



Imię i nazwisko autora rozprawy: **Barbara Borowa-Mazgaj**
Dyscyplina naukowa: nauki chemiczne - biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

„Odpowiedź komórkowa indukowana przez przeciwnowotworową pochodną akrydyny, C-1748 w komórkach raka trzustki. Rola ekspresji enzymów metabolizujących w modulacji tej odpowiedzi”.

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

“The cellular response induced by anticancer acridine derivative, C-1748 in pancreatic cancer cells. The role of metabolic enzymes in modulation of this response”.

Promotor Prof. dr hab. inż. Zofia Mazerska <i>podpis</i>	Drugi promotor <i>podpis</i>
Prof. dr hab. inż. Zofia Mazerska	<Tytuł, stopień, imię i nazwisko>
Promotor pomocniczy Dr hab. Ewa Augustin <i>podpis</i>	Kopromotor <i>podpis</i>
<Stopień, imię i nazwisko>	<Tytuł, stopień, imię i nazwisko>

Najserdeczniejsze podziękowania składam mojej Kochanej Rodzinie.

Braciom, za wiarę i wsparcie.

*Rodzicom za wychowanie, wpojone wartości, zaszczepienie pasji do nauki,
bezgraniczną miłość i nieocenioną pomoc.*

*Kochanemu Łukaszowi, który podczas wszystkich dni mojej pracy udzielał mi wielkiego i bezcennego
wsparcia, za miłość i podtrzymywanie wiary w osiągnięcie zamierzonego celu.*

Pragnę serdecznie podziękować,

Mojemu Promotorowi, Pani Profesor Zofii Mazerskiej, za opiekę naukową i merytoryczną, za pomoc w realizacji pracy, cenne porady, życzliwość, cierpliwość i otwartość umysłu na nowe pomysły naukowe.

Pani Doktor Ewie Augustin, za opiekę merytoryczną nad pracą, okazaną pomoc, życzliwość i wsparcie naukowe.

Panu Profesorowi Jerzemu Konopie, za możliwość pracy z potencjalnymi, nowymi lekami przeciwnowotworowymi, za przekazaną wiedzę, nowe pomysły, uśmiech i życzliwość.

Pani Profesor Annie Rądomińskiej-Pandya za przekazany zapał do pracy, za poczucie humoru i długie rozmowy, za opiekę i wsparcie nie tylko naukowe, ale również osobiste.

Ani Skwarskiej, za rzeczowe uwagi i dyskusje podczas prowadzenia badań, za przekazany zapał do pracy i motywację w chwilach zwątpienia. Za nieocenione wsparcie naukowe i duchowe. Za uśmiech i poczucie humoru.

Koleżankom z Zespołu: Monice Pawłowskiej, Asi Koprrowskiej, Agnieszce Potędze, Magdzie Niemira, Basi Fedejko-Kap, Ani Mróz, Ani Bejrrowskiej, a także Marcinowi Serockiemu za wspólnie spędzony czas, pomoc laboratoryjną, życzliwość oraz miłą atmosferę pracy.

Spis treści

Indeks skrótów	1
Streszczenie	3
Abstract	6
1. Wprowadzenie- charakterystyka badanego związku	8
2. Wstęp teoretyczny	11
2.1. Rak trzustki- ogólna charakterystyka	12
2.1.1. Gemcytabina- złoty standard w leczeniu raka trzustki	13
2.1.2. Czynniki ryzyka rozwoju raka trzustki.....	15
2.1.3. Lekooporność raka trzustki.....	17
2.1.3.1. <i>Mutacje w kluczowych genach</i>	17
2.1.3.2. <i>MikroRNA</i>	19
2.1.3.3. <i>Nowotworowe komórki macierzyste</i>	20
2.1.3.4. <i>Tranzycja epitelialno-mezenchymalna</i>	21
2.1.3.5. <i>Hipoksja</i>	23
2.1.3.6. <i>Oporność wielolekowa</i>	24
2.1.3.7. <i>Metabolizm w komórkach nowotworowych trzustki</i>	25
2.1.3.8. <i>Podsumowanie</i>	27
2.2. Wybrane aspekty mechanizmów śmierci komórkowej indukowanych w wyniku działania chemoterapeutyków.....	27
2.2.1. Autofagia i apoptoza- powiązanie dwóch procesów śmierci komórki	27
2.2.1.1. <i>Regulacja procesu autofagii</i>	29
2.2.1.2. <i>Regulacja procesu apoptozy</i>	30
2.2.1.3. <i>Zależność pomiędzy autofagią i apoptozą</i>	31
2.2.1.4. <i>Autofagia, apoptoza i gospodarka lipidowa</i>	34
2.2.1.5. <i>Krople lipidowe</i>	34
2.2.1.6. <i>Lipofagia</i>	35
2.3. Enzymy metabolizujące chemoterapeutyki a śmierć komórki	35
2.3.1. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji enzymu a śmiercią komórki	36
2.3.2. Cytochromy P450 jako cel w terapii przeciwnowotworowej	37
3. Założenia, cel i zakres pracy	39
4. Wyniki	43
CZĘŚĆ I. Badanie aktywności cytotoksycznej i mechanizmu działania pochodnej C-1748 w stosunku do komórek ludzkich nowotworów trzustki	43
4.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 wobec komórek czterech linii raka trzustki	43
4.2. Analiza dystrybucji komórek raków trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748 w cyklu życiowym.....	45

4.3. Mikroskopowe obserwacje morfologii jąder komórkowych czterech linii raków trzustki poddanych działaniu C-1748	53
4.4. Cytometryczna analiza aktywności kaspazy-3 w komórkach czterech linii raków trzustki traktowanych pochodną C-1748	59
4.5. Badanie poziomu pociętej formy białka PARP w komórkach czterech linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748	61
4.6. Badanie zmian w budowie błony cytoplazmatycznej komórek czterech linii raka trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748	63
4.7. Określenie zdolności pochodnej C-1748 do indukcji przyspieszonego starzenia komórkowego w komórkach czterech linii raka trzustki	67
4.8. Badanie wpływu pochodnej C-1748 na proces autofagii w komórkach czterech linii raka trzustki	71
4.9. Zbadanie aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 w połączeniu z wortmaniną w stosunku do komórek czterech linii raka trzustki	82
4.10. Badanie wpływu pochodnej C-1748 w połączeniu z wortmaniną na homeostazę lipidów w komórkach czterech linii raka trzustki	86
4.11. Analiza aktywności kaspazy-3 w komórkach czterech linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748 w kombinacji z wortmaniną	94
4.12. Analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego i morfologii jąder komórkowych w komórkach czterech linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748 i wortmaniną	101
4.13. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka Bcl-2 w komórkach czterech linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748 i wortmaniną	110
CZĘŚĆ II. Określenie roli ekspresji enzymów metabolizujących C-1748 w końcowej odpowiedzi biologicznej komórek raka trzustki na działanie związku	112
4.1. Analiza metodą western blotting poziomu ekspresji wybranych enzymów I fazy metabolizmu w komórkach czterech raków trzustki	114
4.2. Wpływ nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4 na metabolizm C-1748 i dpowiedź biologiczną indukowaną przez pochodną C-1748 w komórkach AsPC-1	116
4.2.1. Przejściowa transfekcja komórek AsPC-1 plazmidami CPR lub CYP3A4	115
4.2.2. Metabolizm C-1748 w komórkach AsPC-1 o nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4	117
4.2.3. Analiza aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 wobec komórek AsPC-1 o nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4	123
4.2.4. Analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego i morfologii jąder komórkowych w komórkach Aspc-1 z nadekspresją enzymów CPR lub CYP3A4, traktowanych C-1748	124
4.2.5. Zbadanie wpływu nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4 na aktywację kaspazy-3 przez pochodną C-1748 w komórkach AsPC-1	126
5. Dyskusja i wnioski końcowe	129
6. Część doświadczalna	148
6.1. Materiały	
6.1.1. Badany związek	148
6.1.2. Odczynniki chemiczne i zestawy analityczne	148

6.1.3. Zestawy analityczne	148
6.1.4. Barwniki	149
6.1.5. Enzymy	149
6.1.6. Startety do reakcji Real-time PCR	149
6.1.7. Markery.....	150
6.1.8. Bufory	150
6.1.9. Roztwory i bufory do elektroforezy poliakrylamidowej.....	150
6.1.10. Przeciwciała, bufory i inne materiały do techniki western blotting	151
6.1.11. Plazmidy i materiały potrzebne do transfekcji.....	152
6.1.12. Materiały niezbędne do prowadzenia hodowli	152
6.1.13. Linie komórkowe	153
6.2. Stosowana aparatura	154
6.3. Metody doświadczalne	155
6.3.1. Hodowla komórkowa	155
6.3.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748	155
6.3.3. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej C-1748 w połączeniu z inhibitorami autofagii.....	156
6.3.4. Cytometryczna analiza dystrybucji komórek w cyklu życiowym	157
6.3.5. Obserwacje mikroskopowe zmian w morfologii jąder komórkowych	157
6.3.6. Cytometryczna analiza aktywności kaspazy-3.....	158
6.3.7. Badanie zmian ilości komórek nowotworowych z pofragmentowanym PARP	159
6.3.8. Badanie zmian w budowie błony komórkowej- test Aneksyna V/PI.....	160
6.3.9. Mikroskopowe obserwacje indukcji przyspieszonego starzenia komórkowego	160
6.3.10. Mikroskopowa analiza zmian w ilości kwaśnych organelli.....	161
6.3.11. Mikroskopowa analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$	161
6.3.12. Mikroskopowa i cytometryczna analiza poziomu kropli tłuszczowych	162
6.3.13. Analiza poziomu białek metodą western blotting	162
6.3.14. Przejściowa transfekcja komórek AsPC-1 plazmidami CPR i CYP3A4	164
6.3.15. Badanie metabolizmu pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1 z nadekspresją enzymów CPR i CYP3A4 z zastosowaniem techniki HPLC.....	164
6.3.16. Badanie poziomu ekspresji genów metodą Real-time PCR	165
6.3.17. Analiza statystyczna wyników	167
Literatura	168

Indeks skrótów

$\Delta\Psi_m$	mitochondrialny potencjał błonowy (<i>ang. inner mitochondrial membrane potential</i>)
5-FU	5-fluorouracyl
AsPC-1	linia komórkowa ludzkiego raka trzustki
AsPC-1-WT	linia komórkowa AsPC-1 typu dzikiego
AsPC-1-CPR	linia komórkowa AsPC-1 z nadekspresją genu kodującego reduktazę P450
AsPC-1-3A4	linia komórkowa AsPC-1 z nadekspresją genu kodującego izoenzym CYP3A4
AVOs	kwaśne organella komórkowe (<i>ang. acidic vesicular organelles</i>)
Atg	geny związane z autofagią (<i>ang. autophagy related genes</i>)
Bcl-2	białko antyapoptotyczne podrodziny Bcl-2 (<i>ang. B-cell lymphoma protein 2</i>),
BxPC-3	linia komórkowa ludzkiego raka trzustki
C-1748	(9-(2'-hydroksyloetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna
CDK	kinazy cyklino-zależne (<i>ang. cyclin dependent kinases</i>)
CPR	reduktaza cytochromu P450 (<i>ang. cytochrome P450 reductase</i>)
CSC	nowotworowe komórki macierzyste (<i>ang. cancer stem cells</i>)
CQ	chlorochina
CYP3A4	izoenzym cytochromu P450
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
EMT	tranzycja epithelialno-mezenchymalna (<i>ang. epithelial-mesenchymal transition</i>)
FITC	fluoresceina
GFP	białko zielonej fluorescencji (<i>ang. green fluorescent protein</i>)
IC₅₀, IC₈₀	stężenie związku hamujące proliferację komórek, odpowiednio w 50 % lub 80 %
JC-1	jodek 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny
KRAS	onkogen (<i>ang. Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>)
LC3	białko związane z mikrotubulami (<i>ang. microtubule-associated protein light chain 3</i>)
LD	krople tłuszczowe (<i>ang. lipid droplets</i>)
MiaPaCa-2	linia komórkowa ludzkiego raka trzustki
MDR	zjawisko oporności wielolekowej (<i>ang. multidrug resistance</i>)

MOMP	permeabilizacja zewnętrznej błony mitochondrium (<i>ang. mitochondrial outer membrane permeabilization</i>)
mTOR	ssaczy cel dla rapamycyny (<i>ang. mammalian target of rapamycin</i>)
Panc-1	linia komórkowa ludzkiego raka trzustki
PARP	polimeraza poli-ADP-rybozy (<i>ang. poly(ADP-ribose) polymerase</i>)
PI	jodek propidyny
PI3K-III	kinaza fosfatydylo-3 inozytolu klasa III (<i>ang. phosphoinositide 3-kinase class III</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (<i>ang. reactive oxygen species</i>)
UGT	UDP-glukuronylotransferaza (<i>ang. UDP-glucuronyltransferase</i>)
W	wortmanina

Streszczenie

Dynamiczny rozwój medycyny w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat przyczynił się do wdrożenia nowych metod leczenia pacjentów dotkniętych chorobami nowotworowymi. Statystyki dotyczące zachorowań na nowotwory nie są jednak optymistyczne. W ciągu kolejnych kilkunastu lat liczba zachorowań na raka gwałtownie wzrosła. Pocięszający może być fakt, że rośnie także liczba pacjentów, którym udaje się wygrać z chorobą, jednak nie dotyczy to wszystkich nowotworów. Są nowotwory, w przypadku których leczenie nadal ma charakter paliatywny, a zachorowalność jest praktycznie równa umieralności. Do takich nowotworów zaliczany jest rak trzustki.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stanowią kontynuację badań prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej mających na celu otrzymywanie nowych związków przeciwnowotworowych i określenie ich aktywności cytotoksycznej oraz mechanizmu działania wobec komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*. Spośród pochodnych imidazoakrydonów, triazoloakrydonów i pochodnych 1-nitroakrydiny, pochodna 1-nitroakrydiny o symbolu C-1748 w badaniach aktywności cytotoksycznej wykazała najwyższą aktywność wobec komórek czterech linii raka trzustki: Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 oraz AsPC-1. Ponieważ rak trzustki jest najbardziej złośliwym i opornym na leczenie nowotworem, wszystkie badania podstawowe, które przyczynią się do lepszego poznania biologii nowotworu, przyczyn lekooporności, czy mechanizmu działania chemoterapeutyków są w pełni uzasadnione.

W pierwszej części pracy doktorskiej przeprowadziłam badania aktywności biologicznej pochodnej C-1748 w stosunku do komórek czterech wybranych linii raka trzustki. Wykazałam, że związek był najbardziej aktywny wobec komórek linii MiaPaCa-2. Pochodna C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} indukowała istotne zmiany w cyklu życiowym komórek raka trzustki. Cytometryczna analiza zmian w dystrybucji komórek w cyklu życiowym wykazała, że pod wpływem działania związku, w zależności od badanej linii komórkowej, dochodziło m.in. do trwałej akumulacji komórek w fazie G1 lub G2/M cyklu życiowego oraz wzrostu ilości komórek we frakcji sub-G1. Ponadto, w komórkach linii Panc-1, MiaPaCa-2 i BxPC-3 pochodna C-1748 w zależności od zastosowanego stężenia i czasu inkubacji, indukowała apoptozę. Apoptoza zachodziła poprzez aktywację kaspaz i przy udziale mitochondriów. Towarzyszyły jej również zmiany w morfologii jąder komórkowych oraz zmiany rozmieszczenia fosfolipidów błonowych. Dodatkowo, na skutek działania związku dochodziło do obniżenia ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2.

Wybiórczym mechanizmem działania związku była indukcja przyspieszonego starzenia komórkowego w komórkach linii AsPC-1, które wykazały oporność na indukowaną przez związek apoptozę. Nowym, jak dotąd niepoznanym mechanizmem działania pochodnej C-1748 było hamowanie autofagii w komórkach trzech badanych linii. Hamowaniu autofagii i indukcji apoptozy towarzyszył również wzrost poziomu neutralnych lipidów wewnątrzkomórkowych i akumulacja lipidów w kroplach tłuszczowych. Co więcej, zastosowanie kombinacji C-1748 z inhibitorem autofagii – wortmaniną wywierało silniejszy efekt zarówno na proces autofagii jak i apoptozy w porównaniu do zastosowania samej pochodnej 1-nitroakrydyny.

W drugiej części dysertacji skupiłam się na roli enzymów metabolizujących ksenobiotyki w końcowej odpowiedzi biologicznej komórek nowotworowych trzustki. Zarówno dane literaturowe, jak i wyniki badań prowadzonych w naszym zespole wskazują, że zmiana poziomu ekspresji enzymów metabolizujących chemoterapeutyki ma wpływ na odmienną wrażliwość komórek nowotworowych wobec tych związków [*Gut i wsp.*, 2000, *Hołownia i wsp.*, 2003, *Pawłowska*, 2014]. Jedną z przyczyn może być ich różny udział w przemianach metabolicznych zachodzących w komórkach. Przy podwyższonej ekspresji danych enzymów mogą bowiem powstawać dodatkowe metabolity, które wykazują wyższą aktywność wobec komórek [*Gorlewska*, 2001, *Wiśniewska*, 2008]. W pierwszym etapie badań wykazałam, że ekspresja wybranych enzymów I fazy metabolizmu ksenobiotyków, w tym enzymów metabolizujących pochodną C-1748 różni się w komórkach czterech badanych linii raka trzustki. Następnie przeprowadziłam przejściową transfekcję najbardziej opornych na działanie związku komórek linii AsPC-1, plazmidami z sekwencją genów *CPR* (reduktazy cytochromu P450) i *CYP3A4* - kluczowych dla transformacji metabolicznej pochodnej C-1748. Skutkiem nadekspresji *CPR* i *CYP3A4* w komórkach AsPC-1, były m.in. zmiany stężenia i rodzaju produktów przemian metabolicznych związku w komórkach. W komórkach z nadekspresją zarówno *CPR*, jak i *CYP3A4* obserwowałam większą ilość metabolitów oraz nowe metabolity, których obecności nie stwierdziłam podczas analizy chromatograficznej metabolitów w komórkach AsPC-1 typu dzikiego. W kolejnym etapie wykazałam również, że nadekspresja enzymów *CPR* i *CYP3A4* skutkowałą zwiększoną wrażliwością komórek AsPC-1 na cytotoksyczne i proapoptotyczne działanie pochodnej C-1748 w porównaniu do komórek typu dzikiego.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazały na wysoką aktywność pochodnej C-1748 wobec komórek nowotworowych trzustki. Poznane mechanizmy działania badanego związku mogą być podstawą do zaprojektowania nowych analogów pochodnej C-1748 o udoskonalonych właściwościach. Z kolei, zależność pomiędzy poziomem ekspresji enzymów metabolizujących dany związek w komórkach, a końcową odpowiedzią tychże komórek na

jego działanie wskazuje, że potencjalny lek będzie wykazywał indywidualne działanie u różnych pacjentów, o indywidualnym poziomie ekspresji enzymów metabolizujących CPR i P450. Uzyskana wiedza pozwoli również na opracowanie nowych modeli komórkowych do badań podstawowych. Oba poruszane przeze mnie zagadnienia w dalszym ciągu wymagają jednak kontynuacji i będą przedmiotem badań prowadzonych w przyszłości przez innych członków zespołu.

Abstract

The dynamic development of medicine in the last few decades has contributed to the implementation of new treatment for patients with cancer. However, the statistics of new cancer cases are not optimistic. Over the next dozen years, the number of new cases will increase dramatically. Although it is of some consolation that the number of cancer patient who managed to overcome the disease is also increasing, this does not apply to all types of cancer. There is a cancer in case of which therapy is palliative and morbidity equals mortality. The cancer which I am referring to is pancreatic cancer.

The research carried out in the framework of this dissertation is a continuation of the research conducted in the Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry of Gdansk University of Technology the aim of which is developing new anticancer compounds and studying their cytotoxic activity and mechanism of action against tumor cells *in vitro*. Among the imidazoacridinones, triazoloacridinones and 1-nitroacridine derivatives, compound C-1748, 1-nitroacridine derivative, showed the highest cytotoxic activity against four pancreatic cancer cell lines: Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 and AsPC-1. Because pancreatic cancer is the most malignant and chemo-resistant cancer out of all cancer types, basic research that will contribute to a better understanding of the biology of this cancer, the causes of drug resistance and the mechanism of action of chemotherapeutic agents is fully justified.

The first part of my dissertation was focused on the biological activity of the C-1748 derivative against four, selected pancreatic cancer cell lines. I showed that C-1748 exhibited the highest cytotoxic activity against MiaPaCa-2 cells. In the concentration corresponding to the IC_{80} value, the drug also induced significant changes in pancreatic cancer cells progression through the cell cycle. Flow cytometry analysis revealed that, depending on the tested cell line, drug induced permanent accumulation of G1 or G2/M phase cells and an increase in the population of cells in sub-G1 fraction. In addition, following the drug treatment, Panc-1, MiaPaCa-2 and BxPC-3 cells underwent time- and dose-dependent apoptosis. Apoptosis was manifested by caspase-3 activation and mitochondrial dysfunction. It was also accompanied by the changes in nuclear morphology and changes in the distribution of membrane phospholipids. Moreover, treatment with the 1-nitroacridine derivative C-1748 decreased expression of anti-apoptotic Bcl-2 protein. This drug also revealed selected mechanism of action against AsPC-1 cells of highest resistance to C-1748-induced apoptosis. It was accelerated cellular senescence. During my research, I also found a new role for C-1748 as a potent inhibitor of autophagy in the three tested cell lines. Autophagy inhibition and induction of apoptosis was also accompanied by the increasing level of neutral lipids and intracellular accumulation of

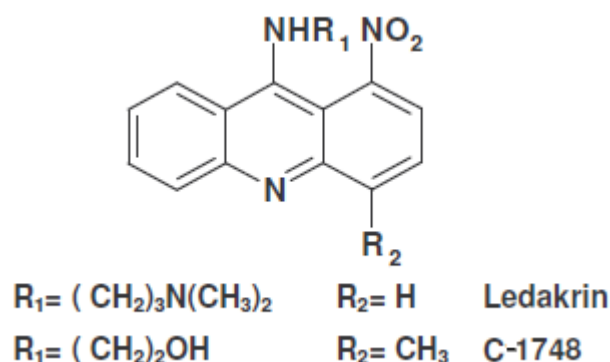
lipid droplets. Moreover, the use of the combination of C-1748 derivative with an autophagy inhibitor - wortmannin exerted a stronger effect on both autophagy and apoptosis in comparison to 1-nitroacridine derivative single treatment.

Second part of my dissertation focused on the role of xenobiotic metabolizing enzymes in the final biological response (cell death) of pancreatic cancer cells to the drug treatment. Both, the literature data and the results obtained so in our group that the expression level of chemotherapeutic metabolizing enzymes may affect the sensitivity of cancer cells to the drug treatment. Different sensitivity may be the result of a variation of metabolic profile of the drug in cells. The overexpression of selected metabolizing enzymes, may lead to the formation of new metabolites, which are more active against cancer cells than the parent compound. First, I demonstrated that the expression level of selected phase I metabolizing enzymes, especially those involved in C-1748 metabolism, differs between four tested pancreatic cancer cell lines. Next, AsPC-1 cells, which were the most resistant to the drug, were transiently transfected with plasmids carrying *CPR* (cytochrome P450 reductase) and *CYP3A4* genes - (which transcribe for) the key enzymes that metabolize C-1748. The overexpression of CPR and CYP3A4 resulted in different types of metabolic products, of various concentrations. In both CPR and CYP3A4 transfected cells I observed more metabolites which were present of greater amount in comparison to AsPC-1 wild type cells. In the next step, I showed that the overexpression of CPR and CYP3A4 resulted in the higher cytotoxic and proapoptotic activity of C-1748 against transfected AsPC-1 cells as compared to wild-type AsPC-1 cells.

In conclusion, the obtained results showed that the C-1748 derivative exhibited high activity against pancreatic cancer cells. Knowing the drugs' possible mechanisms of action, may be the basis for future development of new drug analogs with improved properties. On the other hand, the relationship between the expression level of drug metabolizing enzymes in the cancer cells and the final biological response of these cells to the drug treatment indicates that the drug will exhibit different effect in patients with individual level of metabolizing enzymes CPR and P450. Obtained results may also contribute to the development of new cellular models for basic research. Both issues discussed in my dissertation require continuation and will surely be the subject of future research conducted by other team member

1. Wprowadzenie- charakterystyka badanego związku

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej od lat prowadzone są badania mające na celu otrzymanie nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym. W 1974 roku do lecznictwa wprowadzono pierwszy polski lek przeciwnowotworowy, Ledakrin (Nitracrine^R, C-283) [Radzikowski i wsp., 1974]. Był on stosowany w leczeniu m.in. nowotworów jajnika, otrzewnej oraz niektórych nowotworów skóry. Z powodu wysokiej toksyczności, lek ten został jednak wycofany z terapii klinicznej [Mazerska i wsp., 1990]. Zważywszy na unikalne właściwości biologiczne i chemiczne pochodnych nitroakrydyny, prace badawcze kontynuowano poszukując nowych, udoskonalonych analogów Ledakrinu, które charakteryzowałyby się równie wysoką aktywnością przeciwnowotworową i jednocześnie obniżoną toksycznością ogólną. W trakcie licznych badań wykazano, że wprowadzenie dodatkowego podstawnika elektronodonorowego w położeniu *para* do grupy nitrowej, skutkowało wyższą stabilnością metaboliczną i niższą toksycznością nowo zsyntetyzowanych pochodnych nitroakrydyny [Szostek A., 2003].



Rysunek 1. Wzór strukturalny wybranych pochodnych.

Pochodne 9-amino-4-metylo- lub 4-metoksy-1-nitroakrydyny, stały się mniej podatne na redukcję, co prawdopodobnie odpowiadało za ich szersze spektrum działania przeciwnowotworowego [Tadi i wsp., 2004; Tadi i wsp., 2007]. Najbardziej aktywnym przedstawicielem tej grupy związków jest pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny o symbolu C-1748 (9-(2'-hydroksyloetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna; Capridine β , (rysunek 1). Dodatkowa grupa metylowa w pierścieniu akrydyny spowodowała, że C-1748 wykazał ok. 10 - krotnie niższą toksyczność w porównaniu z pochodną niepodstawioną w pozycji 4, co udowodniono w badaniach przedklinicznych przeprowadzonych na zwierzętach [Narayanan i wsp., 2005, Ashok i wsp., 2006, Ashok i wsp., 2007]. Obecnie związek ten przygotowany jest do pierwszej fazy badań klinicznych.

