

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

**Indrė Januškevičienė**

**TREJOPAI NEIGIAMO KRŪTIES VĖŽIO  
LĄSTELIŲ POPULIACIJŲ SAŪVEIKOS  
ĮTAKA VAISTŲ JAUTRUMUI**

Daktaro disertacija  
Medicinos ir sveikatos mokslai,  
farmacija (M 003)

Kaunas, 2024

Disertacija rengta 2017–2023 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto Vaistų taikinių histopatologijos laboratorijoje.

### **Mokslinė vadovė**

prof. dr. Vilma Petrikaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

### **Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Farmacijos mokslo krypties taryboje:**

### **Pirmininkė**

prof. dr. Sonata Trumbeckaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

### **Nariai:**

prof. dr. Nijolė Savickienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003);

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

prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Roman Lesyk (Danylo Halytsky Lvovo nacionalinis medicinos universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

Disertacija bus ginama viešajame Farmacijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2024 m. lapkričio 7 d. 10 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centro A-202 auditorijoje. Disertacijos gynimo vietos adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

**Indrė Januškevičienė**

**THE IMPACT OF TRIPLE-NEGATIVE  
BREAST CANCER CELL POPULATION  
INTERACTION ON DRUG SENSITIVITY**

Doctoral Dissertation  
Medical and Health Sciences,  
Pharmacy (M 003)

Kaunas, 2024

The dissertation has been prepared at the Laboratory of Drug Targets Histopathology of the Institute of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2017–2023 year.

### **Scientific Supervisor**

Prof. Dr. Vilma Petrikaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

**The dissertation is defended at the Pharmacy Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:**

### **Chairperson**

Prof. Dr. Sonata Trumbeckaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

### **Members:**

Prof. Dr. Nijolė Savickienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003);

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

Prof. Dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Roman Lesyk (Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

The dissertation will be defended at the open session of the Pharmacy Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on the 7<sup>th</sup> of November, 2024, at 10:00 in the Centre for the Advanced Pharmaceutical and Health Technologies of Lithuanian University of Health Sciences, auditorium A-202.

Address: Sukilėlių 13, LT-50162 Kaunas, Lithuania.

# TURINYS

SANTRUMPOS .....	7
ĮVADAS .....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	15
1.1. Krūties vėžio heterogeniškumas .....	15
1.1.1. Trejopai neigiamo krūties vėžio heterogeniškumas ir klasifikacija.....	17
1.1.2. Trejopai neigiamo krūties vėžio ląstelių mutacijos lemiančios potipių įvairovę .....	20
1.1.3. Trejopai neigiamo krūties vėžio mechanizmai, lemiantys atsparumą vaistams .....	23
1.2. Ląstelių sąveikos įtaka gydymo atsparumui.....	26
1.2.1. Vėžinių ląstelių sąveika su naviko mikroaplinkos ląstelėmis.....	27
1.2.2. Vėžinių ląstelių tarpusavio sąveika .....	32
1.3. Doksorubicino transporto į vėžinių ląstelių kultūras tyrimai .....	38
2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI.....	41
2.1. Reagentai, priemonės, aparatūra .....	41
2.1.1. Ląstelių linijos .....	41
2.1.2. Reagentai .....	41
2.1.3. Priemonės .....	41
2.1.4. Laboratorinė įranga.....	42
2.1.5. Programinė įranga.....	42
2.2. Tyrimo metodikos.....	42
2.2.1. MDA-MB-231 ląstelių sublinijų išskyrimas .....	42
2.2.2. CD133 receptoriaus kiekio nustatymas imunofluorescenciniu metodu .....	43
2.2.3. Sublinijų ląstelių migracijos skirtumų vertinimas pritaikant „žaidzos“ gijimo metodą.....	43
2.2.4. Ląstelių sublinijų atsparumo priešvėžiniams junginiams tyrimas naudojant MTT redukcijos testą ląstelių vienasluoksnyje.....	44
2.2.5. Ląstelių dvigubėjimo laiko nustatymas .....	44
2.2.6. Ląstelių sąveikos įtaka atsparumui priešvėžiniams junginiams ląstelių vienasluoksnyje (2D kultūrose).....	45
2.2.7. Ląstelių sąveikos įtaka atsparumui priešvėžiniams junginiams sferoiduose (3D kultūrose) .....	45
2.2.8. Doksorubicino citotoksiškumo įvertinimas .....	45
2.2.9. Doksorubicino transporto į vienasluoksniu auginamas ląsteles tyrimas .....	46
2.2.10. Doksorubicino transporto į sferoidus tyrimas .....	46
2.2.11. Statistinė analizė .....	47
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	48
3.1. Fenotipiškai skirtingų sublinijų išskyrimas ir jų charakterizavimas .....	48
3.2. Sublinijų ląstelių gebėjimas migruoti.....	51
3.3. Ląstelių atsparumas priešvėžiniams junginiams doksorubicinui ir paklitakseliui ...	53
3.4. Ląstelių dvigubėjimo laiko nustatymas .....	57
3.5. Trejopai neigiamo krūties vėžinių ląstelių sąveikos įtaka jų atsparumui vaistams ląstelių vienasluoksnyje.....	58

3.6. Doksorubicino transportas į fenotipiškai skirtingas ląsteles 2D ir 3D kultūras .....	64
3.7. 2D ir 3D ląstelių sąveikos ir doksorubicino transporto tyrimų palyginimas.....	75
IŠVADOS.....	80
SUMMARY .....	82
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	108
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS .....	120
MOKSLINIŲ KONFERENCIJŲ, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS .....	121
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, KURIOSE SKELBIAMI SVARBIAUSI TYRIMŲ REZULTATAI, KOPIJOS .....	123
CURRICULUM VITAE .....	155

## SANTRUMPOS

<b>ATCC</b>	– Amerikos ląstelių kultūrų kolekcija (angl. <i>American type culture collection</i> )
<b>ATP</b>	– adozino trifosfatas (angl. <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>BCRP</b>	– krūties vėžio atsparumo baltymas (angl. <i>breast cancer resistance protein</i> )
<b>BRCA-1</b>	– krūties vėžio 1 tipo atsparumo baltymas (angl. <i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i> )
<b>CAAs</b>	– su vėžiu susiję adipocitai (angl. <i>cancer-associated adipocytes</i> )
<b>CAFs</b>	– su vėžiu susiję fibroblastai (angl. <i>cancer-associated fibroblast</i> )
<b>CCL2</b>	– chemokino ligandas 2 (angl. <i>chemokine ligand 2</i> )
<b>CD133</b>	– promininas-1 (angl. <i>prominin – 1</i> )
<b>CSCs</b>	– vėžio kamieninės ląstelės (angl. <i>cancer stem-like cells</i> )
<b>CXCL12</b>	– C-X-C motyvo chemokinas 12 (angl. <i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i> )
<b>DAPI</b>	– 4',6-diamidino-2-fenilindolo dihidrochloridas
<b>DIC</b>	– diferencinis interferencijos kontrastas
<b>DMEM</b>	– Dulbecc'o modifikuota Eagle mitybinė terpė (angl. <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> )
<b>DMSO</b>	– dimetilsulfoksidas
<b>DNR</b>	– deoksiribonukleorūgštis
<b>DOX</b>	– doksorubicinas
<b>EC<sub>50</sub></b>	– efektyvioji koncentracija (angl. <i>effective concentration</i> ; koncentracija, sukianti 50 proc. ląstelių biologinių ar biocheminių funkcijų netekimą)
<b>ECM</b>	– užląstelinė terpė (angl. <i>extracellular matrix</i> )
<b>EMT</b>	– epitelinis-mezenchiminis perėjimas (angl. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )
<b>ER</b>	– estrogenų receptorius
<b>FBS</b>	– fetalinis veršiukų serumas (angl. <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FGF</b>	– fibroblastų augimo veiksnys (angl. <i>fibroblast growth factor</i> )
<b>GADD45</b>	– augimo sustabdymą ir DNR pažeidimą sukiantis baltymas 45 (angl. <i>growth arrest and DNA damage-inducible 45 protein</i> )
<b>HER2</b>	– žmogaus epidermio augimo veiksnys 2 (angl. <i>human epidermal growth factor 2</i> )
<b>HF</b>	– CRL-4001 žmogaus odos fibroblastai (angl. <i>human skin fibroblasts</i> )

<b>HIF-1</b>	– hipoksiją sukeliantis veiksnys 1 (angl. <i>hypoxia inducible factor 1</i> )
<b>Ki-67</b>	– naviko proliferacijos žymuo (angl. <i>Kiel 67</i> )
<b>LAR</b>	– luminalinis androgenų receptorius (angl. <i>luminal androgen receptor</i> )
<b>lncRNR</b>	– ilgoji nekoduojanti RNR (angl. <i>long non-coding RNA</i> )
<b>M</b>	– mezenchiminis (angl. <i>mesenchymal</i> )
<b>M1, M2</b>	– aktyvuotų makrofagų potipiai
<b>MAPK</b>	– mitogeno aktyvuota proteinkinazė (angl. <i>mitogen activated protein kinase</i> )
<b>miRNR</b>	– mikro ribonukleinė rūgštis (angl. <i>microRNA, micro ribonucleic acid</i> )
<b>MPS</b>	– metabolinio kelio potipiai (angl. <i>metabolic pathways subtypes</i> )
<b>mRNR</b>	– matricinė/informacinė ribonukleinė rūgštis (angl. <i>messenger ribonucleic acid, mRNA</i> )
<b>MRP1</b>	– daugiavaisčio atsparumo baltymas 1 (angl. <i>multidrug resistance protein 1</i> )
<b>MTT</b>	– 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas
<b>NFs</b>	– normalūs fibroblastai (angl. <i>normal fibroblasts</i> )
<b>NF-κB</b>	– aktyvuotų B ląstelių branduolio faktoriaus kapa-lengvosios grandinės stipriklis (angl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
<b>p53</b>	– naviko baltymas p53 (angl. <i>tumor protein 53</i> )
<b>PARP</b>	– poli (adenozindifosfato ribozės) polimerazė (angl. <i>poly (ADP-ribose) polymerase</i> )
<b>PBS</b>	– buferinis fosfatinis druskų tirpalas (angl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PDGF</b>	– trombocitų kilmės augimo veiksnys (angl. <i>platelet-derived growth factor</i> )
<b>P-gp</b>	– P-glikoproteinas (angl. <i>P-glycoprotein</i> )
<b>PI3K/Akt</b>	– fosfatidilinozitolio 3-kinazė ir baltymų kinazė B (angl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase / protein kinase B</i> )
<b>PR</b>	– progesteronų receptorius (angl. <i>progesterone receptor</i> )
<b>PTX</b>	– paklitakselis (angl. <i>paclitaxel</i> )
<b>RhoC</b>	– Ras homologų šeimos narys C (angl. <i>Ras homolog gene family, member C</i> )
<b>ROS</b>	– aktyvios deguonies formos (angl. <i>reactive oxygen species</i> )
<b>TGF-β</b>	– transformuojantis augimo veiksnys (angl. <i>transforming growth factor β</i> )
<b>TNBC</b>	– trejopai neigiamas krūties vėžys (angl. <i>triple- negative breast cancer</i> )



- TRITC** – tetrametilrodaminas
- Triton X-100** – 2-[4-(2,4,4-trimetilpentan-2-il)fenoksi]etanolis
- VEGF** – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (angl. *vascular endothelial growth factor*)
- $\alpha$ -SMA** – alfa lygiųjų raumenų aktinas (angl. *alpha smooth muscle actin*)

## ĮVADAS

Krūties vėžys yra labiausiai paplitęs vėžinis susirgimas tarp moterų visame pasaulyje. 2022 metais šis susirgimas buvo diagnozuotas 12,7 proc. moterų ir lėmė 7,2 proc. mirčių nuo vėžio visame pasaulyje. Krūties vėžiu visose pasaulio šalyse suserga bet kurio amžiaus moterys po lytinio brendimo, tačiau vėlesniame amžiuje susirgimų skaičius didėja [1]. 2020 metų duomenimis, Lietuvoje krūties vėžys diagnozuotas 21,7 procentams moterų (LSAM). Krūties vėžiu sergančioms moterims sutrikdoma ne tik fizinė sveikata, bet ir psichosocialinė gerovė bei ekonominis stabilumas [2].

Krūties vėžys skirstomas į keturis pagrindinius potipius pagal tris pagrindinius hormonų receptorių: estrogenų (ER), progesteronų (PR) ir žmogaus epidermio augimo faktoriaus 2 (HER2). Krūties vėžio potipis, kuris neturi nei vieno iš anksčiau minėtų hormonų receptorių, vadinamas trejopai neigiamu krūties vėžiu (angl. *triple-negative breast cancer*, TNBC) ir tai sudaro 10–20 proc. visų krūties vėžio atvejų [3]. TNBC yra pati agresyviausia krūties vėžio forma ir pasižymi išskirtinėmis klinikinėmis, molekulinėmis savybėmis, įskaitant aukštesnę diferenciacijos laipsnį, polinkį į metastazes ir jaunesnį pacienčių amžių, kuriame diagnozuojama liga [4]. TNBC receptorių taikinių nebuvimas reiškia, kad toks gydymas, kaip hormonų terapija ar vaistai nukreipti į HER2, yra neveiksmingi, todėl chemoterapija yra pagrindinė sisteminio gydymo galimybė [5]. Be to, sergant TNBC dažniau pasitaiko ligos atsinaujinimo ir tolimųjų metastazių atvejų ir tai lemia sudėtingą klinikinę ligos valdymą [6].

TNBC sudėtingumo esmė yra genetinis – fenotipinis heterogeniškumas. Molekuliniu požiūriu TNBC skirstomas į keturis pagrindinius potipius: luminalinį androgenų (LAR), mezenchiminį (M), bazalinį 1 (BL1) ir bazalinį 2 (BL2) [7]. Tyrimai parodė, kad TNBC naviko subklonuose yra skirtumų, kurie lemia jo agresyvumą, įskaitant *TP53* ir *BRC1* genų mutacijas, bei kitų genų, susijusių su DNR taisymu, pokyčius [8]. TNBC navikai pasižymi vidiniu heterogeniškumu, sudarydami skirtingų fenotipų ląsteles skirtingose naviko vietose, kas apsunkina diagnozę ir gydymą. Pavyzdžiui, LAR fenotipo ląstelėms taikoma androgenų receptorių terapija, o BL1 fenotipui – doksorubicinas (DOX) arba cisplatina kartu su PARP slopikliais. DOX ir paklitakselis (PTX) naudojami BL2 potipiui, dažnai derinant su kitais chemoterapiniais vaistais [9,10]. Fenotipų įvairovė navikuose apsunkina gydymą ir skatina atsparumo vaistams susiformavimą, bei lemia ligos atsinaujinimą [11]. TNBC navikuose ne tik vidinis navikų heterogeniškumas, bet ir vėžinių ląstelių sąveika su naviką supančia mikroaplinka sukelia sunkumų gydant šio tipo susirgimus. TNBC navikų mikroaplinką formuoja tokios ląstelės kaip, fi-

broblastai, makrofagai, adipocitai ir imuninės ląstelės, kurios išskiria įvairius veiksnius. Tokia vėžinių ir naviko mikroaplinkos ląstelių sąveika prisideda prie atsparumo vaistams ir naviko augimo [12,13]. Vėžinių ląstelių atsparumui ir ligos progresavimui svarbi ne tik vėžinių ląstelių sąveika su naviko mikroaplinkos ląstelėmis, tačiau ir naviką sudarančių, skirtingų fenotipų vėžinių ląstelių, tarpusavio sąveika. Dėl vėžinėse ląstelėse nuolat įvykstančių mutacijų, aplinkos veiksnių (maistinių medžiagų prieinamumas, deguonies kiekis, vaistų poveikis), navikuose susiformuoja bent keletas skirtingų fenotipų populiacijų, kurios pasižymi skirtingomis savybėmis. Tokios ląstelės per tiesioginę (mikrovamzdelius ar kt.) arba netiesioginę (tirpius veiksnius: citokinus, hormonus, interleukinus, augimo veiksnius ir kt.) sąveiką apsieičia turima informacija (atsparumo baltymais, miRNR) ir ląstelės gali įgyti naujų savybių, bei atsparumą gydyme naudojamiems vaistams [14,15].

Ląstelių tarpusavio sąveika turi reikšmingą įtaką atsparumui DOX ir PTX, kurie yra vieni pagrindinių TNBC chemoterapinių vaistų [16,17]. Atsparumas šiems vaistams vėžinėse ląstelėse formuojasi dėl keletu, šiuo metu žinomų mechanizmų: ląstelių signalinių kelių pokyčių, genetinių ir epigenetinių modifikacijų [18], ląstelės ciklo ir apoptozės reguliavimo [19], bei padidėjusio pernašos baltymų kiekio vėžinėse ląstelėse [20]. Šie mechanizmai apsunkina chemoterapinių junginių efektyvumą, sumažindami jų transportą į ląsteles, kur yra jų terapiniai taikiniai. Viena pagrindinių problemų šiuo metu yra apsunkintas vaistų transportas ir pasiskirstymas vėžinėse ląstelėse, todėl vaistų transporto tyrimai yra ypač svarbūs. Būtina ieškoti būdų, kaip pagerinti junginių transportą į vėžines ląsteles [21], taip pat įvertinti, kaip skiriasi junginių transportas ir pasiskirstymas skirtingų fenotipų vėžinėse ląstelėse. DOX yra patogus naudoti junginių transporto į ląsteles tyrimuose, dėl jo fluorescencinių savybių, tai leidžia lengvai stebėti DOX transportą ir jo lokalizaciją ląstelėse.

Šiuo metu yra labai ribotas tyrimų, analizuojančių krūties vėžinių ląstelių sąveiką, kiekis. Tokie tyrimai yra būtini siekiant geriau suprasti sudėtingus atsparumo mechanizmus ir surasti naujus metodus, kaip padidinti vaistų efektyvumą, gerinant jų transportą į vėžines ląsteles.

**Darbo tikslas** – įvertinti trejopai neigiamo krūties vėžio ląstelių populiacijų sąveikos įtaką atsparumui priešvėžiniams vaistams.

#### **Uždaviniai:**

1. Išskirti ir charakterizuoti fenotipiškai skirtingas krūties vėžio sublinijas iš trejopai neigiamo krūties vėžio MDA-MB-231 ląstelių linijos.

2. Įvertinti fenotipiškai skirtingų sublinijų ląstelių sąveikos įtaką atsparumui priešvėžiniams vaistams doksorubicinui ir paklitakseliui ląstelių vienasluoksnyje ir ląstelių sferoiduose.
3. Iširti doksorubicino transportą į fenotipiškai skirtingų sublinijų ląsteles vienasluoksnyje normoksijoje ir hipoksijoje.
4. Įvertinti doksorubicino transportą į sferoidus, suformuotus iš fenotipiškai skirtingų sublinijų ląstelių.

### **Mokslinio darbo naujumas**

Dauguma duomenų apie fenotipiškai skirtingas TNBC populiacijas yra gauta analizuojant kiekvieną ląstelių populiaciją atskirai, vertinant jų fenotipines savybes, skirtingą atsparumą priešvėžiniams vaistams, bei įvairių genų ir signalinių kelių skirtumus. Dažnai TNBC populiacijų skirtumai tiriami naudojant iš pacientų navikų išskirtas pirmines ląsteles. Literatūros analizė parodė, kad yra mažai informacijos apie skirtingas populiacijas, išskirtas iš ląstelių linijų. Mokslininkai dažniausiai tiria populiacijas, vertindami jų gebėjimą migruoti, genų profilius ir tam tikrų receptorių raišką. Tačiau tyrimų, kuriuose būtų tiriamos ne tik pavienės populiacijos, bet ir fenotipiškai skirtingų populiacijų derinių savybės, nėra daug.

Šiame darbe pirmą kartą įvertinta fenotipiškai skirtingų sublinijų, išskirtų iš MDA-MB-231 linijos, tarpusavio sąveikos įtaka DOX ir PTX atsparumui. Buvo išskirtos 24 sublinijos, iš kurių 7 buvo detaliam charakterizuotos, o 3 labiausiai fenotipiškai išsiskiriančios sublinijos buvo pasirinktos sąveikos tyrimams. Fenotipiškai skirtingų sublinijų sąveikos įtaka atsparumui DOX ir PTX buvo įvertinta dvimatėse ir trimatėse kultūrose. Nustatyta, kad fenotipiškai skirtingų sublinijų deriniai turi skirtingą atsparumą minėtiems junginiams, o DOX transporto tyrimai parodė, kad šis junginys nevienodai pasiskirsto fenotipiškai skirtingose sublinijose.

Atsižvelgiant į tai, kad TNBC gydymui dažniausiai taikomi chemoterapiniai vaistai, tokie kaip DOX ir PTX, didelis dėmesys buvo skirtas būtent šiems junginiams. Gydant vėžį, įskaitant krūties vėžį, dažnai susiduriama su navikų atsparumu vartojamiems vaistams. Šį atsparumą lemia daugybė įvairių mechanizmų, tačiau mūsų atlikti tyrimai rodo, kad fenotipiškai skirtingos ląstelės, nors kilusios iš tos pačios linijos, yra nevienodai atsparios DOX ir PTX. Todėl ypač svarbu įvertinti, kaip DOX, vieno dažniausiai naudojamų chemoterapinių vaistų, transportas skiriasi fenotipiškai skirtingose sublinijose, nes šie skirtumai gali reikšmingai paveikti gydymo veiksmingumą.

Norint kuo geriau atkartoti navikų aplinką ir užtikrinti sąlygas, artimas *in vivo*, buvo formuojami ląstelių sferoidai iš fenotipiškai skirtingų sublinijų (D8, F5, H2). Taikant šį metodą, suformuojami taisyklingos formos ląstelių sferoidai, leidžiantys tiksliau įvertinti DOX skvarbą. Taip pat buvo užauginti

reikiamo dydžio sferoidai (apie 390  $\mu\text{m}$  skersmens), kad jų viduje susidarytų hipoksinė aplinka. DOX transportas taip pat įvertintas ir ląstelių vienasluoksnyje – normoksijos ir hipoksijos sąlygomis. DOX transportą hipoksinėje aplinkoje įvertinti svarbu dėl to, kad esant šioms sąlygoms, vaistai dažnai prasiskverbia daug blogiau, tai lemia per mažą viduląstelinę vaisto koncentraciją ir atsparumo vaistui susiformavimą, kas savo ruožtu apsunkina ligos gydymą. Transporto tyrimai atlikti dvimatėse ir trimatėse ląstelių kultūrose, nes šios eksperimentinės sistemos atspindi skirtingus ląstelių sąveikos lygius, kurie gali turėti įtakos DOX pasiskirstymui ir efektyvumui. Dvimatėse ląstelių kultūrose galime įvertinti DOX transportą į pavienes ląsteles, o trimatėse kultūrose, geriau imituojamos *in vivo* sąlygos, įskaitant ląstelių tarpusavio sąveiką ir ribotą DOX transportą į gilesnius sferoidų sluoksnius. Tokie tyrimų rezultatai gali padėti geriau suprasti DOX veikimą skirtingose modelinėse sistemose ir prisidėti prie tikslingesnės vėžio terapijos kūrimo.

### **Praktinė ir teorinė reikšmė**

TNBC ligos agresyvumas ir veiksmingų gydymo metodų trūkumas yra viena didžiausių šiuolaikinės medicinos problemų. Disertacijoje pateikti tyrimų rezultatai yra svarbūs tolimesniam šios srities plėtojimui, ypač atliekant tyrimus su *in vivo* modeliais ar dirbant su pirminėmis ląstelių kultūromis, nes tai gali būti pritaikoma gerinant TNBC gydymo metodus.

Tyrimo rezultatai patvirtina, kad net ir ląstelių linijose, auginamose kontroliuojamoje aplinkoje (stabilus deguonies ir maistinių medžiagų kiekis), egzistuoja fenotipiškai skirtingos populiacijos, todėl jos yra tinkamas tyrimo objektas. Išskirtos sublinijos skyrėsi savo savybėmis, o tai lėmė jų skirtingą migracijos potencialą bei atsparumą DOX ir PTX. Todėl MDA-MB-231 linija, su fenotipiškai skirtingomis sublinijomis yra tinkamas tyrimo modelis.

Atliktų tyrimų duomenys pagrindžia ląstelių sąveikos įtaką atsparumo vaistams formavimąsi, parodant, kad derinant skirtingas ląstelių sublinijas, keičiasi jų atsparumas priešvėžiniams junginiams. Derinant sublinijas, kurios atskirai yra jautrios DOX ir PTX, padidėja tokių derinių atsparumas šiems junginiams. Tačiau, kai DOX atspari sublinija derinama su kitomis sublinijomis, ląstelių atsparumas DOX sumažėja. DOX transporto tyrimo rezultatai parodė, kad DOX atspariose sublinijose šio junginio transportas į ląsteles yra žymiai mažesnis.

Tyrimo rezultatai pateikia vertingą informaciją apie ląstelių atsparumo DOX ir PTX problematiką. Tai leidžia geriau suprasti skirtingą DOX transportą į fenotipiškai skirtingų ląstelių sublinijas. Šios išvalgos gali būti labai svarbios tiriant įvairius ląstelių atsparumo mechanizmus. Ilgainiui šios žinios galėtų prisidėti prie vėžio gydymo strategijų tobulinimo, leidžiant individualizuoti gydymą pagal tai, kokio fenotipo vėžinės ląstelės sudaro naviką, ir

pasirinkti tinkamiausius gydymo metodus bei vaistus. Be to, įvertinus kaip mikroaplinka veikia gydymą, gali būti taikomas personalizuotas pacientų gydymas.

### **Autorės indėlis**

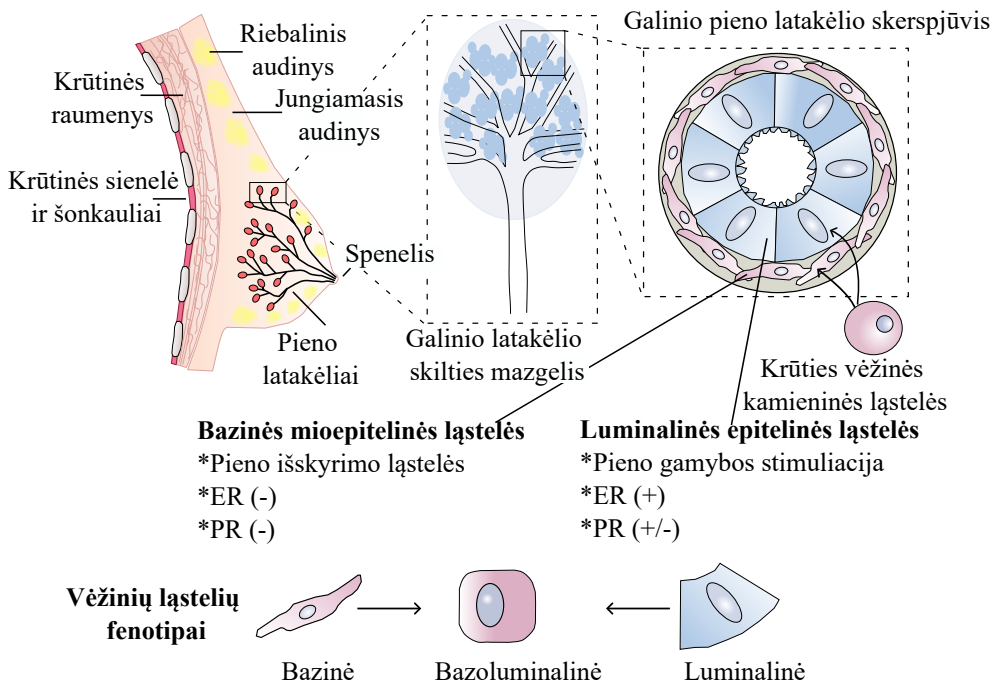
Autorė atliko visus eksperimentus ląstelių vienasluoksnyje ir trimatėse kultūrose, išskyrė ląstelių sublinijas. Taip pat analizavo ir interpretavo gautus rezultatus, juos apdorojo ir pateikė paveiksluose, pristatė mokslinėse konferencijose bei jų pagrindu kartu su vadovu parengė publikacijas. Autorė yra dviejų mokslinių eksperimentinių publikacijų ir vienos apžvalginės publikacijos pirmoji autorė, parengtos šios disertacijos tema, pirmoji autorė. Remiantis šiomis publikacijomis, autorė parengė disertaciją.

Darbo vadovė prof. Vilma Petrikaitė suformulavo darbo temą, eksperimentinių tyrimų kryptis, konsultavo interpretuojant gautus duomenis, dalyvavo rengiant mokslines publikacijas ir tezes bei konsultavo rengiant disertaciją.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Krūties vėžio heterogeniškumas

Krūties vėžys atsiranda iš krūties ląstelių, kuriose įvyksta tam tikri sutrikimai – piktybinė transformacija. Pati krūtis sudaryta iš dviejų tipų audinių: liaukinio ir stromos. Liaukinis audinys apima skilteles, kurios gamina pieną, ir latakus, kuriais pienas teka. Būtent šių struktūrų ląstelės yra pagrindinė krūties vėžio atsiradimo vieta (1.1.1 pav.).



1.1.1 pav. Krūties vėžio kilmė

Skirtinga krūties vėžio kilmė lemia šios ligos heterogeniškumą. Remiantis imunohistochemine hormonų receptorių raiška, krūties vėžys skirstomas į keturis pagrindinius potipius (1.1.2 pav.): ER teigiamas, PR teigiamas, HER2 teigiamas ir trejopai neigiamas [23]. ER receptoriai yra svarbus diagnostinis veiksnys, nes maždaug 70–75 proc. invazinių krūties karcinomų būdinga didelė ER raiška [24]. PR receptoriai taip pat yra išreikšti daugiau kaip pusėje ER navikų ir labai retai ER neigiamuose navikuose. Dažnai krūties vėžinėse ląstelėse aptinkama tiek ER, tiek ir PR receptorių didelė raiška, ir ši informacija panaudojama krūties vėžio diagnostikai kaip prognostiniai žymenys [25]. Didesnė PR receptorių raiška vėžinėse ląstelėse lemia geresnį pacientų išgy-

venamumą, mažą ligos atsinaujinimo tikimybę, sėkmingesnę gydymo rezultatą. Tuo tarpu žemesnis PR raiškos laipsnis rodo agresyvesnę ligos tipą, didesnę ligos atsinaujinimo tikimybę ir blogesnę išgyvenamumo prognozę [26]. HER2 sudaro apie 15–25 proc. krūties vėžio atvejų, o HER2 raiškos lygis yra svarbus, parenkant tinkamą gydymą. HER2 padidina metastazavusio ar atsinaujinusio krūties naviko aptikimo dažnį nuo 50 iki 80 proc. HER2 aptikimas kraujo serume laikomas perspektyviu navikų žymeniu realiuoju laiku [27]. HER2 amplifikacija sukelia proto-onkogeninių signalinių kelių aktyvaciją, lemiančią nekontroliuojamą vėžinių ląstelių augimą, tai lemia blogesnę ligos eigą. HER2 raiška taip pat koreliuoja su žymiai greitesniu ligos atsinaujinimu [28]. Dar vienas svarbus žymuo vėžinių susirgimų diagnostikoje yra Ki67 antigenas - ląstelių proliferacijos žymuo, kuris suteikia informacijos apie ląstelių proliferaciją. Pagal Ki67 nustatomas proliferacijos aktyvumas atspindi vėžinio susirgimo agresyvumą, galimą atsaką į gydymą bei laiką iki ligos atsinaujinimo. Kuo didesnė Ki67 antigeno raiška, tuo liga yra agresyvesnė, bei mažesnis pacientų išgyvenamumas [29].

Potipiai	ER/PR	HER2	Ki-67	Dif. laipsnis	Proliferacija	Prognozė	Gydymas	Dažnis
Luminalinis A	+	-	Žemas	Žemas	Lėta	Gera	Trastuzumabas Endokrininė terapija	40 %
Luminalinis B								20 %
HER2	-	+	Aukštas				Chemoterapija	10-15 %
Trejojai neįgijamas			-		Aukštas	Greita		Bloga

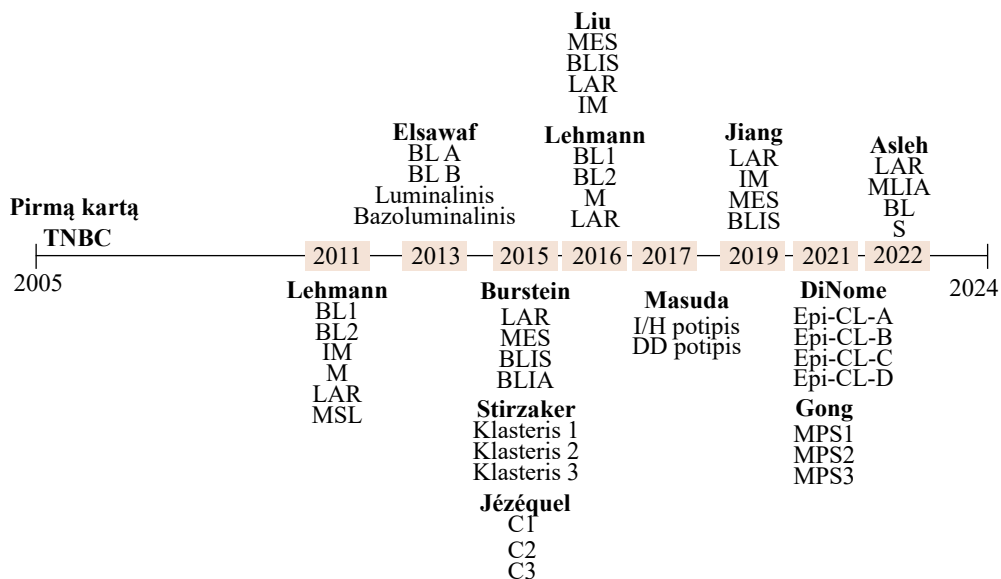
**1.1.2 pav.** Krūties vėžio potipiai ir jų skirtumai

Molekulinė krūties vėžio kvalifikacija reikalinga tam, kad būtų galima atrinkti pacientus, kuriems gali būti naudinga tikslinė terapija – hormonų ar anti-HER2 terapija [30]. Neseniai identifikuota skirtinga genų raiška ilgujų nekoduojančių RNR ir RNR jungiančių baltymus kiekvienam krūties vėžio potipiui: RASDF7 – luminalinio A, DCTPP1 – luminalinio B, DHRS11, KLC3, NAG3 ir TMEM98 – HER2, ABDHD14A ir ADSSL1 – TNBC. Tai yra daug žadantys nauji vėžio potipio identifikavimo žymenys ir potencialūs taikiniai gydymui [31]. Tokių žymenų aptikimas ypač svarbus TNBC tipo navikams, kuriems iki šiol nėra atrasta specifinių vaistų taikinių.



### 1.1.1. Trejopai neigiamo krūties vėžio heterogeniškumas ir klasifikacija

TNBC pirmą kartą identifikuotas kaip atskiras potipis 2005 metais [32]. Klinikiniu, histologiniu ir molekulinu požiūriu tai labai heterogeniška liga, kurią galima išskirstyti į keletą skirtingų TNBC potipių. Skiriant daugiau dėmesio TNBC heterogeniškumui ir tinkamam gydymo parinkimui pagal TNBC skirtingą potipį, mokslininkai pasiūlė keletą TNBC klasifikavimo variantų (1.1.1.1 pav.)



1.1.1.1 pav. Trejopai neigiamo krūties vėžio klasifikacijos pokyčiai nuo pirmojo identifikavimo iki šių dienų

Pirmieji TNBC skirtumus pastebėjo Lehmann ir kt. 2011 metais ir nustatė šešis skirtingus TNBC potipius (TNBC-6 klasifikacija) [33]. Bazalinis 1 ir 2 (BL1, BL2) potipiai išsiskyrė padidėjusiu ląstelės ciklo genų ir augimo veiksnių, signalinių kelių kiekiu. Imunomodulatorinis (IM) potipis pasižymėjo su imuninės sistemos reguliavimu susijusių genų – signalinių kelių raiškos padidėjimu. Mezenchiminio (M) potipio ląstelės skyrėsi nuo kitų dėl padidėjusios genų raiškos atsakingos už mezenchiminę diferenciaciją ir proliferaciją. Mezenchiminio-kamieninio (MSL) potipio ląstelės pasižymėjo mezenchiminių ląstelių savybėmis, tačiau lėta proliferacija. Luminalinis androgenų receptorių (LAR) potipis atskleidė padidėjusią androgenų receptorių raišką ir androgenų sukeltą augimo stimuliaciją. Iš visų šešių potipių nustatyta, kad LAR ir M yra mažiausiai agresyvūs.

Po poros metų buvo atlikta pirmoji TNBC klasifikacija, remiantis histologiniu (imunohistocheminiu, IHC) ir transkriptominiu profiliavimu. Elsawaf ir kt., naudodami IHC žymenis, išskirstė TNBC į 4 potipius: bazalinį A, bazalinį B, bazoluminalinį, luminalinį. Klasifikacija buvo paremta citokeratinų (Ck5, Ck6, Ck14, Ck19) ir epidermio augimo veiksnio receptoriaus (angl. *epidermal growth factor receptor*; EGFR), p53, p16 ir Ki-67 raiškos skirtumais. Bazalinio A ir B potipio navikai pasižymėjo geresne ligos eiga ir atsaku į gydymą, lyginant su bazoluminaliniu ir luminaliniu potipiais [24].

Vis daugiau mokslininkų pradėjo gilintis į TNBC heterogeniškumą, ir 2015 metais nepriklausomos tyrėjų grupės pasiūlė tris skirtingas TNBC klasifikacijas. Burstein vadovaujama mokslininkų grupė atliko TNBC navikų skirstymą (Burstein klasifikacija) pagal genų raiškos profiliavimą ir variacijos kopijų skaičių (angl. *copy numbers variations*, CNVs) ir išskyrė keturis TNBC potipius: LAR, mezenchiminis (MES), bazalinis imunitetą slopinantis (BLIS) ir bazalinis imunitetą aktyvuojantis (BLIA). BLIS potipis pasižymėjo blogiausiu pacientų išgyvenamumu, tuo tarpu BLIA – geriausiu, lyginant su likusiais potipiais [34]. Tuo pat metu Jézéquel ir kt. atliktame tyrime, pritaikant transkriptominių profiliavimą, nustatyti trys skirtingi TNBC potipiai (C1, C2 ir C3). C1 klasteris apėmė TNBC navikus su molekulinio apokrininiu fenotipu, kuriems būdinga geresnė prognozė, o C2 ir C3 buvo praturtinti bazalinių potipio navikų savybėmis. C2 pasižymėjo biologiniu agresyvumu ir imunitetą slopinančiu fenotipu, o C3 pasižymėjo adaptyvaus imuninio atsako ir imuninių kontrolės taškų reguliacijos padidėjimu [35]. Stirzaker ir kt. suskirstė TNBC potipius remiantis navikų epigenetiniais profiliais. TNBC suskirstė į tris klasterius pagal metilinimo grupes. Klasteris 1 (aukštas metilinimo lygis) pasižymėjo atsparumu gydymui, sparčiai progresuojantis ir labai agresyvus fenotipas. Klasteris 2 (vidutinis metilinimo lygis) yra mišrios epigenetinės modifikacijos fenotipas, dažnai gali būti kaip pereinamasis fenotipas į klasterį 1. Klasteris 3 (žemas metilinimas) pasižymi žemesniu metilinimo lygiu, o tai lemia pernelyg didelę onkogenų raišką ir gali nulemti naviko nevienodą atsaką į taikomą gydymą [36].

Praėjus penkeriems metams po pirmosios TNBC klasifikacijos, ta pati Lehmann vadovaujama mokslininkų grupė patikslino TNBC klasifikaciją dėl aptiktų naviką infiltruojančių limfocitų (TIL) ir stromos ląstelių esančių IM ir MSL potipiuose. Atlikus šių tyrimų analizę, buvo išskiriami tik keturi TNBC potipiai (TNBC-4 klasifikacija): BL1, BL2, M ir LAR. BL1 pasižymėjo lengviausia ligos eiga iš visų keturių TNBC potipių [7]. Tuo pat metu Liu mokslininkų grupė pastebėjo, kad remiantis ilgųjų nekoduojančių RNR (angl. *long non-coding RNR*, lncRNR) profiliais, kurie yra genų raiškos reguliatoriai, TNBC galima klasifikuoti į skirtingus potipius. Apjungę mRNR ir lncRNR raiškos profilius, mokslininkai sukūrė Fudano universiteto klasifika-

cijos sistemą (FUSCC), pagal kurią TNBC buvo suskirstytas į 4 potipius: IM – kuriame nustatytas padidėjęs imuninių ląstelių signalinių kelių kiekis; LAR – padidėjęs aktyvumas su hormonų reguliavimu susijusiais keliais; MES – žema ląstelės proliferacijos genų raiška, bet padidėjęs EMT signalinių kelių aktyvumas; BLIS – šiam potipiui būdingas proliferacijos signalinių kelių aktyvumo padidėjimas ir imuninio atsako genų raiškos sumažėjimas. Iš šių keturių TNBC potipių, BLIS pasižymėjo agresyviausia ligos forma [37]. Liu mokslininkų komanda, palygino savo TNBC klasifikaciją su Lehman TNBC-6 klasifikacija. Mokslininkai pastebėjo, kad IM potipis yra beveik identiškas abiejose mokslininkų sukurtose klasifikacijose, o LAR ir BLIS beveik atitinka Lehmano LAR ir BL1 potipius [37].

Masuda ir kt., 2017 metais pastebėjo, kad TNBC galima išskirti į du potipius remiantis funkcinių baltymų skirtumais. Atlikę atvirkštinės fazės baltymų analizę TNBC suskirstė į: I/H potipį (uždegiminis, su hormonais susijęs), kuris išsiskyrė kanoniniais signaliniais keliais (uždegimo, hormonų receptorių ir MAPK signaliniai keliai). DD potipis (susijęs su DNR pažeidimais), kuris išsiskyrė GADD45, DNR pažeidimais ir p53 signalinio kelio aktyvumo padidėjimu [38].

Jiang ir kt., mokslininkų grupė po poros metų atlikusi RNR raiškos, DNR kopijų skaičiaus ir somatinių mutacijų analizę, TNBC mėginiuose išskyrė 4 potipius: IM, BLIS, LAR ir MES. Iš visų 4 potipių BLIS pasižymėjo geriausia ligos prognoze, palyginus su likusiais potipiais [39].

DiNome ir kt., 2021 metais atlikę viso DNR geno metilinio profilių analizę, TNBC suskirstė į keturi potipius: Epi-CL-A, Epi-CL-B, Epi-CL-C, Epi-CL-D. Iš visų potipių Epi-CL-B pasižymėjo kaip agresyviausias fenotipas [40]. Tuo pat metu Gong ir kt., atlikę TNBC mėginių analizę, išskyrė tris TNBC potipius pagal skirtingą metabolinių kelių aktyvumą: MPS1 – lipogeninis (išaugęs lipidų metabolizmas), MPS2 – glikolizinis (suaktyvėjęs angliavandenių ir nukleotidų metabolizmas), MPS3 – mišrus potipis su daliniu metabolinių kelių sutrikimu. Nustatyta, kad MPS2 potipis yra pats agresyviausias [41].

Vienas naujausių TNBC klasifikacijos modelių pasiūlytas Asleh mokslinės grupės, kuri 2022 metais ištyrė 300 formaline fiksuotų TNBC. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad TNBC galima išskirti į 4 potipius, kurie buvo identifikuoti ir Burstein ir kt. 2016 metais. Šio tyrimo metu buvo atlikta globali proteomikos analizė, kurioje išsiskyrė keturi pagrindiniai proteomikos klasteriai: BLIS, BLIA, LAR, MES. Iš šių potipių geriausia ligos prognoze pasižymėjo BLIA, blogiausia – BLIS [42].

Naujos kartos sekoskaita, kompiuterinės sistemos ir eksponentiškai didėjantis turimų duomenų kiekis padėjo rasti būdus, kaip identifikuoti skirtingus TNBC potipius. Iš pradžių buvo naudojami imunohistocheminiai (IHC)

metodai, vėliau pereita prie genų raiškos mikrogardelių tyrimų. Pastebėjus svarbius skirtumus tarp TNBC mRNR ir lncRNR raiškų, buvo atnaujinta TNBC klasifikacija. Per pastaruosius penkerius metus TNBC identifikavimui taikytos naujos metodikos, tokios kaip alternatyvi poliadenilizacija, DNR metilinimas, baltymų kiekio analizė bei metabolinių kelių sutrikimų tyrimai. Šių tyrimų tikslas yra kuo tiksliau identifikuoti atskirus TNBC potipius, rasti potencialius gydymo taikinius ir pritaikyti personalizuotą gydymo strategiją. TNBC pasižymi daugybe skirtingų klasifikacijų, kurios remiasi navikų genetiniais, epigenetiniais ir molekuliniais profiliais. Šios klasifikacijos yra itin svarbios gydymui, nes jos leidžia nustatyti specifinius navikų potipius ir parinkti tikslinius terapinius metodus, tokiu būdu pagerinant gydymo efektyvumą ir pacientų išgyvenamumą.

Tačiau TNBC gydymą vis dar labai apsunkina vidinis navikų heterogeniškumas, kai naviką sudaro skirtingų fenotipų vėžinės ląstelės. Dėl to, mažas biopsinės medžiagos kiekis, ne visada atspindi tikrąją naviko sudėtį ir taikomas gydymas gali būti efektyvus tik daliai naviko, todėl liga vėliau gali atsinaujinti.

### **1.1.2. Trejopai neigiamo krūties vėžio ląstelių mutacijos lemiančios potipių įvairovė**

Trejopai neigiamo krūties vėžio klasifikacija padėjo aiškiau suprasti šios ligos heterogeniškumą ir tai, kad ieškant naujų vaistų reikia atkreipti dėmesį į kiekvieno TNBC potipio savybes. Taikant įvairius analizės metodus identifikuoti TNBC potipiai (1.1.2.1 lentelė) atskleidė ir daugybę kiekvieno potipių skirtumų, kuriems mokslininkai pasiūlė ir galimus terapinius taikinius.

#### **1.1.2.1 lentelė. TNBC klasifikacijos metodai**

<b>Metodas</b>	<b>TNBC potipiai</b>	<b>Šaltinis</b>
Imunohistocheminis	Luminalinis, bazoluminalinis, bazalinis A ir B	[43]
Genų raiška, mikrogardelės	BL1, BL2, IM, M, MSL, LAR	[33]
Genų raiška, mikrogardelės	BL1, BL2, M, LAR	[7]
Genų raiška (CNV)	BLIA, BLIS, LAR, MES	[34]
Genų raiška	C1, C2, C3	[35]
mRNR ir lncRNR	MES, BLIS, LAR, IM	[37]
Alternatyvus poliadelinimas	LAR, MLIA, BL, S	[42]
DNR metilinimas 450K	Epi-CL-A, Epi-CL-B, Epi-CL-C, Epi-CL-D	[40]
DNR metilinimas, MBD-Cap-Seq	Klasteris 1, Klasteris 2, Klasteris 3	[36]
Baltymų lygio nustatymas	I/H-potipis, DD-potipis	[38]
Metabolinių kelių skirtumai	MPS1, MPS2, MPS3	[41]

### *Genų raiška – kopijų skaičiaus variacijos*

TNBC sergančių pacientų navikuose ir kraujyje cirkuliuojančioje DNR nustatyti skirtingi vieno nukleotido variantai (angl. *single nucleotide variant*, SNV) [44]. Jiang ir kt., būtent ir pastebėjo šiuos skirtumus atliktame FUSCC kohortiniame tyrime, kur somatinės mutacijos ir SNV atvejai skyrėsi tarp atskirų TNBC potipių. Pavyzdžiui, FUSCC LAR navikuose yra stipriai padidėjęs PI3K signalinio kelio mutacijų kiekis. Itin aukštas genetinis nestabilumas nustatytas ir FUSCC BLIS potipyje. Remiantis mutacijų skirtumais TNBC ląstelėse, šio tyrimo metu buvo išskirtos pagrindinės 4 mutacijų grupės. 1) *Homologinės rekombinacijos deficitas* (angl. *homologous recombination deficiency*, HRD), kai ląstelės gebėjimas taisyti DNR dvigubų grandinių lūžius naudojant HRD kelią yra sutrikęs. Tai sukelia genominių nestabilumą ir yra susiję su sumažėjusiu atsparumu tam tikriems chemoterapiniams vaistams ir PARP inhibitoriams; 2) *laikrodžio mutacijos* (angl. *clock-like*), jos kaupiasi matomu būdu laikui bėgant, atspindėdamos laikrodžio judėjimo nuoseklumą, šios mutacijos suteikia įžvalgų apie vėžio progresavimo greitį, naviko vystymosi laikotarpį. 3) *APOBEC* mutacijos (apolipoproteino B mRNR keičiantis fermentas, katalitinis polipeptidas) atlieka svarbų vaidmenį RNR ir DNR molekulėse, keičiant citozino nukleotidus į uracilą, šis procesas yra ypač svarbus vėžio kontekste, nes APOBEC fermentai gali sukelti mutacijas, kurios vėliau lemia naviko susiformavimą; 4) mišraus potipio mutacijos, neturėjo dominuojančių mutacijų [39]. Įdomu tai, kad HRD potipis pasižymėjo didesne giminingų variantų dalimi nei kiti mutacijų potipiai. Tai reiškia, kad pacientai, kuriems nustatytas šis mutacinis potipis, turi paveldėtą genetinį polinkį šioms mutacijoms atsirasti, kuris trikdo DNR taisymo mechanizmus. Nustatyta, kad būtent šio potipio navikuose dažniausiai buvo aptinkamos *BRCA1*, *RAD51D* ir *BRCA2* genų mutacijos. Navikų (su HRD potipiu) gydymui ypač tinka PARP slopikliai [45].

### *Alternatyvus poliadenilimas*

Nustatant TNBC potipius taip pat buvo atsižvelgiama į RNR brendimą, atliekant alternatyvaus poliadelinimo analizę TNBC kohortiniame tyrime. Atlikus tyrimą, šių keturių potipių genų raiška buvo palyginta su TNBC-6 klasifikacija. Potipis 1, pavadintas LAR, buvo praturtintas hormonų reguliuojamais keliais ir labai sutapo su LAR potipiu TNBC-6 klasifikacijoje. Remiantis šia klasifikacija, M, MSL ir IM grupėse nustatyti genų raiškos modeliai priskiriami 2 potipiui, kurį pavadino mezenchiminiu imuniteto aktyvuotu (MLIA). Trečias potipis pavadintas bazaliniu (BL), dėl padidėjusios proliferacijos ir dėl su DNR pažaidų susijusiais genais. Šis potipis buvo panašus į BL potipį TNBC-6 klasifikacijoje. Ketvirtasis potipis, kurio ligos prognozė buvo blogiausia, pasižymėjo ląstelių augimo ir su imunitetu susijusių kelių reguliacijos sumažėjimu ir buvo pavadintas slopinamuoju (S) potipiu [46].

### *DNR metilinimas MBDCap-Seq metodu*

DNR metilinimo (DNRm) modeliai taip pat naudojami navikų apibūdinimui [47]. Iš pradžių buvo identifikuotos trys skirtingos DNRm grupės naudojant MBDCap-Seq metodą, kuris naudojamas DNR metilinimo modeliams visame genome nustatyti. Šio tyrimo metu nustatyti 865 TNBC skirtingai metilinami regionai, daugelis iš jų – hipermetilinti. Atlikus išgyvenamumo analizę buvo nustatyta, kad tokio potipio navikai pasižymėjo geresne ligos prognoze [36]. Remiantis DNRm modeliu, TNBC išskirtas į keturis epitipus. Epi-CL-A labiausiai atitiko mezenchiminį potipį (TNBC-6 klasifikacijos), Epi-CL-B pasižymėjo mezenchiminių ląstelių diferenciacijos aktyvavimu ir proliferacijos signalinių kelių aktyvumu. Epi-CL-C apibūdintas kaip su hipoksijos signalinių kelių aktyvavimu ir baltymų homeostazės reguliavimu. Epi-CL-D išsiskyrė imuninės sistemos signalinių kelių aktyvumu, tokių kaip padidinto atsako į interferoną beta, bei T ląstelių sukulto citotoksiškumo reguliavimą [40].

### *Proteominė analizė*

Navikų proteominė analizė dar vienas iš būdų TNBC navikų klasifikacijai, kuris pradedamas vis plačiau naudoti tikslinėje medicinoje. Naudojant atvirkštinės fazės baltymų matricą (angl. *reverse-phase protein array*, RPPA) buvo nustatyti du stabilūs TNBC navikų klasteriai. Baltymų požymių analizė atskleidė, kad viename iš klasterių buvo gausu augimo slopinimo ir DNR pažeidimo (GADD45 genų) ir p53 signalizavimo veiksmų. Šis potipis buvo identifikuotas kaip su DNR pažeidimu (angl. *DNR damage*, DD) susijęs potipis. Kitas klasteris buvo pavadintas I/H potipiu dėl jo ryšio su uždegimu, hormoniniais receptoriais ir MAPK signaliniais keliais [38]. Atlikus detalesnę klasterių analizę nustatyta, kad RPPA klasifikacija labai sutampa su TNBC-4 [7] klasifikavimo sistema. Kur BL1 ir BL2 atitinka RPPA subklasterius 2 ir 1, kurie priskiriami prie DNR pažaidų potipio [38].

### *Metabolinių kelių skirtumais paremta TNBC klasifikacija*

Visai neseniai, metabolinių kelių skirtumai pradėti naudoti TNBC klasifikacijai. FUSCC kohortinio tyrimo metu [39] buvo analizuojama genų raiška, kad būtų galima identifikuoti transkriptomikos skirtumus genuose, susijusiuose su metaboliniais keliais [41]. Remiantis šiuo tyrimu, TNBC buvo priskirtas trims skirtingoms metabolinių kelių grupėms (angl. *metabolic pathways subtypes*, MPS), kurios pasižymėjo skirtingomis metabolinėmis savybėmis. MPS1 potipis buvo apibrėžtas kaip lipogeninis potipis, kuris pasižymėjo padidėjusiu lipidų metabolizmu, PI3K ir RTK-RAS kelių mutacijomis; MPS2 – apibūdintas kaip glikolitinis potipis, kuriame padidėjęs angliavandenių nukleotidų metabolizmas ir HRD, CNA (angl. *copy-number alterations*, CNA). Šis potipis pasižymėjo blogiausiu pacientų išgyvenamumu iš visų trijų

potipių. Navikai, kurie pasižymėjo tiek MPS1, tiek MPS2 savybėmis, buvo priskirti MPS3 potipiui. Netikslinė metabolinė užšaldytų TNBC mėginių analizė atskleidė, kad MPS1 turėjo daugiau riebalų rūgščių, o MPS2 - daugiau glikolizės mediatorių [41]. Mokslininkai nustatė potencialius terapinius taikinius šiems potipiams. MPS1 – lipidų sintezės slopikliai, pavyzdžiui C75 (riebalų rūgščių sintezės slopiklis). MPS2 – laktato dehidrogenazės slopiklis, oksamo ūgštis [48], arba imuninės sistemos patikros taškų slopikliai, tokie kaip programuoti ląstelių mirties ligandai 1 (angl. *programmed cell death ligand 1*, PDL-1) [49].

Supratus, kad TNBC potipiai skiriasi ne tik genetiniu pobūdžiu, bet ir fenotipiniu, vis daugiau dėmesio skiriama TNBC ląstelių fenotipinių savybių nustatymo tyrimams. Tokių savybių identifikavimas padėtų nuspėti galimą ląstelių atsaką į taikomą gydymą ir taip prognozuoti būsimą ligos eigą.

### **1.1.3. Trejopai neigiamo krūties vėžio mechanizmai, lemiantys atsparumą vaistams**

TNBC ląstelių atsparumas vaistams yra didelė kliūtis sėkmingam ligos gydymui. Atsparumą vaistams lemia daug įvairių ir sudėtingų mechanizmų: genų raiškos pokyčiai, alternatyvių signalinių kelių aktyvavimas, naviko mikroaplinkos pokyčiai, vėžio kamieninių ląstelių suaktyvėjimas, vėžinių ląstelių sąveika su naviko mikroaplinka ir vėžinėmis ląstelėmis ir kt. Todėl svarbu tirti kiekvieną atsparumo mechanizmą ir ieškoti naujų potencialių terapinių taikinių.

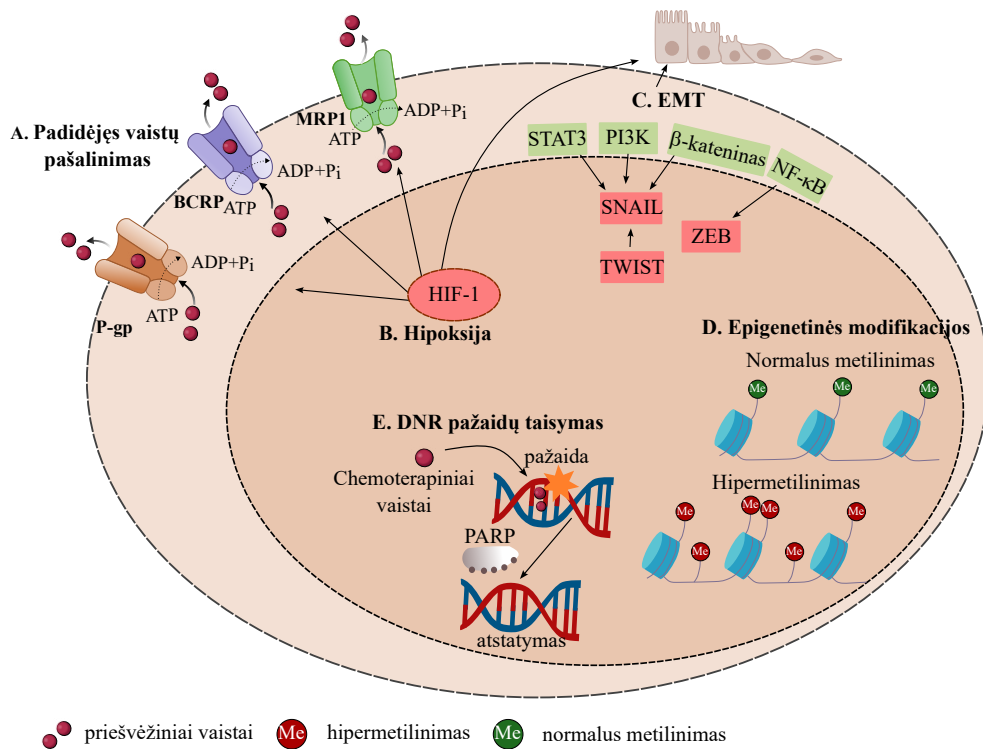
#### *Vaistų pašalinimas*

Sumažėjusi viduląstelinė vaistų koncentracija, dėl padidėjusio vaistų pašalinimo iš ląstelių, yra vienas pagrindinių atsparumo chemoterapijai mechanizmų [50] (1.1.3.1 pav. A). ATP prisijungiantys (ABC) nešikliai atlieka pagrindinį vaidmenį vaistų pašalinime iš ląstelių. ABCB1, ABCC1 ir ABCG2 genai siejami su daugiavaisčiu atsparumu vėžinėse ląstelėse [51] (1.1.3.1 pav. A). P-glikoproteinas (P-gp, ABCB1), kurio padidėjusi raiška vėžinėse ląstelėse lemia daugiavaistį atsparumą, yra pagrindinis nešiklis, dalyvaujantis DOX atsparumo mechanizme. Nuslopinus P-gp geną PTX atspariose SKBR3 ir MCF-7 ląstelėse, jos tapo jautrios PTX [52]. TNBC ląstelėse, ypač mezenchiminio ir mezenchimio-kamieninio potipio, padidėjusi P-gp, MRP1 (ABCC1) ir BCRP (ABCG2) genų raiška [53,54].

