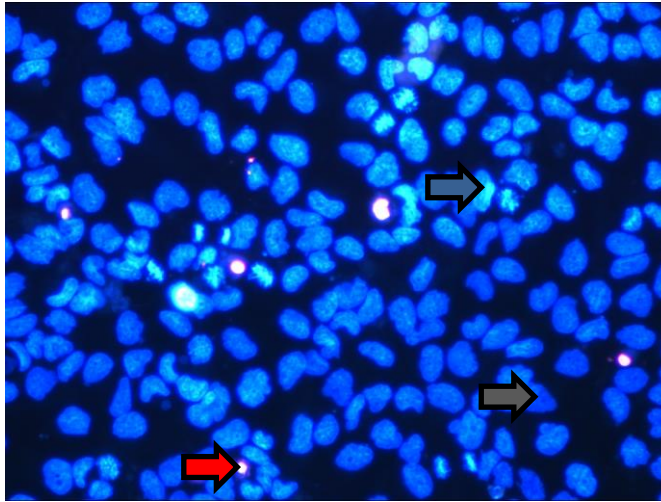
### **2.3 Ląstelių gyvybingumo ir skaičiaus įvertinimas**

Po paros laiko uždėjus medžiagas ant ląstelių, dedami dažai į šulinėlius su ląstelėmis. Tai propidžio jodidas 1 µl, Hoescht 33342 2 µl.

Propidžio jodidas yra populiarus raudonai fluorescuojantis branduolinis ir chromosomų kontrastatas. Kadangi propidžio jodidas neprasiskverbia į gyvas ląsteles, jis puikiai tinka norint pamatyti negyvas nekrozavusias ląsteles. Todėl fluoresuojantis dažas nudažo tik negyvas ląsteles raudona spalva.

Hoechst 33342 (2'-[4-etoksifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazolo trihidrochlorido trihidratas) yra ląstelėms pralaidi DNR dažanti medžiaga, kuri sužadinama ultravioletine šviesa ir skleidžia mėlyną fluorescenciją. Jis specifiskai naudojamas gyvų arba fiksuotų ląstelių ir audinių branduoliams dažyti. Taip pat, šis dažas ryškiau nudažo apoptozinių ląstelių kondensuotą chromatiną nei gyvų ląstelių chromatiną.





**1 pav.** Raudona rodyklė nurodo ląsteles žuvusias nekrozės būdu, ląstelių branduolius nudažant raudonai, mėlyna rodyklė – ląsteles žuvusias apoptozės būdu, ląstelių chromatiną nudažant šviesiai mėlyna spalva, pilka rodyklė – gyvas ląsteles, ląstelių chromatiną nudažant mėlyna spalva

Paveikus ląsteles dažais, lėkštelė su ląstelėmis dedama inkubuotis 15 min inkubatoriuje, kuriame yra 5 % CO<sub>2</sub> ir 20% O<sub>2</sub>, 37 °C temperatūra. Po inkubavimo ląstelių skaičius ir gyvybingumas buvo tiriamas fluorescenciniu mikroskopu OLYMPUS IX71S1F-3 20x priartiniu. Ląstelių skaičius vertinamas skaičiuojant visas esančias ląsteles viename mikroskopiniame laukelyje 5 atsitiktinai pasirinktuose šulinėlio laukeliuose ir apskaičiuojant jų vidurkį. Žmogaus insktų vėžnių ląstelių gyvybingumas vertinamas procentais, kiek iš visų ląstelių yra mirusių apoptozės ir nekrozės būdu, kai visų apskaičiuotų ląstelių 5 šulinėlio laukuose vidurkis yra lygus 100 %.

## 2.4 Vaizdinė duomenų analizė

Žmogaus vėžinių ląstelių vizualizacija buvo atlikta su fluorescentiniu mikroskopu OLYMPUS, kuriame įmontuota vaizdo kamera, leidžianti užfiksuoti aukštos raiškos mikroskopines nuotraukas. Ląstelių stebėjimui buvo naudojamas x20 objektyvas, didinantis mikroskopinį vaizdą apie 500 kartų. Kiekvienas tyrinėjimo šulinys su ląstelėmis buvo fotografuojamas 5 atsitiktinai pasirinktuose taškuose. Fluorescentinių nuotraukų analizei ir surinktų duomenų interpretacijai buvo pritaikytos ImageJ ir ImageProExpress 6.3 programos.

## 2.5 Statistinė duomenų analizė

Duomenų statistinė analizė buvo atlikta pasitelkiant statistikos programą „Sigma Plot“. Šiame tyrime eksperimentų duomenys pristatomi kaip 3–7 vidurkiai su atitinkamomis vidutinėmis paklaidomis ( $\bar{x} \pm SE$ ). Atlikus stjudento t-testą statistikos programoje, nustatoma, ar esantis pokytis yra statistiškai reikšmingas, o tai yra nustatoma iš patikimumo lygmens  $p$ . Rezultatai laikomi statistiškai reikšmingais, jei  $p \leq 0,05$ .