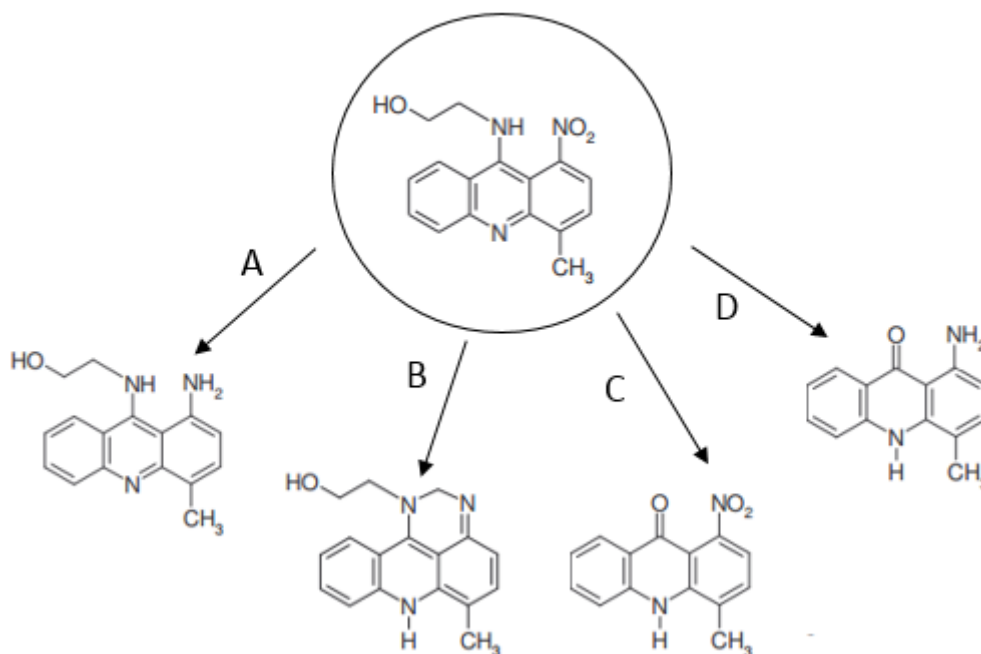
1.1. Biologiczny mechanizm działania pochodnej C-1748

Dotychczasowe, szeroko zakrojone badania przedkliniczne pozwoliły przybliżyć niektóre elementy mechanizmu działania pochodnej C-1748. C-1748 łatwo ulega przemianom metabolicznym, prowadzącym do powstania reaktywnych metabolitów, które zdolne są do kowalencyjnego wiązania się do DNA, w tym do tworzenia wiązań sieciujących [Konopa i wsp., 1983, Konopa i wsp., 2003, Szostek i wsp., 2002]. Badania *in vitro* prowadzone na komórkach różnych linii nowotworowych oraz badania *in vivo* przeprowadzone na zwierzętach pozwoliły dokładniej scharakteryzować mechanizm biologicznego działania pochodnej C-1748. Związek wykazał wysoką aktywność cytotoksyczną *in vitro* m.in. wobec komórek raka jelita, prostaty, piersi, pęcherza, płuc oraz wątroby, a także wysoką aktywność przeciwnowotworową w stosunku do ksenoprzeszczepów u nagich myszy ludzkich raków prostaty: LnCaP, PC-3 i TSU, ludzkiego raka jelita grubego HCT8, raka płuc, jajnika oraz czerniaka [Chen i wsp., 2002]. W komórkach LnCaP, pochodna C-1748 obniżała aktywność receptora androgenowego oraz indukowała działanie receptora estrogenowego [Tadi i wsp., 2007]. Najlepiej poznano mechanizm biologicznego działania związku w stosunku do komórek raka jelita grubego linii HCT8 i HT29 [Moś-Rompa, 2007]. Pochodna C-1748 w zależności od zastosowanego stężenia i czasu inkubacji indukowała zmiany dystrybucji komórek nowotworowych w cyklu życiowym. Ponadto, indukowała apoptozę, co zostało wykazane m.in. mikroskopową analizą zmian w morfologii jąder komórkowych, fragmentacją DNA do poziomu nukleosomów, zmianami potencjału mitochondrialnego, aktywacją kaspazy-3 oraz zmianami w rozmieszczeniu fosfolipidów błonowych. W komórkach HCT8, związek indukował również przyspieszone starzenie komórkowe [Augustin i wsp., 2010]. Dalasze badania nad mechanizmem działania związku w komórkach raka jelita grubego wykazały, że w wyniku inkubacji tych komórek z pochodną C-1748 dochodziło do powstawania reaktywnych form tlenu oraz spadku stężenia zredukowanej formy glutationu. Nie wpływało to jednak w istotny sposób na aktywność cytotoksyczną związku wobec komórek HCT8 i HT29 oraz jego zdolności do indukcji procesu apoptozy i nekrozy [Nowak-Ziatyk, 2011].

1.2. Przemiany metaboliczne pochodnej C-1748

Pochodna C-1748 do pełnej aktywności biologicznej wymaga transformacji metabolicznej. Z tego względu wiele uwagi poświęcono na zbadanie szlaków przemian metabolicznych związku z zastosowaniem enzymów rekombinantowych, enzymów frakcji mikrosomalnych wątroby oraz w komórkach nowotworowych wybranych linii, m.in. HepG2, HT29, HCT-116 oraz A549 [Niemira, 2012]. Dotychczas przeprowadzone badania wykazały,

że C-1748 metabolizowany jest do czterech głównych produktów (rysunek 2): ze zredukowaną grupą nitrową (A), z dodatkowym pierścieniem sześciocłonowym pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny (B), 1-nitroakrydonu (C) oraz 1-aminoakrydonu (D) [Wiśniewska, 2008].



Rysunek 2. Produkty metabolicznej transformacji pochodnej C-1748. Na podstawie [Wiśniewska, 2008].

Metabolizm związku C-1748 zachodził zgodnie z mechanizmem I fazy biotransformacji ksenobiotyków. Wykazano, że kluczową rolę w metabolizmie C-1748 odgrywa reduktaza cytochromu P450 (CPR) oraz następujące izoenzymy cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 oraz CYP3A4 [Wiśniewska, 2008]. Dalsze badania pokazały również, że czynnikiem odgrywającym istotną rolę w przemianach metabolicznych związku jest hipoksja. Ograniczony dostęp tlenu podwyższał bowiem stopień przemian metabolicznych pochodnej C-1748, a powstające metabolity, posiadające zredukowaną grupę nitrową, występowały w wysokim stężeniu, co wpływało na wzrost aktywności cytotoksycznej związku [Wiśniewska i wsp., 2012].

2. Wstęp teoretyczny

Według najnowszych prognoz Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w 2030 r. na raka chorować będzie 22,2 milionów ludzi. To o 75 % więcej niż w 2008 r., gdy chorobę nowotworową wykryto u 12,7 milionów osób na świecie. Ekspertsi przewidują również, że największy wzrost zachorowań, bo aż o 90 %, nastąpi w krajach rozwijających się. W Polsce, według prognoz, w 2025 r. zachorowalność na raka zwiększy się o 40 %. W USA nowotwory będą główną przyczyną zgonów w najbliższym dziesięcioleciu. Powyższe dane potwierdzają, że schorzenie to jest i będzie wyzwaniem dla współczesnej cywilizacji, gdzie tryb życia i stosunek ludzi do środowiska mają bezpośrednie przełożenie na rozwój choroby.

Pomimo niepokojących statystyk pocieszający może być fakt, że z roku na rok, dzięki wysiłkom naukowców i postępom współczesnej medycyny poprawia się skuteczność leczenia raka. Coraz częściej choroba wykrywana jest we wczesnym stadium rozwoju, gdy leczenie jest najbardziej skuteczne, a zastosowanie terapii zindywidualizowanej znacznie poprawia rokowania chorych. Obecnie najlepszym sposobem leczenia nowotworów jest chirurgiczne usunięcie guza. Nie jest to jednak możliwe w przypadku guzów znajdujących się w miejscach niedostępnych oraz białaczkach, będących chorobą nowotworową naczyń krwionośnych. Trzeba również pamiętać, iż leczenie chirurgiczne jest skuteczne jedynie po szybkiej diagnozie i wymaga stosowania dodatkowych metod, do których można zaliczyć: radioterapię, immunoterapię oraz chemioterapię. Obecnie najpopularniejszą metodą jest chemioterapia wykorzystująca działanie związków chemicznych na komórki zmienione w procesie nowotworzenia. W wyniku licznych badań udało się zsyntetyzować szereg związków o działaniu przeciwnowotworowym. Niestety ze względu na duże podobieństwo biochemiczne komórek normalnych i zmienionych nowotworowo, większość potencjalnych chemioterapeutyków jest toksyczna dla człowieka a chemioterapia niesie ze sobą wiele działań niepożądanych i nie zawsze skutecznie zwalcza chorobę. Ponadto są nowotwory, w przypadku których praktycznie nie ma szans na wyleczenie, a za sukces uznaje się chociaż nieznaczne wydłużenie życia pacjenta i uśmierzenie bólu. Do takich nowotworów zaliczany jest rak trzustki, który nie znajduje się w czołówce pod względem umieralności w porównaniu z innymi nowotworami, gdyż jest nowotworem rzadko występującym (zajmuje ósme miejsce na świecie pod względem umieralności spowodowanej chorobami nowotworowymi), ale jest najbardziej złośliwym nowotworem litym o współczynniku zachorowalności właściwie równym współczynnikowi umieralności.

2.1. Rak trzustki - ogólna charakterystyka

Rak trzustki należy do bardzo źle rokujących i opornych na leczenie nowotworów. Wynika to w głównej mierze z braku skutecznej diagnostyki na wczesnym etapie rozwoju nowotworu oraz nieefektywnej terapii. U większości pacjentów choroba diagnozowana jest w stadium zaawansowanym, z przerzutami i tylko 15 - 20 % chorych kwalifikuje się do chirurgicznego usunięcia guza, które wciąż pozostaje jedyną szansą na całkowite wyleczenie. Badania ostatnich lat nie przyniosły znacznego postępu w leczeniu schorzenia, a standardowo stosowanym lekiem wciąż pozostaje gemcytabina, lub jej kombinacje z innymi chemoterapeutykami.

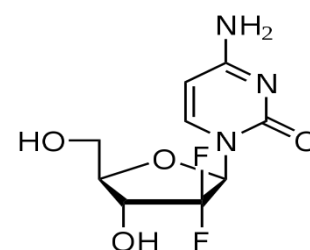
Rak trzustki po raz pierwszy został opisany jako nowe schorzenie w 1836 roku przez Mondiera [Heywood i wsp., 1998]. Alessandro Codivilla w 1898 roku oraz Walther Kaush w 1912 roku, jako pierwsi, niezależnie od siebie, opisali metodę chirurgicznego usunięcia raka trzustki. W latach 30-tych zabieg dokładniej opisał chirurg Allen Oldfather Whipple i między innymi od jego nazwiska wywodzi się nazwa zabiegu [Griffin i wsp., 2015]. Operacja metodą Kausha-Whipple'a należy do najważniejszych i najbardziej skomplikowanych operacji w obrębie jamy brzusznej, obarczonych znacznym odsetkiem powikłań i śmiertelnością w okresie okołoperacyjnym. Polega ona na usunięciu głowy trzustki, przylegającego do trzustki odcinka dwunastnicy, pęcherzyka żółciowego oraz części odźwiernikowej żołądka [Griffin i wsp., 2015]. Przez kolejne dekady nie dokonano znacznego postępu w leczeniu nowotworu, dopiero w 1960 roku zaczęto stosować radioterapię i chemioterapię. W 1984 roku do II fazy badań klinicznych dotarł 5-fluorouracyl, który wydłużał przeżycie pacjentów z przerzutowym rakiem trzustki [Hansen i wsp., 1988]. 5-fluorouracyl pozostawał standardowym lekiem aż do roku 1997, kiedy to w III fazie badań klinicznych wykazano znaczną skuteczność nowego związku - gemcytabiny. Równoległe badania wykazały, że roczny wskaźnik przeżywalności u pacjentów, którym podawano 5-fluorouracyl wynosił 2 %, natomiast w przypadku gemcytabiny było to 18 % [Burriss i wsp., 1997]. Od czasu wprowadzenia do leczenia gemcytabina, podejmowano liczne próby łączenia jej z innymi lekami, takimi jak np. cisplatyna, irinotekan, erlotinib, czy docetaxel, lecz wyniki leczenia były wciąż niezadowolające [van Moorsel i wsp., 1997]. W ostatnich czterech latach pojawiły się jednak nowe schematy leczenia. Jednym z nich, jest terapia o nazwie FOLFIRINOX, której wyniki opublikowano w 2011 roku [Conroy i wsp., 2011]. Terapia ta, polega na jednoczesnym podawaniu czterech leków: 5-fluorouracylu, leukovoryny, irinotekanu oraz oksaliplatyny. Badania kliniczne wykazały, że w porównaniu do leczenia samą gemcytabiną, u pacjentów otrzymujących FOLFIRINOX, ok. 48 % chorych z zaawansowanym rakiem trzustki przeżywało rok, podczas gdy wśród chorych leczonych standardowo gemcytabiną odsetek ten wynosi ok. 20 %. Jest to jednak bardzo toksyczna terapia, powodująca wiele działań

niepożądanych, takich jak znaczne obniżenie odporności organizmu, powikłania żołądkowo-jelitowe, nudności, łysienie oraz przewlekłe zmęczenie [Conroy i wsp., 2011]. Z badań opublikowanych przez Instytut Raka w Mediolanie wynika, że może być ona stosowana jedynie u pacjentów w ogólnie dobrym stanie zdrowia, a takich pacjentów cierpiących na raka trzustki jest bardzo niewielu [Conroy i wsp., 2011]. Drugi schemat leczenia uznawany jest za nowy przełom w leczeniu raka trzustki. W 2014 roku na Gastrointestinal Cancer Symposium w San Francisco ogłoszono przełom w leczeniu raka trzustki z przerzutami. Nowym standardem w leczeniu przerzutowego raka trzustki stał się nab-paklitaksel w skojarzeniu z gemcytabiną [Von Hoff i wsp., 2013]. Wyniki badań klinicznych opublikowane w 2013 r., wykazały, że dzięki tej terapii 35 % chorych na raka trzustki przeżywało rok od momentu zdiagnozowania choroby. Wykazano również, że 9 % pacjentów przeżywało nawet dwa lata, a niewielka grupa ok. 3 % chorych, żyła nawet trzy lata i więcej [Golstein i wsp., 2015]. Skuteczność tej terapii jest nieco mniejsza w porównaniu do skuteczności FOLFIRINOXU, ale wywołuje znacznie mniej działań niepożądanych. Dzięki temu może być stosowana u większej grupy chorych, będących w nieco gorszym stanie zdrowia oraz w różnym wieku, także u osób starszych, na przykład po 75 roku życia. W Polsce terapia nab-paklitakselem w skojarzeniu z gemcytabiną nie jest jeszcze refundowana w leczeniu przerzutowego raka trzustki.

Obecnie testowanych jest ponad 50 nowych cząsteczek, które mogłyby być stosowane w leczeniu raka trzustki. Spośród nich, około 10 znajduje się już w III fazie badań klinicznych, czyli w ostatnim etapie przed złożeniem wniosku o rejestrację.

2.1.1. Gemcytabina- złoty standard w leczeniu raka trzustki

Gemcytabina (dFdC, GEMZAR) od ponad 19 lat pozostaje standardem w leczeniu zaawansowanego raka trzustki (rysunek 3). Związek ten został zsyntetyzowany w 1980 r. w Lilly Research Laboratories (Indianapolis, IN) [Hertel i wsp., 1988]. Początkowo stosowany był jako związek antywirusowy, gdyż oddziaływał na DNA i RNA wirusów [Mini i wsp., 2006]. Wykazał jednak niski indeks terapeutyczny i pewnym czasie zaczął być stosowany jako związek przeciwnowotworowy o unikalnym mechanizmie działania i aktywności w stosunku do szerokiego spektrum guzów litych.



Rysunek 3. Wzór strukturalny cząsteczki gemcytabiny (2'-2'-difluorodeoksycytydyny).

Gemcytabina jest analogiem 2'-deoksycytydyny o podobieństwie strukturalnym i metabolicznym do cytarabiny (ara-C), szeroko stosowanej w leczeniu białaczek, ziarnicy

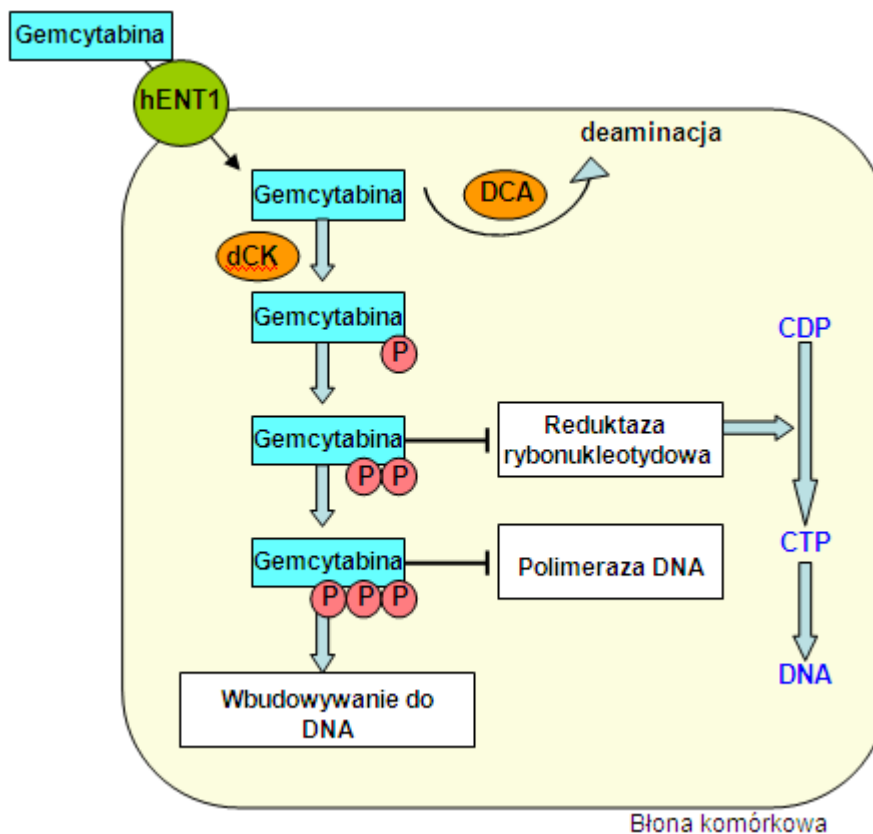
złośliwej i chłoniaków [Mini i wsp., 2006]. Oprócz zastosowania w leczeniu nieoperacyjnego raka trzustki, gemcytabina stosowana jest również w terapii niedrobnokomórkowego raka płuc (w skojarzeniu z cisplatyną), raka sutka, raka jajnika (po niepowodzeniu chemioterapii I rzutu) oraz inwazyjnego raka pęcherza moczowego [Barton-Burke, 1999].

Podobnie jak 5-fluorouracyl, gemcytabina należy do grupy antymetabolitów i w organizmie ulega przekształceniu pod wpływem wewnątrzkomórkowych kinaz nukleozydowych do aktywnych fosforylowanych pochodnych [Mini i wsp., 2006]. Działanie cytotoksyczne gemcytabiny *in vitro* zależy zarówno od jej stężenia, jak i od czasu ekspozycji na związek. Transport do wnętrza komórki przez błonę komórkową możliwy jest dzięki białkowym transporterom nukleozydowym (hENTs). Stąd pacjenci z wysokim poziomem tego enzymu, w stosunku do pacjentów z niskim poziomem, lub całkowitym brakiem białka lepiej reagują na terapię, co przekłada się na ich dłuższe przeżycie [Spratlin i wsp., 2004]. Po wnikięciu do komórki, przy udziale kinazy deoksycytydynowej (dCK), gemcytabina ulega fosforylacji do monofosforanu gemcytabiny (dFdCMP), który następnie przekształcany jest odpowiednio do di- lub trifosforanu (dFdCDP oraz dFdCTP), które są aktywnymi metabolitami leku. Poziom kinazy deoksycytydynowej odgrywa istotną rolę w metabolizmie leku, a tym samym w oporności komórek nowotworowych na leczenie gemcytabiną. Niski poziom białka, lub jego brak koreluje z opornością na działanie chemoterapeutyku, co może służyć jako czynnik prognozujący skuteczność leczenia gemcytabiną [Kroep i wsp., 2002].

Działanie chemoterapeutyku przebiega według trzech mechanizmów pokazanych na rysunku nr 4. Po pierwsze, trifosforan gemcytabiny konkuruje z trifosforanami deoksynukleozydów (dCTP) o wbudowanie do DNA. Po drugie, podwójnie ufosforylowany metabolit hamuje aktywność reduktazy rybonukleotydydowej, która jest jedynym enzymem odpowiedzialnym za kontrolowanie reakcji prowadzących do powstania trifosforanów deoksynukleozydów niezbędnych do syntezy DNA. Zahamowanie aktywności tego enzymu przez dFdCDP zmniejsza stężenie wszystkich deoksynukleozydów, a w szczególności stężenie dCTP. Po trzecie, trifosforan gemcytabiny hamuje polimerazę DNA istotną w procesie jego syntezy i naprawy [Huang i wsp., 1999, Peters i wsp., 2000].

Gemcytabina inaktywowana jest głównie przez deaminazę deoksycytydiny (dCDA) do difluorodeoksyurydiny (dFdU). Inną drogą dezaktywacji jest również deaminacja dFdCMP do dFdUMP (monofosforanu 2'2'-difluorodeoksyurudyny) w wyniku działania deaminazy-dCMP, a końcowym produktem tej reakcji jest dFdU [Heinemann i wsp., 1992]. Różne badania farmakogenetyczne wykazały wpływ odmiennej ekspresji i polimorfizmu genów, których produkty białkowe zaangażowane są w transport leku, czy jego metabolizm, na toksyczność gemcytabiny i indukowaną w wyniku jej działania odpowiedź komórkową [Fukunaga i wsp., 2004].

Badania z udziałem gemcytabiny dotyczące jej interakcji z innymi lekami przeciwnowotworowymi wykazały brak oporności krzyżowej w kombinacji z niektórymi z nich, co czyni gemcytabinę idealnym kandydatem do terapii wielolekowych.



Rysunek 4. Metabolizm i mechanizm działania gemcytabiny. Na podstawie [Barton-Burke, 1999].

2.1.2. Czynniki ryzyka rozwoju raka trzustki

Etiologia raka trzustki nie jest do końca poznana, jednakże wiadomo, że na rozwój choroby ma wpływ wiele czynników, zarówno środowiskowych jak i genetycznych. Środowiskowymi czynnikami ryzyka zachorowania na raka trzustki są przede wszystkim: podeszły wiek, palenie tytoniu, cukrzyca, wysokobiałkowa i wysokotłuszczowa dieta (otyłość), ekspozycja na węglowodory i pochodne ropy, przewlekłe stany zapalne, infekcje, czy przebyta cholecystektomia [Nitsche i wsp., 2011]. Genetyczne predyspozycje do raka trzustki przejawiają się w trzech formach: wczesnie występujące zmiany w obrębie trzustki, takie jak dziedziczne zapalenie trzustki oraz cystis fibrosis, występowanie zespołów genetycznych takich jak Zespół Peutz-Jeghersa, FAMMM, czy zespół HBOC i w końcu rodzinny rak trzustki, w rodzinach, w których wystąpiły dwa, lub więcej przypadki raka trzustki wśród krewnych pierwszego stopnia [Klein i wsp., 2012].

Najistotniejszymi czynnikami ryzyka rozwoju choroby są wiek i palenie papierosów. Ryzyko zachorowania na raka trzustki wzrasta wraz z wiekiem. Większość pacjentów, to

pacjenci powyżej 45 roku życia. Szczyt zachorowań przypada na 60-80 rok życia (80 % przypadków) i bardzo często w tym wieku rak wykrywany jest już w stadium zaawansowanym z licznymi przerzutami m.in. do wątroby, mózgu, czy kości [Nitsche i wsp., 2011]. Palenie papierosów jest kolejnym, potwierdzonym w badaniach czynnikiem związanym z rozwojem raka trzustki [Lowenfels i wsp., 2004]. Szacuje się, że około 25 % wszystkich przypadków zachorowań na ten nowotwór jest związanych z paleniem papierosów. Z badań przeprowadzonych na zwierzętach wynika, że zarówno długotrwała ekspozycja na związki N-nitrozaminowe obecne w dymie tytoniowym, jak i pozajelitowe podanie innych związków N-nitrozowych przyczyniało się do indukcji procesu nowotworzenia. Związki te, metabolizowane są do elektrofilów, które w łatwy sposób reagują z DNA, co z kolei prowadzi do aktywacji onkogenów [Risch, 2003]. Ostatnie badania epidemiologiczne na poziomie molekularnym wykazały również, że zmienność osobnicza w metabolizmie karcynogenów, czy naprawie DNA ma wpływ na rozwój raka trzustki u osób palących papierosy [Jang i wsp., 2013]. Ryzyko rozwoju choroby dotyczy też osób otyłych. W 2007 roku, World Cancer Research Foundation i American Institute for Cancer Research uznały za istotne wyniki badań wskazujące na wpływ otyłości na rozwój raka trzustki. Rozwój raka trzustki u osób otyłych może wynikać m.in. ze stanów zapalnych towarzyszących otyłości i promujących wzrost guza, zmian hormonalnych związanych z otyłością oraz zmian w gospodarce energetycznej organizmu, wynikających ze zwiększonego narażenia na działanie czynników rakotwórczych obecnych w nadmiernie spożywanej, niezdrowej żywności [Bracci, 2012]. Trzecim czynnikiem mającym związek z chorobą jest cukrzyca, która może być zarówno czynnikiem predysponującym, jak i wczesnym markerem rozwoju nowotworu [Fisher i wsp., 2001]. Szacuje się, że u około 1 % cukrzyków powyżej 50 roku życia, rak trzustki może być zdiagnozowany w ciągu 3 lat od wystąpienia pierwszych objawów cukrzycy [Chari i wsp., 2005]. Hiperglikemia indukowana w procesie nowotworzenia zaczyna rozwijać się ok. dwa lata przed zdiagnozowaniem raka. W związku z tym, traktowana jest jako jeden z biomarkerów wczesnej postaci choroby, a identyfikacja pacjentów z cukrzycą skojarzoną z rakiem trzustki dałaby możliwość wczesnej diagnozy tego nowotworu [Pannala i wsp., 2008]. Pozostałymi czynnikami ryzyka są również: ekspozycja na zanieczyszczenia środowiska, takie jak pestycydy, chlorki metylenu, dwuchlorki etylu, chlorohydryny etylenu i propylenu, beta-naftylicznej, benzydyna oraz DDT. Coraz częściej rozwój nowotworu łączy się również z nieprawidłową dietą, niekoniecznie prowadzącą do otyłości. Dieta, która może chronić przed rakiem, powinna być bogata w błonnik, witaminę C i inne antyoksydanty, a także wielonienasycone kwasy tłuszczowe, które znajdują się w rybach oraz olejach. Niezależnymi czynnikami ryzyka rozwoju choroby są również płeć męska i rasa czarna [Jemal i wsp., 2003].

2.1.3. Lekooporność raka trzustki

Pomimo tego, że bardzo dobrze poznano mechanizmy śmierci komórkowej indukowane w wyniku działania gemcytabiny i innych stosowanych chemoterapeutyków, ich skuteczność jest ograniczona, ze względu na nabywanie przez komórki nowotworowe trzustki lekooporności. Do tej pory większość mechanizmów oporności badana była pod kątem mutacji w licznych genach, kluczowych do prawidłowego funkcjonowania szlaków sygnalizacyjnych w komórce zmienionej nowotworowo. Jednakże ostatnie badania sugerują istotną rolę mikrośrodowiska guza w rozwoju i utrzymaniu oporności na klasycznie stosowane chemoterapeutyki i terapie ukierunkowane molekularnie. Lekooporność raka trzustki wynika z wielu mechanizmów, do których można zaliczyć m.in.: mutacje w kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki genach, nieprawidłową ekspresję genów, rozregulowanie kluczowych szlaków sygnalizacyjnych, takich jak: NF- κ B, Notch, Akt, czy szlaków apoptozy, tranzycję epitelialno-mezenchymalną odpowiedzialną za zdolność nowotworu do przerzutowania i obecność nowotworowych komórek macierzystych, nasilony proces angiogenezy, czy obecność we wnętrzu guza mikrośrodowiska hipoksyjnego [Long i wsp., 2011].