#### *Padidėjęs DNR pažeidimų taisymas ir ląstelių senėjimo išvengimas*

DNR pažeidimas vėžinėse ląstelėse yra daugelio vaistų (doksorubicino, cisplatinos, 5-fluorouracilo, gemcitabino) pagrindinis taikynys. DNR pažeidi-

dimų atsakas gali lemti atsparumą vaistams dėl padidėjusio DNR pažeidų taisymo. TNBC atveju BL1 potipio ląstelėse nustatytas ypač padidėjęs DNR pažeidų taisymas [9]. Slopinant DNR pažeidų taisymą, pavyzdžiui, PARP slopikliais, galima sumažinti atsparumą gydymui (1.1.3.1 pav. E). Klinikiniuose tyrimuose TNBC pacientams taikomas niraparibo ir pembrolizumabo derinys, tačiau atsparumas PARP slopikliams vis dar yra iššūkis [55]. Slopikliai, nukreipti į DNR pataisos kinazes, taip pat yra potencialus gydymo būdas, nes sustiprina atsparių ląstelių apoptozę. Chemoterapiniai vaistai sukelia ląstelių senėjimą, kurio metu ląstelės sustoja dalintis ir daugintis. Vėžinės ląstelės, veikiamos chemoterapijos, gali įgyti CSCs savybių, išvengdamos senėjimo proceso ir skatindamos ligos progresavimą [56]. Tokie atsparumo mechanizmai aptinkami BL1 ir MSL potipiuose. BL1 potipio ląstelės pasižymi itin aukštu DNR pažeidų taisymu, padedančiu išvengti DNR pažeidų kaupimosi ir užprogramuotos ląstelių mirties [57,58].



### 1.1.3.1 pav. Atsparumo mechanizmai vėžinėse ląstelėse

A – vaistų pašalinimas dėl daugiavaisčio atsparumo nešiklių; B – hipoksija. HIF-1 faktoriaus įtaka; C – epitelinis-mezenchiminis perėjimas; D – epigenetinės modifikacijos; E – DNR pažeidų taisymas.



### *Epigenetinės modifikacijos*

Genų slopinimas, histonų modifikacijos ir nekoduojančių RNR raiškos pokyčiai gali prisidėti prie chemoterapijos atsparumo. Atsparumas gali atsirasti dėl taikinių mutacijų arba epigenetinių pokyčių (1.1.3.1 pav. D), kurie keičia vaisto taikinio raišką [59]. Pavyzdžiui, atsparumas tamoksifenui ER krūties vėžio atveju gali atsirasti dėl sumažėjusios ER raiškos, kurią lemia mutacijos ir epigenetiniai pokyčiai. Epigenetiniai vaistai, tokie kaip DNR metilinimo slopikliai (5-azacitidinas ir 5-aza-2'-deoksicitidinas), naudojami vėžinių susirgimų gydymui ir tiriama klinikiniuose tyrimuose kombinuotam gydymui [60]. TNBC mezenchiminio potipio vėžinėse ląstelėse nustatytas statistiškai reikšmingai didesnis epigenetinių modifikacijų kiekis, palyginti su kitais TNBC potipiais. Šios modifikacijos, nutildant tam tikrus genus, lemia atsparumą gydymui, nes daugelis priešvėžinių vaistų yra nukreipti į šiuos genus ar jų signalinius kelius [61].

### *Epitelio-mezenchiminis perėjimas (EMT)*

Normaliose ląstelėse, EMT dalyvauja embrionų vystymosi procese ir žaizdų gijime, leisdamas epitelinėms ląstelėms įgyti mezenchiminių savybių, dėl to jos tampa judresnės ir invazyvesnės [62]. Tokį perėjimą lemia sudėtingas signalinių kelių ir transkripcijos veiksnių, tokių kaip SNAIL, ZEB, TWIST šeimos, tinklas (1.1.3.1 pav. C). TNBC mezenchiminio ir mezenchiminio-kamieninio potipio ląstelės pasižymi ypač aktyviu EMT, leidžiančiu šioms ląstelėms atsiskirti nuo pirminio naviko ir išplisti į kitus organus. EMT taip pat yra susijęs su atsparumu chemoterapijai ir gebėjimu išvengti imuninės sistemos, apsunkinant vėžinių susirgimų gydymą [63]. EMT ląstelės turi panašumų signalų sklaidos keliuose su CSCs ląstelėmis. Naudojant chemoterapinį vaistą etoposidą, padidėjo RhoC raiška, sukianti EMT fenotipo atsiradimą krūties vėžyje, tai įrodo EMT, CSCs ir atsparumo gydymui ryšį [64]. RhoC reguliuoja ląstelių citoskeleto gijų išsidėstymą ir padidėjusi RhoC raiška yra susijusi su bloga krūties vėžio prognoze. RhoC ne tik svarbus CSCs metastaziniam potencialui ir dauginimuisi, bet ir jų elgsenai. Moduliuojant RhoC raišką, pastebėti pokyčiai ląstelių proliferacijai ir gebėjimui įsiskverbti į aplinkinius audinius [65]. Taikiniai, sukurti prieš RhoC, gali būti perspektyvi gydymo strategija.

### *Hipoksija*

Hipoksija vaidina svarbų vaidmenį moduliuojant naviko mikroaplinką (angl. *tumor microenvironment*, TME), lemia atsparumą gydymui, bei prisideda prie vėžinių ligų progresavimo. Žinoma, kad ląstelėms esant hipoksinėje aplinkoje, padidėja hipoksiją sukeliančio veiksnio aktyvumas (HIF). HIF aktyvavimas lemia CSCs fenotipo ląstelių populiacijos gausėjimą, išaugusią na-

vikų angiogenezę, vaistų pašalinimą dėl padidėjusios ABCC1 ir ABCG2 raiškos, senėjimo ir apoptozės moduliācijas, metastazių formavimą ir genomo nestabilumą [64,66] (1.1.3.1 pav. B). Hipoksiją sukeliantis veiksnys 1 (HIFs-1) skatina epitelinį – mezenchiminį ląstelių perėjimą (EMT) ir tai yra vienas iš TNBC požymių [64]. Dar vienas iš mechanizmų, kaip hipoksinė ląstelių būklė lemia atsparumą vaistams – sukuriamas „atvirkštinis pH gradientas“. Aplink vėžines ląsteles yra labiau rūgštinė aplinka (pH 6,5–7,1) nei normaliuose audiniuose. Sumažėjus užląsteliniam pH, silpnai baziniai priešvėžiniai vaistai yra jonizuojami ir teigiamas krūvis riboja vaistų transportą į ląsteles. Protonų siurblių slopikliai yra vienas iš terapinio gydymo taikinių, galinčių padidinti užląstelinį pH ir taip sumažinti vėžinių ląstelių atsparumą gydyme taikomiems vaistams [66]. TNBC ląstelės gali lengvai prisitaikyti prie hipoksinės aplinkos sąlygų keičiant ląstelių metabolizmą į glikolitinį. Mezenchiminio ir mezenchiminio-kamieninio potipio ląstelės geba išgyventi hipoksinės aplinkos sąlygomis dėl greito EMT aktyvavimo [67].

#### *Navikų vidinio heterogeniškumo nulemtas atsparumas vaistams*

Krūties vėžio navikai, įskaitant TNBC, dažniausiai sudaryti iš fenotipiškai skirtingų vėžinių ląstelių populiacijų, pasižyminčių skirtingomis epigenetinėmis modifikacijomis ir fenotipinėmis savybėmis, tai lemia ląstelių atsaką į gydymą. Pavyzdžiui TNBC, BL1 ir BL2 potipiems tinkamas chemoterapinis gydymas arba PARP slopikliai, tuo tarpu M ir MSL potipiems gydymas turi būti nukreiptas į specifinius signalinių kelių taikinius, tokius kaip TGF- $\beta$  [9]. CSCs ląstelės taip pat atlieka svarbų vaidmenį vėžinių susirgimų gydymo atsparume bei ligos atsinaujinimo procese, nes šios ląstelės geba „savaiame atsinaujinti“. Atlikti tyrimai rodo, kad CSCs yra atsparios įprastiems gydymo metodams [66]. Vienas iš būdų identifikuoti CSCs – biožymenų, tokių kaip CD133, panaudojimas [68]. Kol kas nėra žinoma, kokie mechanizmai CSCs ląstelėse lemia jų atsparumą gydymui. Nustatyta, kad CSCs įprastai yra ramybės, „miego“ būsenoje ir pasižymi ypač didele ABC nešiklių raiška. Šių ląstelių atsparumas gydymui gali būti susijęs ir su tuo, kad ląstelėms esant ramybės būsenoje, G0 ciklo fazėje, jos išvengia gydymo, kadangi daugelis chemoterapinių vaistų ar radioterapijos metodų veikia tik greitai besidauginančias ląsteles [69]. Navikus, sudarytus iš tokių fenotipiškai skirtingų ląstelių, ypatingai sudėtinga gydyti, nes sunku identifikuoti navikų fenotipinę sudėtį.

## **1.2. Ląstelių sąveikos įtaka gydymo atsparumui**

Sveikuose audiniuose ląstelės sąveikauja tarpusavyje su jas supančia aplinka, gerai organizuotu signalinių kelių tinklu. Tai palaiko homeostazę ir audinių vientisumą, bei užtikrina sklandų organizmo funkcionavimą. Ląste-

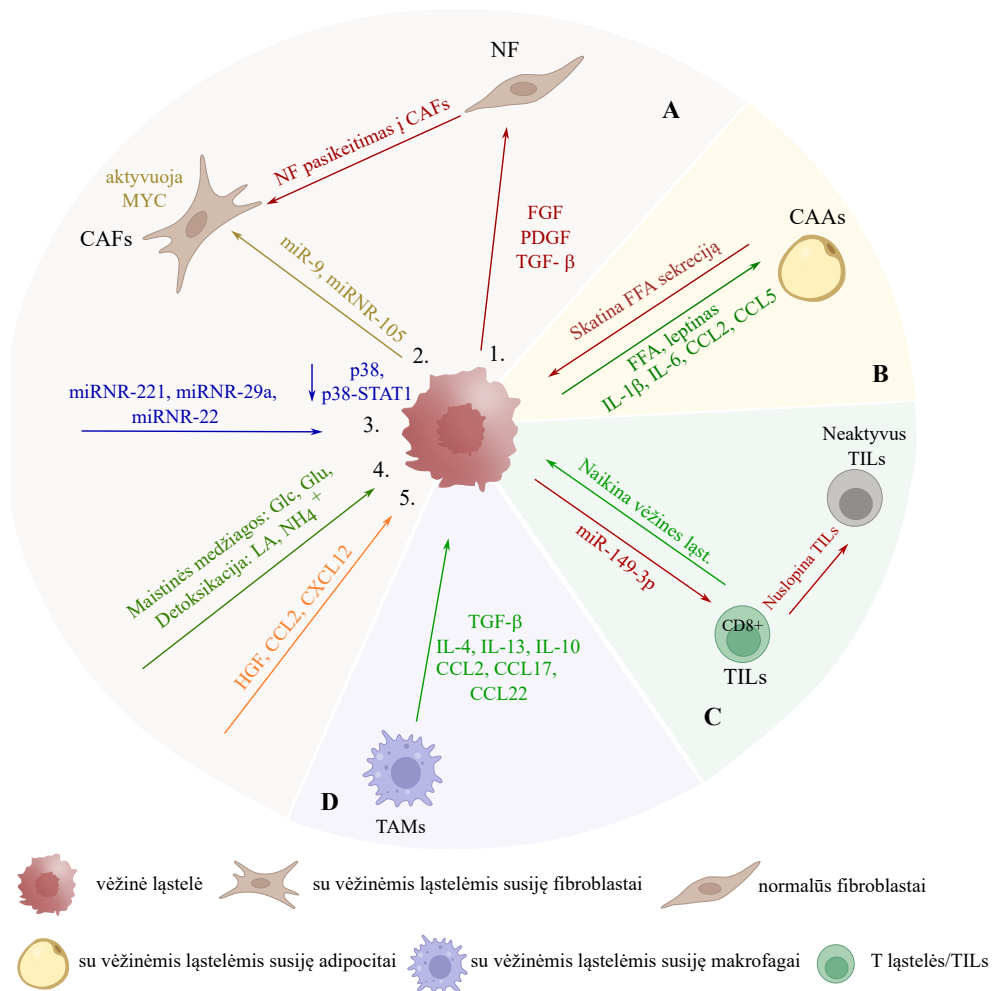
lių tarpusavio sąveika svarbi įvairiems fiziologiniams procesams, įskaitant ląstelių diferenciaciją, proliferaciją ir apoptozę, kurie yra griežtai reguliuojami siekiant užtikrinti audinių „sveikatą“ ir funkciją. Ląstelių sąveika vyksta per tiesioginį sąlytį arba netiesioginį, per signalinius veiksnius – hormonus, augimo veiksnius, citokinus, chemokinus, egzosomas [70]. Ląstelių sąveikos procesuose svarbų vaidmenį atlieka ir užląstelinis užpildas (ECM), kuris palaiko ląstelių adheziją, užtikrina audinių vientisumą ir dalyvauja signalų perdavimo procesuose [71]. Ląstelių sąveika yra svarbi tuo, kad padeda palaikyti pusiausvyrą tarp ląstelių augimo ir jų žūties, užtikrinant tinkamą audinių vystymąsi, regeneraciją, pažaidų taisymą. Pavyzdžiui, pusiausvyra tarp proliferacijos signalų ir ląstelės ciklo slopiklių apsaugo nuo nekontroliuojamo ląstelių dalijimosi, šios pusiausvyros sutrikimas gali lemti navikų susiformavimą. Taip pat tinkamai reguliuojama ląstelių mirtis (apoptozė) pašalina pažeistas ar nereikalingas ląsteles, užkirsdama kelių mutacijų kaupimuisi, galinčiam paskatinti vėžio vystymąsi [72].

Kai vėžiniuose audiniuose ląstelių sąveikos reguliavimas sutrinka, pakinta normali audinių struktūra ir jų funkcijos. Vėžinių ląstelių sąveika su ląsteliniiais ir neląsteliniiais komponentais, juos panaudoja savo išgyvenamumui, dauginimuisi, invazijai ir metastazių formavimui [73]. Navikų progresavimo ir gydymo atsparumui didelę įtaką daro vėžinių ląstelių sąveiką su naviko mikroaplinkos ląstelėmis, bei fenotipiškai skirtingų vėžinių ląstelių tarpusavio sąveika.

### **1.2.1. Vėžinių ląstelių sąveika su naviko mikroaplinkos ląstelėmis**

#### *Fibroblastai ir su vėžinėmis ląstelėmis susiję fibroblastai (CAFs)*

Naviko mikroaplinką sudaro įvairūs ląsteliniai ir neląsteliniai komponentai, kurių sąveika su vėžinėmis ląstelėmis turi įtakos ligos progresavimui, metastazių formavimui ir atsakui į gydymą. Ląsteliniai TME komponentai: su vėžinėmis ląstelėmis susiję fibroblastai (angl. *cancer-associated fibroblasts, CAFs*), imuninės ląstelės (T, B ląstelės, makrofagai, dendritinės ląstelės ir natūralios žudikės (angl. *natural killer, NK*), endotelio ląstelės, adipocitai (1.2.1.1 pav.). Neląsteliniai komponentai: užląstelinis matiksas (angl. *extracellular matrix, ECM*), egzosomos, įvairūs tirpūs faktoriai (citokinai, chemokinai, augimo faktoriai, hormonai) [64].



### 1.2.1.1 pav. Vėžinių ląstelių sąveika su naviko mikroaplinkos ląstelėmis

Sąveika: A – su vėžinėmis ląstelėmis susijusiais fibroblastais, CAFs; B – su vėžinėmis ląstelėmis susijusiais makrofagais, TAMs; C – su vėžinėmis ląstelėmis susijusiais adipocitais, CAAs; D – su T tipo infiltruojančiais limfocitais, TILs.

Fibroblastai yra pagrindinis stromos ląstelinis komponentas, kuris fiziologiškai palaiko ir apsaugo epitelį, sintetindamas ir pertvarkydamas ECM, įvykus ECM pažeidimams. Navikuose fibroblastai gali įgyti neįprastų savybių ir prisidėti prie naviko progresavimo bei plitimo, sąveikaujant su vėžio ir stromos ląstelėmis. Fibroblastai, vadinami CAFs, skiriasi nuo normalių fibroblastų (NF) tiek funkciniu, tiek genetiniu požiūriu [74]. Šiuo metu yra žinoma keletas skirtingų CAFs fenotipų 1) miofibroblastiniai CAFs (myCAF), išskiriantys  $\alpha$ -lygiųjų raumenų aktino ( $\alpha$ -SMA) raiška ir pertvarkantys ECM

naviko augimui; 2) uždegiminiai CAFs (iCAFs), gaminantys uždegiminius citokinus ir chemokinus, palaikantys uždegiminę mikroaplinką; 3) antigenus pateikiantys CAFs (apCAFs), moduluojantys imuninį atsaką ir T ląstelių sąveiką [75]. Vėžinių ląstelių ir CAFs ląstelių sąveika vyksta per įvairius kompleksinius mechanizmus (1.2.1.1 pav. A). Pirmiausia, CAFs atsiradimas nulemtas vėžinių ląstelių, kurios išskiria tokius veiksnius kaip TGF- $\beta$ , PDGF, FGF ir įvairius citokinus. Šios molekulės aktyvuoja fibroblastus ir skatina jų diferenciaciją į CAFs (1.2.1.1 pav. A1). Tuomet CAFs ląstelės aktyviai gamina ir išskiria įvairius veiksnius, kurie sukuria palankias sąlygas vėžinių ląstelių dauginimuisi. Pavyzdžiui, CAFs išskiriamas augimo veiksnys HGF, skatina vėžinių ląstelių proliferaciją ir ląstelių judrumą [76]. Kitas sąveikos mechanizmas, veikiantis tiesiogiai ir netiesiogiai – CAFs ląstelės išskiria chemokinus (pvz.: CCL2, CXCL12), kurie į naviko mikroaplinką „pritraukia“ imunines ląsteles (1.2.1.1 pav. A5). Taip pat CAFs chemokinai tiesiogiai veikia vėžines ląsteles, skatina vėžinių ląstelių migraciją. Trečiasis CAFs ir vėžinių ląstelių sąveikos mechanizmas apima ECM pertvarkymą. CAFs ląstelės išskiria kolageną, fibronektiną ir užląstelinio užpildo metalproteinazes, kurios skaido ECM komponentus ir taip palengvina vėžinių ląstelių invaziją į gretimus audinius [76]. Vėžinių ląstelių su CAFs ląstelėmis vienas iš pagrindinių sąveikos mechanizmų – apsikeitimas egzosomomis, kurios užpildytos baltymais, lipidais ar nukleorūgštimis, įskaitant ir mikroRNR (miRNR). Vėžinės ląstelės naudoja egzosomas su miRNR kaip signalinę molekulę skatinti CAFs ląstelių formavimą ir tokia miRNR disreguliacija turi įtakos CAFs gebėjimui palaikyti navikų vystymąsi [44,45]. CAFs ląstelių sekretomas (baltyminis mišinys), įskaitant egzosomas su miRNR ir ECM sudėtis gali paveikti naviko atsaką į gydymą. Mokslininkai nustatė, kad TNBC ląstelių išskiriamas miR-9 skatina NF virtimą CAFs (1.2.1.1 pav. A2), o tai didina TNBC atsparumą cisplatinai [77,78]. ER krūties vėžio atveju, CAFs turintys CD63 receptorius ir egzosominę miR-22, sukelia atsparumą tamoksifenui [79]. 2017 m. Sansone ir kt. nustatė, kad CAFs mikropūslelės su miR-221 sukelia atsparumą hormonų terapijai, skatinant CD133 vėžio kamieninių ląstelių atsiradimą [80]. Liu Y. grupė pastebėjo, kad miR-29a trikdo p38-STAT1 signalo perdavimui, skatindama vėžinių ląstelių augimą, atsparumą vaistams ir metastazių formavimą [81] (1.2.1.1 pav. A3). Į CAFs patekusi, egzosominė miRNR-105, aktyvuoja MYC signalinį kelią ir perprogramuoja šių ląstelių metabolizmą. Šis perprogramavimas leidžia CAFs pritaikyti savo metabolinį aktyvumą vėžinių ląstelių poreikiams (1.2.1.1 pav. A2). Pavyzdžiui, esant pakankamam maistinių medžiagų kiekiui, CAFs ląstelės skatina gliukozės ir glutamino apykaitą, taip „maitinant“ vėžines ląsteles. Esant maistinių medžiagų stygiui, CAFs ląstelės apsaugo vėžines ląsteles nuo medžiagų apykaitos produktų liekanų,

jas detoksikuojant [82] (1.2.1.1 pav. A4), o toks vėžinių ir CAFs ląstelių ryšys rodo, kokią įtaką ląstelių tarpusavio sąveika turi vėžinių susirgimų atveju.

### *Makrofagai*

Su krūties vėžiu susiję makrofagai (angl. *tumor-associated macrophages*, TAMs) yra krūties navikų mikroaplinkos komponentas. TAMs diferencijuoja iš aplink naviką cirkuliuojančių monocitų. TAMs gamina ir išskiria įvairius citokinus, fermentus, veiksnius, kurie skatina naviko augimą, angiogenezę, metastazių formavimą ir turi įtakos atsparumo vaistams susiformavime [83]. Makrofagai paprastai skirstomi į du potipius atsižvelgiant į jų funkciją: M1 – priešūždegiminiai ir turi prieš-navikinį poveikį, dalyvauja Th1 imuniniame atsake, gamina priešūždegiminius citokinus ir skatina patogenų ir vėžinių ląstelių naikinimą; M2 – priešūždegiminiai turi pro-navikinį poveikį, dalyvauja Th2 imuniniame atsake, palaiko audinių atstatymą, naviko augimą, angiogenezę ir slopina imuninį atsaką [84]. Navikuose TAMs dažniausiai yra M2 fenotipo, kurie gamina ir išskiria tokius veiksnius kaip, IL-4, IL-13, IL-10 ir C-C motyvo ligandus 2, 17 ir 22, bei TGF- $\beta$ , kurie skatina vėžinių ląstelių augimą ir plitimą (1.2.1.1 pav. D). Taip pat nustatyta, kad M2 makrofagai yra susiję su chemoterapinio gydymo atsparumu [85]. Atlikti tyrimai parodė, kad miRNR daro didelę įtaką makrofagų poliarizacijai ir imuniniam atsakui naviko mikroaplinkoje. 2012 metais atliktas tyrimas atskleidė, kad miR-155 gali perprogramuoti M2 makrofagus į pro-uždegiminį M1 fenotipą, taip pabrėžiant esminį miR-155 vaidmenį makrofagų fenotipo pasikeitime [86]. Tolimesni krūties vėžio tyrimai parodė, kad tokios miRNR kaip miR-19a-3p gali slopinti M2 fenotipą ir sumažinti vėžinių ląstelių migraciją ir invaziją. Be to, navikinės ląstelės ir naviko mikroaplinkos ląstelės gali apsikeisti miRNR, darydamos įtaką makrofagų elgsenai ir ligos progresavimui. Tolimesni tyrimai parodė, kad miRNR kaip miR-503, miR-375 ir miR-100 vaidina svarbų vaidmenį skatinant arba slopinant makrofagų migraciją, naviko augimą ir metastazių formavimą [87]. TNBC atveju miR-149 yra susijusi su sumažėjusia makrofagų infiltracija ir geresniais išgyvenamumo rezultatais [88]. Šios išvados parodo miRNR potencialą keičiant TAMs elgseną ir taip sumažinant vėžinių ląstelių atsparumą gydymui.

### *Naviką infiltruojantys limfocitai (TILs)*

Naviko mikroaplinkoje dažnai aptinkami naviką infiltruojantys limfocitai (angl. *tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs) siejami su pacientų ligos prognoze ir atsaku į gydymą. Šiuo metu yra žinoma keletas skirtingų TILs fenotipų: CD8+ citotoksinės T ląstelės, *forkhead box* P3-teigiami reguliatoriai (FOXP3+), CD4+ pagalbininkai, folikuliniai T-limfocitai. CD8+ citotoksinės ląstelės yra pagrindinės, kurios naikina vėžines ląsteles, tai lemia aukštą atsa-

ką į gydymą ir geresnę ligos prognozę. Dažnai šios ląstelės „išsenka“ (1.2.1.1 pav. C), sumažėja šių ląstelių proliferacija bei interferono- $\gamma$  gamyba, taip CD8+ nebegali naikinti vėžinių ląstelių [89]. Lemiamą vaidmenį T-ląstelių reguliavime vaidina miRNR, o ypač miR-149-3p, kuris sutrikdo CD8+ ląstelių aktyvumą ir gebėjimą naikinti vėžines ląsteles. Tai rodo, kad miR-149-3p gali būti naudojamas kaip terapinis vaistas [90]. Keletas kitų miRNR (miR-155, miR-149-3p, miR-204-5p) vaidina svarbų vaidmenį T-ląstelių modeliavime, vienos jų suaktyvina CD8+ ląsteles, kitos keičia imuninių ląstelių sudėtį naviko mikroaplinkoje didinant CD4+ ir CD8+ ląstelių paplitimą tuo pačiu sumažinant mieloidinės kilmės supresorines (angl. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) ir NK ląsteles [91,92]. Šie tyrimai rodo, kad miRNR yra galimi imunoterapijos taikiniai, galintys moduluoti T ląstelių imunitetą ir pagerinti vėžio gydymo rezultatus.

### *Adipocitai*

Krūties vėžiniai adipocitai dar žinomi kaip su naviku susiję adipocitai (angl. *cancer-associated adipocytes*, CAAs) yra riebalinės ląstelės esančios naviko mikroaplinkoje. Nors šios ląstelės vėžio patogenezėje atrodo nereikšmingos, tačiau atlieka svarbų vaidmenį prisidedant prie naviko augimo ir progresavimo. CAAs ląstelių sąveika su vėžinėmis ląstelėmis lemia fenotipinius ir funkcinis pokyčius tiek pačių adipocitų tiek ir vėžinių ląstelių [93]. CAAs skiriasi nuo įprastų adipocitų ir išskiria įvairius veiksnius: citokinus (CCL2, CCL5), adipokinus (leptinas), interleukinus (IL-1 $\beta$ , IL-6), kurie prisideda prie vietinio ir sisteminio poveikio naviko mikroaplinkai [93]. Vėžinės ląstelės dažnai įsikverbia į riebalinį krūtų audinį ir priverčia adipocitus išskirti laisvąsias riebalų rūgštis (1.2.1.1 pav. B), kurias vėžinės ląstelės naudoja ATP sintezei ir taip paspartina naviko augimą [94]. CAAs ląstelės prisideda prie vėžinių ląstelių membranos pertvarkymo, dėl to sumažėja arachidono rūgšties kiekis fosfolipidų membranoje, o tai aktyvuoja autofagijos procesus vėžinėse ląstelėse. Autofagija apsaugo nuo vėžinių ląstelių susiformavimo, tačiau jau esant vėžinėms ląstelėms ir susidarius nepalankioms aplinkos sąlygoms (hipoksijai, maistinių medžiagų stygiui, ROS) aktyvuojama autofagija. Įvykus ląstelės autofagijai, susidaro medžiagos apykaitos substratų, kuriuos naudoja aplinkinės vėžinės ląstelės, kad išgyventų [95]. Todėl riebalų rūgščių pernašos slopinimas tarp adipocitų ir vėžinių ląstelių gali būti vienas iš potencialių terapijos taikinių.

### **1.2.2. Vėžinių ląstelių tarpusavio sąveika**

Ankstesni tyrimai nagrinėjo vidinius ląstelių pokyčius, kurie lemdavo normalų vėžinių ląstelių elgesį, o tai turėjo įtakos ligos progresavimui ir gy-

dymo atsparumui. Šiuo metu skiriama daugiau dėmesio vėžinių ląstelių sąveikai su naviko mikroaplinkos ląstelėmis, bei fenotipiškai skirtingomis vėžinių ląstelių populiacijomis tame pačiame navike. Daugėjant tyrimų, mokslininkai nustatė, kad vėžinių ląstelių sąveika gali būti išskiriama į du tipus: konkurencinę ir kooperatyvinę (bendradarbiavimą). Kai kuriais atvejais ląstelių sąveika lemia, kad vienos vėžinės ląstelės įgyja pranašumą lyginant su kitomis. Taip pat agresyvesnio fenotipo vėžinės ląstelės gali „pašalinti“ mažiau agresyvias ar sveikas ląsteles [96]. Ląstelių konkurencija reiškia, kad išgyvena stipriausios ląstelės. Dažniausiai yra pašalinamos ląstelės, turinčios tam tikrų defektų ar pažaidų ir taip sukuriama erdvė, priėjimas prie maistinių medžiagų vėžinėms ląstelėms. Svarbu paminėti, kad ląstelių konkurencija gali slopinti ankstyvą karcinogenezę, pašalinant mutavusias ląsteles. Konkurencija tarp vėžinių ląstelių ir naviko mikroaplinkos yra vienas iš mechanizmų lemiančių naviko invaziją, difuziją, evoliucionavimą, vidinio ir tarpnavikinio heterogeniškumo formavimą [97,98]. Naviko susiformavimas ir progresavimas yra labai dinamiškas procesas, kurio metu vėžinių ląstelių populiacijos ir jų tarpusavio sąveika nuolat kinta. Besikeičianti ląstelių sąveika lemia heterogeniškų navikų susiformavimą su įvairių genotipų ir fenotipų populiacijomis [99]. Todėl labai svarbu suprasti, kaip ląstelių sąveika formuoja vėžinių ląstelių populiacijas tiek erdvėje tiek ir laike.

#### *Krūties vėžinių ląstelių sąveika su normaliomis (sveikomis) epitelio ląstelėmis*

Krūties vėžinės ląstelės atsiranda įvykus įvairiems pakitimams krūties epitelinėse ląstelėse. Todėl krūties epitelio ląstelės yra neatsiejamai susijusios su krūties vėžinėmis ląstelėmis. Ankstyvosios karcinogenezės stadijose normalios pieno liaukų epitelio ląstelės yra arčiausiai vėžinių ląstelių. Šių ląstelių sąveika yra dinamiška, iš pradžių normalios epitelinės ląstelės slopina vėžinių ląstelių formavimąsi. Tyrimų metu įrodyta, kad kartu auginant normalias ir vėžines ląsteles, normalios epitelio ląstelės gali sukelti vėžio ląstelių transkripcijos aktyvumą p53, dėl to vėžinėse ląstelėse aktyvuojama apoptozė, kurioje galimai dalyvauja ir tirozino fosfatazė [100,101]. Navikui vystantis, vėžinių ląstelių slopinimo procesas laikui bėgant silpnėja, o vėžinių ląstelių populiacija didėja. Krūties vėžinės ląstelės gali pakeisti normalias epitelio ląsteles į ląsteles, turinčias vėžinių ląstelių savybių: padidėjusi proliferacija, migracija, EMT savybių atsiradimas ir apikalinio-bazalinio poliškumo praradimas [102]. S100A8/A9 tarpininkauja ląstelių tarpusavio sąveikoje tarp normalių epitelio ląstelių ir gretimų vėžinių ląstelių, taip skatinant normalių ląstelių perprogramavimą į vėžines ląsteles. Mokslininkai nustatė, kad auginant kartu su vėžinėmis ląstelėmis, normalias epitelio ląsteles ar sukeltiant S100A8/A9 raiškos padidėjimą normaliose epitelio ląstelėse, padidėja pro-



liferacijos aktyvumas, migracija, kolonijų formavimas ir trimačių kultūrų formavimas [103]. Tuo pačiu metu vėžinių ląstelių egzomosos, kurios yra užpildytos miRNR, yra vienas svarbiausių tarpląstelinės sąveikos mechanizmų. Vėžinių ląstelių egzomosos, užpildytos miR-21 ir miR-10b, gali slopinti PTEN (angl. *phosphatase and tensin homolog*, PTEN, fosfotazės ir tenzino homologas) ir HOXD10 (angl. *homeobox D10*, HOXD10) raišką normaliose epitelio ląstelėse, sukeldamos naviko formavimąsi nuo Dicer priklausomu būdu [14]. Epitelio ir krūties vėžinių ląstelių sąveika bėgant laikui keičiasi, pereidama nuo vėžinių ląstelių slopinimo iki jų augimo, invazijos skatinimo, o tai lemia heterogeniškų populiacijų susiformavimą krūties navikuose.

### *Vėžinių ląstelių linijų heterogeniškumas*

Genetiškai homogeniškose ląstelių populiacijose fenotipinis heterogeniškumas dažnai pastebimas *in vitro* ląstelių kultūrose, net jas auginant kontroliuojamoje aplinkoje. Fenotipiniai pokyčiai taip pat vyksta homogeniškoje aplinkoje ir gali būti nulemti ląstelių asimetrinio dalijimosi. Dėl mutacijų vėžinėse ląstelėse, joms besidalijant, susiformuoja ląstelės, kurios skiriasi nuo motininės ląstelės [104]. Krūties vėžinės ląstelės yra vienos iš labiausiai heterogeniškumu pasižyminčių kultūrų, turinčių morfologiškai skirtingus potipius su skirtingais molekuliniais ir biocheminiais žymenimis [105].

Mokslininkai, pastebėję ląstelių linijų heterogeniškumą, norėdami detaliau ištirti šias subpopuliacijas, jas išskirdavo iš ląstelių kultūros. Amaro A. ir kt. naudodami matrigeliu dengtas membranas išskyrė dvi invazyvias ląstelių sublinijas iš MDA-MB-231 ląstelių linijos. Charakterizavę šias sublinijas nustatė, kad jos pasižymi didesniu migraciniu pajėgumu, o genetiniai tyrimai patvirtino šių sublinijų ir pradinės linijos tą pačią genetinę kilmę. Tačiau išskirtose sublinijose nustatyti tam tikrų genų amplifikacijos sutrikimai. Genų raiškos analizė atskleidė citokinų pokyčius. Išskirtos sublinijos turėjo invazinėms ląstelėms būdingų savybių: spartesnis dauginimasis, išaugusi apoptozė, bei padidėjęs atsparumas 5-fluorouracilui ir ifosfamidui. Tuo tarpu atsparumas DOX nepasikeitė, lyginant su pradine MDA-MB-231 linija [106].

Panašų tyrimą atliko Hapach L. A. ir kt., naudodami matrigeliu dengtas membranas, išskyrė dvi, greičiau (MDA+) ir lėčiau (MDA-) migruojančias populiacijas. Nors paprastai manoma, kad migracija yra susijusi su metastazių formavimu, tyrimai *in vivo* su pelėmis atskleidė, kad lėčiau migruojanti populiacija suformavo reikšmingai daugiau metastazių pelėse, lyginant su greičiau migruojančia populiacija. Šis rezultatas sudomino mokslininkus ir todėl buvo atlikta papildomų tyrimų, vertinant abiejų populiacijų plitimą iš pirminio naviko, ląstelių išgyvenamumas kraujotakos sistemoje, šių ląstelių perėjimas iš kraujotakos sistemos į naujus audinius, bei naujų navikų formavimas. Gauti rezultatai parodė sublinijų panašumą, tačiau lėčiau migruojan-

čiai populiacijai, esant kraujotakos sistemoje, susidarė cirkuliuojančių vėžinių ląstelių telkiniai (angl. *circulating tumor cells*, CTC), tai galėjo nulemti lėčiau migruojančių ląstelių gebėjimas suformuoti daugiau naujų metastazių, o RNR sekoskaitos tyrimai parodė, jog lėčiau migruojančios populiacijos ląstelės pasižymi daugiau epitelinių, o greičiau migruojančios – pasižymi daugiau mezenchiminių ląstelių savybėmis. Rezultatai atskleidė, jog migracija nebūtinai susijusi su metastazių formavimo potencialu [107].

Po poros metų, ta pati mokslininkų komanda, pateikė naujus tyrimų rezultatus su šiomis MDA+ ir MDA- populiacijomis. Tyrimas atliktas 3D kultūrose, iš šių populiacijų formuojant sferoidus. Sferoidai suformuoti atskirai iš kiekvienos populiacijos, bei maišant populiacijas santykiu 1:1. Mišriuose sferoiduose buvo stebimas lyderio-sekėjo elgesys, t.y., kai greičiau migruojančių ląstelių sferoido ruožuose, stebimos lėčiau migruojančios ląstelių sankaupos. Tyrimai su pelėmis atskleidė, kad atlikus lėčiau migruojančių ir greičiau migruojančių ląstelių mišinio transplantaciją pelėms, reikšmingai padidėja tolimųjų metastazių formavimas, palyginus su greičiau migruojančių ląstelių populiacija (ankstesnis tyrimas parodė, kad greičiau migruojančios ląstelės suformuoja mažiau metastazių). Rezultatai parodė, kad lėtai migruojančių ląstelių sąveika su greitai migruojančiomis ląstelėmis, padidina ląstelių migraciją ir metastazių formavimo potencialą [108].

Moreira M. P. ir kt., populiacijų iš linijų neišskyrė, tačiau įvertino dviejų – BT-549 ir Hs578T TNBC linijų heterogeniškumą, kultivuojant šias linijas vienasluoksniu ir formuojant sferoidus (3D kultūras). Skirtumai buvo vertinami pritaikant fluorescencinę mikroskopiją, bei tėkmės citometriją. Tyrimų rezultatai atskleidė didelį fenotipinį ir morfologinį heterogeniškumą tarp šių linijų, taip pat tarp šias linijas sudarančių ląstelių subpopuliacijų. Vertinant CD44 ir CD24 receptorius, nustatyta, krūties vėžinio kamieninių ląstelių populiacija atsiranda BT-549 auginant vienasluoksniu ir sferoiduose, bei Hs578T auginant sferoiduose. Pritaikant elektroninę skenuojančią mikroskopiją nustatyta, kad šias linijas auginant sferoiduose pastebima ir daugiau skirtingų subpopuliacijų [109].

Khan G. N. ir kt., tyrimo metu buvo siekiama įvertinti, kaip skiriasi kolonijų suformuotų iš vienos ląstelės atsparumas 5-azacidui (AzaC) ir DOX. Tyrimo metu naudojant daug kartų praskiestas MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijų suspensijas ir jas užsėjant taip jog susiformuotų vienos ląstelės kolonijos. Vėliau šias skirtingas kolonijas veikiant minėtais junginiais. Atlikus kolonijų morfologinę ir imunohistocheminę analizę, nustatyti skirtumai tiek tarp MCF-7, tiek ir tarp MDA-MB-231 sublinijų [110].

Mahmoud L. ir kt., tyrime naudoti MDA-MB-231 sublinijos skyrėsi ląstelių dalijimosi ir migracijos greičiu, bei mitochondrijų mase. Tokios sublinijos maišomos su MDA-MB-231 pradine linija ir formuojami sferoidai. Tyrimo

metu buvo stebima, kaip sublinijos pasižyminčios skirtingomis savybėmis pasiskirsto 3D sferoiduose. Nustatyta, jog nepriklausomai nuo fenotipo, visos sublinijos lokalizavosi sferoidų pakraščiuose. Vertinant šių sferoidų atsparumą PTX, nebuvo nustatyta morfologinių sferoidų pokyčių, tačiau sumažėjo greitai besidalijančių sublinijų dalis. PTX nepaveikė kitų sublinijų gyvybingumo. Tyrime buvo naudojami ir kiti chemoterapiniai vaistai, kurie sukėlė citotoksinį poveikį atskiroms sublinijoms, bet ne visam sferoidui. Tuo tikslu, mokslininkai, sudarė įvairius vaistų derinius su PTX, everolimu, trametinibu. Nustatyta, kad efektyviausias vaistų derinys prieš visus tris fenotipus buvo, PTX ir trametinibas. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad sferoidai sudaryti iš skirtingų fenotipų ląstelių yra atsparūs priešvėžiniams junginiams, tačiau derinant kelis skirtingus junginius galima pasiekti teigiamų rezultatų visai 3D kultūrai [111].

Ląstelių subpopuliacijų tyrimų rezultatai atskleidė, kad net tos pačios ląstelių linijos subpopuliacijos gali skirtis savo biologinėmis savybėmis, tokio- mis kaip migracija ir metastazių formavimas. Šių subpopuliacijų išskyrimas ir charakterizavimas yra būtinas, nes skirtingos ląstelių savybės gali turėti įtakos ligos progresavimui, o šių subpopuliacijų tarpusavio sąveika gali keisti ligos eigą ir sukelti nebūdingą atsparumą gydyme naudojamiems vaistams.

#### *Fenotipiškai skirtingų vėžinių ląstelių tarpusavio sąveika*

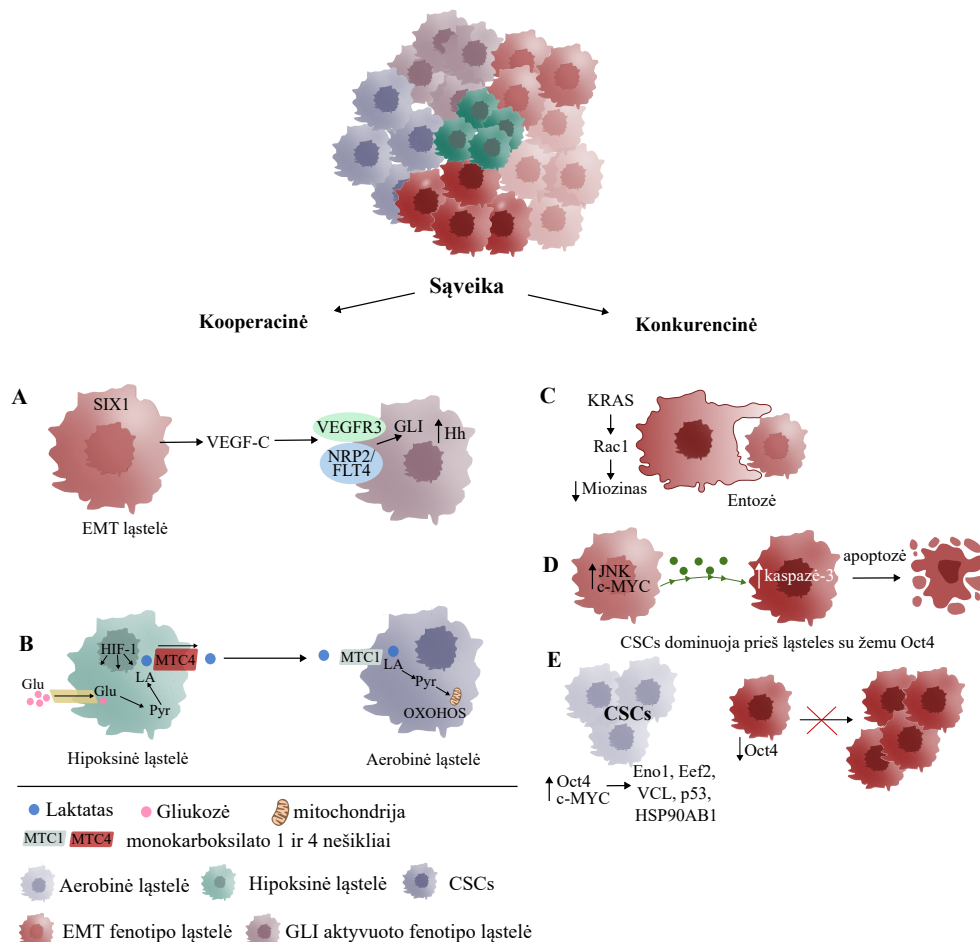
Vėžinių ląstelių kooperacija (bendradarbiavimas) atlieka pagrindinį vaidmenį krūties vėžio atsiradime ir vystymosi procese. Toks ląstelių bendradarbiavimas naudingas vėžinių ląstelių proliferacijai, invazijai ir metastazių formavimui. Įdomu tai, kad nei luminalinės, nei bazalinės ląstelės pačios savaime negali sukelti vėžinio susirgimo. Tyrimo metu, antriniam pelės recipientui perkėlus luminalines arba bazalines ląsteles – navikas nesusiformavo, tačiau abiejų tipų ląstelių perkėlimas kartu paskatino kancerogenezę. Manoma, kad būtent Wnt signalinis kelias, šiame procese atlieka pagrindinį vaidmenį. Karcinomos sudarytos iš luminalinių ir bazalinių ląstelių augimas buvo sutrikdytas blokuojant Wnt signalinį kelią. Bazalinės ląstelės paveikia kitas ląsteles ir suaktyvina Wnt signalą, taip atstatant naviko augimą [112].

DACH-EYA-SIX (angl. *DACH-Eyes absent-sineoculis homeobox homolog*) [113,114] yra svarbus signalinis kelias krūties vėžio vystymesi ir progresavime, reguliuojantis ląstelės ciklą, apoptozę ir DNR atstatymą. Genų raiška šiame signaliniame kelyje yra tiesiogiai susijusi su ligos prognoze ir gali būti terapiniu taikiniu. Pavyzdžiui, kai EMT fenotipo vėžinėse ląstelėse yra aktyvus SIX1 genas, jis aktyvuoja VEGF-C baltymą, kuris gretimose vėžinėse ląstelėse per neuropilino 2 koreptorių (angl. *neuropilin 2*, NRP2) ir Fms susijusių tirozino kinazės 4 receptorių (angl. *Fms-related tyrosine kinase 4*, FLT4), suaktyvina GLI baltymus gretimose epitelio vėžinėse ląstelėse

(1.2.2.1 pav. A) ir taip skatina ląstelių augimą, invaziją ir metastazių formavimą [115].

Glutaminas yra svarbus krūties vėžinių ląstelių metabolizme. Luminalinės ląstelės sintetina glutaminą, kad išgelbėtų nuo jo priklausomas bazinės ląstelės. *In vitro* tyrimuose nustatyta, kad šių ląstelių sąveika vyksta per glutamino simbiozę [116]. Hipoksinės ląstelės gamina laktatą, kurį aerobinės ląstelės naudoja energijos gamybai (1.2.2.1 pav. B). Aerobinės ląstelės, turinčios daug monokarboksilato 1 ir mažai monokarboksilato 4 transporterių (angl. *monocarboxylate transporter*, MCT1/ MCT4), vartoja daug laktato, mažindamos gliukozės suvartojimą, todėl daugiau gliukozės lieka kitoms vėžinėms ląstelėms [117]. Tokio tipo ląstelių sąveika padeda navikams prisitaikyti prie aplinkos pokyčių ir susiformuoja heterogeniškas ląstelių populiacijas.

## Navikas sudarytas iš fenotipiškai skirtingų vėžinių ląstelių



### 1.2.2.1 pav. Fenotipiškai skirtingų ląstelių tarpusavio sąveikos įtaką vėžio vystymuisi

Didesnė JNK (angl. *Jun N-terminal kinase*) raiška vėžinėse ląstelėse siejama su apoptoze (1.2.2.1 pav. D). HUGL-1 baltymo pokyčiai mažina YAP slopinimą, suaktyvina c-MYC transkripciją ir skatina nuo kaspazės-3 priklausomą gretimų ląstelių, apoptozę, todėl vėžinės ląstelės turinčios didelę c-MYC raišką konkuruoja su kitomis ląstelėmis [118].

Oktamerą surišantis transkripcijos veiksnys 4 (angl. *octamer-binding transcription factor 4*, Oct4) reguliuoja vėžio kamieninių ląstelių savaiminį atsinaujinimą ir diferenciaciją, skatindamas naviko augimą ir atsparumą gydymui (1.2.2.1 pav. E). Oct4 ir c-MYC per didelę raišką skatina enolazės 1 (Eno1), karščio šoko baltymo 90  $\alpha$  šeimos b klasės 1 nario (HSP90AB1), eukariotų pailgėjimo faktoriaus 2 (angl. *eukaryotic elongation factor 2*, Eef2),

vinkulino (VCL), ir p53 raišką, kad slopintų gretimas vėžines ląsteles [119]. MYC didesnė raiška koreliuoja su trumpesniu pacientų išgyvenamumu. Plazmocitomos translokacijos 1 varianto (angl. *plasmacytoma variant translocation 1*, PVT1) onkogenas gali slopinti MYC raišką ir gali būti terapiniu taikiniu [120]. KRAS mutacijos suaktyvina Rac1 kelią, padidinant ląstelių mechaninį lankstumą ir skatinant entozę (1.2.2 pav. C), prisideda prie naviko progresavimo [121,122].

Tokia ląstelių, tiek konkurencinė tiek kooperatyvinė, sąveika kinta ir gali pasikeisti priešinga linkme priklausomai nuo naviko aplinkos sąlygų: pH, gliukozės, deguonies koncentracijos ar taikomo gydymo. Navikų heterogeniškumą ir ląstelių sąveiką apima daug įvairių mechanizmų, tame tarpe ir pradinės vėžinės ląstelės diferenciacijos laipsnis, ląstelių plastiškumas ir CSCs reikšmė, genetinė bei daugiafunkcinė vėžinių ląstelių evoliucija [123,124]. Atsižvelgiant į tai, kad krūties vėžinės ląstelės pasižymi ypač dideliu heterogeniškumu, progresuojant ligai, bei susiformuojant gydymo atsparumui, labai svarbu stebėti ir kiekybiškai įvertinti naviko heterogeniškumą ligos diagnozavimo ir gydymo metu. Heterogeniškumas pasireiškia visuose naviko audinių lygmenyse, todėl ir heterogeniškumo vertinimas turi būti atliekamas atitinkamai – keliais lygmenimis.

### 1.3. Doksorubicino transporto į vėžinių ląstelių kultūras tyrimai

Vienas iš pagrindinių iššūkių priešvėžinėje terapijoje yra nepakankamas vaistų transportas į vėžines ląsteles, taip sumažėja vaisto efektyvumas. Priešvėžinių vaistų taikiniai dažniausiai yra ląstelių viduje. Pavyzdžiui, DOX, jungiasi prie topoizomerazės II ir slopina nukleorūgščių sintezę. Kad junginiai veiktų efektyviai šie turi patekti į ląstelės vidų, jog pasiektų savo tikslinius taikinius [17].

Lee J. H. ir kt., atlikę tyrimą su storosios žarnos vėžio ląstelių linija, DLD-1, pritaikant fluorescencinę mikroskopiją nustatė, kad DOX į ląsteles patenka jau po 1 val., o jo kaupimasis stebimas dar 3 val. Tuo tarpu PTX pasižymėjo lėtesniu transportu ir mažesniu junginio kaupimusi ląstelėse. Tyrimo metu taip pat nustatyta, kad DOX ir PTX kaupimasis ląstelėse 2,5-6,3 didesnis, ląsteles inkubuojant trumpiau (1 val.) su didesne junginio koncentracija (50  $\mu$ M) [125]. Tuo tarpu, Xu F. ir kt., vertino DOX ir PTX atsparumo susiformavimą MCF-7 ląstelių linijoje. Tyrimo metu nustatyta, kad ląsteles inkubuojant su PTX, aktyvuojamas NF- $\kappa$ B ir ilgėja PXR suaktyvinimo laikas. Tuo tarpu, inkubuojant ląsteles su DOX, PXR indukcija nesukėlė P-gp aktyvavimo. Be to, NF- $\kappa$ B aktyvavimas lėmė ląstelių atsparumą tiek PTX, tiek DOX [18].

Bontenbal M. ir kt., pritaikydami HPLC, tėkmės citometriją ir fluorescencinę mikroskopiją, įvertino DOX transportą ir pasiskirstymą MCF-7 ląstelėse. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad ląsteles inkubuojant ilgiau (6 val.) su didesne junginio koncentracija (2 µg/ml) DOX transportas į ląsteles buvo efektyvesnis. Tyrime papildomai panaudojant estradiolį, kuris manoma padidina DOX transportą ir užsilaikymą ląstelėse, nebuvo nustatytas geresnis DOX transportas nei vienu iš anksčiau minėtų metodų [126].

Lovitt C. J. ir kt., tyrimo rezultatai parodė, navikų mikroaplinkos įtaką vaistų atsparume. MDA-MB-231 ląstelės auginant 3D kultūrose, matrigeliu padengtuose šulinėliuose, nustatytas didesnis ląstelių atsparumas DOX lyginant su vienasluoksniu auginamomis ląstelėmis. Manoma, kad ląstelių proliferacijos sumažėjimas 3D kultūroje ir ląstelių sukibimas su ECM lėmė atsparumą DOX. Todėl β1-integrino arba panašių baltymų slopinimas gali būti taikomas, kartu naudojant ir DOX. Taip pat, šio tyrimo metu nustatyta, kad DOX transportas 3D kultūrose pastebimas jau po 6 val. inkubacijos su 2 µM DOX [127].

DOX kaupimosi vertinimas ląstelių sferoiduose yra svarbus siekiant suprasti jo terapinį efektyvumą ir toksiškumą gydant vėžį. Svarbu išanalizuoti įvairius metodus, kuriais galima įvertinti DOX kaupimąsi ląstelių sferoiduose, nes išsami šių metodų apžvalga padeda pasirinkti tinkamiausią metodiką, atitinkančią tyrimo tikslus ir turimus išteklius. Taip pat supratimas apie kiekvieno metodo privalumus ir trūkumus leidžia kritiškai vertinti duomenų kokybę ir patikimumą.

Atliekant DOX transporto tyrimus į ląstelių 3D kultūras, tėkmės citometrija ir masių spektrometrija yra du svarbūs metodai kiekybinei analizei. Tėkmės citometrija leidžia greitai ir patogiai atlikti tūkstančių ląstelių analizę, nes DOX yra pats iš savęs fluorescuojantis junginys, tad nereikia papildomų fluorescencinių žymenų. Tai suteikia galimybę identifikuoti fenotipiškai skirtingas ląstelių populiacijas, kurios pasižymi skirtingu DOX kaupimosi lygiu [128]. Vis dėlto šis metodas turi ir trūkumų: norint atlikti analizę, reikia suskaidyti sferoidus į atskiras ląsteles, o tai gali paveikti ląstelių gyvybingumą ir DOX kaupimąsi. Be to, tėkmės citometrija nesuteikia erdvinės informacijos apie DOX pasiskirstymą sferoiduose, o ilgalaikis lazerio naudojimas gali sukelti fotobalinimo efektą, mažinantį DOX fluorescenciją. Kitas metodas – masių spektrometrija [130], dažnai naudojama kartu su skysčių chromatografija, yra ypatingai tikslus ir jautrus metodas, leidžiantis aptikti net mažiausias DOX koncentracijas. Šis metodas reikalauja sferoidų ir ląstelių suardymo, tačiau jis leidžia tiksliai ir kiekybiškai įvertinti DOX kiekį ląstelėse, analizuoti kelis skirtingus junginius ir aptikti DOX metabolitus. Vizualizuoti ir įvertinti DOX pasiskirstymą tiek atskirose ląstelėse, tiek ir ląstelių sferoiduose, naudojama fluorescencinė arba konfokalinė mikroskopija. Šie metodai leidžia

tiksliai ir kokybiškai įvertinti DOX koncentraciją ląstelėse ir suteikia išvalgų apie vaistų pasiskirstymą ir įsisavinimo dinamiką. Konfokalinę mikroskopiją patogu taikyti analizuojant 3D ląstelių kultūras, nes skenuoti galima įvairiame sferoidų gylyje. Naudojant konfokalinę mikroskopą DOX transporto į sferoidus tyrimuose galima „pamatyti“ gilesnius sferoidų sluoksnius, tai leidžia vizualizuoti ir nustatyti vaisto pasiskirstymą per visą sferoido struktūrą [132]. Taip pat galima įvertinti DOX gradientą sferoide, įvertinti vaisto veiksmingumą ir nustatyti DOX transportą į skirtingus sferoido dalis priklausomai nuo susiformavusių aplinkos sąlygų sferoide (hipoksijos, maistinių medžiagų prieinamumo) [134].

TNBC heterogeniškumo ir fenotipiškai skirtingų populiacijų sąveikos tyrimai yra labai svarbūs siekiant suprasti kokią įtaką gydymui ir ligos progresavimui turi skirtingų ląstelių sąveika. Tokie tyrimai gali būti pritaikomi personalizuotam pacientų gydymui. Įvertinus navikų fenotipinę sudėtį, bei nustačius skirtingų populiacijų, bei jų derinių atsaką į įvairius gydymui naudojamus vaistus, pacientams būtų galima paskirti veiksmingiausią preparatą, taip kuo mažiau žalos padarant visam organizmui.



## 2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Reagentai, priemonės, aparatūra

#### 2.1.1. Ląstelių linijos

Žmogaus trejopai neigiamo krūties vėžio linija MDA-MB-231 ir CRL-1502 žmogaus odos fibroblastai (HF) įsigyti iš ATCC (Manasasas, JAV). MDA-MB-231 ir HF ląstelių linijos buvo kultivuojamos DMEM mitybinėje terpėje. Terpė buvo papildyta 1 proc. antibiotikų tirpalu (10 000 VV/ml penicilino, 10 mg/ml streptomicino) bei 10 proc. FBS (HF ląstelių linijai 20 proc. FBS). Į MDA-MB-231 ląstelių mitybinę terpę papildomai buvo pridėta: 1 µg/ml insulino, 1 proc. minimaliųjų būtinųjų terpės ne pagrindinių aminorūgščių (MEM NEAA), 1 proc. natrio piruvato. Terpės bei jų priedai įsigyti iš Gibco (Karlsbandas, JAV). Ląstelės auginamos inkubatoriuje kur palaikoma pastovi 37 °C temperatūra, 5 proc. CO<sub>2</sub> koncentracija ir 95 proc. drėgmė.

#### 2.1.2. Reagentai

DOX hidrochloridas (> 98 proc., Abcam, Kembridžas, JK), PTX (99,5 proc., Alfa Aesar, Haverhill, JAV), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas (Sigm-Aldrich Co., ≥ 97 proc.), 4',6-diamidino-2-fenilindolo dihidrochloridas (DAPI, Thermo Scientific, Valthamas, JAV), kobalto (II) chloridas (bevandenis, 97 proc., Carl Roth GmbH, Vokietija), dimetil-sulfoksidas (DMSO, Sigma-Aldrich Co., ≥ 99,5 proc.), vandenilio chloridas (37 proc., Sigma-Aldrich Co.), paraformaldehido tirpalas be metanolio (PFA, 16 proc., Thermo Scientific), nanodalelės *NanoShuttle* (Greiner bio-one, Kremsmunsteris, Austrija), buferinis fosfatinis druskų tirpalas, pH 7,4 (angl. *phosphate-buffered saline*, PBS, Gibco), *ProLong Gold antifade* reagentas (Invitrogen, Karlsbadas, JAV), imersinis aliejus fluorescencijai (Carl Roth GmbH), tripsino analogas *TrypLE Express* (Gibco), pirminiai antikūnai: anti-CD133 triušio polikloninis antikūnas (Abcam, Kembridžas, Jungtinė Karalystė), antrinis antikūnas: ožkos prieš triušio pirminį AlexaFluor 594 (Life technologies, Oregonas, JAV).

#### 2.1.3. Priemonės

Ląstelių kultivavimui ir tyrimams naudotos priemonės – mėgintuvėliai (15 ml, 50 ml tūrio), centrifuginiai mėgintuvėliai, šaldymo mėgintuvėliai, serologinės pipetės (15 ml, 10 ml tūrio), pipečių antgaliai (10 µl, 100 µl, 1000 µl), 6, 12, 24 ir 96 šulinėlių plokštelės, 10 cm skersmens ląstelių kultūrų lėkštelės, 25 cm<sup>2</sup> ląstelių auginimo indeliai, objektiniai ir dengiamieji

stikleliai, Pastero pipetės Carl Roth GmbH (Vokietija). Labai mažo prilipimo 96 šulinėlių plokštelės, magnetinės plokštelės įsigytos iš kompanijos Corning (JAV). Laboratorinis pincetas įsigytas iš kompanijos Bochem Instrumente GmbH (Vokietija). Švirkštiniai filtrai (porų skersmuo 0,22 μm, polietersulfono (PES) membrana) bei švirkštai įsigyti iš kompanijos GVS Filter Technology (Jungtinė Karalystė). Ląstelių skaičiavimui naudota Neubauer kamera Blaubrand, Sigma-Aldrich (JAV).

#### **2.1.4. Laboratorinė įranga**

Tyrimams naudota aparatūra: centrifuga *Eppendorf Centrifuge 5702 R (Eppendorf)*, invertuotas fluorescencinis mikroskopas Olympus IX73 (*Olympus*, Tokijas, Japonija), konfokalinis mikroskopas Olympus FLUOVIEW FV1000 (*Olympus*, Tokijas, Japonija).