### 3. REZULTATAI

#### 3.1 Antidiabetinių preparatų poveikis žmogaus inkstų vėžinėms ląstelėms

##### 3.1.1 Metformino poveikis žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui

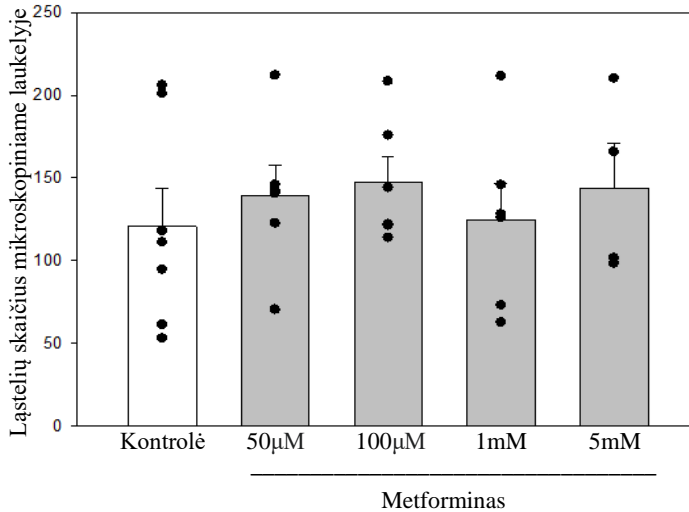
Metformino poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių skaičiui mikroskopiniame laukelyje buvo tiriamas, lyginant 7 kontrolių tyrimų visų ląstelių skaičių mikroskopiniame laukelyje vidurkį 120.7 ( $\pm 23.2$ ) su metformino 4 koncentracijomis 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM ir 5mM. Be to, taikant stjudento t–testą, lyginant kontrolę su minėtomis koncentracijomis tikimasi gauti  $p \leq 0.05$ , kad rezultatai būtų statistiškai reikšmingi.

Su 50  $\mu\text{M}$  koncentracija metformino atliki 6 tyrimai, kurių visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 139.0 ( $\pm 18.6$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Su 100  $\mu\text{M}$  koncentracija taip pat atlikti 6 tyrimai, kurių visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 147.6 ( $\pm 15.3$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Su 1 mM koncentracija irgi atlikti 6 tyrimai, kurių visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 124.5 ( $\pm 22.0$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Su 5 mM koncentracija buvo atlikti 4 tyrimai, kurių visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 143.9 ( $\pm 27.0$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.



**2 pav.** Metformino poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių skaičiui mikroskopiniame laukelyje. Taškais pažymėtos atskiros eksperimentų reikšmės.

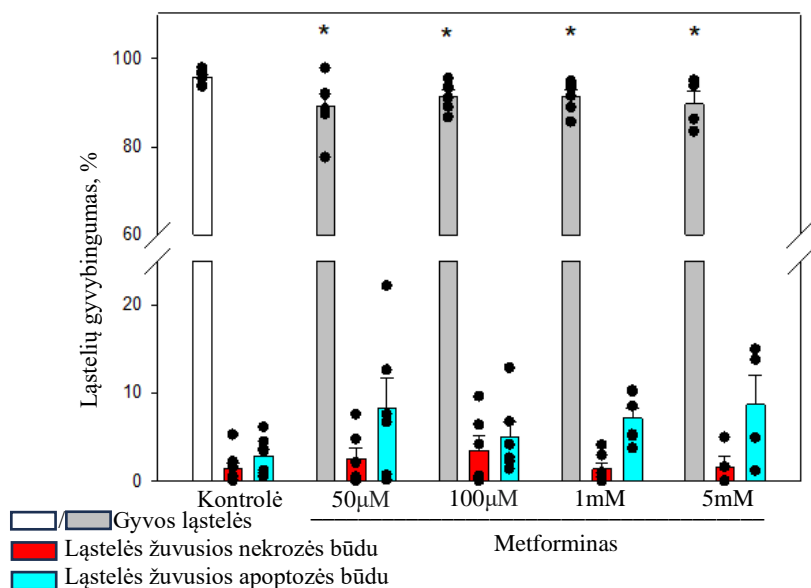
Metformino poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių gyvybingumui buvo tiriamas, lyginant 7 kontrolių tyrimų gyvų ląstelių % vidurkį kuris buvo 95.8 % ( $\pm 0.6$  %) su 4 metformino koncentracijomis 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 5mM. Be to, taikant stjudento t–testą, lyginant kontrolę su minėtomis koncentracijomis tikimasi gauti  $p \leq 0.05$ , kad rezultatai būtų statistiškai reikšmingi.

Su 50  $\mu$ M koncentracija metformino 6 tyrimų ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 89.2 % ( $\pm 2.8$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.

Su 100  $\mu$ M koncentracija taip pat atlikti metformino 6 tyrimai ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 91.5 % ( $\pm 1.3$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.

Su 1 mM koncentracija irgi atlikti 6 tyrimai, kurių ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 91.4 % ( $\pm 1.5$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.

Su 5 mM koncentracija metformino 4 tyrimų ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 89.7 % ( $\pm 2.9$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.



**3 pav.** Imeglimino poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių gyvybingumui. Balti ir pilki stulpeliai rodo gyvybingumą, raudoni rodo nekrozės būdu žuvusių, žydri rodo apoptozės būdu žuvusių ląstelių kiekį % kultūroje.

\* – statistiškai patikimas pokytis, kai  $p \leq 0.05$ , lyginant su kontroline grupe.

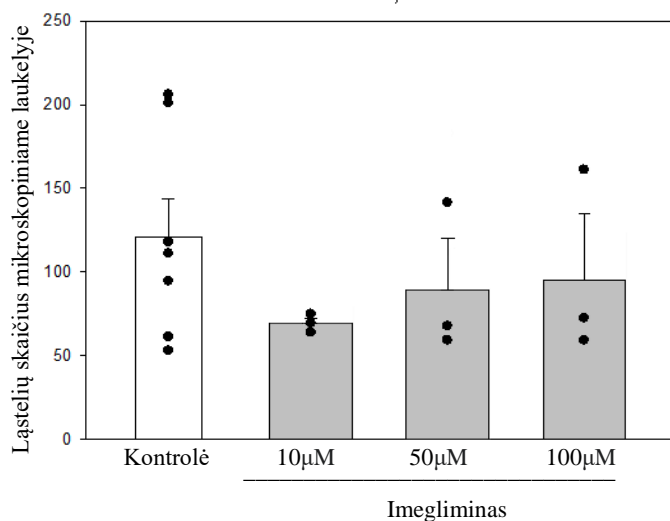
### 3.1.2 Imeglimino poveikis žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui

Imeglimino poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių skaičiui mikroskopiniame laukelyje buvo tiriamas, lyginant 7 kontrolių tyrimų visų ląstelių skaičių mikroskopiniame laukelyje vidurkį  $120.7 (\pm 23.2)$  su imeglimino 3 koncentracijomis  $10 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ . Be to, taikant stjudento t–testą, lyginant kontrolę su minėtomis koncentracijomis tikimasi gauti  $p \leq 0.05$ , kad rezultatai būtų statistiškai reikšmingi.