2.1.3.1. Mutacje w kluczowych genach

Rak trzustki jest chorobą, w której mutacje w genach supresorowych, onkogenach i genach mutatorowych prowadzą do nowotworowej transformacji komórek nabłonka gruczołowego przewodów trzustkowych. Mutacje i inaktywacja genów supresorowych powodują niestabilność genetyczną i zwiększoną proliferację komórek. Najczęstsze mutacje w przypadku raka trzustki dotyczą onkogenów: *K-RAS* (75-100% przypadków), *HER-2/neu* (30%), *Akt-2* (10-20%), *COX-2*, *Notch 1*, oraz genów supresorowych: *p16INK4a* (do 80%), *p53* (60%), *DPC4/SMAD4* (około 50%), oraz *BRCA-2* (7-10%) [Donghui i wsp., 2004, Strimpakos i wsp., 2008]. Rola mutacji wybranych genów w rozwoju raka trzustki i leczeniu choroby została przedstawiona w tabeli nr 1.

Tabela 1. Geny najczęściej zmutowane w raku trzustki i ich rola w rozwoju choroby.

Gen	Lokalizacja	Mutacje w rakach trzustki	Funkcje genu	Rola mutacji w raku trzustki
K-RAS	12p13	>90%	<i>K-RAS</i> pełni rolę molekularnego „przełącznika”. W stanie aktywnym związany jest z GTP co skutkuje aktywacją efektorów RAS: RAF-MEK-ERK i PI3K. W prawidłowych warunkach układ RAS aktywowany jest chwilowo ze względu na niską wewnętrzną aktywność GTP-azy. Dodatkowo, działanie białka GAP stymuluje hydrolizę GTP, przekształcając go w GDP, co doprowadza do inaktywacji białka [Bryant i wsp., 2014, Court i wsp., 2013].	Mutacje w genie <i>K-RAS</i> należą do najwcześniejszych i najczęściej spotykanych mutacji związanych z rozwojem raka trzustki. Stanowią czynnik prognozujący skuteczność leczenia gemcytabiną w połączeniu z erlotinibem. Wykazano, że wyciszenie <i>K-RAS</i> techniką siRNA prowadziło do zmniejszenia proliferacji komórek nowotworowych i objętości guza u myszy. Ponadto, komórki raka trzustki ze zmutowaną formą genu cechują się wysokim, konstytutywnym poziomem autofagii, nawet w przypadku wystarczającej ilości składników odżywczych. Jest to mechanizm promujący przeżycie komórki, a jego blokowanie z użyciem inhibitorów takich jak chlorochina czy hydroksychlorochina w połączeniu z innymi chemoterapeutykami jest obecnie przedmiotem wielu badań klinicznych [Guo i wsp., 2011, Laghi i wsp., 2002].
p16	9p21	80%	Produkt genu <i>16INK4a</i> hamuje oddziaływanie cykliny D z kinazami CDK4 i CDK6, oraz zatrzymuje komórki w fazie G1/S cyklu komórkowego. W normalnych komórkach kompleks cyklinyD/CDK4 fosforyluje białko Rb1, nie dopuszczając do utworzenia kompleksu E2F-Rb1. W wyniku uszkodzenia DNA dochodzi do zablokowania przez p16 kompleksu kinazy z cykliną, białko Rb1 nie ulega fosforylacji, co ostatecznie skutkuje zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G1/S [Strimpakos i wsp., 2008].	Mutacje genu <i>p16</i> wśród wszystkich nowotworów z największą częstotliwością spotykane są w rakach trzustki. Utrata aktywności genu przyczynia się do złośliwości nowotworu (mniej zróżnicowane komórki), krótszego przeżycia pacjentów i obecności przerzutów. Polimorfizm genu związany jest z szybszą progresją nowotworu i słabszą odpowiedzią na terapię [69]. Przywrócenie prawidłowych funkcji genu <i>p16</i> rozpatrywane jest jako jedna ze strategii terapeutycznych, bowiem wprowadzenie funkcjonalnego genu w ksenoprzeszczepach komórek linii AsPC-1 na myszy przyczyniło się do wydłużenia czasu przeżycia gryzoni i zmniejszenia objętości guza [Hosotani i wsp., 2002].
p53	17p13	50-75%	Produkt genu, białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym o właściwościach supresora nowotworowego. Zaangażowane jest w regulację wielu procesów związanych z aktywacją mechanizmów naprawy DNA czy indukcją apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Stężenia białka w komórce podlega ciągłej regulacji, głównie przez ligazę Mdm2 [Court i wsp., 2013, Kubbutat i wsp., 1997, Levine i wsp., 1991].	Badania wykazały krótszy czas przeżycia pacjentów noszących mutacje w genie <i>p53</i> w porównaniu do pacjentów p53(-). Inaktywacja genu <i>p53</i> związana jest również z opornością na leczenie 5-fluorouracyłem i gemcytabiną [Giovanetti i wsp., 2006], a także sprzyja tworzeniu przerzutów i nabyciu oporności na indukcję przyspieszonego starzenia komórkowego i zahamowanie cyklu życiowego [Morton i wsp., 2010].
SMAD4	18q21	50%	<i>SMAD4</i> jest genem supresorowym i uczestniczy w przekazywaniu sygnału na szlaku transformującego czynnika wzrostu α (TGF α) i jego ligandów [Elliott i wsp., 2005].	Inaktywacja genu <i>SMAD4</i> w raku trzustki związana jest z jego złośliwością. Przywrócenie prawidłowej funkcji genu w ksenoprzeszczepach raka trzustki na nagie myszy powodowało zahamowanie angiogenezy i w konsekwencji zmniejszenie inwazyjności nowotworu [Peng i wsp., 2002].

2.1.3.2. MikroRNA

Mikro RNA (miRNA) są jednoniciowymi cząsteczkami niekodującego RNA o długości 18-24 nukleotydów, których rolą jest obniżenie ekspresji genów na etapie translacji informacji genetycznej. Wykazano, że różne rodzaje miRNA odgrywają istotną rolę w patogenezie nowotworów [Calin i wsp., 2002]. Zaburzenie regulacji miRNA zaobserwowano również w komórkach nowotworowych trzustki. Bloomston i inni wykazali, że na podstawie poziomu mikro RNA możliwe jest m.in. odróżnienie raka trzustki od przewlekłego zapalenia trzustki [Bloomston i wsp., 2006]. Ponadto, określenie poziomu ekspresji 95 różnych miRNA w guzie trzustki, liniach komórkowych raka trzustki, tkance trzustki oraz w komórkach nabłonka przewodów trzustkowych wskazało na zaburzoną ekspresję ośmiu miRNA w tkance i w komórkach nowotworowych, w porównaniu do zdrowej tkanki i komórek przewodów trzustkowych [Zhang i wsp., 2009].

Biorąc pod uwagę, że odmienna ekspresja miRNA pozwala zróżnicować tkankę zmienioną nowotworowo od prawidłowej tkanki trzustki, spekulowano, że na tej podstawie będzie można również przewidzieć rokowania pacjentów i ich odpowiedź na leczenie. Badania przeprowadzone na tkankach pozyskanych z nowotworów trzustki wykazały, że 6 rodzajów miRNA ulega odmienniejszej ekspresji u pacjentów z dłuższym czasem przeżycia (ponad 2 lata). Na przykład pacjenci z nadekspresją miR-196a-2 wykazywali średnią medianę przeżycia 14,3 miesiąca w porównaniu z 26,5 miesiąca dla pacjentów z niską ekspresją miR-196a-2. Podobnie średni czas przeżycia pacjentów z wysoką ekspresją miR-219 wynosił ok. 13 miesięcy w porównaniu z 24 miesiącami u osób z obniżoną ekspresją miRNA [Wang i wsp., 2011].

Przykładem mikro RNA, wykazującego podwyższoną ekspresję w komórkach nowotworowych trzustki jest miR21 będący negatywnym regulatorem ekspresji PTEN (*ang. phosphatase and tensin homolog*), PDCD4 (*ang. programmed cell death protein 4*) oraz TIMP3 (*ang. metalloproteinase inhibitor 3*). Nadekspresja miR21 prowadziła więc do zahamowania apoptozy i wzrostu inwazyjności nowotworu [Xia i wsp., 2001]. Skutkiem zahamowania jego ekspresji był m.in. spadek proliferacji i chemooporności komórek oraz zahamowanie cyklu komórkowego i indukcja apoptozy [Moriyama i wsp., 2009]. Z kolei w grupie Shao, po przywróceniu prawidłowej ekspresji miR-132 w komórkach raków trzustki obserwowano zahamowanie proliferacji i zdolności do tworzenia kolonii [Wang i wsp., 2011]. Yu i inni wykazali, że miR-96 ulega obniżonej ekspresji w tkance nowotworowej trzustki w porównaniu do prawidłowej tkanki, a jego celem molekularnym jest szlak sterowany przez białko K-RAS. Przywrócenie prawidłowej ekspresji miR-96 silnie hamowało proliferację komórek, inwazyjność nowotworu, indukowało apoptozę i ograniczało wzrost guza [Yu i wsp., 2010]. Podejmowano również udane próby wyciszania genu kodującego miR-34a,

bezpośrednio regulowanego przez gen *p53* i odgrywającego istotną rolę w zdolności nowotworowych komórek macierzystych trzustki do samoodnawiania się [Chang i wsp., 2007].

2.1.3.3. Nowotworowe komórki macierzyste

Guz nowotworowy nie jest jednorodną strukturą. W jego obrębie można znaleźć subpopulacje komórek różniących się genotypem i fenotypem. Jedną z subpopulacji są komórki, które pomimo ograniczonej zdolności do podziałów, mogą odpowiadać za inicjację i progresję procesu nowotworzenia. Ze względu na ich zdolność do różnicowania i nieograniczonej liczby podziałów, nazwano je nowotworowymi komórkami macierzystymi (*ang. cancer stem cells, CSC*). Nowotworowe komórki macierzyste, podobnie jak prawidłowe komórki macierzyste posiadają unikalne zdolności do proliferacji, multipotencji i samoodnawiania. Ponadto, cechują się wysoką aktywnością transporterów ABC, odpowiadających za usuwanie poza komórkę czynników szkodliwych, w tym i leków przeciwnowotworowych [Lobo i wsp., 2007]. Obecnie z coraz większym sukcesem izoluje się macierzyste komórki nowotworowe, a następnie bada się ich genotyp i fenotyp, co z kolei przekłada się na rozwój nowych strategii terapeutycznych, pozwalających zniwelować zjawisko chemooporności wywołane przez właściwości tych komórek [Reya i wsp., 2001].

W przypadku raka trzustki w wyniku stosowania radioterapii i chemioterapii obserwowano wzrost populacji komórek o charakterze nowotworowych komórek macierzystych. Na podstawie ekspresji określonych markerów na powierzchni komórki, wyizolowano komórki o fenotypie: CD44, CD24, CD133 i ESA [Hermann i wsp., 2007, Li i wsp., 2007]. Shah i inni wykazali, że w komórkach niewrażliwych na działanie gemcytabiny dochodzi do ekspresji markerów charakterystycznych dla komórek macierzystych, takich jak: CD44, CD24 i ESA [Shah i wsp., 2013]. Inni badacze obserwowali zwiększenie populacji komórek linii L3.6p z markerem CD133+ po traktowaniu gemcytabiną. Podwyższoną ekspresję tych markerów stwierdzono również w ksenoprzeszczepach raków trzustki na myszy, poddanych działaniu gemcytabiny i promieniowania jonizującego [Shukla i wsp., 2008]. W innym eksperymencie z użyciem linii komórkowej raka trzustki Panc-1 wykazano, że komórki z markerami powierzchniowymi CD24 i CD44 miały wyższy potencjał tumorogenny niż komórki z markerami CD24- i CD44- [Hindriksen i wsp., 2012].

CSC trzustki wykazują pewne podobieństwa do komórek macierzystych innych nowotworów, aczkolwiek wykazano szereg cech specyficznych tylko dla tego typu nowotworu. Powszechnie stosowane terapie przeciwnowotworowe, takie jak: radioterapia, czy chemioterapia zwalczają jedynie szybko rosnące komórki nowotworowe, nie uszkadzając tych inicjujących ich powstawanie. Niezbędne są więc terapie nakierowane na nowotworowe

komórki macierzyste trzustki, a dokładne zbadanie szlaków sygnalizacyjnych w tych komórkach pozwoli wskazać najlepszy cel molekularny. Do tej pory zidentyfikowano kilka szlaków sygnalizacyjnych i genów ulegających wybiórczej ekspresji w CSC w porównaniu do pozostałych komórek nowotworowych trzustki. Jednym z przykładów jest gen *c-Met*. *C-Met* jest protoonkogenem kodującym białko HGFR (*ang. hepatocyte growth factor receptor*) mające aktywność kinazy tyrozynowej. Poziom ekspresji *c-Met* jest znacznie wyższy w tkance nowotworowej trzustki niż w normalnej tkance i związany jest z inwazyjnością i wzrostem nowotworu. Zastosowanie chemicznego inhibitora *c-Met*: XL-184, lub wyciszenie genu z użyciem techniki siRNA prowadziło do indukcji apoptozy i zahamowania progresji komórek w cyklu życiowym, co wskazuje na istotną rolę genu *c-Met* w utrzymaniu populacji CSC w raku trzustki [Herreros i wsp., 2012]. Podobną sytuację, w warunkach *in vivo* obserwowano po zahamowaniu receptorów Nodal/Activin: Alk-4 i Alk-7 przez inhibitor SB431542. Komórki nowotworowe L3.6pl traktowane wstępnie inhibitorem SB431542, a następnie gemcytabiną, przeszczepiono na bezgranicze myszy, co skutkowało wyraźnym wzrostem populacji komórek apoptotycznych o fenotypie CD133⁺ i ograniczeniem wzrostu guza u myszy. Z kolei traktowanie komórek samym inhibitorem, lub gemcytabiną, nie dawało podobnego efektu [Lonardo i wsp., 2011]. Zastosowanie takiego schematu leczenia może być wyzwaniem, biorąc pod uwagę obfite podścielisko pierwotnej tkanki nowotworowej trzustki i utrudniony dostęp chemoterapeutyków do wnętrza guza [Olive i wsp., 2009]. Ponadto, 50 % pacjentów cierpiących na raka trzustki nosi mutacje w genie *Smad 4*, znajdującym się pod kontrolą genów *Nodal/Activin*. Wyciszenie genu *Smad 4*, techniką siRNA w komórkach nowotworowych z aktywną formą tego genu skutkowało zmniejszeniem populacji komórek nowotworowych, głównie w wyniku zahamowania szlaku Nodal/Activin. Z tego powodu, gen *Smad 4* jest niezbędnym elementem szlaku sygnalizacyjnego Nodal/Activin, a mutacje w obrębie tego genu czynią komórki niewrażliwe na inhibitory receptorów Alk-4 i Alk-7. Wykazano również, że nie wszystkie mutacje powodują dysfunkcję genu i część nowotworów ze zmutowanym genem *Smad 4* posiada aktywny szlak sygnalizacyjny *Smad2/3*, co warunkuje wrażliwość pacjentów o takim genotypie na tego typu terapię [Lonardo i wsp., 2011].

2.1.3.4. Tranzycja epithelialno-mezenchymalna

Podczas, gdy większość nowotworów złośliwych wywodzi się z tkanki nabłonkowej, już dawno potwierdzono, że zdolne do migracji i przerzutowania komórki tych nowotworów wykazują cechy komórek mezenchymalnych, co świadczy o istnieniu tranzycji fenotypu komórek podczas rozwoju nowotworu [Thiery i wsp., 2009]. Podczas tranzycji epithelialno-mezenchymalnej (*ang. epithelial-mesenchymal transition, EMT*) dochodzi do utraty

markerów nabłonkowych takich jak: E-kadheryna, niektóre cytokeratyny, klaudyny, czy okludyny. Pojawiają się natomiast markery mezenchymalne, takie jak: N-kadheryna, wimentyna, czy fibronektyna [Kalluri i wsp., 2009].

EMT występuje podczas normalnego płodowego procesu rozwojowego i jest niezbędna dla tworzenia mezodermy. W ostatnich latach EMT obserwuje się również w procesach chorobowych, zwłaszcza w gojeniu się ran, regeneracji narządów, zwłóknieniu tkanki, czy rozwoju nowotworu [Kalluri i wsp., 2009]. EMT odgrywa istotną rolę w kilku etapach rozwoju nowotworu [Huber i wsp., 2005]. Po pierwsze, komórki nabywają zdolności do migracji, dzięki czemu mogą oderwać się od reszty populacji komórek. Po drugie, tranzycja umożliwia komórkom dostęp do węzłów chłonnych, czy naczyń krwionośnych, a po trzecie umożliwia ponowne opuszczenie krwiobiegu i utworzenie mikroprzerzutów [Hugo i wsp., 2007].

Obecnie istnieją dowody na występowanie EMT w kilku nowotworach przewodu pokarmowego [Natalwala i wsp., 2008]. W przypadku raka trzustki badania wykazały sprzeczne wyniki. Javle i inni [Javle i wsp., 2007] obserwowali związek pomiędzy niskim przeżyciem pacjentów a markerami EMT (wysoki poziom fibronektyny, wimentyny i niski E-kadheryny) w 36 próbkach operacyjnie usuniętych guzów trzustki. W związku z tym, wykazano, że niski poziom E-kadheryny może być markerem prognozującym przerzutowanie raka trzustki, jednak tylko w kombinacji z tkankowym aktywatorem plazminogenu typu urokinazy (uPa) [Shin i wsp., 2005]. W innych badaniach, wykazano obecność N-kadheryny nie ulegającej ekspresji w normalnej tkance trzustki w 13 spośród 30 próbek [Nakajima i wsp., 2004]. Niestety dane na temat markerów EMT w raku trzustki nie są tak jednoznaczne jak w przypadku innych nowotworów. Wynika to z niejednorodnej grupy pacjentów, małej ilości próbek, czy różnych podejść metodologicznych. Ponadto, trzeba wziąć pod uwagę trudną detekcję komórek o fenotypie EMT i ich zdolność do szybkiej rewersji [Iwatsuki i wsp., 2012].

Od pewnego czasu coraz więcej danych wskazuje na znaczenie EMT w lekooporności nowotworów. Przemawiają za tym badania, na podstawie których wykazano, że komórki które uległy EMT są bardziej odporne na leki, a zahamowanie tranzycji prowadzi nie tylko do zmniejszenia potencjału inwazyjnego tych komórek, ale również ich zwiększonej wrażliwości na chemoterapeutyki [Sarkar i wsp., 2009]. I tak np. komórki raka trzustki linii AsPC-1 i L3.6pl inkubowane ze wzrastającym stężeniem gemcytabiny wykazywały cechy charakterystyczne dla fenotypu mezenchymalnego [Shah i wsp., 2007]. Ponadto, po wykonaniu profilu ekspresji genów w komórkach opornych i wrażliwych na działanie gemcytabiny, 5-fluorouracylu czy cisplatyny, w przypadku komórek opornych obserwowano cechy charakterystyczne dla EMT [Arumugam i wsp., 2009]. Dodatkowo wykazano, że EMT

indukowana jest w warunkach niedotlenienia, które są również związane z lekoopornością nowotworów [Cannito i wsp., 2008] oraz występowaniem zależności pomiędzy EMT a nabyciem przez komórki nowotworowe właściwości macierzystych komórek nowotworowych [Shah i wsp., 2007].

2.1.3.5. Hipoksja

Mikrośrodowisko hipoksyjne jest cechą guzów litych, w których podaż tlenu jest zmniejszona lub całkowicie zniesiona. Większość guzów o średnicy przekraczającej 1mm³ posiada regiony niedotlenienia, powstałe na skutek nieuporządkowanej struktury naczyń krwionośnych i utrudnionej dyfuzji [Höckel i wsp., 2001]. Liczne badania potwierdziły, że guzy lite posiadające regiony niedotlenienia mają znacznie gorsze rokowania niż guzy prawidłowo utlenowane, niezależnie od zastosowanej metody leczenia [Höckel i wsp., 1993]. Przyczyną tego są zmiany genetyczne zachodzące w komórkach, które umożliwiają im przeżycie w warunkach niedoboru tlenu i skutkują nabyciem bardziej złośliwego fenotypu. Do szlaków biologicznych regulowanych przez geny aktywowane hipoksją, znajdujące się głównie pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego indukowanego hipoksją (HIF-1 α) zaliczyć można: apoptozę, cykl komórkowy, angiogenezę, glikolizę i regulację pH, a część z nich związana jest z nabyciem przez komórki lekooporności [Carmeliet i wsp., 1998, Maxwell i wsp., 1997].

Hipoksja w guzie trzustki po raz pierwszy została potwierdzona przez Koonga i współpracowników w 2000 roku, kiedy to dokonano pomiaru poziomu utlenowania wewnątrz guza trzustki podczas jego resekcji u siedmiu pacjentów. W obrębie guza pO₂ wahało się w granicach 0-5.3 mmHg, podczas, gdy w sąsiadującej, prawidłowej tkance trzustki mieściło się w granicach 24-92.7mm Hg [Koong i wsp., 2000]. Inni naukowcy potwierdzili aktywację HIF-1 α w raku trzustki, w odpowiedzi na niską podaż tlenu zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Zastosowanie selektywnego inhibitora HIF-1 α w połączeniu z radioterapią powodowało wzmożoną śmierć komórek nowotworowych trzustki [Duffy i wsp., 2003]. W linii komórkowej raka trzustki Capan-2 wstępnie zidentyfikowano trzy geny aktywowane *in vitro* w warunkach hipoksji: GPI/NLK/AMF (ang. *glucose phosphate isomerase/interleukin/autocrine motility factor*), DEC 1 (ang. *deleted in esophageal cancer 1*), i heksokinazę II. Obecnie trwają badania mające na celu wyjaśnienie roli tych genów w rozwoju i progresji raka trzustki [Duffy i wsp., 2003]. Hipoksja uważana jest za jedną z przyczyn oporności raka trzustki na gemcytabinę, co wynika m.in. z aktywacji NF-kB indukowanego niedotlenieniem. Ponadto, warunki niedotlenienia mogą indukować tranzycję epithelialno-mezenchymalną komórek raka trzustki związaną z inwazyjnością nowotworu, przerzutowaniem oraz powstawaniem nowotworowych komórek macierzystych [Salnikov i wsp., 2012]. Najnowsze badania wskazują, że w warunkach niedotlenienia dochodzi

również do wzrostu poziomu cytokin prozapalnych. Shi i inni wykazali, że komórki nowotworowe trzustki w których dochodziło do wzrostu ekspresji interleukiny-8 (IL-8) tworzyły większe guzy z odleglejszymi przerzutami w ortotopowym modelu mysim. Immunohistochemiczne analizy guzów wykazały, że do wzrostu ekspresji IL-8 dochodziło w pobliżu obszaru martwicy nowotworu, o kwaśnym pH i obniżonym poziomie tlenu dyfuzyjnego i składników odżywczych. Zahamowanie ekspresji IL-8 w wyniku zastosowania antysensownych oligonukleotydów powodowało zmniejszenie wzrostu guza i angiogenezy w warunkach *in vivo* [Shi i wsp., 1999]. W innych badaniach określono wpływ niedotlenienia guza na zdolność do przerzutowania i ekspansję raka trzustki. Wykazano obecność niedotlenienia nie tylko we wnętrzu guza, ale również jego wpływ na inwazyjność komórek położonych w peryferialnych częściach guza [Büchler i wsp., 2004].

2.1.3.6. Oporność wielolekowa

Zjawisko oporności wielolekowej (*ang. multidrug resistance, MDR*) jest głównym mechanizmem dzięki któremu komórki nowotworowe stają się niewrażliwe na stosowane chemoterapeutyki. Oporność na chemoterapię wynika m.in. z obecności w błonie komórek nowotworowych pomp, odpowiedzialnych za aktywny transport leków na zewnątrz, lub do wnętrza komórek, przez co m.in. lek, lub jego aktywny metabolit zbyt wcześnie usunięty z komórki nie wywiera zamierzonego efektu terapeutycznego. Białka transportowe z rodziny białek ABC (*ang. ATP-binding cassette transporters*), do których zaliczyć można: ABCB1 (białko oporności wielolekowej 1, MDR1), ABCC (białko oporności wielolekowej, MRP), ABCG2 (białko oporności lekowej w raku piersi, BCRP) uważane są za główne białka odpowiedzialne za chemooporność komórek nowotworowych [Cascorbi, 2006]. Część z tych pomp bierze udział w wydalaniu na zewnątrz komórki nowotworowej takich leków jak gemcytabina i 5-fluorouracyl, które od lat pozostają jednymi z podstawowych chemoterapeutyków stosowanych w leczeniu raka trzustki [Szakacs i wsp., 2006].

Białka transportowe ABC ulegające podwyższonej ekspresji w raku trzustki to m.in. MRP 1, 3, 4 oraz 5, a także BCRP. Wykazano znacznie wyższy poziom mRNA dla MRP5 (białko odpowiedzialne za oporność na 5-FU) w tkance nowotworowej trzustki w porównaniu z tkanką prawidłową [Konig i wsp., 2005]. Wewnątrz komórki 5-FU przekształcany jest do 5'-fluoro-2'-deoxyurydyny (5-FdUrd), która z kolei ulega fosforylacji z udziałem kinazy tymidynowej do monofosforanu 5'-fluoro-2'-deoxyurydyny (5-FdUMP), będącego jednym z aktywnych metabolitów 5-fluorouracylu. Badania w których zastosowano pęcherzyki błonowe wyizolowane z komórek transfekowanych genem *MRP5*, wykazały, że białko to, w sposób zależny od ATP transportuje 5-FdUMP na zewnątrz komórki, uniemożliwiając tym samym dostateczną ekspozycję komórek na chemoterapeutyk [Pratt i wsp., 2005]. Wyciszenie genu

MRP5 z zastosowaniem techniki siRNA przywracało wrażliwość komórek nowotworowych trzustki na 5-fluorouracyl [Hagmann i wsp., 2009]. Na chwilę obecną dostarczenie siRNA do docelowego organu jakim jest np. trzustka może przysparzać wiele trudności i tego typu leczenie jest jeszcze nierealne. Większy potencjał w odniesieniu do zastosowania klinicznego zdają się wykazywać małowcząsteczkowe inhibitory transporterów ABC. W ciągu ostatnich dziesięciu lat, ponad 70 % znanych inhibitorów ABC transporterów stanowiły związki pochodzenia naturalnego oraz ich syntetyczne pochodne [Shukla i wsp., 2008]. Jednym z przykładów związków fitochemicznych, będących silnymi inhibitorami kilku transporterów ABC (m.in. Pgp, MRP1 i BCRP) jest kurkumina [Anuchapreeda i wsp., 2002, Limtrakul i wsp., 2007]. Gemcytabina, oraz 5-fluorouracyl skojarzone w terapii z kurkumina wykazywały wyższą aktywność przeciwnowotworową zarówno na modelach *in vitro* jak i *in vivo* [Bisht i wsp., 2010, Kunnumakkara i wsp., 2007, Patel i wsp., 2008]. W innych badaniach nad opornością komórek nowotworowych trzustki na gemcytabinę i 5-FU wykazano, że: (I) po pierwsze, długotrwałe traktowanie komórek nowotworowych trzustki gemcytabiną, lub gemcytabiną skojarzoną z 5-fluorouracylem w dawkach stosowanych klinicznie wpływa na poziom ekspresji transporterów błonowych, (II) po drugie, nabyta odporność komórek nowotworowych na gemcytabinę związana jest z obniżoną lub zwiększoną ekspresją odpowiednich transporterów błonowych, w zależności od rodzaju komórek oraz (III) po trzecie, że MRP5 odpowiada za oporność komórek na gemcytabinę, co wykazano na modelach komórek nowotworowych z nadekspresją tego genu i po jego wyciszeniu. Komórki z nadekspresją MRP5 były bardziej odporne na gemcytabinę, podczas gdy wyciszenie genu skutkowało zwiększoną wrażliwością komórek na chemoterapeutyk [Hagmann i wsp., 2010].