#### **2.1.5. Programinė įranga**

*Microsoft Office Excel 2021 versija 2405* (Redmondas, JAV), *ImageJ 1.53 K versija* (Nacionalinis sveikatos institutas, Betesda, JAV), *IBM SPSS Statistics versija 29.0* (Niujorkas, JAV).

### **2.2. Tyrimo metodikos**

#### **2.2.1. MDA-MB-231 ląstelių sublinijų išskyrimas**

Ląstelių sublinijos išskirtos iš žmogaus trejopai neigiamo krūties vėžios linijos MDA-MB-231, pritaikant daugkartinį ląstelių suspensijos skiedimą. 200 μl ( $2 \times 10^4$  ląst./ml) ląstelių suspensijos supilta į 96 šulinėlių plokštelės A1 šulinėlį, o visa plokštelė, naudojant 8 kanalų mikropipetę, užpildyta ląstelių mitybine terpe (100 μl/šul.). Naudojant vienkanalę mikropipetę atliktas pirmasis daugkartinis skiedimas, 100 μl ląstelių suspensijos perkeltas iš A1 į B1, tuomet iš B1 į C1 ir t.t. Iš paskutiniojo H1 šulinėlio 100 μl praskiestos ląstelių suspensijos pašalinta ir papildomai pridėta po 100 μl ląstelių mitybinės terpės į A1–H1 šulinėlius, galutinis praskiestos suspensijos tūris 200 μl/šul. Naudojant 8 kanalų mikropipetę atliktas antrasis daugkartinis skiedimas, po 100 μl praskiestos ląstelių suspensijos perkelta iš pirmo stulpelio (A1–H1) į antrąjį stulpelį (A2–H2), skiedimas atliktas visoje plokštelėje, o iš paskutinio stulpelio (A12–H12) po 100 μl praskiestos ląstelių suspensijos pašalinta. Į šulinėlius pridėta po 100 μl ląstelių mitybinės terpės, kad visuose šulinėliuose galutinis tūris būtų 200 μl/šul. Plokštelė perkeliama į ląstelėms skirtą inkubatorių, 37°C, 5 proc. CO<sub>2</sub>, 95 proc. drėgmės.

Po 9 dienų susiformavusios 23 skirtingos ląstelių kolonijos iš šulinėlių A1, A5, A9, A11, B1, B7, B9, C1, C3, C6, C7, D1, D8, E1, E5, E7, F1, F5, F7,

G1, G5, H1 ir H2 buvo perkeltos į ląstelėms auginti skirtus indus. Ląstelių kolonijoms buvo priskirti kodai pagal tai, iš kurio šulinėlio jos buvo paimtos.

### **2.2.2. CD133 receptoriaus kiekio nustatymas imunofluorescenciniu metodu**

Ląstelės buvo pasėtos į 24 šulinėlių plokšteles ant kolagenu padengtų dengiamųjų stiklelių (skersmuo 13 mm) po 40 000 ląst./šul. (tūris šulinėlyje – 500 μl) ir inkubuotos 24 val. ląstelėms auginti skirtame inkubatoriuje. Po inkubacijos ląstelės fiksuojamos 30 minučių 4 proc. paraformaldehido tirpalu. Ląstelių membranos pralaidinamos inkubuojant 10 minučių su 0,1 proc. Triton X-100 tirpalu. Baltymų blokavimas atliekamas 10 minučių panaudojant blokavimo buferį (10 ml PBS su 0,2 ml FBS ir 0,02 g BSA). Imunologinis dažymas atliekamas dviem etapais, ląsteles inkubuojant su pirminiu (1 val., anti-CD133, 1:50), o vėliau su antriniu (Alexa Fluor 594, 1:1000) antikūnu. Branduoliai dažomi DAPI 10 min. Po kiekvieno etapo stikleliai praplaunami PBS tirpalu (2 kartus). Ant objektinio stiklelio buvo užlašinama nuo šviesos apsaugančio aliejaus ir ant jo uždedamas dengiamasis stiklelis su ląstelėmis. Ląstelės fotografuotos konfokaliu mikroskopu Olympus FLUOVIEW FV1000 (Olympus, Tokijas, Japonija), 600× didinimu, naudojant DAPI ir TRITC filtrus, bei DIC. Nuotraukos išanalizuotos *ImageJ 1.53K versijos* programa (Merilandas, JAV). Kiekvienoje grupėje išanalizuota ne mažiau nei 20 atsitiktinai pasirinktų ląstelių, atskirai ląstelėse ir branduoliuose išmatuotas santykinis fluorescencijos intensyvumas.

### **2.2.3. Sublinijų ląstelių migracijos skirtumų vertinimas pritaikant „žaidos“ gijimo metodą**

Ląstelės užsėtos į 24 šulinėlių plokštelę apie  $2 \times 10^4$  ląst./šul. (terpės tūris 500 μl/šul.). Plokštelė su ląstelėmis inkubuota 24 val. inkubatoriuje. Po 24 val. ląstelės sudarė tolygų vienasluoksnį. Naudojant 100 μl mikropipetės antgalį švelniai braukiant per vidinį šulinėlio paviršių ląstelių vienasluoksnyje yra padaroma „žaidza“. Nusiurbus ląstelių terpę (pašalinamos atkibusios ląstelės), ląstelės praplaunamos PBS tirpalu ir į šulinėlius pripilama šviežios ląstelių mitybinės terpės. Suformuota „žaidza“ fotografuojama toje pačioje šulinėlio vietoje kas 24 val. tris dienas, „žaidzos“ ploto pokyčiai po 0, 24, 48, 72 val. analizuoti *ImageJ* programa (*1.53K versija*).

#### 2.2.4. Ląstelių sublinijų atsparumo priešvėžiniams junginiams tyrimas naudojant MTT redukcijos testą ląstelių vienasluoksnyje

Ląstelių atsparumas priešvėžiniams junginiams buvo nustatytas pritaikant MTT redukcijos testą. Priešvėžinių junginių DOX ir PTX skiedimai atlikti terpėje prieš pat eksperimentą. DOX ir PTX ištirpinti DMSO ir skiedžiamimi ląstelių mitybinėje terpėje, kad DMSO galutinė koncentracija neviršytų 0,2 proc. Į 96 šulinėlių plokštelę ląstelės užsėjama  $5 \times 10^3$  ląst./šul. ir inkubuojama 24 val. Po inkubacijos terpė pakeičiama šviežia su skirtingomis tiriamųjų junginių koncentracijomis. Kaip teigiama kontrolė naudota mitybinė terpė su 0,2 proc. DMSO tirpalu be ląstelių, kaip neigiama kontrolė naudota mitybinė terpė su 0,2 proc. DMSO tirpalu su ląstelėmis. Plokštelė su ląstelėmis inkubuojama 72 val., po inkubacijos terpė pašalinama ir į kiekvieną šulinėlį supilama po 20  $\mu$ l 5 mg/ml vandeninio MTT tirpalo ir inkubuojama 3 val. Po to terpė pašalinama, susiformavę formazano kristalai ištirpinami 50  $\mu$ l DMSO. Absorbicija išmatuota mikroplokštelių skaitytuvu 570 ir 630 nm bangos ilgiuose.  $EC_{50}$  vertės apskaičiuojamos naudojant Hilo lygtį (1) [135].

$$E = E_{\max} \frac{[D]^n}{[EC_{50}]^n + [D]^n} \quad (1)$$

$E$  – efektas, stebimas esant tam tikrai vaisto koncentracijai,  $E_{\max}$  – maksimalus efektas pasiektas su vaistu,  $[D]$  – vaisto koncentracija,  $EC_{50}$  – vaisto koncentracija sukelianti 50 proc. maksimalaus efekto,  $n$  – Hilo koeficientas, apibūdinantis kreivės nuolydį.

#### 2.2.5. Ląstelių dvigubėjimo laiko nustatymas

Ląstelių dvigubėjimo laiko įvertinimui ląstelės užsėtos į keturias 24 šulinėlių plokšteles ( $8 \times 10^3$  ląst./šul.) ir inkubuojamos inkubatoriuje. Po 24, 48, 72 ir 96 val. paruošiamos ląstelių suspensijos ir centrifuguojamos 1000 aps./min 4 min., suspenduotos 200  $\mu$ l ląstelių mitybinėje terpėje suskaičiuotos panaudojant Neubauerio kamerą (hemocitometrą). Ląstelių skaičiavimai atliekami kas 24 val. keturias dienas. Ląstelių dvigubėjimo laikas apskaičiuojamas panaudojant formulę (2) [136].

$$DT = \frac{(\ln 2) \times (t_2 - t_1)}{\ln \left( \frac{c_2}{c_1} \right)} \quad (2)$$

$c_1, c_2$  – ląstelių skaičius, esamu  $t_1, t_2$  – laiku.

### **2.2.6. Ląstelių sąveikos įtaka atsparumui priešvėžiniams junginiams ląstelių vienasluoksnyje (2D kultūrose)**

Ląstelių sąveikos įtakos tyrimams ląstelių linijos ir sublinijos buvo maišomos tarpusavyje trimis skirtingais būdais: I grupę sudarė MDA-MB-231 ir sublinijų (D8, F5, H2) deriniai, kur ląstelės buvo maišomos su HF santykiu 1:1; II grupę sudarė sublinijų deriniai su MDA-MB-231 ir HF, santykiu 1:1:2; III grupę sudarė sublinijų deriniai maišant jas tarpusavyje su HF, santykiu 1:1:2. Maišant vėžines ląsteles su HF, HF kiekis kiekviename derinyje visada sudarė pusę viso ląstelių derinio. Tokie ląstelių deriniai užsėti į 96 šulinėlių plokšteles ( $5 \times 10^3$  ląst./šul.) ir inkubuoti 24 val. inkubatoriuje. Po inkubacijos pakeista ląstelių mitybinė terpė su tiriamaisiais junginiais DOX (0,5  $\mu\text{M}$ ) ir PTX (0,05  $\mu\text{M}$ ) ir plokštelės vėl gražintos į inkubatorių. Po 72 val. inkubacijos ląstelių derinių atsparumas priešvėžiniams junginiams įvertintas pritaikant MTT redukcijos testą, aprašytą 2.2.4 skyrelyje. Išanalizuoti gauti absorbcijos intensyvumo duomenys ir apskaičiuotas ląstelių derinių gyvybingumas procentais.

### **2.2.7. Ląstelių sąveikos įtaka atsparumui priešvėžiniams junginiams sferiduose (3D kultūrose)**

Ląstelių sferoidai suformuoti naudojant magnetinį *3D Bioprinting* metodą [137]. Į 6 šulinėlių plokštelę užsėjamos ląstelės ir inkubuojamos inkubatoriuje, po 24 val. inkubacijos pridedama nanodalelių NanoShuttle ir inkubuojama 8 val. Po inkubacijos paruošiamos ląstelių suspensijos ir atliekami ląstelių linijų ir sublinijų maišymai (analogiškai 2.2.6 poskyriui) po 4000 ląst./šul. išpilstyta į labai mažo prikibimo 96 šulinėlių plokšteles. Taip paruoštos plokštelės su ląstelėmis uždėtos ant magnetinės plokštelės ir inkubuojama 48 val. Po inkubacijos mitybinė terpė pakeista šviežia terpe su 0,5  $\mu\text{M}$  DOX arba 0,05  $\mu\text{M}$  PTX (kontrolė – 0,2 proc. DMSO). Sferoidai fotografuojami invertuotu fluorescentiniu mikroskopu Olympus IX73 (*Olympus*, Tokijas, Japonija) kas 24 val. 12–14 dienų, terpė su junginiais keičiama kas 48 val. Sferoidų dydžio pokyčiai vertinami naudojant *ImageJ* programą *1.53K versiją*.

### **2.2.8. Doksorubicino citotoksiškumo įvertinimas**

DOX citotoksiškumą ląstelėms svarbu įvertinti prieš atliekant DOX transporto į ląsteles tyrimus. Tikslas yra nustatyti, ar naudojamos junginio koncentracijos ir taikomas inkubacijos laikas su DOX reikšmingai nepaveikia ląstelių gyvybingumo, kad atliekant DOX transporto tyrimą būtų išvengiama jo citotoksinio poveikio. Tyrimas atliktas analogiškai 2.2.4 poskyryje aprašytai MTT redukcijos testo metodikai. Trumpai: ląstelės užsėtos į 96 šulinėlių

plokštelę, inkubuojamos 24 val., po inkubacijos mitybinė terpė pakeista nauja terpe su 1 ir 5  $\mu\text{M}$  DOX tirpalais. DOX poveikis ląstelių gyvybingumui įvertintas po 120 ir 240 min. Absorbicija matuojama automatiniu mikroplokštelių skaitytuvu 570 ir 630 nm bangų ilgiuose. Ląstelių gyvybingumas apskaičiuojamas procentais.

### **2.2.9. Doksorubicino transporto į vienasluoksniu auginamas ląsteles tyrimas**

Ląstelės pasėjamos į 24 šulinėlių plokštelę ant kolagenu padengtų stiklelių ( $4 \times 10^4$  ląst./šul.). Po 48 val. mitybinė terpė pakeista nauja su 1 ir 5  $\mu\text{M}$  DOX tirpalais arba 0,2 proc. DMSO (neigiama kontrolė). Ląstelės inkubuojamos 30, 60, 120 arba 240 minučių. Po inkubacijos ląstelės kelis kartus praplaunamos PBS, fiksuojamos 20 min. 4 % PFA 10 min. dažomi ląstelių branduoliai (DAPI). Ant objektinio stiklelio buvo užlašinama nuo šviesos apsaugančio aliejaus ir ant jo uždedamas dengiamasis stiklelis su ląstelėmis. Ląstelės fotografuotos konfokaliniumi mikroskopu Olympus FLUOVIEW FV1000 (*Olympus*, Tokijas, Japonija),  $600\times$  didinimu, naudojant DAPI ir TRITC filtrus bei DIC. Nuotraukos išanalizuotos *ImageJ* programa 1.53K versija (Merilandas, JAV). Kiekvienoje grupėje išanalizuota ne mažiau 20 atsitiktinai pasirinktų ląstelių. Ląstelėse ir branduoliuose išmatuotas santykinis fluorescencijos intensyvumas. Hipoksijos atveju visas eksperimentas atliekamas analogiškai. Hipoksijos sąlygų palaikymui 24 val. iki eksperimento į mitybinę terpę papildomai pridedama 200  $\mu\text{M}$  kobalto (II) chlorido.

### **2.2.10. Doksorubicino transporto į sferoidus tyrimas**

Sferoidams suformuoti pritaikytas ankščiau aprašytas metodas (2.2.7 skyriuje). Ląstelės inkubuotos su nanodalelėmis NanoShuttle 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO<sub>2</sub> turinčioje aplinkoje 8 val. Po inkubacijos paruošti MDA-MB-231 sublinijų mišiniai su HF ląstelėmis (santykis 1:2). Ląstelių suspensijos išpilstomos po 100  $\mu\text{l}$  ( $4 \times 10^3$  ląst./šul.) į labai mažo prikibimo 96 šulinėlių plokšteles. Plokštelės su ląstelėmis uždėtos ant magnetinių plokštelių ir inkubuojamos 48 val., kol susiformuoja sferoidai. Po inkubacijos plokštelės nuimtos nuo magnetinių plokštelių, o mitybinė terpė pakeista šviežia terpe, kurioje buvo 10  $\mu\text{M}$  DOX tirpalas arba 0,2 proc. DMSO (neigiama kontrolė). Sferoidai inkubuojami 1, 2, 4, 8 val., po inkubacijos praplaunami PBS ir 24 val. fiksuojami 4 proc. PFA tirpalu. DOX transportas į sferoidus įvertintas fotografuojant sferoidus invertuotu fluorescentiniu mikroskopu Olympus IX73 (*Olympus*, Tokijas, Japonija). Nuotraukos išanalizuotos panaudojant *ImageJ* programą (1.53K versija), įvertinant DOX fluorescencijos

intensyvumą sferoiduose santykiniais vienetais. Sferoidų skaičius grupėje svyravo nuo 10 iki 15 sferoidų.

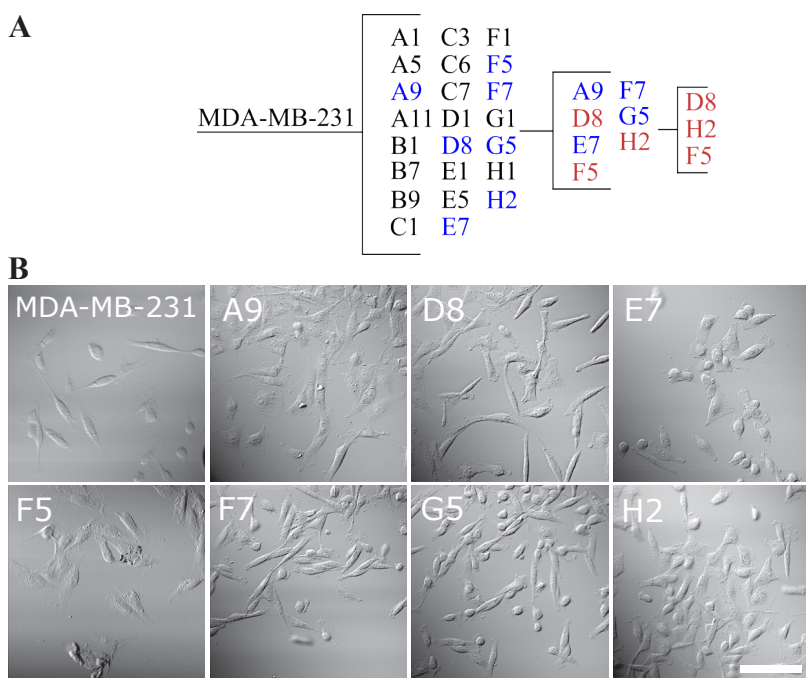
### **2.2.11. Statistinė analizė**

Statistinė analizė atlikta naudojant *IBM SPSS Statistics 29.0.1.0* programinę įrangą. Visi eksperimentai buvo atlikti mažiausiai trimis nepriklausomais matavimais. Gautos vertės nurodytos kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis. Statistiniam patikimumui įvertinti naudota vienkryptė ANOVA analizė, panaudojant *post hoc* Tukey testą. Skirtumai laikyti statistiškai patikimais, kai  $p < 0,05$ .

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Fenotipiškai skirtingų sublinijų išskyrimas ir jų charakterizavimas

MDA-MB-231 ląstelių linija pasižymi labai didele genetinė, fenotipine įvairove, o šios linijos sublinijose (subpopuliacijose/subklonuose) galima aptikti tam tikrų panašumų į TNBC potipių ląsteles [138]. Siekiant įvertinti skirtingų sublinijų savybes ir jų tarpusavio sąveikos įtaką vaistų atsparumui, pritaikant daugkartinį ląstelių suspensijos skiedimo metodą, iš MDA-MB-231 trejopai neigiamos ląstelių linijos buvo išskirtos 23 sublinijos (3.1.1 pav. A). Literatūroje yra duomenų, kad išskirtų sublinijų morfologiniai požymiai yra paveldimi ir gali būti naudojami kaip skiriamasis požymis [139]. Todėl šios sublinijos atrinktos remiantis morfologiniais ląstelių skirtumais, suformuotų kolonijų tankiu, dauginimosi greičiu. Kai kurios iš atrinktų sublinijų lėtai augo arba augimas visai sustojo. Todėl įvertinus visus veiksnius tolimesniems ląstelių charakterizavimo tyrimams atrinktos 7 sublinijos (3.1.1 pav. A, mėlyna spalva). Atlikus ląstelių charakterizavimą, buvo įvertintos visų sublinijų savybės ir tolimesniems sąveikos tyrimams atrinktos trys (3.1.1 pav. A, raudona spalva), labiausiai besiskiriančios tarpusavyje.



#### 3.1.1 pav. MDA-MB-231 ląstelių linijos heterogeniškumas

A – išskirtos sublinijos ir jų atrankos schema; B – morfologiniai atrinktų sublinijų ir MDA-MB-231 ląstelių linijos skirtumai. Skalė atitinka 50  $\mu\text{m}$ .

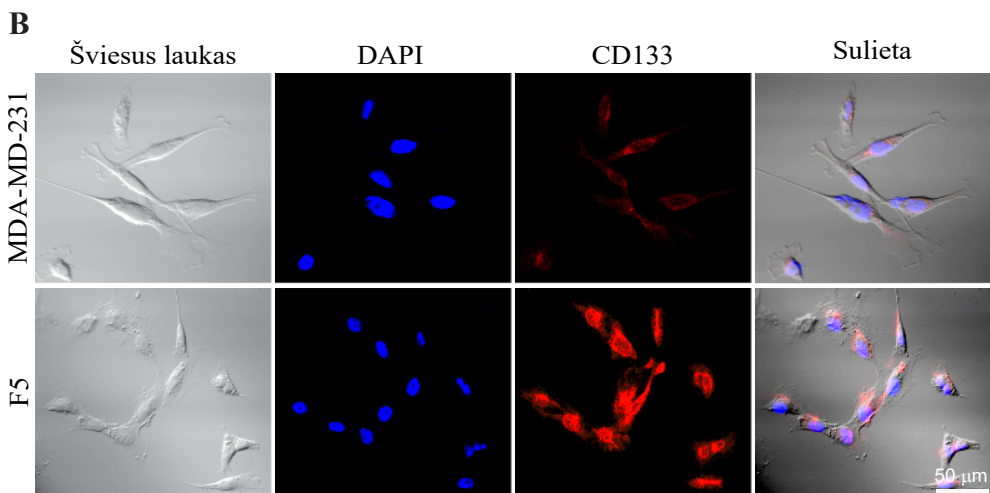
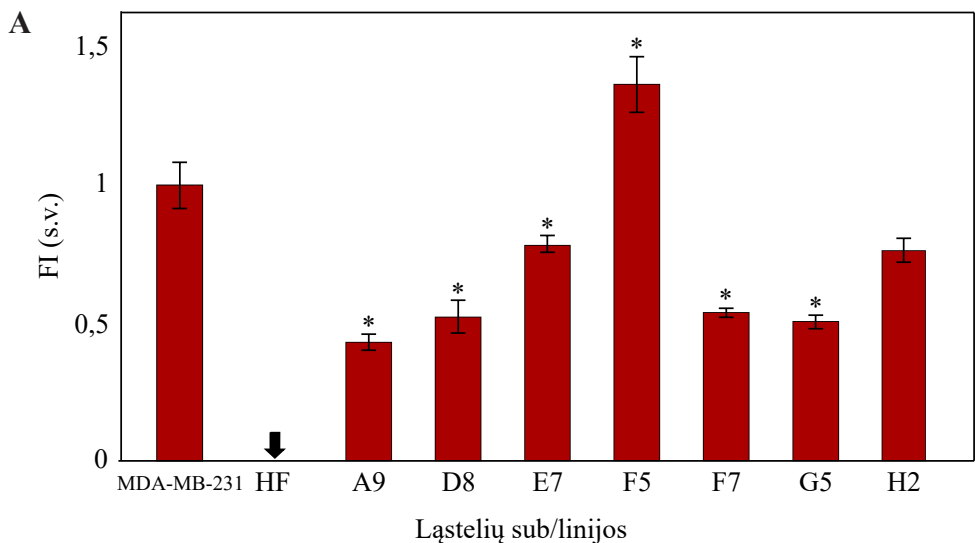


Lyginant su MDA-MB-231 ląstelių linija, **F5** ir **E7** sublinijų ląstelės yra trumpesnės, daugiakampės formos. **F5** sublinijos ląstelių suformuota kolonija auga glaudžiai, kompaktiškai, ir kultivuojant visų tyrimų metu ši savybė neišnyko. **D8** ir **F7** kolonijų ląstelės yra pailgesnės ir auga ne taip glaudžiai kaip **F5** sublinijos ląstelės. **H2** sublinija iš visų labiausiai išsiskiria ovalia (trumpa) ląstelių forma, bei formuojamos kolonijos auga nekompanktiškai (išsibarsčiusios). **A9** ir **G5** sublinijų kolonijos buvo tarpinis variantas iš minėtų sublinijų ir išvaizda priminė pirminę (MDA-MB-231) ląstelių liniją.

Įvertinę sublinijų morfologinius skirtumus toliau buvo atliktas CD133 receptoriaus nustatymas išskirtose ląstelių sublinijose. CD133 susijęs su vėžio kamieninėmis ląstelėmis, kurios gali turėti didesnę atsparumą gydymui ir gebėjimą sukelti naviko atsinaujinimą. Nustatant CD133 lygį, galima atskleisti skirtumus tarp ląstelių populiacijų ir įvertinti, ar jose yra ląstelių, pasižyminčių kamieninėmis savybėmis, tai gali turėti svarbią įtaką gydymo strategijai ir prognozei.

#### *CD133 receptoriaus raiškos nustatymas*

CD133 yra antigenas dar žinomas kaip promininas-1, tai yra glikoproteinas, kurį koduoja *PROM1* genas [140]. CD133 receptorių turinčios ląstelės pasižymi kamieninių ląstelių savybėmis: savaiminiu ląstelių atsinaujinimu, diferenciacija, greita proliferacija ir atsparumu standartiniam chemoterapiniam gydymui [141]. CD133 raiška dažniausiai sutrinka įvairių tipų vėžinėse ląstelėse, taip pat ir TNBC ir *BRCA-1* navikų ląstelėse [142]. Kol kas tiksliai CD133 funkcija vėžinėse ląstelėse nėra iki galo aiški, bet padidėjusi šio receptoriaus raiška vėžinėse ląstelėse yra siejama su agresyvesnio fenotipo vėžinėmis ląstelėmis ir jų atsparumu chemoterapiniams vaistams, dėl pasikeitusio PI3K/Akt signalinio kelio krūties vėžinėse ląstelėse [143]. Nustatyta, kad PI3K/Akt signalinio kelio aktyvavimas kelių skirtingų tipų vėžinėse ląstelėse, tame tarpe ir krūties vėžinėse ląstelėse, suaktyvina ląstelių proliferaciją, invaziją į aplinkinius audinius ir lemia daugiavaistį atsparumą ir metastazių formavimą [144,145]. Taip pat nustatyta, kad PI3K/Akt signalinio kelio aktyvavimas skatina EMT, todėl sustiprėja TGF- $\beta$  receptoriaus signalo perdavimas, kuris savo ruožtu palaiko hiperaktyvią PI3K/Akt signalų sklaidą ir kartu sukelia krūties vėžio metastazavimą [145]. Padidėjusi CD133 raiška vėžį inicijuojančiose ląstelėse nustatyta kelių tipų navikuose, taip pat ir krūties CSCs [144]. Todėl pirmiausia buvo įvertinti CD133 receptoriaus raiškos skirtumai sublinijų ląstelėse (3.1.2 B pav.).



### 3.1.2 pav. CD133 raiška imunofluorescenciniu metodu

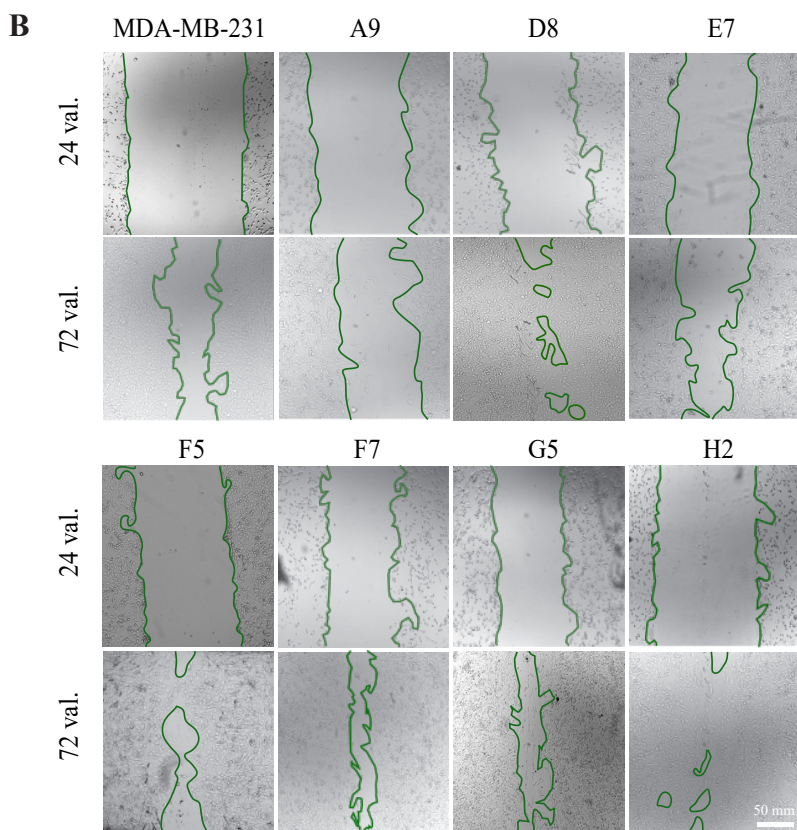
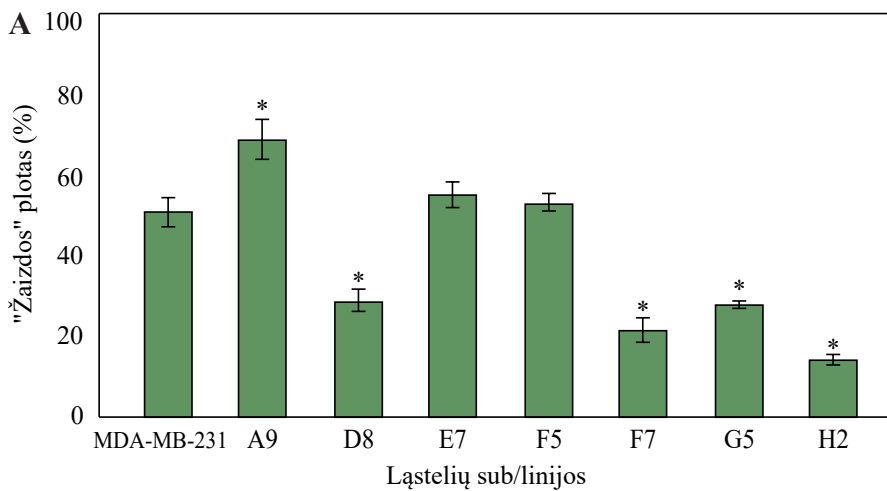
A – kiekybiniai CD133 receptoriaus raiškos skirtumai tarp ląstelių linijų ir sublinijų; B – ląstelės buvo pažymėtos naudojant anti-CD133 polikloninį antikūną (pažymėtas AlexaFluor 594 antriniu antikūnu, raudona spalva). Branduoliai dažyti DAPI (mėlyna spalva). \*  $p < 0,05$  lyginant su kontrole,  $n = 3$ , skalė atitinka 50  $\mu\text{m}$ .

Buvo pasirinktas imunofluorescencinis ląstelių dažymo metodas, kuris leidžia pamatyti CD133 receptorių lokalizaciją ląstelėse. Nustatyta, kad didžiausia CD133 receptoriaus raiška yra F5 sublinijos ląstelėse, lyginant su kitų sublinijų ląstelėmis (3.1.2 B pav.). CD133 raiška MDA-MB-231 ląstelių linijos populiacijose pirmą kartą buvo nustatyta 1997 metais [146], nuo to laiko ne viena mokslininkų grupė aptiko MDA-MB-231 ląstelių linijoje popu-

liacijas, pasižyminčias teigiama CD133 raiška. Mokslininkai taip pat pastebėjo, kad šiose populiacijose pasikeitęs ląstelių augimas, migracija, invazija ir atsparumas vaistams, lyginant su pagrindine ląstelių linija (MDA-MB-231) [140,147,148]. CD133 raiška **F5** sublinijos ląstelėse yra 31 proc. didesnė lyginant su MDA-MB-231 ląstelių linija (3.1.2 A pav.). Ląstelės, kuriose nustatyta padidėjusi CD133 raiška, pasižymi didesniu sukibimo plotu [147]. Šią savybę pastebėjome ir mūsų auginamoje **F5** sublinijoje, kur kultivuojant ląsteles, **F5** sublinijos ląstelių tripsinizacija užtrukdavo dvigubai ilgiau nei kitų sublinijų. Taip pat CD133 teigiamos ląstelės pasižymi mažesniu proliferacijos ir migracijos greičiu [149]. Kitose mūsų išskirtose sublinijose: **A9**, **D8**, **E7**, **F7**, **G5** ir **H2**, CD133 raiška nustatyta nuo 21 iki 57 proc. mažesnė, lyginant su MDA-MB-231 ląstelių linija. Įvertinus CD133 receptoriaus raišką minėtose sublinijose ir nustatčius statistškai reikšmingų skirtumų, toliau atlikome ląstelių migracijos tyrimus.

### 3.2. Sublinijų ląstelių gebėjimas migruoti

Vėžinių ląstelių migracija vienas iš pagrindinių požymių, rodančių vėžinės ligos progresavimą, ypač metastazių kontekste. Toks vėžinių ląstelių plitimas lemia tolimųjų metastazių susidarymą ir antrinių navikų susiformavimą toli nuo pirminio naviko. Šis procesas yra pagrindinė mirtingumo nuo vėžinių susirgimų priežastis. Vėžinių ląstelių migracija yra kompleksinis procesas, kurį gali lemti keletas skirtingų mechanizmų: EMT, chemotaksis, ląstelių tarpusavio sukibimo sumažėjimas, užląstelinio užpildo pokyčiai, genų mutacijos [150]. Tyrimo metu pritaikėme „žaizdos gijimo“ metodą, kuris yra vienas iš dažniausiai naudojamų metodų siekiant įvertinti ląstelių migraciją *in vitro* tyrimuose. Atlikus tyrimą nustatyta skirtinga ląstelių migracija tarp atskirų sublinijų (3.2.1 B pav.). Įvertinus žaizdos ploto pokyčius po 72 val. palyginome gautus rezultatus tarp sublinijų (3.2.1 A pav.).



### 3.2.1 pav. Ląstelių migracijos skirtumai tarp sublinijų ir MDA-MB-231 ląstelių linijos

A – MDA-MB-231 ląstelių linijos ir sublinijų „žaizdų“ plotai procentais, po 72 val. B – „žaizdos“ ploto pokyčiai po 24 ir 72 val.; \*  $p < 0,05$  lyginant su kontrole,  $n = 3$ , skalė atitinka 200  $\mu\text{m}$ .

Lėčiausia migracija pasižymėjo **A9** sublinijos ląstelės. „Žaizdos“ plotas po 72 val. buvo 19 proc. didesnis lyginant su MDA-MB-231 „žaizdos“ plotu (3.2.1 A pav.). Greičiausia migracija pasižymėjo **H2** sublinijos ląstelės, pastarųjų „žaizdos“ plotas po 72 val. buvo 38 proc. mažesnis lyginant su MDA-MB-231 ląstelių linijos „žaizdos“ plotu. Taip pat greitesne migracija pasižymėjo ir **D8**, **F7** ir **G5** sublinijų ląstelės. „Žaizdos“ plotas po 72 val. buvo 20 – 30 proc. mažesnis lyginant su MDA-MB-231 „žaizdos“ plotu. **E7** ir **F5** sublinijų ląstelių „žaizdos“ plotas statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo MDA-MB-231 „žaizdos“ ploto. Rezultatai rodo, kad išskirtos sublinijos skiriasi nuo pirminės MDA-MB-231 ląstelių linijos.

Mokslininkai išskiria sublinijas iš MDA-MB-231 ląstelių linijos, norėdami ištirti skirtingų populiacijų savybes. Pardillos ir kt. išskyrė tris skirtingas ląstelių sublinijas iš MDA-MB-231 ląstelių linijos nenustatė statistiškai reikšmingų migracijos skirtumų tarp minėtų klonų [151]. Hershey ir kt. vertino skirtingų klonų išskirtų iš MDA-MB-231 ląstelių linijos migraciją bei migracijos greitį ir reikšmingų skirtumų taip pat nebuvo aptikta. Ši mokslininkų grupė nustatė, kad ląstelių migracijos greičiui įtakos turi populiacijos tankis, bei ląstelių tarpusavio sąveika per ląstelių metabolitus ir augimo veiksnius [152]. Atliktas Amaro ir kt. tyrimas parodė, kad MDA-MB-231 ląstelių linijoje egzistuoja bent dvi sublinijos, kurios pasižymi didesniu gebėjimu migruoti lyginat su MDA-MB-231 ląstelių linija [106]. Nustatyta, kad išvesta DOX atspari MDA-MB-231 ląstelių linijos ląstelių migracija buvo 4 kartus didesnė lyginant su laukinio fenotipo MDA-MB-231 linijos ląstelėmis [153].

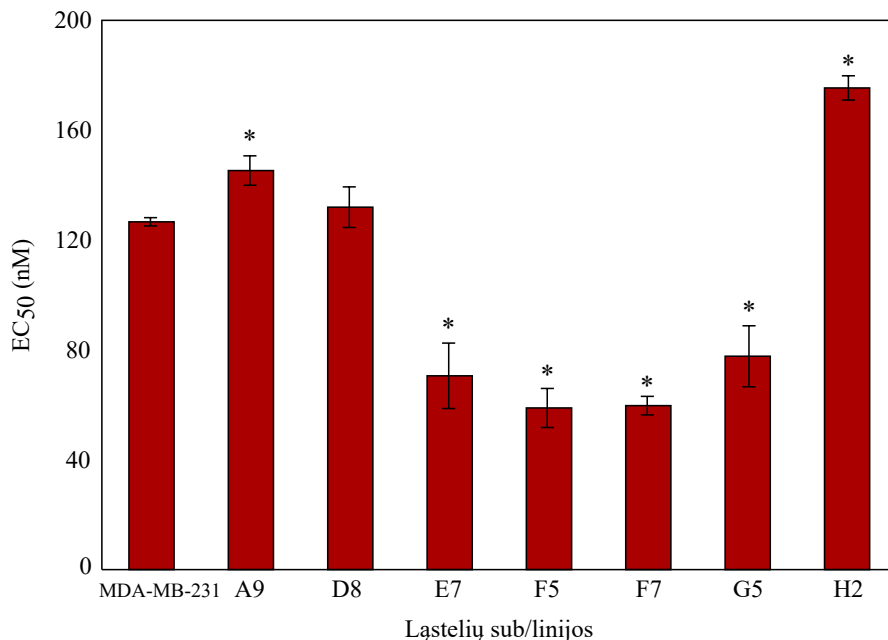
### **3.3. Ląstelių atsparumas priešvėžiniams junginiams doksorubicinui ir paklitakseliui**

#### *Atsparumas doksorubicinui*

DOX yra vienas dažniausiai vartojamų priešvėžinių vaistų gydant vėžinius susirgimus, tame tarpe ir trejopai neigiamą krūties vėžį [153]. DOX priklauso antraciklinų klasei, kuris įsiterpia į dvigrandę DNR molekulę, slopina topoizomerazės II veikimą ir lemia laisvųjų radikalų susidarymą, to rezultatas – stabdomas ląstelių dauginimasis ir ląstelės žūsta. Gydant vėžinius susirgimus dažnai susiduriama su ląstelių atsparumu gydyme vartojamiems vaistams. Mechanizmai lemiantys atsparumą vaistams labai įvairūs: padidėjęs vaistų metabolizmas, išaugęs DNR pažaidų taisymas, genų mutacijos, amplifikacijos, epigenetiniai pakitimai, o taip pat ir fenotipiškai skirtingų navikų populiacijų sąveika [59]. Todėl svarbu įvertinti ir mūsų išskirtų sublinijų atsparumą priešvėžiniams junginiams taip surenkant dar daugiau informacijos apie kiekvienos sublinijos fenotipines savybes.

Sublinijų, išskirtų iš MDA-MB-231, atsparumas priešvėžiniams junginiams buvo įvertintas pritaikant MTT gyvybingumo testą. Ląstelių gyvybingumas įvertintas po 72 val. inkubacijos su DOX. Nustatyta, kad **H2** sublinijos ląstelės yra apie 1,5 karto atsparesnės DOX, lyginant su MDA-MB-231 ląstelių linija (3.3.1 pav.). Po 72 val. **H2** sublinijos ląstelių  $EC_{50}$  vertė yra  $175,4 \pm 4,4$  nM, tuo tarpu MDA-MB-231 ląstelių  $EC_{50}$  vertė yra  $126,7 \pm 1,6$  nM. **A9** sublinijos ląstelės, 1,15 karto mažiau atsparios DOX lyginant su MDA-MB-231 ir **A9**  $EC_{50}$  lygi  $145,2 \pm 5,6$  nM. Nustatyta, kad **E7**, **F5** ir **G5** sublinijų ląstelės yra du kartus jautresnės DOX ( $EC_{50}$  po 72 val.  $77,7 \pm 11,2$  nM ir  $55,9 \pm 7,2$  nM, atitinkamai) lyginant su MDA-MB-231 ląstelių linija. Statistiškai reikšmingo skirtumo **D8** sublinijos ląstelėms nebuvo nustatyta lyginant su MDA-MB-231 ląstelių linija.

Įdomu tai, kad **A9** sublinijos ląstelės migravo lėčiausiai, tačiau buvo 1,15 karto atsparesnės DOX nei MDA-MB-231 ląstelių linija. Šis sublinijos atsparumas gali būti siejamas su lėta migracija, kuri taip pat siejama ir su ląstelių dauginimusi. DOX paveikia greitai besidauginančias ląsteles [154]. Tuo tarpu **H2** sublinijos didžiausias atsparumas gali būti susijęs su šios sublinijos gebėjimu greitai migruoti. Ląstelės, kurios greičiau migruoja, pasižymi agresyvesniu ir atsparesniu vaistams fenotipu [155].



### 3.3.1 pav. DOX poveikis ląstelių gyvybingumui

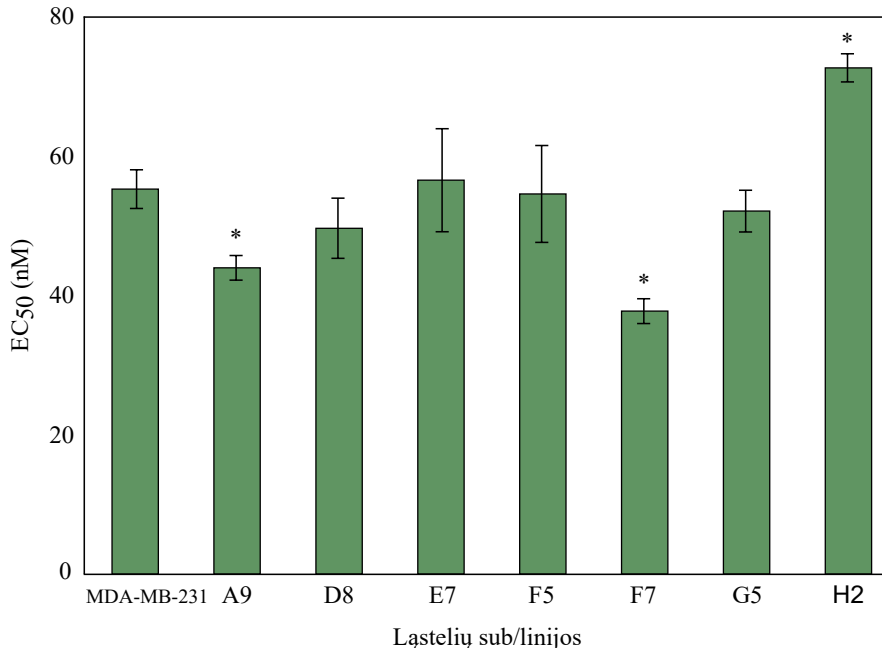
$EC_{50}$  vertės nustatytos po MDA-MB-231 ir sublinijų 72 val. inkubacijos su DOX, \*  $p < 0,05$  lyginant su kontrole,  $n = 3$ .

Literatūroje yra duomenų, kad  $EC_{50}$  vertės MDA-MB-231 ląstelėms yra  $160 \pm 0,02$  nM [156], o tai yra koncentracija artima **H2** sublinijos ląstelėms. Mokslininkai yra nustatę ir žemesnę MDA-MB-231 ląstelių linijos  $EC_{50}$  vertę – 140 nM [157]. Paramanantham ir kt. sukūrė DOX atsparią MDA-MB-231 liniją. Tyrimų metu nustatyta, kad DOX atspari ląstelių linija yra daugiau nei 2 kartus ( $EC_{50} = 14,3$   $\mu$ M) atsparesnė DOX lyginant su laukiniu fenotipu ( $EC_{50} = 6,5$   $\mu$ M) [153].

#### *Atsparumas paklitakseliui*

PTX, kaip ir DOX, yra dažniausiai vartojamų vaistų gydant TNBC. Patekęs į ląsteles PTX jungiasi prie ląstelių citoskeleto elementų - mikrovamzdelių, juos stabilizuoja, trukdo jų išsivyniojimo ir depolimerizacijos procesams, o tai stabdo ląstelių dalijimąsi [158].

Tyrimuose su PTX gauti panašūs rezultatai – **H2** sublinija pasižymėjo didžiausiu (1,3 karto lyginant su MDA-MB-231) atsparumu PTX (3.3.2 pav.),  $EC_{50}$  po 72 val. lygus  $72,6 \pm 2,1$  nM, tuo tarpu MDA-MB-231 ląstelių linijos  $EC_{50}$  lygus  $55,2 \pm 2,8$  nM. **A9** ir **F7** sublinijų ląstelės buvo jautriausios PTX poveikiui.  $EC_{50}$  po 72 val. atitinkamai buvo  $43,9 \pm 1,8$  nM ir  $46,9 \pm 4,5$  nM. Statistiškai reikšmingumo atsparumo PTX nenustatyta **D8**, **E7**, **F5** ir **G5** sublinijų ląstelėse.



#### **3.3.2 pav. PTX poveikis ląstelių gyvybingumui**

$EC_{50}$  vertės nustatytos po MDA-MB-231 ir sublinijų 72 val. inkubacijos su PTX, \*  $p < 0,05$  lyginant su kontrole,  $n = 3$ .

Kenicer ir kt. tyrimo rezultatai rodo, kad MDA-MB-231 ląstelių linijai  $EC_{50}$  po 72 val. inkubacijos su PTX lygus 1,6 nM. Ši mokslininkų komanda išvedė dvi MDA-MB-231 ląstelių linijas atsparias 25 ir 50 nM PTX. Minėtų linijų  $EC_{50}$  vertės buvo 19–56 kartų didesnės (29,61-89,98 nM atitinkamai) lyginant su laukinio tipo MDA-MB-231 ląstelių linija [159].

Apibendrinant galime daryti išvadą, kad **H2** sublinijos atsparumas PTX yra panašaus lygio kaip ir Kenicer ir kt. išvestų atsparių PTX ląstelių. Tai rodo, kad išskirta **H2** sublinija „natūraliai“ turi padidėjusį atsparumą PTX ir reikšmingai skiriasi nuo MDA-MB-231 ląstelių linijos.

Didžiausiu atsparumu tiek DOX tiek PTX pasižymėjo **H2** sublinijos ląstelės. Jautriausios DOX poveikiui buvo **F5** ir **F7**, o PTX - **F7** sublinijų ląstelės.

### *Išskirtų sublinijų pasirinkimas ląstelių sąveikos tyrimams*

Charakterizuojant visas iš MDA-MB-231 ląstelių linijos išskirtas sublinijas įvertinome CD133 raišką, ląstelių gebėjimą migruoti bei sublinijų atsparumą DOX bei PTX. Apibendrinant gautus rezultatus, pasirinkome tris labiausiai išsiskiriančias sublinijas (3.3.1 lentelė) ląstelių sąveikos tyrimams.

#### **3.3.1 lentelė.** *Sąveikos tyrimams pasirinktų sublinijų palyginimas*

Savybė	<b>D8</b>	<b>F5</b>	<b>H2</b>
CD133 raiška	50 % (-)	31 % (+)	26 % (-)
Gebėjimas migruoti	20 % (+)	5 % (-)	38 % (+)
Atsparumas DOX	4,2 % (NS)	54 % (-)	39 % (+)
Atsparumas PTX	10 % (NS)	1,3 % (NS)	32 % (+)

„-“ – mažiau už kontrolę; „+“ – daugiau už kontrolę; NS – nėra statistiškai reikšmingo skirtumo. Kontrolė: MDA-MB-231 ląstelių linija.

**F5** sublinijos ląstelių išvaizda skyrėsi nuo MDA-MB-231 ląstelių. Ląstelės sudarė kompaktiškas, glaudaus kontakto kolonijas, būdinga ląstelių forma daugiakampė, tačiau nepailga, kaip MDA-MB-231. Šios sublinijos ląstelėms buvo būdinga didesnė CD133 receptoriaus raiška tarp visų tirtų sublinijų (31 proc. didesnė nei MDA-MB-231). **F5** sublinijos atsparumas PTX nebuvo statistiškai reikšmingas, tačiau **F5** sublinijos ląstelės buvo 54 proc. jautresnės priešvėžiniam junginiui DOX nei MDA-MB-231 ląstelių linija. **F5** sublinijos ląstelės migravo lėčiau nei MDA-MB-231 ląstelių linijos ląstelės. CD133 raiška **D8** sublinijos ląstelėse buvo mažiausia iš visų sublinijų ir 50 proc. mažesnė nei MDA-MB-231 ląstelių linijoje. **D8** sublinijos migracijos greitis buvo apie 20 proc. didesnis nei MDA-MB-231 ląstelių linijos. Trečioji sublinija, **H2**, skyrėsi nuo kitų sublinijų. CD133 raiška, **H2** ląstelių sublinijoje ji buvo 26 proc. mažesnė nei MDA-MB-231 ląstelių linijoje. **H2** sublinijos ląstelės buvo 38 proc. atsparesnės DOX ir 31 proc. atsparesnės PTX lyginant

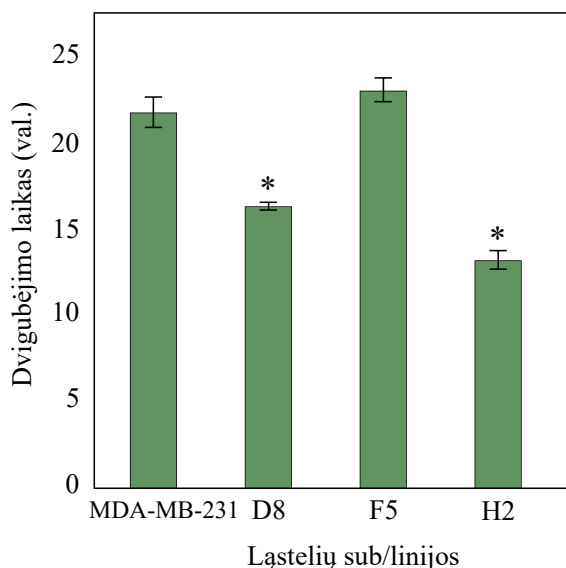


su MDA-MB-231 ląstelių linija. **H2** sublinijos ląstelės migravo greičiau nei MDA-MB-231 ląstelių linijos ląstelės.

### 3.4. Ląstelių dvigubėjimo laiko nustatymas

Pasirinkę tris labiausiai išsiskiriančias MDA-MB-231 sublinijas (**D8**, **F5**, **H2**), nustatėme kiek laiko reikia, kad ląstelių populiacija padvigubėtų esant optimalioms augimo sąlygoms. Šis testas suteikia informacijos apie ląstelių proliferacijos greitį, taip pat yra svarbus veiksnys atliekant tyrimus su priešvėžiniais junginiais, kurie veikia sparčiai besidalijančias ląsteles [160].

Nustatytas MDA-MB-231 ląstelių linijos ląstelių dvigubėjimo laikas buvo apie 20 val. (3.4.1 pav.).



#### 3.4.1 pav. Ląstelių linijų ir sublinijų dvigubėjimo laikas

\*  $p < 0,05$  lyginant su MDA-MB-231,  $n = 3$ .

Išskirtų sublinijų dvigubėjimo laikas skyrėsi nuo pradinės, MDA-MB-231 ląstelių linijos dvigubėjimo laiko (apie 20 val.). **F5** sublinijos ląstelių dvigubėjimo laikas buvo 21 val., **D8** sublinijos – 15 val., o **H2** sublinijos – 12 val. Apibendrinant galima teigti, kad **D8** ir **H2** sublinijų ląstelių dvigubėjimo laikas buvo statistiškai reikšmingai trumpesnis lyginant su MDA-MB-231 ląstelių linija.

Mokslinės literatūros duomenimis MDA-MB-231 ląstelių linijos dvigubėjimo laikas dažniausiai varijuoja tarp 25 ir 30, kitur iki 48 val. [127,161,162]. Tačiau iki šiol nėra duomenų, kad MDA-MB-231 sublinijose/klonuose būtų

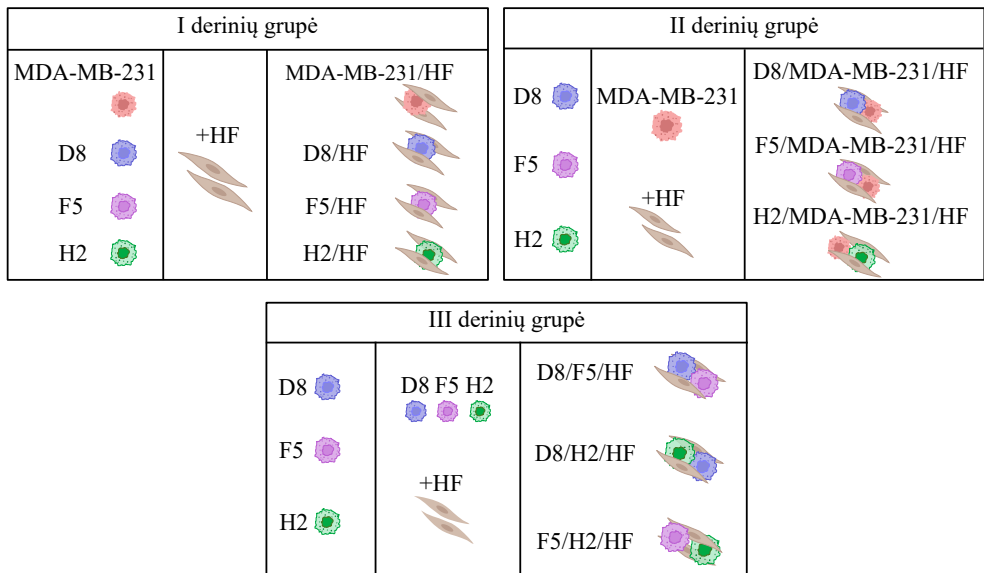
nustatytas 12–15 valandų dvigubėjimo laikas. Tai rodo, kad mūsų tyrimo metu pavyko išskirti sublinijas, gebančias greitai dalintis, ir tai gali lemti šių sublinijų didesnę atsparumą priešvėžiniams junginiams. Tai dažnai pastebima ir kituose moksliniuose tyrimuose, kur priešvėžiniams junginiams atsparių ląstelių proliferacija yra greitesnė [163,164].

Tyrimo metu gauti rezultatai padės interpretuoti sublinijų skirtingą atsaką į junginių poveikį, bei įvertinti ląstelių tarpusavio sąveikos rezultatus.

### **3.5. Trejopai neigiamo krūties vėžinių ląstelių sąveikos įtaka jų atsparumui vaistams ląstelių vienasluoksnyje**

#### *Ląstelių sąveika 2D kultūrose*

Pastaruoju metu mokslininkai aktyviai tiria navikų heterogeniškumą, tiek pacientų navikuose, tiek ir komercinėse ląstelių linijose. Kiekvieno tyrimo metu aptinkama skirtingų ląstelių populiacijų tame pačiame navike/linijoje. Daugeliu atvejų išskyrę skirtingas sublinijas jas charakterizuoja, įvertina įvairius (genetinius, epigenetinius, žymenų) pokyčius [108,109]. Analizuojant mokslinę literatūrą aptikta daug informacijos tiriant fenotipiškai skirtingų sublinijų sąveiką su navikų mikroaplinkos ląstelėmis, tačiau trūksta tyrimų, kuriuose būtų tiriama fenotipiškai skirtingų vėžinių ląstelių tarpusavio sąveika. Nors moksliniuose straipsniuose kalbama apie tokių sublinijų/subpopuliacijų/klonų sąveikos svarbą, mūsų duomenimis panašių tyrimų iki šiol nebuvo atlikta. Fenotipiškai skirtingos **D8**, **F5**, **H2** ląstelių sublinijos buvo pasirinktos norint įvertinti ląstelių tarpusavio sąveiką *in vitro* tyrimuose. Žinoma, kad ląstelių tarpusavio ryšys yra labai svarbus naviko vystymosi ir progresavimo metu, nes leidžia vėžinėms ląstelėms „perprogramuoti“ naviko mikroaplinką, o vėžinių ląstelių tarpusavio sąveika prisideda prie ligos progresavimo ir atsparumo gydyme naudojamiems vaistams [165]. Ląstelių tarpusavio sąveikos tyrimų eksperimentams sudarėme tris skirtingas ląstelių derinių grupes (3.5.1 pav.).



3.5.1 pav. Ląstelių linijų ir sublinijų deriniai ląstelių sąveikos tyrimams

**Pirmąją derinio grupę** sudarė išskirtų sublinijų (**D8, F5, H2**) ir MDA-MB-231 sumaišymas su HF ląstelėmis (santykiu 1:2) (3.5.1 pav. I derinių grupė). HF (fibroblastai) naudojami dėl keleto aspektų: tyrimų metu nustatėme, kad suformuoti sferoidus tik iš MDA-MB-231 ląstelių nepavyko, o papildomai pridėjus HF ląstelių sferoidus pavyko suformuoti. HF ląsteles, taip pat fibroblastai yra vienas pagrindinių komponentų navikų mikroaplinkoje ir turi didelę įtaką vėžinių ir TME ląstelių sąveikoje.

**Antroji derinių grupė:** ląstelių sublinijos buvo sumaišomos su MDA-MB-231 ir HF ląstelių linijų ląstelėmis (santykis 1:1:2) (3.5.1 pav. II derinių grupė). MDA-MB-231 ląstelių naudojimas deriniuose buvo svarbus tam, kad įvertinti konkrečių sublinijų (**D8, F5, H2**) sąveikos skirtumus su visomis MDA-MB-231 populiacijomis. Šie deriniai buvo sudaryti siekiant nustatyti sublinijų sąveiką su pradine MDA-MB-231 ląstelių linija ir jų sąveikos įtaką vaistų atsparumui. MDA-MB-231 ląstelių linija labai heterogeniška ir pasižymi didele gentine ląstelių įvairove [166]. Maišant sublinijų ląsteles su MDA-MB-231 ląstelių linijos ląstelėmis buvo siekiama kiekybiškai įvertinti sublinijų sąveiką su galimai kitomis MDA-MB-231 linijos populiacijomis.