Su  $10 \mu\text{M}$  koncentracija imeglimino 3 tyrimų visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo  $72.6 (\pm 2.5)$ , atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Su  $50 \mu\text{M}$  koncentracija taip pat buvo atlikti 3 tyrimai, kurių visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo  $90.9 (\pm 27.7)$ , atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Su  $100 \mu\text{M}$  koncentracija irgi buvo atlikti 3 tyrimai, kurių visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo  $98.3 (\pm 33.4)$ , atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.



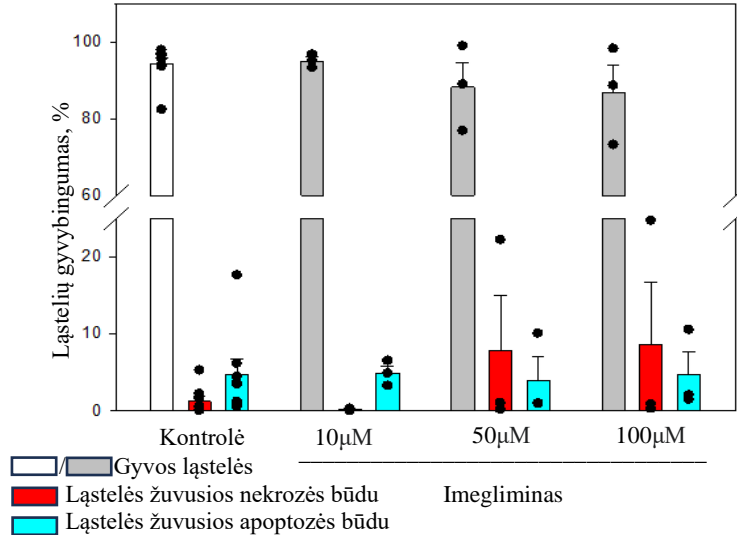
**4 pav.** Imeglimino poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių skaičiui mikroskopiniame laukelyje. Taškais pažymėtos atskiros eksperimentų reikšmės.

Imeglimino poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių gyvybingumui buvo tiriamas, lyginant 7 kontrolių tyrimų gyvų ląstelių % vidurkį kuris buvo 95.8 % ( $\pm 0.6$  %) su 3 imeglimino koncentracijomis 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ . Be to, taikant stjudento t–testą, lyginant kontrolę su minėtomis koncentracijomis tikimasi gauti  $p \leq 0.05$ , kad rezultatai būtų statistiškai reikšmingi.

Su 10  $\mu\text{M}$  koncentracija imeglimino 3 tyrimų ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 95.0 % ( $\pm 1.0$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Su 50  $\mu\text{M}$  koncentracija, taip pat atlikti imeglimino 3 tyrimai, kurių ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 88.2 % ( $\pm 6.4$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Su 100  $\mu\text{M}$  koncentracija, irgi atlikti imeglimino 3 tyrimai, kurių ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 86.7 % ( $\pm 7.3$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.



**5 pav.** Imeglimino poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių gyvybingumui. Balti ir pilki stulpeliai rodo gyvybingumą, raudoni rodo nekrozės būdu žuvusių, žydri rodo apoptozės būdu žuvusių ląstelių kiekį % kultūroje.

\* – statistiškai patikimas pokytis, kai  $p \leq 0.05$ , lyginant su kontroline grupe.

### 3.2 LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui

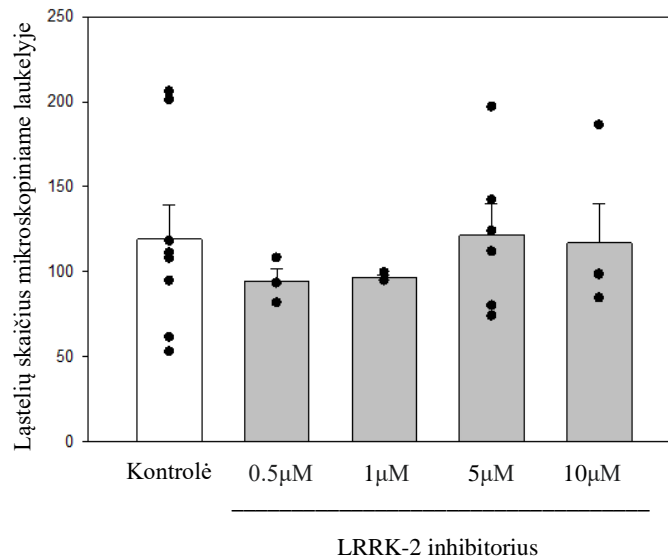
LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių skaičiui mikroskopiniame laukelyje buvo tiriamas, lyginant 7 kontrolinių tyrimų visų ląstelių skaičių mikroskopiniame laukelyje vidurkį  $120.7 (\pm 23.2)$  su LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 4 koncentracijomis  $0,5 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$  ir  $10 \mu\text{M}$ . Be to, taikant studento t-testą, lyginant kontrolę su minėtomis koncentracijomis tikimasi gauti  $p \leq 0.05$ , kad rezultatai būtų statistiškai reikšmingi.

Su  $0,5 \mu\text{M}$  koncentracija LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 3 tyrimų visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo  $94.3 (\pm 7.6)$ , atlikus studento t-testą, gautas  $p > 0.05$ , statistinio reikšmingumo nerasta.