2.1.3.7. Metabolizm w komórkach nowotworowych trzustki

Komórki nowotworowe mają zdolność do syntezy niezbędnej puli aktywnych biologicznie lipidów, niezależnie od szlaków regulujących ich syntezę w komórkach prawidłowych [DeBerardinis i wsp., 2008]. W szczególności mają zdolność do syntezy dużej ilości niezbędnych produktów pośrednich wykorzystywanych następnie do syntezy aktywnych biologicznie związków wspomagających proliferację komórek [Baenke i wsp., 2013] i zdolnych do generowania kwasów tłuszczowych, sfingolipidów, lizolipidów, fosfoinozytów błonowych oraz cholesterolu, w wyniku lipogenezy *de novo* (synteza lipidów z substratów nielipidowych) [Baenke i wsp., 2013, Medes i wsp., 1953]. Aktywność biologiczna tych związków, związana jest ze szlakami sygnalizacyjnymi zaangażowanymi w rozwój nowotworu i proces przerzutowania, tak więc przyczyny ich nietypowej syntezy w komórkach nowotworowych są przedmiotem wielu badań [Baenke i wsp., 2013]. Wiele cech

charakterystycznych dla komórek nowotworowych, takich jak: odmienny metabolizm glukozy, synteza kwasów tłuszczowych, czy glutaminoliza związane są z ich opornością na leczenie. Biorąc to pod uwagę, zmiany zachodzące w metabolizmie komórek nowotworowych można wykorzystać jako nowy cel terapeutyczny, poprzez zastosowanie np. kombinacji chemoterapeutyków z inhibitorami metabolizmu komórkowego, co może stanowić obiecującą strategię przewycięzania oporności wielu nowotworów, w tym raka trzustki, na leczenie.

W przypadku raka trzustki wykazano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją syntazy kwasów tłuszczowych (*ang. fatty acid synthase, FASN*), a opornością na chemo- i radioterapię [Yang i wsp., 2011]. FASN jest enzymem katalizującym syntezę kwasu palmitynowego, niezbędnego do syntezy fosfolipidów – lipidowych składników błon komórkowych. Ekspresja genu kodującego FASN w tkankach osób dorosłych jest bardzo niska, lub prawie niewykrywalna. Zwiększoną ekspresję enzymu obserwuje się natomiast w komórkach nowotworowych, a produkty metaboliczne kompleksu FASN bardzo szybko zużywane są przez proliferujące komórki nowotworowe, co potwierdza, że ekspresja FASN jest ważnym czynnikiem warunkującym wzrost i przeżycie komórek nowotworowych, a sama FASN określana jest mianem metabolicznego onkogenu [Flavin i wsp., 2010]. Wpływ nadekspresji FASN na oporność komórek nowotworowych trzustki potwierdzono wyciszając gen kodujący enzym techniką siRNA, lub stosując inhibitor enzymu – orlistat, czego efektem było przywrócenie wrażliwości komórek nowotworowych trzustki na gemcytabinę i radioterapię [Yang i wsp., 2011].

Kolejnym podejściem terapeutycznym mogącym mieć zastosowanie w leczeniu raka trzustki jest zmniejszenie puli lipidów komórkowych w wyniku działania chemoterapeutyków, czy nadekspresji enzymów odpowiedzialnych za ich metabolizm. Liczne badania wykazały, że lipidy są niezbędne do proliferacji komórek nowotworowych trzustki, co związane jest m.in. z mutacją w genie *K-RAS* [Barnes i wsp., 1980, Clerc i wsp., 1991, McKeehan i wsp., 1982]. Enzymami odpowiedzialnymi m.in. za metabolizm lipidów są UDP-glukuronylotransferazy (UGTs). UGTs są enzymami II fazy metabolizmu, przeprowadzającymi glukuronidację substratów, a co za tym idzie zwiększającymi ich polarność i umożliwiającymi wydalenie ich z organizmu [Guillemette i wsp., 2003]. UGTs metabolizują i detoksyfikują nie tylko ksenobiotyki i związki pochodzenia endogenne, ale przede wszystkim biorą udział w regulacji poziomu lipidów komórkowych odgrywających istotną rolę we wzroście i różnicowaniu się komórek nowotworowych [Burchell i wsp., 1995, Radomska-Pandya i wsp., 1999]. Określenie poziomu ekspresji enzymów metabolizujących lipidy w komórkach nowotworowych trzustki a następnie transfekcja komórek plazmidami z sekwencją *UGT*, których ekspresji nie stwierdzono w tych komórkach,

skutkowało zahamowaniem proliferacji komórek nowotworowych w wyniku zmniejszenia puli lipidów niezbędnych do ich prawidłowego wzrostu [Czernik i wsp., 2002].

2.1.3.8. Podsumowanie

Rak trzustki jest wyniszczającą chorobą charakteryzującą się agresywnym przebiegiem, wysoką inwazyjnością, szybką progresją i opornością na konwencjonalnie stosowane terapie. Rozwój nowych metod biologii molekularnej pozwolił lepiej poznać patogenezę choroby i wskazać kluczowe geny związane z jej rozwojem. Coraz więcej wiadomo również na temat molekularnych mechanizmów leżących u podstaw oporności raka trzustki na leczenie, a wiedza ta może pomóc w opracowywaniu nowych strategii zmierzających do pokonania zjawiska lekooporności. Obiecującymi regulatorami lekooporności w raku trzustki mogą okazać się mikroRNA, gdyż poprzez regulację ekspresji specyficznych miRNA możliwa byłaby selektywna i ukierunkowana eliminacja komórek o fenotypie EMT, czy nowotworowych komórek macierzystych. Wydaje się, iż konieczne jest prowadzenie dalszych badań podstawowych, poświęconych rozszerzeniu wiedzy na temat przyczyn lekooporności raka trzustki, jak i podejmowanie prób wykorzystania zdefiniowanych już obserwacji eksperymentalnych i klinicznych do wdrażania nowych terapii u chorych cierpiących na ten nowotwór.

2.2. Wybrane aspekty mechanizmów śmierci komórkowej indukowanych w wyniku działania chemoterapeutyków

Związki przeciwnowotworowe wykazują zróżnicowany mechanizm działania na poziomie molekularnym. Większość standardowo stosowanych chemoterapeutyków wywołuje śmierć komórek nowotworowych bezpośrednio uszkodzając ich DNA. Celem w poszukiwaniu i projektowaniu nowych chemoterapeutyków, jest ich wybiórcze działanie, skierowane przeciwko konkretnym procesom zachodzącym w komórce nowotworowej. Do tej pory opisano wiele mechanizmów śmierci komórkowej, a do najważniejszych można zaliczyć: apoptozę, nekrozę, katastrofę mitotyczną oraz autofagię. Obecnie coraz więcej wiadomo o wzajemnych zależnościach pomiędzy różnymi mechanizmami śmierci komórki. Wciąż trwają również badania mające na celu poszukiwanie nowych celów molekularnych dla chemoterapeutyków.

2.2.1. Autofagia i apoptoza- powiązanie dwóch procesów śmierci komórki

Apoptoza, zwana inaczej programowaną śmiercią komórki jest uporządkowanym, czynnym procesem, w wyniku którego komórka popełnia samobójstwo. Mechanizm apoptozy

jest bardzo skomplikowany i złożony. Proces ten wymaga nakładu energii i aktywacji wielu genów. Apoptoza może przebiegać w różny sposób, w zależności od rodzaju komórek i czynników ją indukujących. Dwie najlepiej poznane ścieżki apoptozy to szlak zewnętrzny-receptorowy, związany z błoną komórkową oraz wewnętrzny, przebiegający z udziałem mitochondriów [Igney i wsp., 2002]. Ponadto, wymienia się również szlak pseudoreceptorowy, zaobserwowany w cytotoksycznych limfocytach T i komórkach NK, angażujący perforyny i granzym B, szlak sfingomielinowo-ceramidowy oraz szlak indukowany stresem, związany z retikulum endoplazmatycznym. Wszystkie te szlaki łączą kaspazy, proteiny cysteinowe, które dzielą się na inicjatorowe i wykonawcze, w zależności od etapu apoptozy w którym biorą udział [Martinvalet i wsp., 2005].

Autofagia jest procesem samodegradacji komórki niezbędnym do zapewnienia równowagi energetycznej np. w warunkach niedoboru składników odżywczych. W procesie autofagii usuwane są również niepoprawnie pofalowane białka, agregaty białkowe, uszkodzone organelle, takie jak mitochondria, retikulum endoplazmatyczne, peroksosomy oraz wewnątrzkomórkowe patogeny. Z jednej strony autofagia jest mechanizmem umożliwiającym przeżycie komórki np. w warunkach stresowych, z drugiej strony zaburzona regulacja tego procesu może prowadzić do śmierci komórki. Autofagia może być zarówno selektywna jak i nieselektywna w usuwaniu specyficznych organeli, rybosomów i agregatów białkowych, jednak mechanizmy regulujące selektywność procesu autofagii nie zostały jak dotąd dokładnie wyjaśnione i zbadane [Glik i wsp., 2010].

Autofagia może chronić komórkę przed indukcją apoptozy. Na przykład, podwyższony poziom autofagii w komórkach nowotworowych, do którego dochodziło na skutek niedoboru składników odżywczych, promował ich przeżycie, co było związane z zahamowaniem apoptozy [Lum i wsp., 2005]. Mechanizm hamowania apoptozy przez autofagię nie jest do końca poznany. Jedną z przyczyn może być degradacja uszkodzonych mitochondriów, przez co nie dochodzi do uwolnienia cytochromu c i utworzenia funkcjonalnego apoptosomu w obrębie którego zachodzi autokatalityczna aktywacja kaspazy-9 [Ravikumar i wsp., 2006]. Badania innych autorów wskazują również, że autofagia może chronić komórkę przed śmiercią niezależną od kaspaz, do której dochodzi w wyniku zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej, określanej jako permeabilizacja zewnętrznej błony mitochondrium (*ang. mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP*). Co ciekawe, w tych samych badaniach wykazano również, że tak długo jak komórkom dostarczana jest energia (w tym przypadku w wyniku glikolizy), wykorzystują one autofagię jako mechanizm umożliwiający ich przeżycie nawet, gdy dojdzie do zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej i uwolnienia cytochromu c i innych białek apoptogennych [Collet i wsp., 2007]. Z drugiej strony, zamiast promować przeżycie komórki,

autofagia może promować jej śmierć i określana jest przez to jako programowana śmierć typu II [Gozuacik i wsp., 2004]. W odróżnieniu od apoptozy, która wymaga aktywacji kaspaz, autofagia jest procesem przebiegającym bez udziału tych enzymów proteolitycznych [Yu i wsp., 2004].

Komórki ulegające apoptozie i komórki ulegające autofagii wykazują różne zmiany morfologiczne. W przypadku apoptozy, zmiany morfologiczne w komórce są wynikiem działania kaspaz, które hydrolizują białka cytoszkieletu i inne białka strukturalne w wyniku czego dochodzi do uszkodzenia cytoszkieletu, lecz organella komórkowe pozostają nieuszkodzone aż do końcowego stadium procesu [Luthi i wsp., 2007]. Z kolei w procesie autofagii, dochodzi do nadmiernej akumulacji pęcherzyków autofagosomalnych, które następnie degradują organella komórkowe na wczesnym etapie procesu, podczas gdy cytoszkielet pozostaje funkcjonalny aż do końcowej fazy autofagii [Cuervo i wsp., 2004].

2.2.1.1. Regulacja procesu autofagii

Za regulację autofagii odpowiedzialne są geny z rodziny *Atg*. Do szlaków sygnalizacyjnych związanych z procesem autofagii zaliczyć można m.in.: szlak sygnałowy naskórkowego czynnika wzrostu, szlak PI3K-Akt, szlak sygnałowy kinaz MAP, szlak zależny od aktywacji kinazy AMP, szlak kontrolowany przez małe GTPazy i inne. Wiele z tych szlaków związanych jest ze szlakiem kinazy mTOR, będącej inhibitorem autofagii. Inhibitory kinazy mTOR, takie jak np. rapamycyna mogą więc indukować ten proces. Indukcja autofagii może zachodzić również bez udziału mTOR. Przykładem takiego induktora jest disacharyd-trehaloza [Sarkar i wsp., 2007].

Formowanie pęcherzyków autofagosomalnych regulowane jest przez Atg-1, Atg-9 oraz kompleks zawierający kinazę 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) klasy III (Vps34), Beklinę-1 oraz p150. Kinaza Vps34 jest zaangażowana w proces autofagii tylko wówczas, gdy występuje w kompleksie z Bekliną-1 i innymi białkami regulatorowymi. Interakcje te nasilają jej aktywność katalityczną i powodują zwiększone wytwarzanie fosfatydyloinozytolo trifosforanu (PIP3) - niezbędnego do elongacji fagoforu i przyłączenia do niego kolejnych białek Atg [Hoyer-Hansen i wsp. 2007]. Elongacja autofagosomu wymaga dwóch procesów koniugacji. Pierwszy z nich inicjuje formowanie wiązania izopeptydowego pomiędzy wewnętrzną lizyną Atg-5 a C-końcową glicyną Atg-12. W procesie tym pośredniczy Atg-7, który powoduje aktywację Atg-12. Atg-12 jest wówczas przenoszony na Atg10, co prowadzi do związania Atg-12 z Atg-5 [Glick i wsp., 2010]. Następnie, do powstałych kompleksów Atg-12-Atg-5 przyłącza się dimer Atg-16L, co prowadzi do powstania multimeru Atg-12-Atg-5-Atg-16L [Barth i wsp., 2010]. Drugi system koniugacji zostaje uruchomiony po przyłączeniu się fosfatydyloetanoloaminy (PE), przy alternatywnym udziale proteaz Atg-4, Atg-7 lub Atg-3

do białka LC3. Dochodzi wówczas do konwersji białka LC3 z cytoplazmatycznej formy LC3-I do formy lipofilowej LC3-II, która może być wbudowana do błon autofagosomu i autofagolizosomu. Ponieważ ekspresja LC3-II jest ściśle skorelowana z ilością autofagosomów, stąd też jest uważana za najbardziej wiarygodny marker aktywnych autofagosomów i autofagolizosomów [Yorimitsu i wsp., 2005]. LC-II pozostaje przyłączone do błony autofagosomu aż do fuzji z lizosomem, po której powstaje dojrzały autofagolizosom.

2.2.1.2. Regulacja procesu apoptozy

Zarówno zmiany morfologiczne, jak i w ostateczności śmierć komórek na drodze apoptozy są wynikiem działania kaspaz. Kaspazy można podzielić na te inicjujące proces apoptozy, jak kaspaza-2, -8, -9 i -10 oraz kaspazy wykonawcze procesu apoptozy, takie jak: kaspaza-3, -6 i -7. Scharakteryzowano różne szlaki aktywacji kaspaz [Adams, 2003]. Wiele czynników takich jak, uszkodzenie DNA, hipoksja, brak określonych czynników wzrostu, hormonów oraz cytokin, wzrost stężenia reaktywnych form tlenu, stres oksydacyjny, zaburzenie transportu elektrolitów, czy wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie może aktywować wewnętrzny szlak apoptozy, który prowadzi do zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej i uwolnienia cytochromu c i innych apoptogennych białek [Green i wsp., 2004]. MOMP jest regulowana przez białka z rodziny Bcl, które ze względu na ilość posiadanych domen BH3 można podzielić na trzy kategorie: białka antyapoptotyczne BH1234 (np. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), białka proapoptotyczne BH123 (np. Bax, Bak) oraz białka o pojedynczej domenie BH3 (np. Bid, Bim, Bad, Noxa i inne). Białka o pojedynczej domenie BH działają poprzez bezpośrednią aktywację białek BH123 lub inaktywację białek BH1234 [Hacker i wsp., 2007]. Uwolniony cytochrom c oddziałuje z białkiem Apaf-1, prokaspazą-9 oraz dATP formując apoptosom. Taki kompleks aktywuje kaspazę-9, która następnie aktywuje kaskadę kaspaz efektorowych. W tym samym czasie uwalniany z mitochondriom do cytoplazmy kompleks Smac/DIABLO wiąże białka antyapoptotyczne z rodziny IAPs uwalniając tym samym kaspazy, które ulegają wówczas aktywacji [Du i wsp., 2000].

Szlak zewnętrzny apoptozy obejmuje interakcję z udziałem błonowych receptorów śmierci należących do rodziny TNF [Ashkenazi i wsp., 1998]. Po związaniu do białka TNF ligandu i cytoplazmatycznego białka adaptorowego FADD (*ang. Fas-Associated Death Domain, FADD*) powstaje kompleks sygnału indukującego śmierć (*ang. death-inducing signal complex, DISC*), który aktywuje kaspazę-8. Kaspaza-8 z kolei może bezpośrednio aktywować kaspazę-3 lub może aktywować wewnętrzny szlak apoptozy poprzez oddziaływanie, a dokładnie cięcie białka Bid do formy tBid, która działa jako sygnał dla błony mitochondrialnej, czego konsekwencją jest uwolnienie cytochromu c [Luo i wsp., 1998].

Trzeci szlak apoptozy jest indukowany stresem i związany jest z retikulum endoplazmatycznym (*ang. endoplasmic reticulum, ER*) [Boyce i wsp., 2006]. Do indukcji szlaku dochodzi na skutek zaburzenia homeostazy związanej z nagromadzeniem się jonów wapnia i nieprawidłowych białek w ER. Zazwyczaj szlak indukowany stresem aktywuje również szlak mitochondrialny apoptozy.

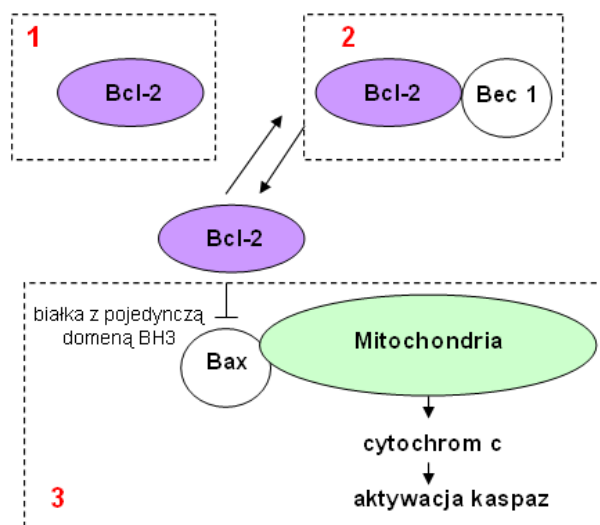
2.2.1.3. Zależność pomiędzy autofagią i apoptozą

Zależność pomiędzy autofagią i apoptozą od lat jest przedmiotem wielu badań. Oba procesy są przynajmniej częściowo regulowane przez wspólne szlaki. Na przykład białko p53, które jest induktorem apoptozy, oddziałując na poziom ekspresji jednego z genów docelowych DRAM, może w ten sposób indukować również autofagię [Crichton i wsp., 2006]. Podobnie, aktywacja ścieżki kinaz PI3K/Akt hamującej apoptozę, może również doprowadzić do zahamowania autofagii [Arico i wsp., 2001]. Ponadto, kluczowe białka regulujące proces apoptozy bądź autofagii, takie jak np. białka z rodziny Bcl, FADD, białka Atg w sposób bezpośredni oddziałują na obydwa procesy.

Beklina-1 jest elementem kompleksu kinazy PI3 typu III, który jest niezbędny do formowania pęcherzyków autofagosomalnych. Białka antyapoptotyczne, takie jak Bcl-2 i Bcl-xL oprócz tego, że oddziałują na białka proapoptotyczne Bax i Bak, hamując ich aktywację i zapobiegając uwolnieniu cytochromu c z mitochondriom, mogą oddziaływać również z domeną BH3 Bekliny-1 [Wei i wsp., 2008]. Oddziaływanie pomiędzy Bekliną-1 a białkami Bcl-2 oraz Bcl-xL regulowane jest stanem ich ufosforylowania. Beklina-1, pod wpływem działania kinazy DAPK-1 ulega fosforylacji na Thr 119, natomiast białko Bcl-2 fosforylowane jest przez kinazę JNK1 [Wei i wsp., 2008]. Fosforylacja prowadzi do rozłączenia się białek, indukując tym samym autofagię. Jednocześnie ufosforylowane białko Bcl-2 łączy się z proapoptotycznym białkiem Bax hamując apoptozę. Białko JNK1 może również powodować hiperfosforylację białka Bcl-2, które w takiej postaci odłącza się od białka Bax, co prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy. Ponadto, białko DAPK-1 uczestniczy również w etapie „pączkowania” błony komórkowej poprzez oddziaływanie ze składnikami cytoszkieletu w czasie apoptozy [Maiuri i wsp., 2007].

Białko Bcl-2 może hamować autofagię nie tylko w wyniku oddziaływania z Bekliną-1, ale również poprzez blokowanie uwalniania jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego. Uwolnione jony wapnia aktywują bowiem kinazy zależne od Ca^{2+} i kalmoduliny takie jak kinaza- β i kinaza aktywowana AMP, co z kolei hamuje szlak kinazy mTOR aktywując autofagię [Hoyer-Hansen i wsp., 2007]. W taki sposób białko Bcl-2 (także Bcl-xL) może hamować proces autofagii za pomocą dwóch różnych mechanizmów (rysunek 5).

Niewiadomo jak dotąd, czy oba mechanizmy działają równocześnie oraz który z nich odgrywa ważniejszą rolę.



Rysunek 5. Regulacja autofagii i apoptozy przez białka z rodziny Bcl-2. 1: hamowanie autofagii na skutek blokowania uwalniania jonów wapnia z ER. 2: hamowanie autofagii w wyniku interakcji z domeną BH3 Bcl-1. 3: hamowanie apoptozy w wyniku blokowania aktywacji białka Bax, MOMP i uwolnienia cytochromu c. Na podstawie [Thorburn, 2008].

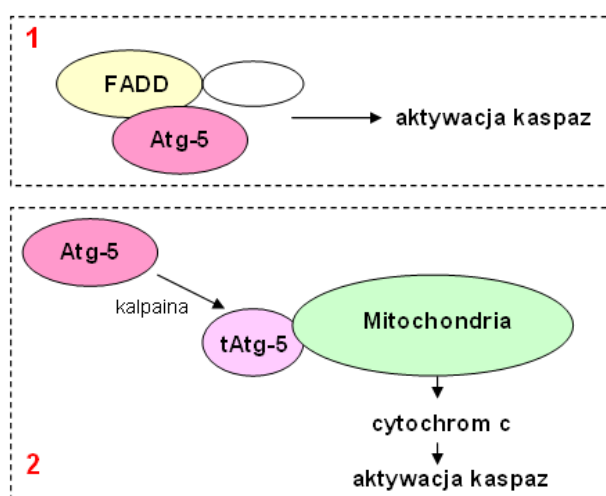
W pewnych warunkach poziom antyapoptotycznych białek Bcl-2 może modulować proces autofagii hamując ją bądź indukując. W komórkach, w których nie dochodzi do ekspresji białek proapoptotycznych takich jak np. Bax, czy Bak, wewnętrzny szlak apoptozy jest nieczynny. Wówczas, zwiększenie poziomu ekspresji białka Bcl-2 (oraz Bcl-xL) skutkuje śmiercią komórki w wyniku autofagii, podczas gdy wyciszenie ekspresji genu *Bcl-2* hamuje autofagię [Shimizu i wsp., 2004].

Autofagia podlega regulacji również przez inne białka szlaku apoptozy. FADD jest cytoplazmatycznym białkiem adaptorowym niezbędnym do utworzenia kompleksu sygnału indukującego śmierć - DISC, który z kolei aktywuje kaspazę-8. Białko FADD składa się z domeny śmierci i domeny efektorowej. Wykazano, że w prawidłowych komórkach epitelialnych, domena śmierci FADD może indukować śmierć komórek której towarzyszy wysoki poziom autofagii (rysunek 5). Ponieważ domena śmierci FADD nie posiada zdolności katalitycznej, do indukcji autofagii dochodzi prawdopodobnie w wyniku działania innego białka, aktywowanego przez FADD (uważa się, że tym białkiem może być Atg-5) [Thorburn i wsp., 2005].

Podobnie białko FLIP, które blokuje inicjację apoptozy na poziomie receptorów śmierci, kontroluje również proces autofagii. Poprzez domeny DED, białko FLIP rozpoznaje i przyłącza się do białka Atg-3, co w konsekwencji uniemożliwia koniugację białka Atg-3 z białkiem LC3 i blokuje autofagię na etapie tworzenia autofagosomu [Lee i wsp., 2010].

Istnieje również wiele mechanizmów regulacji apoptozy przez białka bezpośrednio związane z procesem autofagii.

W degradacji białek istotnych w procesie apoptozy biorą udział kaspazy. Kaspazy: 3, 7 i 8 hamując autofagię poprzez proteolizę i inaktywację Bekliny-1 oraz kinazy PI3K III, indukują apoptozę [Djavaheri-Mergny i wsp., 2010]. W wyniku przecięcia Bekliny 1 przez kaspazy powstają dwa produkty: N-końcowy (Beklina 1-N, aa 1-133) oraz C-końcowy (Beklina 1-C, aa 150-450), które tracą zdolność do indukcji autofagii. Analiza rozmieszczenia obu fragmentów w komórce wykazała, że fragment N-końcowy przemieszcza się z cytoplazmy do jądra, natomiast C-końcowy do mitochondrium, gdzie powoduje uwolnienie czynników proapoptotycznych, takich jak cytochrom c oraz białko HtrA2/Omi [Wirawan i wsp., 2010].



Rysunek 6. Regulacja apoptozy przez Atg-5. 1: aktywacja kaspaz na skutek oddziaływania białka Atg-5 z białkiem adaptorowym FADD, głównym elementem zewnętrznego szlaku apoptozy. 2: cięcie białka Atg-5 przez kalpainę powoduje transport białka do mitochondrium i aktywację MOMP, czego konsekwencją jest uwolnienie cytochromu c i aktywacja kaspaz [Thorburn, 2008].

Innym przykładem jest cięcie białka Atg-5, odgrywającego istotną rolę w formowaniu autofagosomu przez aktywowaną jonami wapnia kalpainę (rysunek 6). Pocięte białko Atg-5 ulega translokacji do mitochondrium, gdzie łączy się z białkiem Bcl-xL i uczestniczy w indukcji apoptozy przebiegającej z udziałem mitochondriów [Mizushima i wsp., 2007]. Mechanizm ten jest złożony. Z jednej strony, wyciszenie ekspresji genu *Atg-5* może chronić komórki nowotworowe przed różnymi czynnikami indukującymi apoptozę, z drugiej zaś nadekspresja *Atg-5* może uwrażliwiać komórki na indukcję apoptozy. Ponadto, kalpaina może zarówno hamować lub indukować autofagię. W wyniku cięcia Atg-5 przez kalpainę powstaje białko niezdolne do indukcji autofagii [Yousefi i wsp., 2006]. Inne badania pokazują z kolei, że aktywność kalpainty jest niezbędna do indukcji autofagii w wyniku działania rapamycyny, czy niedoboru składników odżywczych [Demarchi i wsp., 2006].