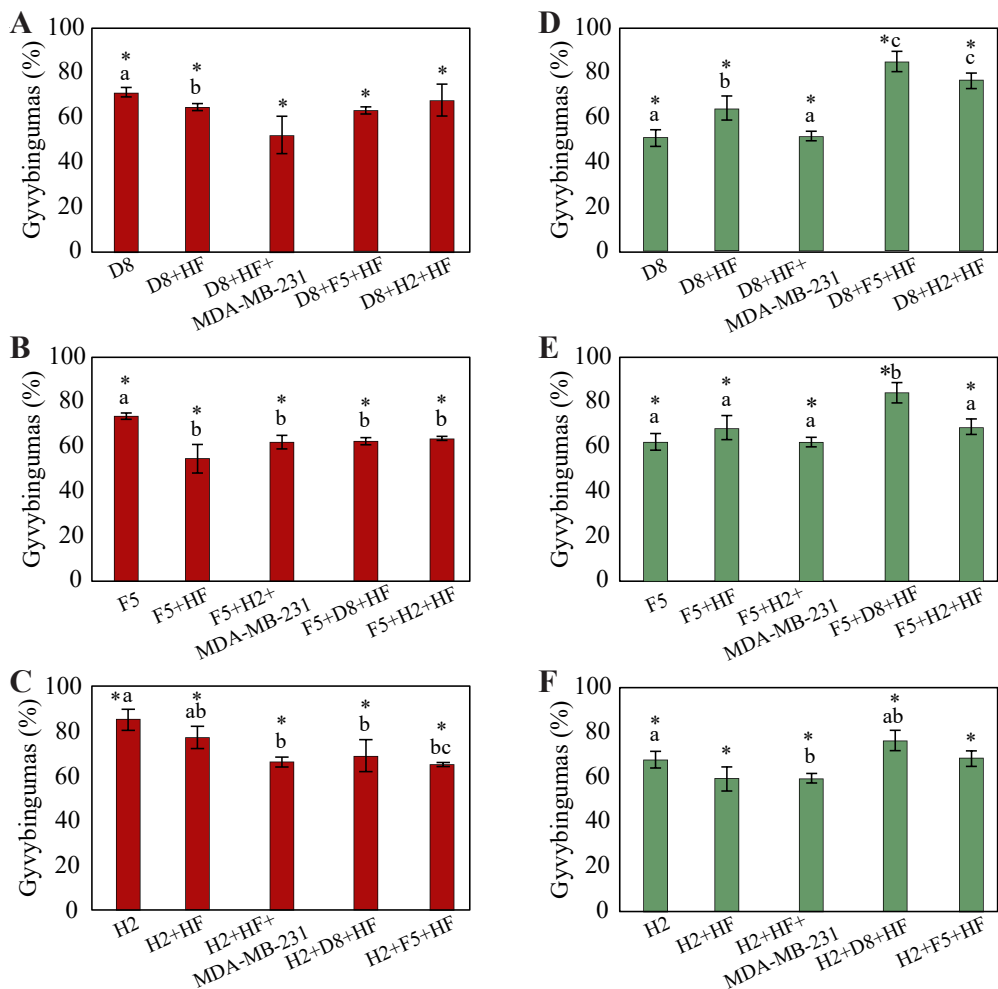
**Trečiąją derinių grupę** sudarė ląstelių sublinijų maišymas tarpusavyje, pridėdant 2 dalis HF ląstelių (3.5.1 pav. derinys III). Maišant sublinijas tarpusavyje buvo siekiama įvertinti, kaip kiekvienas fenotipas paveiks sublinijų savybes, ar jos skirsis nuo rezultatų, kai sublinijos buvo tiriamos vienos – ne deriniuose.

Ląstelių sąveikos tyrimams visuose ląstelių deriniuose naudojome HF ląsteles norint imituoti navikui artimesnę mikroaplinką. Fibroblastų ir vėžinių ląstelių sąveika vyksta per interleukino 6 (IL-6) ir chemokino 7 ligando (CXCL7) sekreciją [167]. Fibroblastai išskiria IL-6, kuris atlieka svarbų vaidmenį vėžinių ląstelių chemoterapinio atsparumo susiformavime (DOX ir PTX) [168], aktyvuoja ląstelių proliferaciją ir CXCL7, kuris atsakingas už ląstelių „savęs atsinaujinimo“ funkciją [169]. Šie citokinai (IL-6 ir CXCL7), bei CXCL12, FGF, HGF, IGF, PDGF, Wnt, MMPs, VEGF [170] dalyvauja aktyvuojant PI3K/Akt (skatina ląstelių proliferaciją, invaziją ir daugiavaistį atsparumą [144]) ir NF- $\kappa$ B (dalyvauja vėžinių ląstelių proliferacijos procese, angiogenezėje [171]) signalinius kelius. Tuo pačiu, fibroblastai išskiria chemokino 1 ligandą (CXCL1) ir IL-8, kurie skatina vėžinių ląstelių ABCG2 raiškos padidėjimą, tai lemia padidėjusį DOX pašalinimą [172]. Į naviko mikroaplinką fibroblastų išskiriamas transformuojantis augimo veiksnys  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) aktyvuoja signalinius kelius, kurie atsakingi už ląstelių epitelinį-mezenchiminį perėjimą (EMT), tai prisideda prie atsparumo DOX susiformavimo [170].

Tyrimų metu panaudotos DOX (0,5  $\mu$ M) ir PTX (0,05  $\mu$ M) koncentracijos buvo vienodos visoms derinių grupėms. Junginių koncentracijos pasirinktos remiantis ankstesnių mūsų tyrimų metu nustatyta  $EC_{50}$  verte. Ląstelių sąveikos tyrimams 2D modelyje pasirinkome MTT testą, kuris leido įvertinti junginių poveikį ląstelių gyvybingumui.

Atlikę tyrimą nustatėme, kad po 72 val. inkubacijos su 0,5  $\mu$ M DOX pavienėms **D8**, **F5** ir **H2** sublinijoms (3.5.2 pav. A, B ir C) gyvybingumas sumažėjo tik 15 – 28 proc., tai rodo šių sublinijų atsparumą DOX. **F5** ir **H2** sublinijų ląsteles derinant su HF ar MDA-MB-231, ar šias sublinijas derinant tarpusavyje, gyvybingumas sumažėja 24 – 44 proc. Tai rodo, kad šių sublinijų ląstelių sąveika su HF, MDA-MB-231 ar sublinijas derinant tarpusavyje, sumažina atsparumą DOX. **D8** sublinijos ląsteles derinant su kitų tipų ląstelėmis statistiškai reikšmingo atsparumo DOX nenustatyta.

Priešingi rezultatai nustatyti atlikus tyrimus su PTX (3.5.2 pav. D, E ir F). Sublinijų ląsteles derinant su HF arba MDA-MB-231 arba sublinijas derinant tarpusavyje, atsparumas PTX padidėja nuo 18 iki 34 proc. lyginant su sublinijų atsparumu nesant deriniuose.



### 3.5.2 pav. Ląstelių atsparumas priešvėžiniams junginiams DOX ir PTX

Ląstelių gyvybingumas procentais po 72 val. inkubacijos su DOX (raudona) arba PTX (žalia). Deriniai su: D8 sublinija (A, D); F5 sublinija (B, E); H2 sublinija (C, F); \*  $p < 0,05$  lyginant su kontrole (kontrolinė grupė – ląstelės inkubuotos su 0,2 proc. DMSO). Stulpeliai pažymėti skirtingomis raidėmis rodo statistškai reikšmingus skirtumus tarp tų pačių grupių,  $n = 3$ .

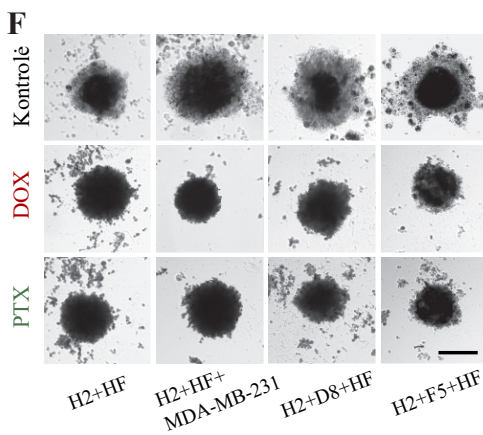
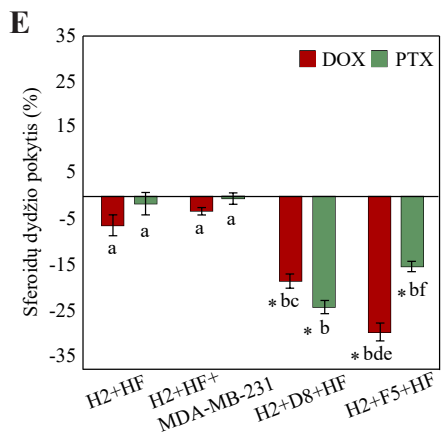
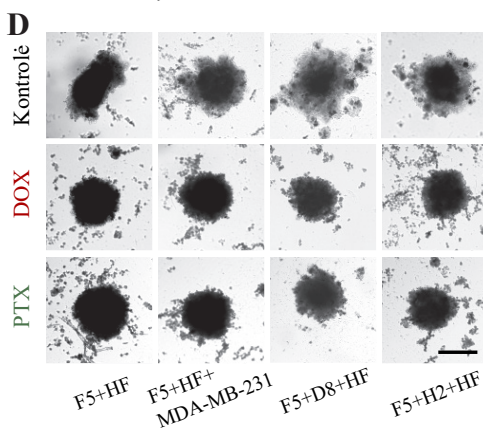
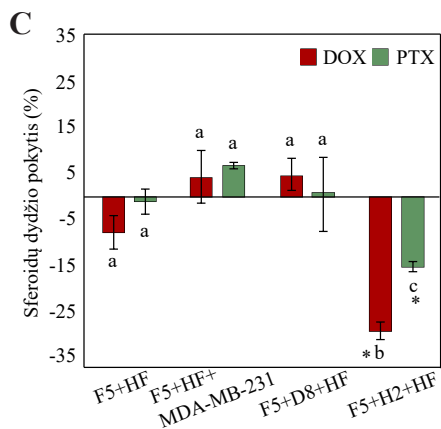
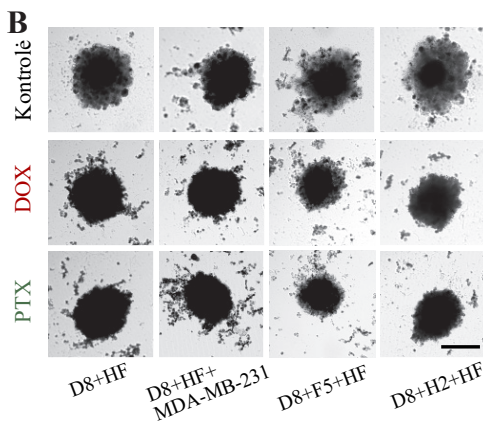
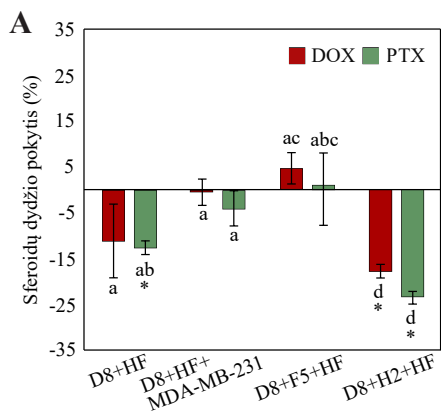
Nustatyta, kad vėžinių ląstelių sąveika su fibroblastais pakeičia vėžinių ląstelių atsparumą priešvėžiniams junginiams. Sublinijų ląstelių-fibroblastų-DOX ir H2-fibroblastų-PTX deriniai buvo jautresni priešvėžiniams junginiams, nei šias sublinijas paveikus priešvėžiniais vaistais ne deriniuose (3.5.2 pav. A, B ir F). Tuo tarpu F5-fibroblastai-PTX ir D8-fibroblastai-PTX deriniai buvo atsparesni junginių poveikiui lyginant su ląstelių gyvybingumu ne deriniuose. Vėžinių ląstelių-fibroblastų-vaistų deriniai buvo tiriami ir Landry

ir kt. darbe [12], jie pastebėjo, kad ląstelių derinių atsparumas vaistams priklauso nuo vėžinių ląstelių ir fibroblastų fenotipo. Keletas mokslinių tyrimų taip pat patvirtino, kad vėžinių ląstelių ir fibroblastų deriniuose sumažėja ląstelių atsparumas vaistams [173,174], nors daugeliu atvejų vėžinių ląstelių ir fibroblastų sąveika padidina ląstelių atsparumą vaistams [13,175].

#### *Ląstelių sąveika 3D kultūrose*

Šiuo metu, 3D ląstelių kultūros yra plačiai naudojamos moksliniuose tyrimuose tiriant naujus junginius ar vertinant priešvėžinių junginių poveikį trimatėms ląstelių kultūroms [176]. Magnetinio 3D biospausdinimo metodo privalumai yra atkuriamumas, sferoidų formavimo kontrolė ir galimybė sferoidus formuoti iš skirtingų ląstelių tipų. Metodas yra patogus atlikti įvairias modifikacijas, galima naudoti bet kokius ląstelių derinius sferoidams formuoti, įvertinti ląstelių sąveikos įtaką junginių atsparumui, bei viso sferoido dydžio pokyčius. Mes pritaikėme šį metodą ląstelių sąveikos tyrimams, norint suprasti ląstelių tarpusavio sąveiką, esant panašioms mikroaplinkos sąlygoms į tikrą navikų mikroaplinką. 3D modelio tyrimuose naudojome tuos pačius ląstelių derinius kaip ir 2D modelyje. 3D modelio tyrimuose, nebuvo vien tik iš vėžinių ląstelių suformuotų sferoidų grupės, kadangi be HF ląstelių MDA-MB-231 ir jos sublinijos nesuformavo sferoidų.

Sferoidai, suformuoti iš **D8** sublinijos ir HF ląstelių (3.5.3 pav. A ir B), buvo jautresni PTX poveikiui, ir jų dydis po 12 dienų buvo 5 proc. mažesnis, lyginant su kontrole. Sferoidai, kurie buvo suformuoti iš **D8**, HF ir **H2** sublinijos ląstelių buvo jautresni DOX ir PTX poveikiui. Sferoidų dydis po 12 dienų buvo nuo 18 iki 24 proc. mažesnis lyginant su kontrole. Iš **F5**, HF ir MDA-MB-231 ląstelių suformuoti sferoidai (3.5.3 pav. C ir D) esant PTX poveikiui po 12 dienų buvo 7 proc. didesni lyginant su kontrole. Sferoidai sudaryti iš **F5**, HF ir **H2** sublinijų ląstelių esant terpėje DOX arba PTX, buvo nuo 15 iki 29 proc. mažesni lyginant su kontrole (3.5.3 pav. E ir F).



### 3.5.3 pav. Ląstelių sąveikos įtaka 3D kultūrose

Procentais nurodytas sferoidų dydžio pokytis po 12 dienų inkubuojant sferoidus su terpe, kurioje yra papildomai pridėta DOX arba PTX lyginant su kontrole. D8 sublinijos deriniai (A, B), F5 sublinijos deriniai (C, D) ir H2 sublinijos deriniai (E, F). \*  $p < 0,05$  lyginant su kontrole (kontrolė – sferoidai inkubuoti su 0,2 proc. DMSO terpeje). Stulpeliai pažymėti skirtingomis raidėmis rodo statistiškai reikšmingą skirtumą ( $p < 0,05$ ) tarp tos pačios grupės,  $n = 8$ . Skalė atitinka 200  $\mu\text{m}$ .

3D modelyje derinant **H2** sublinijos ląsteles su HF, MDA-MB-231, **F5** ar **D8** sumažėja atsparumas DOX ir PTX lyginant su kontrole. Tuo tarpu F5 sublinijos ląsteles derinant su MDA-MB-231 ar **D8** sublinijos ląstelėmis nustatėme padidėjusį atsparumą DOX ir PTX lyginant su kontrole. Mokslininkai nustatė, kad esant ląstelė-ląstelė sąveikai 3D ląstelių kultūrose, fibroblastai išskiria keleto tipų molekules (HGF, TGF- $\beta$ , VEGF, TNF $\alpha$ , FGF2, IL-6 ir IL-8) didesnėmis koncentracijomis. Nustatyta, kad fibroblastai 3D ląstelių kultūrose išskiria daugiau signalinių molekulių, palyginti su jų išskiriamų molekulių kiekiu ląstelių vienasluoksnyje. Tai įrodo, kad ląstelės auginamos 3D kultūrose, dėl didesnės tarpusavio sąveikos auga ir „elgiasi“ kitaip nei auginamos vienasluoksniu. Fibroblastų funkciniai skirtumai 2D ir 3D sąlygomis buvo stebimi pagal HGF raišką, kuri padidina vėžio ląstelių perėjimą iš vietinių karcinomos ląstelių į invazines karcinomos ląstelės ir sukelia vėžio atsparumą gydymui [177]. Tai, kad tam tikri deriniai su **F5** sublinijos ląstelėmis buvo žymiai atsparesni DOX ir PTX poveikiui, galėjo nulemti padidėjusi CD133 raiška šiose ląstelėse (**F5** sublinijos ląstelėse CD133 38 proc. didesnė), lyginant su MDA-MB-231. Siekiant įvertinant CD133 raiškos stabilumą **F5** sublinijos ląstelėse, imunofluorescencinius CD133 raiškos tyrimus atlikome išskyrę **F5** subliniją ir praėjus 6 mėnesiams po **F5** išskyrimo, CD133 raiškos pokyčių nenustatyta. Šiuo metu žinoma, kad CD133 receptoriaus reguliavime dalyvauja bent 16 skirtingų genų. Vienas pagrindinių yra *TRIM28* genas, kurio padidėjusi raiška vėžinėse ląstelėse lemia padidėjusį vėžinių ląstelių agresyvumą ir atsparumą vaistams. Tyrimų metu nustatyta, kad iš ląstelių pašalinus/inaktyvavus *TRIM28* geną reikšmingai sumažėja CD133 receptoriaus raiška [178]. Taip pat mokslininkai atlikę tyrimus su kiaušidžių vėžinėmis ląstelėmis nustatė, kad CD133 raiška padidėja ląstelėms augant 3D kultūrose [179]. Tai gali būti vienas iš paaiškinimų, kodėl F5 sublinijos ląstelės deriniuose, 2D modelyje buvo jautresnės priešvėžinių vaistų poveikiui, lyginant su 3D modelyje gautais rezultatais.

Sąveikos tyrimas 3D modelyje atskleidė, kad **D8**, **F5** ląstelių sąveika su **H2** sublinijos ląstelėmis sumažina jų atsparumą DOX ir PTX lyginant su kontrole. Sferoidai, kurių sudėtyje buvo **H2** sublinijos ląstelių, užaugo mažesnio dydžio sferoidai lyginant su kitų grupių sferoidais.

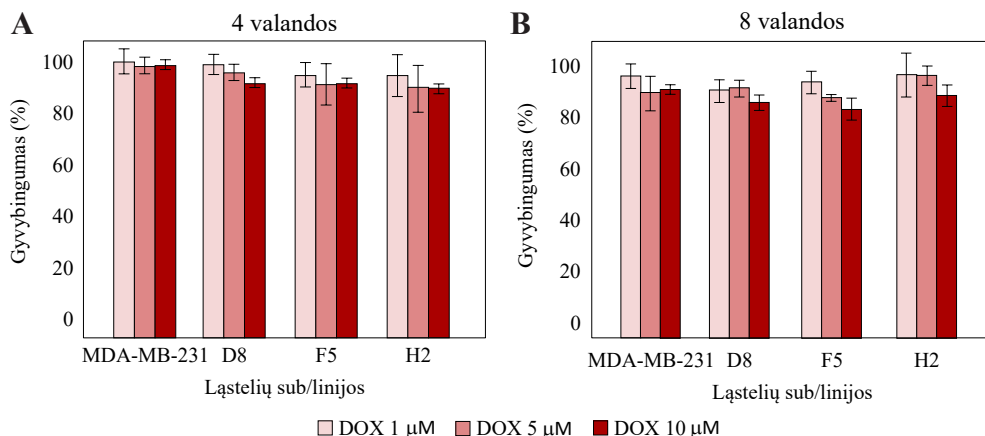
### 3.6. Doksorubicino transportas į fenotipiškai skirtingas ląstelių 2D ir 3D kultūras

Atlikus tyrimus nustatyta, kad PTX ir DOX nevienodai paveikia skirtingų sublinijų ląstelių gyvybingumą. Siekiant geriau suprasti šiuos skirtumus, buvo atliktas DOX transporto į šias sublinijas tyrimas. Junginių transporto tyrimuose patogiu naudoti DOX dėl jo gebėjimo fluorescuoti, tai palengvina



junginio judėjimo ir kaupimosi ląstelėje stebėjimą. Tyrimai atlikti 2D ir 3D ląstelių modeliuose, siekiant praplėsti supratimą apie DOX transportą esant skirtingoms galimybėms ląstelėms turėti tarpusavio ryšį. Papildomai, DOX transportas įvertintas normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, nes hipoksija yra būdinga vėžio mikroaplinkai ir gali turėti įtakos vaistų pernašai. Tyrimo rezultatai leis geriau suprasti sublinijų skirtumus ir įvertinti galimus atsparumo mechanizmus priešvėžiniams vaistams.

Tyrimė panaudotos 1 ir 5  $\mu\text{M}$  DOX koncentracijos 2D ląstelių kultūrose ir 10  $\mu\text{M}$  DOX 3D ląstelių kultūrose. Prieš atliekant DOX transporto į ląsteles tyrimą pirmiausiai įvertinta minėtų DOX koncentracijų įtaka ląstelių gyvybingumui. Toks tyrimas svarbus DOX transporto eksperimentuose, norint užtikrinti, kad stebimas DOX transportas į gyvybingas ląsteles ir naudojamos koncentracijos nesukelia ženklios ląstelių žūties tyrimo laikotarpiu (iki 8 val.).



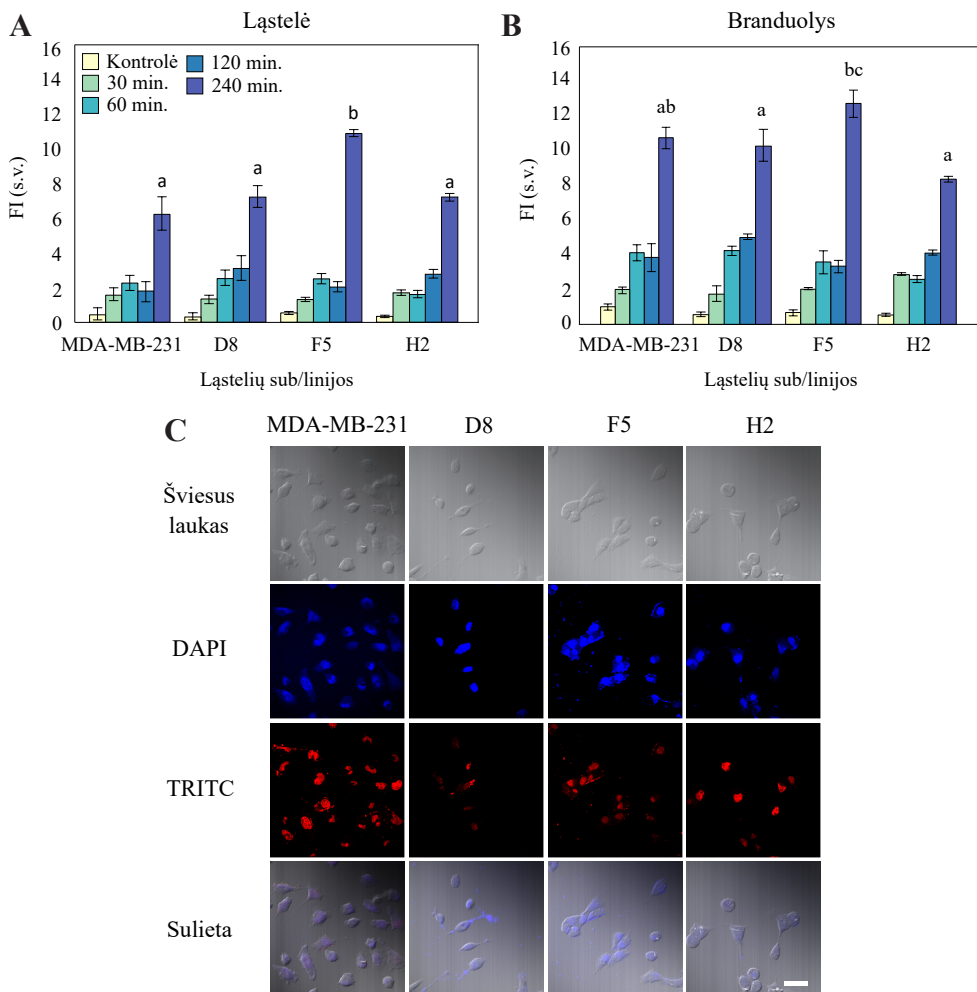
### 3.6.1 pav. DOX poveikis ląstelių gyvybingumui

Ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas vienasluoksniu auginamas ląsteles inkubuojant su 1, 5, ir 10  $\mu\text{M}$  DOX koncentracijomis terpėje. A – inkubacija su DOX 4 valandas; B – inkubacija su DOX 8 valandas,  $n = 3$ .

Tyrimo rezultatai parodė, kad DOX neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio ląstelių gyvybingumui (3.6.1 pav.). Remiantis moksliniais tyrimais yra žinoma, kad DOX patekti į ląstelės citoplazmą pakanka 5-15 min., į branduolį – 1 val., apoptozės aktyvavimas gali prasidėti per keletą valandų nuo DOX transporto į branduolį, tačiau pastebimi apoptozės padariniai, tokie kaip ląstelių susitraukimas, branduolio suskaidymas gali išryškėti tik po kelių valandų [180,181]. Bendras citotoksinis DOX poveikis ląstelių populiacijai išryškėja po 24–48 val., kai pastebimas gyvybingumo ir proliferacijos sumažėjimas [182].

*Doksorubicino transportas į vienasluoksniu auginamas ląsteles normoksisijos sąlygomis*

DOX transportas į MDA-MB-231 ląstelių liniją ir sublinijas **D8**, **F5**, **H2** buvo įvertintas normoksisijos sąlygomis. Statistiškai reikšmingas DOX transportas nustatytas tik po ilgiausio inkubacijos laiko – 240 min. Terpėje esant 1  $\mu$ M DOX koncentracijai, didžiausias DOX transportas nustatytas į **F5** sublinijos ląstelių citoplazmą 1,5 karto ir į branduolį 1,8 karto lyginant su kitomis tirtomis sublinijomis (3.6.2 pav. A ir B). **H2** sublinijos ląstelėse DOX pateko 1,5 karto mažiau (tiek į citoplazmą tiek į branduolį) lyginant su kitomis (D8, F5) sublinijomis.

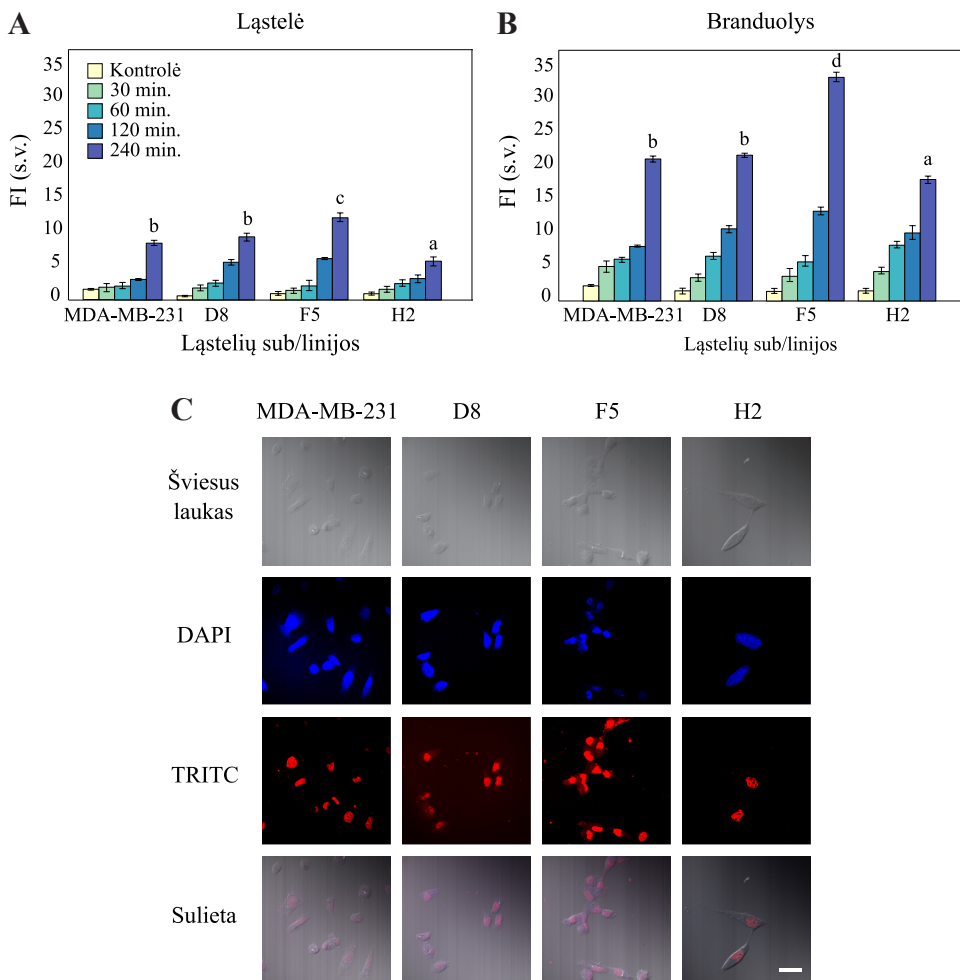


### 3.6.2 pav. DOX transportas į vienasluoksniu auginamas ląsteles normoksijos sąlygomis esant 1 $\mu$ M DOX koncentracijai

A – DOX fluorescencijos intensyvumas ląstelėse ir B – branduoliuose, skirtingais laiko momentais. C – ląstelių nuotraukos po 4 val. inkubacijos su DOX 1  $\mu$ M terpėje. Didinimas 600 $\times$ , mastelis lygus 50  $\mu$ m. Skirtingos raidės žymi skirtumus tarp grupių,  $p < 0,05$  lyginant su DOX transportu tuo pačiu laiko momentu skirtingose ląstelių sublinijose,  $n = 3$ .

DOX transporto į ląstelių citoplazmą ir branduolį santykis statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp MDA-MB-231 ir sublinijų (D8, F5, H2). Padidėjęs DOX kaupimasis ląstelių branduolyje yra dėl šio vaisto gebėjimo įsiterpti į ląstelių DNR. Šią savybę lemia DOX hidrofilinis pobūdis (pasyvi difuzija) ir aktyvūs pernašai neatrankūs pernašos baltymai (aktyvus transportas), palengvinantys jo transportą į branduolį.

Tyrimo rezultatai parodė 2,5 karto didesnę DOX transportą ir kaupimąsi ląstelių branduoliuose nei citoplazmoje, terpėje esant 5  $\mu\text{M}$  DOX koncentracijai (3.6.3 pav. A ir B). Tuo tarpu terpėje esant 1  $\mu\text{M}$  DOX nustatytas vienodas santykis tarp DOX pasiskirstymo ląstelių citoplazmoje ir branduolyje. Didžiausias – 1,5 karto didesnis DOX transportas, toliau stebimas **F5** sublinijos ląstelėse, lyginant su kitomis tirtomis sublinijomis. Statistiškai reikšmingai didesnis DOX transportas į **F5** sublinijos ląsteles veda prie hipotezės, kad šios sublinijos ląstelėse neišreikšti arba silpnai išreikšti atsparumo mechanizmai galintys pašalinti DOX iš ląstelių viduląstelinės terpės. Tuo tarpu **H2** sublinijos ląsteles inkubuojant su 5  $\mu\text{M}$  DOX koncentracija nustatytas 2 kartais mažesnis DOX kaupimasis tiek citoplazmoje, tiek ir branduolyje lyginant su **F5** sublinija ir 1,5 karto mažesniu DOX kaupimusi lyginant su MDA-MB-231 ir **D8**. Skirtingas DOX transportas į ląstelių sublinijas įrodo, kad fenotipinės ląstelių savybės lemia ir nevienodą vaisto transportą į ląsteles.



### 3.6.3 pav. DOX transportas į vienasluoksniu auginamas ląsteles normoksijos sąlygomis esant 5 $\mu\text{M}$ DOX koncentracijai

A – DOX fluorescencijos intensyvumas ląstelėse ir B – branduoliuose skirtingais laiko momentais. C – ląstelių nuotraukos po 4 val. inkubacijos su DOX 5  $\mu\text{M}$  mitybinėje terpėje. Didinimas 600 $\times$ , mastelis lygus 50  $\mu\text{m}$ . Skirtingos raidės žymi skirtumus tarp grupių,  $p < 0,05$  lyginant su DOX transportu tuo pačiu laiku skirtingose ląstelių sublinijose,  $n = 3$ .

Viso tyrimo metu vertinant DOX transportą į ląsteles, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta ląsteles inkubuojant 30, 60 ir 120 min. Statistiškai reikšmingi skirtumai nustatyti ląsteles inkubuojant tik ilgesnį laiką (240 minučių), tai rodo, kad MDA-MB-231 ir sublinijoms reikalingas ilgesnis inkubacijos laikas norint identifikuoti statistiškai reikšmingus skirtumus.

Apibendrinant DOX transporto tyrimus normoksijos sąlygomis, nustatyta, kad kai terpėje yra 1 ar 5  $\mu\text{M}$  DOX koncentracija, DOX pasiskirstymas ląs-

telių citoplazmoje ir branduolyje skyrėsi po 240 min. Esant 1  $\mu\text{M}$  DOX terpėje, transportas į branduolius yra 1,7 karto didesnis nei į citoplazmą, o esant 5  $\mu\text{M}$  DOX koncentracijai, transportas į branduolius yra 2,6 karto didesnis nei į citoplazmą. Didžiausias DOX transporto skirtumas nustatytas F5 sublinijos ląstelėse, kur DOX transportas į branduolius buvo 3,2 kartus didesnis nei citoplazmoje.

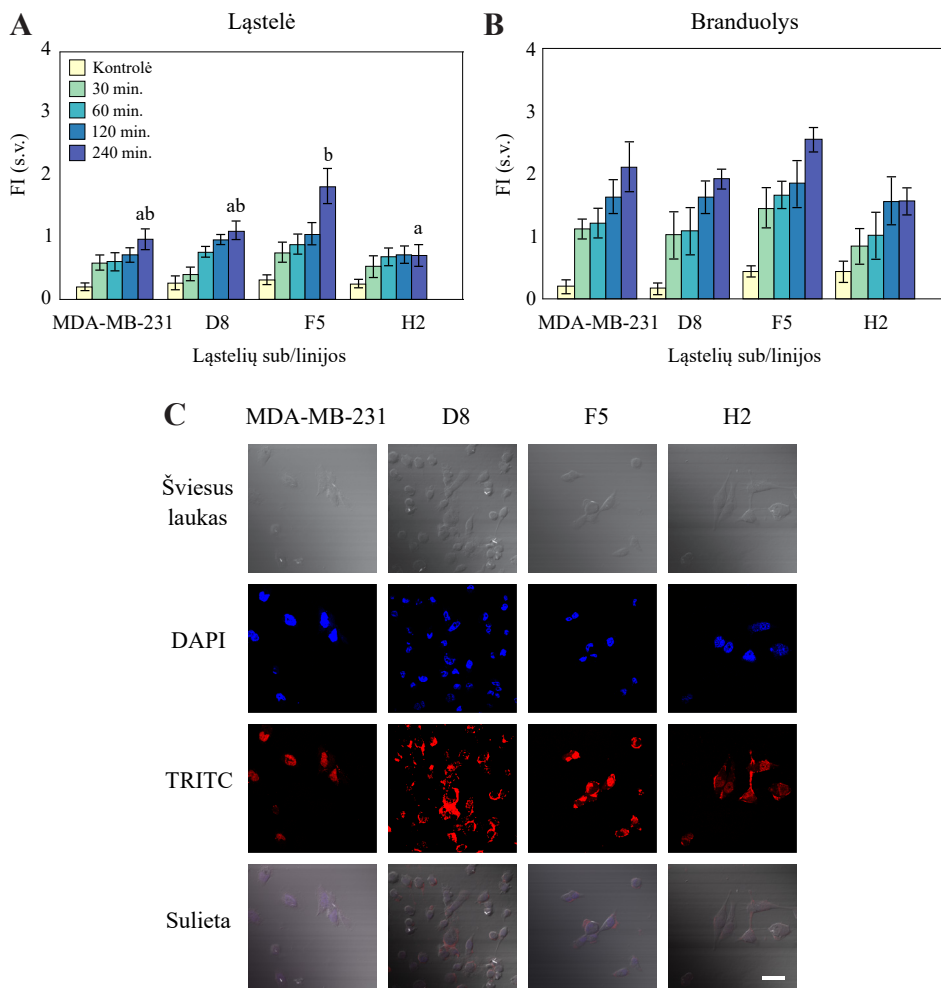
Tiriant DOX transportą į fenotipiškai skirtingas sublinijas svarbu įvertinti, kaip keičiasi DOX transportas esant hipoksinėmis aplinkos sąlygoms, kurios dažniausiai yra navikuose.

#### *Doksorubicino transportas į vienasluoksniu auginamas ląsteles hipoksijos sąlygomis*

Hipoksija, tai būseną, kuriai būdingas nepakankamas deguonies kiekis audiniuose, yra dažnas krūties, bei kitų navikų požymis. Hipoksinė vėžinių ląstelių mikroaplinka yra mutagenezės ir vėžio vystymosi veiksnys [183]. Hipoksiją navikuose suformuoja ir pačios vėžinės ląstelės aktyvuodamos angiogenezės procesą, dėl kurio vėžinės ląstelės yra aprūpinamos pakankamu maistinių medžiagų kiekiu. Taip skatinamas naviko augimas ir metastazių atsiradimas, o aplink naviką esantiems sveikiems audiniams sukeliama struktūrinė ir funkcinė žala [184]. Hipoksinės aplinkos susidarymas ir pagrindinis jos veiksnys yra HIF-1, kurio stabilizavimas dažniausiai nustatomas piktybiuose ir agresyvesnio fenotipo navikuose [185,186].

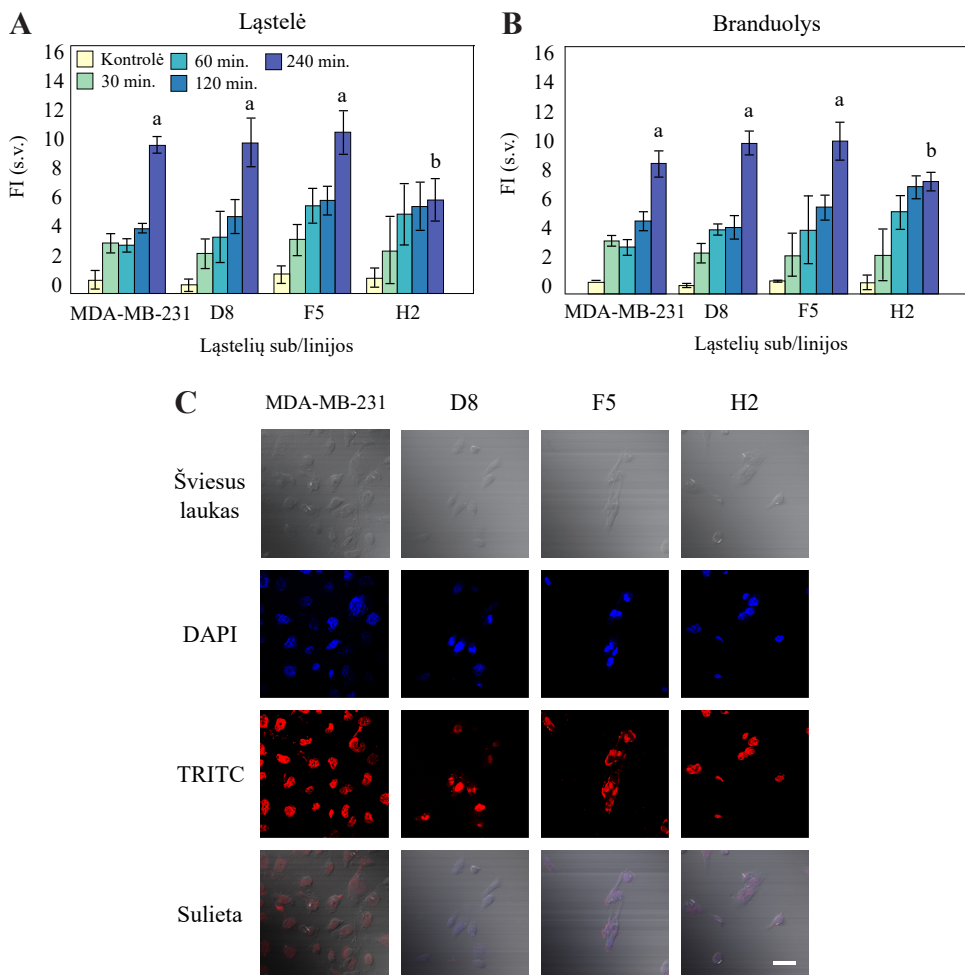
Hipoksinės aplinkos sąlygų formavimui cheminiu būdu buvo panaudotas 200  $\mu\text{M}$  kobalto (II) chloridas, kuris plačiai taikomas *in vitro* tyrimuose [187,188].

Hipoksijos sąlygomis nustatytas DOX transportas į ląsteles buvo reikšmingai mažesnis lyginant su normoksijos rezultatais. DOX transportas į ląsteles esant hipoksijai yra 5 kartus mažesnis su 1  $\mu\text{M}$  ir 2 kartus mažesnis su 5  $\mu\text{M}$  DOX koncentracija mitybinėje terpėje, lyginant su normoksijos sąlygomis gautais rezultatais (3.6.4 ir 3.6.5 pav.).



**3.6.4 pav.** *DOX transportas į vienasluoksniu auginamas ląsteles hipoksijos sąlygomis esant 1 μM DOX koncentracijai*

A – DOX fluorescencijos intensyvumas ląstelėse ir B – branduoliuose skirtingais laiko momentais. C – ląstelių nuotraukos po 4 val. inkubacijos su DOX 1 μM terpėje. Didinimas 600×, mastelis lygus 50 μm. Skirtingos raidės žymi skirtumus tarp grupių,  $p < 0,05$  lyginant su DOX transportu tuo pačiu laiko momentu skirtingose ląstelių sublinijose,  $n = 3$ .



### 3.6.5 pav. DOX transportas į vienasluoksniu auginamas ląsteles hipoksijos sąlygomis esant 5 $\mu\text{M}$ DOX koncentracijai

A – DOX fluorescencijos intensyvumas ląstelėse ir B – branduoliuose skirtingais laiko momentais. C – ląstelių nuotraukos po 4 val. inkubacijos su DOX 5  $\mu\text{M}$  terpėje. Didinimas 600 $\times$ , mastelis - 50  $\mu\text{m}$ . Skirtingos raidės žymi skirtumus tarp grupių,  $p < 0,05$  lyginant su DOX transportu tuo pačiu laiku momentu skirtingose ląstelių sublinijose,  $n = 3$ .

Didžiausias DOX transportas šiomis sąlygomis nustatytas į **F5** sublinijos ląsteles. DOX fluorescencijos intensyvumas **F5** sublinijos ląstelėse 2,5 karto didesnis lyginant su **H2** sublinijos ląstelėmis ir 2 kartus didesnis lyginant su **D8** ir **MDA-MB-231** ląstelių linija (3.6.4 pav. A). Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp DOX transporto į fenotipiškai skirtingų sublinijų branduolius nebuvo nustatyta (3.6.4 pav. B).



Tyrimo metu naudojant didesnę (5  $\mu\text{M}$ ) DOX koncentraciją, nustatyti DOX transporto į ląstelių citoplazmą ir branduolius skirtumai (3.6.5 pav. C). Statistiškai reikšmingo skirtumo DOX transporto į MDA-MB-231, **D8** ir **F5** citoplazmą nenustatyta po 240 minučių. Tuo tarpu į **H2** sublinijos ląstelių citoplazmą pateko 1,7 karto mažiau DOX lyginant su kitomis tirtomis ląstelių sublinijomis (3.6.5 pav. A). DOX fluorescencijos intensyvumas ląstelėse nustatytas 2,5 karto mažesnis lyginant su normoksijos sąlygomis esant 5  $\mu\text{M}$  koncentracijai. Tyrimo metu buvo nustatytas 2 kartus didesnis DOX transportas į branduolius nei į citoplazmą, o didžiausias DOX transportas nustatytas **F5** sublinijos ląstelėse, kur DOX transportas buvo 3 kartus mažesnis hipoksijos nei normoksijos sąlygomis.

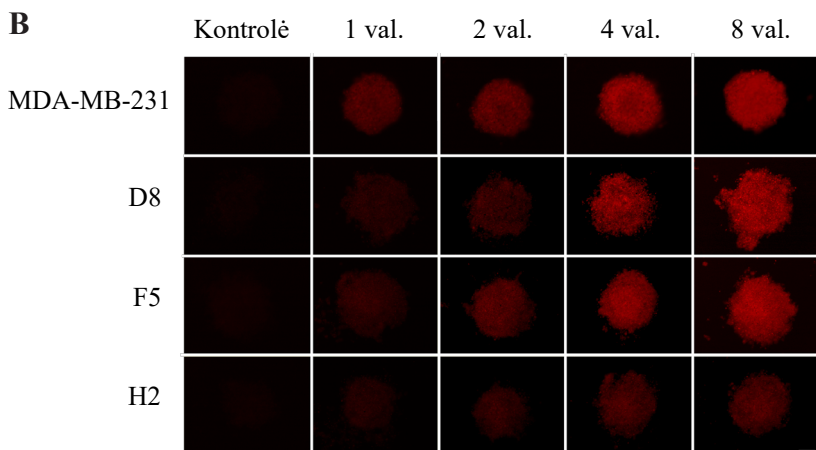
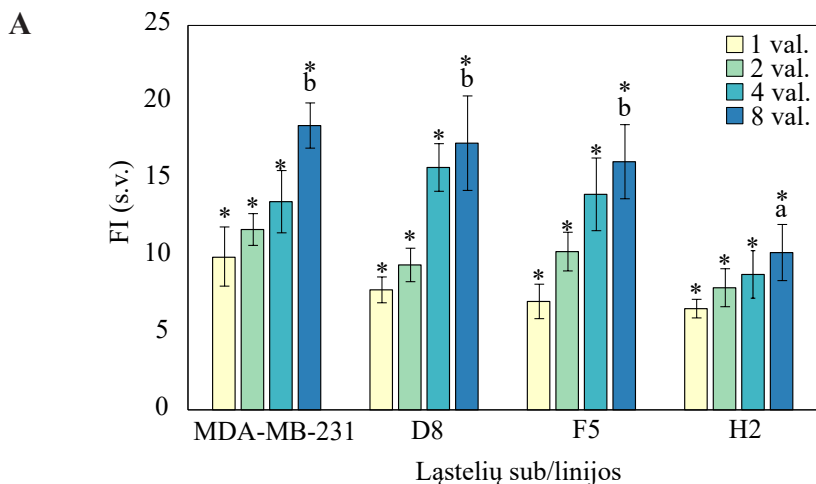
Lyginant DOX transportą į ląsteles esant skirtingoms koncentracijoms (1 ir 5  $\mu\text{M}$ ) hipoksinėje aplinkoje, skyrėsi DOX pasiskirstymas viduląstelinėje terpėje. Naudojant 1  $\mu\text{M}$  DOX koncentraciją DOX transportas į branduolius buvo 1,4–2,2 karto didesnis nei citoplazmoje. Didėjant DOX koncentracijai didėja ir DOX transporto skirtumai tarp citoplazmos ir branduolio. Esant 5  $\mu\text{M}$  DOX koncentracijai terpėje, į branduolius patenka 2–3,9 karto daugiau DOX. Didžiausias skirtumas tarp DOX kaupimosi citoplazmoje ir branduolyje nustatytas **H2** sublinijos ląstelėse, kur DOX į branduolius patenka 3,8 karto daugiau.

Gavus statistiškai reikšmingus skirtumus DOX transporto į fenotipiškai skirtingų sublinijų ląsteles auginant vienasluoksniu, tyrimą toliau tęsėme su 3D ląstelių kultūromis – sferoidais. Tyrimai sferoiduose suteiks papildomos informacijos apie ląstelių tarpusavio sąveikos įtaką DOX transportui, kadangi sferoiduose natūraliu būdu susiformuoja hipoksinės aplinkos sritys.

#### *Doksorubicino transportas į ląstelių sferoidus (3D kultūras)*

MDA-MB-231 linijos ląstelės neformuoja sferoidų, tam papildomai naudojami fibroblastai, mūsų atveju HF ląstelių linija. Sferoidus formuojant kartu su fibroblastais, tiksliau imituojamos natūralios vėžinių ląstelių mikroaplinkos sąlygos navikuose. Tai leidžia geriau suprasti ir įvertinti ląstelių sąveikos įtaką vaistų transportui į ląsteles.

Ekspertimentų pradžioje sferoidų skersmuo buvo apie 390  $\mu\text{m}$ . Lyginant sferoidų skersmenį tarp tiriamųjų grupių, jis varijavo tarp 360 ir 420  $\mu\text{m}$ . Didžiausi, netaisyklingos formos sferoidai susiformavo iš **D8** sublinijos ląstelių, tuo tarpu mažiausi ir kompaktiškiausi sferoidai susiformavo iš **H2** sublinijos ląstelių. Sferoidų dydis/skersmuo nepakito tyrimo eigoje ir išliko toks pats tarp kontrolinės ir tiriamųjų grupių.



### 3.6.6 pav. Dokсорubicino transportas į vėžinių ląstelių sferoidus

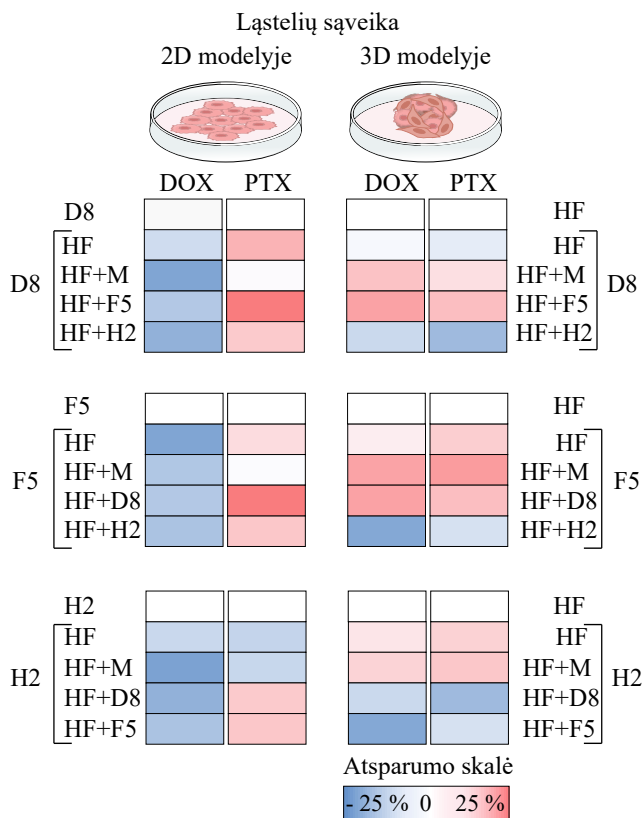
A – DOX fluorescencijos intensyvumas ląstelėse; B – sferoidų nuotraukos skirtingais laiko intervalais su DOX 10  $\mu$ M terpėje. Didinimas 600 $\times$ , mastelis lygus 200  $\mu$ m. Skirtingos raidės žymi skirtumus tarp grupių, lyginant su DOX transportu tuo pačiu laiko momentu skirtingose ląstelių sublinijose; \*  $p < 0,05$  lyginant su kontrole, sferoidais kurie nebuvo inkubuoti su DOX,  $n = 12$ .

Statistiškai reikšmingi DOX transporto skirtumai į sferoidus buvo nustatyti po 8 val. inkubacijos su DOX (10  $\mu$ M) (3.6.6 pav. A). Didžiausias DOX transportas buvo nustatytas į sferoidus, suformuotus iš **D8**, **F5** ir MDA-MB-231 ląstelių. Tuo tarpu į iš **H2** ląstelių suformuotus sferoidus DOX pateko du kartus mažiau, lyginant su kitų tirtų grupių sferoidais (3.6.6 pav. A ir B). Mažesnis DOX transportas į sferoidus, suformuotus iš **H2** sublinijos ląstelių, patvirtina šios sublinijos atsparumą DOX, kuris buvo nustatytas ankstesnių tyrimų metu (3.3 skyrelis). Sferoiduose, suformuotuose iš **F5** sublinijos ląstelių, ne-

nustatytas didesnis DOX transportas lyginant su kitų sublinijų suformuotais sferoidais. DOX transporto į sferoidus tyrimų rezultatai koreliuoja su 2D modelio tyrimais hipoksijos sąlygomis, kur statistiškai reikšmingų skirtumų tarp sublinijų nebuvo nustatyta, išskyrus **H2** subliniją, kuri pasižymėjo mažiausiu DOX kaupimu. Tyrimuose su sferoidais pastarieji buvo pakankamo dydžio, kad susiformuotų hipoksinės zonos, DOX transportas į sferoidus atitinka ir ląstelių auginant vienasluoksniu hipoksinėmis sąlygomis gautus rezultatus.

### 3.7. 2D ir 3D ląstelių sąveikos ir doksorubicino transporto tyrimų palyginimas

Vertinant tyrimų rezultatus, normalizavome ir palyginome 2D ir 3D ląstelių tarpusavio sąveikos gautus tyrimo rezultatus, kurie pateikti 3.7.1 paveiksle.



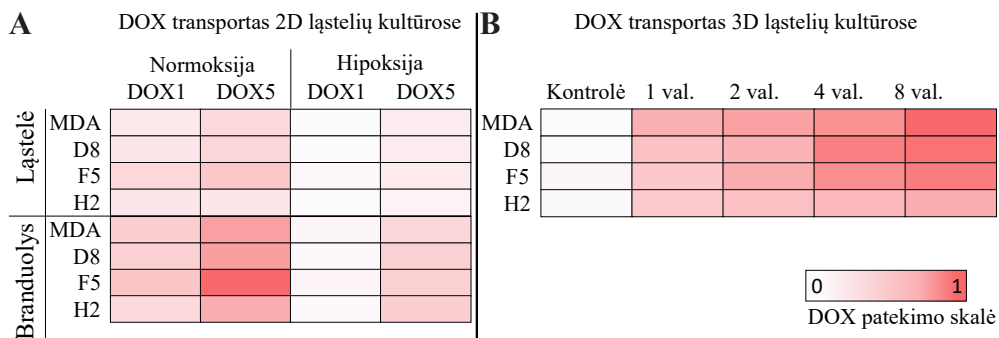
**3.7.1 pav.** Sublinijų ląstelių sąveikos tyrimų santrauka „Šilumos žemėlapis“ (angl. heatmap) atspindi ląstelių sąveikos įtaką terpėje esant priešvėžiniams junginiams

Atsparumo skalė (mėlyna – sumažėjęs, raudona – padidėjęs, balta spalva – nepasikeitęs atsparumas) rodo kiek procentiškai kiekvienas ląstelių derinys buvo atsparus/neatsparus priešvėžiniams junginiams. Santrumpos: M – MDA-MB-231.

Visi ląstelių deriniai buvo mažiau atsparūs DOX poveikiui, bet padidėjo atsparumas PTX, lyginant su ląstelių atsparumu nesant deriniuose. Atsparumas PTX ypatingai padidėjo **D8-F5-HF** derinyje. Nustatyta, kad sublinijų deriniai su MDA-MB-231 ir HF buvo jautresni DOX, nei derinant sublinijas tarpusavyje. Vėžinių ląstelių ir fibroblastų sąveikos rezultatai pateikti ir keliuose moksliniuose darbuose [174,189,190], kuriuose nustatyta, kad vėžinių ir stromos ląstelių, bei užląstelinės terpės sąveika mažina vėžinių ląstelių atsparumą chemoterapiniams vaistams. Manoma, kad dėl fibroblastų išskiriamų įvairių faktorių padidinamas vaistų pralaidumas į ląsteles. Tyrimas parodė, kad vėžinių ląstelių ir fibroblastų sąveikos rezultatas vaistų atsparumui yra susijęs su fibroblastų kilme, t.y. kokio tipo fibroblastai naudojami *in vitro* tyrimuose, atitinkamai gali skirtis gauti rezultatai [12]. Svarbu paminėti, kad dėl vėžinių ląstelių sąveikos su fibroblastais ilgesnį laiką, o taip pat navikuose *in vivo*, vėžinės ląstelės geba „pakeisti“ fibroblastų fenotipą į CAFs, jų išskiriami faktoriai naudingi vėžinių ląstelių funkcionavimui. Būtent tokio fenotipo fibroblastų sąveika su vėžinėmis ląstelėmis reikšmingai didina atsparumą priešvėžiniams vaistams [75,191–194].

3D modelyje visi ląstelių deriniai buvo atsparesni DOX ir PTX, išskyrus derinius su **H2** sublinija. Nors ši sublinija auginama viena buvo atspariausia DOX poveikiui, tačiau deriniuose su kitomis ląstelėmis atsparumas sumažėjo. Tą pastebėjo ir Landry ir kt. mokslininkų grupė, kurie nustatė, kad TNBC ląstelių deriniuose su fibroblastais sumažėja ląstelių atsparumas priešvėžiniams junginiams [12].

Atlikti DOX transporto tyrimai į fenotipiškai skirtingas MDA-MB-231 sublinijas papildė turimas žinias apie šias sublinijas ir suteikė naudingos informacijos apie DOX transporto įtaką ląstelių atsparumui. Be to, įvertinome, kaip keičiasi DOX transportas esant hipoksinei aplinkai, ir palyginome šiuos rezultatus su gautais normoksijos sąlygomis. Šie rezultatai leidžia geriau suprasti aplinkos sąlygų vaidmenį vaisto efektyvumo ir atsparumo mechanizmuose. DOX transporto rezultatų apibendrinimas pateiktas 3.7.2 paveiksle.



### 3.7.2 pav. DOX transportas palyginimas hipoksijos ir normoksijos sąlygomis

Skalė nurodo DOX transportą į ląsteles. DOX1, DOX5 nurodo skirtingas DOX koncentracijas, 1 ir 5  $\mu\text{M}$ . Rezultatai normalizuoti, 1 prilyginant didžiausiam DOX fluorescencijos intensyvumui ląstelėse

DOX transporto į vienasluoksniu auginamas ląstelių kultūras tyrimuose nustatėme reikšmingus skirtumus tarp fenotipiškai skirtingų sublinijų. Taip pat nustatyti reikšmingi skirtumai tarp DOX kaupimosi ląstelių citoplazmoje ir branduolyje naudojant 1 ir 5  $\mu\text{M}$  DOX koncentracijas. Aplinkos sąlygos – normoksija ir hipoksija, turėjo reikšmingos įtakos DOX transportui į ląsteles. Visose ląstelių sublinijose nustatytas reikšmingai mažesnis DOX transportas hipoksinėmis sąlygomis lyginant su DOX transporto rezultatais normoksijos sąlygomis.

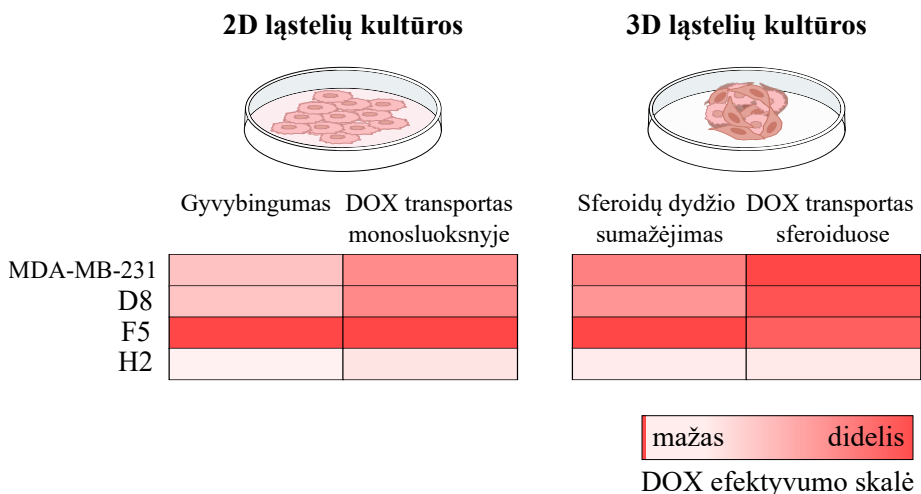
DOX transportas į **F5** sublinijos ląsteles buvo didžiausias normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, lyginant su kitomis ląstelių sublinijomis (3.7.2 pav.). DOX daugiausiai sumažino **F5** sublinijos gyvybingumą, o transporto tyrimai parodė, išaugusį DOX kaupimąsi **F5** sublinijos ląstelių branduoliuose, toks DOX poveikis ląstelėms aprašytas ir mokslinėje literatūroje [195]. Dažnu atveju, DOX jautriose ląstelėse nepadidėjusi transmembraninių nešiklių (pvz., P-gp) raiška, tiek išorinėje tiek ir branduolių membranoje, lemia DOX kaupimąsi [196]. Svarbu paminėti, kad hipoksijos sąlygomis DOX transportas **F5** sublinijos ląstelėse yra 3 kartus mažesnis nei normoksijos sąlygomis, tai rodo, kad didesni (virš 100  $\mu\text{m}$ ) hipoksiniai navikai gali būti atsparesni gydymui [197].