Su  $1 \mu\text{M}$  koncentracija LRRK-2 receptorių inhibitoriumi taip pat buvo atlikti 3 tyrimai, kurių visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo  $96.4 (\pm 1.6)$ , atlikus studento t-testą, gautas  $p > 0.05$ , statistinio reikšmingumo nerasta.

Su 5  $\mu\text{M}$  koncentracija LRRK-2 receptorių inhibitoriumi buvo atlikti 6 tyrimai, kurių visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 121.5 ( $\pm 18.4$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Su 10  $\mu\text{M}$  koncentracija LRRK-2 receptorių inhibitoriumi buvo atlikti 4 tyrimai, kurių visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 116.9 ( $\pm 23.4$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.



**6 pav.** LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių skaičiui mikroskopiniame laukelyje. Taškais pažymėtos atskiros eksperimentų reikšmės.

Imeglimino poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių gyvybingumui buvo tiriamas, lyginant 7 kontrolių tyrimų gyvų ląstelių % vidurkį kuris buvo 95.8 % ( $\pm 0.6$  %) su 4 LRRK-2 receptoriaus inhibitoriaus koncentracijomis 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ir 10  $\mu\text{M}$ . Be to, taikant stjudento t–testą, lyginant kontrolę su minėtomis koncentracijomis, tikimasi gauti  $p \leq 0.05$ , kad rezultatai būtų statistiškai reikšmingi.

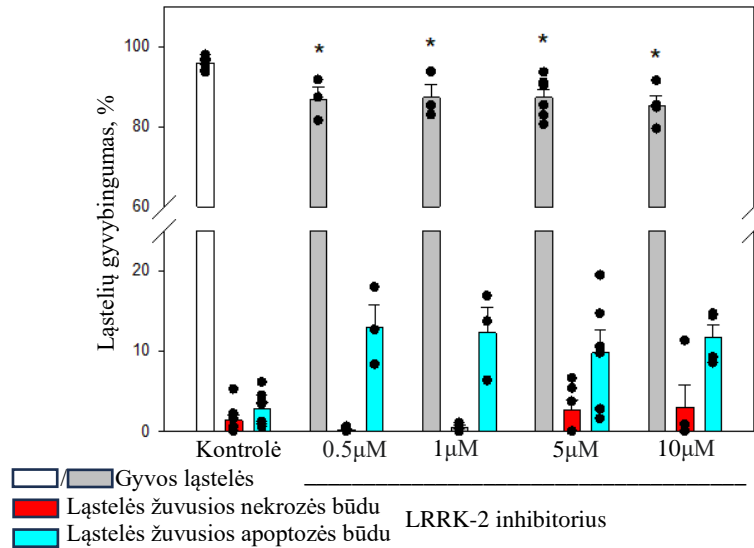
Su 0,5  $\mu\text{M}$  koncentracija LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 3 tyrimų ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 86.8 % ( $\pm 3.0$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.

Su 1  $\mu\text{M}$  koncentracija LRRK-2 receptorių inhibitoriumi taip pat buvo atlikti 3 tyrimai, kurių ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 87.3 % ( $\pm 3.3$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.



Su 5  $\mu\text{M}$  koncentracija LRRK-2 receptorių inhibitoriumi buvo atlikti 6 tyrimai, kurių ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 87.3 % ( $\pm 2.1$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.

Su 10  $\mu\text{M}$  koncentracija LRRK-2 receptorių inhibitoriumi buvo atlikti 6 tyrimai, kurių ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 85.3 % ( $\pm 2.4$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.



**7 pav.** LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių gyvybingumui.

Balti ir pilki stulpeliai rodo gyvybingumą, raudoni rodo nekrozės būdu žuvusių, žydri rodo apoptozės būdu žuvusių ląstelių kiekį % kultūroje.

\* – statistiškai patikimas pokytis, kai  $p \leq 0.05$ , lyginant su kontroline grupe.

### 3.3 Sinergistinis antidiabetinių preparatų ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui ir gyvybingumui

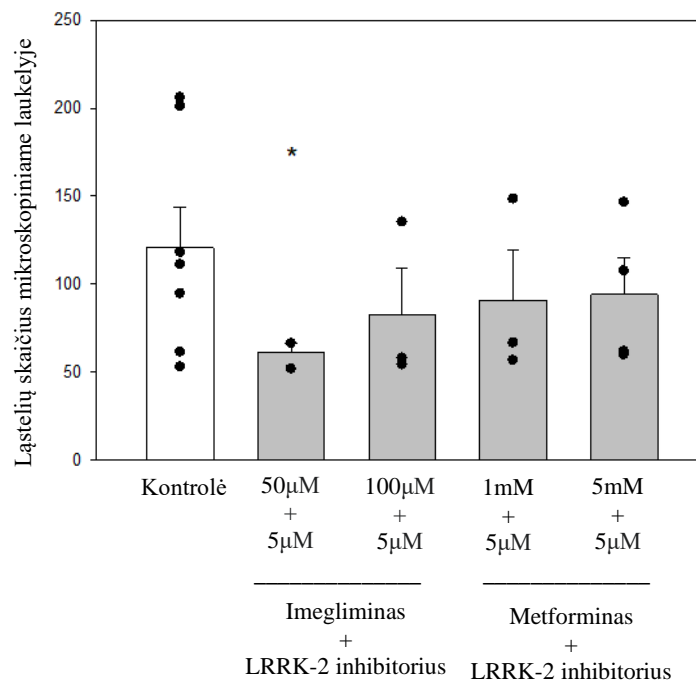
Sinergistinis antidiabetinių preparatų ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių skaičiui mikroskopiniame laukelyje buvo tiriamas, lyginant 7 kontrolių tyrimų visų ląstelių skaičių mikroskopiniame laukelyje vidurkį 120.7 ( $\pm 23.2$ ) su imeglimino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 2 koncentracijomis 50  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$  ir 100  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$  bei su metformino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 2 koncentracijomis 1 mM + 5  $\mu\text{M}$  ir 5 mM + 5  $\mu\text{M}$ . Be to, taikant stjudento t–testą, lyginant kontrolę su minėtomis koncentracijomis tikimasi gauti  $p \leq 0.05$ , kad rezultatai būtų statistiškai reikšmingi.