2.2.1.4. Autofagia, apoptoza i gospodarka lipidowa

Autofagia i apoptoza powiązane są również z gospodarką lipidową komórki. Zbalansowana gospodarka lipidowa jest niezwykle istotna dla prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek. Zaburzenia homeostazy lipidowej w wyniku nagromadzenia się wewnątrz komórki kwasów tłuszczowych może prowadzić do apoptozy [Singh i wsp., 2012]. Ponadto niektóre związki przeciwnowotworowe mogą hamować proces autofagii, prowadząc tym samym do zmniejszenia puli lipidów komórkowych lub działać bezpośrednio na poziom lipidów w komórce zaburzając jej homeostazę. Stosunkowo niedawno odkrytym zjawiskiem towarzyszącym autofagii jest mobilizacja wewnątrzkomórkowych lipidów na drodze lipolizy.

2.2.1.5. Krople lipidowe

Krople lipidowe (*ang. lipid droplets, LD*) są sferycznymi organellami występującymi głównie w tkance tłuszczowej w której komórkach, jedna duża kropla (o średnicy ok. 100 μm) zajmuje niemal całą powierzchnię cytoplazmy. Obecność kropli tłuszczowych stwierdzono również w innych komórkach a ich rozmiary wahają się w granicach od 0,1 do 10 μm . Powierzchnię dojrzałych kropli lipidowych stanowi pojedyncza warstwa fosfolipidowa z hydrofobowymi ogonami skierowanymi do wnętrza kropli. W skład fosfolipidów budujących błonę wchodzi: fosfatydylocholina, fosfatydyloetyloamina i fosfatydyloinozytol. Z kolei wewnątrz kropli stanowią neutralne estry lipidów, głównie estry cholesterolu i triglicerydy [Lass i wsp., 2011]. LD wywodzą się z retikulum endoplazmatycznego i są ściśle związane z tym organellum. ER odpowiada za konwertowanie nadmiaru steroli do ich estrów przez sprzężanie z tłuszczowym acylo-CoA wytworzonym przez wcześniejszą reakcję kwasów tłuszczowych z acylo-CoA. Istnieje parę hipotez powstawania kropli tłuszczowych. Według głównej hipotezy krople tłuszczowe powstają na drodze pączkowania z retikulum endoplazmatycznego. Powstające w ER diacyloglicerole i estry steroli gromadzą się w skupiska w pobliżu błony a wraz ze wzrostem ich liczby dochodzi do obniżenia napięcia powierzchniowego błony i oddzielenia pęcherzyka od błony retikulum [Thiam i wsp., 2013].

Do niedawna LD traktowane były jako bierne organelle komórkowe magazynujące tłuszcze, wykorzystywane następnie do tworzenia błon biologicznych, syntezy hormonów steroidowych oraz jako źródło energii. Dzięki licznym badaniom wykazano, że z kroplami tłuszczowymi związanymi jest wiele białek zaangażowanych w gromadzenie, stabilizację i uwalnianie tłuszczów z kropli lipidowych. Ponadto, zaobserwowano że LD wchodzi w interakcję z innymi organellami oraz są zdolne do przemieszczania się w komórce przy udziale elementów cytoszkieletu.

2.2.1.6. Lipofagia

Do mobilizacji LD i rozkładu triglicerydów dochodzi na drodze lipolizy [Lass i wsp., 2011]. Szlaki lipolizy i autofagii wykazują szereg podobieństw. Obydwa z nich są kluczowymi szlakami katabolicznymi, aktywowanymi w odpowiedzi na niedobór składników odżywczych. Znajdują się pod kontrolą tych samych hormonów, czyli są hamowane insuliną lub aktywowane glukagonem. Wewnątrzkomórkowe lipidy jak do tej pory nie były rozważane jako substraty dla procesu autofagii, ale podobieństwa między lipolizą a autofagią wskazują na istnienie zależności pomiędzy tymi dwoma szlakami. Niedawno wykazano, że w wyniku autofagii dochodzi do uwolnienia lipidów z LD a proces ten nazwano lipofagią [Singh i wsp., 2011]. Po raz pierwszy lipofagię opisano w komórkach wątroby, które poza komórkami tłuszczowymi posiadają największą ilość wewnątrzkomórkowych lipidów. Farmakologiczne zahamowanie autofagii, przy użyciu 3-metyloadeniny lub wyciszenie genu *Atg-5*, kluczowego dla tego procesu, powodowało znaczne zwiększenie poziomu triglicerydów i cholesterolu w hepatocytach. Nagromadzeniu lipidów towarzyszył wzrost LD. Wzrost poziomu LD, przy braku bodźców lipogennych, wskazywał na rolę procesu autofagii w kontroli poziomu lipidów. Zahamowanie autofagii nie wpływało na syntezę triglicerydów, hamowało lipolizę i β -oksydację wolnych kwasów tłuszczowych. Ostatecznym dowodem na rolę autofagii w metabolizmie lipidów wątrobowych były eksperymenty przeprowadzone na myszach. W komórkach wątrobowych myszy przeprowadzono wyciszenie genu *Atg-7*, kluczowego dla procesu autofagii. Następstwem wyciszenia genu *Atg-7* było powiększenie wątroby, częściowo spowodowane znacznym wzrostem poziomu triglicerydów i cholesterolu. Wyniki te wskazują, że upośledzenie przebiegu autofagii lub brak lipofagii może leżeć u podstaw np. licznych chorób wątroby [Singh i wsp., 2009].

W niektórych typach komórek, np. leukocytach czy komórkach nowotworowych liczba kropli lipidowych może gwałtownie wzrastać, pomimo iż komórki te nie są zaangażowane w magazynowanie tłuszczów. W komórkach nowotworowych wykazano również powiązanie apoptozy z poziomem lipidów wewnątrzkomórkowych. Indukcja apoptozy może powodować wzrost poziomu LD. Im późniejsze jest stadium apoptozy, tym większe są rozmiary formujących się LD. Może to wynikać z rozpadu organelli takich jak retikulum endoplazmatyczne, mitochondria, czy z degradacji błon komórkowych podczas procesu apoptozy, czego konsekwencją jest nagromadzenie się uwolnionych triglicerydów w kroplach tłuszczowych [Singh i wsp., 2009].

2.3. Enzymy metabolizujące chemoterapeutyki a śmierć komórki

Dokładne przewidywanie losów leku w organizmie w zależności od jego właściwości chemicznych i fizycznych oraz cech fizjologicznych i patologicznych danego pacjenta jest

wciąż jedynie pożądaną, daleką od zastosowania w rutynowej praktyce klinicznej wizją. Zrozumienie czynników odpowiedzialnych za farmakokinetyczne i farmakodynamiczne różnice międzypersonne wciąż pozostaje wyzwaniem, szczególnie w przypadku leków o niskim indeksie terapeutycznym.

Większość enzymów metabolizujących ksenobiotyki zlokalizowana jest w wątrobie, jednakże ekspresję mRNA różnych izoenzymów cytochromu P450 i UDP-glukuronylotransferaz (UGT) scharakteryzowano również w innych tkankach, takich jak: piersi, płuc, mózgu, jelita oraz trzustki [Nishimura i wsp., 2006]. Ponadto, wykazano występowanie istotnych różnic w metabolizmie chemioterapeutyków pomiędzy tkanką prawidłową, a zmienioną nowotworowo [Standop i wsp., 2003]. W wielu typach nowotworów dochodzi do obniżenia ekspresji enzymów metabolizujących leki w porównaniu z tkanką zdrową. Jeżeli obniżeniu ulega ekspresja enzymów fazy I, to konsekwencją jest np. brak aktywacji proleków i brak efektu terapeutycznego. Z kolei obniżenie ekspresji enzymów II fazy skutkuje przedłużonym efektem toksycznym w wyniku zbyt długiego przebywania w organizmie aktywnego związku, który nie ulega detoksyfikacji. Poziom ekspresji wybranych enzymów nie zależy jedynie od polimorfizmu genów kodujących te enzymy, ale również od czynników zewnętrznych takich jak: ekspozycja na leki i interakcje lek-lek (dany lek moduluje ekspresję enzymu metabolizującego inny lek), zanieczyszczenia środowiska, czy inne środki chemiczne. W literaturze można znaleźć również doniesienia na temat wpływu ograniczonego dostępu tlenu (hipoksji) na ekspresję wybranych enzymów I i II fazy metabolizmu oraz białek transporterowych. Wykazano, że w komórkach linii HepaRG, wyprowadzonej z ludzkiego nowotworu wątroby dochodziło do zmiany poziomu ekspresji wybranych enzymów odpowiedzialnych za I fazę metabolizmu: CYP3A4, CYP1A2, CYP2E1, CYP2C9, II fazę metabolizmu: GSTA1/2, GSTM1, UGT1A1, SULT2A1, oraz transporterów białkowych: MDR1, MRP3 [Legendre i wsp., 2009]. Zmiany w poziomie ekspresji zaobserwowano również dla receptorów: PXR i CAR. Ponadto wykazano, że za obniżoną ekspresję enzymu CYP3A4 w hipoksji odpowiada podwyższony poziom czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α [Legendre i wsp., 2009].

2.3.1. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji enzymu a śmiercią komórki

Liczne badania wskazują, że zmiana ekspresji genów cytochromów P450 ma wpływ na odpowiedź biologiczną indukowaną w komórkach nowotworowych przez ksenobiotyki, w tym leki przeciwnowotworowe. Wyniki badań dotyczą głównie wpływu nadekspresji genów na apoptozę, przy czym wykazano, że nadekspresja cytochromów P450 może zarówno hamować jak i wzmacniać efekt apoptozy indukowany przez te związki. Wykazano na przykład, że hamowanie aktywności cytochromu P450 przez proadifen wywoływało m.in.

wyższą przeżywalność komórek białaczki mieloblastycznej HL-60 i chroniło je przed apoptozą indukowaną przez kwas *all-trans* retinoidowy [Hofmanova i wsp., 2000]. Wykazano również, że indukcja CYP1A1 przez 4-chlorobifenyl w komórkach nowotworu piersi MCF-7, silnie wzmacniała efekt apoptozy hamowany przez estradiol10 [Chung i wsp., 2007]. Również aktywacja CYP1A1 w komórkach Hepa1c1c7 wzmacniała efekt apoptozy indukowanej przez kancerogeny benzo[α]piren13 [Moore i wsp., 1993].

2.3.2. Cytochromy P450 jako cel w terapii przeciwnowotworowej

Głównym celem w projektowaniu leków przeciwnowotworowych jest ich selektywne działanie na komórki nowotworowe. Ponieważ wykazano, że poziom ekspresji enzymów P450 jest znacznie wyższy w tkance zmienionej nowotworowo, w porównaniu do otaczających ją prawidłowych tkanek, można wykorzystać tą cechę nowotworu stosując proleki ulegające aktywacji jedynie w komórkach nowotworowych, co znacznie zmniejszyłoby występowanie niekorzystnych efektów ubocznych towarzyszących chemoterapii [Riddick i wsp., 2005]. W związku z tym dostępne są nowe strategie terapeutyczne polegające na zwiększeniu ekspresji enzymów CYP w komórkach. Jeżeli chodzi o endogenną nadekspresję wybranych enzymów CYP w komórkach nowotworowych, najlepiej zbadanym przykładem jest izoenzym CYP1B1. mRNA CYP1B1 jak i ekspresję białka tego enzymu stwierdzono w komórkach wielu typów nowotworów złośliwych [Gibson i wsp., 2003; McFadyen i wsp., 2001]. Enzymy CYP1A, CYP2C czy CYP3A również wykazują zwiększoną ekspresję w niektórych rodzajach komórek nowotworowych, lecz w porównaniu do CYP1B1, ulegają znacznej ekspresji również w normalnych tkankach, głównie w wątrobie. Obecnie w badaniach przedklinicznych znajduje się kilka związków aktywowanych przez CYP1B1, takich jak np. reserwatrol [Potter i wsp., 2002]. Ponadto w II fazie badań klinicznych znajduje się szczepionka CYP1B1 (Zyc300) mająca na celu zniszczenie komórek nowotworowych poprzez indukcję limfocytów T [Gibson i wsp., 2003]. Podobne strategie zastosowano z udziałem innych enzymów P450, specyficznych dla tkanki nowotworowej, takich jak: CYP2W1, CYP2J2 i CYP4Z1, po zidentyfikowaniu odpowiedniego dla nich proleku. Wciąż do wyjaśnienia pozostaje jednak polimorfizm tych genów w odniesieniu do sukcesu terapii opartej o cytochromy P450.

Drugim podejściem terapeutycznym wykorzystującym różnice w ekspresji genów P450 pomiędzy tkanką prawidłową a zmienioną nowotworowo jest terapia genowa, w której egzogenny gen P450 byłby wprowadzony do nowotworu metodami inżynierii genetycznej razem z prolekiem. Przykładem są cyklofosfamidy, które do pełnej aktywności wymagają transformacji metabolicznej, głównie przez enzym CYP2B6. Nadekspresja enzymu CYP2B6 skutkowałą uwrażliwieniem komórek nowotworowych różnych rodzajów w warunkach *in vitro*

na cyklofosamid. Podobne wyniki uzyskano po transfekcji komórek glejomięsaka IL9 plazmidami z sekwencją CYP2B6, CYP2B1 oraz reduktazą cytochromu P450 (CPR). Nadekspresja enzymów powodowała zwiększenie aktywności cytotoksycznej związków przeciwnowotworowych zarówno w hodowli *in vitro* jak i na ksenoprzeszczepach tych komórek na „nagie” myszy [*Huang i wsp., 2000, Roy i wsp., 2006*].

3. Założenia, cel i zakres pracy

Niniejsza rozprawa doktorska stanowi kontynuację badań prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej nad mechanizmem działania związków przeciwnowotworowych. We wstępnych badaniach przesiewowych aktywności cytotoksycznej pochodnych imidazoakrydonu, triazoloakrydonu i pochodnych 1-nitroakrydiny, pochodna 1-nitroakrydiny o symbolu C-1748 wykazała wysoką aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek czterech linii raka trzustki. Ponieważ rak trzustki zaliczany jest do najbardziej złośliwych i opornych na leczenie nowotworów, badania nad mechanizmem działania pochodnej C-1748 w stosunku do tychże komórek były w pełni uzasadnione.

Złe rokowania pacjentów cierpiących na raka trzustki oraz niepokojące dane statystyczne wskazujące na wysoką śmiertelność i krótki czas przeżycia pacjentów z tym schorzeniem wynikają z wielu czynników. Należą do nich między innymi: brak skutecznych metod diagnostycznych, brak specyficznych objawów rozwoju choroby, aż do momentu pojawienia się przerzutów, czy brak skutecznych terapii zwalczających nowotwór [Nitsche i wsp., 2011]. Ponadto, pomimo bardzo dobrego poznania podłoża molekularnego rozwoju nowotworu oraz mechanizmów śmierci komórkowej indukowanej w wyniku działania chemoterapeutyków takich jak gemcytabina, czy 5-fluorouracyl, ich skuteczność jest ograniczona ze względu na nabywanie lekooporności przez komórki nowotworowe trzustki. Oporność komórek nowotworowych trzustki wynika w głównej mierze z niezdolności chemoterapeutyków do indukcji apoptozy. Badania wielu autorów wskazały na możliwe przyczyny tej oporności, m.in. odmienną ekspresję genów regulujących apoptozę [Donghui i wsp., 2004, Strimpakos i wsp., 2008].

Z danych literaturowych jak i wyników badań przeprowadzonych w naszym zespole wynika, że istnieje szereg powiązań między szlakami przemian metabolicznych chemoterapeutyków a zmianami w cyklu życiowym i indukcją śmierci komórkowej wywołanymi przez te związki [Gut i wsp., 2000, Hołownia i wsp., 2003, Pawłowska, 2014, Schmidt i wsp., 2004]. Podwyższona ekspresja izoenzymów cytochromu P450 oraz innych enzymów metabolizujących dany związek w komórkach nim traktowanych może wpływać na jej funkcjonowanie w różny sposób. Po pierwsze, przyspieszając metabolizm związku katalizowany przez ten enzym. Po drugie, indukując wzrost stężenia innych białek, w tym białek regulatorowych w komórce. Po trzecie, indukując zmiany w szlakach metabolicznych związków endogennych. W przypadku związków, które do pełnej aktywności biologicznej wymagają enzymatycznej biotransformacji, wyższy poziom enzymów gwarantuje powstawanie większej ilości aktywnych metabolitów, co zwiększa również cytotoksyczność

związków. Wzrost aktywności cytotoksycznej i przeciwnowotworowej chemoterapeutyków w warunkach podwyższonej ekspresji enzymów P450 obserwowany był między innymi dla cyklofosfamidu, gdzie nadekspresja CYP2B1 i CYP3A4 zwiększała cytotoksyczne działanie leku [Gut i wsp., 2000]. Podobny efekt obserwowano również dla tamoksifenu będącego substratem dla CYP3A4 [Hołownia i wsp., 2003], czy ifosfamidu metabolizowanego przez CYP3A4, CYP2C9 i CYP2B6 [Schmidt i wsp., 2004].

Wyniki badań przeprowadzonych dotychczas w naszym zespole wskazują, że pochodną C-1748 również zaliczyć można do proleków, gdyż do pełnej aktywności wymaga transformacji metabolicznej [Wiśniewska, 2008]. W związku z tym założyłam, że podwyższony poziom ekspresji enzymów metabolizujących pochodną C-1748 w komórkach nowotworowych trzustki opornych na działanie związku może wpłynąć na wyższą wrażliwość komórek, będącą rezultatem powstawania większej ilości aktywnych metabolitów, w porównaniu do komórek w których poziom ekspresji tych enzymów jest niski.

Podsumowując, wobec powyższego, prowadzone przeze mnie badania zmierzały w dwóch kierunkach:

- I. Określenie w warunkach *in vitro* aktywności cytotoksycznej oraz typu odpowiedzi biologicznej indukowanej przez pochodną 1-nitroakrydyny, C-1748 w komórkach czterech linii raka trzustki pochodzenia ludzkiego: Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 oraz AsPC-1.**
- II. Określenie wpływu nadekspresji wybranych enzymów I fazy metabolizmu ksenobiotyków w komórkach nowotworowych trzustki (które wykazały najwyższą oporność na działanie C-1748), na końcową odpowiedź biologiczną indukowaną w tychże komórkach przez związek.**

Dla osiągnięcia postawionych przeze mnie celów zrealizowałam następujące zadania badawcze:

I PIERWSZY KIERUNEK BADAŃ:

- określenie aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 w stosunku do komórek czterech linii raka trzustki,
- zbadanie wpływu pochodnej C-1748 na przebieg cyklu życiowego komórek czterech linii raka trzustki w oparciu o określenie zawartości DNA w poszczególnych komórkach metodą cytometrii przepływowej,

- zbadanie zdolności wybranej pochodnej do indukcji apoptozy w komórkach czterech badanych linii raka trzustki za pomocą:
 - ✓ obserwacji zmian w morfologii jąder komórkowych z zastosowaniem barwnika DAPI umożliwiającego ocenę stopnia kondensacji i pofragmentowania jądra oraz tworzenie ciałek apoptotycznych,
 - ✓ określenia ilości komórek z aktywną kaspazą-3 będącą kaspazą wykonawczą procesu apoptozy,
 - ✓ określenia metodą cytometrii przepływowej fragmentacji substratu dla kaspazy-3: białka PARP,
 - ✓ oznaczania zmian zachodzących w budowie błony cytoplazmatycznej z użyciem wyznakowanej fluorescencyjnie Aneksyny V,
- zbadanie zdolności pochodnej C-1748 do indukcji przyspieszonego starzenia komórkowego w komórkach raka trzustki,
- określenie zdolności pochodnej C-1748 do aktywacji lub zahamowania autofagii w komórkach czterech badanych linii raka trzustki,
- określenie wpływu pochodnej C-1748 na przebieg procesu autofagii w badanych komórkach nowotworowych, w obecności inhibitorów autofagii: wortmaniny i chlorochiny:
 - ✓ określenie aktywności cytotoksycznej C-1748 wobec komórek nowotworowych trzustki w obecności inhibitorów autofagii,
 - ✓ zbadanie wpływu kombinacji związku i inhibitorów autofagii na zmiany w morfologii jąder komórkowych,
 - ✓ zbadanie wpływu kombinacji związków na zmiany potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej,
 - ✓ zbadanie wpływu pochodnej C-1748 w połączeniu z inhibitorami autofagii na indukcję apoptozy, potwierdzoną obecnością kaspazy-3 i pociętego substratu dla kaspaz: PARP,
 - ✓ zbadanie wpływu kombinacji związku z inhibitorem autofagii na homeostazę lipidów w komórkach nowotworowych trzustki,
 - ✓ zbadanie wpływu kombinacji związków na poziom białka Bcl-2 w komórkach badanych raków trzustki.

II DRUGI KIERUNEK BADAŃ:

- zbadanie metodą western blotting poziomu ekspresji wybranych enzymów cytochromu P450 w komórkach czterech linii raka trzustki,

- dokonanie nadekspresji wybranych enzymów kluczowych dla transformacji metabolicznej pochodnej C-1748 w komórkach nowotworowych trzustki, które wykazały najwyższą oporność na działanie tego związku,
- zbadanie wpływu nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4 w komórkach AsPC-1 na odpowiedź biologiczną indukowaną przez pochodną C-1748:
 - ✓ określenie aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 w komórkach z nadekspresją enzymów CPR i CYP3A4,
 - ✓ zbadanie przemian metabolicznych pochodnej C-1748 w komórkach z nadekspresją enzymów CPR i CYP3A4,
 - ✓ określenie wpływu nadekspresji enzymów na indukowaną przez związek apoptozę (zbadanie aktywności kaspazy-3, ocena morfologii jąder komórkowych, zmian potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej).

4. Wyniki

CZĘŚĆ I. Badanie aktywności cytotoksycznej i mechanizmu działania pochodnej C-1748 w stosunku do komórek czterech linii raka trzustki

Pochodna 1-nitroakrydyny, C-1748 jako jedyna z dotychczas zsyntetyzowanych w naszym zespole, najbardziej aktywnych pochodnych 1-nitroakrydyny, triazoloakrydonu oraz imidazoakrydonu, we wstępnych badaniach aktywności cytotoksycznej wykazała wysoką aktywność w stosunku do komórek różnych linii raka trzustki pochodzenia ludzkiego. Biorąc pod uwagę, że rak trzustki jest najbardziej złośliwym nowotworem litym o najgorszych rokowaniach, w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej podjęłam szerokie badania mające na celu określenie mechanizmu działania związku w stosunku do komórek wybranych linii raka trzustki. Badania prowadziłam na komórkach czterech linii: Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 oraz AsPC-1, różniących się między sobą m.in. statusem genów najczęściej zmutowanych w przypadku tego nowotworu, zdolnością do przerzutowania oraz wrażliwością na standardowo stosowaną w leczeniu raka trzustki gemcytabinę.

4.1. Oznaczenie aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 wobec komórek czterech linii raka trzustki

Badanie aktywności cytotoksycznej chemoterapeutyków jest pierwszym etapem pozwalającym ocenić wrażliwość komórek na działanie związku. Badanie aktywności biologicznej pochodnej C-1748 wobec komórek linii Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 i AsPC-1 miało na celu wyznaczenie efektywnego stężenia związku stosowanego w dalszych badaniach. Aktywność cytotoksyczną C-1748 określiłam na podstawie metodyki zawartej w pkt. 6.3.2, z użyciem anionowego barwnika - sulforodaminy B, który wiąże się z podstawowymi aminokwasami białek komórkowych.

W celu określenia aktywności cytotoksycznej związku, wyznaczyłam wartości IC_{50} i IC_{80} , odpowiadające stężeniu pochodnej, przy którym dochodzi do zahamowania proliferacji komórek odpowiednio w 50 % i 80 % w stosunku do komórek nietraktowanych związkiem (kontrolnych). Wartości parametrów IC_{50} i IC_{80} , będące podstawą do oceny aktywności cytotoksycznej badanego związku, stanowią średnią z trzech niezależnych eksperymentów i zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Zestawienie uzyskanych wyników efektywnych stężeń biologicznych związku C-1748 w odniesieniu do komórek czterech badanych linii raka trzustki.

	Linie komórkowe			
	Panc-1	MiaPaCa-2	BxPC-3	AsPC-1
IC ₅₀ [μM]	0,017 ± 0,003	0,015 ± 0,002	0,017 ± 0,005	0,075 ± 0,004
IC ₈₀ [μM]	0,063 ± 0,005	0,037 ± 0,003	0,044 ± 0,004	0,212 ± 0,003

Uzyskane przeze mnie wyniki, pokazują, że pochodna C-1748 cechuje się wysoką aktywnością cytotoksyczną w stosunku do komórek wszystkich czterech badanych linii raka trzustki.

Przebieg krzywych zależności zahamowania wzrostu od stężenia pochodnej C-1748 dla komórek: Panc-1, MiaPaCa-2 i BxPC-3 jest bardzo zbliżony, co ma swoje odzwierciedlenie również w uzyskanych wartościach stężeń hamujących proliferację komórek w 50 % i 80 %. Wynosiły one odpowiednio: 0,017 i 0,063 μM dla komórek linii Panc-1, 0,015 i 0,037 μM dla komórek linii MiaPaCa-2 oraz 0,017 i 0,044 μM dla komórek linii BxPC-3. Największą wrażliwość na działanie związku wykazały komórki linii MiaPaCa-2 z najniższą wartością IC₈₀. Z kolei, komórki linii AsPC-1 wykazały najniższą wrażliwość na badany związek, a stężenia pochodnej C-1748 odpowiadające wartości IC₅₀ i IC₈₀ w przypadku tych komórek wynosiły odpowiednio 0,075 μM oraz 0,212 μM.

Dodatkowo, w przypadku komórek linii Panc-1 i AsPC-1 pochodna C-1748 wykazała podobną lub nawet wyższą aktywność cytotoksyczną niż standardowo stosowana w leczeniu raka trzustki gemcytabina. Stężenia hamujące proliferację komórek Panc-1 w 50 % wynosiły odpowiednio 0,017 μM dla pochodnej C-1748 oraz 0,021 μM dla gemcytabiny. Dla komórek AsPC-1 stężenie C-1748 odpowiadające wartości IC₅₀ wynosiło z kolei 0,075 μM, natomiast dla gemcytabiny 0,087 μM. Ponadto, w przypadku komórek wszystkich czterech badanych linii pochodna C-1748 była bardziej aktywna cytotoksycznie niż inny lek stosowany w terapii skojarzonej raka trzustki- erlotinib (tabela 3).

Tabela 3. Aktywność cytotoksyczna gemcytabiny i erlotinibu w stosunku do komórek wybranych linii raka trzustki uzyskana przy użyciu testu z SRB. Na podstawie: [Ioannou i wsp., 2011].

Linia komórkowa	Stężenie odpowiadające IC ₅₀ [μM]	
	Gemcytabina	Erlotinib
Panc-1	0,0214	>20
MiaPaCa-2	0,0064	>20
BxPC-3	0,0074	1,26
AsPC-1	0,0873	5,80

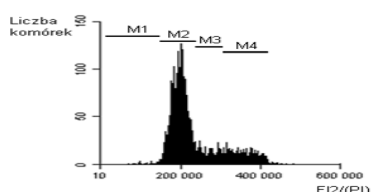
4.2. Analiza dystrybucji komórek raka trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748 w cyklu życiowym

Kolejnym etapem moich badań było określenie wpływu pochodnej C-1748 na dystrybucję komórek czterech linii raka trzustki w cyklu życiowym.