**H2** sublinijos ląstelėse nustatytas mažiausias DOX transportas normoksijos ir hipoksijos sąlygomis (3.7.3 pav.). **H2** sublinija, žinoma kaip DOX atspari, nes DOX negali pasiekti branduolio ir kaupiasi citoplazmoje mažomis koncentracijomis, didžioji dalis pašalinama į užląstelinę terpę [195]. Esant didesnei DOX koncentracijai (5  $\mu\text{M}$ ), dalis vaisto pasiekia branduolius. Hipoksinėmis sąlygomis DOX transportas į citoplazmą sumažėja 7 kartus, o į branduolius 5 kartus lyginant su normoksijos sąlygomis.

**MDA-MB-231** ir **D8** sublinijų ląstelėse DOX transporto eksperimentuose reikšmingai nesiskyrė ir buvo tarpinis variantas tarp **F5** ir **H2** sublinijų, tai atitinka ankstesnius tyrimų rezultatus. Nors **D8** ląstelių sublinija buvo jautresnė DOX poveikiui, transporto skirtumų tarp linijų nebuvo.

Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp **MDA-MB-231**, **D8** ir **F5** sferoidų DOX transporte nenustatyta. **H2** sublinijos sferoiduose DOX fluorescencijos intensyvumas buvo mažiausias. Tyrimo rezultatai atitinka kitų mokslininkų duomenis, kad naviko mikroaplinka turi didelę įtaką vaistų transportui ir veiksmingumui [198].

Apibendrinant DOX transportą ir jo veikimo efektyvumą 2D ir 3D ląstelių kultūrose, buvo palyginti DOX įtakos ląstelių gyvybingumo rezultatai ir įtaka sferoidų dydžio pokyčiui esant DOX poveikiui (3.7.3 pav.).



**3.7.3 pav.** *DOX transportas ir veikimo aktyvumas fenotipiškai skirtingų ląstelių 2D ir 3D ląstelių kultūrose*

2D kultūrose DOX efektyvumas ląstelių gyvybingumui įvertintas MTT metodu, DOX transportas vertintas fluorescencijos intensyvumo skirtumais ląstelėse. 3D kultūrose, sferoidų dydžio pokytis vertinamas sferoidus inkubuojant su DOX ir matuojant sferoidų diametro pokyčius, transportas sferoiduose įvertintas stebintis fluorescencijos intensyvumo pokyčius atskirose grupėse. Skalė nurodo DOX aktyvumą santykiniais vienetais nuo mažiausių (šviesiai raudona) iki didžiausio efektyvumo (tamsiai raudona).

Visų tyrimų metu labiausiai išsiskyrė dvi sublinijos – **F5** ir **H2**. **F5** sublinija jautriausia DOX poveikiui, kadangi DOX susikaupia šiose ląstelėse auginamose tiek 2D, tiek 3D kultūrose. Taip pat, sferoidai, suformuoti iš **F5** sublinijos, DOX poveikyje augo statistiškai reikšmingai lėčiau (3.7.3 pav.). **F5** sublinijos mažesnis atsparumas DOX gali būti siejamas su genetinėmis ir epigenetinėmis modifikacijomis, kurios lemia mažesnę pernašos baltymų

aktyvumą ir tai lemia didesnę DOX viduląstelinę koncentraciją [54]. Padidėjęs DOX kaupimasis **F5** sublinijos ląstelėse gali būti dėl lipidų metabolizmo pasikeitimo, bei padidėjusio membranos pralaidumo įvairioms molekulėms, kas gali lemti didesnę vaisto transportą į ląsteles. Todėl DOX aktyviai veikia ląsteles įsiterpdamas į DNR molekulę, sutrikdydamas topoizomerazės II veikimą [199], tai lemtų ląstelių žūtį, nors pastarosios ir pasižymi panašiomis į vėžio kamieninių ląstelių savybėmis.

**H2** sublinija visų tyrimų metu išsiskyrė kaip atspari DOX sublinija. Atlikti DOX transporto tyrimai parodė, kad DOX transportas ir kaupimasis šios sublinijos ląstelėse yra ypač mažas. Taip pat mažas DOX transportas nustatytas ir ląstelių sferoiduose. **H2** sublinijos atsparumą galėjo nulemti keletas atsparumo mechanizmų: padidėjęs vaistų pašalinimas lemiantis sumažėjusį vaistų kaupimąsi ląstelėse, pasikeitęs vaistų metabolizmas, vaisto inaktyvavimas [200]. Toks **H2** sublinijos atsparumas gali būti panašus į TNBC mezenchiminį potipį, kuris pasižymi ypač išaugusia daugiavaisčio atsparumo nešiklių raiška [53].

Apibendrinant tyrimo rezultatus, galima teigti, kad atsparumą vaistams nulemia ne tik iki šiol gerai žinomi atsparumo mechanizmai (padidėjęs vaistų pašalinimas, pasikeitęs vaistų metabolizmas ląstelėse ir t.t.), bet ir fenotipiškai skirtingų sublinijų tarpusavio sąveika. Įrodėme, jog derinant fenotipiškai skirtingas, trejopai neigiamo krūties vėžio linijos MDA-MB-231 sublinijas, atsparumas vaistams yra nevienodas. Nustatyta, kad fenotipiškai skirtingose sublinijose DOX transportas ir jo pasiskirstymas ląstelėse skiriasi. Tai leidžia geriau suprasti mechanizmus, kuriais grindžiamas vaistų atsparumas, ir šie rezultatai tolimoje perspektyvoje gali prisidėti kuriant efektyvesnes gydymo strategijas skirtingiems TNBC vėžio potipiams.

## IŠVADOS

1. Iš trejopai neigiamos krūties vėžinių ląstelių linijos MDA-MB-231 išskirtos septynios fenotipiškai skirtingos sublinijos. Morfologine išvaizda nuo pradinės linijos labiausiai skiriasi D8, F5, E7, F7 ir H2 sublinijos. H2 sublinijos ląstelės labiausiai atsparios doksorubicino ir paklitakselio, o F5 – mažiausiai atsparios doksorubicino poveikiui, lyginant su pradine MDA-MB-231 ląstelių linija. Doksorubicinui jautriose F5 sublinijos ląstelėse nustatyta didžiausia CD133 receptoriaus raiška, lyginant su MDA-MB-231 linija. Doksorubicinui ir paklitakseliui atsparių H2 sublinijos ląstelių populiacija dauginasi sparčiausiai ir migruoja greičiausiai, o A9 sublinijos ląstelės migruoja lėčiau, lyginant su MDA-MB-231 linija.
2. Vienasluoksniu auginamas trejopai neigiamo krūties vėžio ląstelių sublinijas D8, F5, H2 derinant su fibroblastais arba MDA-MB-231 ląstelėmis, arba sublinijas derinant tarpusavyje, sumažėja atsparumas doksorubicinui. Greičiau migruojančių D8 ląstelių derinys su doksorubicinui jautriomis F5 ląstelėmis padidina atsparumą paklitakseliui, ląstelių vienasluoksnyje, bet ne sferoiduose. Doksorubicinui ir paklitakseliui atsparias H2 sublinijos ląsteles derinant su greičiau migruojančiomis D8 arba doksorubicinui jautriomis F5 ląstelėmis, padidėja atsparumas paklitakseliui ląstelių vienasluoksnyje, bet sumažėja atsparumas abiem junginiams sferoiduose.
3. Doksorubicino transportas į D8, F5, H2 sublinijas priklauso nuo ląstelių fenotipinių savybių ir deguonies koncentracijos aplinkoje. Normoksijos sąlygomis daugiau doksorubicino patenka į jautrias F5 sublinijos ląsteles, o mažiausiai – į doksorubicinui atsparias H2 sublinijos ląsteles. Doksorubicino kaupimasis ląstelėse priklauso nuo jo koncentracijos terpėje: esant mažesnei koncentracijai, junginys tolygiau pasiskirsto tarp citoplazmos ir branduolio, o esant didesnei koncentracijai, doksorubicinas labiau kaupiasi branduoliuose. Hipoksijos sąlygomis doksorubicino transportas į sublinijas D8, F5, H2 sumažėja, tačiau išlieka ta pati tendencija – mažiausiai junginio patenka į doksorubicinui atsparias H2 sublinijos ląsteles, o daugiausiai – į F5 sublinijos ląsteles, lyginant su MDA-MB-231 ląstelėmis.
4. Doksorubicino transportas į sferoidus, suformuotus iš doksorubicinui atsparių H2 sublinijos ląstelių, mažesnis nei į MDA-MB-231 sferoidus, kaip ir ląstelių vienasluoksnyje. Doksorubicinui jautrių F5 sublinijos ląstelių sferoiduose nenustatytas didesnis doksorubicino kaupimasis,



nors jis buvo didžiausias šias ląsteles auginant vienasluoksniu. Doksorubicino transportas į D8 ir F5 ląstelių sferoidus toks pat kaip ir į MDA-MB-231 sferoidus.

# SUMMARY

## INTRODUCTION

Breast cancer is the most common cancer among women worldwide. In 2022, this disease was diagnosed in 12.7% of women and accounted for 7.2% of cancer-related deaths globally. Women of all ages after puberty in all countries are at risk of developing breast cancer, although the incidence increases with age [1]. As of 2020, breast cancer was diagnosed in 21.7% of women in Lithuania (LSAM). Women with breast cancer experience disruptions not only in their physical health but also in their psychosocial well-being and economic stability [2].

Breast cancer is classified into four main subtypes based on three key hormone receptors: estrogen (ER), progesterone (PR), and human epidermal growth factor 2 (HER2). The subtype of breast cancer that lacks all three of these hormone receptors is called triple-negative breast cancer (TNBC), which accounts for 10–20% of all breast cancer cases [3]. TNBC is the most aggressive form of breast cancer and is characterized by distinct clinical and molecular features, including a higher degree of differentiation, a tendency to metastasize, and a younger age of diagnosis [4]. The absence of receptor targets in TNBC means that treatments like hormone therapy or HER2-targeted drugs are ineffective, making chemotherapy the primary systemic treatment option [5]. Additionally, TNBC is more prone to recurrence and distant metastases, complicating clinical management of the disease [6].

The complexity of TNBC lies in its genetic-phenotypic heterogeneity. On a molecular level, TNBC is divided into four main subtypes: luminal androgen receptor (LAR), mesenchymal (M), basal-like 1 (BL1), and basal-like 2 (BL2) [7]. Studies have shown that differences within TNBC tumor subclones contribute to its aggressiveness, including mutations in TP53 and BRCA1 genes, as well as changes in other genes involved in DNA repair [8]. TNBC tumors exhibit intrinsic heterogeneity, consisting of cells with different phenotypes in various parts of the tumor, complicating diagnosis and treatment. For example, androgen receptor therapy is applied to LAR phenotype cells, while DOX or cisplatin combined with PARP inhibitors are used for the BL1 phenotype. DOX and PTX are used for the BL2 subtype, often in combination with other chemotherapeutic drugs [9,10]. The diversity of phenotypes within tumors complicates treatment and promotes drug resistance, leading to disease recurrence [11]. In TNBC tumors, not only intrinsic tumor heterogeneity but also the interaction between cancer cells and the surrounding microenvironment poses challenges for treating this type of cancer. The TNBC tumor microenvironment is composed of cells such as

fibroblasts, macrophages, adipocytes, and immune cells, which secrete various factors. This interaction between cancer cells and the tumor microenvironment contributes to drug resistance and tumor growth [12,13]. The resistance of cancer cells and disease progression is influenced not only by the interaction between cancer cells and microenvironment cells but also by the interaction between different phenotypes of cancer cells within the tumor. Due to constant mutations in cancer cells and environmental factors (availability of nutrients, oxygen levels, drug exposure), several distinct phenotypic populations form within tumors, each exhibiting different properties. These cells can exchange information (resistance proteins, miRNAs) through direct (microtubules, etc.) or indirect (exosomes, soluble factors, etc.) interactions, allowing cells to acquire new characteristics and resistance to drugs used in treatment [14,15].

Cell-to-cell interaction significantly impacts resistance to DOX and PTX, which are among the main chemotherapeutic drugs for TNBC [16,17]. Resistance to these drugs in cancer cells develops due to several known mechanisms, including changes in signaling pathways, genetic and epigenetic modifications [18], regulation of the cell cycle and apoptosis [19], and increased levels of transport proteins in cancer cells [20]. These mechanisms complicate the effectiveness of chemotherapeutic compounds by reducing their transport into cells, where their therapeutic targets are located. One of the major current challenges is the hindered delivery and distribution of drugs within cancer cells, making research on drug transport particularly important. It is crucial first to find ways to improve the transport of compounds into cancer cells [21] and to evaluate how compound transport and distribution differ in cancer cells of different phenotypes. DOX is convenient to use in studies of compound transport due to its fluorescent properties, which allow easy observation of DOX transport and localization within cells.

Currently, there is a very limited number of studies analyzing cell-to-cell interaction. Such studies are necessary to better understand the complex mechanisms of resistance and to find new methods to enhance drug effectiveness by improving their transport into cancer cells.

**The aim:** To evaluate the impact of triple-negative breast cancer cell population interactions on resistance to anticancer drugs.

**Objectives:**

1. To isolate and characterize phenotypically distinct sublines from the triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell line.
2. To evaluate the impact of interactions between phenotypically distinct sublines on resistance to anticancer drugs, doxorubicin and paclitaxel, in monolayer cell cultures and cell spheroids.

3. To investigate doxorubicin transport into phenotypically distinct sublines in monolayers under normoxia and hypoxia.
4. To assess doxorubicin transport into spheroids formed from phenotypically distinct sublines.

### **Scientific novelty**

Most of the data on phenotypically distinct TNBC populations has been obtained by analyzing each cell population individually, focusing on their phenotypic traits, varying sensitivity to anticancer drugs, and differences in various genes and signaling pathways. Often, differences among TNBC populations are studied using primary cells isolated from patient tumors. However, a literature review reveals limited information on distinct populations isolated from cell lines. Researchers typically investigate populations by assessing their migratory abilities, gene profiles, and expression of specific receptors. However, there is a scarcity of studies that examine not only individual populations but also the characteristics of combinations of phenotypically distinct populations.

In this study, for the first time, the impact of interactions between phenotypically distinct sublines, isolated from the MDA-MB-231 line, on resistance to DOX and PTX was assessed. A total of 24 sublines were isolated, of which 7 were characterized in detail, and 3 of the most phenotypically distinct sublines were selected for interaction studies. The influence of interactions between phenotypically distinct sublines on resistance to DOX and PTX was evaluated in both two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cultures. During the experiments, resistance to DOX and PTX was assessed in cell monolayers and spheroids formed from combinations of these sublines. The study revealed that combinations of phenotypically distinct sublines exhibited different levels of resistance to the mentioned compounds, and DOX transport studies showed that this compound was distributed unevenly among the phenotypically distinct sublines.

Considering that chemotherapy drugs like DOX and PTX are commonly used in TNBC treatment, significant attention was given to these compounds. In cancer treatment, including breast cancer, resistance to administered drugs is often encountered. This resistance is driven by numerous mechanisms, but our studies indicate that phenotypically distinct cells, although derived from the same line, exhibit varying sensitivity to DOX and PTX. Therefore, it is important to assess how the transport of these drugs differs among phenotypically distinct sublines.

To better understand the tumor environment and create conditions that closely resemble those in the human body, cell spheroids were formed by combining phenotypically distinct sublines (D8, F5, H2). Using this method,

well-formed cell spheroids were created, allowing for a more objective evaluation of DOX penetration. Additionally, spheroids of the required size (approximately 390  $\mu\text{m}$ ) were grown to ensure the formation of a hypoxic environment within them. DOX transport was also assessed in cell monolayers under normoxic and hypoxic conditions. Evaluating DOX transport in a hypoxic environment is crucial because, under these conditions, drugs often penetrate much less effectively, leading to insufficient intracellular drug concentrations and the development of drug resistance, complicating disease treatment. Transport studies were conducted in both 2D and 3D cell cultures, as these two experimental systems reflect different levels of cell interaction that can influence DOX distribution and efficacy. In 2D cultures, DOX transport into individual cells can be assessed, while 3D cultures better mimic *in vivo* conditions, including cell-to-cell interactions and limited DOX transport into deeper spheroid layers. These research results can help better understand DOX activity in different model systems and contribute to the development of more targeted cancer therapies.

### **Practical and theoretical significance**

The aggressiveness of triple-negative breast cancer (TNBC) and the lack of effective treatment methods represent one of the biggest challenges in modern medicine. The research results presented in this dissertation are crucial for further development in this field, particularly when conducting studies with *in vivo* models or working with primary cell cultures.

The findings confirm that even in cell lines grown in a controlled environment (with stable oxygen and nutrient levels), phenotypically distinct populations exist, making them a suitable subject for research. The isolated sublines differed in their characteristics, which influenced their migration potential and sensitivity to DOX and PTX. Therefore, the MDA-MB-231 line, with its phenotypically distinct sublines, is an appropriate model for research.

The data from the conducted studies substantiate the influence of cell interactions on the development of drug resistance, demonstrating that combining different cell sublines alters their sensitivity to anticancer compounds. When sublines that are sensitive to DOX and PTX individually are combined, the resistance of these combinations to the compounds increases. However, when a DOX-resistant subline is combined with other sublines, the cells' resistance to DOX decreases. The results of the DOX transport study revealed that in DOX-resistant sublines, the transport of this compound into the cells is significantly reduced.

These findings provide valuable insights into the issue of DOX and PTX resistance, helping to understand the different transport mechanisms of DOX into phenotypically distinct cell sublines. These insights could

be critical for investigating various mechanisms of cellular resistance. Over time, this knowledge could contribute to the improvement of cancer treatment strategies, allowing for the personalization of treatment based on the phenotype of the cancer cells forming the tumor, and the selection of the most appropriate treatment methods and drugs. Furthermore, by considering how the microenvironment affects treatment, personalized therapy could be applied.

### **Contribution of the Author**

The author conducted all experiments in cell monolayer and three-dimensional cultures and isolated cell sublines. Additionally, the author analyzed and interpreted the results, processed them, and presented them in figures, presented the findings at scientific conferences, and prepared publications based on them together with the supervisor. The author is the first author of two experimental scientific publications and the first author of one review publication prepared on the topic of this dissertation. Based on these publications, the author prepared the dissertation.

The scientific supervisor, Prof. Vilma Petrikaitė, formulated the research topic, directed the experimental research, consulted on the interpretation of the data, participated in the preparation of scientific publications and theses, and advised on the preparation of the dissertation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Isolation of cell sublines from commercial MDA-MB-231 cell line**

Cell sublines were isolated from the MDAMB-231 commercial cell line by multiple cell suspension dilution in 96-well plates. Using an 8-channel micropipettor, 100  $\mu\text{L}$  of medium was added to all the wells in 96-well plate, except well A1. Then 200  $\mu\text{l}$  of cell suspension ( $2 \times 10^4$  cell/mL) was added into well A1, and using a single channel pipettor, 100  $\mu\text{l}$  of the solution was quickly transferred from the first well to well B1. This dilution was repeated down the entire column, discarding 100  $\mu\text{L}$  from H1, so that it ends up with the same volume as the wells above it. With the 8-channel micro pipettor, 100  $\mu\text{l}$  of medium was added to each well in column 1 (giving 200  $\mu\text{l}$ /well). Using the same pipettor, 100  $\mu\text{L}$  of the liquid was quickly transferred from the wells in the first column (A1-H1) to those in the second column (A2-H2). This dilution strategy was repeated across the entire plate. After nine days of incubation, the cell colonies in the plate were detected microscopically. Based on formed colonies differences (shape, density of cells), sublines from the wells A9, B7, C7, D8, E7, F5, F7, G5, and H2 were selected (the names

of subcolonies were assigned according to the name of the well from which the cells were taken). Sublines were sub-cultured to 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (TPP, Switzerland).

### **Expression of CD133 receptor by immunofluorescence staining**

Cells ( $4 \times 10^4$  cell/mL) were grown for 24 h in a 24-well plate on collagen-coated oval 13 mm diameter cover glasses at standard cell culturing conditions. After 24 h, cells were fixed in 4 % paraformaldehyde (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) for 20 min., permeabilized in 0.1 % Triton X-100 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) for 10 min., blocked in blocking buffer (10 mL of phosphate buffer solution + 0.2 mL fetal bovine serum + 0.02 g bovine serum albumin) for 30 min. Immunostaining was performed with primary antibody 1:50 (anti-CD133 rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, UK) against the protein CD133. Then cells were incubated with secondary antibody 1:1000 (goat anti-rabbit IgG highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 594, life technologies, Oregon, USA) for 30 min. Cell nuclei were stained with DAPI (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 1 µg/mL, for 10 min. Then the cover glass was transferred to objective lenses and mounted in ProLong Gold Antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). CD133 expression was determined by immunofluorescence using confocal microscopy (Olympus FLUOVIEW FV1000). Cells were imaged under a microscope at 600 × magnification using DAPI and TRITC filters. Images were analyzed using *ImageJ 1.53K software* (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). In each group, at least 20 (from 5 different glass points) randomly selected cells were analyzed, and the relative fluorescence intensity was measured. HF cells were used as a negative control.

### **Determination of doxorubicin cytotoxicity by MTT assay**

The sensitivity of cells to DOX was assessed using the MTT method [120]. DOX dilutions in the medium were prepared immediately before starting the experiment. DOX was dissolved in DMSO, followed by further dilutions in the medium, ensuring that the final DMSO concentration did not exceed 0.5 %. Cells ( $2 \times 10^4$  cells/well) were seeded into a 96-well flat-bottom plate and incubated for 24 hours at 37 °C. After incubation, the medium was aspirated and replaced with fresh medium containing the appropriate concentration of DOX. Cells were incubated for 4 and 8 hours, then 20 µL of MTT solution (5 mg/mL) was added. The cells were incubated for an additional 3 hours at 37 °C. After this incubation period, the medium was aspirated, and the resulting formazan crystals were dissolved by adding 50 µL of DMSO.

Complete dissolution of the formazan crystals was achieved by briefly shaking the plate. Absorbance was measured using an automated plate reader at wavelengths of 570 and 630 nm.

### **Wound healing assay**

Cells were seeded in a 24-well plates (Corning, New York, USA) at a density of 20000 cells/ well in 500  $\mu$ L of medium and incubated for 24 h in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub> at 37°C. Then the monolayers were scratched with a sterile 100  $\mu$ L pipette tip in the center of the well. The media was removed, cells were washed twice with PBS, and fresh media was added. Images of the scratch were captured immediately and at every 24 h for three days at several well points of scratch. The percentage of the wound was calculated using ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Three technical replicates per experiment were made.

### **Chemosensitivity assay**

Cell susceptibility to anticancer drugs was established by MTT assay, as described elsewhere [19]. All drug dilutions in media were prepared freshly just before use. DOX (> 98 %, Abcam, Cambridge, UK) and PTX (> 99.5 % Alfa Aesar, Kandel, Germany) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) and diluted in medium (final DMSO concentration did not exceed 0.5 %). Cells ( $5 \times 10^3$  cells/well) were plated into 96-well flat-bottomed plates and incubated for 24 h. Then the dilutions of drugs were added to each well. The only medium without cells was used as a positive control, and the medium with 0.5% DMSO served as a negative control. After three days of incubation, the medium was removed and 100  $\mu$ L of 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazdium bromide (MTT, Life technologies, Oregon, USA) solution (0.5 mg/mL in medium) was added. After incubation for 3 h at 37 °C, the liquid was discarded, and the formed formazan crystals were dissolved in 50  $\mu$ L of DMSO. Complete solubilization of formazan crystals was achieved by short shaking. The absorbance was measured on a plate reader at 570 and 630 nm.  $EC_{50}$  values were calculated using Hill equation. Experiments were repeated three times.

### **Cell doubling time**

Prepared cell suspension of  $2 \times 10^4$  cells/mL was seeded in a 24-well plate ( $8 \times 10^3$  cells/ well). After 24, 48, 72, and 96 h, cells were washed twice with PBS, trypsinized and centrifuged at 1000 rpm for 4 min. Then the cells were resuspended in 200  $\mu$ L of fresh medium and counted in duplicates on



a hemocytometer. Cell doubling time ( $DT$ ) was estimated by the following formula (1) [18] to calculate each line and subline  $DT$ , where  $c_1$  and  $c_2$  are the number of cultured cells at the current ( $t_2$ ) and previous ( $t_1$ ).

$$DT = \frac{(\ln 2) \times (t_2 - t_1)}{\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)} \quad (1)$$

### **Influence of cell interactions on resistance to anticancer compounds in monolayer cells (2D model)**

The MTT assay was applied. Cell lines and sublines were mixed in three different ways: Group I consisted of MDA-MB-231 and sublines (D8, F5, H2), which were mixed at a 1:1 ratio with HF cells; Group II consisted of mixtures of sublines with MDA-MB-231 and HF, at a 1:1:2 ratio; Group III consisted of mixtures of sublines with each other, with the addition of HF, at a 1:1:2 ratio. The experiment was then carried out similarly to the sensitivity determination to compounds. After measurements, cell viability was assessed as a percentage.

### **Influence of cell interactions on resistance to anticancer compounds in spheroids (3D model)**

Cell spheroids were formed using the 3D Bioprinting method [122]. The required amount of cells from each line and subline were seeded into a 6-well plate. After 24 hours, NanoShuttle™ was added, and the cells were incubated at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> for 8 hours. After incubation, the prepared suspension was used for cell mixing (similarly to section 2.10), and 4000 cells/well were distributed into ultra-low attachment 96-well plates. These prepared plates with cells were placed on magnetic plates for 48 hours. After incubation, the culture medium was replaced with fresh medium containing 0.5 μM DOX or 0.05 μM PTX (control – 0.2 % DMSO). Spheroids were photographed, and the medium with compounds was changed every 48 hours. The size of the spheroids was measured using *ImageJ software version 1.53K*.

### **Study of doxorubicin transport into phenotypically different monolayer cells**

Cells were seeded into a 24-well plate on collagen-coated coverslips (40,000 cells/well). After 48 hours, the medium was replaced with fresh medium containing either 1 or 5 μM DOX (control with 0.2 % DMSO). The cells were incubated for 30, 60, 120, or 240 minutes. After incubation, the

cells were washed with PBS, fixed, stained for nuclei, and transferred to slides with a light-protective mounting medium (Golden ProLong). DOX transport into cells was assessed by fluorescence microscopy at 600× magnification, using DAPI and TRITC filters and DIC. Images were analyzed using ImageJ software version 1.53K to calculate the fluorescence intensity of DOX in cells and nuclei. For hypoxia conditions, the entire experiment was performed similarly, with 200 μM cobalt (II) chloride added to the medium to maintain hypoxia.

### **Study of doxorubicin transport into spheroids formed from different sublines**

The previously described method [122] was used to form spheroids. Cells were incubated with NanoShuttle™ nanoparticles at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> for 8 hours. After incubation, mixtures of cell line and subline suspensions with HF cells were prepared (ratio 1:2). Cells were seeded at 100 μL per well (4000 cells/well) in ultra-low attachment 96-well plates. Plates with cells were placed on magnetic plates and incubated for 48 hours until spheroids formed. After incubation, magnetic plates were removed, and the medium was replaced with fresh medium containing 10 μM DOX or 0.2 % DMSO (control). Spheroids were incubated for 1, 2, 4, or 8 hours, then carefully washed with PBS and fixed with 4 % PFA for 24 hours. DOX transport into spheroids was assessed by fluorescence microscopy.

### **Statistical analysis**

The statistical analysis was performed using *IBM SPSS Statistics 29.0.1.0* software. All experiments were conducted with at least three independent measurements. The obtained values are presented as the mean ± standard deviation. One-way ANOVA analysis was used to evaluate statistical significance, with post hoc Tukey tests applied to calculate p-values. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Isolation and characterization of phenotypically different sublines**

The MDA-MB-231 cell line exhibits significant genetic and phenotypic diversity, and its sublines (subpopulations/subclones) may show similarities to certain TNBC subtype cells [138]. To assess the characteristics of different sublines and the impact of their interactions on drug resistance, 24 sublines were isolated from the MDA-MB-231 triple-negative cell line using the

multiple cell suspension dilution method (Fig. 3.1.1 A). Literature indicates that the morphological features of isolated sublines are heritable and can be used as distinguishing characteristics [139]. Therefore, these sublines were selected based on morphological differences, colony density, and growth rate. Some of the selected sublines exhibited slow growth or ceased growing altogether. Considering all factors, seven sublines were selected for further cell characterization studies (Fig. 3.1.1 A, blue color). After characterizing the cells, the properties of all sublines were evaluated, and three of the most distinct sublines (Fig. 3.1.1 A, red color) were chosen for further studies. Compared to the MDA-MB-231 cell line, the **F5** and **E7** subline cells are shorter and have a more polygonal shape. The colonies formed by **F5** subline cells grow densely and compactly, and this characteristic persisted throughout all experiments. In contrast, the cells in the **D8** and **F7** colonies are more elongated and grow less densely compared to the **F5** subline cells. Among these, the **H2** subline is particularly distinctive with its oval (short) cell shape, and the colonies it forms are non-compact and scattered. The colonies of the **A9**, and **G5** sublines represent an intermediate form between the mentioned sublines and visually resemble the original MDA-MB-231 cell line. After assessing the morphological differences among the sublines, CD133 receptor expression was evaluated in the isolated sublines. CD133 is associated with cancer stem cells, which may have greater treatment resistance and the potential to cause tumor recurrence. By determining CD133 levels, differences between cell populations can be revealed, and it can be assessed whether the populations contain cells with stem-like properties, which could have important implications for treatment strategies and prognoses.

### **CD133 characterization in sublines**

CD133, also known as prominin-1, is a glycoprotein encoded by the PROM1 gene [140]. Cells expressing the CD133 receptor exhibit stem cell-like properties, including self-renewal, differentiation, rapid proliferation, and resistance to standard chemotherapy treatments [141]. CD133 expression is often dysregulated in various types of cancer cells, including those in TNBC and BRCA1-associated tumors [142]. Although the exact function of CD133 in cancer cells is not fully understood, increased expression of this receptor in cancer cells is associated with a more aggressive cancer phenotype and resistance to chemotherapeutic agents, potentially due to altered PI3K/Akt signaling pathways in breast cancer cells [143].

The activation of the PI3K/Akt signaling pathway in several types of cancer cells, including breast cancer cells, has been found to enhance cell proliferation, invasion into surrounding tissues, and contribute to multidrug

resistance and metastasis formation [144,145]. Additionally, activation of the PI3K/Akt signaling pathway promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT), which in turn strengthens TGF- $\beta$  receptor signaling, maintaining hyperactive PI3K/Akt signaling and contributing to breast cancer metastasis [145]. Increased CD133 expression has been identified in cancer-initiating cells across various tumor types, including breast cancer stem cells (CSCs) [144]. Therefore, the CD133 expression was first determined in the subline cells to identify the potential presence of a CSC phenotype (Fig. 3.1.2 B). To visualize the localization of CD133 receptors within the cells, an immunofluorescence staining method was chosen. This method revealed that the highest expression of the CD133 receptor was observed in **F5** subline cells compared to other sublines (Fig. 3.1.2 B). CD133 expression in MDA-MB-231 cell populations was first identified in 1997 [146], and since then, several research groups have detected CD133-positive populations within the MDA-MB-231 cell line. Researchers have also noted changes in cell growth, migration, invasion, and drug resistance in these populations compared to the parental MDA-MB-231 cell line [140,147,148].

In the **F5** subline cells, CD133 expression was found to be 31% higher compared to the MDA-MB-231 cell line (Fig. 3.1.2 A). Cells with increased CD133 expression tend to exhibit a larger adhesion area [147], a characteristic also observed in our **F5** subline, where trypsinization took twice as long as in other sublines during cell culture. Additionally, CD133-positive cells typically display lower proliferation and migration rates [149]. In the other sublines we isolated — **A9**, **D8**, **E7**, **F7**, **G5**, and **H2** — CD133 expression was found to be 21 % to 57 % lower than in the MDA-MB-231 cell line. Given the statistically significant differences in CD133 receptor expression among these sublines, we proceeded to conduct cell migration studies.

### **Migration Ability of Sublines**

Cancer cell migration is one of the key indicators of cancer progression, particularly in the context of metastasis. This spread of cancer cells leads to the formation of distant metastases and the development of secondary tumors far from the primary tumor site. This process is a major cause of mortality in cancer patients. Cancer cell migration is a complex process influenced by several mechanisms, including epithelial-mesenchymal transition (EMT), chemotaxis, reduced cell-cell adhesion, alterations in the extracellular matrix, and gene mutations [150].

In this study, we employed the “wound healing” assay, a commonly used method to evaluate cell migration *in vitro*. The study revealed different migration rates among the various sublines (Fig. 3.2.1 B). By assessing

changes in the wound area after 72 hours, we compared the results across the sublines (Fig. 3.2.1 A). The **A9** subline cells exhibited the slowest migration. After 72 hours, the “wound” area was 19 % larger compared to the wound area of the MDA-MB-231 cells (Fig. 3.2.1 A). In contrast, the **H2** subline cells showed the fastest migration, with the wound area being 38 % smaller than that of the MDA-MB-231 cell line after 72 hours. Additionally, the **D8**, **F7**, and **G5** subline cells also demonstrated faster migration, with wound areas 20–30 % smaller than the MDA-MB-231 wound area after the same period. The wound areas for the **E7** and **F5** subline cells did not significantly differ from the MDA-MB-231 wound area. These results indicate that the isolated sublines differ from the parental MDA-MB-231 cell line.

Many researchers also isolate sublines from the MDA-MB-231 cell line to study the properties of different populations. For instance, Pardillos et al. isolated three different cell clones from the MDA-MB-231 cell line but did not find statistically significant differences in migration among these clones [151]. Similarly, Hershey et al. assessed the migration and migration speed of different clones derived from the MDA-MB-231 cell line and also found no significant differences. This group determined that cell migration speed is influenced by population density and cell-cell interactions through soluble factors [152]. However, a study by Amaro and colleagues showed that at least two sublines within the MDA-MB-231 cell line exhibit a greater ability to migrate compared to the parental MDA-MB-231 cell line [106]. Additionally, it was found that a DOX-resistant MDA-MB-231 subline had a migration rate four times higher than that of the wild-type MDA-MB-231 cells [153].

## **Cell resistance to anticancer compounds - doxorubicin and paclitaxel**

### *Resistance to doxorubicin*

DOX is one of the most used chemotherapeutic agents in treating various cancers, including TNBC [153]. DOX belongs to the anthracycline class of drugs, which intercalates into double-stranded DNA, inhibits the activity of topoisomerase II, and leads to the formation of free radicals, ultimately resulting in the inhibition of cell proliferation and cell death. However, resistance to chemotherapeutic agents is a common challenge in cancer treatment. The mechanisms leading to drug resistance are diverse, including increased drug metabolism, enhanced DNA damage repair, gene mutations, amplifications, epigenetic changes, and interactions between phenotypically distinct tumor populations [59]. Therefore, it is important to assess the sensitivity/resistance of the isolated sublines to anticancer agents to gather more information about the phenotypic characteristics of each subline.

The sensitivity of the sublines isolated from the MDA-MB-231 cell line to anticancer agents was evaluated using the MTT viability assay. Cell viability was assessed after 72 hours of incubation with DOX. The results showed that the **H2** subline cells are approximately 1.5 times more resistant to DOX compared to the MDA-MB-231 cell line (Fig. 3.3.1). After 72 hours, the  $EC_{50}$  value for the **H2** subline cells was  $175.4 \pm 4.4$  nM, while the  $EC_{50}$  value for the MDA-MB-231 cells was  $126.7 \pm 1.6$  nM. The **A9** subline cells were found to be 1.15 times less resistant to DOX compared to the MDA-MB-231 cells, with an  $EC_{50}$  of  $145.2 \pm 5.6$  nM. The **E7**, **F5**, and **G5** subline cells were twice as sensitive to DOX ( $EC_{50}$  values after 72 hours were  $77.7 \pm 11.2$  nM and  $55.9 \pm 7.2$  nM, respectively) compared to the MDA-MB-231 cell line. No statistically significant difference was found in the **D8** subline cells compared to the MDA-MB-231 cell line.

Interestingly, the **A9** subline cells exhibited the slowest migration rate but were 1.15 times more resistant to DOX than the MDA-MB-231 cell line. This resistance in the **A9** subline might be associated with its slow migration, which is also linked to reduced cell proliferation. DOX primarily affects rapidly proliferating cells [154]. In contrast, the highest resistance in the **H2** subline could be related to its ability to migrate rapidly. Cells that migrate faster often display a more aggressive and drug-resistant phenotype [155].

Literature reports indicate that the  $EC_{50}$  values for MDA-MB-231 cells are approximately  $160 \pm 0.02$  nM [156], a concentration like that observed in the **H2** subline cells. Other studies have reported a lower  $EC_{50}$  value for the MDA-MB-231 cell line, around 140 nM [157]. Paramanatham et al. developed a DOX-resistant MDA-MB-231 cell line, and their studies revealed that the DOX-resistant line was more than twice as resistant to DOX, with an  $EC_{50}$  of 14.3  $\mu$ M, compared to the wild-type phenotype, which had an  $EC_{50}$  of 6.5  $\mu$ M [153].

These findings suggest that the **H2** subline's  $EC_{50}$  value is within the range of what has been observed in MDA-MB-231 cells in other studies, reinforcing the notion that this subline might share resistance characteristics with the DOX-resistant variants reported in the literature. The variability in  $EC_{50}$  values across different studies highlights the importance of context-specific assessments, particularly when considering the genetic and phenotypic diversity within cell lines like MDA-MB-231.

### *Resistance to paclitaxel*

Like DOX, PTX is one of the most used drugs in treating TNBC. Once inside the cells, PTX binds to microtubules, stabilizing them and disrupting their processes of unwinding and depolymerization, which inhibits cell division [158].

The study results with PTX mirrored those observed with DOX. The H2 subline exhibited the highest resistance to PTX, being 1.3 times more resistant compared to the MDA-MB-231 cell line (Fig. 3.3.2). The  $EC_{50}$  after 72 hours was  $72.6 \pm 2.1$  nM, while the  $EC_{50}$  for the MDA-MB-231 cell line was  $55.2 \pm 2.8$  nM. The **A9** and **F7** subline cells were the most sensitive to PTX, with  $EC_{50}$  values of  $43.9 \pm 1.8$  nM and  $46.9 \pm 4.5$  nM, respectively, after 72 hours. No statistically significant differences in sensitivity or resistance to PTX were observed in the **D8**, **E7**, **F5**, and **G5** sublines.

The results from a study by Kenicer et al. reported that the  $EC_{50}$  for the MDA-MB-231 cell line after 72 hours of incubation with PTX was 1.6 nM. This research team developed two MDA-MB-231 cell lines resistant to 25 and 50 nM PTX, with  $EC_{50}$  values that were 19–56 times higher (29.61–89.98 nM, respectively) compared to the wild-type MDA-MB-231 cell line [159].

In summary, the H2 subline's resistance to PTX is comparable to that of the PTX-resistant lines developed by Kenicer et al., suggesting that the H2 subline naturally possesses increased resistance to PTX and significantly differs from the MDA-MB-231 cell line. The H2 subline exhibited the highest resistance to both DOX and PTX, while the F5 and F7 sublines were the most sensitive to DOX, and the F7 subline was the most sensitive to PTX.

### **Selection of sublines for cell interaction studies**

In our characterization of the sublines derived from the MDA-MB-231 cell line, we evaluated CD133 expression, cell migration abilities, and resistance to DOX and PTX. From these assessments, we selected three sublines—**F5**, **D8**, and **H2**—that exhibited the most distinct characteristics for further study (Table 3.3.1). The **F5** subline formed compact, tightly connected colonies with a polygonal shape, differing from the typical MDA-MB-231 cells, and showed the highest CD133 expression, being 31 % higher than in the parental cell line. **F5** cells were also 50 % more sensitive to DOX and migrated more slowly than MDA-MB-231 cells. The **D8** subline, on the other hand, had the lowest CD133 expression, 50 % lower than MDA-MB-231, and demonstrated a 20 % higher migration rate. While **D8** cells were 4.2 % more resistant to DOX, they were 10 % more sensitive to PTX. Lastly, the **H2** subline was distinguished by its 26 % lower CD133 expression, along with significant drug resistance, being 38 % more resistant to DOX and 31 % more resistant to PTX compared to MDA-MB-231, and it also exhibited the fastest migration rate among the sublines. These findings underscore the phenotypic diversity within the MDA-MB-231 cell line and the importance of considering subline-specific traits in cancer research and treatment strategies.

## **Doubling time of selected MDA-MB-231 sublines**

After selecting the three most distinct MDA-MB-231 sublines (**D8**, **F5**, and **H2**), we measured the cell doubling time to assess their proliferation rates. This test is crucial as it provides insights into the proliferation speed of cells, which is particularly important when studying the effects of anticancer agents that target rapidly dividing cells [160]. The doubling time for the MDA-MB-231 cell line was approximately 20 hours (Fig. 3.4.1).

The doubling times for the isolated sublines differed from the original MDA-MB-231 cell line. The **F5** subline had a doubling time of 21 hours, **D8** subline cells doubled in 15 hours, and the **H2** subline had the shortest doubling time of 12 hours. Notably, the doubling times for the **D8** and **H2** sublines were significantly shorter compared to the MDA-MB-231 cell line. According to scientific literature, the doubling time for the MDA-MB-231 cell line typically ranges between 25 and 30 hours, with some reports extending up to 48 hours [127,161,162]. However, there have been no reports of MDA-MB-231 sublines or clones exhibiting doubling times as short as 12–15 hours. This suggests that our study successfully isolated sublines capable of rapid cell division, which may contribute to their increased resistance to anticancer agents. This phenomenon is often observed in other studies where cells resistant to anticancer agents also exhibit faster proliferation [163,164].

The results obtained from this study will aid in interpreting the differential responses of the sublines to compound treatments and evaluating the outcomes of cell-cell interaction studies.

## **Effect of cell interactions on drug resistance in monolayer cultures**

### *2D cell culture interactions*

Recent research has increasingly focused on tumor heterogeneity, both in patient tumors and commercial cell lines. Studies consistently identify different cell populations within the same tumor or cell line. In many cases, researchers isolate and characterize these sublines, assessing various changes, including genetic, epigenetic, and marker variations [108,109]. While there is extensive information on the interaction of phenotypically distinct sublines with tumor microenvironment cells, studies exploring the interaction between different cancer cell sublines themselves are lacking. Although the importance of such interactions is discussed in scientific literature, similar studies have not been conducted to our knowledge. Therefore, we selected three phenotypically distinct sublines—**D8**, **F5**, and **H2**—to evaluate cell-cell interactions in vitro.

It is well-known that cell-cell interactions play a crucial role in tumor development and progression, allowing cancer cells to “reprogram” the tumor microenvironment. Interactions between cancer cells contribute to disease



progression and drug resistance [165]. For our cell interaction experiments, we created three different groups of cell combinations (Fig. 3.5.1).

**Group I:** This group involved mixing the isolated sublines (**D8, F5, H2**) and MDA-MB-231 cells with HF (human fibroblast) cells at a 1:2 ratio (Fig. 3.5.1, Group I). HF cells were included because it was challenging to form spheroids with only MDA-MB-231 cells; the addition of HF cells facilitated spheroid formation. Additionally, fibroblasts are a key component of the tumor microenvironment (TME) and significantly influence interactions between cancer and TME cells.

**Group II:** This group mixed the sublines with MDA-MB-231 and HF cells at a 1:1:2 ratio (Fig. 3.5.1, Group II). Including MDA-MB-231 cells was important to assess the interaction differences between specific sublines (**D8, F5, H2**) and the entire MDA-MB-231 population. These combinations aimed to determine the sublines' interactions with the parental MDA-MB-231 cell line and how these interactions affect drug resistance, given the high heterogeneity and genetic diversity within the MDA-MB-231 cell line [166].

**Group III:** This group consisted of mixing the sublines with each other, adding two parts of HF cells (Fig. 3.5.1, Group III). Mixing the sublines was intended to evaluate how each phenotype would influence the properties of the sublines and whether these properties would differ from the results observed when the sublines were tested individually, without combinations.

In all cell combinations, HF cells were used to simulate a tumor-like microenvironment. The interaction between fibroblasts and cancer cells occurs through the secretion of interleukin-6 (IL-6) and chemokine ligand 7 (CXCL7) [167]. Fibroblasts secrete IL-6, which plays a crucial role in the development of chemotherapeutic resistance (to DOX and PTX) [168], activates cell proliferation, and secretes CXCL7, which is responsible for the “self-renewal” function of cells [169]. These cytokines (IL-6 and CXCL7), along with CXCL12, FGF, HGF, IGF, PDGF, Wnt, MMPs, and VEGF [170], are involved in activating the PI3K/Akt (which promotes cell proliferation, invasion, and multidrug resistance [144]) and NF- $\kappa$ B (which is involved in cancer cell proliferation and angiogenesis [171]) signaling pathways. Additionally, fibroblasts secrete chemokine ligand 1 (CXCL1) and IL-8, which increase the expression of ABCG2 in cancer cells, leading to increased DOX efflux [172]. The transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) secreted by fibroblasts into the tumor microenvironment activates signaling pathways responsible for epithelial-mesenchymal transition (EMT), contributing to the development of DOX resistance [170].

For our experiments, the concentrations of DOX (0.5  $\mu$ M) and PTX (0.05  $\mu$ M) were the same across all combination groups, chosen based on the  $EC_{50}$  values determined in our previous studies. The MTT assay was selected

for cell interaction studies in a 2D model, allowing us to assess the impact of these compounds on cell viability.

After 72 hours of incubation with 0.5  $\mu\text{M}$  DOX, the viability of the individual **D8**, **F5**, and **H2** sublines (Fig. 3.5.2 A, B, and C) decreased by only 15–28%, indicating the inherent resistance of these sublines to DOX. However, when **F5** and **H2** subline cells were combined with HF cells, MDA-MB-231 cells, or with each other, viability decreased by 24–44%, suggesting that interactions with HF, MDA-MB-231, or other sublines increased sensitivity to DOX. In contrast, combining D8 subline cells with other cell types did not result in a statistically significant change in DOX sensitivity.

Opposite results were observed in experiments with PTX (Fig. 3.5.2 D, E, and F). When subline cells were combined with HF or MDA-MB-231 cells or with each other, resistance to PTX increased by 18–34% compared to the resistance of the sublines when tested alone. This suggests that cancer cell interaction with fibroblasts can alter the sensitivity of cancer cells to anticancer agents. Combinations of subline cells with fibroblasts in the presence of DOX, as well as **H2**-fibroblast combinations with PTX, were more sensitive to the anticancer agents than when these sublines were exposed to the drugs individually (Fig. 3.5.2 A, B, and F). On the other hand, **F5**-fibroblast-PTX and **D8**-fibroblast-PTX combinations were more resistant to the compounds compared to the viability of the cells when tested without combinations.

Similar observations were reported in the study by Landry et al. [12], who noted that the sensitivity/resistance of cell combinations to drugs depends on the phenotype of both cancer cells and fibroblasts. Several other studies have also confirmed that drug resistance decreases in cancer cell-fibroblast combinations [173,174], although in many cases, interactions between cancer cells and fibroblasts increase drug resistance [13,175].

## **Effect of cell interactions on drug resistance in 3D cultures – spheroids**

### *Cell interactions in 3D cultures*

In recent years, 3D cells cultures have become widely used in scientific research for testing new compounds and evaluating the effects of anticancer agents on three-dimensional cell cultures [176]. The advantages of magnetic 3D bioprinting include reproducibility, control over spheroid formation, and the ability to form spheroids from different cell types. This method is simple, allowing for the use of various drugs and cell combinations to form spheroids and assess the impact of cell interactions on drug resistance and changes in spheroid size. We applied this method to study cell interactions in a setting that mimics the tumor microenvironment.

In our 3D model studies, we used the same cell combinations as in the 2D model. However, no spheroid group was formed solely from cancer cells because MDA-MB-231 and its sublines did not form spheroids without the presence of HF cells.

Spheroids formed from **D8** subline and HF cells (Fig. 3.5.3 A and B) were more sensitive to PTX, with their size being 5 % smaller after 12 days compared to the control. Spheroids formed from **D8**, HF, and **H2** subline cells were more sensitive to both DOX and PTX, with sizes 18 % to 24 % smaller, respectively, compared to the control after 12 days. In contrast, spheroids formed from **F5**, HF, and MDA-MB-231 cells (Fig. 3.5.3 C and D) were 7 % larger after 12 days of PTX exposure compared to the control. Spheroids composed of **F5**, HF, and **H2** subline cells were 15 % to 29 % smaller in the presence of DOX or PTX compared to the control (Fig. 3.5.3 E and F).

In the 3D model, combining **H2** subline cells with HF, MDA-MB-231, F5, or D8 increased sensitivity to DOX and PTX compared to the control. In contrast, combining **F5** subline cells with MDA-MB-231 or D8 subline cells resulted in increased resistance to DOX and PTX compared to the control. Previous research has shown that cell-cell interactions in 3D cultures lead to increased secretion of various molecules (HGF, TGF- $\beta$ , VEGF, TNF $\alpha$ , FGF2, IL-6, and IL-8) by fibroblasts. It has been established that fibroblasts in 3D cultures secrete more signaling molecules than those grown in monolayers, demonstrating that cells grown in 3D conditions behave differently due to increased interactions [177]. Functional differences in fibroblasts under 2D and 3D conditions were observed based on HGF expression, which enhances the transition of cancer cells from localized carcinoma to invasive carcinoma and contributes to cancer resistance to treatment.

The increased resistance of **F5** subline cell combinations to DOX and PTX may be attributed to the higher CD133 expression in these cells (38 % higher in **F5** cells compared to MDA-MB-231). To evaluate the stability of CD133 expression in **F5** subline cells, immunofluorescent staining for CD133 was performed both immediately after isolating the **F5** subline and six months later, with no changes in CD133 expression observed. It is known that at least 16 different genes are involved in regulating CD133 expression, with TRIM28 being one of the key genes. Increased TRIM28 expression in cancer cells leads to greater aggressiveness and drug resistance, and the removal or inactivation of the TRIM28 gene significantly reduces CD133 expression [178]. Additionally, studies with ovarian cancer cells have shown that CD133 expression increases when cells are grown in 3D cultures [179]. This could explain why **F5** subline cells were more sensitive to anticancer drugs in the 2D model compared to the 3D model.

The interaction study in the 3D model revealed that the interaction of **D8** and **F5** cells with **H2** subline cells reduced their resistance to DOX and PTX compared to the control. Spheroids containing **H2** subline cells were smaller in size compared to spheroids from other groups.

### **DOX transport into phenotypically different 2D and 3D cell cultures**

#### *Doxorubicin transport in 2D cultures under normoxia*

The studies revealed that PTX and DOX differentially affect the viability of various sublines. To better understand these differences, we conducted a study on the transport of DOX into these sublines. DOX is particularly useful in transport studies due to its natural fluorescence, which facilitates the observation of its movement and accumulation within cells. Experiments were performed using both 2D and 3D cell models to expand our understanding of DOX transport under different conditions, which reflect varying levels of cell-cell interaction. Additionally, DOX transport was evaluated under normoxic and hypoxic conditions, as hypoxia is a characteristic feature of the tumor microenvironment and can influence drug transport. The results of this study are expected to provide insights into the differences among sublines and potential resistance mechanisms to anticancer drugs.

In the study, DOX concentrations of 1 and 5  $\mu\text{M}$  were used for 2D cell cultures, and 10  $\mu\text{M}$  was used for 3D cell cultures. Before assessing DOX transport into cells, we first evaluated the impact of these DOX concentrations on cell viability. This evaluation was crucial to ensure that the observed DOX transport occurred in viable cells and that the concentrations used did not cause significant cell death during the study period (up to 8 hours). The results showed that DOX had no statistically significant effect on cell viability (Fig. 3.6.1).

Scientific research indicates that it takes 5–15 minutes for DOX to enter the cytoplasm, about 1 hour to reach the nucleus, and apoptosis can be activated within a few hours of DOX entering the nucleus. However, observable effects of apoptosis, such as cell shrinkage and nuclear fragmentation, may only become apparent after several hours [180,181]. The overall cytotoxic effect of DOX on cell populations typically becomes evident after 24–48 hours, when decreases in viability and proliferation are observed [182].

#### *Doxorubicin transport in 2D cultures under normoxia*

DOX transport into the MDA-MB-231 cell line and sublines D8, F5, and H2 was assessed under normoxic conditions. Statistically significant DOX transport was observed only after the longest incubation time – 240 minutes.

At a 1  $\mu\text{M}$  DOX concentration, the highest DOX transport was observed in the cytoplasm of F5 subline cells, which was 1.5 times greater, and in the nucleus, which was 1.8 times greater compared to the other sublines (Fig. 3.6.2 A and B). In contrast, H2 subline cells exhibited 1.5 times less DOX transport in both the cytoplasm and the nucleus compared to the other sublines.

The ratio of DOX distribution between the cytoplasm and the nucleus did not significantly differ between the MDA-MB-231 cell line and its sublines (D8, F5, H2). The increased accumulation of DOX in the nucleus is due to its ability to intercalate into cellular DNA. This characteristic is influenced by DOX's hydrophilic nature (passive diffusion) and non-specific transport proteins that facilitate its active transport into the nucleus.

The study results indicated that at a 5  $\mu\text{M}$  DOX concentration, DOX transport and accumulation in the nuclei were 2.5 times greater than in the cytoplasm (Fig. 3.6.3 A and B). In contrast, at a 1  $\mu\text{M}$  DOX concentration, the distribution of DOX between the cytoplasm and nucleus was approximately equal. The highest transport—1.5 times greater—continued to be observed in F5 subline cells compared to the other sublines. The statistically significant increase in DOX transport in F5 subline cells suggests that these cells may have reduced or absent resistance mechanisms that would otherwise expel DOX from the intracellular environment. Meanwhile, in H2 subline cells, DOX accumulation was 2 times lower in both the cytoplasm and nucleus when incubated with 5  $\mu\text{M}$  DOX compared to the F5 subline, and 1.5 times lower compared to MDA-MB-231 and D8.

The differing DOX transport across sublines demonstrates that phenotypic differences in cells influence the drug's ability to enter the cells. Throughout the study, statistically significant differences in DOX transport were not observed at 30, 60, and 120 minutes of incubation; differences only became apparent after longer incubation times, indicating that MDA-MB-231 and its sublines require extended incubation to detect significant differences. Summarizing the DOX transport studies under normoxic conditions, it was found that at 1 or 5  $\mu\text{M}$  DOX concentrations, the distribution of DOX between the cytoplasm and nucleus varied. At a 1  $\mu\text{M}$  DOX concentration, transport into the nuclei was 1.7 times greater than into the cytoplasm, while at a 5  $\mu\text{M}$  concentration, transport into the nuclei was 2.6 times greater than into the cytoplasm. The most significant difference in DOX transport was observed in F5 subline cells, where DOX transport into the nuclei was 3.2 times greater than into the cytoplasm.

Given the importance of hypoxic conditions in solid tumors, it is crucial to assess how DOX transport changes under hypoxic conditions when investigating DOX transport into phenotypically distinct sublines.

### *Doxorubicin transport in 2D cultures under hypoxia*

Hypoxia, characterized by insufficient oxygen levels in tissues, is a common feature in breast and other solid tumors. The hypoxic tumor microenvironment is a factor in mutagenesis and cancer progression [183]. Tumor cells themselves contribute to the formation of hypoxia by activating angiogenesis, which replenishes the tumor with sufficient nutrients, thus promoting tumor growth and metastasis while causing structural and functional damage to the surrounding healthy tissues [184]. The formation of hypoxic conditions and the key factor in this process is hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), whose stabilization is often observed in malignant and more aggressive tumors [185,186].

To chemically induce hypoxic conditions *in vitro*, we used 200  $\mu\text{M}$  cobalt (II) chloride, a method widely employed in research [187,188].

DOX transport under hypoxic conditions was found to be significantly lower compared to normoxic results. Specifically, DOX transport into cells was 5 times lower at a 1  $\mu\text{M}$  concentration and 2 times lower at a 5  $\mu\text{M}$  concentration under hypoxia compared to normoxia (Fig. 3.6.4 and 3.6.5).

The highest DOX transport under these conditions was observed in F5 subline cells, where DOX fluorescence intensity was 2.5 times higher than in H2 subline cells and 2 times higher than in D8 and MDA-MB-231 cells (Fig. 3.6.4 A). However, no significant difference was observed in DOX transport into the nuclei of the phenotypically distinct sublines (Fig. 3.6.4 B). When using a higher DOX concentration (5  $\mu\text{M}$ ), differences in DOX transport into the cytoplasm and nuclei were identified (Fig. 3.6.5 C). No statistically significant difference in DOX transport into the cytoplasm of MDA-MB-231, D8, and F5 cells was detected after 240 minutes. However, in the H2 subline, DOX transport into the cytoplasm was 1.7 times lower compared to the other sublines (Fig. 3.6.5 A). DOX fluorescence intensity in cells was 2.5 times lower compared to normoxia at a 5  $\mu\text{M}$  concentration. It was found that DOX transport into nuclei was 2 times greater than into the cytoplasm, with the highest DOX transport observed in F5 subline cells. DOX transport under hypoxic conditions was 3 times lower compared to normoxia.

When comparing DOX transport into cells at different concentrations (1 and 5  $\mu\text{M}$ ) in a hypoxic environment, differences in intracellular distribution were observed. At a 1  $\mu\text{M}$  DOX concentration, transport into the nuclei was 1.4–2.2 times greater than in the cytoplasm. As the DOX concentration increased, the transport differences between the cytoplasm and nucleus also increased. At a 5  $\mu\text{M}$  concentration, 2–3.9 times more DOX was transported into the nuclei. The most significant difference between DOX accumulation in the cytoplasm and nucleus was found in H2 subline cells, where 3.8 times more DOX entered the nuclei.

Given the statistically significant differences in DOX transport among phenotypically distinct sublines in monolayer cultures, we extended the study to 3D cell cultures—spheroids. Spheroid studies will provide additional information on the impact of cell-cell interactions on DOX transport, as hypoxic regions naturally form within spheroids.

### **Doxorubicin transport in 3D cell cultures – spheroids**

MDA-MB-231 cells do not naturally form spheroids; therefore, fibroblasts, specifically the HF cell line in our case, are used to facilitate spheroid formation. Including fibroblasts in spheroid formation more accurately mimics the natural tumor microenvironment, allowing for a better understanding and assessment of the impact of cell-cell interactions on drug transport.

At the start of the experiment, the spheroids were approximately 390  $\mu\text{m}$  in diameter, with sizes ranging from 360 to 420  $\mu\text{m}$  across different groups. The largest and most irregularly shaped spheroids were formed from D8 subline cells, while the smallest and most compact spheroids were formed from H2 subline cells. The size of the spheroids remained consistent throughout the experiment and showed no significant changes between the control and experimental groups.

Statistically significant differences in DOX transport into the spheroids were observed after 8 hours of incubation (Fig. 3.6.6 A). The highest DOX transport was seen in spheroids formed from D8, F5, and MDA-MB-231 cells. In contrast, DOX transport into H2 cell spheroids was half that of the other groups (Fig. 3.6.6 A and B). The lower DOX transport into spheroids formed from H2 subline cells confirms the DOX resistance of this subline, as observed in previous studies. Spheroids formed from F5 subline cells did not show increased DOX transport compared to spheroids from other sublines.

The results of DOX transport in spheroids correlate with the findings from 2D model studies under hypoxic conditions, where no statistically significant differences were observed between the sublines, except for the H2 subline, which exhibited the lowest DOX accumulation. Since the spheroids in these studies were of sufficient size to develop hypoxic zones, DOX transport in the spheroids reflects the results obtained from monolayer cultures under hypoxic conditions.