Imeglimino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 50  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$  koncentracijos 3 tyrimų visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 61.4 ( $\pm 4.8$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.

Imeglimino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 100  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$  koncentracijos 3 tyrimų visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 82.5 ( $\pm 26.5$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Metformino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 1 mM + 5  $\mu\text{M}$  koncentracijos 3 tyrimų visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 90.5 ( $\pm 29.1$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.

Metformino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 5 mM + 5  $\mu\text{M}$  koncentracijos 4 tyrimų visų ląstelių skaičius mikroskopiniame laukelyje vidurkis buvo 94.0 ( $\pm 20.7$ ), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p > 0.05$ , statistiško reikšmingumo nerasta.



**8 pav.** Sinergistinis antidiabetinių preparatų ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių skaičiui mikroskopiniame laukelyje. Taškais pažymėtos atskiros eksperimentų reikšmės.

\* — statistiškai patikimas pokytis, kai  $p \leq 0.05$ , lyginant su kontroline grupe.

Sinergistinis antidiabetinių preparatų ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių gyvybingumui buvo tiriamas, lyginant 7 kontrolių tyrimų gyvų ląstelių % vidurkį kuris buvo 95.8 % ( $\pm 0.6$  %) su imeglimino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 2 koncentracijomis 50  $\mu\text{M}$  +

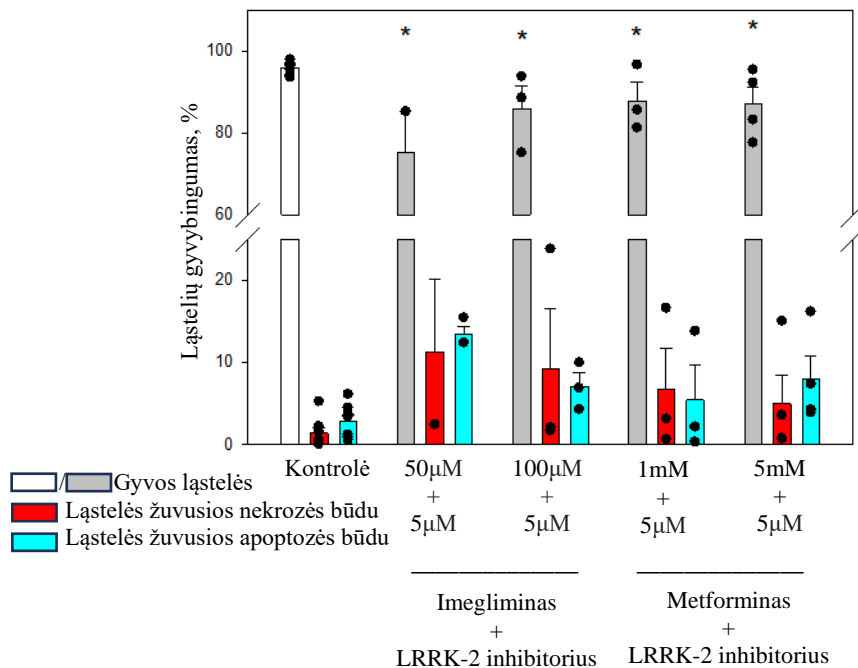
5  $\mu\text{M}$  ir 100  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$  bei su metformino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 2 koncentracijomis 1 mM + 5  $\mu\text{M}$  ir 5 mM + 5  $\mu\text{M}$ . Be to, taikant stjudento t–testą, lyginant kontrolę su minėtomis koncentracijomis tikimasi gauti  $p \leq 0.05$ , kad rezultatai būtų statistiškai reikšmingi.

Imeglimino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 50  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$  koncentracijos 3 tyrimų ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 75.3 % ( $\pm 9.9$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.

Imeglimino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 100  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$  koncentracijos 3 tyrimų ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 85.8 % ( $\pm 5.5$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.

Metformino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 1 mM + 5  $\mu\text{M}$  koncentracijos 3 tyrimų ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 87.8 % ( $\pm 4.6$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.

Metformino ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus 5 mM + 5  $\mu\text{M}$  koncentracijos 4 tyrimų ląstelių gyvybingumo % vidurkis buvo 87.1 % ( $\pm 4.1$  %), atlikus stjudento t–testą, gautas  $p \leq 0.05$ , rezultatai yra statistiškai reikšmingi lyginant su kontrole.



**9 pav.** Sinergistinis antidiabetinių preparatų ir LRRK-2 receptorių inhibitoriaus poveikis žmogaus inkstų vėžinių Caki-2 ląstelių ląstelių gyvybingumui. Balti ir pilki stulpeliai rodo gyvybingumą, raudoni rodo nekrozės būdu žuvusių, žydri rodo apoptozės būdu žuvusių ląstelių kiekį % kultūroje.

\* – statistiškai patikimas pokytis, kai  $p \leq 0.05$ , lyginant su kontroline grupe.