Z danych literaturowych wynika, że celem molekularnym dla wielu chemoterapeutyków przeciwnowotworowych jest DNA. Związki te mogą powodować uszkodzenia materiału genetycznego, co niekorzystnie odbija się na procesach zachodzących w komórce, m.in. na cyklu życiowym [Hurley, 2002]. Pod wpływem licznych uszkodzeń DNA może dojść do zahamowania cyklu komórkowego w jednym z punktów kontrolnych (G1/S, replikacji DNA w fazie S, G2/M, wrzeciona podziałowego w czasie mitozy) i uruchomienia mechanizmów naprawczych. Jeżeli mechanizmy naprawcze okażą się nieskuteczne, w komórkach zostaną zainicjowane procesy prowadzące do ich śmierci. Większość związków przeciwnowotworowych, które tworzą międzylańcuchowe wiązania sieciujące DNA oddziałują w zbliżony sposób na przebieg cyklu życiowego komórek nowotworowych, tzn. w niskich stężeniach powodują zahamowanie wzrostu komórek w fazie G2/M, natomiast przy wyższych dawkach w fazie S.

Komórki mogą ulegać apoptozie z różnych faz cyklu życiowego, np. gdy apoptoza dotyczy komórek znajdujących się w fazie S lub G2/M cyklu, szczyt piku „sub-G1” może nie oddzielać się od G1, lecz wręcz na niego nakładać. Ponadto, frakcja sub-G1, uznawana jako frakcja zawierająca komórki apoptotyczne, może reprezentować również komórki uszkodzone mechanicznie, o mniejszej zawartości DNA, lub o odmiennej strukturze chromatyny mające zmniejszoną dostępność DNA dla fluorochromów. Tak więc, zaliczenie komórek we frakcji sub-G1 do komórek apoptotycznych tylko na podstawie zmniejszonej ilości DNA nie jest wystarczającym kryterium i wymaga potwierdzenia dodatkowymi metodami.

Obserwacji zmian w dystrybucji komórek badanych linii raka trzustki w cyklu życiowym do których dochodziło pod wpływem działania pochodnej C-1748, dokonałam korzystając z metody cytometrycznej i wykorzystując intensywność fluorescencji jodku propidyny, która bezpośrednio związana jest z ilością DNA. Badania przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.4. Uzyskane wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych eksperymentów.



Legenda:

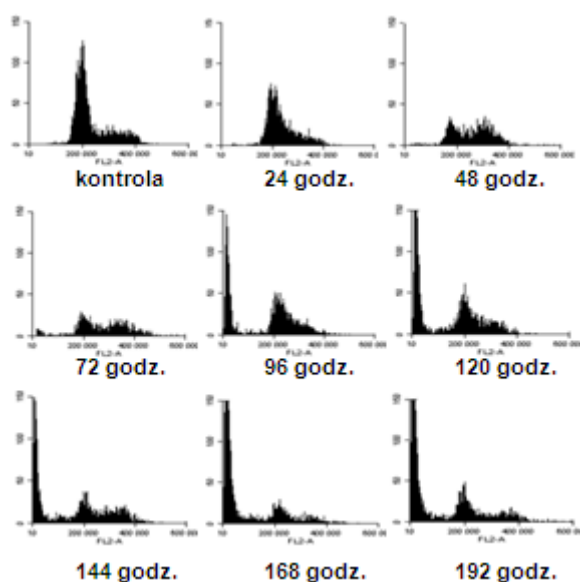
- M1**- populacja komórek w fazie sub-G1
- M2**- populacja komórek w fazie G1
- M3**- populacja komórek w fazie S
- M4**- populacja komórek w fazie G2 i M
- OX**- fluorescencja jodku propidyny, adekwatna do zawartości DNA
- OY**- liczba komórek

Rysunek 7. Przykładowy histogram, obrazujący rozmieszczenie populacji komórek z różną zawartością DNA.

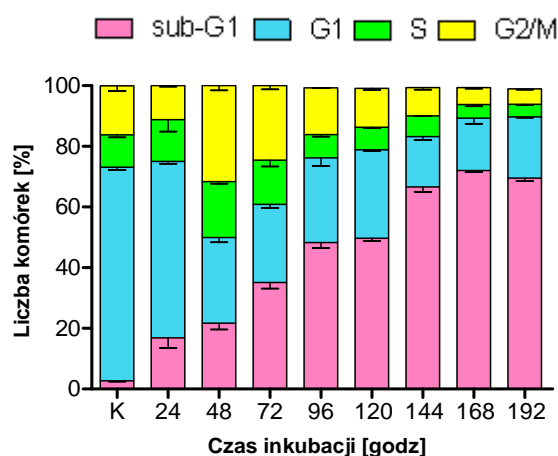
4.2.1. Komórki linii Panc-1

Tabela 4. Procentowa ilość komórek Panc-1 nietraktowanych związkiem (kontrolnych) i inkubowanych z pochodną C-1748 [IC_{80}] w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

Czas inkubacji [godz.]	Fazy cyklu życiowego							
	sub-G1	±	G1	±	S	±	G2/M	±
K	2,73	0,31	70,40	0,96	10,70	0,86	16,13	1,7
24	16,89	3,39	58,17	0,76	13,77	3,96	11,17	0,29
48	21,70	2,09	28,27	1,62	18,40	0,69	31,63	1,55
72	38,10	1,98	22,85	1,2	14,55	2,05	24,55	1,2
96	48,30	1,84	27,90	2,69	7,70	0,71	15,40	0,1
120	49,70	0,85	29,20	0,42	7,40	0,28	12,85	0,64
144	66,65	1,63	16,53	1,13	6,85	0,07	9,35	0,64
168	72,00	0,42	17,25	1,77	4,50	0,57	5,65	0,35
192	69,50	0,99	20,20	0,28	4,20	0,28	5,05	0,21



Rysunek 8. Histogramy obrazujące zmiany w dystrybucji komórek Panc-1 w cyklu życiowym, inkubowanych z pochodną C-1748 (stężenie związku równe IC_{80}) przez podaną liczbę godzin. Oś X – intensywność fluorescencji jodku propidyny określającego zawartość DNA. Oś Y – ilość komórek. Przedstawione histogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń.



Wykres 1. Procentowy rozkład komórek Panc-1 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego inkubowanych z pochodną C-1748 w stężeniu IC_{80} . Wykres uwzględnia procentową zawartość komórek w fazach: G1, S i G2/M oraz frakcję komórek sub-G1.

Analizując uzyskane wyniki stwierdziłam, że pochodna C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} indukuje istotne zmiany w cyklu życiowym komórek Panc-1 (rysunek 8). Przez cały okres inkubacji komórek z pochodną 1-nitroakrydyny, populacja komórek w fazie syntezy DNA – S, zarówno w przypadku kontroli, jak i początkowych czasów inkubacji (24, 48, 72 godziny) utrzymywała się na dosyć niskim poziomie (poniżej 10 %), osiągając wartość maksymalną (18 %) po 48 godz. inkubacji. Po 24 godzinnej ekspozycji komórek na badany związek, ilość komórek we frakcji G1 utrzymywała się na poziomie zbliżonym do kontroli, natomiast po 48 godz. gwałtownie spadła do wartości równej ok. 5 %.

Po 72 godz. ponownie obserwowałam niewielki wzrost ilości komórek znajdujących się we frakcji G1 cyklu życiowego, a począwszy od 120 godz. inkubacji ilość komórek w tej fazie była stała i utrzymywała się na poziomie równym ok. 20 %. Po 48 godz. obserwowałam przejściową akumulację komórek Panc-1 w fazie G2/M cyklu życiowego (32 % w stosunku do 16 % w przypadku komórek kontrolnych). Następnie, wraz ze wzrostem czasu ekspozycji na działanie pochodnej C-1748, ilość komórek w fazie G2/M zaczynała powoli spadać, osiągając ostatecznie wartość równą około 5 % po 168 godzinach inkubacji. W porównaniu do populacji komórek kontrolnych, nietraktowanych związkiem obserwowałam ponadto gwałtowny wzrost ilości komórek Panc-1 we frakcji sub-G1, już po 24 godzinach inkubacji (15 %). Po 96 godzinnej ekspozycji na działanie badanego związku było to już ok. 50 %. Ostatecznie, po 192 godzinnej inkubacji z pochodną C-1748, ilość komórek we frakcji sub-G1 wynosiła ok. 70 %.

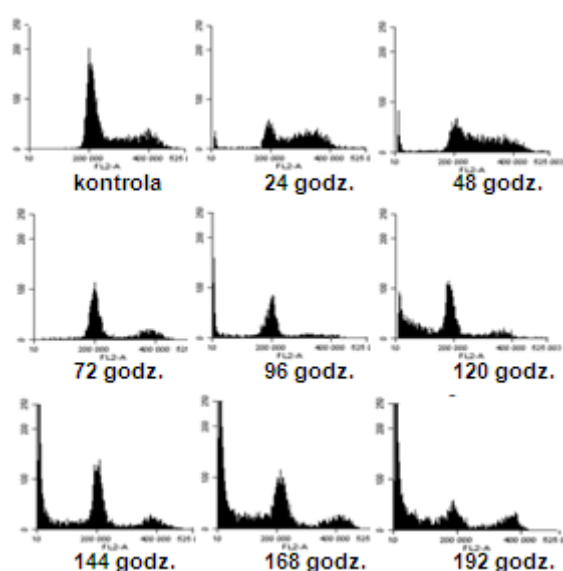
4.2.2. Komórki linii MiaPaCa-2

W przypadku komórek linii MiaPaCa-2, traktowanych pochodną C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} obserwowałam następujące zmiany dystrybucji komórek w cyklu podziałowym: po 24 godz. inkubacji komórek ze związkiem dochodziło do nieznacznego wzrostu ilości komórek we frakcji S cyklu życiowego w porównaniu do komórek nietraktowanych związkiem. Po 48 godzinach, ilość komórek w fazie S zaczynała spadać, utrzymując się na poziomie równym ok. 10 % przez pozostały okres inkubacji ze związkiem. Po 24 godz. zmniejszała się ilość komórek MiaPaCa-2 w fazie G1 cyklu podziałowego. Począwszy od 48 godzin inkubacji, dochodziło jednak do przejściowej akumulacji komórek w tej właśnie fazie (ok. 60 % komórek po 72 i 96 godz.) aż do 168 godz. inkubacji z pochodną 1-nitroakrydyny. Po 192 godz. następował gwałtowny spadek ilości komórek w fazie G1 cyklu do wartości równej ok. 8 %. Po 24 godzinnej ekspozycji komórek MiaPaCa-2 na badany związek dochodziło również do przejściowej akumulacji komórek w fazie G2/M (ok. 46 % komórek w porównaniu do 20 % dla komórek kontrolnych). W wyniku dłuższej ekspozycji komórek na działanie pochodnej C-1748, ich ilość w tej fazie zaczęła powoli spadać, utrzymując się na względnie stałym poziomie równym 10-11 % aż do 192 godzin inkubacji. Od 24 godz. inkubacji ze związkiem obserwowałam także stopniowy wzrost komórek z pofragmentowanym DNA (frakcja sub-G1). Ilość komórek w tej fazie zaczęła gwałtownie wzrastać (po 120 godz. wynosiła ok. 40 %), osiągając ostatecznie po 192 godzinach inkubacji wartość równą ok. 75 % całkowitej populacji komórek. Analiza zmian w progresji komórek MiaPaCa-2 w cyklu życiowym wykazała również przejściowy blok komórek w fazie G2/M cyklu po 24 godz. inkubacji. Zmianom tym towarzyszył stopniowy wzrost ilości

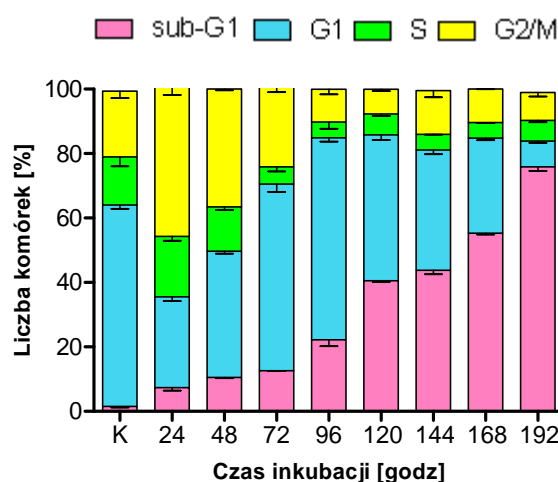
komórek z pofragmentowanym DNA, a ilość komórek we frakcji sub-G1 osiągnęła ostatecznie wartość równą ok. 76 % po 192 godzinach inkubacji komórek ze związkiem.

Tabela 5. Procentowa ilość komórek MiaPaCa-2 nietraktowanych związkiem (kontrolnych) i inkubowanych z pochodną C-1748 [IC_{80}] w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

Czas inkubacji [godz.]	Fazy cyklu życiowego							
	sub-G1	±	G1	±	S	±	G2/M	±
K	1,58	0,38	62,48	1,21	14,90	2,96	20,40	2,12
24	7,41	0,99	28,11	1,34	18,80	1,34	46,68	2,76
48	10,51	0,21	39,22	0,78	13,70	0,99	36,57	0,35
72	12,65	0,07	57,90	2,4	5,30	1,41	24,15	0,92
96	22,22	2,05	62,65	1,2	4,95	2,12	10,15	1,56
120	40,56	0,35	45,25	1,63	6,45	0,65	7,74	0,6
144	43,82	1,27	37,28	1,27	4,85	0,07	13,60	2,05
168	55,30	0,42	29,45	0,64	4,87	0,07	10,38	0,07
192	75,85	1,2	8,00	0,57	6,40	0,57	8,70	1,27



Rysunek 9. Histogramy obrazujące zmiany w dystrybucji komórek MiaPaCa-2 w cyklu życiowym, inkubowanych z pochodną C-1748 (stężenie związku równe IC_{80}) przez podaną liczbę godzin. Oś X – intensywność fluorescencji jodku propidyny określającego zawartość DNA. Oś Y – ilość komórek. Przedstawione histogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń.

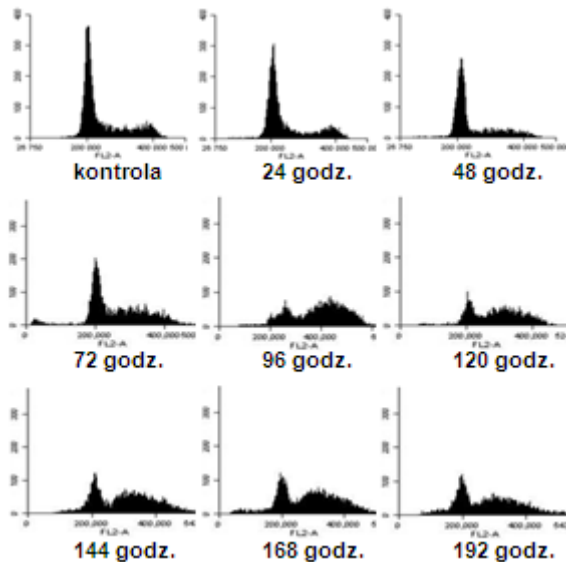


Wykres 2. Procentowy rozkład komórek MiaPaCa-2 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego inkubowanych z pochodną C-1748 w stężeniu IC_{80} . Wykres uwzględnia procentową zawartość komórek w fazach: G1, S i G2/M oraz frakcję komórek sub-G1.

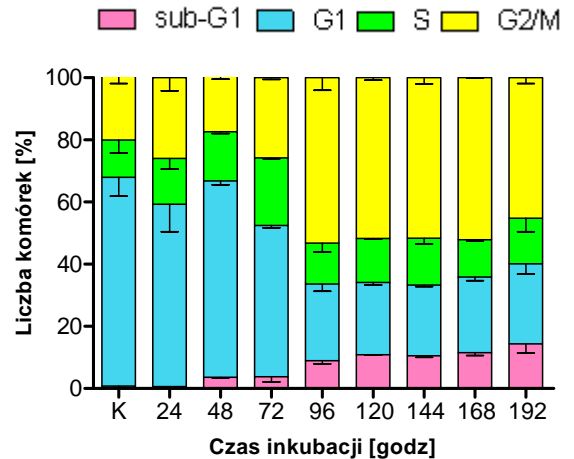
4.2.3. Komórki linii BxPC-3

Tabela 6. Procentowa ilość komórek BxPC-3 nietraktowanych związkiem (kontrolnych) i inkubowanych z pochodną C-1748 [IC_{80}] w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

Czas inkubacji [godz.]	Fazy cyklu życiowego							
	sub-G1	±	G1	±	S	±	G2/M	±
K	0,75	0,44	67,23	6,12	11,98	4,21	20,04	1,84
24	0,63	0,61	58,68	8,87	14,73	3,45	25,96	4,25
48	3,60	0,14	63,20	1,27	15,8	0,57	17,40	0,42
72	3,80	1,7	48,65	0,78	21,75	0,28	25,80	0,57
96	8,98	1,06	24,62	2,33	13,15	2,76	53,25	4,03
120	10,85	0,07	23,30	0,85	14,10	0,11	51,75	0,78
144	10,55	0,49	22,75	0,49	15,10	1,98	51,60	1,98
168	11,55	0,92	24,30	1,13	12,05	0,35	52,10	0,14
192	14,35	2,9	25,75	3,32	14,70	4,38	45,20	1,84



Rysunek 10. Histogramy obrazujące zmiany w dystrybucji komórek BxPC-3 w cyklu życiowym, inkubowanych z pochodną C-1748 (stężenie związku równe IC_{80}) przez podaną liczbę godzin. Oś X – intensywność fluorescencji jodku propidyny określającego zawartość DNA. Oś Y – ilość komórek. Przedstawione histogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń.



Wykres 3. Procentowy rozkład komórek BxPC-3 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego inkubowanych z pochodną C-1748 w stężeniu IC_{80} . Wykres uwzględnia procentową zawartość komórek w fazach: G1, S i G2/M oraz frakcję komórek sub-G1.

W przypadku komórek linii BxPC-3, traktowanych pochodną C-1748 obserwowałam następujące zmiany w cyklu podziałowym: ilość komórek będących w fazie G1 przez pierwsze trzy doby inkubacji ze związkiem utrzymywała się na stałym, wysokim poziomie równym ok. 60 %. Ponad dwukrotny spadek ilości komórek w tej fazie zaobserwowałam po 96 godzinnej ekspozycji komórek na działanie związku (spadek z wartości 50 % po 72 godz. do 19 % po 96 godz.). Ostatecznie, po 192 godzinnej inkubacji, ilość komórek w tej fazie cyklu wynosiła ok. 25 %. Populacja komórek BxPC-3 w fazie S utrzymywała się na względnie

niskim poziomie przez cały czas inkubacji ze związkami. Wzrosła nieznacznie po 72 godz., osiągając wartość równą 20 %. Ilość komórek BxPC-3 w fazie G2/M początkowo utrzymywała się stałym poziomie, zbliżonym do ilości tychże komórek w kontroli, nietraktowanej związkami (ok. 20 %). W wyniku dłuższego traktowania komórek pochodną 1-nitroakrydyny, po 96 godz. inkubacji dochodziło do trwałej akumulacji komórek BxPC-3 w fazie G2/M cyklu (50 % populacji komórek), a ilość komórek w tej fazie utrzymywała się na stałym, wysokim poziomie również po dłuższych czasach inkubacji z pochodną C-1748. Nieznaczny wzrost ilości komórek z pofragmentowanym DNA (frakcja sub-G1) obserwowaliśmy dopiero po 96 godz. inkubacji ze związkami. Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji, ilość komórek w tej frakcji utrzymywała się na stałym, dosyć niskim poziomie, aż do 192 godz. inkubacji.

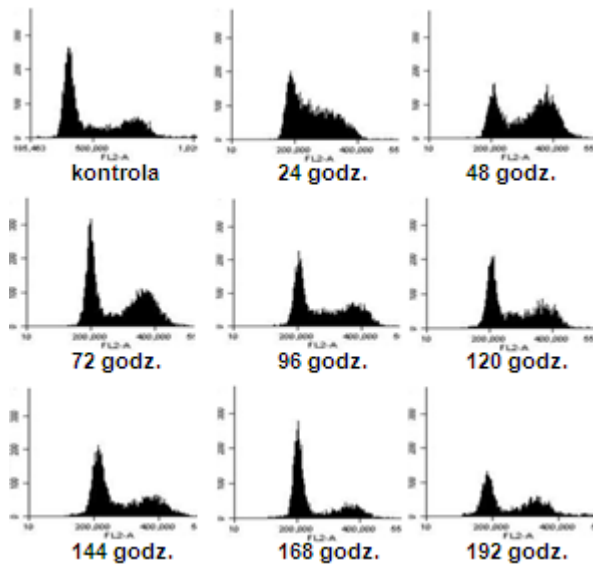
4.2.4. Komórki linii AsPC-1

Tablica 7. Procentowa ilość komórek AsPC-1 nietraktowanych związkami (kontrolnych) i inkubowanych z pochodną C-1748 [IC₅₀] w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

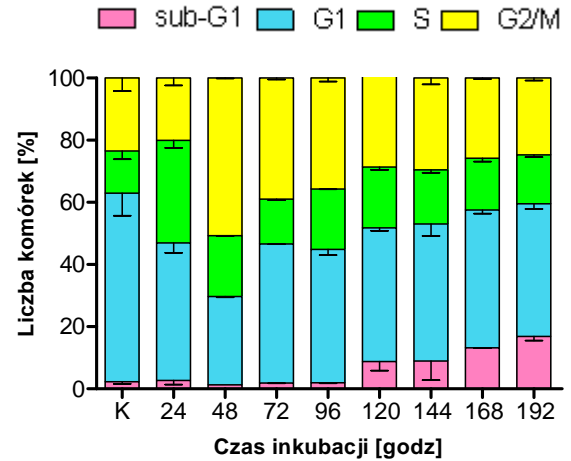
Czas inkubacji [godz.]	Fazy cyklu życiowego							
	sub-G1	±	G1	±	S	±	G2/M	±
K	2,30	0,71	60,65	7,28	13,60	2,69	23,45	4,17
24	2,74	1,36	44,20	3,14	33,03	2,41	20,03	2,4
48	1,30	0,05	28,40	0,28	19,60	0,12	50,70	0,14
72	1,85	0,07	44,75	0,07	14,40	0,28	39,00	0,42
96	1,95	0,14	42,90	1,84	19,45	0,07	35,70	1,13
120	8,77	2,9	43,00	0,89	19,60	0,88	34,73	1,73
144	8,94	6,18	44,13	3,85	17,40	0,93	29,53	2,06
168	13,20	0,07	44,35	1,2	16,65	1,06	25,80	0,28
192	16,85	1,34	42,65	1,63	15,75	0,74	24,75	0,78

W wyniku traktowania komórek linii AsPC-1 pochodną C-1748, po pierwszych 24 godz. inkubacji ze związkami dochodziło do wzrostu populacji komórek w fazie S. Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji, ilość komórek w tej fazie cyklu zaczynała spadać (począwszy od 48 godz.), utrzymując się mniej więcej na tym samym poziomie równym ok. 18-20 %. Z kolei, po 48 godzinnej inkubacji obserwowaliśmy akumulację znacznej ilości komórek w fazie G2/M (ok. 50 %). Dłuższy czas inkubacji powodował nieznaczny spadek ilości komórek z 4N DNA, przy jednoczesnym wzroście populacji komórek w fazie G1 cyklu życiowego. Ostatecznie, począwszy od 144 godzin ekspozycji komórek na badaną pochodną, ilość komórek AsPC-1 w fazie G2/M cyklu życiowego była zbliżona do ilości komórek nietraktowanych związkami i wynosiła ok. 25 %. Ilość komórek w fazie G1 cyklu podziałowego, począwszy od 72 godzin inkubacji utrzymywała się na zbliżonym poziomie

równym ok. 45 % przez wszystkie czasy inkubacji z pochodną C-1748. Populacja komórek AsPC-1 ze zdegradowanym DNA (frakcja sub-G1) utrzymywała się na stałym, niskim poziomie, aż do 168 godz. inkubacji komórek ze związkiem.



Rysunek 11. Histogramy obrazujące zmiany w dystrybucji komórek AsPC-1 w cyklu życiowym, inkubowanych z pochodną C-1748 (stężenie związku równe IC_{50}) przez podaną liczbę godzin. Oś X – intensywność fluorescencji jodku propidyny określającego zawartość DNA. Oś Y – ilość komórek. Przedstawione histogramy są reprezentatywne dla trzech niezależnych doświadczeń.



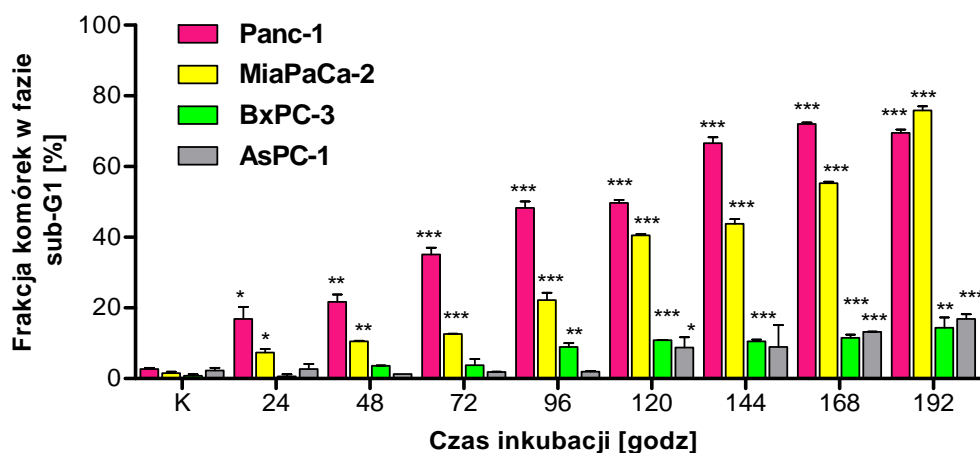
Wykres 4. Procentowy rozkład komórek AsPC-1 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego inkubowanych z pochodną C-1748 w stężeniu IC_{50} . Wykres uwzględnia procentową zawartość komórek w fazach: G1, S i G2/M oraz frakcję komórek sub-G1.

4.2.5. Podsumowanie

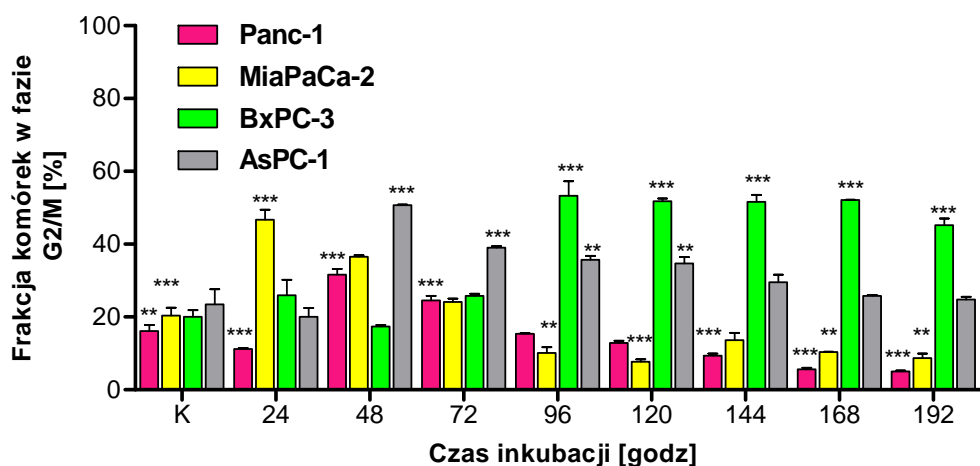
Na wykresie 5 i 6 przedstawiłam procentowy rozkład ilości komórek czterech badanych linii raka trzustki, odpowiednio w fazie sub-G1 i G2/M cyklu podziałowego.