### **Comparison of 2D and 3D cell interactions and doxorubicin transport studies**

In summarizing the research findings, we normalized and compared the results obtained from 2D and 3D cell interaction studies, as presented in Figure 3.7.1. All cell combinations were more sensitive to DOX but

exhibited reduced sensitivity to PTX compared to the sensitivity of cells when not combined. Resistance to PTX notably increased in the D8-F5-HF combination. It was found that subline combinations with MDA-MB-231 and HF cells were more sensitive to DOX than combinations of sublines alone. The interaction between cancer cells and fibroblasts, as documented in several scientific studies [174,189,190], shows that the interaction between cancer and stromal cells, as well as the extracellular matrix, enhances the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic drugs. It is believed that fibroblast-secreted factors increase drug permeability into cells. A large-scale study also demonstrated that the effect of cancer cell-fibroblast interaction on drug sensitivity or resistance is influenced by the origin of the fibroblasts used in *in vitro* studies, with results varying depending on the fibroblast type [12]. It is also important to note that prolonged interaction between cancer cells and fibroblasts, both *in vitro* and in solid tumors *in vivo*, can lead cancer cells to “reprogram” fibroblasts into cancer-associated fibroblasts (CAFs), whose secreted factors support cancer cell function. This specific fibroblast phenotype interaction with cancer cells significantly increases resistance to anticancer drugs [75,191–194].

In the 3D model, we observed that all cell combinations were more resistant to DOX and PTX, except for combinations with the H2 subline. Although the H2 subline was the most resistant to DOX when grown alone, its resistance decreased when combined with other cells. This observation aligns with findings by Landry and colleagues, who noted that combinations of TNBC cells with fibroblasts increased the sensitivity of the cells to anticancer compounds [12].

The DOX transport studies into phenotypically distinct MDA-MB-231 sublines provided additional insights into these sublines and offered valuable information on how DOX transport influences cell resistance and sensitivity. Additionally, we assessed how DOX transport changes under hypoxic conditions and compared these results with those obtained under normoxic conditions. These findings offer a deeper understanding of the role of environmental conditions in drug efficacy and resistance mechanisms. The summary of DOX transport results is presented in Figure 3.7.2.

The study of DOX transport into monolayer cultures revealed significant differences among phenotypically distinct sublines. We also observed significant differences in DOX accumulation between the cytoplasm and the nucleus when using 1 and 5  $\mu\text{M}$  DOX concentrations. Environmental conditions—normoxia and hypoxia—had a significant impact on DOX transport. All sublines exhibited significantly lower DOX transport under hypoxic conditions compared to normoxic conditions.



DOX transport into F5 subline cells was the highest under both normoxic and hypoxic conditions compared to the other sublines (Figure 3.7.2). DOX significantly reduced the viability of F5 subline cells, and transport studies showed increased DOX accumulation in the nuclei of F5 subline cells, a phenomenon also described in the scientific literature [195]. Often, in DOX-sensitive cells, there is no increased expression of transmembrane transporters (e.g., P-gp) in either the outer or nuclear membrane, leading to DOX accumulation [196]. Notably, under hypoxic conditions, DOX transport in F5 subline cells was three times lower than under normoxic conditions, suggesting that larger (over 100  $\mu\text{m}$ ) hypoxic tumors may be more resistant to treatment [197].

In contrast, the H2 subline showed the lowest DOX transport under both normoxic and hypoxic conditions (Figure 3.7.3). The H2 subline is known to be resistant to DOX, as DOX cannot reach the nucleus and accumulates in low concentrations in the cytoplasm, with most of it being expelled into the extracellular environment [195]. At higher DOX concentrations (5  $\mu\text{M}$ ), some of the drug reaches the nucleus. Under hypoxic conditions, DOX transport into the cytoplasm decreased sevenfold, and into the nucleus, fivefold, compared to normoxic conditions.

DOX transport experiments in MDA-MB-231 and D8 subline cells showed no significant differences and represented an intermediate response between the F5 and H2 sublines, consistent with previous studies. Although D8 cells were more sensitive to DOX, there were no transport differences between the lines.

There was no statistically significant difference in DOX transport between MDA-MB-231, D8, and F5 spheroids. The H2 subline spheroids exhibited the lowest DOX fluorescence intensity. The study results align with other research findings that indicate the tumor microenvironment significantly affects drug transport and efficacy [198].

In summary, the comparison of DOX transport and its effectiveness in 2D and 3D cell cultures revealed differences in DOX's impact on cell viability and the influence of DOX on spheroid size (Figure 3.7.3).

Two sublines—F5 and H2—stood out throughout the study. The F5 subline was the most sensitive to DOX due to significant DOX accumulation in both 2D and 3D models. Additionally, in the presence of DOX, spheroids formed from F5 subline cells grew significantly more slowly (Figure 3.7.3). The F5 subline did not exhibit resistance to DOX; instead, it was highly sensitive. The sensitivity of the F5 subline to DOX may be linked to genetic and epigenetic modifications that reduce transporter protein activity, leading to higher intracellular DOX concentration [54]. Increased DOX accumulation

in F5 subline cells may also be due to changes in lipid metabolism and membrane permeability, which can enhance drug transport. As a result, DOX actively affects the cells by intercalating into DNA molecules, disrupting topoisomerase II activity [199], and leading to cell death, despite these cells exhibiting cancer stem cell-like properties.

On the other hand, the H2 subline consistently demonstrated resistance to DOX throughout the study. DOX transport studies showed that DOX transport and accumulation in H2 subline cells were minimal. Similarly, low DOX transport was observed in cell spheroids. The resistance of the H2 subline may be attributed to several resistance mechanisms, including increased drug efflux, resulting in reduced drug accumulation within the cells [200]. This resistance in the H2 subline could be analogous to the mesenchymal subtype of TNBC, which is characterized by significantly increased expression of multidrug resistance pumps [53].

In conclusion, our study successfully revealed differences in drug resistance due to interactions between phenotypically distinct sublines. Moreover, we found that DOX transport and its distribution within cells vary among phenotypically distinct sublines. This enhanced understanding of drug resistance mechanisms may contribute to the development of more effective treatment strategies for different TNBC subtypes in the future.

## CONCLUSIONS

1. Seven phenotypically distinct sublines were isolated from the triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell line. The sublines D8, F5, E7, F7, and H2 showed the most pronounced morphological differences from the parental line. Cells from the H2 subline exhibited the highest resistance to doxorubicin and paclitaxel, while the F5 subline showed the least resistance to doxorubicin compared to the MDA-MB-231 cell line. Among doxorubicin-sensitive F5 subline cells, the highest CD133 receptor expression was observed compared to the MDA-MB-231 line. The H2 subline cells, which are resistant to doxorubicin and paclitaxel, proliferate and migrate the fastest, while A9 subline cells migrate more slowly compared to the MDA-MB-231 line.
2. In monolayer cultures, combining the triple-negative breast cancer sublines D8, F5, and H2 with fibroblasts, MDA-MB-231, or among themselves, decreases resistance to doxorubicin. The combination of rapidly migrating D8 cells with doxorubicin-sensitive F5 cells increases resistance to paclitaxel in monolayer cultures, but not in spheroids. Combining doxorubicin and paclitaxel-resistant H2 cells with rapidly migrating D8 cells or doxorubicin-sensitive F5 cells increases resistan-

ce to paclitaxel in monolayers, but decreases resistance to both drugs in spheroids.

3. Doxorubicin transport into the D8, F5, and H2 sublines depends on cell phenotypic characteristics and oxygen concentration in the environment. Under normoxic conditions, more doxorubicin enters the doxorubicin-sensitive F5 subline cells and the least amount enters the doxorubicin-resistant H2 subline cells. Doxorubicin accumulation in cells depends on its concentration in the medium: at lower concentrations, the compound is more evenly distributed between the cytoplasm and nucleus, while at higher concentrations, it accumulates more in the nucleus. Under hypoxic conditions, doxorubicin transport into the D8, F5, and H2 sublines decreases, but the trend remains the same: the least amount of the compound enters the doxorubicin-resistant H2 subline cells and the most enters the F5 subline cells compared to MDA-MB-231 cells.
4. Doxorubicin transport into spheroids formed from doxorubicin-resistant H2 subline cells was lower compared to MDA-MB-231 spheroids, similar to the monolayer cultures. In spheroids of doxorubicin-sensitive F5 subline cells, no increased doxorubicin accumulation was observed, although it was highest in monolayer cultures. Doxorubicin transport into D8 and F5 subline spheroids was the same as into MDA-MB-231 spheroids.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Smith D, Thomson K, Bambra C, Todd A. The breast cancer paradox: A systematic review of the association between area-level deprivation and breast cancer screening transport in Europe. *Cancer Epidemiol*. 2019 Jun;60:77–85.
3. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Subtypes of Breast Cancer. In: Mayrovitz HN, editor. *Breast Cancer* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 [cited 2024 Jan 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/>
4. Roshanzamir F, Robinson JL, Cook D, Karimi-Jafari MH, Nielsen J. Metastatic triple negative breast cancer adapts its metabolism to destination tissues while retaining key metabolic signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Aug 30;119(35):e2205456119.
5. Burguin A, Diorio C, Durocher F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *J Pers Med*. 2021 Aug 19;11(8):808.
6. Wu Q, Siddharth S, Sharma D. Triple Negative Breast Cancer: A Mountain Yet to Be Scaled Despite the Triumphs. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 23;13(15):3697.
7. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PloS one*. 2016;11(6):1–22.
8. Asleh K, Riaz N, Nielsen TO. Heterogeneity of triple negative breast cancer: Current advances in subtyping and treatment implications. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2022 Sep 1;41(1):265.
9. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*. 2020;22(1):1–13.
10. Zhao S, Zuo WJ, Shao ZM, Jiang YZ. Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. *Annals of Translational Medicine*. 2020 Apr;8(7):499–499.
11. Naz F, Shi M, Sajid S, Yang Z, Yu C. Cancer stem cells: a major culprit of intra-tumor heterogeneity. *Am J Cancer Res*. 2021 Dec 15;11(12):5782–811.
12. Landry BD, Leete T, Richards R, Cruz-Gordillo P, Schwartz HR, Honeywell ME, et al. Tumor-stroma interactions differentially alter drug sensitivity based on the origin of stromal cells. *Mol Syst Biol* [Internet]. 2018 Aug [cited 2023 Mar 7];14(8). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/msb.20188322>
13. Ni Y, Zhou X, Yang J, Shi H, Li H, Zhao X, et al. The Role of Tumor-Stroma Interactions in Drug Resistance Within Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol*. 2021 May 20;9:637675.
14. Li C, Zhou T, Chen J, Li R, Chen H, Luo S, et al. The role of Exosomal miRNAs in cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2022 Jan 3;20(1):6.
15. Khan SU, Fatima K, Aisha S, Malik F. Unveiling the mechanisms and challenges of cancer drug resistance. *Cell Communication and Signaling*. 2024 Feb 12;22(1):109.
16. Bauer JA, Chakravarthy AB, Rosenbluth JM, Mi D, H E, Granja-ingram NDM, et al. Identification of Markers of Taxane Sensitivity Using Proteomic and Genomic Analyses of Breast Tumors from Patients Receiving Neoadjuvant Paclitaxel and Radiation. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;16(2):681–90.
17. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, et al. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells*. 2023 Feb 19;12(4):659.

18. Xu F, Wang F, Yang T, Sheng Y, Zhong T, Chen Y. Differential drug resistance acquisition to doxorubicin and paclitaxel in breast cancer cells. *Cancer Cell International*. 2014 Dec 21;14(1):538.
19. Sanchez-Carranza JN, González-Maya L, Razo-Hernández RS, Salas-Vidal E, Nolasco-Quintana NY, Clemente-Soto AF, et al. Achillin Increases Chemosensitivity to Paclitaxel, Overcoming Resistance and Enhancing Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line Resistant to Paclitaxel (Hep3B/PTX). *Pharmaceutics*. 2019 Oct;11(10):512.
20. Gottesman MM, Pastan IH. The Role of Multidrug Resistance Efflux Pumps in Cancer: Revisiting a JNCI Publication Exploring Expression of the MDR1 (P-glycoprotein) Gene. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(9):4–6.
21. Frontiers | Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance [Internet]. [cited 2024 Jul 23]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.648407/full>
22. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol*. 2007 Apr 12;117(1):6–15.
23. Shaath H, Elango R, Alajez NM. Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (lncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic lncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*. 2021 Jan;13(21):5350.
24. Miah S, Bagu E, Goel R, Ogunbolude Y, Dai C, Ward A, et al. Estrogen receptor signaling regulates the expression of the breast tumor kinase in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2019 Jan 16;19(1):78.
25. Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Seminars in Cancer Biology*. 2018 Oct 1;52:56–73.
26. Kwak Y, Jang SY, Choi JY, Lee H, Shin DS, Park YH, et al. Progesterone Receptor Expression Level Predicts Prognosis of Estrogen Receptor-Positive/HER2-Negative Young Breast Cancer: A Single-Center Prospective Cohort Study. *Cancers*. 2023 Jan;15(13):3435.
27. Budi HS, Ahmad FN, Achmad H, Ansari MJ, Mikhailova MV, Suksatan W, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor (CAR) for tumor immunotherapy; recent progress. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022 Jan 29;13(1):40.
28. Abbasvandi F, Bayat M, Akbari A, Shojaeian F, Zandi A, Rahmani J, et al. Tumor characteristics and survival rate of HER2-low breast cancer patients: a retrospective cohort study. *Sci Rep*. 2023 Oct 4;13(1):16719.
29. Davey MG, Hynes SO, Kerin MJ, Miller N, Lowery AJ. Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 3;13(17):4455.
30. Sharma JD, Khanna S, Ramchandani S, Kakoti LM, Baruah A, Mamidala V. Prevalence of Molecular Subtypes of Breast Carcinoma and Its Comparison between Two Different Age Groups: A Retrospective Study from a Tertiary Care Center of Northeast India. *South Asian J Cancer*. 2021 Dec;10(04):220–4.
31. Cava C, Armaos A, Lang B, Tartaglia GG, Castiglioni I. Identification of long non-coding RNAs and RNA binding proteins in breast cancer subtypes. *Sci Rep*. 2022 Jan 13;12(1):693.
32. Brenton JD, Carey LA, Ahmed A, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(29):7350–60.
33. Lehmann BDB, Bauer J a J, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy a B, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(7):2750–67.

34. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Fuqua SAW, Savage MI, et al. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(7):1688–98.
35. Jézéquel P, Loussouarn D, Guérin-Charbonnel C, Campion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: Importance of immune response. *Breast Cancer Research*. 2015;17(1):1–16.
36. Stirzaker C, Zotenko E, Song JZ, Qu W, Nair SS, Locke WJ, et al. Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nat Commun*. 2015 Feb 2;6(1):5899.
37. Liu YR, Jiang YZ, Xu XE, Yu KD, Jin X, Hu X, et al. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2016 Mar 15;18(1):33.
38. Masuda H, Qi Y, Liu S, Hayashi N, Kogawa T, Hortobagyi GN, et al. Reverse phase protein array identification of triple-negative breast cancer subtypes and comparison with mRNA molecular subtypes. *Oncotarget*. 2017 Sep 19;8(41):70481–95.
39. Jiang YZ, Ma D, Suo C, Shi J, Xue M, Hu X, et al. Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. *Cancer Cell*. 2019 Mar 18;35(3):428-440.e5.
40. DiNome ML, Orozco JIJ, Matsuba C, Manughian-Peter AO, Ensenyat-Mendez M, Chang SC, et al. Clinicopathological Features of Triple-Negative Breast Cancer Epigenetic Subtypes. *Ann Surg Oncol*. 2019 Oct;26(10):3344–53.
41. Gong Y, Ji P, Yang YS, Xie S, Yu TJ, Xiao Y, et al. Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. *Cell Metabolism*. 2021 Jan 5;33(1):51-64.e9.
42. Asleh K, Negri GL, Spencer Miko SE, Colborne S, Hughes CS, Wang XQ, et al. Proteomic analysis of archival breast cancer clinical specimens identifies biological subtypes with distinct survival outcomes. *Nat Commun*. 2022 Feb 16;13(1):896.
43. Elsawaf Z, Sinn HP, Rom J, Bermejo JL, Schneeweiss A, Aulmann S. Biological subtypes of triple-negative breast cancer are associated with distinct morphological changes and clinical behaviour. *Breast*. 2013 Oct;22(5):986–92.
44. Davis AA, Jacob S, Gerratana L, Shah AN, Wehbe F, Katam N, et al. Landscape of circulating tumour DNA in metastatic breast cancer. *EBioMedicine*. 2020 Aug;58:102914.
45. Ma D, Chen SY, Ren JX, Pei YC, Jiang CW, Zhao S, et al. Molecular Features and Functional Implications of Germline Variants in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2021 Jul 1;113(7):884–92.
46. Wang L, Lang GT, Xue MZ, Yang L, Chen L, Yao L, et al. Dissecting the heterogeneity of the alternative polyadenylation profiles in triple-negative breast cancers. *Theranostics*. 2020;10(23):10531–47.
47. Orozco JIJ, Knijnenburg TA, Manughian-Peter AO, Salomon MP, Barkhoudarian G, Jalas JR, et al. Epigenetic profiling for the molecular classification of metastatic brain tumors. *Nat Commun*. 2018 Nov 6;9(1):4627.
48. Shibata S, Sogabe S, Miwa M, Fujimoto T, Takakura N, Naotsuka A, et al. Identification of the first highly selective inhibitor of human lactate dehydrogenase B. *Sci Rep*. 2021 Nov 1;11(1):21353.
49. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Current Oncology*. 2022 May;29(5):3044–60.
50. Krishna Vadlapatla R, Dutt Vadlapudi A, Pal D, K. Mitra A. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy: Coordinated Role and Regulation of Efflux

- Transporters and Metabolizing Enzymes. *Current Pharmaceutical Design*. 2013 Dec 1;19(40):7126–40.
51. He J, Fortunati E, Liu DX, Li Y. Pleiotropic Roles of ABC Transporters in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 21;22(6):3199.
  52. Němcová-Fürstová V, Kopperová D, Balušíková K, Ehrlichová M, Brynychová V, Václavíková R, et al. Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016 Nov 1;310:215–28.
  53. Kinnel B, Singh SK, Oprea-Ilieș G, Singh R. Targeted Therapy and Mechanisms of Drug Resistance in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023 Feb 19;15(4):1320.
  54. Fultang N, Chakraborty M, Peethambaran B. Regulation of cancer stem cells in triple negative breast cancer. *CDR [Internet]*. 2021 [cited 2024 Apr 15]; Available from: <https://www.oaepublish.com/articles/cdr.2020.106>
  55. Henneman L, van Miltenburg MH, Michalak EM, Braumuller TM, Jaspers JE, Drenth AP, et al. Selective resistance to the PARP inhibitor olaparib in a mouse model for BRCA1-deficient metaplastic breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS*. 2015 Jul 7;112(27):8409–14.
  56. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. 2018 Jan;553(7686):96–100.
  57. Zhang Z, Zhang R, Li D. Molecular Biology Mechanisms and Emerging Therapeutics of Triple-Negative Breast Cancer. *BTT*. 2023 Sep;Volume 17:113–28.
  58. Hill DP, Harper A, Malcolm J, McAndrews MS, Mockus SM, Patterson SE, et al. Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: multiple mechanisms of resistance. *BMC Cancer*. 2019 Dec;19(1):1039.
  59. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Jan;21(9):3233.
  60. Zhu J, Zou Z, Nie P, Kou X, Wu B, Wang S, et al. Downregulation of microRNA-27b-3p enhances tamoxifen resistance in breast cancer by increasing NR5A2 and CREB1 expression. *Cell Death Dis*. 2016 Nov;7(11):e2454–e2454.
  61. Lehmann BD, Colaprico A, Silva TC, Chen J, An H, Ban Y, et al. Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nat Commun*. 2021 Nov 1;12(1):6276.
  62. Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett JMS. EMT in Breast Carcinoma—A Review. *J Clin Med*. 2016 Jul 14;5(7):65.
  63. Huang Y, Hong W, Wei X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis. *Journal of Hematology & Oncology*. 2022 Sep 8;15(1):129.
  64. Drug resistance and combating drug resistance in cancer [Internet]. [cited 2024 Feb 2]. Available from: <https://www.oaepublish.com/articles/cdr.2019.10>
  65. Thomas P, Pranathartha A, Ross C, Srivastava S. RhoC: a fascinating journey from a cytoskeletal organizer to a Cancer stem cell therapeutic target. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019 Jul 24;38(1):328.
  66. Nedeljković M, Damjanović A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. *Cells*. 2019 Sep;8(9):957.
  67. Xu Z, Zhang Y, Dai H, Han B. Epithelial–Mesenchymal Transition-Mediated Tumor Therapeutic Resistance. *Molecules*. 2022 Jul 25;27(15):4750.
  68. Li Y, Wang Z, Ajani JA, Song S. Drug resistance and Cancer stem cells. *Cell Commun Signal*. 2021 Dec;19(1):19.
  69. Ismaeel GL, Abdul-Hussein AH, Qasim HM, Abed NK, Jalil AT, Suleiman AA, et al. Therapeutic targeting of dormant cancer stem cells in solid tumors. *Gene Reports*. 2023 Mar 1;30:101717.

70. Karamanos NK, Theocharis AD, Neill T, Iozzo RV. Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biology*. 2019 Jan 1;75–76:1–11.
71. Tai K, Cockburn K, Greco V. Flexibility sustains epithelial tissue homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*. 2019 Oct 1;60:84–91.
72. Brückner DB, Arlt N, Fink A, Ronceray P, Rädler JO, Broedersz CP. Learning the dynamics of cell–cell interactions in confined cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021 Feb 16;118(7):e2016602118.
73. Nishida-Aoki N, Gujral TS. Emerging approaches to study cell-cell interactions in tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2019 Jan 22;10(7):785–97.
74. Peng Q, Zhao L, Hou Y, Sun Y, Wang L, Luo H, et al. Biological characteristics and genetic heterogeneity between carcinoma-associated fibroblasts and their paired normal fibroblasts in human breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(4):e60321.
75. Yang D, Liu J, Qian H, Zhuang Q. Cancer-associated fibroblasts: from basic science to anticancer therapy. *Exp Mol Med*. 2023 Jul;55(7):1322–32.
76. Gao D, Fang L, Liu C, Yang M, Yu X, Wang L, et al. Microenvironmental regulation in tumor progression: Interactions between cancer-associated fibroblasts and immune cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023 Nov 1;167:115622.
77. Baroni S, Romero-Cordoba S, Plantamura I, Dugo M, D'Ippolito E, Cataldo A, et al. Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. *Cell Death Dis*. 2016 Jul;7(7):e2312–e2312.
78. Cosentino G, Romero-Cordoba S, Plantamura I, Cataldo A, Iorio MV. miR-9-Mediated Inhibition of EFEMP1 Contributes to the Acquisition of Pro-Tumoral Properties in Normal Fibroblasts. *Cells*. 2020 Sep;9(9):2143.
79. Gao Y, Li X, Zeng C, Liu C, Hao Q, Li W, et al. CD63+ Cancer-Associated Fibroblasts Confer Tamoxifen Resistance to Breast Cancer Cells through Exosomal miR-22. *Advanced Science*. 2020;7(21):2002518.
80. Sansone P, Berishaj M, Rajasekhar VK, Ceccarelli C, Chang Q, Strillacci A, et al. Evolution of Cancer Stem-like Cells in Endocrine-Resistant Metastatic Breast Cancers Is Mediated by Stromal Microvesicles. *Cancer Research*. 2017 Apr 15;77(8):1927–41.
81. Liu Y, Zhang J, Sun X, Su Q, You C. Down-regulation of miR-29b in carcinoma associated fibroblasts promotes cell growth and metastasis of breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Apr 16;8(24):39559–70.
82. Yan W, Wu X, Zhou W, Fong MY, Cao M, Liu J, et al. Cancer-cell-secreted exosomal miR-105 promotes tumour growth through the MYC-dependent metabolic reprogramming of stromal cells. *Nat Cell Biol*. 2018 May;20(5):597–609.
83. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2019 Jun;19(6):369–82.
84. Tumor-Associated Macrophage - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cited 2024 Feb 23]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/tumor-associated-macrophage>
85. Ireland LV, Mielgo A. Macrophages and Fibroblasts, Key Players in Cancer Chemoresistance. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Oct 9;6:131.
86. Cai X, Yin Y, Li N, Zhu D, Zhang J, Zhang CY, et al. Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. *J Mol Cell Biol*. 2012 Oct;4(5):341–3.
87. Wang W, Liu Y, Guo J, He H, Mi X, Chen C, et al. miR-100 maintains phenotype of tumor-associated macrophages by targeting mTOR to promote tumor metastasis via Stat5a/IL-1ra pathway in mouse breast cancer. *Oncogenesis*. 2018 Dec 19;7(12):97.



88. Sánchez-González I, Bobien A, Molnar C, Schmid S, Strotbek M, Boerries M, et al. miR-149 Suppresses Breast Cancer Metastasis by Blocking Paracrine Interactions with Macrophages. *Cancer Res.* 2020 Mar 15;80(6):1330–41.
89. Exhaustion-associated regulatory regions in CD8+ tumor-infiltrating T cells - PubMed [Internet]. [cited 2024 Feb 23]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28283662/>
90. Zhang M, Gao D, Shi Y, Wang Y, Joshi R, Yu Q, et al. miR-149-3p reverses CD8+ T-cell exhaustion by reducing inhibitory receptors and promoting cytokine secretion in breast cancer cells. *Open Biol.* 2019 Oct 31;9(10):190061.
91. Ji Y, Fioravanti J, Zhu W, Wang H, Wu T, Hu J, et al. miR-155 harnesses Phf19 to potentiate cancer immunotherapy through epigenetic reprogramming of CD8+ T cell fate. *Nat Commun.* 2019 May 14;10(1):2157.
92. Hong BS, Ryu HS, Kim N, Kim J, Lee E, Moon H, et al. Tumor Suppressor miRNA-204-5p Regulates Growth, Metastasis, and Immune Microenvironment Remodeling in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2019 Apr 1;79(7):1520–34.
93. Wu Q, Li B, Li Z, Li J, Sun S, Sun S. Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology & Oncology.* 2019 Sep 10;12(1):95.
94. Bellanger D, Dziagwa C, Guimaraes C, Pinault M, Dumas JF, Brisson L. Adipocytes Promote Breast Cancer Cell Survival and Migration through Autophagy Activation. *Cancers (Basel).* 2021 Aug 3;13(15):3917.
95. Bustos SO, Antunes F, Rangel MC, Chammas R. Emerging Autophagy Functions Shape the Tumor Microenvironment and Play a Role in Cancer Progression - Implications for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2020 [cited 2024 Feb 27];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.606436>
96. Sasaki A, Nagatake T, Egami R, Gu G, Takigawa I, Ikeda W, et al. Obesity Suppresses Cell-Competition-Mediated Apical Elimination of RasV12-Transformed Cells from Epithelial Tissues. *Cell Rep.* 2018 Apr 24;23(4):974–82.
97. Madan E, Peixoto ML, Dimitrion P, Eubank TD, Yekelchik M, Talukdar S, et al. Cell Competition Boosts Clonal Evolution and Hypoxic Selection in Cancer. *Trends Cell Biol.* 2020 Dec;30(12):967–78.
98. Pelham CJ, Nagane M, Madan E. Cell competition in tumor evolution and heterogeneity: Merging past and present. *Semin Cancer Biol.* 2020 Jun;63:11–8.
99. Freischel AR, Damaghi M, Cunningham JJ, Ibrahim-Hashim A, Gillies RJ, Gatenby RA, et al. Frequency-dependent interactions determine outcome of competition between two breast cancer cell lines. *Scientific Reports.* 2021 Dec 1;11(1).
100. Toillon RA, Descamps S, Adriaenssens E, Ricort JM, Bernard D, Boilly B, et al. Normal breast epithelial cells induce apoptosis of breast cancer cells via Fas signaling. *Exp Cell Res.* 2002 Apr 15;275(1):31–43.
101. Shams A. Re-evaluation of the myoepithelial cells roles in the breast cancer progression. *Cancer Cell International.* 2022 Dec 12;22(1):403.
102. Li S, Zhou J, Wu H, Lu Q, Tai Y, Liu Q, et al. Oncogenic transformation of normal breast epithelial cells co-cultured with cancer cells. *Cell Cycle.* 2018;17(16):2027–40.
103. Jo SH, Heo WH, Son HY, Quan M, Hong BS, Kim JH, et al. S100A8/A9 mediate the reprogramming of normal mammary epithelial cells induced by dynamic cell–cell interactions with adjacent breast cancer cells. *Sci Rep.* 2021 Jan 14;11(1):1337.
104. Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. 2013;8:277–302.
105. Dawson S jane, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. Review A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *The EMBO Journal.* 2013;32(5):617–28.

106. Amaro A, Angelini G, Mirisola V, Esposito AI, Reverberi D, Matis S, et al. A highly invasive subpopulation of MDA-MB-231 breast cancer cells shows accelerated growth, differential chemoresistance, features of apocrine tumors and reduced tumorigenicity in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(42):68803–20.
107. Hapach LA, Carey SP, Schwager SC, Taufalele PV, Wang W, Mosier JA, et al. Phenotypic heterogeneity and metastasis of breast cancer cells. *Cancer Research*. 2021 Jul 1;81(13):3649–63.
108. Hapach LA, Wang W, Schwager SC, Pokhriyal D, Fabiano ED, Reinhart-King CA. Phenotypically sorted highly and weakly migratory triple negative breast cancer cells exhibit migratory and metastatic commensalism. *Breast Cancer Research*. 2023 Aug 30;25(1):102.
109. Moreira MP, Brayner FA, Alves LC, Cassali GD, Silva LM. Phenotypic, structural, and ultrastructural analysis of triple-negative breast cancer cell lines and breast cancer stem cell subpopulation. *Eur Biophys J*. 2019 Oct 1;48(7):673–84.
110. Khan GN, Gul S, Lee SH, Kim HG. Role of cellular interaction and cell phenotype in azacytidine to doxorubicin sensitivity in breast cancer cell-derived clones. *Human Gene*. 2024 Feb 1;39:201259.
111. Mahmoud L, Cournoux A, Bekiari C, Araceli Ruiz de Castroviejo Teba P, El Marrahi A, Panneau G, et al. Microscopy-based phenotypic monitoring of MDA-MB-231 spheroids allows the evaluation of phenotype-directed therapy. *Experimental Cell Research*. 2023 Apr 15;425(2):113527.
112. Cleary AS, Leonard TL, Gestl SA, Gunther EJ. Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature*. 2014;508(1):113–7.
113. Liu Y, Han N, Zhou S, Zhou R, Yuan X, Xu H, et al. The DACH/EYA/SIX gene network and its role in tumor initiation and progression. *Int J Cancer*. 2016 Mar 1;138(5):1067–75.
114. Zhu S, Li W, Zhang H, Yan Y, Mei Q, Wu K. Retinal determination gene networks: from biological functions to therapeutic strategies. *Biomarker Research*. 2023 Feb 8;11(1):18.
115. Kong D, Zhou H, Neelakantan D, Hughes CJ, Hsu JY, Srinivasan RR, et al. VEGF-C mediates tumor growth and metastasis through promoting EMT-epithelial breast cancer cell crosstalk. *Oncogene*. 2021 Feb;40(5):964–79.
116. Wang Z, Jiang Q, Dong C. Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med*. 2020 Feb 15;17(1):44–59.
117. Contreras-Baeza Y, Sandoval PY, Alarcón R, Galaz A, Cortés-Molina F, Alegría K, et al. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) is a high affinity transporter capable of exporting lactate in high-lactate microenvironments. *J Biol Chem*. 2019 Dec 27;294(52):20135–47.
118. Di Giacomo S, Sollazzo M, de Biase D, Ragazzi M, Bellosta P, Pession A, et al. Human Cancer Cells Signal Their Competitive Fitness Through MYC Activity. *Sci Rep*. 2017 Oct 3;7:12568.
119. Li K, Sun X, Zha R, Liu S, Feng Y, Sano T, et al. Counterintuitive production of tumor-suppressive secretomes from Oct4- and c-Myc-overexpressing tumor cells and MSCs. *Theranostics*. 2022;12(7):3084–103.
120. Li R, Wang X, Zhu C, Wang K. lncRNA PVT1: a novel oncogene in multiple cancers. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2022 Oct 4;27(1):84.
121. Zeng C, Zeng B, Dong C, Liu J, Xing F. Rho-ROCK signaling mediates entotic cell death in tumor. *Cell Death Discov*. 2020 Jan 23;6(1):1–3.

122. Liu J, Wang L, Zhang Y, Li S, Sun F, Wang G, et al. Induction of entosis in prostate cancer cells by nintedanib and its therapeutic implications. *Oncology Letters*. 2019 Mar 1;17(3):3151–62.
123. Hausser J, Szekely P, Bar N, Zimmer A, Sheftel H, Caldas C, et al. Tumor diversity and the trade-off between universal cancer tasks. *Nat Commun*. 2019 Nov 28;10(1):5423.
124. Hausser J, Alon U. Tumour heterogeneity and the evolutionary trade-offs of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020 Apr;20(4):247–57.
125. Lee JH, Na K, Song SC, Lee J, Kuh HJ. The distribution and retention of paclitaxel and doxorubicin in multicellular layer cultures. *Oncology Reports*. 2012 Apr 1;27(4):995–1002.
126. Bontenbal M, Sieuwerts AM, Peters HA, Putten WLJ van, Foekens JA, Klijn JGM. Transport and distribution of doxorubicin in hormone-manipulated human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res Treat*. 1998 Sep 1;51(2):139–48.
127. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer*. 2018 Jan 6;18(1):41.
128. Kauffman MK, Kauffman ME, Zhu H, Jia Z, Li YR. Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*. 2016;2(6):432.
129. Dunnill C, Ibraheem K, Peake M, Ioannou M, Palmer M, Smith A, et al. Cooling-mediated protection from chemotherapy drug-induced cytotoxicity in human keratinocytes by inhibition of cellular drug transport. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240454.
130. Choi WG, Kim DK, Shin Y, Park R, Cho YY, Lee JY, et al. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Determination of Doxorubicin and its Metabolites Doxorubicinol, Doxorubicinone, Doxorubicinolone, and 7-Deoxydoxorubicinone in Mouse Plasma. *Molecules*. 2020 Jan;25(5):1254.
131. Kullenberg F, Degerstedt O, Calitz C, Pavlović N, Balgoma D, Gråsjö J, et al. In Vitro Cell Toxicity and Intracellular Transport of Doxorubicin Exposed as a Solution or Liposomes: Implications for Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Cells*. 2021 Jul 6;10(7):1717.
132. Tchoryk A, Taresco V, Argent RH, Ashford M, Gellert PR, Stolnik S, et al. Penetration and Transport of Nanoparticles in 3D Tumor Spheroids. *Bioconjugate Chem*. 2019 May 15;30(5):1371–84.
133. Gong X, Lin C, Cheng J, Su J, Zhao H, Liu T, et al. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. *PLoS One*. 2015 Jun 19;10(6):e0130348.
134. Vakhshiteh F, Bagheri Z, Soleimani M, Ahvaraki A, Pournemat P, Alavi SE, et al. Heterotypic tumor spheroids: a platform for nanomedicine evaluation. *Journal of Nanobiotechnology*. 2023 Aug 2;21(1):249.
135. Prinz H. Hill coefficients, dose–response curves and allosteric mechanisms. *Journal of Chemical Biology*. 2010 Mar;3(1):37.
136. Qing Y, Yang X qin, Zhong Z yang, Lei X, Xie J yin, Li M xia, et al. Microarray analysis of DNA damage repair gene expression profiles in cervical cancer cells radioresistant to 252 Cf neutron and X-rays. 2010;1–9.
137. Tseng H, Gage JA, Shen T, Haisler WL, Neeley SK, Shiao S, et al. A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging. *Sci Rep*. 2015 Nov;5(1):13987.
138. Minussi DC, Nicholson MD, Ye H, Davis A, Wang K, Baker T, et al. Breast tumours maintain a reservoir of subclonal diversity during expansion. *Nature*. 2021 Apr;592(7853):302–8.
139. Wu PH, Gilkes DM, Phillip JM, Narkar A, Cheng TWT, Marchand J, et al. Single-cell morphology encodes metastatic potential. *Sci Adv*. 2020 Jan;6(4):eaaw6938.

140. Brugnoli F, Grassilli S, Al-Qassab Y, Capitani S, Bertagnolo V. CD133 in Breast Cancer Cells: More than a Stem Cell Marker. *J Oncol.* 2019 Sep 16;2019:7512632.
141. Pospieszna, J.; Dams-Kozłowska, H.; Udomsak, W.; Murias, M.; Kucinska, M. Unmasking the Deceptive Nature of Cancer Stem Cells: The Role of CD133 in Revealing Their Secrets. [Internet]. [cited 2023 Dec 14]. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/13/10910>
142. Liou GY. CD133 as a Regulator of Cancer Metastasis through the Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019 Jan;106:1–7.
143. Lu R, Zhao G, Yang Y, Jiang Z, Cai J, Hu H. Inhibition of CD133 Overcomes Cisplatin Resistance Through Inhibiting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway and Autophagy in CD133-Positive Gastric Cancer Cells. *Technol Cancer Res Treat.* 2019 Aug 12;18:1533033819864311.
144. Dong C, Wu J, Chen Y, Nie J, Chen C. Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Front Pharmacol.* 2021 Mar 15;12:628690.
145. Ortega MA, Fraile-Martínez O, Asúnsolo Á, Buján J, García-Honduvilla N, Coca S. Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. *Journal of Oncology.* 2020 Mar 9;2020:1–11.
146. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 11;94(23):12425–30.
147. Brugnoli F, Grassilli S, Piazzini M, Palomba M, Nika E, Bavelloni A, et al. In triple negative breast tumor cells, PLC- $\beta$ 2 promotes the conversion of CD133<sup>high</sup> to CD133<sup>low</sup> phenotype and reduces the CD133-related invasiveness. *Mol Cancer.* 2013 Dec 13;12:165.
148. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. 2009;13(8):2236–52.
149. Tay ASMS, Amamo T, Edwards LA, Yu JS. CD133 mRNA-transfected dendritic cells induce coordinated cytotoxic and helper T cell responses against breast cancer stem cells. *Mol Ther Oncolytics.* 2021 May 19;22:64–71.
150. Novikov NM, Zolotaryova SY, Gautreau AM, Denisov EV. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.* 2021 Jan;124(1):102–14.
151. Martín-pardillos A, Chiva ÁV, Vargas GB, Blanco PH, Cid RP, Guijarro PJ, et al. The role of clonal communication and heterogeneity in breast cancer. 2019;1–26.
152. Hershey BJ, Barozzi S, Orsenigo F, Pompei S, Iannelli F, Kamrad S, et al. Clonal cooperation through soluble metabolite exchange facilitates metastatic outgrowth by modulating Allee effect. *Sci Adv.* 2023 Sep 15;9(37):eadh4184.
153. Paramanantham A, Jung E, Kim H, Jeong B, Jung JM, Kim G, et al. Doxorubicin-Resistant TNBC Cells Exhibit Rapid Growth with Cancer Stem Cell-like Properties and EMT Phenotype, Which Can Be Transferred to Parental Cells through Autocrine Signaling. *IJMS.* 2021 Nov 18;22(22):12438.
154. Kim HS, Lee YS, Kim DK. Doxorubicin Exerts Cytotoxic Effects through Cell Cycle Arrest and Fas-Mediated Cell Death. *Pharmacology.* 2009 Oct 14;84(5):300–9.
155. Chong KH, Chang YJ, Hsu WH, Tu YT, Chen YR, Lee MC, et al. Breast Cancer with Increased Drug Resistance, Invasion Ability, and Cancer Stem Cell Properties through Metabolism Reprogramming. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 25;23(21):12875.
156. Alkaraki A, Alshaer W, Wehaibi S, Gharaibeh L, Abuarqoub D, Alqudah DA, et al. Enhancing chemosensitivity of wild-type and drug-resistant MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line to doxorubicin by silencing of STAT 3, Notch-1, and  $\beta$ -catenin genes. *Breast Cancer.* 2020 Sep 1;27(5):989–98.

157. Wigner P, Zielinski K, Labieniec-Watala M, Marczak A, Szwed M. Doxorubicin–transferrin conjugate alters mitochondrial homeostasis and energy metabolism in human breast cancer cells. *Sci Rep.* 2021 Feb 25;11:4544.
158. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *Biomed Res Int.* 2015;2015:413076.
159. Kenicer J, Spears M, Lyttle N, Taylor KJ, Liao L, Cunningham CA, et al. Molecular characterisation of isogenic taxane resistant cell lines identify novel drivers of drug resistance. *BMC Cancer.* 2014 Oct 14;14(1):762.
160. Tannock IF, Gordon Steel G. Cell proliferation, drug distribution and therapeutic effects in relation to the vascular system of solid tumours. *Br J Cancer.* 2023 Feb 2;128(3):413–8.
161. Enciso-Benavides J. Biological characteristics of a sub-population of cancer stem cells from two triple-negative breast tumour cell lines. 2021;9.
162. Leibniz Institute | MDA-MB-231 | DSMZ [Internet]. <https://webshop.dsmz.de/>. [cited 2024 May 30]. Available from: <https://webshop.dsmz.de/en/human-animal-cell-lines/MDA-MB-231.html>
163. Han J, Lim W, You D, Jeong Y, Kim S, Lee JE, et al. Chemoresistance in the Human Triple-Negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231 Induced by Doxorubicin Gradient Is Associated with Epigenetic Alterations in Histone Deacetylase. *J Oncol.* 2019 Jun 2;2019:1345026.
164. Carneiro TJ, Carvalho ALMB, Vojtek M, Carmo IF, Marques MPM, Diniz C, et al. Disclosing a metabolic signature of cisplatin resistance in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells by NMR metabolomics. *Cancer Cell International.* 2023 Dec 6;23(1):310.
165. Chiodoni C, Di Martino MT, Zazzeroni F, Caraglia M, Donadelli M, Meschini S, et al. Cell communication and signaling: How to turn bad language into positive one. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 2019 Mar 13;38(1).
166. Shen Y, Schmidt BUS, Kubitschke H, Morawetz EW, Wolf B, Käs JA, et al. Detecting heterogeneity in and between breast cancer cell lines. *Cancer Converg.* 2020 Dec;4(1):1.
167. Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest.* 2011 Oct 3;121(10):3804–9.
168. Bent EH, Millán-Barea LR, Zhuang I, Goulet DR, Fröse J, Hemann MT. Microenvironmental IL-6 inhibits anti-cancer immune responses generated by cytotoxic chemotherapy. *Nat Commun.* 2021 Oct 28;12(1):6218.
169. Chen J, Wei Y, Yang W, Huang Q, Chen Y, Zeng K, et al. IL-6: The Link Between Inflammation, Immunity and Breast Cancer. *Front Oncol.* 2022 Jul 18;12:903800.
170. Fernández-Nogueira P, Fuster G, Gutierrez-Uzquiza Á, Gascón P, Carbó N, Bragado P. Cancer-Associated Fibroblasts in Breast Cancer Treatment Response and Metastasis. *Cancers.* 2021 Jun 23;13(13):3146.
171. Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, et al. Role of the NFκB-signaling pathway in cancer. *OTT.* 2018 Apr;Volume 11:2063–73.
172. Plava J, Cihova M, Burikova M, Matuskova M, Kucerova L, Miklikova S. Recent advances in understanding tumor stroma-mediated chemoresistance in breast cancer. 2019;1–10.
173. McMillin DW, Delmore J, Weisberg E, Negri JM, Geer DC, Klippel S, et al. Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat Med.* 2010 Apr;16(4):483–9.
174. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature.* 2012 Jul 26;487(7408):500–4.

175. Marusyk A, Tabassum DP, Janiszewska M, Place AE, Trinh A, Rozhok AI, et al. Spatial proximity to fibroblasts impacts molecular features and therapeutic sensitivity of breast cancer cells influencing clinical outcomes. *Cancer Res.* 2016 Nov 15;76(22):6495–506.
176. Fontana F, Santos HA, editors. *Bio-Nanomedicine for Cancer Therapy* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cited 2022 Sep 27]. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1295). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-58174-9>
177. Sung KE, Su X, Berthier E, Pehlke C, Friedl A, Beebe DJ. Understanding the Impact of 2D and 3D Fibroblast Cultures on In Vitro Breast Cancer Models. Cukierman E, editor. *PLoS ONE.* 2013 Oct 4;8(10):e76373.
178. Kim YS, Potashnikova DM, Gisina AM, Kholodenko IV, Kopylov AT, Tikhonova OV, et al. TRIM28 Is a Novel Regulator of CD133 Expression Associated with Cancer Stem Cell Phenotype. *IJMS.* 2022 Aug 30;23(17):9874.
179. Arch V, Stanta G, Jahn SW, Bonin S, Hoefler G. Tumour heterogeneity : principles and practical consequences. *Virchows Archiv* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-016-1987-9>
180. Levi M, Salaroli R, Parenti F, De Maria R, Zannoni A, Bernardini C, et al. Doxorubicin treatment modulates chemoresistance and affects the cell cycle in two canine mammary tumour cell lines. *BMC Veterinary Research.* 2021 Jan 18;17(1):30.
181. Ramazi S, Salimian M, Allahverdi A, Kianamiri S, Abdolmaleki P. Synergistic cytotoxic effects of an extremely low-frequency electromagnetic field with doxorubicin on MCF-7 cell line. *Sci Rep.* 2023 May 31;13(1):8844.
182. De Boeck J, Verfaillie C. Doxycycline inducible overexpression systems: how to induce your gene of interest without inducing misinterpretations. *Mol Biol Cell.* 2021 Aug 15;32(17):1517–22.
183. Finger EC, Giaccia AJ. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Jun;29(2):285–93.
184. Triner D, Shah YM. Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 126(10):3689–98.
185. Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis.* 2018 Jan 24;7(1):10.
186. Chiu DKC, Tse APW, Xu IMJ, Di Cui J, Lai RKH, Li LL, et al. Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun.* 2017 Sep 11;8:517.
187. Gao XX, Liu CH, Hu ZL, Li HY, Chang X, Li YY, et al. The biological effect of cobalt chloride mimetic-hypoxia on nucleus pulposus cells and the comparability with physical hypoxia in vitro. *FBL.* 2021 Oct 30;26(10):799–812.
188. Rana NK, Singh P, Koch B. CoCl<sub>2</sub> simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis. *Biol Res.* 2019 Mar 15;52:12.
189. Weaver VM, Lelièvre S, Lakins JN, Chrenek MA, Jones JCR, Giancotti F, et al. Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell.* 2002;2(September):205–16.
190. Nguyen TV, Sleiman M, Moriarty T, Herrick WG, Peyton SR. Sorafenib resistance and JNK signaling in carcinoma during extracellular matrix stiffening. *Biomaterials.* 2014 Jul;35(22):5749–59.
191. Guo Z, Zhang H, Fu Y, Kuang J, Zhao B, Zhang L, et al. Cancer-associated fibroblasts induce growth and radioresistance of breast cancer cells through paracrine IL-6. *Cell Death Discov.* 2023 Jan 13;9(1):1–10.

192. Castillo-Sanchez R, Churruca-Schuind A, Martinez-Ival M, Salazar EP. Cancer-associated Fibroblasts Communicate with Breast Tumor Cells Through Extracellular Vesicles in Tumor Development. *Technol Cancer Res Treat*. 2022 Jan 1;21:15330338221131647.
193. Chen C, Liu J, Lin X, Xiang A, Ye Q, Guo J, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and regulated cell death in tumors: insights into apoptosis, autophagy, ferroptosis, and pyroptosis. *Cell Death Discov*. 2024 Apr 22;10(1):1–12.
194. Mao X, Xu J, Wang W, Liang C, Hua J, Liu J, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer*. 2021 Dec;20(1):131.
195. Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K, Dash S. Increased Expression of P-Glycoprotein and Doxorubicin Chemoresistance of Metastatic Breast Cancer Is Regulated by miR-298. *The American Journal of Pathology*. 2012 Jun 1;180(6):2490–503.
196. Mirzaei S, Gholami MH, Hashemi F, Zabolian A, Farahani MV, Hushmandi K, et al. Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. *Drug Discovery Today*. 2022 Feb;27(2):436–55.
197. Al Tameemi W, Dale TP, Al-Jumaily RMK, Forsyth NR. Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:4.
198. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jun;14(6):430–9.
199. Cheng CC, Shi LH, Wang XJ, Wang SX, Wan XQ, Liu SR, et al. Stat3/Oct-4/c-Myc signal circuit for regulating stemness-mediated doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer cells and inhibitory effects of WP1066. *International Journal of Oncology*. 2018 Jul 1;53(1):339–48.
200. Engle K, Kumar G. Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB1 inhibition: A recent update. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2022 Sep 5;239:114542.
201. Masuda H, Harano K, Miura S, Wang Y, Hirota Y, Harada O, et al. Changes in Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes in Patients Without Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Systemic Chemotherapy. *JCO Precis Oncol*. 2022 Dec;(6):e2000368.
202. Pasha N, Turner NC. Understanding and overcoming tumor heterogeneity in metastatic breast cancer treatment. *Nat Cancer*. 2021 Jul;2(7):680–92.

**MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ,  
KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS  
TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS**

1. **Januškevičienė I.**, Petrikaitė V. Exploring doxorubicin transport in 2D and 3D models of MDA-MB-231 sublines: impact of hypoxia and cellular heterogeneity on doxorubicin accumulation in cells// *American Journal of Cancer Research*, 2024, t. 14, nr. 7, p. 3584–3599, ISSN 2156-6976. [Citav.rod.:4,973].
2. **Januškevičienė I.**, Petrikaitė V. Interaction of phenotypic sublines isolated from triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 modulates their sensitivity to paclitaxel and doxorubicin in 2D and 3D assays // *American Journal of Cancer Research*, 2023, t.13, nr. 8, p. 3368–3383, ISSN 2156-6976. [Citav.rod.:4,973].
3. **Januškevičienė I.**, Petrikaitė V. Heterogeneity of breast cancer: the importance of interaction between different tumor cell populations: review article // *Life sciences*. Oxford: Pergamon-Elsevier Science Ltd, 2019, t. 239, p. 1–10, ISSN 0024-3205, 1879-0631. [Citav. rod.: 3.647].



# MOKSLINIŲ KONFERENCIJŲ, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS

1. **Januškevičienė I., (pranešėjas)** Petrikaitė V. Exploring the interaction between triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 sublines in 2D and 3D models // International Conference of Life Sciences The COINS. Vilnius, Lietuva, 2023, balandžio 24–27
2. **Januškevičienė I., (pranešėjas)** Petrikaitė V. The interaction between the sublines of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 in 2D and 3D models. The 11th CCBIO Annual Symposium. Bergen, Norvegija. 2023, gegužės 8–10 d.
3. **Januškevičienė I., (pranešėjas)** Petrikaitė V. Characterization of phenotypic sub-populations of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231. The COINS 14th international conference of life sciences. Vilnius, Lietuva, 2019, vasario 26–28 d.
4. **Januškevičienė I., (pranešėjas)** Petrikaitė V. Heterogeneity of single-cell derived clones (sublines) from triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. Health for all: Science and innovation week. Kaunas, Lietuva. 2019, balandžio 8–12 d.
5. **Januškevičienė I., (pranešėjas)** Petrikaitė V. The Differences in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell sub-lines. 34th congress and international scientific-practical conference of the Lithuanian pharmaceutical association = Lietuvos farmacijos sąjungos XXXIV suvažiavimas ir tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija, skirta pirmosios profesinės farmacijos draugijos įkūrimo 200-mečiui pažymėti „Farmacinės draugijos vaidmuo sveikatinimo sistemoje: praeitis, dabartis ateitis“ Vilnius, Lietuva. 2019, spalio 19 d.
6. **Januškevičienė I., (pranešėjas)** Petrikaitė V. The Effect of MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell sub-lines interaction on resistance to chemotherapy. 55<sup>th</sup> international conference on medicinal chemistry (55<sup>èmes</sup> Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique) Interfacing chemical biology and drug discovery-RICT 2019. Nantes, Prancūzija. 2019, liepos 3–5 d.
7. **Januškevičienė I., (pranešėjas)** Petrikaitė V. Triple negative breast cancer cell sub-lines differences in MDA-MB-231 cell culture. The 22<sup>nd</sup> annual international scientific-practical conference „BaltPharm Forum 2019“ „Pharmacists as drug experts: their role in health care system“. Kaunas, Lietuva. 2019, balandžio 13–14 d.

8. **Januškevičienė I., (pranešėjas)** Petrikaitė V. Triple negative breast cancer cell sub-lines differences in MDA-MB-231 cell culture. Lietuvos farmacijos žinios = Lithuanian Pharmaceutical News :XXII Tarptautinė Baltijos šalių konferencija BaltPharm Forum 2019. Kaunas, Lietuva. 2019, balandžio 13–14 d.

# MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, KURIOSE SKELBIAMI SVARBIAUSI TYRIMŲ REZULTATAI, KOPIJOS

Am J Cancer Res 2024;14(7):3584-3599  
[www.ajcr.us](http://www.ajcr.us) /ISSN:2156-6976/ajcr0158187

## Original Article

### Exploring doxorubicin transport in 2D and 3D models of MDA-MB-231 sublines: impact of hypoxia and cellular heterogeneity on doxorubicin accumulation in cells

Indrė Januškevičienė, Vilma Petrikaitė

Laboratory of Drug Targets Histopathology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, Sukilėlių av., LT-50162 Kaunas, Lithuania

Received May 31, 2024; Accepted July 12, 2024; Epub July 15, 2024; Published July 30, 2024

**Abstract:** Triple-negative breast cancer (TNBC) treatment is challenging due to its aggressive nature and heterogeneity of this type of cancer, characterized by various subtypes and intratumoral diversity. Doxorubicin (DOX) plays a crucial role in TNBC chemotherapy reducing the tumor size and improving patient survival. However, decreased drug uptake and increased resistance in specific cell subpopulations reduce the effectiveness of the treatment. This study explored the differences in DOX transport in MDA-MB-231 phenotypic sublines in cell monolayer (2D model) and cell spheroids (3D cultures). Cell spheroids were formed using magnetic 3D Bioprinting method. DOX transport into cells and spheroids was evaluated using fluorescence microscopy after different incubation durations with DOX in normoxia and hypoxia. In hypoxia, DOX transport into cells was 2.5 to 5-fold lower than in normoxia. The subline F5 monolayer-cultured cells exhibited the highest DOX uptake, while subline H2 cells showed the lowest uptake in normoxia and hypoxia. In 3D cultures, DOX transport was up to 2-fold lower in spheroids formed from subline H2 cells. Spheroids from subline D8 and MDA-MB-231 parent cells had the highest DOX uptake. A correlation was observed between the characteristics of the cells and their resistance to anticancer drugs. The results indicate that different cancer cell subpopulations in tumours due to differences in drug uptake could significantly impact treatment efficacy.

**Keywords:** Heterogeneity, cell sublines, drug resistance, doxorubicin transport, tumor spheroids, hypoxia

#### Introduction

Treatment of triple-negative breast cancer (TNBC) is a huge challenge in oncology. This cancer type is characterized by the absence of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR) and human epidermal growth factor receptors-2 (HER2), which precludes the possibility of using hormone therapies and HER2-targeted treatments, leaving chemotherapy as the primary treatment option. Due to its effectiveness in killing cancer cells, doxorubicin (DOX) is frequently employed among chemotherapeutic agents. However, the heterogeneity inherent in TNBC, both at the intertumoral and intratumoral levels, significantly complicates the therapeutic strategy, decreasing the efficacy of anticancer agents such as DOX [1]. The complexity of TNBC is further amplified by the tumour microenvironment (TME), a dynam-

ic ecosystem comprising not only the cancer cells but also various non-cancerous cell types, including fibroblasts, immune cells, and endothelial cells. It is known that interaction between cancer cells and TME might affect tumour progression. However, little information exists about phenotypically different cancer cell interactions in tumours. Cell-cell interactions are mediated by a complex network of signaling pathways and physical contact, making cell interaction a critical factor in developing effective treatment strategies for TNBC [2].

Scientists have extensively studied the transport of DOX in both cell monolayers and spheroids (3D cultures). The key factors known to impede DOX transport in cancer cells include overexpression of efflux pumps [3], intracellular sequestration of drugs in subcellular compartments such as lysosomes [4], pH changes with-

<https://doi.org/10.62347/VNWH9165>

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines

in cancer cells [5], interactions of cancer cells with TME [6-8] and, notably, interactions among phenotypically distinct cancer cells within the tumour [9, 10]. It is recognized that interactions between different cancer cell phenotypes can contribute to cancer progression and drug resistance [11-14]. To our knowledge, no studies have specifically addressed the interactions between phenotypically diverse cancer cells in relation to drug resistance. Although many publications have reported on the isolation and characterization of different sublines, populations, or clones [15-18], their interactions have not been explored regarding DOX transport.

Given the critical role of the cell-cell interaction in cancer progression and treatment response, this study focuses on the DOX transport into the MDA-MB-231 cell line and its phenotypically diverse sublines (D8, F5, H2). The DOX transport was investigated in cell monolayer (2D model) and spheroids (3D cultures). To mimic cell interaction *in vivo* conditions, apart from 3D cultures, experiments in monolayer-cultured cells were done under normoxia and hypoxia. Hypoxia, a common feature of the tumour, is known to influence the biology of cancerous and stromal cells, affecting drug uptake and, consequently, treatment efficacy [19, 20].

This research hypothesized that by studying DOX transport in conditions that simulate the complex environment of tumors in living organisms, we could identify obstacles to effective drug delivery and uncover strategies to enhance treatment results for patients with TNBC. The significance of this work lies in its potential to contribute to the refinement of therapeutic regimens for TNBC, a subtype of breast cancer known for its poor prognosis and limited treatment options. This could pave the way for developing more effective, personalized treatment strategies considering the complex interplay between cancer cells and their microenvironment.

### Materials and methods

#### Cell culture

The human triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 was acquired from the American Type Culture Collection (ATCC) located in Manassas, VA, USA. Similarly, human foreskin fibroblast cells (HF) CRL-4001, origi-

nally sourced from ATCC, were generously provided by Prof. Helder Santos from the University of Helsinki, Finland. These cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX supplied by Gibco, UK, and enriched with 10% fetal bovine serum (FBS), heat-inactivated (Gibco). Additionally, the culture medium was supplemented with 1% of penicillin and streptomycin mixture, 1 µg/ml of insulin (27 USP units/mg), 1% minimum essential medium non-essential amino acids (MEM NEAA), and 1% sodium pyruvate, all supplied from Gibco, UK. Cells were cultured in a humidified environment with 5% CO<sub>2</sub> at a temperature of 37°C.

#### Isolation of cell sublines from commercial MDA-MB-231 cell line

Sublines were derived from the MDA-MB-231 commercial cell line, utilizing a previously described method involving serial dilution in 96-well plates [21]. Initially, an 8-channel micropipette was used to dispense 100 µl of the medium into each well of a 96-well plate, excluding well A1. Subsequently, 200 µl of a cell suspension (containing  $2 \times 10^4$  cells/ml) was introduced into well A1. From there, 100 µl of this mixture was transferred from well A1 to B1 using a single channel pipettor, a process repeated down the column, with the final 100 µl from well H1 being discarded. Next, each well in column 1 received an additional 100 µl of medium via the 8-channel micropipette, bringing the total volume to 200 µl per well. This dilution was then extended horizontally across the plate, transferring 100 µl from each well in the first column to the corresponding wells in the second column using the same micropipette, and the process was replicated across the plate. Following nine days of incubation, cell colonies were observed under a microscope. The selection of sublines was based on the observed differences in colony formation, including shape and cell density. Selected wells were then expanded into 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (TPP, Switzerland) for further cultivation.