## 4. REZULTATŲ APITARIMAS

Remiantis gautais rezultatais, galima teigti, jog vaistai nuo diabeto gali būti naudojami kaip priemonė kovojant su inkstų vėžiu. Buvo tiriami du vaistai: metforminas ir imegliminas, iš kurių pirmasis yra stipresnis, kadangi net mažiausios jo dozės mažina Caki-2 ląstelių gyvybingumą. Šiuo metu yra ganėtinai daug informacijos, kad metforminas gali būti taikomas kaip prevencinis vaistas nuo plaučių, prostatos, kepenų, kasos bei inkstų vėžio [7,52,53,54,55], bet yra šaltinių, nurodančių, kad imegliminas taip pat gali būti naudojamas kaip priemonė padedanti kovoti prieš vėžį [56]. Tirtasis LRRK-2 inhibitorius pasižymi tokia savybe kaip ir prieš tai minėti vaistai, todėl gali būti naudojamas kaip prevencinė priemonė nuo vėžio. Kiti šaltiniai irgi teigia, kad LRRK-2 inhibitoriai turi poveikį vėžinėms Caki-2 ląstelėms [57]. Taip pat, šiame tyrime buvo tiriamas sinergistinis poveikis su LRRK-2 inhibitoriumi ir antidiabetiniais vaistais. Nustačius LRRK-2 ir antidiabetinių vaistų sinergistinį poveikį, pastebėta, kad šios medžiagos kartu veiksmingai mažina Caki-2 ląstelių gyvybingumą, bei imeglimino ir LRRK-2 receptorių inhibitorius kartu mažina ląstelių skaičių. Šie rezultatai įrodo, kad tokios priemonės gali tapti vienu iš būdų gydyti pacientus nuo inkstų vėžio.

## 5. IŠVADOS

1. Imegliminas bei metforminas neturi poveikio žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui, tačiau metforminas mažina Caki-2 ląstelių gyvybingumą.
2. LRRK-2 receptorių inhibitorius neturi poveikio žmogaus inkstų vėžinių ląstelių skaičiui, bet mažina Caki-2 ląstelių gyvybingumą.
3. Imegliminas ir LRRK-2 receptorių inhibitorius veikdami kartu mažina Caki-2 ląstelių skaičių bei gyvybingumą, o metforminas ir LRRK-2 receptorių inhibitorius slopina Caki-2 ląstelių gyvybingumą, bet neturi poveikio ląstelių skaičiui.

## 6. LITERATŪROS SARAŠAS

1. Hallakou-Bozec S., Vial G., Kergoat M., Fouqueray P., Bolze S., Borel A.L., Fontaine E., Moller D.E. Mechanism of action of Imeglimin: A novel therapeutic agent for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2021 Mar;23(3):664-673. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8049051/>
2. Yan J., Zhao W., Yu W., Cheng H., Zhu B. LRRK2 correlates with macrophage infiltration in pancreatic cancer. *Genomics.* 2022 Jan;114(1):316-327. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34929286/>
3. Zhang F., Han S., Song W. Anticancer effects of metformin in experimental animal models of different types of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lab Anim Res.* 2022 Jul 19;38(1):22. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9297580/>
4. Vander H.M.G, DeBerardinis R.J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell.* 2017 Feb 9;168(4):657-669. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28187287/>
5. Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010 Sep-Oct;60(5):277-300. Epub 2010 Jul 7. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):133-4. PMID: 20610543. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20610543/>
6. Srigley J.R., Delahunt B., Eble J.N., Egevad L., Epstein J.I., Grignon D., Hes O., Moch H., Montironi R., Tickoo S.K., Zhou M., Argani P.; ISUP Renal Tumor Panel. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver classification of renal neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 2013;37:1469–1489. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24025519/>
7. Pasha M, Sivaraman SK, Frantz R, Agouni A, Munusamy S. Metformin Induces Different Responses in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Caki Cell Lines. *Biomolecules.* 2019 Mar 22;9(3):113. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468376/>
8. Choueiri T.K., Motzer R.J. Systemic therapy for metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2017;376:354–366. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28121507/>
9. Brodaczewska K.K., Szczylik C., Fiedorowicz M., Porta C., Czarnecka A.M. Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol. Cancer.* 2016;15:83. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468376/#B15-biomolecules-09-00113>

10. Kalogirou C., Schäfer D., Krebs M., Kurz F., Schneider A., Riedmiller H., Kneitz B., Verghe D. Metformin-Derived Growth Inhibition in Renal Cell Carcinoma Depends on miR-21-Mediated PTEN Expression. *Urol Int.* 2016;96(1):106-15. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26496641/>
11. Ketelut-Carneiro N., Fitzgerald K.A., Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis—Oh My! The Many Ways a Cell Can Die, *Journal of Molecular Biology*, Volume 434, Issue 4, 2022, 167378, ISSN 0022-2836. Prieiga prie interneto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002228362100615X?via%3Dihub>
12. Collins J.A., Schandi C.A., Young K.K., Vesely J., Willingham M.C. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 1997 Jul;45(7):923-34. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9212818/>
13. Rehm M., Dussmann H., Janicke R.U., Tavare J.M., Kogel D., Prehn J.H. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *J Biol Chem.* 2002 Jul 5;277(27):24506-14. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11964393/>
14. Gong Y.N., Crawford J.C., Heckmann B.L., Green D.R. To the edge of cell death and back. *FEBS J.* 2019 Feb;286(3):430-440. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30506628/>
15. Cain K., Brown D.G., Langlais C., Cohen G.M. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem.* 1999 Aug 6;274(32):22686-92. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10428850/>
16. Jiang X., Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:87-106. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15189137/>
17. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M. Adam D., Agostinis P., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar;25(3):486-541. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29362479/>
18. Boatright K.M., Salvesen G.S. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Dec;15(6):725-31. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14644197/>
19. Ahmed F.F., El-Hafeez A.A., Abbas S.H., Abdelhamid D., Abdel-Aziz M. New 1,2,4-triazole-Chalcone hybrids induce Caspase-3 dependent apoptosis in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Eur J Med Chem.* 2018 May 10;151:705-722. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29660690/>

20. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516. Prieiga prie internetu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17562483/>
21. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019 Jun;43(6):582-592. Prieiga prie internetu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30958602/>
22. Vercammen D., Beyaert R., Denecker G., Goossens V., Van L.G., Declercq W., Grooten J., Fiers W., Vandenameele P. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1998 May 4;187(9):1477-85. Prieiga prie internetu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9565639/>
23. Sun L., Wang X. A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. *Trends Biochem Sci.* 2014 Dec;39(12):587-93. Prieiga prie internetu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25455759/>
24. Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J.L., Schneider P., Seed B., Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* 2000 Dec;1(6):489-95. Prieiga prie internetu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11101870/>
25. Degterev A., Hitomi J., Gemscheid M., Ch'en I.L., Korkina O., Teng X., Abbott D., Cuny G.D., Yuan C., Wagner G., Hedrick S.M., Gerber S.A., Lugovskoy A., Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol.* 2008 May;4(5):313-21. Prieiga prie internetu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18408713/>
26. Bertrand M.J., Milutinovic S., Dickson K.M., Ho W.C., Boudreault A., Durkin J., Gillard J.W., Jaquith J.B., Morris S.J., Barker P.A. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell.* 2008 Jun 20;30(6):689-700. Prieiga prie internetu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18570872/>
27. Mallik R., Chowdhury T.A., Metformin in cancer, *Diabetes Research and Clinical Practice*, Volume 143, 2018, Pages 409-419, ISSN 0168-8227. Prieiga prie internetu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29807101/>
28. Giovannucci E., Harlan D.M., Archer M.C., Bergental R.M., Gapstur S.M., Habel L.A., Pollak M., Regensteiner J.G., Yee D. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care.* 2010 Jul;33(7):1674-85. Prieiga prie internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2890380/>



29. Hemminki K., Li X., Sundquist J., Sundquist K. Risk of cancer following hospitalization for type 2 diabetes. *Oncologist*. 2010;15(6):548-55. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20479278/>
30. Inzucchi S.E., Bergenstal R.M., Buse J.B., Diamant M., Ferrannini E., Nauck M., Peters A.L., Tsapas A., Wender R., Matthews D.R. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Jan;38(1):140-9. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25538310/>
31. Cicero AF, Tartagni E, Ertek S. Metformin and its clinical use: new insights for an old drug in clinical practice. *Arch Med Sci*. 2012 Nov 9;8(5):907-17. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3506244/>
32. Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Mar;88(3):1323-32. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12629126/>
33. Krishan S., Richardson D.R., Sahni S., Adenosine monophosphate-activated kinase and its key role in catabolism: structure, regulation, biological activity, and pharmacological activation. *Mol Pharmacol*. 2015;87(3):363-77. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25422142/>
34. Faubert B., Vincent E.E., Poffenberger M.C., Jones R.G., The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: many faces of a metabolic regulator. *Cancer Lett*. 2015 Jan 28;356(2 Pt A):165-70. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486219/>
35. Vakana E., Altman J.K., Glaser H., Donato N.J., Plataniias L.C. Antileukemic effects of AMPK activators on BCR-ABL-expressing cells. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6399-402. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3236122/>
36. Kim H.G., Hien T.T., Han E.H., Hwang Y.P., Choi J.H., Kang K.W., Kwon K.I., Kim B.H., Kim S.K., Song G.Y., Jeong T.C., Jeong H.G. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- $\kappa$ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *Br J Pharmacol*. 2011 Mar;162(5):1096-108. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3051382/>
37. Takemura Y., Osuga Y., Yoshino O., Hasegawa A., Hirata T., Hirota Y., Nose E., Morimoto C., Harada M., Koga K., Tajima T., Yano T., Taketani Y. Metformin suppresses interleukin (IL)-1 $\beta$ -induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. *J*

- Clin Endocrinol Metab. 2007 Aug;92(8):3213-8. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17504902/>
38. Yendapally R., Sikazwe D., Kim S.S., Ramsinghani S., Fraser-Spears R., Witte A.P., La-Viola B. A review of phenformin, metformin, and imeglimin. *Drug Dev Res.* 2020 Jun;81(4):390-401. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31916629/>
39. Hozumi K, Sugawara K, Ishihara T, Ishihara N, Ogawa W. Effects of imeglimin on mitochondrial function, AMPK activity, and gene expression in hepatocytes. *Sci Rep.* 2023 Jan 13;13(1):746. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9839736/>
40. Di M.R., Hoffman E.K., Rocha E.M., Keeney M.T., Sanders L.H., Miranda B.R., Zharikov A., Laar A., Stepan A.F., Lanz T.A., Kofler J.K., Burton E.A., Alessi D.R., Hastings T.G., Greenamyre J.T. LRRK2 activation in idiopathic Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2018 Jul 25;10(451):eaar5429. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30045977/>
41. Kelly K., West A.B. Pharmacodynamic Biomarkers for Emerging LRRK2 Therapeutics. *Front Neurosci.* 2020 Aug 6;14:807. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32903744/>
42. Gu S., Chen J., Zhou Q., Yan M., He J., Han X., Qiu Y. LRRK2 Is Associated with Recurrence-Free Survival in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Downregulation of LRRK2 Suppresses Tumor Progress In Vitro. *Dig Dis Sci.* 2020 Feb;65(2):500-508. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31489563/>
43. Zhao Y., Zhao L., Li J., Zhong L. Silencing of long noncoding RNA RP11-476D10.1 enhances apoptosis and autophagy while inhibiting proliferation of papillary thyroid carcinoma cells via microRNA-138-5p-dependent inhibition of LRRK2. *J. Cell Physiol.* 2019;234:20980–20991. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31102261/>
44. Ho D.H., Kim H., Kim J., Sim H., Ahn H., Kim J., Seo H., Chung K.C., Park B.J., Son I., Seol W. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) phosphorylates p53 and induces p21(WAF1/CIP1) expression. *Mol Brain.* 2015 Sep 18;8:54.. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26384650/>
45. Jiang Z.C., Chen X.J., Zhou Q., Gong X.H., Chen X., Wu W.J. Downregulated LRRK2 gene expression inhibits proliferation and migration while promoting the apoptosis of thyroid cancer cells by inhibiting activation of the JNK signaling pathway. *Int. J. Oncol.* 2019;55:21–34. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31180559/>
46. Han K.A., Yoo L., Sung J.Y., Chung S.A., Um J.W., Kim H., Seol W., Chung K.C. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Stimulates IL-1 $\beta$ -Mediated Inflammatory Signaling through