Na podstawie analizy uzyskanych wyników stwierdziłam, że w zależności od badanej linii komórkowej, pochodna C-1748 indukowała różne zmiany w cyklu życiowym komórek raka trzustki. Wyraźnie widać, że DNA komórek linii Panc-1 oraz MiaPaCa-2 ulegało degradacji na skutek działania pochodnej C-1748 w większym stopniu niż w przypadku komórek linii BxPC-3 oraz AsPC-1 (wykres 5). Blok cyklu komórkowego w fazie G2/M najsilniej zachodził w komórkach linii BxPC-3, począwszy od 96 godzin inkubacji komórek ze związkiem. W przypadku komórek pozostałych trzech linii można mówić jedynie o przejściowej akumulacji w tej fazie cyklu (wykres 6). W komórkach linii MiaPaCa-2 dochodziło natomiast do przejściowej akumulacji komórek w fazie G1 cyklu życiowego. W przypadku komórek linii BxPC-3, ilość komórek w fazie G1 była wysoka przez pierwsze trzy doby inkubacji z pochodną (ok. 60 %), a następnie spadła do poziomu ok. 20 %

i utrzymywała się na tym poziomie przez pozostałe czasy inkubacji komórek ze związkiem. Trwałą akumulację w fazie G1 obserwowałam z kolei dla komórek linii AsPC-1.



Wykres 5. Liczba komórek czterech linii raka trzustki znajdujących się we frakcji sub-G1 cyklu komórkowego po inkubacji z pochodną C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} . Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.



Wykres 6. Liczba komórek czterech linii raka trzustki znajdujących się we frakcji G2/M cyklu komórkowego po inkubacji z pochodną C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} . Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.

Ponieważ w przypadku komórek linii Panc-1 i MiaPaCa-2 obserwowałam znaczną populację komórek z $DNA < 2N$, co mogło świadczyć o indukcji w tych komórkach procesu apoptozy, w kolejnych eksperymentach postanowiłam zbadać jakie rodzaje śmierci komórkowej indukowane są przez pochodną C-1748 w komórkach badanych przeze mnie linii raka trzustki.

4.3. Mikroskopowe obserwacje morfologii jąder komórkowych czterech linii raka trzustki poddanych działaniu C-1748

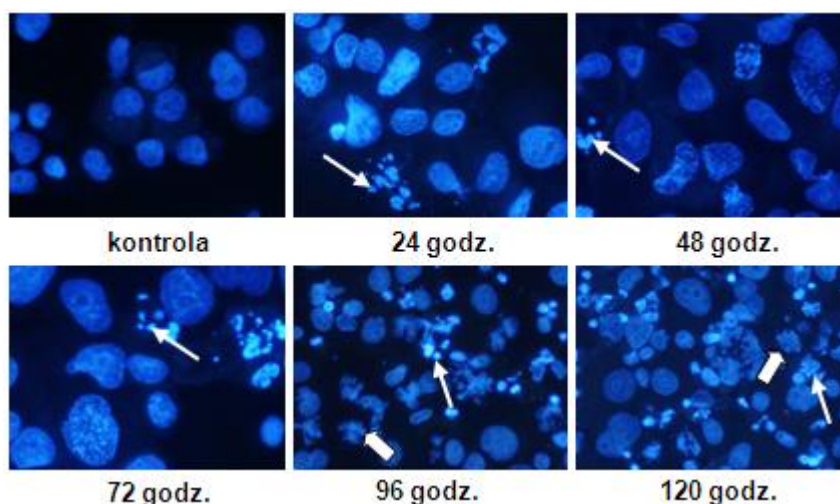
Mikroskopowa analiza morfologii komórek jest podstawową, prostą i skuteczną metodą identyfikacji nieprawidłowości w budowie komórki wynikającej np. z transformacji nowotworowej lub zmian jakie zachodzą w komórce na skutek działania chemoterapeutyków. Na podstawie obserwacji mikroskopowych rozróżnić można trzy główne rodzaje śmierci komórkowej. Położenie kilku niewielkich jąder o średnim sygnale fluorescencji blisko siebie jest charakterystyczne dla katastrofy mitotycznej. Mocno powiększone i rozplaszczone jądra mogą świadczyć o indukcji nekrozy, z kolei komórki apoptotyczne mają jądra o nieregularnych kształtach, skondensowaną chromatynę, intensywniejszą fluorescencję i cechują się wzmożoną fragmentacją jądra, podczas gdy jądra prawidłowych komórek są okrągłe, o gładkich krawędziach i jednakowo wybarwione.

W celu oceny zmian w morfologii jąder komórkowych posłużyłam się techniką mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem barwnika DAPI, który wnika do komórek przez nieuszkodzoną błonę komórkową i interkaluje preferencyjnie do rejonów DNA bogatych w pary AT. Po wzbudzeniu światłem ultrafioletowym, DAPI wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 358$ nm oraz maksimum emisji przy $\lambda = 461$ nm (kolor niebiesko-fioletowy), dzięki czemu możliwa jest wizualna obserwacja wybarwionego materiału genetycznego. Zmiany zachodzące w morfologii jąder komórkowych, będące wynikiem działania związku przedstawiłam w sposób zależny od czasu inkubacji ze związkiem oraz w sposób zależny od zastosowanego stężenia pochodnej 1-nitroakrydyny.

Eksperyment przeprowadziłam dwukrotnie wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.5.

4.3.1. Zmiany zależne od czasu inkubacji komórek z pochodną C-1748

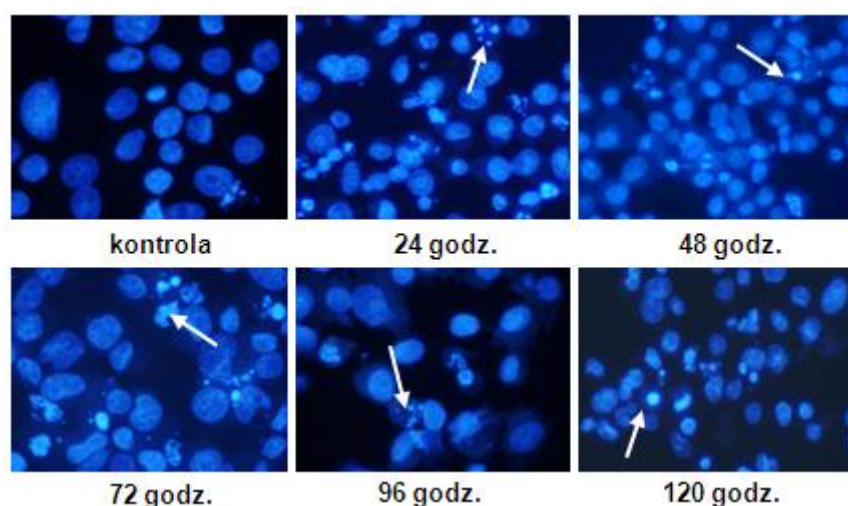
4.3.1.1. Komórki linii Panc-1



Rysunek 12. Morfologia jąder komórek linii Panc-1 traktowanych pochodną C-1748 (stężenie równe IC_{80}), wybarwionych DAPI i oglądanych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w świetle UV przy powiększeniu 20x. Cienka strzałka wskazuje apoptozę, gruba strzałka – katastrofę mitotyczną.

Obserwacje mikroskopowe wykazały, że pierwsze zmiany w morfologii jąder komórek Panc-1 pojawiły się już po 24 godzinach inkubacji komórek ze związkiem, o czym świadczyła m.in. obecność ciałek apoptotycznych (rysunek 12). Po 24 godzinach, znaczna populacja komórek wykazywała również kondensację chromatyny. Po upływie pierwszej doby inkubacji dochodziło także do nieznacznego powiększenia jąder komórek traktowanych pochodną 1-nitroakrydyny w stosunku do komórek kontrolnych. Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji jądra komórek Panc-1 ulegały silniejszym zmianom, które dotyczyły coraz większej populacji komórek. Po 96 godz., oprócz komórek ulegających apoptozie obserwowałam również liczne komórki wielojądrzaste, charakterystyczne dla procesu katastrofy mitotycznej. Po 120 godz. inkubacji komórek Panc-1 z pochodną C-1748, zdecydowana ich większość ulegała apoptozie.

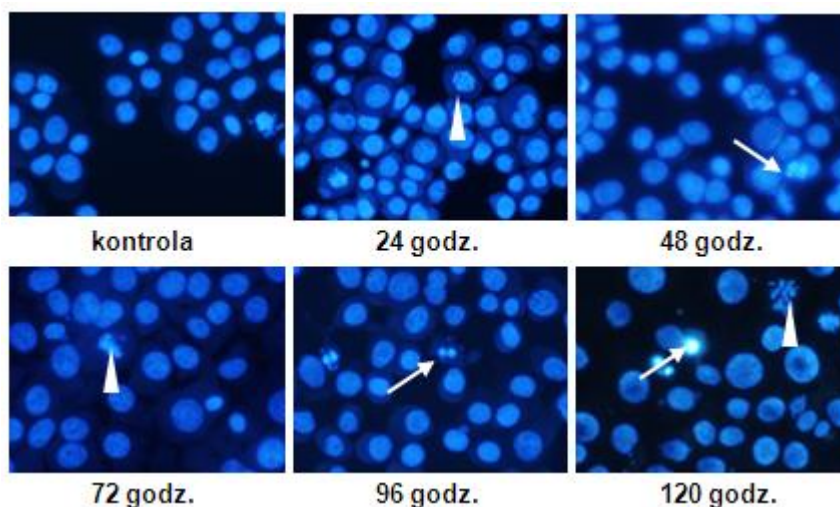
4.3.1.2. Komórki linii MiaPaCa-2



Rysunek 13. Morfologia jąder komórek linii MiaPaCa-2 traktowanych pochodną C-1748 (stężenie równe IC_{50}), wybarwionych DAPI i oglądanych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w świetle UV przy powiększeniu 20x. Cienka strzałka wskazuje apoptozę.

W przypadku komórek linii MiaPaCa-2 do indukcji apoptozy dochodziło już po 24 godz. inkubacji z pochodną C-1748, o czym świadczyła stopniowa degradacja jąder komórkowych i pojawiające się ciała apoptotyczne. Po 48 godz. obserwowałam również kondensację chromatyny. Przez cały okres inkubacji komórek ze związkiem widoczne były też nieliczne komórki wielojądrzaste. Wydłużenie czasu inkubacji komórek ze związkiem skutkowało wzrostem populacji komórek apoptotycznych. Podobnie jak w przypadku komórek linii Panc-1, po 120 godz. inkubacji z pochodną 1-nitroakrydyny można było zaobserwować zmniejszającą się liczbę prawidłowych komórek, dlatego też obserwacje zmian w morfologii jąder komórkowych prowadziłam do 120 godz. włącznie.

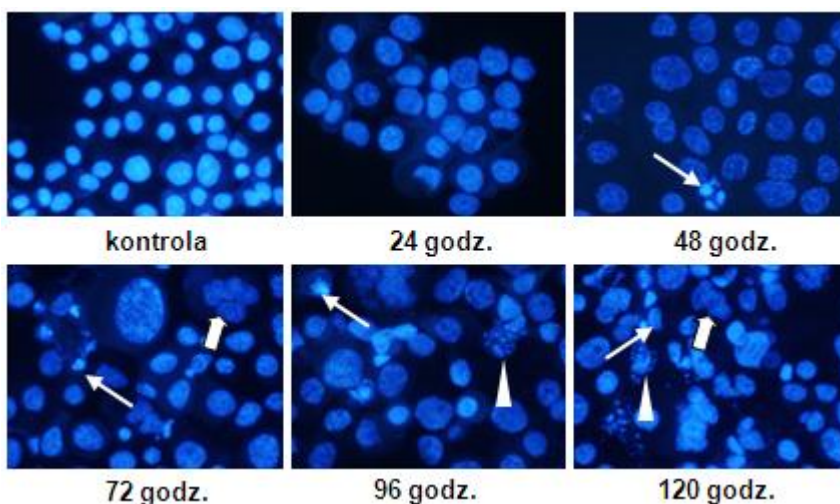
4.3.1.3. Komórki linii BxPC-3



Rysunek 14. Morfologia jąder komórek linii BxPC-3 traktowanych pochodną C-1748 (stężenie równe IC_{80}), wybarwionych DAPI i oglądanych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w świetle UV przy powiększeniu 20x. Cienka strzałka wskazuje apoptozę, grot – nieprawidłową mitozę.

Z obserwacji mikroskopowych komórek linii BxPC-3 traktowanych pochodną C-1748, wynika, że wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek ze związkim dochodziło do powiększenia jąder komórek traktowanych związkim w stosunku do jąder komórek kontrolnych. Po 48 godz. obserwowałam także pojedyncze jądra olbrzymie oraz nieliczne ciała apoptotyczne, których ilość utrzymywała się na stałym, niskim poziomie w miarę wydłużania czasu inkubacji. Począwszy od 24 godz. inkubacji komórek ze związkim obserwowałam również nieprawidłową mitozę i rozdział chromosomów, a ilość takich komórek wzrastała nieznacznie wraz z wydłużającym się czasem inkubacji. Ponieważ komórki linii BxPC-3 były oporne na indukcję apoptozy w wyniku działania pochodnej C-1748 o stężeniu równym IC_{80} , wydłużyłam czas inkubacji ze związkim do 192 godz. Po tym czasie ok. 90 % komórek wciąż nie wykazywało zmian charakterystycznych dla któregoś rodzaju śmierci komórkowej. Jądra tych komórek miały w większości prawidłowy kształt i wielkość.

4.3.1.4. Komórki linii AsPC-1



Rysunek 15. Morfologia jąder komórek linii AsPC-1 traktowanych pochodną C-1748 (stężenie równe IC_{80}), wybarwionych DAPI i oglądanych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w świetle UV przy powiększeniu 20x. Cienka strzałka wskazuje apoptozę, gruba strzałka – katastrofę mitotyczną, grot – nieprawidłową mitozę.

Mikroskopowa analiza komórek AsPC-1 wykazała szereg zmian będących wynikiem działania pochodnej C-1748 w morfologii jąder komórek traktowanych pochodną C-1748. Po 48 godz. inkubacji obserwowałam pojedyncze komórki apoptotyczne oraz komórki ze skondensowaną chromatyną. Dodatkowo, począwszy od 72 godz. obserwowałam nieznaczną populację komórek wielojądrzastych, których ilość utrzymywała się na stałym, niskim poziomie przez wszystkie czasy inkubacji komórek ze związkami. Po 72 godz. widoczne były również pojedyncze komórki z nieprawidłową mitozą. Ponieważ po 120 godz. inkubacji z pochodną C-1748 znaczna ilość komórek wciąż wykazywała prawidłową morfologię, postanowiłam wydłużyć czas inkubacji ze związkiem o kolejne trzy doby. Jednak po dłuższych czasach inkubacji zdecydowana większość komórek AsPC-1 wciąż wykazywała prawidłową morfologię jąder komórkowych.

4.3.1.5. Podsumowanie

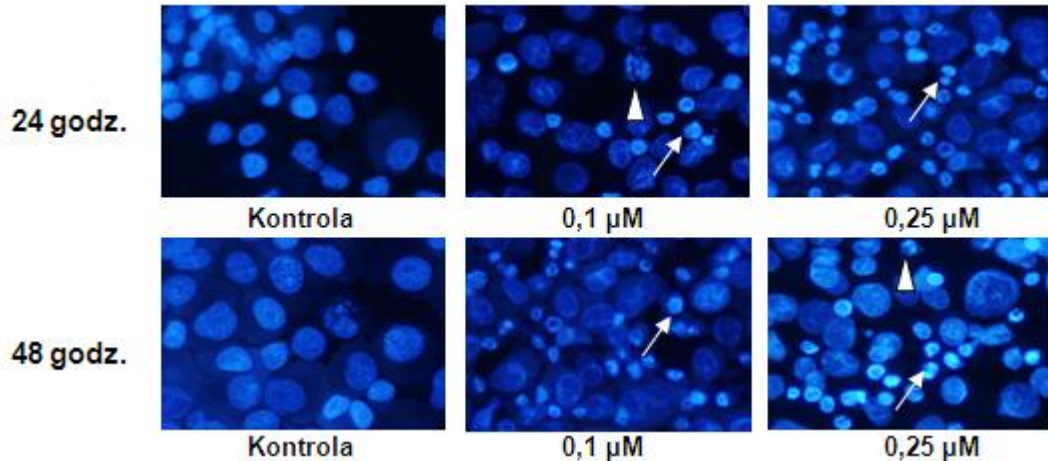
Podsumowując uzyskane wyniki, na podstawie analizy preparatów mikroskopowych stwierdziłam, że pochodna C-1748 w stężeniu odpowiadającym IC_{80} najsilniej oddziaływała na komórki linii Panc-1 i MiaPaCa-2. W komórkach Panc-1 związek indukował zmiany charakterystyczne głównie dla apoptozy i katastrofy mitotycznej. Podobne wyniki otrzymałam również dla komórek linii MiaPaCa-2. Znacznie mniejszy procent komórek apoptotycznych obserwowałam w przypadku komórek linii AsPC-1 i BxPC-3 poddanych działaniu pochodnej C-1748, nawet po długiej, 192 godzinnej inkubacji ze związkiem.

4.3.2. Zmiany zależne od dawki chemoterapeutyku

Ponieważ w przypadku komórek linii BxPC-3 oraz AsPC-1 nawet po długich czasach inkubacji z pochodną C-1748 o stężeniu hamującym proliferację komórek w 80 %, obserwowałam niewielką ilość komórek apoptotycznych, w kolejnym etapie postanowiłam zbadać zmiany zachodzące w morfologii jąder komórkowych, komórek traktowanych wzrastającymi stężeniami związku.

4.3.2.1. Komórki linii Panc-1

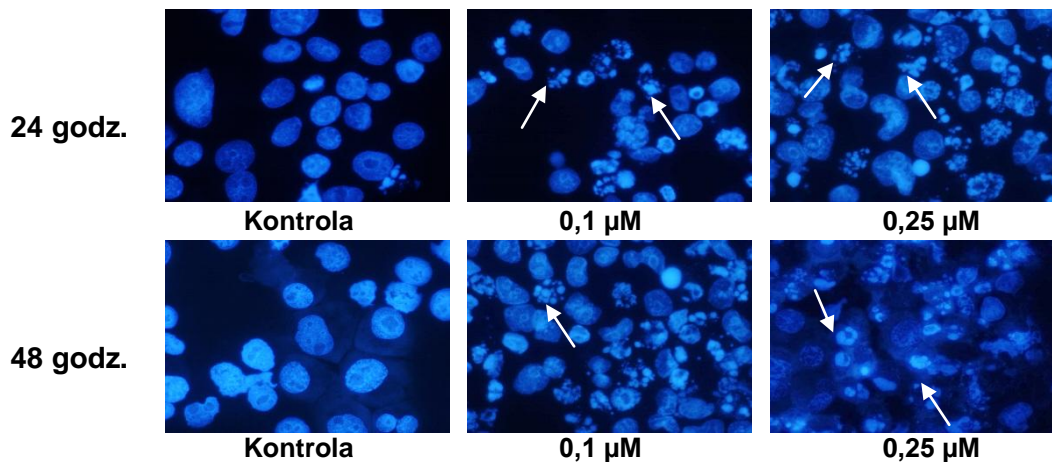
Z obserwacji mikroskopowych komórek linii Panc-1 wynika że, wraz ze wzrastającym stężeniem związku wzrastała ilość komórek apoptotycznych. Po 48 godzinach inkubacji z pochodną C-1748 o stężeniu równym $0,25 \mu\text{M}$, ilość komórek apoptotycznych wynosiła ponad już ok. 50 %.



Rysunek 16. Zmiany w morfologii jąder komórek raka trzustki Panc-1, traktowanych pochodną C-1748 i komórek kontrolnych-nietraktowanych związkiem, wybarwionych DAPI. Powiększenie 20x. Cienka strzałka wskazuje apoptozę, grot – nieprawidłową mitozę.

4.3.2.2. Komórki linii MiaPaCa-2

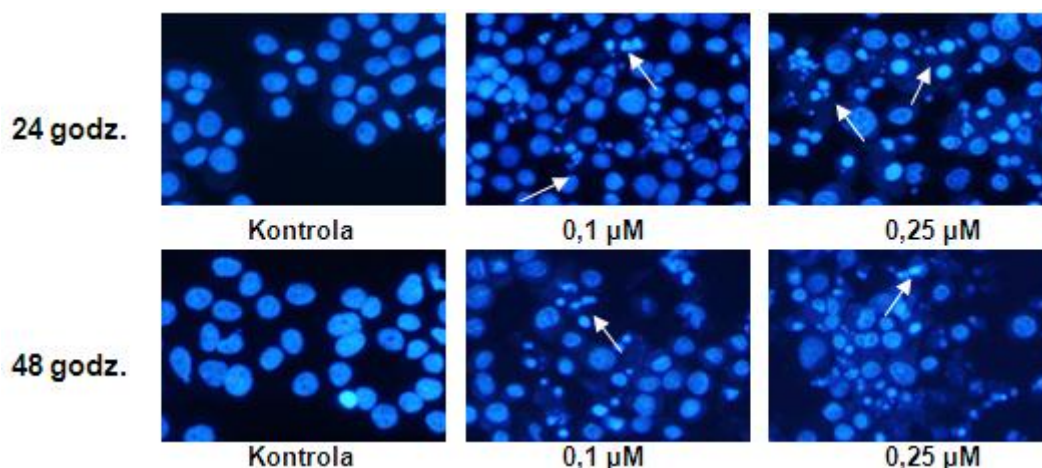
W przypadku komórek linii MiaPaCa-2 również obserwowałam wzrost ilości komórek apoptotycznych wraz ze wzrastającym stężeniem pochodnej C-1748. Zarówno po 24, jak i po 48 godzinach inkubacji komórek ze związkiem o stężeniu równym 0,25 μM , ilość komórek apoptotycznych wahała się w granicach ok. 80 i 90 %.



Rysunek 17. Zmiany w morfologii jąder komórek raka trzustki MiaPaCa-2, traktowanych pochodną C-1748 i komórek kontrolnych-nietraktowanych związkiem, wybarwionych DAPI. Powiększenie 20x. Cienka strzałka wskazuje apoptozę.

4.3.2.3. Komórki linii BxPC-3

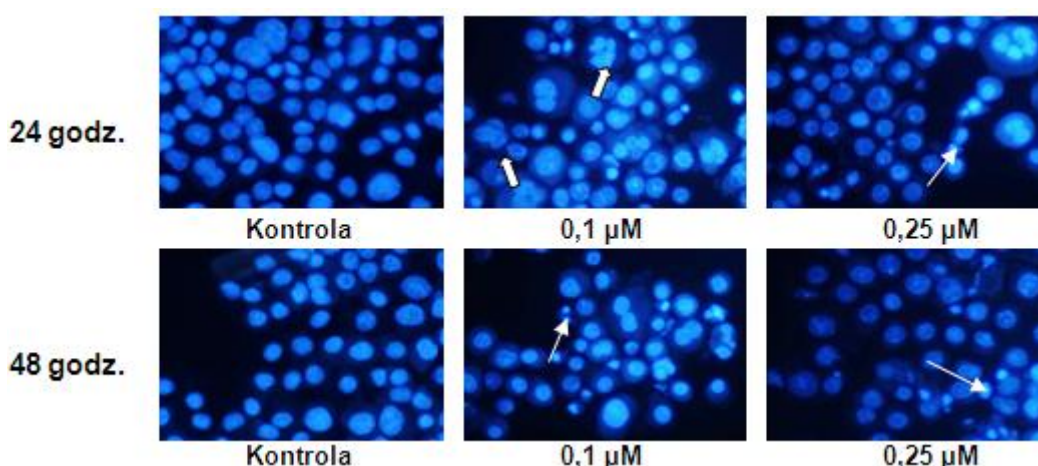
Komórki linii BxPC-3, odporne na apoptozę indukowaną przez związek o stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} wykazały większą wrażliwość na działanie związku przy stężeniu ponad dwukrotnie wyższym niż IC_{80} (0,1 μM). Przy stężeniu związku równym 0,25 μM , po 48 godzinach inkubacji z pochodną C-1748 obserwowałam już ok. 40 % komórek apoptotycznych.



Rysunek 18. Zmiany w morfologii jąder komórek raka trzustki BxPC-3, traktowanych pochodną C-1748 i komórek kontrolnych-nietraktowanych związkiem, wybarwionych DAPI. Powiększenie 20x. Cienka strzałka wskazuje apoptozę.

4.3.2.4. Komórki linii AsPC-1

Komórki linii AsPC-1, pomimo zastosowania stężenia związku równego 0,25 μM , które w przypadku komórek pozostałych trzech linii raka trzustki było stężeniem wystarczającym do indukcji apoptozy u co najmniej 40 % populacji komórek w zależności od badanej linii, nadal były odporne na indukcję tego procesu. Przy niższym stężeniu związku obserwowałam pojedyncze komórki o morfologii charakterystycznej dla katastrofy mitotycznej, natomiast przy wyższym stężeniu związku obserwowałam pojedyncze komórki o morfologii charakterystycznej dla procesu apoptozy.



Rysunek 19. Zmiany w morfologii jąder komórek raka trzustki AsPC-1, traktowanych pochodną C-1748 i komórek kontrolnych-nietraktowanych związkiem, wybarwionych DAPI. Powiększenie 20x. Cienka strzałka wskazuje apoptozę, gruba strzałka – katastrofę mitotyczną.

4.3.2.5. Podsumowanie

Mikroskopowe obserwacje zmian w morfologii jąder komórek nowotworowych trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748 o stężeniu wyższym niż IC_{80} potwierdziły wysoką

aktywność związku w stosunku do komórek linii Panc-1 i MiaPaCa-2. Znaczna ilość komórek BxPC-3 również ulegała apoptozie, szczególnie przy stężeniu związku równym $0,25 \mu\text{M}$. Natomiast komórki linii AsPC-1 wciąż pozostawały odporne na działanie związku.

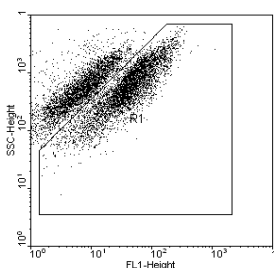
Zarówno zmiany morfologiczne jak i cytometryczna analiza cyklu życiowego komórek traktowanych pochodną C-1748 wykazały indukcję procesu apoptozy. W związku z tym, w kolejnych eksperymentach postanowiłam potwierdzić uzyskane dotychczas wyniki, dalszymi, niezależnymi metodami.

4.4. Cytometryczna analiza aktywności kaspazy-3 w komórkach czterech linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748

Na podstawie analizy zmian w morfologii jąder komórkowych będących wynikiem działania związku wykazałam, że w przypadku komórek linii Panc-1, MiaPaCa-2 i w mniejszym stopniu komórek BxPC-3 dochodziło do indukcji śmierci na drodze apoptozy. Ponadto, analizując zmiany w cyklu życiowym komórek linii Panc-1 i MiaPaCa-2, traktowanych pochodną C-1748, zaobserwowałam stopniowo wzrastającą ilość komórek we frakcji sub-G1, która po 192 godzinach inkubacji ze związkiem wynosiła ok. 70 % całej populacji.