#### DOX cytotoxicity by MTT

Cell susceptibility to DOX was determined using the MTT assay, as described previously [22]. Fresh DOX dilutions in the medium were prepared just before use. DOX (> 98%, Abcam, Cambridge, UK) was dissolved in dimethyl sulf-

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines

oxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and then diluted in the medium, ensuring the final DMSO concentration did not exceed 0.5%. Cells ( $2 \times 10^4$  cells/well) were plated into 96-well flat-bottomed plates and incubated for 24 h. Subsequently, DOX dilutions were added to each well. The medium without cells served as a positive control, and the medium with 0.5% DMSO served as a negative control. After 4 and 8 hours of incubation, 20  $\mu$ l of 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Life technologies, Oregon, USA) solution (5 mg/ml in medium) was added. Following a 3-hour incubation at 37°C, the liquid was removed, and the resulting formazan crystals were dissolved in 50  $\mu$ l of DMSO. Complete solubilization of formazan crystals was achieved by brief shaking. The absorbance was measured on a plate reader at 570 and 630 nm.

### *DOX transport into monolayer-cultured cells*

The cells were seeded in 24-well plates on collagen-coated coverslips at a volume of 500  $\mu$ L (50,000 cells/well) and incubated for 48 h in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After 48 h, the medium was replaced by the fresh medium that contained 1 or 5  $\mu$ M DOX. In case to simulate hypoxia, the medium containing 200  $\mu$ M cobalt (II) chloride (anhydrous, 97%, Carl Roth GmbH, Germany), was used. After 0.5, 1, 2 or 4 h of incubation, the medium was removed, the cells were washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) solution in PBS and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo Scientific). The photos were taken using confocal fluorescence microscopy (Olympus IX73, Japan), 600 $\times$  magnification, using DAPI and TRITC filters. The uptake of DOX into whole cells and their nucleus was evaluated using *ImageJ* software (National Institutes of Health, 1.53K version, USA). In each group, at least 5 photos were taken, and from these photos, 20 randomly selected cells were analyzed. The relative fluorescence intensity and background fluorescence were measured separately for the cytoplasm and nuclei, and the background fluorescence was subtracted from the cellular fluorescence measurements. The same procedure was followed for experiments conducted under hypoxic conditions. To induce hypoxia, 200  $\mu$ M cobalt (II) chloride was added to the culture medium 24 hours prior to the experiment.

### *DOX delivery into tumor spheroids*

The spheroids were formed using the magnetic 3D Bioprinting method as previously described [21]. Cells were seeded in a 6-well plate, and after their attachment, they were incubated with NanoShuttle PL (Greiner Bio-One North America, Inc., Monroe, NC, USA) for 8-10 h. Then, cells were trypsinised, centrifuged, resuspended in a fresh medium and seeded into 96-well ultra-low attachment plates in a volume of 100  $\mu$ L (2000 cancer cells (MDA-MB-231 or sublines D8, F5, H2) and 2000 human fibroblasts). The plate was placed on a magnetic drive and incubated in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 2 days. After that, the medium was replaced with a fresh medium containing 10  $\mu$ M of DOX. After 1, 2, 4 and 8 h, spheroids were washed with PBS and fixed in a 4% paraformaldehyde solution in PBS. DOX transport to the spheroids was assessed by fluorescence microscopy with an Olympus IX73 inverted fluorescent microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The images were analyzed using *ImageJ* software version 1.53K to estimate the intensity of DOX fluorescence in the whole spheroids area in relative units. The DOX fluorescence intensity in the spheroids is calculated by subtracting the background fluorescence measured at multiple places near the spheroid. The number of spheroids per group ranged from 10 to 14 spheroids.

### *Statistical analysis*

Each experiment was conducted in triplicate, with the results averaged and the standard deviation calculated. Data analysis was done utilizing Microsoft Office Excel 2021, 2405 version (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and the IBM SPSS Statistics software, version 26.0. A value of  $P < 0.05$  was considered as the level of significance. An analysis of variance (ANOVA) was applied to identify significant differences among the values, followed by a Tukey post-hoc test for detailed comparison.

## **Results**

### *Selection of sublines isolated from the MDA-MB-231 cell line for DOX uptake studies*

In previous studies focused on the interactions of phenotypically different sublines [21], we isolated 24 sublines and selected seven (A9, D8,

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines

E7, F5, F7, G5, and H2) for characterization based on CD133 receptor expression, migratory ability, and sensitivity to the anticancer drugs doxorubicin (DOX) and paclitaxel (PTX). Among these, we identified three sublines - D8, F5, and H2 - as the most distinct. The D8 subline exhibited a 50% reduction in CD133 expression, a 20% increase in migratory ability, and a 10% greater sensitivity to PTX. Morphologically, D8 cells were elongated and loosely packed. The F5 subline showed a 31% increase in CD133 expression, a 5% decrease in migratory ability, and a 54% higher sensitivity to DOX. These cells were shorter, more oval, and formed tightly packed colonies. The H2 subline was notable for its resistance to anticancer drugs, with 39% lower sensitivity to DOX and 32% lower sensitivity to PTX. Additionally, H2 cells exhibited a 38% increase in migratory ability and a 26% reduction in CD133 expression compared to the parental MDA-MB-231 cell line. The H2 cells were also shorter in shape compared to the parental cells.

### *DOX uptake in phenotypically different breast cancer sublines in normoxia*

In this research, it was hypothesized that varying concentrations of DOX (1  $\mu$ M and 5  $\mu$ M) will elicit different patterns of intracellular uptake in cells. Specifically, in this study, it was supposed that at the lower concentration (1  $\mu$ M), DOX uptake would be relatively evenly distributed between the cytoplasm and nucleus. Conversely, at the higher concentration (5  $\mu$ M), it will anticipate increased transport and accumulation of DOX within the nucleus, which is a main DOX target in cancerous cells.

Before conducting DOX transport experiments, it is important to assess the influence of DOX on cell viability to ensure that changes in DOX uptake are not solely due to the drug's cytotoxic effects. In this experiment, a statistically significant DOX cytotoxicity effect on cell viability was not established up to a concentration of 10  $\mu$ M after 8 hours of incubation (Figure 1).

DOX transport in MDA-MB-231 cells and its sublines D8, F5, H2 was first explored in normoxia conditions (Figure 2C). At 1  $\mu$ M concentration, DOX uptake was highest in subline F5 cells after 240 minutes (Figure 2A). DOX delivery in F5 cells and nucleus was up to 1.8-fold and 1.5-fold greater, respectively, compared to

other sublines and parent MDA-MB-231 cell line (Figure 2B). Contrary, the H2 subline showed the least 1.5-fold lower DOX uptake among all the cell lines and sublines tested, highlighting significant variability in drug uptake efficiency among different cellular phenotypes.

The DOX uptake ratio between cells and nucleus was the same in MDA-MB-231 and sublines (Figure 3C). Cells incubated with 5  $\mu$ M DOX show increased DOX uptake and accumulation in the cell nucleus (Figure 3B). The subline F5 cells continued to exhibit a superior capacity for DOX uptake, with uptake levels in both the cells and their nuclei about 1.5-fold higher than those observed in other cell lines and sublines (Figure 3A, 3B). The DOX transport into subline H2 cells was about 2-fold lower in both cells and nuclei than the subline F5 and about 1.5-fold lower than the parent cell line MDA-MB-231.

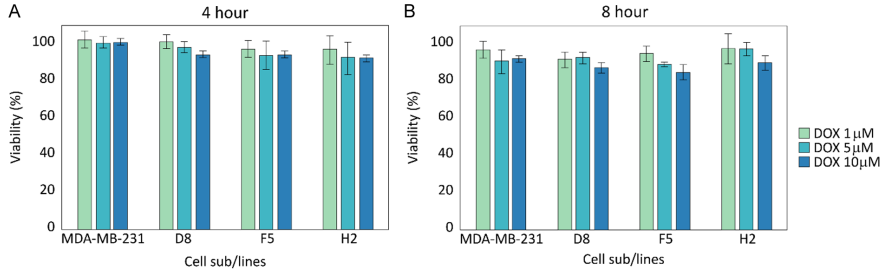
In this research, no statistically significant DOX uptake was observed in the cells or their nuclei after 30, 60, and 120 minutes of incubation across all compared cell lines and sublines.

However, differences in DOX distribution within the cells were observed when comparing DOX uptake in cells using 1  $\mu$ M or 5  $\mu$ M concentrations. At 1  $\mu$ M of DOX, similar drug distribution was observed between the cell cytoplasm and nucleus, with DOX uptake in the nucleus being 1.7-fold higher than in the cytoplasm. Conversely, at a concentration of 5  $\mu$ M, DOX distribution within the cell and nucleus differed significantly, with DOX uptake in the cell nucleus being 2.6-fold higher than in the cytoplasm. The highest difference was observed in the H2 subline, where DOX uptake in the cell nucleus was 3.2-fold higher than in the cytoplasm.

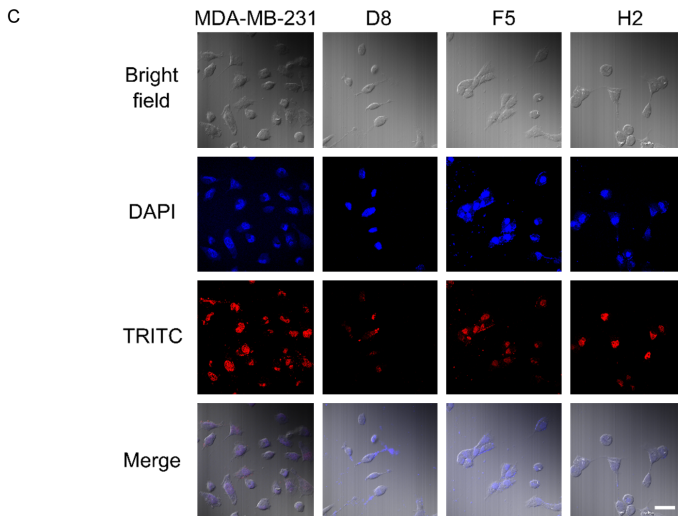
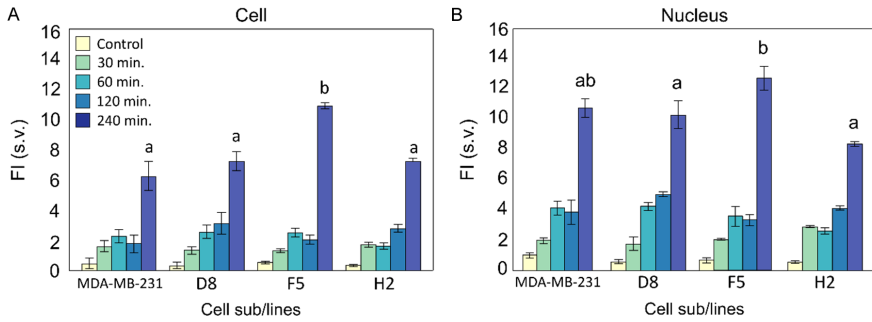
### *DOX uptake in phenotypically different breast cancer sublines in hypoxia*

Analyzing DOX transport under hypoxic conditions is crucial for understanding how an oxygen-deprived environment affects DOX uptake efficiency. In this study, differences in DOX uptake and uptake ratios were observed between hypoxic and normoxic conditions. Moreover, the effects of different DOX concentrations varied between normoxia and hypoxia. DOX uptake under hypoxic conditions was approximately 5-fold lower at 1  $\mu$ M and 2-fold lower at 5  $\mu$ M compared to normoxic conditions (see Figures 4 and 5).

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines

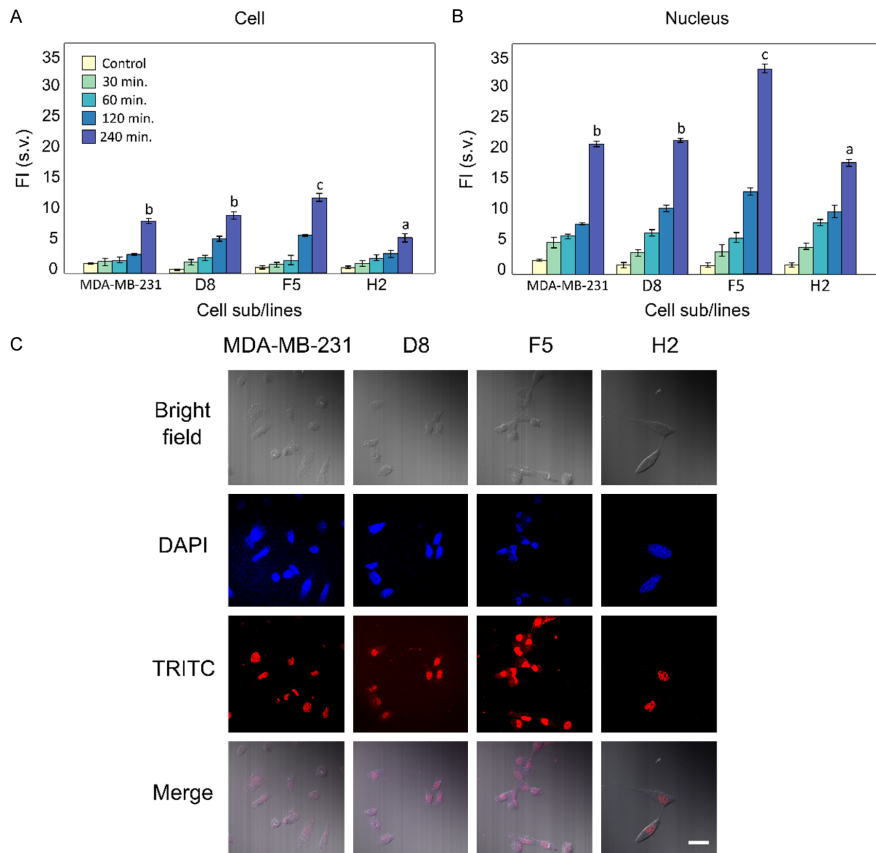


**Figure 1.** DOX effect on cell viability. Viability was evaluated in monolayer-cultured cells of MDA-MB-231 cell line and its sublines after incubation with 1, 5 or 10 μM DOX. A. Viability of cells after 4 hours of incubation. B. Viability of cells after 8 hours of incubation, n = 3.



**Figure 2.** DOX uptake into monolayer-cultured cells from MDA-MB-231 cell line and its sublines after incubation with 1 μM DOX in normoxic conditions. A. DOX fluorescence intensity in cells. B. DOX fluorescence intensity in cell nucleus at different time periods. C. Representative images of cells after 4 h incubation with 1 μM DOX. Scale bar = 50 μm. Bars marked with different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) within the same category, n = 3.

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines



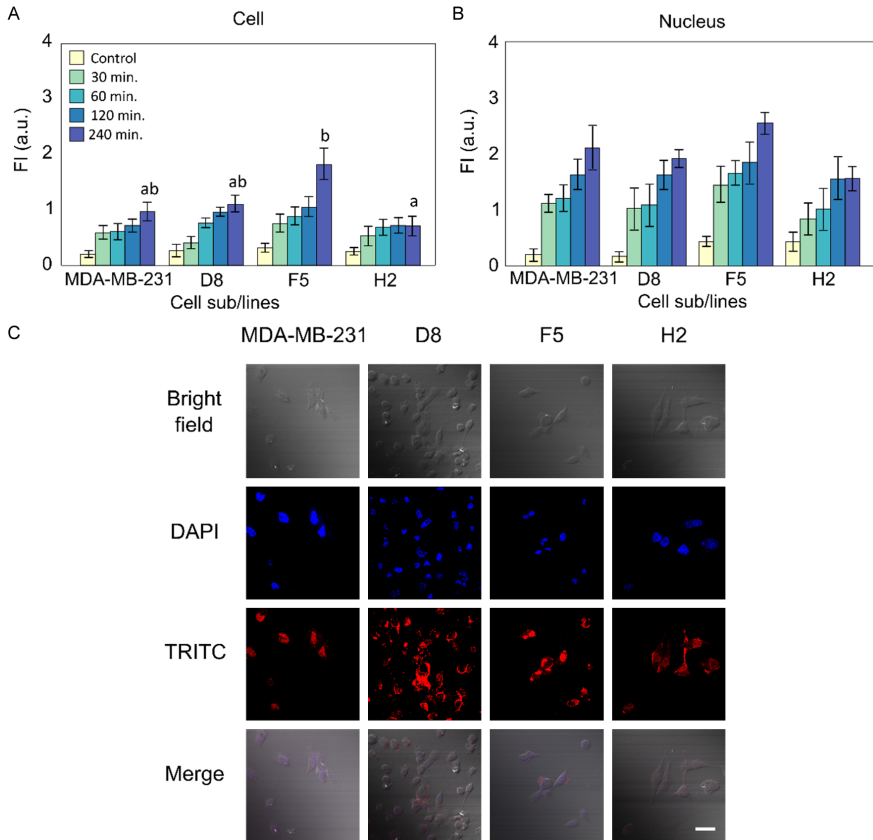
**Figure 3.** DOX uptake into monolayer-cultured cells from MDA-MB-231 cell line and its sublines after incubation with 5  $\mu$ M DOX in normoxic conditions. A. DOX fluorescence intensity in cells. B. DOX fluorescence intensity in cell nucleus at different time periods. C. Representative images of cells after 4 h incubation with 5  $\mu$ M DOX. Scale bar = 50  $\mu$ m. Bars marked with different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) within the same category,  $n = 3$ .

The F5 subline demonstrated the highest DOX fluorescence intensity among the cell lines tested after 240 minutes of incubation with 1  $\mu$ M DOX (Figure 4A). This intensity was approximately 2.5-fold higher than observed in the H2 subline and 2-fold higher than in the MDA-MB-231 and D8 sublines, as illustrated in Figure 4C. Comparatively, under these oxygen-deprived conditions, no significant differences were noted in the uptake of DOX into the nuclei of the cells across the different sublines (Figure 4B).

When the DOX concentration was increased to 5  $\mu$ M, an enhanced DOX uptake into cells and nuclei was observed, as represented in Figure 5C. After 240 minutes of incubation, the DOX fluorescence intensity in cells of the MDA-MB-231, F5, and D8 sublines showed no statistically significant differences at this higher concentration. However, the DOX fluorescence intensity in H2 subline cells remained approximately 1.7-fold lower than in the other examined subline cells (Figure 5A). Furthermore, the overall DOX fluorescence intensity under hypox-



## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines



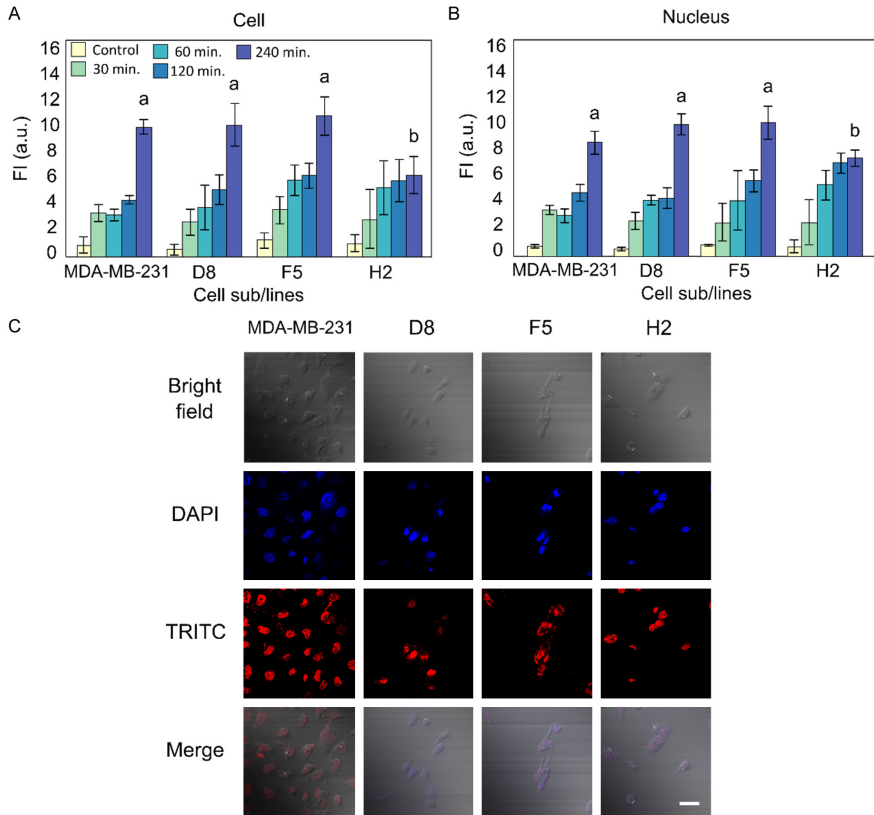
**Figure 4.** DOX uptake into monolayer-cultured cells from MDA-MB-231 cell line and its sublines after incubation with 1  $\mu$ M DOX in hypoxic conditions. A. DOX fluorescence intensity in cells. B. DOX fluorescence intensity in cell nucleus at different time periods. C. Representative images of cells after 4 h incubation with 1  $\mu$ M DOX. Scale bar = 50  $\mu$ m. Bars marked with different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) within the same category,  $n = 3$ .

ic conditions was 2.5-fold lower than that under normoxic conditions for the same DOX concentration. The study also highlighted a more pronounced DOX transport into the nuclei, approximately 2-fold higher than in the cytoplasm of the cells (**Figure 5B**), with the highest DOX transport observed in the nuclei of F5 subline cells. Notably, DOX transport into cell nuclei was 3-fold lower under hypoxic compared to normoxic conditions.

However, when comparing DOX uptake in cells at 1  $\mu$ M or 5  $\mu$ M concentrations in hypoxic envi-

ronment, differences in DOX distribution within the cells were observed. At 1  $\mu$ M of DOX, a different drug distribution between the cell cytoplasm and nucleus was observed, with DOX uptake in the nucleus being from 1.4 to 2.2-fold higher than in the cytoplasm. The same tendency was observed at a concentration of 5  $\mu$ M. The DOX distribution within the cell and nucleus, with DOX uptake in the cell nucleus being from 2 to 3.9-fold higher than in the cytoplasm. The highest difference was observed in the H2 subline, where DOX uptake in the cell nucleus was 3.8-fold higher than in the cell cytoplasm.

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines



**Figure 5.** DOX uptake into monolayer-cultured cells from MDA-MB-231 cell line and its sublines after incubation with 5 μM DOX in hypoxic conditions. A. DOX fluorescence intensity in cells. B. DOX fluorescence intensity in cell nucleus at different time periods. C. Representative images of cells after 4 h incubation with 5 μM DOX. Scale bar = 50 μm. Bars marked with different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) within the same category,  $n = 3$ .

### DOX transport into spheroids

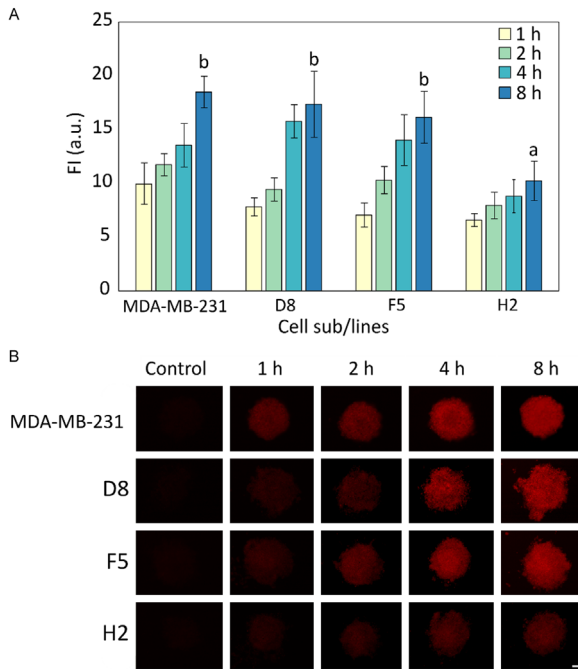
MDA-MB-231 cells alone did not form spheroids, so HF (fibroblast) cells were used. Combining breast cancer cells with fibroblasts when forming spheroids allowed us to better mimic the TME.

The spheroids formed at the experiment's onset had an average diameter of approximately 390 μm. Across the groups, spheroid sizes varied between 360 and 420 μm. The largest spheroids, lacking a clear round shape, were formed by D8 subline cells, while the smallest

were observed in the H2 subline cells. Spheroid sizes remained consistent within each group under control and DOX incubation conditions.

Fluorescence intensity demonstrated that the penetration of DOX into the cell spheroids was directly proportional to the duration of incubation, highlighting a time-dependent penetration mechanism (Figure 6B). After 1 hour of incubation, DOX transport into MDA-MB-231 spheroids was up to 1.5-fold higher than in other groups, though not statistically significant (Figure 6A). After 8 hours of incubation, the penetration of DOX was higher in spheroids

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines



**Figure 6.** The different DOX penetration into spheroids at DOX 10  $\mu$ M concentration. DOX fluorescence intensity in spheroids at different time periods (A), images of cells after 8 h incubation with DOX (B). Magnification 100  $\times$ . Scale bar = 100  $\mu$ m. The different letters indicate  $P < 0.05$  compared the DOX penetration at the same time in different cell sublines,  $n = 3$ . Abbreviation: MDA, MDA-MB-231 cell line.

formed from subline D8, F5, and MDA-MB-231 cells than from subline H2 cells. DOX fluorescence intensity in spheroids from subline H2 cells was about 2-fold lower than in the other spheroids (Figure 6A). These findings are consistent with the results from studies in 2D cultures.

### Discussion

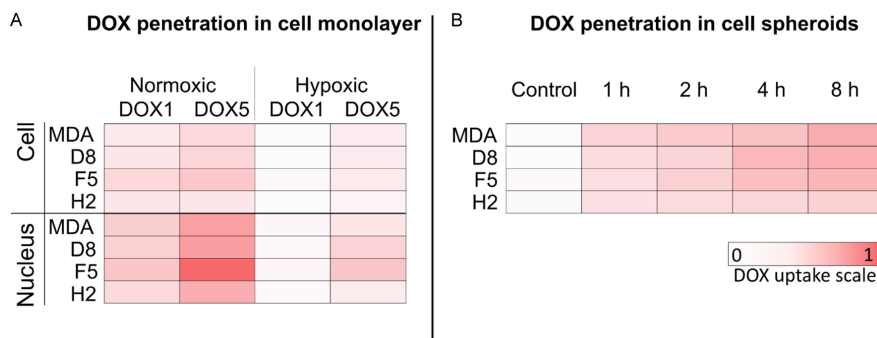
Triple-negative breast cancer is recognized for its inherent heterogeneity, a characteristic that complicates treatment strategies. This diversity within TNBC tumours contributes to the emergence of drug resistance, driven by the phenotypic variations among subpopulations. Current scientific research delves deeply into understanding these differences among sublines and their interactions to decipher their

influence on treatment outcomes [1].

This study investigates the heterogeneous nature of TNBC, focusing on the variations in DOX uptake among different sublines, which are associated with distinct traits such as drug resistance (H2 subline), CD133 receptor expression (F5 subline), and migration rates (D8 subline), consistent with previous findings [21]. Furthermore, we examine the influence of culture conditions, particularly the contrast between normoxic and hypoxic environments, on DOX uptake, aiming to elucidate the underlying mechanisms contributing to DOX resistance in TNBC. Studies have demonstrated significant differences in DOX uptake among these sublines. For example, Bao et al. [23] demonstrated substantial differences in DOX, with DOX primarily accumulating in the nucleus of the DOX-sensitive MDA-MB-231 subline, while in the resistant subline, it predominantly resided in the cytoplasm. Further, recent research by Khan et al. [24] indicated that single cell-derived clones from four different breast cancer cell lines exhibited varied sensitivities to DOX. These findings highlight the necessity of assessing DOX uptake in phenotypically different sublines, as this can provide pivotal insights into overcoming DOX resistance in cancer treatment.

During the investigation of DOX penetration into cells cultured in monolayers, significant variations in DOX penetration were evident. Primarily, distinct differences in DOX penetration were noted among MDA-MB-231 sublines. Additionally, the variations of DOX distribution in the cell cytoplasm and nucleus were determined. Subsequently, environmental conditions, such as normoxia and hypoxia, were observed to impact the intracellular entry of

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines



**Figure 7.** Comparing DOX uptake in 2D and 3D cell cultures. A. DOX uptake in monolayer cultured cells after 8 hours of incubation. B. DOX transport into spheroids at incubation periods from 1 to 8 hours. The scale bar represents normalized DOX fluorescence intensity (FI). The highest amount of FI equal to 1.

DOX, which was an expected result. The observed decrease in DOX uptake under hypoxic conditions significantly impacts chemotherapy's effectiveness, particularly in the microenvironments of rapidly growing tumours with low oxygen supply. Hypoxia-inducible factors (HIFs), especially HIF-1, play a crucial role in this process, activating drug resistance mechanisms like P-glycoprotein and altering gene transcription to promote tumour survival and growth, thereby reducing the intracellular concentration of anticancer drugs such as DOX [20, 25]. Our findings reveal that in hypoxic conditions, DOX uptake in both cells and their nuclei substantially decreases up to five times with a lower concentration and almost three times with a higher concentration, compared to normoxic conditions. This reduction in DOX uptake underlines the adaptability of breast cancer cells, such as the MDA-MB-231 line, to hypoxic conditions by modifying their metabolism to not only survive but also expel chemotherapeutic drugs.

In the present study, subline F5 cells demonstrated the most pronounced uptake of DOX under normoxic conditions (Figure 7A), with an increased uptake observed under hypoxic conditions with elevated DOX concentrations. Previously recognized as notably responsive to DOX [21], the F5 subline exhibited a higher accumulation of DOX within both cytoplasmic and nuclear compartments, correlating with increased cellular sensitivity to the drug. Additionally, scientists noted divergent resistance

patterns to DOX across various sublines of the MDA-MB-231 cell line [24]. At the DOX uptake experiments, an increased fluorescence intensity was observed in the F5 subline nucleus. This observation indicates that in DOX-sensitive cells, DOX efficiently localizes in higher concentrations in the cell nucleus and less in the cytoplasm [23]. The increased accumulation of DOX in the cell nucleus is primarily due to its ability to intercalate into DNA, aided by its hydrophilic nature and possibly active transport mechanisms that facilitate its entry and retention in the nucleus [26-28]. Typically, there is low expression of nuclear and cytoplasmic P-gp in DOX-sensitive cells, which results in an increased intracellular concentration of DOX [29, 30]. Comparing the DOX uptake results in F5 subline cells under hypoxia and normoxia, a threefold decrease in nuclear DOX uptake at a higher DOX concentration under hypoxia compared to normoxia suggests that tumours with cell phenotypes like the F5 subline may display increased resistance to chemotherapy in hypoxic conditions. This resistance poses a significant challenge, especially in tumours larger than 100  $\mu\text{m}$  from the nearest blood vessel, as they are difficult to detect early due to their small size [25].

The H2 subline cells displayed the lowest DOX uptake between all tested lines (Figure 7A) under normoxia and hypoxia in the cells and their nuclei across both concentrations. This reduced uptake is consistent with the H2 subline's previously observed resistance to DOX

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines

[21]. In DOX-resistant cells, DOX is typically unable to reach the nucleus and remains exclusively in the components of cytoplasm (mitochondria [31], endoplasmic reticulum [32] and lysosomal accumulation [33]), especially at lower concentrations [23]. However, at higher concentrations, DOX can cross the nuclear membrane pores in cells (passive diffusion [34] or active transport [35]) and exhibit increased fluorescence intensity in the nucleus compared to the cytoplasm. Additionally, the H2 subline showed a marked decrease in DOX uptake under hypoxia, 7-fold less in cells and 5-fold less in the nucleus than under normoxic conditions, highlighting the significant challenge hypoxia poses to effective cancer treatment.

The MDA-MB-231 and D8 subline cells displayed intermediate levels of DOX uptake under various growth conditions and DOX concentrations, ranking between the F5 and H2 sublines regarding uptake intensity into cells and nuclei under normoxic conditions. This observation underscores the similarity of the D8 subline to the MDA-MB-231 parent cell line. Our previous research has shown that D8 subline cells are more sensitive to anticancer drugs than the MDA-MB-231 cells, but in DOX uptake, significant differences were not determined.

Furthermore, our investigation of DOX transport in 3D cell cultures provides deeper insights into the complexities of drug delivery within the TME. 3D tumour spheroids can replicate the *in vivo* resistance patterns seen in solid tumours, attributed to factors such as hypoxia, cellular heterogeneity, and the physical barriers to drug diffusion [36]. Employing fibroblasts allowed us to model the TME more accurately and assess DOX transport in spheroids [37]. The observed time-dependent DOX transport in 3D cultures varied among MDA-MB-231, F5, D8, and H2 sublines, with H2 spheroids exhibiting the lowest DOX uptake compared to MDA-MB-231, F5, and D8 spheroids (**Figure 7B**). This underscores the critical role of different subline phenotypes in drug transport and resistance mechanisms. The spheroids from subline F5 cells exhibited a sensitivity to DOX, challenging the conventional understanding that cancer stem cell-like phenotypes (as indicated by high CD133 expression) are inherently resistant to chemotherapy. This F5 cell sensitivity in 3D cultures may point

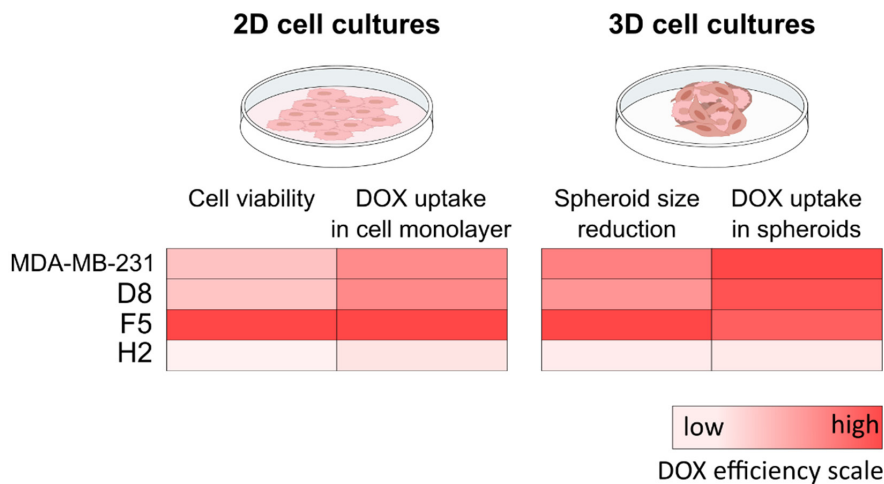
to the heterogeneity within the MDA-MB-231 cell line itself and suggests that not all cells with stem-like features exhibit the same drug resistance profiles [38-40]. The lower DOX uptake in H2 spheroids highlights the challenge of overcoming drug resistance in tumour subpopulations that exhibit reduced drug accumulation, potentially due to enhanced efflux mechanisms or alterations in drug metabolism pathways [41]. Our findings align with recent studies indicating that the microenvironment of solid tumours plays a significant role in modulating drug uptake and efficacy [42]. The reduced uptake of DOX in hypoxia observed in our study corroborates the notion that hypoxia-induced factors contribute to cancer drug resistance [25].

The variation in DOX uptake under normoxic versus hypoxic conditions highlights the significant influence of the TME on chemotherapy efficacy. This finding is consistent with the research by Gilkes et al. [43], which showed how hypoxia-inducible factors (HIFs) modulate gene expression to enhance survival and resistance in low-oxygen environments. Our study builds on this by demonstrating how these specific microenvironmental conditions directly affect drug uptake in TNBC cells. Additionally, using 3D spheroid models has revealed the challenges posed by complex tumour structures in drug delivery. Notably, the differential DOX uptake observed in 3D spheroids, particularly the reduced uptake in H2 subline spheroids, underscores the significant physical and biological barriers that complicate effective treatment. These observations are supported by findings from Weigelt et al. [44], who discussed the advantages of 3D models in replicating tumours' spatial and architectural heterogeneity, greatly affecting treatment outcomes.

Our study demonstrates a correlation between our results on DOX transport in 2D and 3D cultures and our previous research on DOX activity for cell viability and spheroid size reduction (**Figure 8**) [21].

Previously, we revealed that H2 subline cells were resistant to DOX. In this study, H2 cells showed the lowest DOX uptake compared to all other tested cells in both 2D and 3D cultures. Additionally, the viability of H2 subline cells was the highest compared to all tested sublines,

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines



**Figure 8.** Comparison of DOX activity and transport in 2D and 3D cell cultures. In 2D cell cultures, the effect of DOX on cell viability was determined using the MTT-colorimetric method, while DOX uptake in cell monolayers was assessed through fluorescence intensity measurements. In 3D cell cultures, the reduction in spheroid size was measured ( $\mu\text{m}$ ), and DOX uptake in spheroids was evaluated using fluorescence intensity. The scale bar represents relative units of the DOX effect in cells, ranging from low (light red) to high (intense red).

indicating the low effect of DOX (**Figure 8**, left). However, H2 subline spheroids showed the lowest DOX uptake, a finding that correlates with the results from 2D cell cultures. This may be attributed to insufficient drug accumulation in H2 cells, compromising its cytotoxic effects. Such a scenario could arise from several resistance mechanisms, including increased drug efflux, which actively removes the drug from the cell [23, 45, 46], and reduced drug influx. The resistance observed in the H2 subline could be associated with the TNBC mesenchymal subtype, known for its increased expression of multidrug resistance (MDR) pumps [47, 48]. This hypothesis is supported by the low DOX transport observed, suggesting that the H2 subline may have elevated MDR pump expression, a characteristic feature of the TNBC mesenchymal subtype.

The sensitivity of the F5 subline to DOX is due to high DOX accumulation in the nucleus of F5 cells (**Figure 7**, intense red colour). Furthermore, DOX statistically significantly reduced the size of the spheroids, and DOX entry into the spheroids of the F5 subline was the highest among all lines (**Figure 8**, right). Similar TNBC subtypes to the F5 subline may increase DOX

transport in cells due to genetic or epigenetic modifications impairing efflux pumps' effectiveness, allowing DOX to remain within the cells longer [49, 50]. Additionally, this could lead to changes in lipid metabolism or membrane fluidity, affecting drug permeability. Finally, these cells might exhibit susceptibility to DOX's mechanism of action, such as intercalation into DNA and disruption of topoisomerase II, leading to effective cytotoxicity despite a stem-like phenotype [40]. These insights into the drug dynamics within the F5 subline could inform targeted strategies to overcome drug resistance in other TNBC subtypes exhibiting similar characteristics.

Many scientists are looking for effective inhibitors to reduce drug resistance in cancer cells [51-54] and evaluating different resistance mechanisms to DOX [55]. This research contributes to these findings and provides several insights that could significantly influence future treatment strategies. Identifying sublines with varying DOX uptake enables the development of targeted treatments, as sublines like F5, which uptake more DOX, respond better to DOX-based therapies, while resistant sublines, like H2, may require alternative or combination

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines

treatments. Understanding the mechanism behind reduced DOX uptake in resistant sublines is essential for overcoming drug resistance therapies for specific tumor subpopulations and can enhance chemotherapy effectiveness. Understanding the mechanisms behind reduced DOX uptake (overcoming drug resistance) in resistant sublines is crucial. Factors like hypoxia reduce DOX uptake, implicating HIFs and efflux pumps like P-gp. Combining DOX with HIF inhibitors or P-glycoprotein blockers may enhance drug sensitivity in resistant sublines. The tumor microenvironment influence, such as normoxia and hypoxia, significantly affects DOX uptake. Hypoxic conditions notably reduce DOX penetration. Designing treatments that consider microenvironmental factors or target hypoxic tumor regions could enhance treatment efficacy. Also, phenotypic markers correlating with DOX uptake can serve as predictive biomarkers, helping stratify patients based on their likely response to DOX-based therapies. For instance, high CD133 expression in F5 subline cells correlates with higher DOX uptake, suggesting its potential as a predictive marker. In addition, variability in DOX uptake among TNBC sublines supports personalized medicine approaches. By evaluating a patient's tumor phenotypes, clinicians can design personalized treatment plans, optimizing drug selection and dosing to improve outcomes and reduce adverse effects. Overall, this study on DOX uptake in TNBC sublines offers critical insights for improving cancer treatment strategies. By targeting specific tumor subpopulations, addressing microenvironmental influences, and utilizing predictive biomarkers, we can advance towards more effective and personalized cancer therapies, overcoming drug resistance and enhancing chemotherapy success.

### Conclusions

The intratumor diversity and microenvironmental factors explored in our study underline the complexity of treatment resistance in TNBC. By understanding how specific phenotypic properties contribute to drug uptake and resistance, we can tailor the development of targeted therapies and combination treatments. In this study, we revealed that phenotypically different cells exhibit varying DOX accumulation, with sensitive sublines showing higher nuclear accumulation and resistant sublines showing lower

levels. Both 2D and 3D models confirmed that hypoxia reduces DOX accumulation. Modulating the TME, for instance, improving oxygenation or targeting hypoxic cells, could enhance the efficacy of conventional chemotherapies such as DOX. Our findings advocate for a personalized approach in TNBC treatment, where therapies are adapted based on the detailed characteristics of each tumour's subpopulation and its microenvironment. Ultimately, this study enriches our understanding of TNBC heterogeneity and emphasizes the importance of considering intratumor diversity and the TME in searching for more effective treatment strategies.

### Acknowledgements

This research was supported by the Science Foundation of Lithuania University of Health Sciences project "Implication of interactions between triple-negative breast cancer cell populations for chemotherapy resistance", 2023.

### Disclosure of conflict of interest

None.

**Address correspondence to:** Vilma Petrikaitė, Laboratory of Drug Targets Histopathology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, Sukileliu pr. 13, LT-50162 Kaunas, Lithuania. Tel: +370-686-29383; E-mail: vilma.petrikaite@ismuni.lt

### References

- [1] Chen Y, Feng X, Yuan Y, Jiang J, Zhang P and Zhang B. Identification of a novel mechanism for reversal of doxorubicin-induced chemotherapy resistance by TXNIP in triple-negative breast cancer via promoting reactive oxygen-mediated DNA damage. *Cell Death Dis* 2022; 13: 338.
- [2] Álvarez-Teijeiro S, García-Inclán C, Villaronga MÁ, Casado P, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, Rodrigo JP, Calvo F, del-Río-Ibáñez N, Gandarillas A, Morís F, Hermsen M, Cutillas P and García-Pedrero JM. Factors secreted by cancer-associated fibroblasts that sustain cancer stem properties in head and neck squamous carcinoma cells as potential therapeutic targets. *Cancers (Basel)* 2018; 10: 334.
- [3] Theile D and Wiggall P. Acquired ABC-transporter overexpression in cancer cells: transcriptional induction or Darwinian selection? *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2021; 394: 1621-32.

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines

- [4] Hraběta J, Belhajová M, Šubrtová H, Merlos Rodrigo MA, Heger Z and Eckschlager T. Drug sequestration in lysosomes as one of the mechanisms of chemoresistance of cancer cells and the possibilities of its inhibition. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 4392.
- [5] Paškevičiūtė M and Petrikaitė V. Proton pump inhibitors modulate transport of doxorubicin and its liposomal form into 2D and 3D breast cancer cell cultures. *Cancer Manag Res* 2019; 11: 9761-69.
- [6] Mattioli R, Ilari A, Colotti B, Mosca L, Fazi F and Colotti G. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Aspects Med* 2023; 93: 101205.
- [7] Chen Z, Han F, Du Y, Shi H and Zhou W. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8: 70.
- [8] Ni Y, Zhou X, Yang J, Shi H, Li H, Zhao X and Ma X. The role of tumor-stroma interactions in drug resistance within tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 637675.
- [9] Deshmukh S and Saini S. Phenotypic heterogeneity in tumor progression, and its possible role in the onset of cancer. *Front Genet* 2020; 11: 604528.
- [10] Bhattacharya S, Mohanty A, Achuthan S, Kotala S, Jolly MK, Kulkarni P and Salgia R. Group behavior and emergence of cancer drug resistance. *Trends Cancer* 2021; 7: 323-34.
- [11] Sasaki A, Nagatake T, Egami R, Gu G, Takigawa I, Ikeda W, Nakatani T, Kunisawa J and Fujita Y. Obesity suppresses cell-competition-mediated apical elimination of RasV12-transformed cells from epithelial tissues. *Cell Rep* 2018; 23: 974-82.
- [12] Madan E, Peixoto ML, Dimitrion P, Eubank TD, Yekelchik M, Talukdar S, Fisher PB, Mi QS, Moreno E and Gogna R. Cell competition boosts clonal evolution and hypoxic selection in cancer. *Trends Cell Biol* 2020; 30: 967-78.
- [13] Pelham CJ, Nagane M and Madan E. Cell competition in tumor evolution and heterogeneity: merging past and present. *Semin Cancer Biol* 2020; 63: 11-18.
- [14] Freischel AR, Damaghi M, Cunningham JJ, Ibrahim-Hashim A, Gillies RJ, Gatenby RA and Brown JS. Frequency-dependent interactions determine outcome of competition between two breast cancer cell lines. *Sci Rep* 2021; 11: 4908.
- [15] Hapach LA, Carey SP, Schwager SC, Taufalele PV, Wang W, Mosier JA, Ortiz-Otero N, McArdle TJ, Goldblatt ZE, Lampi MC, Bordeleau F, Marshall JR, Richardson IM, Li J, King MR and Reinhart-King CA. Phenotypic heterogeneity and metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 2021; 81: 3649-63.
- [16] Hapach LA, Wang W, Schwager SC, Pokhriyal D, Fabiano ED and Reinhart-King CA. Phenotypically sorted highly and weakly migratory triple negative breast cancer cells exhibit migratory and metastatic commensalism. *Breast Cancer Res* 2023; 25: 102.
- [17] Kvokačková B, Remšík J, Jolly MK and Souček K. Phenotypic heterogeneity of triple-negative breast cancer mediated by epithelial-mesenchymal plasticity. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 2188.
- [18] Moreira MP, Brayner FA, Alves LC, Cassali GD and Silva LM. Phenotypic, structural, and ultrastructural analysis of triple-negative breast cancer cell lines and breast cancer stem cell subpopulation. *Eur Biophys J* 2019; 48: 673-84.
- [19] Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H and Shu Y. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer* 2019; 18: 157.
- [20] Sørensen BS and Horsman MR. Tumor hypoxia: impact on radiation therapy and molecular pathways. *Front Oncol* 2020; 10: 562.
- [21] Januškevičienė I and Petrikaitė V. Interaction of phenotypic sublines isolated from triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 modulates their sensitivity to paclitaxel and doxorubicin in 2D and 3D assays. *Am J Cancer Res* 2023; 13: 3368-83.
- [22] Čeponytė U, Paškevičiūtė M and Petrikaitė V. Comparison of NSAIDs activity in COX-2 expressing and non-expressing 2D and 3D pancreatic cancer cell cultures. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 1543-51.
- [23] Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K and Dash S. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am J Pathol* 2012; 180: 2490-503.
- [24] Khan GN, Kim EJ, Shin TS and Lee SH. Heterogeneous cell types in single-cell-derived clones of MCF7 and MDA-MB-231 cells. *Anticancer Res* 2017; 37: 2343-54.
- [25] Al Tameemi W, Dale TP, Al-Jumaily RMK and Forsyth NR. Hypoxia-modified cancer cell metabolism. *Front Cell Dev Biol* 2019; 7: 4.
- [26] Pronina VV, Kostryukova LV, Bulko TV and Shumyantseva VV. Interaction of doxorubicin embedded into phospholipid nanoparticles and targeted peptide-modified phospholipid nanoparticles with DNA. *Molecules* 2023; 28: 5317.
- [27] Jawad B, Poudel L, Podgornik R and Ching WY. Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Phys Chem Chem Phys* 2019; 21: 3877-93.



## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines

- [28] Chen NT, Wu CY, Chung CY, Hwu Y, Cheng SH, Mou CY and Lo LW. Probing the dynamics of doxorubicin-DNA intercalation during the initial activation of apoptosis by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *PLoS One* 2012; 7: e44947.
- [29] Kopecka J, Godel M, Dei S, Giampietro R, Belisario DC, Akman M, Contino M, Teodori E and Riganti C. Insights into p-glycoprotein inhibitors: new inducers of immunogenic cell death. *Cells* 2020; 9: 1033.
- [30] Mirzaei S, Gholami MH, Hashemi F, Zabolian A, Farahani MV, Hushmandi K, Zarrabi A, Goldman A, Ashrafzadeh M and Orive G. Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. *Drug Discov Today* 2022; 27: 436-55.
- [31] Chen R, Niu M, Hu X and He Y. Targeting mitochondrial dynamics proteins for the treatment of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Front Mol Biosci* 2023; 10: 1241225.
- [32] Kopsida M, Clavero AL, Khaled J, Balgoma D, Luna-Marco C, Chowdhury A, Nyman SS, Rorsman F, Ebeling Barbier C, Bergsten P, Lennernäs H, Hedeland M and Heindryckx F. Inhibiting the endoplasmic reticulum stress response enhances the effect of doxorubicin by altering the lipid metabolism of liver cancer cells. *Mol Metab* 2024; 79: 101846.
- [33] Lin CP, Wu SH, Lin TY, Chu CH, Lo LW, Kuo CC, Chang JY, Hsu SC, Ko BS, Yao M, Hsiao JK, Wang SW and Huang DM. Lysosomal-targeted doxorubicin delivery using RBC-derived vesicles to overcome drug-resistant cancer through mitochondrial-dependent cell death. *Pharmacol Res* 2023; 197: 106945.
- [34] dos Reis SB, de Oliveira Silva J, Garcia-Fossa F, Leite EA, Malachias A, Pound-Lana G, Mosqueira VCF, Oliveira MC, de Barros ALB and de Jesus MB. Mechanistic insights into the intracellular release of doxorubicin from pH-sensitive liposomes. *Biomed Pharmacother* 2021; 134: 110952.
- [35] Cohen O and Granek R. Nucleus-targeted drug delivery: theoretical optimization of nanoparticles decoration for enhanced intracellular active transport. *Nano Lett* 2014; 14: 2515-21.
- [36] Brancato V, Gioielli F, Imparato G, Guarnieri D, Urciuolo F and Netti PA. 3D breast cancer microtissue reveals the role of tumor microenvironment on the transport and efficacy of free-doxorubicin in vitro. *Acta Biomater* 2018; 75: 200-12.
- [37] Sztankovics D, Moldvai D, Petővári G, Gelencsér R, Krencz I, Raffay R, Dankó T and Sebestyén A. 3D bioprinting and the revolution in experimental cancer model systems-A review of developing new models and experiences with in vitro 3D bioprinted breast cancer tissue-mimetic structures. *Pathol Oncol Res* 2023; 29: 1610996.
- [38] Prasetyanti PR and Medema JP. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer* 2017; 16: 41.
- [39] Yang F, Cao L, Sun Z, Jin J, Fang H, Zhang W and Guan X. Evaluation of breast cancer stem cells and intratumor stemness heterogeneity in triple-negative breast cancer as prognostic factors. *Int J Biol Sci* 2016; 12: 1568-77.
- [40] Saha T and Lukong KE. Breast cancer stem-like cells in drug resistance: a review of mechanisms and novel therapeutic strategies to overcome drug resistance. *Front Oncol* 2022; 12: 856974.
- [41] Yu S, Zheng J, Zhang Y, Meng D, Wang Y, Xu X, Liang N, Shabiti S, Zhang X, Wang Z, Yang Z, Mi P, Zheng X, Li W and Chen H. The mechanisms of multidrug resistance of breast cancer and research progress on related reversal agents. *Bioorg Med Chem* 2023; 95: 117486.
- [42] Tang K, Zhu L, Chen J, Wang D, Zeng L, Chen C, Tang L, Zhou L, Wei K, Zhou Y, Lv J, Liu Y, Zhang H, Ma J and Huang B. Hypoxia promotes breast cancer cell growth by activating a glycogen metabolic program. *Cancer Res* 2021; 81: 4949-63.
- [43] Gilkes DM, Semenza GL and Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 430-9.
- [44] Weigelt B, Ghajar CM and Bissell MJ. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 69-70: 42-51.
- [45] Aydinlik S, Erkisa M, Cevatemre B, Sarimahmut M, Dere E, Ari F and Ulukaya E. Enhanced cytotoxic activity of doxorubicin through the inhibition of autophagy in triple negative breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017; 1861: 49-57.
- [46] Engle K and Kumar G. Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB1 inhibition: a recent update. *Eur J Med Chem* 2022; 239: 114542.
- [47] Kinnel B, Singh SK, Oprea-Ilie G and Singh R. Targeted therapy and mechanisms of drug resistance in breast cancer. *Cancers (Basel)* 2023; 15: 1320.
- [48] Jianmongkol S. Overcoming P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance. In: Arnouk H, editors. *Advances in Precision Medicine Oncology*. IntechOpen; 2021. pp. 1-22.
- [49] Fultang N, Chakraborty M and Peethambaran B. Regulation of cancer stem cells in triple negative breast cancer. *Cancer Drug Resist* 2021; 4: 321-42.
- [50] Cheng CC, Shi LH, Wang XJ, Wang SX, Wan XQ, Liu SR, Wang YF, Lu Z, Wang LH and Ding Y.

## Transport of doxorubicin in MDA-MB-231 sublines

- Stat3/Oct-4/c-Myc signal circuit for regulating stemness-mediated doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer cells and inhibitory effects of WP1066. *Int J Oncol* 2018; 53: 339-48.
- [51] Tsou SH, Chen TM, Hsiao HT and Chen YH. A critical dose of doxorubicin is required to alter the gene expression profiles in MCF-7 cells acquiring multidrug resistance. *PLoS One* 2015; 10: e0116747.
- [52] Otter M, Csader S, Keiser M and Oswald S. Expression and functional contribution of different organic cation transporters to the cellular uptake of doxorubicin into human breast cancer and cardiac tissue. *Int J Mol Sci* 2021; 23: 255.
- [53] Kullenberg F, Degerstedt O, Calitz C, Pavlović N, Balgoma D, Gråsjö J, Sjögren E, Hedeland M, Heindryckx F and Lennernäs H. In vitro cell toxicity and intracellular uptake of doxorubicin exposed as a solution or liposomes: implications for treatment of hepatocellular carcinoma. *Cells* 2021; 10: 1717.
- [54] Nagai K, Fukuno S, Shiota M, Tamura M, Yabumoto S and Konishi H. Differences in transport characteristics and cytotoxicity of epirubicin and doxorubicin in HepG2 and A549 cells. *Anticancer Res* 2021; 41: 6105-12.
- [55] Lei T, Srinivasan S, Tang Y, Manchanda R, Nagasetti A, Fernandez-Fernandez A and McGoron AJ. Comparing cellular uptake and cytotoxicity of targeted drug carriers in cancer cell lines with different drug resistance mechanisms. *Nanomedicine* 2011; 7: 324-32.

## Original Article

# Interaction of phenotypic sublines isolated from triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 modulates their sensitivity to paclitaxel and doxorubicin in 2D and 3D assays

Indrė Januškevičienė, Vilma Petrikaitė

Laboratory of Drug Targets Histopathology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, Sukilėlių pr., LT-50162, Kaunas, Lithuania

Received May 5, 2023; Accepted June 23, 2023; Epub August 15, 2023; Published August 30, 2023

**Abstract:** Breast cancer is a rapidly evolving, multifactorial disease that accumulates numerous genetic and epigenetic alterations. These result in molecular and phenotypic heterogeneity within the tumor, the complexity of which is further amplified through specific interactions between cancer cells. We aimed to analyze cell phenotypic sublines and the influence of their interaction on drug resistance, spheroid formation, and migration. Seven sublines were derived from the MDA-MB-231 breast cancer cell line using a multiple-cell suspension dilution. The growth rate, CD133 receptor expression, migration ability, and chemosensitivity of these sublines to anticancer drugs doxorubicin (DOX) and paclitaxel (PTX) were determined. Three sublines (F5, D8, H2) have been chosen to study their interaction in 2D and 3D assays. In the 2D model, the resistance of all sublines composition to DOX decreased, but in the 3D model, the resistance of all sublines except H2, increased to both PTX and DOX. In the 3D model, the combined sublines F5 and D8 had higher resistance to DOX and statistically significantly lower resistance for PTX compared to the control. The interaction between cancer stem-like cells (F5) and increased migration cells (D8) increased resistance to PTX in cell monolayer and increased resistance against both DOX and PTX in the spheroids. The interaction of DOX-resistant (H2) cells with other cell subpopulations (D8, F5, HF) decreased the resistance to DOX in cell monolayer and both DOX and PTX in spheroids.

**Keywords:** Triple-negative breast cancer, cell interaction, drug resistance, phenotypic sublines, MDA-MB-231

## Introduction

Breast cancer is one of the most common oncology diseases worldwide. In 2020, the predicted number of new breast cancer cases was 2.3 million and 685,000 deaths globally (based on World Health Organization (WHO) data) [1]. Over the past few decades, significant progress has been made in preventing, diagnosing, and treating cancer. TNBC accounts for about 15-20% of all biological types of breast cancer [2]. Based on the histological classification of breast tumors, TNBC is classified as invasive ductal, less commonly metaplastic, medullary, or adenoid cystic carcinoma. Invasive ductal carcinoma is the most common (70-80%) form of breast cancer [3]. These tumors begin to develop in the milk ducts from the epi-

thelial cells that line them. Based on molecular profiling studies, since 2011, many TNBC subtypes have been established [4]. Still, there is no one unique official classification due to the TNBC cell variability [5-8]. Burstein et al. divided TNBC into four stable, distinct molecular subtypes that differentially respond to chemotherapy and targeted-therapy agents: basal-like immune-suppressed subtype, basal-like immune-activated subtype, mesenchymal subtype, luminal androgen receptor subtype. This new classification was suggested by combined early years studies [9].

Each molecular subtype has a different response to the treatment [4, 9]. Molecular profiling studies indicate that most TNBCs (approximately 70%) tumors consist of basal subtype

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line

cells. The rest of these tumors consist of various molecular subtypes of TNBC cells that are biologically distinct. This intratumor cell heterogeneity usually is responsible for the failure of treatment of disease due to the drug-resistant cell populations in tumors. These drug-resistant cell populations lead the tumor relapse and cancer progression. Intratumor cell heterogeneity is believed to form differently and can be detected at the morphological and molecular heterogeneity [10]. Morphological heterogeneity is observed as tumor histology (histotype, tissue reaction, differentiation, tissue composition) and different functional areas (tumor center and borders). These differences could cause clinical misinterpretation of the future tumor treatment strategy [11]. Molecular intratumor heterogeneity is divided into two types: first is clonal heterogeneity (genetic or epigenetic evolution) and nonclonal heterogeneity (phenotypic functional plasticity or stochastic (single cell plasticity) [12].

TNBC tumor heterogeneity makes the treatment of these tumors very complicated. The treatment options for this disease are limited because the cells do not have targets on which to tailor the treatment. Patients whose tumors are in later stages have a very poor survival prognosis. TNBC positively responds to chemotherapy (anthracyclines or/and taxanes-based) [13]. However, more than 50% of patients diagnosed with TNBC at an early stage have a recurrence of the disease, and 37% of these patients die within the first five years, despite the treatment being applied [14]. Many drug resistance mechanisms are described, such as impaired drug influx, enhanced drug efflux via multidrug resistance pumps, drug compartmentalization away from its target protein, metabolic drug inactivation and drug resistance due to cancer cell-cell and cancer cell-stromal cell interaction [15]. Cell interaction in a tumor is one of the objects of target therapy. Due to cell interaction via signalling pathways or soluble factors induce tumor growth and drug resistance. Stromal cells, like a fibroblast, secrete many cytokines and growth factors [16, 17]. These molecules activate phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT and nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) pathways in cancer cells and cause drug resistance in cancer cells [18]. Tumor microenvironment could affect drug resistance in cancer cells due to cell interaction. So, cell-cell interaction in cancer needs to be studied more

to understand this mechanism to prevent drug resistance in tumors.

This study aimed to evaluate cancer cell-cell interaction by isolating several phenotypically different cell sublines from the MDA-MB-231 cell line. Investigate the influence of these cell sublines interaction on resistance to anticancer drugs in 2D and 3D cell culture models. For subline characterization, we used immunocytochemistry and stained the cells with stem-like cancer cell (CSCs) CD133 antibody to investigate CD133 receptor expression in sublines. To assess the sublines' resistance to anticancer drugs, we applied the MTT cytotoxicity assay. A wound-healing assay was used to estimate the cell's ability to migrate. The most characteristic sublines D8, F5, H2 at drug sensitivity, migration, and CSCs-like properties, were chosen. Cell interaction research is performed by mixing these sublines in many ways: 1) sublines with fibroblast cells; 2) MDA-MB-231, fibroblasts and sublines; 3) mixing sublines between each other and fibroblasts. Interaction studies performed in 2D and 3D models.