- Phosphorylation of RCAN1. *Front Cell Neurosci.* 2017 May 11;11:125. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28553204/>
47. Looyenga B.D., Furge K.A., Dykema K.J., Koeman J., Swiatek P.J., Giordano T.J., West A.B., Resau J.H., Teh B.T., MacKeigan J.P. Chromosomal amplification of leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2) is required for oncogenic MET signaling in papillary renal and thyroid carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:1439–1444. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21220347/>
48. Wang J., Wang Y., Kong F., Han R., Song W., Chen D., Bu L., Wang S., Yue J., Ma L. Identification of a six-gene prognostic signature for oral squamous cell carcinoma. *J. Cell Physiol.* 2020;235:3056–3068. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31538341/>
49. Yan R., Liu Z.. LRRK2 enhances Nod1/2-mediated inflammatory cytokine production by promoting Rip2 phosphorylation. *Protein Cell.* 2017 Jan;8(1):55-66. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5233611/>
50. Yan J., Zhao W., Gao C., Liu X., Zhao X., Wei T., Gao Z. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates mouse dendritic cell migration by ORAI2. *FASEB J.* 2019 Sep;33(9):9775-9784. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31166814/>
51. Kubo M., Nagashima R., Kurihara M., Kawakami F., Maekawa T., Eshima K., Ohta E., Kato H., Obata F. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Controls Inflammatory Cytokines Production through NF- $\kappa$ B Phosphorylation and Antigen Presentation in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 10;21(5):1890. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32164260/>
52. Kato H., Sekine Y., Furuya Y., Miyazawa Y., Koike H., Suzuki K. Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via the downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;461:115–121. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25862373/>
53. Cai X., Hu X., Cai B., Wang Q., Li Y., Tan X., Hu H., Chen X., Huang J., Cheng J., et al. Metformin suppresses hepatocellular carcinoma cell growth through induction of cell cycle G1/G0 phase arrest and p21CIP and p27KIP expression and downregulation of cyclin D1 in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* 2013;30:2449–2457. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24008375/>
54. Wang J., Gao Q., Wang D., Wang Z., Hu C. Metformin inhibits growth of lung adenocarcinoma cells by inducing apoptosis via the mitochondria-mediated pathway. *Oncol. Lett.* 2015;10:1343–1349. Prieiga prie interneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26622674/>

55. Dong Y.W., Shi Y.Q., He L.W., Cui X.Y., Su P.Z. Effects of metformin on survival outcomes of pancreatic cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:55478–55488. Prieiga prie intertneto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28903435/>
56. Annemiläi T.R., Matthieu M., Valérie P., Jean-Pierre B., Eric J., Eric R. Abstract 5312: Imeglimin alone or in combination with sorafenib showed potent anti-tumor effect in human hepatocellular carcinoma: A new kid on the block for HCC treatment. *Cancer Res* 15 August 2020; 80: 5312. Prieiga prie interneto: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2020-5312>
57. Chen L., Hou J., Zeng X., Guo Q., Deng M., Kloeber J.A., Tu X., Zhao F., Wu Z., Huang J., Luo K., Kim W., Lou Z. LRRK2 inhibition potentiates PARP inhibitor cytotoxicity through inhibiting homologous recombination-mediated DNA double strand break repair. *Clin Transl Med*. 2021 Mar;11(3):e341. Prieiga prie interneto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7908045/>

## **7. PRIEDAI**

**1 priedas**

### **DARBO RĖMIMO, AUTORIAUS INDĖLIO IR GALIMO INTERESŲ KONFLIKTO DEKLARACIJA**

**Dominykas Samuilis**

**Imeglimino ir metformino poveikio žmogaus inkstų vėžinėms ląstelėms tyrimas**

**Study of the Effects of Imeglimin and Metformin on Human Renal Cancer Cells**

**Darbas remiamas Medicinos fakulteto lėšomis.**

**Patvirtinu, kad baigiamasis darbas atliktas ir parašytas savarankiškai, nepažeidžiant kitiems asmenims priklausančių autorinių teisių.**

**Autoriui interesų konflikto nebuvo.**

**Dominykas Samuilis**

Bakalauranto vardas, pavardė ir parašas

**Dr. Kristina Škėmienė**

Vadovo vardas, pavardė ir parašas

## 2 priedas



### LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETO BIOETIKOS CENTRAS

---

Medicinos akademija (MA)

Nr. 2023-BEC2-160

Pirmosios pakopos studijų programa - Medicininė ir veterinarinė biochemija

3 k. studentas: Dominykas Samuilis

Darbo vadovas: Mokslo darbuotojas Kristina Škėmienė

NI Biochemijos laboratorija

#### **DĖL PRITARIMO TYRIMUI**

LSMU Bioetikos centras, įvertinęs pateiktus dokumentus, moksliniam-tiriamajam darbui  
tema „Imeglimino ir metformino poveikio žmogaus vėžinėms ląstelėms tyrimas“ **P R I T A R I A .**

*dr. Aušra Urbonienė 2023-06-23 09:42:50*

\* Pastaba: šis pritarimas neatleidžia tiriamąjį mokslinį darbą vydančių asmenų nuo privalės laikytis Bendrojo duomenų apsaugos reglamento nuostatų ir nuo atsakomybės gauti nacionalinio arba regioninio bioetikos komiteto leidimą, jei toks leidimas būtinas pagal LR Biomedicininų tyrimų etikos įstatyme numatytus reikalavimus.

---

Kodas 302536989, Tiltėš g. 18, LT- 47181, Kaunas, tel.: (8 37) 327233, www.lsmu.lt., el. p.: bioetika@lsmu.lt