### Materials and methods

#### *Cell culturing*

Human triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Human foreskin fibroblasts (HF) CRL-4001 were initially obtained from ATCC and kindly provided by Prof. Helder Santos (University of Helsinki, Finland). Cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX (Gibco, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, qualified, heat-inactivated, E.U.-approved, South America Origin, Gibco, UK), 10,000 U/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin (Gibco, UK), 1  $\mu$ g/ml insulin 27 USP units/mg (Gibco, UK), 1% minimum essential medium non-essential amino acids (MEM NEAA) (Gibco, UK), 1% sodium pyruvate (Gibco, UK). Cells were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The same conditions were used for the MDA-MB-231 isolated sublines.

#### *Isolation of cell sublines from commercial MDA-MB-231 cell line*

Cell sublines were isolated from the MDA-MB-231 commercial cell line by multiple cell

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line

suspension dilution in 96-well plates. Using an 8-channel micropipettor, 100 µl of medium was added to all the wells in 96-well plate, except well A1. Then 200 µl of cell suspension ( $2 \times 10^4$  cell/ml) was added into well A1, and using a single channel pipettor, 100 µl of the solution was quickly transferred from the first well to well B1. This dilution was repeated down the entire column, discarding 100 µl from H1, so that it ends up with the same volume as the wells above it. With the 8-channel micro pipettor, 100 µl of medium was added to each well in column 1 (giving 200 µl/well). Using the same pipettor, 100 µl of the liquid was quickly transferred from the wells in the first column (A1-H1) to those in the second column (A2-H2). This dilution strategy was repeated across the entire plate.

After nine days of incubation, the cell colonies in the plate were detected microscopically. Based on formed colonies differences (shape, density of cells), sublines from the wells A9, B7, C7, D8, E7, F5, F7, G5, and H2 were selected (the names of subcolonies were assigned according to the name of the well from which the cells were taken). Sublines were sub-cultured to 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (TPP, Switzerland).

### *Expression of CD133 receptor by immunofluorescence staining*

Cells ( $4 \times 10^4$  cell/ml) were grown for 24 h in a 24-well plate on collagen-coated oval 13 mm diameter cover glasses at standard cell culturing conditions. After 24 h, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) for 20 min., permeabilized in 0.1% Triton X-100 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) for 10 min., blocked in blocking buffer (10 ml of phosphate buffer solution + 0.2 ml fetal bovine serum + 0.02 g bovine serum albumin) for 30 min. Immunostaining was performed with primary antibody 1:50 (anti-CD133 rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, UK) against the protein CD133. Then cells were incubated with secondary antibody 1:1000 (goat anti-rabbit IgG highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 594, life technologies, Oregon, USA) for 30 min. Cell nuclei were stained with DAPI (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 1 µg/ml, for 10 min. Then cover glass was

transferred to objective lenses and mounted in ProLong Gold Antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). CD133 expression was determined by immunofluorescence using confocal microscopy (Olympus FLUOVIEW FV1000). Cells were imaged under a microscope at 600 × magnification using DAPI and TRITC filters. Images were analyzed using ImageJ 1.53K software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). In each group, at least 20 (from 5 different glass points) randomly selected cells were analyzed, and the relative fluorescence intensity was measured. HF cells were used as a negative control.

### *Wound healing assay*

Cells were seeded in a 24-wellplates (Corning, New York, USA) at a density of 20000 cells/well in 500 µL of medium and incubated for 24 h in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Then the monolayers were scratched with a sterile 100 µL pipette tip in the center of the well. The media was removed, cells were washed twice with PBS, and the fresh media was added. Images of the scratch were captured immediately and at every 24 h for three days at several well points of scratch. The percentage of the wound was calculated using ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Three technical replicates per experiment were made.

### *Chemosensitivity assay*

Cell susceptibility to anticancer drugs was established by MTT assay, as described elsewhere [19]. All drug dilutions in media were prepared freshly just before use. DOX (> 98%, Abcam, Cambridge, UK) and PTX (> 99.5% Alfa Aesar, Kandel, Germany) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) and diluted in medium (final DMSO concentration did not exceed 0.5%). Cells ( $5 \times 10^3$  cells/well) were plated into 96-well flat-bottomed plates and incubated for 24 h. Then the dilutions of drugs were added to each well. The only medium without cells was used as a positive control, and the medium with 0.5% DMSO served as a negative control. After three days of incubation, the medium was removed and 100 µl of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazidium bromide (MTT, Life technologies, Oregon, USA) solution (0.5 mg/ml

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line

in medium) was added. After incubation for 3 h at 37°C, the liquid was discarded, and the formed formazan crystals were dissolved in 50 µl of DMSO. Complete solubilization of formazan crystals was achieved by short shaking. The absorbance was measured on a plate reader at 570 and 630 nm.  $EC_{50}$  values were calculated using Hill equation. Experiments were repeated three times.

### Cell doubling time

Prepared cell suspension of  $2 \times 10^4$  cells/ml was seeded in a 24-well plate ( $8 \times 10^3$  cells/well). After 24, 48, 72, and 96 h, cells were washed twice with PBS, trypsinized and centrifuged at 1000 rpm for 4 min. Then the cells were resuspended in 200 µl of fresh medium and counted in duplicates on a hemocytometer. Cell doubling time (DT) was estimated by the following formula (1) [18] to calculate each line and subline DT, where  $c_1$  and  $c_2$  are the number of cultured cells at the current ( $t_2$ ) and previous ( $t_1$ ).

$$DT = \frac{\ln(2) \times (t_2 - t_1)}{\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)} \quad (1)$$

### Spheroid formation and growth

Spheroids were formed from MDA-MB-231 line and sublines by the magnetic 3D Bioprinting method [21], as described elsewhere [20]. Cancer cells were mixed with human fibroblasts (1:1), to create a better-representing tumor microenvironment, as the noncancer cells, like fibroblasts, endothelial, immune cells (e.g., monocytes, neutrophils, and lymphocytes), and extracellular matrix components (e.g., proteoglycans, glycosaminoglycans, and collagens) play an essential role in cell signaling, tumor growth, and development [29]. The cells were incubated with nanoparticles NanoShuttle (Nano3D Biosciences Inc., Houston, TX, USA) for 8-10 h. Then cells were trypsinized and seeded into ultra-low attachment 96-well plates at a volume of 100 µL (2,000 breast cancer cells and 2,000 human fibroblasts per well). In all cell mixtures, the HF cells composed 50% of cells. The plate was placed on a magnetic drive and incubated in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C until spheroids were formed. After two days of incubation, the images of spheroids were taken every 48 h.

Before taking images, the medium was replaced by a fresh one containing 0.5 µM of DOX and 0.05 µM PTX. The spheroid size was calculated using ImageJ software (NIH).

### Statistical analysis

All experiments were repeated three times, calculating the mean and standard deviation. The data were processed using Microsoft Office Excel 2016 software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and IBM SPSS Statistics version 26.0 package. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . An analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey post-hoc test was performed to determine significant differences between values.

## Results

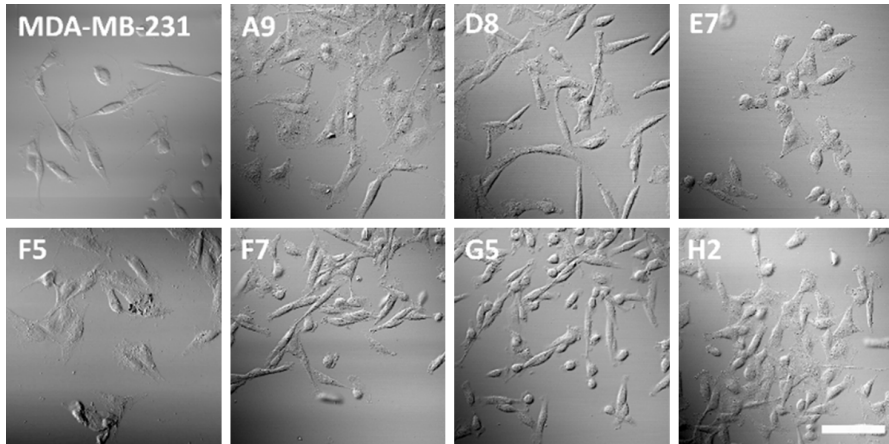
### Isolation of subpopulations within MDA-MB-231 cell line and their characterization

We isolated new sublines from the TNBC cell line MDA-MB-231 by multiple dilutions of the cell suspensions in a 96-well microplate [21]. After 7-14 days, colonies were formed, and seven colonies (sublines) were selected based on differences of colony density, size, and shape (Figure 1). These sublines showed a spectrum of morphologies ranging from round or oval colonies of closely packed cells to irregularly shaped colonies of loosely packed cells. The F5 and E7 sublines were non-elongated, shorter, and more oval, and the cells were tightly packed, forming colonies during cell growth; D8 and F7 - were more elongated in shape and comprised of loosely packed cells. The H2 subline cells were shorter in shape compared to parental cell line. The morphology of A9 and G5 was intermediate between the first and second groups of sublines. Differences in cell morphology are associated with their morphodynamics [22] - elongated cell shape related to increased migration and more aggressive cell phenotypes.

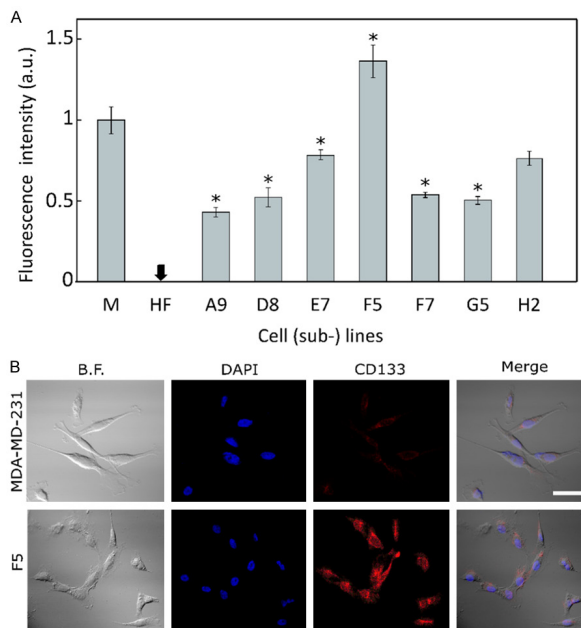
### CD133 receptor expression in cell sublines

The CD133 antigen, also known as prominin-1, is a single-chain transmembrane glycoprotein identified as an important surface marker of breast cancer stem cells [23]. The expression of CD133 is dysregulated in various solid tumors, as well as TNBC and BRCA-1 tumors [24]. The specific function of CD133 in cancer

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line



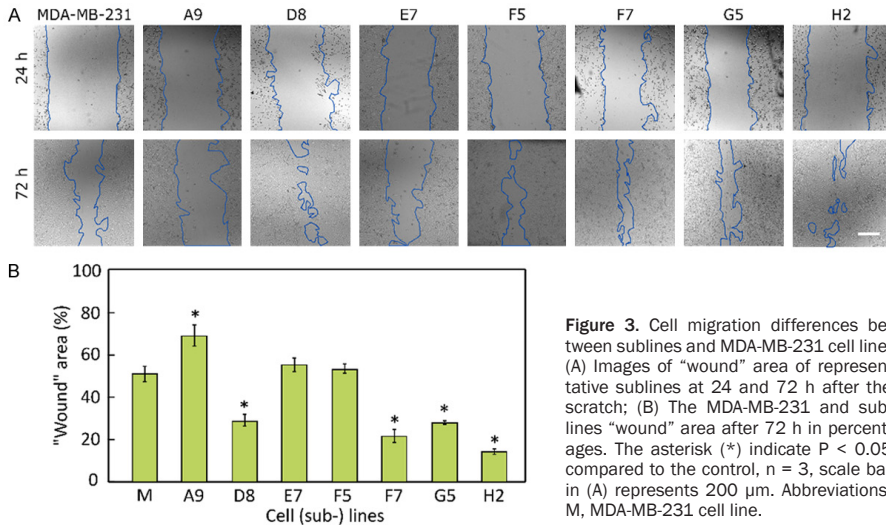
**Figure 1.** Morphological features of MDA-MB-231 cell lines and isolated sublines. The scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2.** Immunofluorescence staining of CD133 in indicated cell lines and sublines. **A.** The quantified CD133 expression was different among cell (sub-)lines. The highest CD133 receptor expression was determined in subline F5 and the lowest in subline A9. **B.** Cells were labeled using anti-CD133 rabbit polyclonal primary antibody and goat anti-rabbit secondary antibody, Alexa Fluor 594 (red). Nuclei (blue) were stained with DAPI. The asterisk (\*) indicates  $P < 0.05$  compared to the control,  $n = 3$ , scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ . Abbreviations: M, MDA-MB-231 cell line.

cells has not been defined, but CD133 is accompanied by increased malignancy and multidrug resistance by enhancing PI3K/Akt signalling in breast cancer cells [25]. Activating the PI3K/Akt signalling pathway in several human cancers, including breast cancer, induces cell proliferation, invasion, multidrug resistance, and metastasis of tumor cells [26-28]. The PI3K/Akt signalling was shown to promote the expression of a master transcription factor of epithelial-mesenchymal transition (EMT), leading to enhance TGF- $\beta$  receptor signalling, which in turn functions to maintain hyperactivated PI3K/Akt signalling, cooperatively driving breast tumor metastasis [28]. The expression of CD133 in cancer-initiating cells has been reported in several tumor types, and recently CD133 was identified in breast CSCs [29]. We aimed to figure out this CSCs cell phenotype in our isolated cell sublines (**Figure 2**). For it we chose immunofluorescence method that can provide valuable com-

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line



**Figure 3.** Cell migration differences between sublines and MDA-MB-231 cell line. (A) Images of "wound" area of representative sublines at 24 and 72 h after the scratch; (B) The MDA-MB-231 and sublines "wound" area after 72 h in percentages. The asterisk (\*) indicate  $P < 0.05$  compared to the control,  $n = 3$ , scale bar in (A) represents 200  $\mu\text{m}$ . Abbreviations: M, MDA-MB-231 cell line.

plementary information, such as subcellular localization of CD133, morphological information about cells. CD133 receptors were not detected in the HF cell line (Figure 2A), which was used as a negative control. However, the subline F5 exhibited the highest CD133 expression compared to other sublines. CD133 expression in subline F5 was 31% higher than in the MDA-MB-231 commercial cell line. In other sublines: A9, D8, E7, F7, G5, and H2, fluorescence intensity was from 21% to 57% lower than in the MDA-MB-231 cell line.

### The cell sublines' ability to migrate

Tumor cell migration is the most critical trait of metastasis. The differences between cell subline migration abilities were examined using a wound-healing assay (Figure 3). Analysis of the wound area changes shows different migration ability of cell sublines (Figure 3A). The slowest migration was determined for the A9 subline cells. The "wound" area after 72 h was 19% larger compared to the MDA-MB-231 "wound" area (Figure 3B). Furthermore, H2 subline cells migrated faster and the "wound" area after 72 h was 38% smaller than the MDA-MB-231 "wound" area. The other sublines - D8, F7, and G5 cells were also more migrant, and

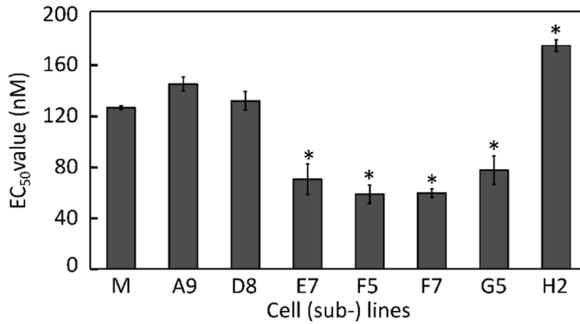
the "wound" area after 72 h was from 20 to 30% smaller than MDA-MB-231 "wound" area.

### Susceptibility to anticancer drugs

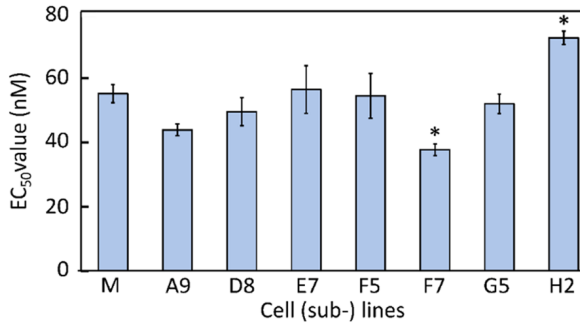
Cell (sub)lines susceptibility to anticancer drugs was evaluated by MTT assay. The results are shown in Figures 4 and 5. The subline H2 was about 1.5 times more resistant to DOX than the parent MDA-MB-231 cell line (Figure 4).  $EC_{50}$  value in H2 after 72 h was  $175.4 \pm 4.4$  nM, whereas in MDA-MB-231  $EC_{50}$  value was  $126.7 \pm 1.6$  nM. Sublines E7, F5, and G5 were about twice more sensitive to DOX than the parent cell line ( $EC_{50}$  after 72 h were  $77.7 \pm 11.2$  nM and  $55.9 \pm 7.2$  nM, respectively). Subline D8 sensitivity to DOX was similar to MDA-MB-231 sensitivity. Among tested cell sublines, H2 had the highest resistance to PTX (Figure 5),  $EC_{50}$  after 72 h was  $72.6 \pm 2.1$  nM, whereas  $EC_{50}$  in MDA-MB-231 was  $55.2 \pm 2.8$  nM. Subline A9 was slightly more sensitive to PTX than the parental cell line, with  $EC_{50}$   $43.9 \pm 1.8$  nM, though this subline was resistant to DOX. The subline F7 was sensitive to PTX ( $EC_{50}$   $46.9 \pm 4.5$  nM). The sensitivity of sublines D8, E7, F5, and G5 was comparable to MDA-MB-231 sensitivity. The most resistant cell subline to both DOX and PTX was H2. The most sensitive



## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line



**Figure 4.** DOX effect on cell viability. The  $EC_{50}$  values of DOX after 72 h in breast cancer MDA-MB-231 cell line and isolated sublines. Abbreviations:  $EC_{50}$ , half maximal effective concentration; M, MDA-MB-231 cell line; The asterisks (\*) indicate  $P < 0.05$  compared to control,  $n = 3$ .



**Figure 5.** PTX effect on cell viability. The  $EC_{50}$  values of PTX after 72 h in breast cancer MDA-MB-231 cell line and isolated sublines. Abbreviations:  $EC_{50}$ , half maximal effective concentration; M, MDA-MB-231 cell line; The asterisks (\*) indicate  $P < 0.05$  compared to control,  $n = 3$ .

**Table 1.** Properties of selected sublines

Properties	D8	F5	H2
CD133 expression	50% L <sup>1</sup>	31% H	26% L
Ability to migrate	20% H <sup>2</sup>	5% L	38% H
Sensitivity to DOX	4.2% H (NSD <sup>3</sup> )	54% L	39% H
Sensitivity to PTX	10% L	1.3% L (NSD)	32% H

<sup>1</sup>L - lower than control, <sup>2</sup>H - higher than control, <sup>3</sup>NSD - no significant difference. All experimental results compared to commercial cell line MDA-MB-231 results.

to DOX were sublines F5 and F7, and PTX - subline F7.

### Selection of sublines for the interaction studies

We observed differences in receptor expression, migration ability, and their sensitivity to

3374

anticancer drugs DOX and PTX. After all, we summarized all results and chose three the most characteristic sublines for further research (**Table 1**). Subline F5 cells were different in appearance compared with MDA-MB-231 cells. Cells formed compact colonies with typical epithelial polygonal shapes in close contact with each other. This subline was characterized by a higher expression of the CD133 receptor among all tested sublines (31% higher than in MDA-MB-231). The sensitivity of the F5 subline to PTX was not statistically significant, but the F5 subline cells were 50% more sensitive to anticancer compound DOX than the MDA-MB-231 cell line. The F5 subline cells migrated slower than the parental cell line.

The expression of CD133 in D8 subline cells was the lowest among all sublines and 50% lower than in the parental cell line. The D8 subline was 4.2% more resistant to DOX and 10% more sensitive to PTX than the parental cell line. The migration rate of the D8 subline was about 20% higher than that of the parental cell line.

The third subline, H2, was different from other sublines. The expression of CD133 in H2 was 26% lower than in the parental cell line. The H2 subline cells were 38% more resistant to DOX and 31% more resistant to PTX than the MDA-MB-231 line. The H2 subline cells migrated faster

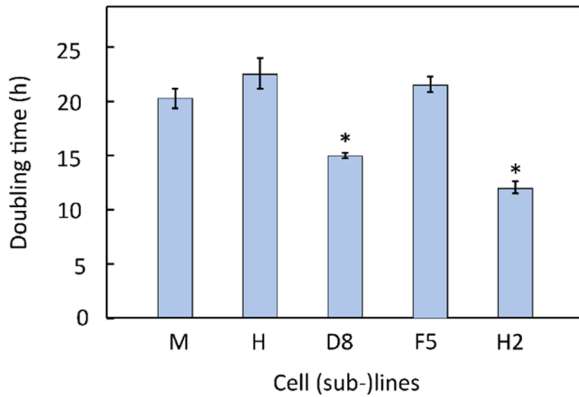
than the MDA-MB-231 cell line. These three sublines were chosen for further studies of cell interaction.

### Doubling time of sublines

After the selection of three cell sublines (F5, D8, H2), at first, we focused on their cell dou-

Am J Cancer Res 2023;13(8):3368-3383

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line



**Figure 6.** The doubling time of cell lines and sublines. The asterisks (\*) indicate  $P < 0.05$  compared to the control, MDA-MB-231,  $n = 3$ . Abbreviations: M, MDA-MB-231 cell line; H, HF cell line.

	Combination group I	Combination group II	Combination group III
Mixed with	+HF	+HF/+MDA	+HF/+sublines
cell mixtures	MDA/HF		
	D8/HF	D8/MDA/HF	D8/F5/HF
	F5/HF	F5/MDA/HF	D8/H2/HF
	H2/HF	H2/MDA/HF	F5/H2/HF

**Figure 7.** Combinations of cell lines and sublines used for interaction research. Abbreviations: MDA, MDA-MB-231 cell line.

bling time (DT) (**Figure 6**). The DT of MDA-MB-231 commercial cell line was about 20 h, and the DT of HF was approximately 22 h. DT of isolated sublines from the MDA-MB-231 commercial cell line was different. The F5 subline DT was 21 h, the D8 - 15 h, and H2 subline DT was 12 h. In summary, most isolated sublines were characterized by faster dividing cell phenotypes than the parent cell line.

### Cell interaction studies in the 2D model

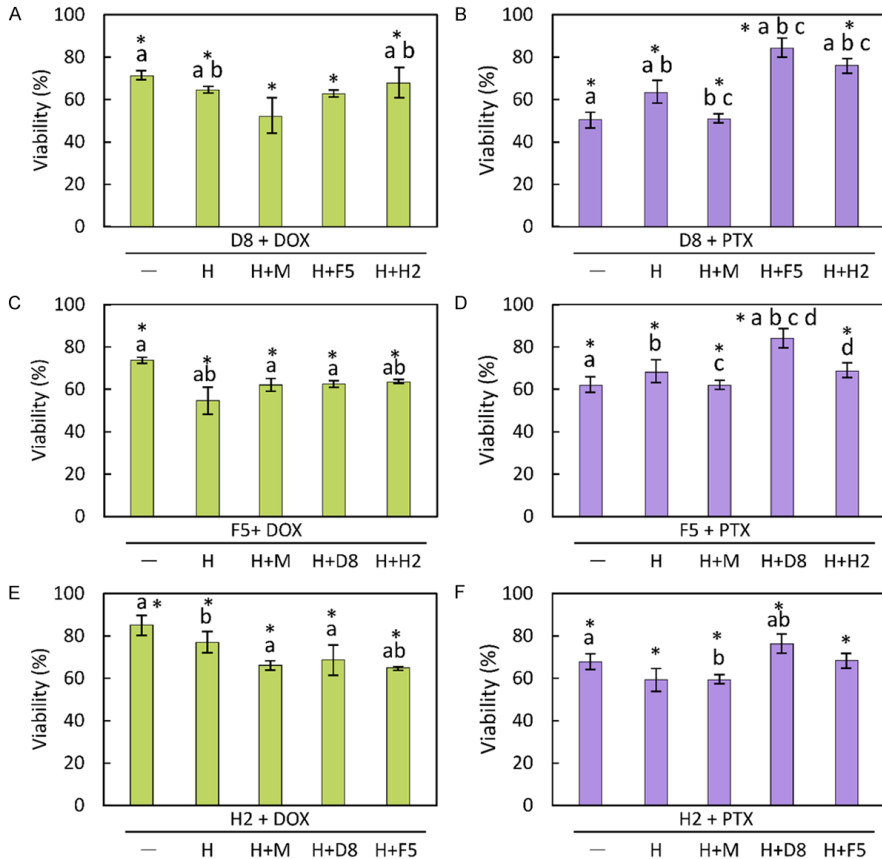
Cell sublines were selected to study the relevance of cell-cell communication *in vitro* studies. We made three cell subline mixtures for interaction research (**Figure 7**). First, we explored combinations of sublines and MDA-

MB-231 cell line mixed with HF (**Figure 7**, combination I). The second group (**Figure 7**, combination II) consisted of sublines (D8, F5, H2) combined with HF and MDA-MB-231 cells. The third group (**Figure 7**, combination III) consisted of two sublines (D8, F5 or D8, H2 or F5, H2) mixed with HF.

In cell interaction study, we used the HF cells to mimic the tumor microenvironment. It is known that the interaction between breast cancer cells and tumor microenvironments is essential for tumor growth and progression. Cells that support the function of epithelial cells, like cancer-associated fibroblasts (CAFs), contribute to therapy resistance via the production of several secreted factors and direct interaction with cancer cells [30-33]. The MDA-MB-231 cell line in combination II was used to evaluate the parental cell line and isolated sublines' interaction influence on drug resistance. The MDA-MB-231 cells are phenotypically different from each other [34] and have much more different phenotypes than we found. Additionally, we want to look up isolated sublines interaction with all populations in MDA-MB-231 cell line. By combining two (combination III) different sublines together (D8, F5 or D8, H2 or F5, H2), we assess the influence of the interaction of cells with different characteristics to evaluate drug resistance in these combinations. All tested cell combinations showed different responses to drugs DOX and PTX (**Figure 8**).

We used the same concentration of DOX (0.5  $\mu\text{M}$ ) and PTX (0.05  $\mu\text{M}$ ) in all tested cell combinations. Concentrations were chosen based on previous experiments of  $EC_{50}$ . MTT assay was chosen due to its simplicity, and it allowed us to assess the overall viability of the cell com-

Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line



**Figure 8.** The cell susceptibility to anticancer drugs DOX and PTX. The percentage of cell viability after 72 h treatment in D8 cells combinations with DOX (A) and PTX (B), F5 cells combinations with DOX (C) and PTX (D), H2 cells combination with DOX (E) and PTX (F). The “-” symbol on the x-axis indicates that no additional cells were added. The asterisk (\*) indicate  $P < 0.05$  compared to the control (control group consisted of cells treated with DMSO). Bars marked with different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) within the same category. Abbreviations: M, MDA-MB-231 cell line; H, HF cell line; n = 3.

binations in rapid manner and evaluate cell combination viability as a whole. This method in 2D model studies required minimal additional optimization. The DOX resistance in D8, F5, and H2 sublines (Figure 8A, 8C, 8E) was observed, and cell viability after 72 h treatment with DOX varied from 72% to 85%. These sublines in combination with HF or MDA-MB-231 or each other, possessed lower resistance to DOX, it decreased by 9 to 16% compared with separate sublines. The opposite results were

observed in the case of cell combination response to PTX (Figure 8B, 8D, 8F). In cell sublines combined with HF or MDA-MB-231 or with each other, the resistance to PTX increased by 18-34% compared to the separate sublines.

*Cell interaction studies in the 3D model*

Nowadays, 3D cultures are widely used to study the effects of new compounds or anticancer drugs [35]. Magnetic 3D bioprinting method

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line

advantages in reproducibility, control over spheroid formation, and the ability to incorporate multiple cell types. The method is also simple, scalable, we can use any drug and any cell combinations to form spheroids and evaluate cell interaction influence on resistance or sensitivity to drugs and a whole spheroid size change. We applied 3D model to explore cell-cell interaction as it better represents the real tumor microenvironment. We used the same cell combinations as in the 2D model. The sublines alone were not included in these experiments, as TNBC cells without HF did not form spheroids.

The spheroids of the D8 and HF cells combinations (**Figure 9A, 9B**) were more sensitive to PTX treatment, and their size after 12 days was about 5% lower compared with the control. The spheroids formed from D8, HF and H2 subline cells were more sensitive to DOX and PTX. Spheroid size after 12 days was from 18% to 24% lower, respectively, compared to the control. The spheroid size of the F5, HF, and MDA-MB-231 cell combinations (**Figure 9C, 9D**) in the presence of PTX after 12 days was 7% bigger compared to the control. Spheroids composed from F5, HF, and H2 subline cells in the presence of DOX or PTX in a medium, were from 15% to 29% smaller after 12 days, respectively, compared to control (**Figure 9E, 9F**).

In 3D cell interaction study, we established that sublines D8, F5 cell interaction with subline H2 cells reduced their resistance to DOX and PTX compared to the control. The spheroids, which consisted of subline H2 cells, grew smaller in size compared to other tested groups.

### Discussion

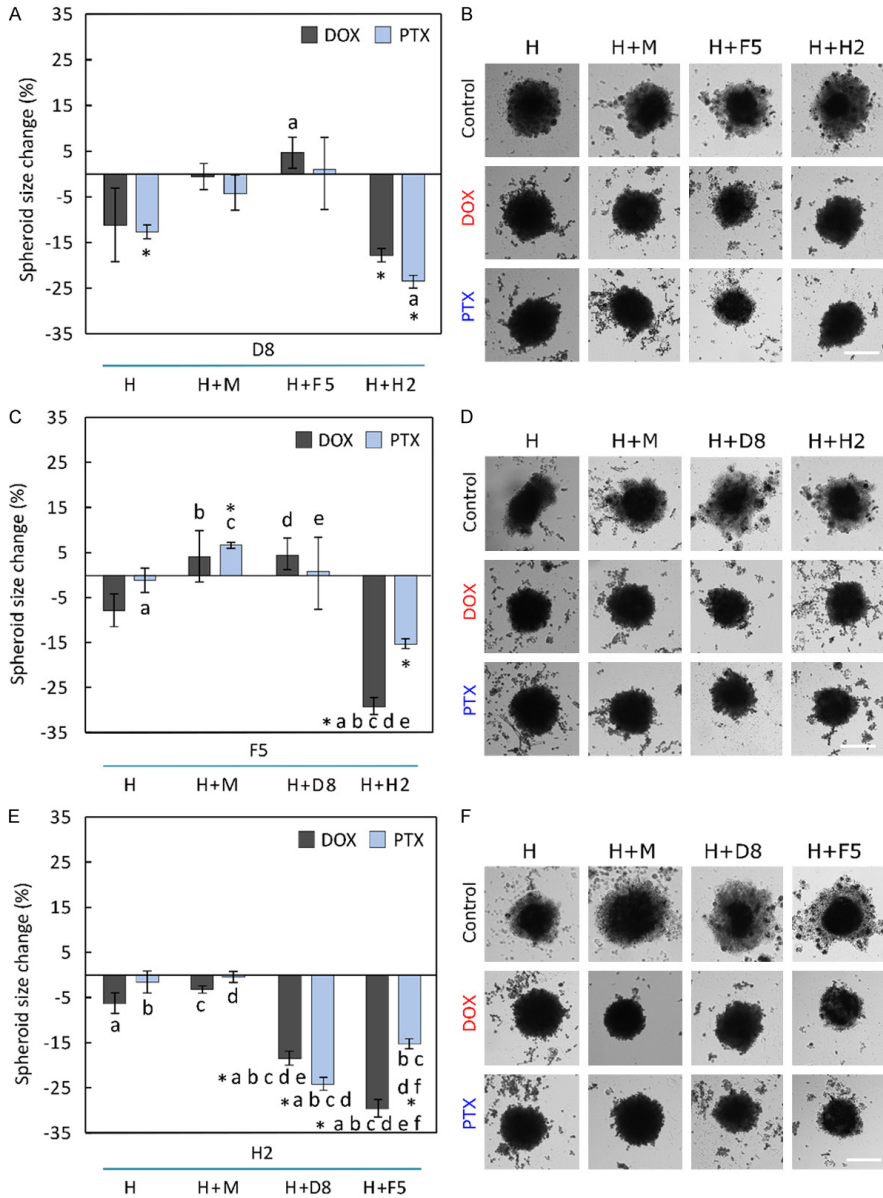
This study evaluated an interaction influence on drug resistance of different cell phenotypes isolated from the MDA-MB-231 cell line. We isolated seven new sublines from the MDA-MB-231 cell line, and three of them (D8, F5, H2) for cell interaction studies were chosen. These sublines differed from the others in the expression of the CD133 receptor, susceptibility to anticancer drugs, and ability to migrate.

CD133 is an important biomarker to identify and isolate the specific cell subpopulation named "cancer stem cells" (CSCs) in breast cancer. CSCs are a small cell population caus-

ing therapeutic resistance, metastasis, and recurrence of tumors, and might be used as the target of cancer treatment [36, 37]. CD133-positive cells have stemness properties such as drug resistance, self-renewal, differentiation ability, and high proliferation, and they are more resistant to standard chemotherapy [38]. During the immunofluorescence assay, we confirmed the existence, in MDA-MB-231 cells, of a small subpopulation (named F5) expressing a high level of CD133 in both membrane and cytoplasm compartments. We are not the first who found CD133 positive cell subpopulation in the MDA-MB-231 cell line. The first time CD133 was identified in 1997 [39], many scientists found some subpopulations of CD133-positive cells in the MDA-MB-231 cell line. The scientist also notes that these subpopulations cells showed enhanced cell growth, migration, drug resistance and invasion [40-42]. Our study found that the F5 subline possesses a 31% higher CD133 receptor expression than the commercial MDA-MB-231 cell line (**Figure 2B**). We hypothesized that the F5 subline would exhibit resistance to DOX and PTX, but it was two times more sensitive to DOX than the commercial cell line, and susceptibility to PTX was not statistically significantly different from the control. Many scientists found CD133-positive cells association to drug resistance [44] but exist several resistance mechanisms. First, CD133 overexpression in cancer cells activates PI3K/Akt, AKT/Wnt and other signalling pathways and affects the behaviour of CD133 cells, thereby playing a major role in cancer therapy [43]. Second, CD133 regulates tumor resistance via the AKT/NF- $\kappa$ B/multidrug resistance protein (MDR)1 pathway [44]. Third, the high expression of CD133 is associated with drug resistance due to increased ABC transporter ABCG2, resulting in breast cancer resistance for platinum, paclitaxel [45] and doxorubicin [46].

We have a hypothesis that in our isolated F5 subline cells the MDR pumps gene was not activated and that has been cause cells sensitivity for DOX and PTX. Also, F5 subline cells didn't show increased migration rates compared with the control (**Figure 3**). It could be related to the heterogeneity of CD133 expression in the MDA-MB-231 cell line, where not all subpopulations showed the same expression level of CD133 [47]. Moreover, the F5 subline in

Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line



**Figure 9.** Effect of cell sublines combinations in 3D cultures. The percentage of spheroid size changes after 12 days of incubation with DOX and PTX compared to the control. D8 subline combinations (A, B), F5 subline combinations (C, D) and H2 subline combinations (E, F). The asterisks (\*) indicate  $P < 0.05$  compared to control (control group consisted of spheroids treated with DMSO). Bars marked with different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) within the same category. Abbreviations: M, MDA-MB-231 cell line; H, HF cell line; n = 2, scale bar 200  $\mu$ m.

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line

the 3D model was more resistant to DOX and PTX in both alone with HF and in combinations with other sublines. Scientists observed that due to cell-cell interaction in 3D cultures, several molecules (HGF, TGF $\beta$ , VEGF, TNF $\alpha$ , FGF2, IL-6 and IL-8) are secreted in higher concentrations from fibroblasts cells. Also, scientists found that in 3D culture of fibroblasts results in an increased secretion of signaling molecules compared to stromal fibroblasts cultured in 2D, which provides that the 3D environment affected stromal fibroblasts. The fibroblast cells' functional differences in 2D vs. 3D conditions were observed, specifically, the expression of HGF, which increases cancer cell transition from local carcinoma cells to invasive carcinoma cells and causes cancer resistance to treatment [48]. Another hypothesis could be that CD133 expression changes in F5 subline over time, we took a CD133 immunofluorescence experiments several times and one of them was 6 months after subline isolation. The significant CD133 expression changes in cell sublines were not observed. Also, we check publications and found that some genes (about 16 different genes), for example TRIM28 are involved in CD133 expression regulation. In cancer cells CD133 expression increased during cell proliferation and tumor cell growth [10, 11]. In other publication we found that CD133 expression increased in several ovarian cancer cells lines during cell spheres formation [12]. That could be the explanation why F5 subline in 2D cultures were more sensitive to anticancer compounds compared to the 3D cultures results.

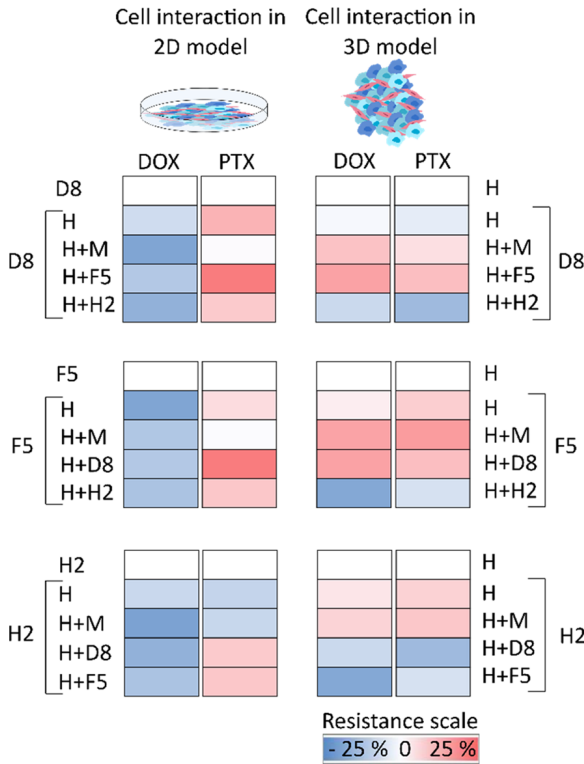
The subline H2 was identified as an increased migration and drug-resistant phenotype. H2 cells showed a more remarkable migration ability than the MDA-MB-231 cell line, and this could be related to faster DT (12 h) than MDA-MB-231 DT (20 h) (**Figure 6**). The subline H2 cells were more resistant to drugs than the MDA-MB-231 cell line. Similarly, Amaro and colleagues isolated an increased migration subpopulation from the MDA-MB-231 cell line. This increased migration cell phenotype was more resistant to PTX than MDA-MB-231 cell line resistance to this compound [41]. In our research, we observed increased resistance to both DOX and PTX anticancer drugs. Interestingly, the CD133 marker expression in H2 subline is not a statistically significant differ-

ence compared with the control. So, resistance to drugs was due to other resistance mechanisms, for example, MDR pumps, drug inactivation, reduced absorption of drugs, changed drug metabolism and others [49]. Usually, increased cell migration is associated with increased expression of MDR pumps, and it causes resistance to DOX and PTX [50].

We found that subline D8 was also identified with increased migration capacity compared with the control. This subline (D8) showed decreased sensitivity to PTX and increased sensitivity to DOX. The relationship between PTX resistance and increased migration could explain the D8 subline-specific properties. Scientists found out that in PTX-resistant cancer cells cathepsin L (cysteine protease associated with cancer cell migration) undergoes that subsequently mediates mesenchymal phenotype of cancer cells via EMT induction and that induce cell migration [51, 52].

After we chose three phenotypic different cell sublines, we moved on to our main aim - the influence of cell-cell interaction on drug resistance. It is known that cell-to-cell communication is critical during tumor development and progression, allowing cancer cells to reprogram the surrounding tumor microenvironment [53]. Stromal cells usually interact with breast cancer cells through IL-6 and chemokine ligand 7 (CXCL7) secretion [54]. Here, stromal cells secrete IL-6 has an important role in acquired breast cancer chemoresistance, which promotes cell proliferation and CXCL7 responsible for the self-renewal potential of breast cancer cells [55]. In addition, IL-6 has proven protective effects against paclitaxel and doxorubicin in breast cancer cells [56]. These cytokines (IL-6 and CXCL7) activate PI3K/AKT (induce cell proliferation, invasion, multidrug resistance [27]) and NF- $\kappa$ B (mediates cancer cell proliferation, survival and angiogenesis [57]) signaling pathways. Moreover, fibroblast secreted chemokine ligand 1, and IL-8 cytokines enhance expression of ABCG2 (known as breast cancer resistance ATP-binding cassette transporter, BRCP) and it is responsible for efflux of doxorubicin and causes resistance to this drug [58, 59]. The transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is another factor secreted by fibroblasts and it signals a pathway that can trigger cell epithelial to mesenchymal transition (EMT). Thus, TGF- $\beta$

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line



**Figure 10.** Summary of all cell sublines interaction research. Heatmap representation of cell combinations interaction influence on drug presence. Resistance scale (blue decreased resistance, red increased resistance) show how much combinations was resistant for drugs in percent.

contributes to the fibroblast's drug protective effect by inducing EMT. Also, fibroblast secreted factors such as CXCL12, FGF, HGF, IGF, PDGF, Wnt, MMPs, VEGF [54, 60] and these molecules activate, PI3K/AKT (promote the expression of a master transcription factor of epithelial-mesenchymal transition (EMT)) and NF- $\kappa$ B pathways [61].

Fibroblast and breast cancer cell interaction due to various molecular mechanisms cause cancer cell drug resistance in both cell lines and tumors and disease progression in tumor. We found that fibroblasts alter the drug sensitivity of tumor cells in cell sublines-fibroblast-DOX and H2-fibroblast-PTX combination in 2D (Figure 8A, 8C, 8E), where more sensitive to drugs compared with sublines resistance al-

one. Moreover, F5-fibroblast-PTX and D8-fibroblast-PTX combinations (Figure 9B, 9D) were more resistant to PTX compared to sublines viability in monoculture. The same cancer-fibroblast-drug combination interaction effect was observed in Landry and colleagues' research [62] where resistance or sensitivity to drugs depends on the cancer and fibroblast cell phenotypes. In several studies, cancer cell-fibroblast interaction decreased drug resistance [63, 64], but in many cases, interaction with fibroblast induced drug resistance [65, 66]. In 3D model comparison, at sublines cell-fibroblast-drug combinations, drug resistance decreases (Figure 9). We also found out drug sensitivity differences in between sublines cell-drug combinations in 2D and 3D models. All sublines' combinations were sensitive to DOX but decreased sensitivity to PTX in 2D, especially in the combination of D8-F5-fibroblast-PTX (Figure 10). Moreover, in 3D model sublines cells between-fibroblast-drug, all combinations decrease sensitivity to DOX and PTX, except combinations with

the H2 subline. A largescale study also observed that in a 3D model, TNBC cells-fibroblast-drug combination strongly altered drug sensitivity [62] and subtype-specific responses to treatment are not cell-intrinsic properties but rather a product of subtype-specific interactions between tumor cells and microenvironmental features.

### Conclusions

Interaction between F5 (stem-like phenotype) and D8 (increased migration phenotype) sublines increased resistance to PTX in 2D cultures and resistance to both compounds in 3D cultures. The H2 subline which alone is the most resistant to DOX and PTX, interaction with other sublines decreased resistance to DOX in 2D

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line

and in 3D to both compounds. In summary, we found that different phenotypes cancer cell interaction has a value influence of drug resistance and in some combination of cells reduced drug resistance. Therefore, future studies should aim to understand the mechanisms of interaction between cancer subline-subline and fibroblast-subline cells. In particular, the mechanisms by which different sublines phenotypes and fibroblasts alter the priming state of cancer cells.

### Acknowledgements

This research was supported by the Science Foundation of Lithuania University of Health Sciences project "Implication of interactions between triple-negative breast cancer cell populations for chemotherapy resistance", 2019.

### Disclosure of conflict of interest

None.

**Address correspondence to:** Vilma Petrikaitė, Laboratory of Drug Targets Histopathology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, Sukileliu pr. 13, LT-50162, Kaunas, Lithuania. Tel: +370-686-29383; E-mail: vilma.petrikaitė@ismuni.lt

### References

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A and Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209-249.
- [2] Gnant M, Thomssen C and Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2015: a brief summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel)* 2015; 10: 124-130.
- [3] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P and Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4429-4434.
- [4] Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y and Pietsenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011; 121: 2750-2767.
- [5] Ahn SG, Kim SJ, Kim C and Jeong J. Molecular classification of triple-negative breast cancer. *J Breast Cancer* 2016; 19: 223-230.
- [6] Yam C, Mani SA and Moulder SL. Targeting the molecular subtypes of triple negative breast cancer: understanding the diversity to progress the field. *Oncologist* 2017; 22: 1086-1093.
- [7] Lehmann BD and Pietsenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple negative breast cancer subtypes. *J Pathol* 2014; 232: 142-150.
- [8] Hubalek M, Czech T and Müller H. Biological subtypes of triple-negative breast cancer. *Breast Care (Basel)* 2017; 12: 8-14.
- [9] Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, Savage MI, Osborne CK, Hilsenbeck SG, Chang JC, Mills GB, Lau CC and Brown PH. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 1688-1698.
- [10] Wauters E and Vansteenkiste J. Will liquid biopsies become our fluid transition to personalized immunotherapy? *Ann Oncol* 2018; 29: 11-13.
- [11] Stanta G and Bonin S. A practical approach to tumor heterogeneity in clinical research and diagnostics. *Pathobiol* 2018; 85: 7-17.
- [12] Stanta G, Jahn SW, Bonin S and Hoeffler G. Tumor heterogeneity: principles and practical consequences. *Virchows Arch* 2016; 469: 371-384.
- [13] Bonnefoi H, Grellety T, Tredan O, Saghatchian M, Dalenc F, Mailliez A, L'Haridon T, Cottu P, Abadie-Lacourtoisie S, You B, Mousseau M, Dauba J, Del Piano F, Desmoulins I, Coussy F, Madranges N, Grenier J, Bidard FC, Proudhon C, MacGrogan G, Orsini C, Pulido M and Gonçalves A. A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). *Ann Oncol* 2016; 27: 812-818.
- [14] Costa RLB and Gradishar WJ. Triple-negative breast cancer: current practice and future directions. *J Oncol Pract* 2017; 13: 301-303.
- [15] Nussinov R, Tsai CJ and Jang H. Anticancer drug resistance: an update and perspective. *Drug Resist Updat* 2021; 59: 100796.
- [16] Fitzgerald AA and Weiner LM. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 2020; 39: 783-803.
- [17] Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L and Yin R. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 2019; 12: 86.
- [18] Hemmings BA and Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a011189.
- [19] Čeponytė U, Paškevičiūtė M and Petrikaitė V. Comparison of NSAIDs activity in COX-2 expressing and non-expressing 2D and 3D pancreatic cancer cell cultures. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 1543-1551.



## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line

- [20] Bytautaite M and Petrikaite V. Comparative study of lipophilic statin activity in 2D and 3D in vitro models of human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. *Onco Targets Ther* 2020; 13: 13201-13209.
- [21] Ye M, Wilhelm M, Gentschev I and Szalay A. A modified limiting dilution method for monoclonal stable cell line selection using a real-time fluorescence imaging system: a practical workflow and advanced applications. *Methods Protoc* 2021; 4: 16.
- [22] Qing Y, Yang XQ, Zhong ZY, Lei X, Xie JY, Li MX, Xiang DB, Li ZP, Yang ZZ, Wang G and Wang D. Microarray analysis of DNA damage repair gene expression profiles in cervical cancer cells radioresistant to 252 Cf neutron and X-rays. *BMC Cancer* 2010; 10: 71.
- [23] DA Cruz Paula A and Lopes C. Implications of different cancer stem cell phenotypes in breast cancer. *Anticancer Res* 2017; 37: 2173-2183.
- [24] Li GW and Xie XS. Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature* 2011; 475: 308-315.
- [25] Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol* 2013; 2: 17.
- [26] Vivanco I and Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489-501.
- [27] Dong C, Wu J, Chen Y, Nie J and Chen C. Activation of PI3K/AKT/mTOR pathway causes drug resistance in breast cancer. *Front Pharmacol* 2021; 12: 628690.
- [28] Ortega MA, Fraile-Martínez O, Asúnsolo Á, Bujan J, Hondurilla N and Coca S. Signal transduction pathways in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR. *J Oncol* 2020; 2020: 9258396.
- [29] Eddy CZ, Raposo H, Manchanda A, Wong R, Li F and Sun B. Morphodynamics facilitate cancer cells to navigate 3D extracellular matrix. *Sci Rep* 2021; 11: 20434.
- [30] Fernández-Nogueira P, Fuster G, Gutierrez-Uzquiza Á, Gascon P, Carbo N and Bragado P. Cancer-associated fibroblasts in breast cancer treatment response and metastasis. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 3146.
- [31] Czekay RP, Cheon DJ, Samarakoon R, Kutz SM and Higgins PJ. Cancer-associated fibroblasts: mechanisms of tumor progression and novel therapeutic targets. *Cancers (Basel)* 2022; 14: 1231.
- [32] Louault K, Bonneaud TL, Séveno C, Gomez-Bougie P, Nguyen F, Gautier F, Bourgeois N, Loussouarn D, Kerdraon O, Barillé-Nion S, Jézéquel P, Campone M, Amiot M, Juin PP and Souazé F. Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene* 2019; 38: 3261-3273.
- [33] Mao X, Xu J, Wang W, Liang C, Hua J, Liu J, Zhang B, Meng Q, Yu X and Shi S. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer* 2021; 20: 131.
- [34] Shen Y, Schmidt BUS, Kubitschke H, Morawetz EW, Wolf B, Käs JA and Losert W. Detecting heterogeneity in and between breast cancer cell lines. *Cancer Conver* 2020; 4: 1.
- [35] In: Fontana F, Santos HA, editors. *Bio-nano-medicine for cancer therapy*. Cham: Springer International Publishing; 2021. pp. 1295.
- [36] Morata-Tarifa C, Jiménez G, García MA, Entrena JM, Griñán-Lisón C, Aguilera M, Picon-Ruiz M and Marchal JA. Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells. *Sci Rep* 2016; 6: 18772.
- [37] Freischel AR, Damaghi M, Cunningham JJ, Ibrahim-Hashim A, Gillies RJ, Gatenby RA and Brown JS. Frequency-dependent interactions determine outcome of competition between two breast cancer cell lines. *Sci Rep* 2021; 11: 4908.
- [38] Irollo E and Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res* 2013; 5: 563-581.
- [39] Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A and Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polypeptidic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12425-12430.
- [40] Brugnoli F, Grassilli S, Piazzini M, Palomba M, Nika E, Bavelloni A, Capitani S and Bertagnolo V. In triple negative breast tumor cells, PLC-β2 promotes the conversion of CD133high to CD133low phenotype and reduces the CD133-related invasiveness. *Mol Cancer* 2013; 12: 165.
- [41] Brugnoli F, Grassilli S, Al-Qassab Y, Capitani S and Bertagnolo V. CD133 in breast cancer cells: more than a stem cell marker. *J Oncol* 2019; 2019: 7512632.
- [42] Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA and Allan AL. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2236-2252.
- [43] Manoranjan B, Chokshi C, Venugopal C, Subapanditha M, Savage N, Tatari N, Provias JP, Murty NK, Moffat J, Doble BW and Singh SK. A CD133-AKT-Wnt signaling axis drives glioblastoma brain tumor-initiating cells. *Oncogene* 2020; 39: 1590-1599.
- [44] Yuan Z, Liang X, Zhan Y, Wang Z, Xu J, Qiu Y, Wang J, Cao Y, Le VM, Ly HT, Xu J, Li W, Yin P and Xu K. Targeting CD133 reverses drug-resistance via the AKT/NF-κB/MDR1 pathway in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2020; 122: 1342-1353.
- Am J Cancer Res* 2023;13(8):3368-3383

## Interaction of phenotypic sublines isolated from MDA-MB-231 cell line

- [45] Li Y, Wang Z, Ajani JA and Song S. Drug resistance and cancer stem cells. *Cell Commun Signal* 2021; 19: 19.
- [46] Mirzaei S, Gholami MH, Hashemi F, Zabolian A, Farahani MV, Hushmandi K, Zarrabi A, Goldman A, Ashrafizadeh M and Orive G. Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. *Drug Discov Today* 2022; 27: 436-455.
- [47] Tay ASS, Amano T, Edwards LA and Yu JS. CD133 mRNA-transfected dendritic cells induce coordinated cytotoxic and helper T cell responses against breast cancer stem cells. *Mol Ther Oncolytics* 2021; 22: 64-71.
- [48] Sung KE, Su X, Berthier E, Pehlke C, Friedl A and Beebe DJ. Understanding the impact of 2D and 3D fibroblast cultures on in vitro breast cancer models. *PLoS One* 2013; 8: e76373.
- [49] Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S and Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. *Adv Pharm Bull* 2017; 7: 339-348.
- [50] Kryczka J and Boncela J. Cell migration related to MDR-another impediment to effective chemotherapy? *Molecules* 2018; 23: 331.
- [51] Ashrafizadeh M, Mirzaei S, Hashemi F, Zarrabi A, Zabolian A, Saleki H, Sharifzadeh SO, Soleymani L, Daneshi S, Hushmandi K, Khan H, Kumar AP, Aref AR and Samarghandian S. New insight towards development of paclitaxel and docetaxel resistance in cancer cells: EMT as a novel molecular mechanism and therapeutic possibilities. *Biomed Pharmacother* 2021; 141: 111824.
- [52] Han ML, Zhao YF, Tan CH, Xiong YJ, Wang WJ, Wu F, Fei Y, Wang L and Liang ZQ. Cathepsin L upregulation-induced EMT phenotype is associated with the acquisition of cisplatin or paclitaxel resistance in A549 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37: 1606-1622.
- [53] Chiodoni C, Di Martino MT, Zazzeroni F, Caraglia M, Donadelli M, Meschini S, Leonetti C and Scotlandi K. Cell communication and signaling: how to turn bad language into positive one. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38: 128.
- [54] Korkaya H, Liu S and Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest* 2011; 121: 3804-3809.
- [55] Wiicken N, Zdenkowski N, White M, Snyder R, Pittman K, Mainwaring P, Green M, Francis P, De Boer R, Colosimo M, Chua S, Chirgwin J, Beth J and Bell R. Systemic treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: a systematic review. *Asia Pac J Clin Oncol* 2014; 10 Suppl S4: 1-14.
- [56] Shi Z, Yang WM, Chen LP, Yang DH, Zhou Q, Zhu J, Chen JJ, Huang RC, Chen ZS and Huang RP. Enhanced chemosensitization in multi-drug-resistant human breast cancer cells by inhibition of IL-6 and IL-8 production. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 135: 737-747.
- [57] Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, Tian Y, Liu L, Su M, Wang H, Cao D and Liao Q. Role of the NFκB-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 2063-2073.
- [58] Yeh WL, Tsai CF and Chen DR. Peri-foci adipose-derived stem cells promote chemoresistance in breast cancer. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8: 177.
- [59] Chen DR, Lu DY, Lin HY and Yeh WL. Mesenchymal stem cell-induced doxorubicin resistance in triple negative breast cancer. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 532161.
- [60] Chu QD, Panu L, Holm NT, Li BD, Johnson LW and Zhang S. High chemokine receptor CXCR4 level in triple negative breast cancer specimens predicts poor clinical outcome. *J Surg Res* 2010; 159: 689-695.
- [61] Xue G, Restuccia DF, Lan Q, Hynx D, Dirnhofer S, Hess D, Rüegg C and Hemmings BA. Akt/PKB-mediated phosphorylation of twist1 promotes tumor metastasis via mediating crosstalk between PI3K/Akt and TGF-β signaling axes. *Cancer Discov* 2012; 2: 248-259.
- [62] Landry BD, Leete T, Richards R, Cruz-Gordillo P, Schwartz HR, Honeywell ME, Ren G, Schwartz AD, Peyton SR and Lee MJ. Tumor-stroma interactions differentially alter drug sensitivity based on the origin of stromal cells. *Mol Syst Biol* 2018; 14: e8322.
- [63] McMillin DW, Delmore J, Weisberg E, Negri JM, Geer DC, Klippel S, Mitsiades N, Schlossman RL, Munshi NC, Kung AL, Griffin JD, Richardson PG, Anderson KC and Mitsiades CS. Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat Med* 2010; 16: 483-489.
- [64] Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, Ribas A, Lo RS, Flaherty KT, Oginio S, Wargo JA and Golub TR. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012; 487: 500-504.
- [65] Ni Y, Zhou X, Yang J, Shi H, Li H, Zhao X and Ma X. The role of tumor-stroma interactions in drug resistance within tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 637675.
- [66] Marusyk A, Tabassum DP, Janiszewska M, Place AE, Trinh A, Rozhok AI, Pyne S, Guerriero JL, Shu S, Ekram M, Ishkin A, Cahill DP, Nikolsky Y, Chan TA, Rimawi MF, Hilsenbeck S, Schiff R, Osborne KC, Letai A and Polyak K. Spatial proximity to fibroblasts impacts molecular features and therapeutic sensitivity of breast cancer cells influencing clinical outcomes. *Cancer Res* 2016; 76: 6495-6506.

# CURRICULUM VITAE

**Name, Surname:** Indrė Januškevičienė  
**E-mail:** indre.januskeviciene@lsmu.lt

## Education:

2017–2023 Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania  
**Ph.D. student in Pharmacy**

2015–2017 Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania.  
**M. Sc. in Biochemical analysis**

2011–2015 Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania.  
**B. Sc. in Biology**

## Work Experience:

2021 11–present Laboratory of Drug Targets Histopathology Institute of Cardiology,  
Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.  
**Junior researcher**

2018 01–2018 06 Institute of Pharmaceutical Technologies, Faculty of Pharmacy  
Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.  
**Junior researcher**

2018 02–2018 06 Department of Drug Chemistry Faculty of Pharmacy.  
Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.  
**Lecturer assistant**

2017 11–2018 02 Department of Drug Chemistry Faculty of Pharmacy.  
Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.  
**Junior researcher**

2015 02–2017 06 Department of Biochemistry, Faculty of natural sciences,  
Vytautas Magnus university  
**Laboratory assistant**

## Participation in Research Projects:

2024 05–present COST action CA21139 international project “Improving the Quality of  
Biomedical Science with 3Rs Concepts”

2018 01–2020 06 Laboratory of Drug Targets Histopathology Institute of Cardiology,  
Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.  
Adaptation of Exosomes for Targeted Drug Delivery (EXOTARGET)  
Funded by Research Council of Lithuania  
(Grant No. 3.01.2.2-LMT-K-718-01-0036)  
**Project Researcher**

2018 09–2022 04 COST action 17104 international project “New diagnostic and  
therapeutic tools against multidrug-resistant tumors”

2015 07–2016 07 Department of Biochemistry, Faculty of natural sciences,  
Vytautas Magnus university  
“Increasing the effectiveness of antibacterial and cytostatic  
preparations by strengthening their interaction with cells”  
Funded by Research Council of Lithuania  
(Grant No. MIP-040/2015)  
**Laboratory assistant**

2014 06 – 2014 08 Department of Biochemistry, Faculty of natural sciences,  
Vytautas Magnus university  
“Promotion of students’ scientific activity”  
The project is financed from the funds of the European Social Fund  
and the state budget of the Republic of Lithuania  
(Grant No. PS-14-41/SMP14-153)  
***Project Researcher***