Apoptoza charakteryzuje się licznymi zmianami morfologicznymi i biochemicznymi zachodzącymi w komórkach. Wszystkie te zmiany wywołwane są działaniem kaspaz, które należą do rodziny proteaz cysteinowych, posiadających zdolność rozszczepiania łańcucha białkowego substratów w miejscu reszty karboksylowej kwasu asparaginowego. W skład rodziny kaspaz wchodzi 14 dotychczas poznanych enzymów. Najważniejsze z nich, uczestniczące w procesie apoptozy, można podzielić na dwie grupy: kaspazy inicjujące apoptozę i kaspazy wykonawcze procesu apoptozy. Jedną z głównych kaspaz wykonawczych procesu apoptozy jest kaspaza-3, odpowiedzialna m.in. za wiązanie kluczowych białek, takich jak np. polimeraza poli(ADP)-rybozy [Martin i wsp., 1995].

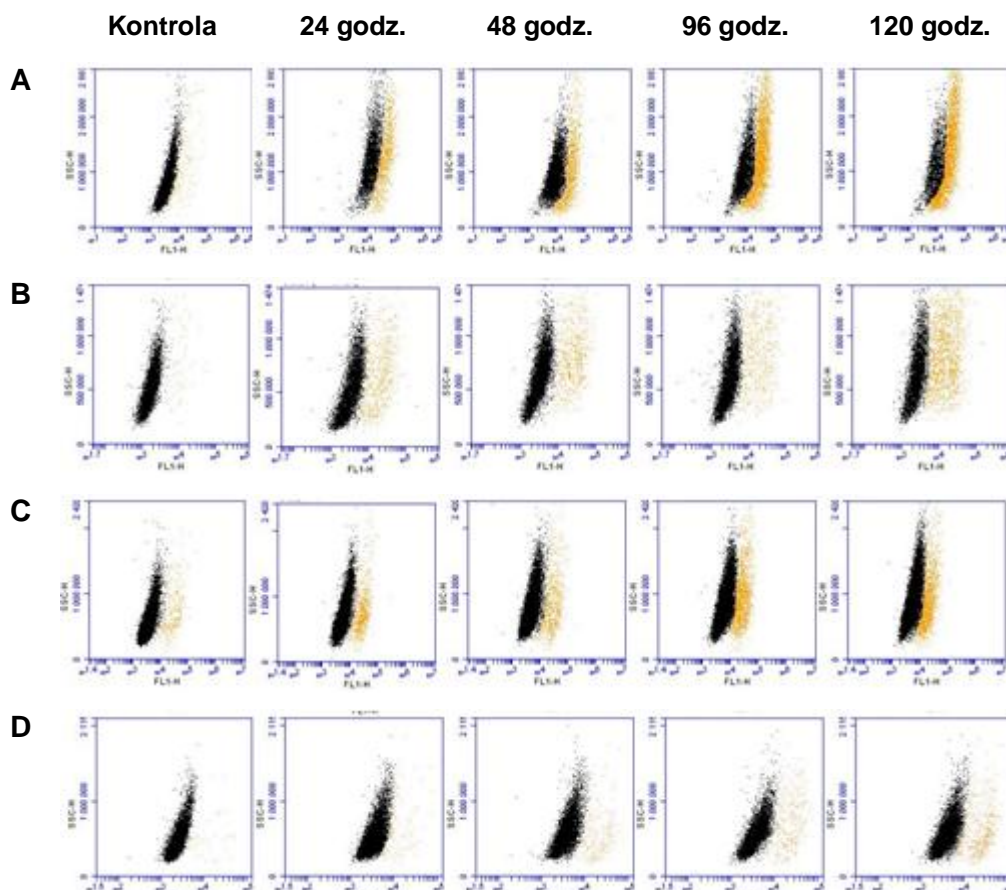
Detekcji kaspazy-3, w komórkach traktowanych pochodną C-1748, dokonałam za pomocą gotowego zestawu analitycznego (Active Caspase-3 Apoptosis Kit) zawierającego królicze przeciwciało poliklonalne, skoniugowane z fikoerytryną. Wyniki są średnią z trzech niezależnych powtórzeń, a badania przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.6.



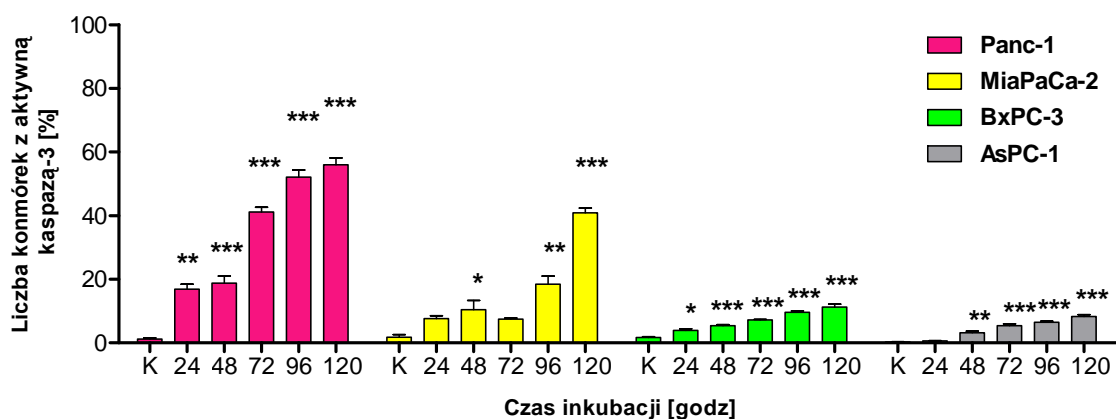
Rysunek 20. Przykładowy cytogram ukazujący zmiany w ilości komórek z aktywną kaspazą-3.

Zaznaczony na cytogramie obszar **R1** reprezentuje komórki zawierające aktywną kaspazę-3. **FL1**- intensywność fluorescencji fluoresceiny skoniugowanej z przeciwciałem przeciwko aktywnej kaspazie-3.

Wyniki analizy cytometrycznej, dotyczącej ilości komórek z aktywną kaspazą-3 przedstawiłam na rysunku 21 oraz w postaci zbiorczego wykresu 8, zależności ilości komórek z aktywną kaspazą-3 (apoptotycznych) od czasu inkubacji z pochodną C-1748.



Rysunek 21. Ilość komórek z aktywną kaspazą-3 (populacja zaznaczona na kolor pomarańczowy) komórek linii: **A: Panc-1, B: MiaPaCa-2, C: BxPC-3, D: AsPC-1**, kontrolnych i inkubowanych z pochodną C-1748 (IC_{80}) przez podane czasy, otrzymane z analizy cytometrycznej. Oś X – fluorescencja pochodząca od fluoresceiny skoniugowanej z przeciwciałem anty-kaspazą-3. Oś Y – liczba komórek.



Wykres 8. Wpływ czasu inkubacji komórek czterech linii raka trzustki z pochodną C-1748 (stężenie IC_{80}) na aktywację kaspazy-3. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.

Przedstawione wyniki pokrywają się z wynikami uzyskanymi z analizy dystrybucji komórek badanych linii raka trzustki w cyklu życiowym i mikroskopowymi obserwacjami zmian w budowie jąder komórkowych i świadczą o aktywacji kaspazy wykonawczej procesu apoptozy z różną intensywnością w komórkach czterech linii raka trzustki. Już od pierwszych 24 godzin inkubacji z pochodną C-1748, ilość komórek linii Panc-1 z aktywną kaspazą-3 wzrosła do wartości 18 % w porównaniu do 3 % w kontroli. Wraz z wydłużającym się czasem ekspozycji na badany związek populacja komórek apoptotycznych z aktywną kaspazą-3 ciągle rosła, osiągając po 144 godz. inkubacji wartość równą ok. 60 %. W przypadku komórek linii MiaPaCa-2, po 24 godz. i dalszych czasach inkubacji obserwowałam stopniowy wzrost ilości komórek z aktywną kaspazą-3. Ostatecznie, ich ilość po 144 godz. inkubacji wynosiła ok. 45 %. W komórkach linii BxPC-3 aktywne białko, kaspaza-3 pojawiło się po 24 godz. inkubacji ze związkiem, a jego ilość nieznacznie wzrastała wraz z wydłużającym się czasem inkubacji z pochodną 1-nitroakrydyny, osiągając po 144 godz. wartość równą ok. 15 %. Cytometryczna analiza aktywności kaspazy-3 w komórkach linii AsPC-1 nie wykazała obecności aktywnego białka po upływie pierwszej doby inkubacji z pochodną C-1748. Po 144 godz. inkubacji, ilość komórek apoptotycznych tej linii wynosiła jedynie 13 %.

4.5. Badanie poziomu pociętej formy białka PARP w komórkach czterech linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748

Cechą wspólną kaspaz jest proteoliza białkowych substratów w miejscu reszty karboksylowej kwasu asparaginowego. Kaspazy mają zdolność niszczenia zarówno białek enzymatycznych, jak i strukturalnych, dzięki czemu w końcowej fazie apoptozy doprowadzają do całkowitej dezintegracji komórki. Degradują one m.in. białkową kinazę DNA i polimerazę poli-ADP rybozy (PARP) uniemożliwiając w ten sposób naprawę uszkodzonego DNA. Obecność pociętego substratu dla kaspaz- PARP, badana zarówno za pomocą cytometrii przepływowej, jak i techniki western blotting, świadczy o indukcji procesu apoptozy zależnej od kaspaz.

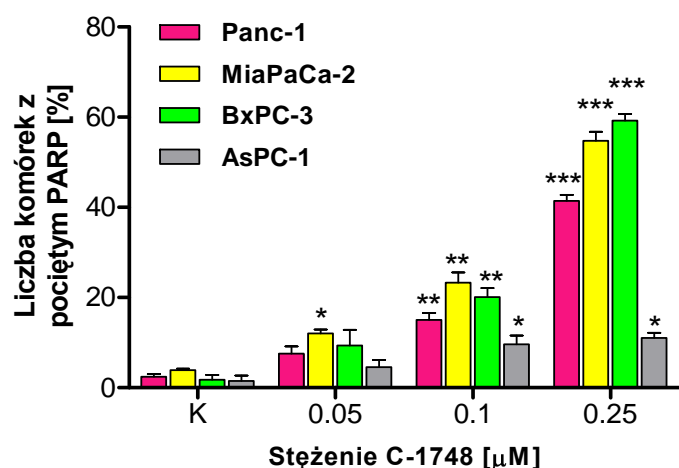
Cytometryczna analiza aktywacji kaspazy-3 w komórkach czterech linii raków trzustki traktowanych pochodną C-1748 wykazała wysoką aktywność związku w stosunku do komórek linii Panc-1 i MiaPaCa-2 przy stężeniu C-1748 odpowiadającym IC_{80} wraz z wydłużającym się czasem inkubacji z pochodną. Ponieważ komórki linii BxPC-3 i AsPC-1 były odporne na indukowaną przez związek apoptozę w tych warunkach eksperymentalnych postanowiłam sprawdzić jaki wpływ na indukcję apoptozy będzie miało zastosowanie trzech różnych stężeń związku: 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,25 μ M, podczas 48 godzinnej inkubacji komórek.

Detekcji pociętego substratu dla kaspaz-PARP, w komórkach traktowanych związkiem C-1748, dokonałam za pomocą cytometrii przepływowej, przy użyciu gotowego zestawu analitycznego (PE Mouse Anti-Cleaved PARP) zawierającego mysie przeciwciało monoklonalne, skoniugowane z fikoerytryną. Uzyskane wyniki są średnią z trzech niezależnych powtórzeń. Badania przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.7.

Wyniki cytometrycznej analizy ilości komórek z pociętym substratem dla kaspaz-PARP, przedstawiłam w postaci tabeli 7 oraz zbiorczego (dla wszystkich badanych linii) wykresu nr 9 zależności ilości komórek z pociętym PARP od stężenia pochodnej C-1748.

Tabela 7. % ilość komórek czterech linii raka trzustki z pociętym substratem dla kaspaz-PARP, poddanych działaniu pochodnej C-1748 o trzech różnych stężeniach po 48 godzinnej inkubacji.

	Kontrola \pm SD	0,05 μ M \pm SD	0,1 μ M \pm SD	0,25 μ M \pm SD
Panc-1	2,40 \pm 0,64	7,60 \pm 1,56	15,00 \pm 1,58	41,40 \pm 1,34
MiaPaCa-2	3,9 \pm 0,35	12,0 \pm 0,92	23,3 \pm 2,26	55,1 \pm 3,98
BxPC-1	1,8 \pm 1,06	9,4 \pm 3,46	20,1 \pm 1,98	59,2 \pm 2,5
AsPC-1	1,5 \pm 1,2	4,6 \pm 1,59	9,6 \pm 1,98	11,0 \pm 1,2



Wykres 9. Odsetek komórek nowotworowych trzustki z pociętym substratem dla kaspaz-PARP, w zależności od stężenia pochodnej C-1748. Czas inkubacji 48 godz.

Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.

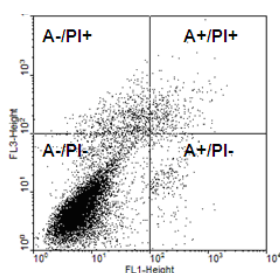
Uzyskane wyniki świadczą o aktywacji kaspaz – enzymów kluczowych w przebiegu procesu apoptozy w komórkach czterech linii raka trzustki wraz ze wzrastającym stężeniem związku. Już przy najniższym stężeniu związku, równym 0,05 μ M, po 48 godzinach inkubacji z pochodną C-1748 nieznacznie wzrosła ilość komórek linii Panc-1, MiaPaCa-2, oraz BxPC-3 ze zdegradowanym PARP. Wraz ze wzrostem stężenia związku, populacja tych komórek ciągle rosła, osiągając przy stężeniu 0,25 μ M wartości równe odpowiednio: 41 % dla komórek linii Panc-1, 55 % dla komórek linii MiaPaCa-2, 59 % dla komórek BxPC-3 oraz ok. 11 % dla komórek linii AsPC-1. Wyniki te częściowo pokrywają się z analizą aktywacji kaspazy-3 w komórkach nowotworowych trzustki poddanych działaniu związku o stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (wykres 8). Na wykresie 9 widać, że odpowiedź komórek

BxPC-3 na działanie związku była silniejsza przy zastosowaniu jako parametru zmiennego stężenia związku a nie czasu inkubacji ze związkiem. W przypadku komórek linii AsPC-1, uzyskane wyniki ponownie wskazują na większą oporność tychże komórek na indukcję procesu apoptozy przez pochodną C-1748 w porównaniu do komórek innych badanych linii.

4.6. Badanie zmian w budowie błony cytoplazmatycznej komórek czterech linii raka trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748

Celem kolejnego eksperymentu było określenie, czy pochodna C-1748 powoduje zmiany w budowie błony komórkowej komórek nowotworowych trzustki, które mogłyby wskazywać na indukcję określonego rodzaju śmierci komórkowej. Zróżnicowanie procesów apoptozy, czy nekrozy można dokonać m.in. w oparciu o zmiany w rozmieszczeniu fosfolipidów w biwarstwie lipidowej oraz w oparciu o zmiany w integralności błony plazmatycznej. W prawidłowych komórkach fosfatydyloseryna znajduje się po wewnętrznej stronie warstwy lipidowej błony plazmatycznej, podczas gdy fosfatydocholina – po stronie zewnętrznej. W momencie, gdy zostanie uruchomiona apoptoza, dochodzi do translokacji fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Zastosowany w teście barwnik: białko aneksyna-V ma zdolność do wiązania się z fosfatydyloseryną. Aby umożliwić bezpośrednią detekcję aneksyny V jest ona chemicznie skoniugowana z tioizocyjanianem fluoresceiny (FITC). Drugi barwnik: jodek propidyny ma z kolei zdolność do interkalacji do DNA, przez co wnika do jądra tylko tych komórek, których błona komórkowa została uszkodzona. Utrata integralności błony obserwowana jest w przypadku późnej apoptozy, katastrofy mitotycznej i nekrozy.

Badania przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.8. Przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych doświadczeń.

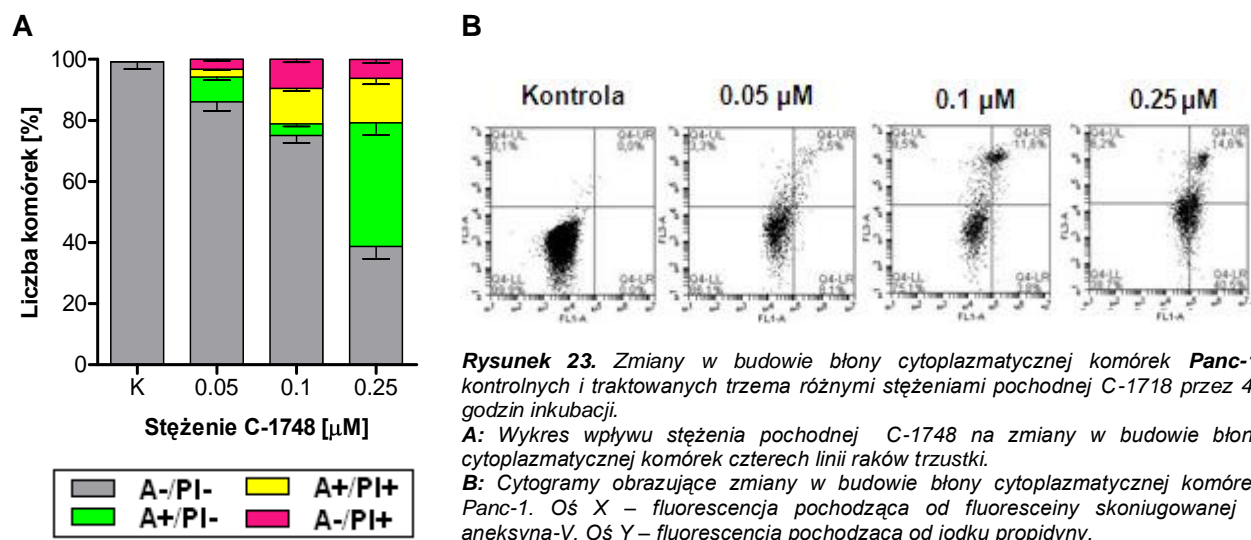


Rysunek 22. Przykładowy cytogram rozkładu komórek – test aneksyna V / PI

FL1 – intensywność fluorescencji FITC, skoniugowanej z aneksyną V; **FL3** – intensywność fluorescencji jodku propidyny.

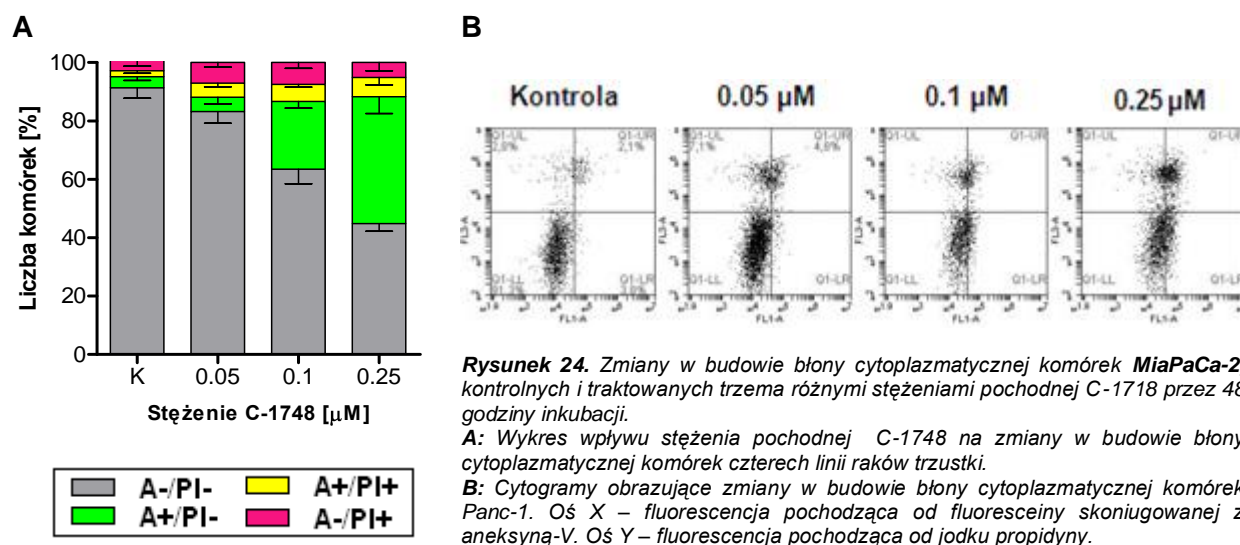
- A-/PI-** komórki żywe
- A+/PI-** komórki wczesnoapoptotyczne
- A+/PI+** komórki późnoapoptotyczne, nekrotyczne oraz ulegające katastrofie mitotycznej
- A-/PI+** komórki nekrotyczne

4.6.1. Komórki linii Panc-1



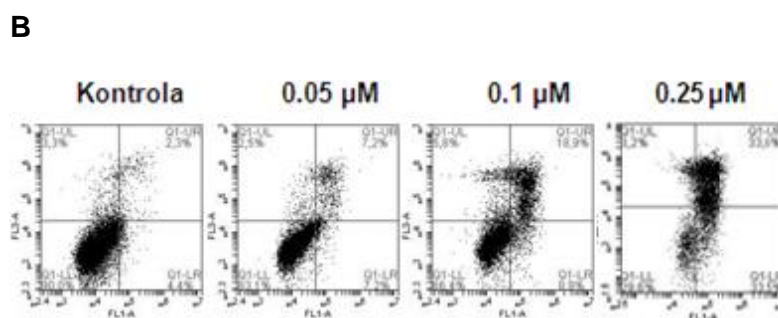
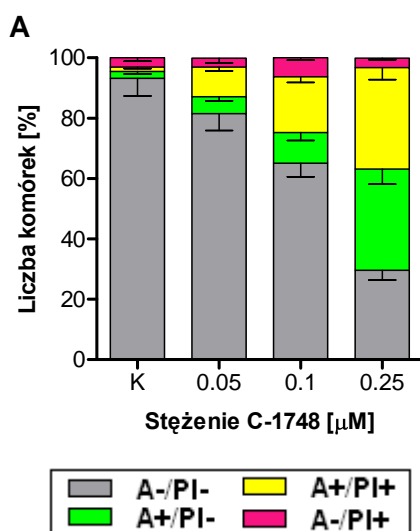
W przypadku komórek linii Panc-1 pochodna C-1748 indukowała pierwsze zmiany w budowie błony plazmatycznej już przy stężeniu związku równym 0,05 μM . Populacja komórek wczesnoapoptotycznych (A+/PI-) wzrosła wówczas do ok. 10 % w stosunku do komórek nietraktowanych związkiem. Przy stężeniu pochodnej C-1748 równym 0,1 μM , ilość komórek tej frakcji spadła o ponad połowę, czemu towarzyszył wzrost ilości komórek późnoapoptotycznych (24 %) wybarwionych zarówno aneksyną jak i jodkiem propidyny. Równocześnie, wraz ze wzrostem stężenia związku, przybywało komórek nekrotycznych, których najwięcej obserwowałam przy stężeniu pochodnej C-1748 równym 0,1 μM . Inkubacja komórek Panc-1 ze związkiem o stężeniu równym 0,25 μM , skutkowała znacznym wzrostem ilości komórek wczesnoapoptotycznych do wartości równej ok. 45 % (rysunek 23).

4.6.2. Komórki linii MiaPaCa-2



Pierwsze zmiany w budowie błony plazmatycznej komórek linii MiaPaCa-2 pojawiły się już przy zastosowaniu najniższego stężenia pochodnej C-1748 równego 0,05 μM . Ilość komórek wczesnoapoptotycznych (A+/PI-) wynosiła wówczas ok. 7 %. Wraz ze wzrastającym stężeniem związku przybywało komórek późnoapoptotycznych (A+/PI+), wybarwionych aneksyną i jodkiem propidyny oraz komórek nekrotycznych, wybarwionych jedynie jodkiem propidyny (A-/PI+). Przy stężeniu pochodnej C-1748 równym 0,25 μM populacja komórek wczesnoapoptotycznych wynosiła już ok. 50 %. Z kolei ilość komórek nekrotycznych wzrosła ok. trzykrotnie w porównaniu do ilości tych komórek w kontroli. Komórki późnoapoptotyczne stanowiły ok. 10 % całkowitej populacji komórek MiaPaCa-2 poddanych działaniu pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,25 μM (rysunek 24).

4.6.3. Komórki linii BxPC-3



Rysunek 25. Zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej komórek **BxPC-3**, kontrolnych i traktowanych trzema różnymi stężeniami pochodnej C-1718 przez 48 godzin inkubacji.

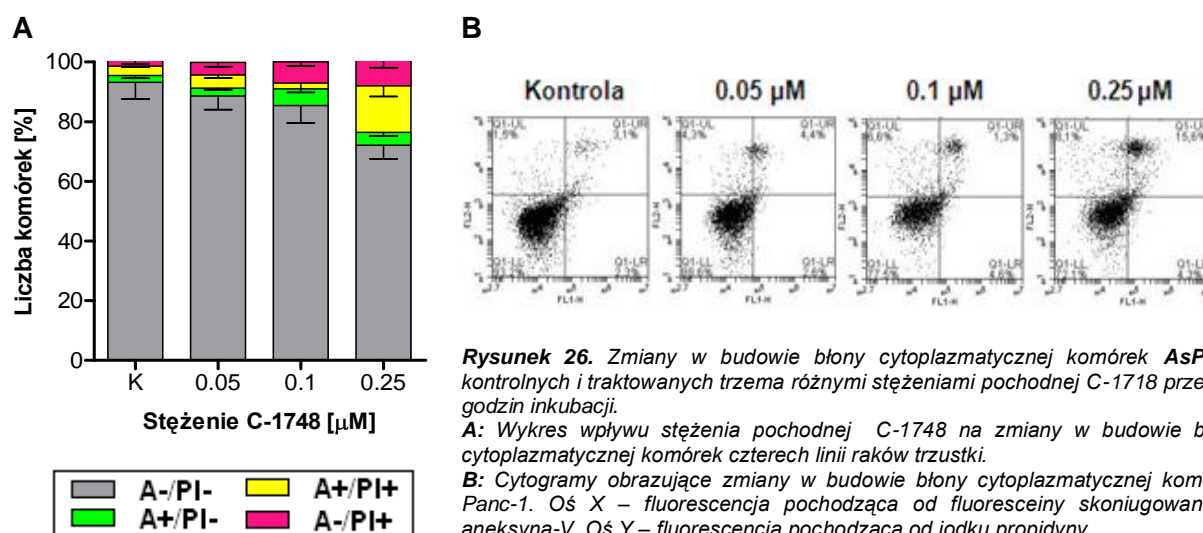
A: Wykres wpływu stężenia pochodnej C-1748 na zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej komórek czterech linii raków trzustki.

B: Cytogramy obrazujące zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej komórek Panc-1. Oś X – fluorescencja pochodząca od fluoresceiny skoniugowanej z aneksyną-V. Oś Y – fluorescencja pochodząca od jodku propidyny.

Pochodna C-1748 indukowała istotne zmiany w budowie błony plazmatycznej komórek linii BxPC-3. Już przy stężeniu związku równym 0,05 μM obserwowałam wzrost populacji komórek apoptotycznych wybarwionych aneksyną (A+/PI-) oraz późnoapoptotycznych wybarwionych aneksyną i jodkiem propidyny (A+/PI+). Dwukrotny wzrost stężenia pochodnej C-1748 spowodował dalszy przyrost ilości komórek apoptotycznych. Przy stężeniu związku równym 0,25 μM obserwowałam gwałtowny wzrost populacji komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych których sumaryczna ilość wynosiła ok. 70 %. Frakcja komórek nekrotycznych utrzymywała się na stałym, niskim poziomie (ok. 4 %) niezależnie od zastosowanego stężenia związku (rysunek 25).

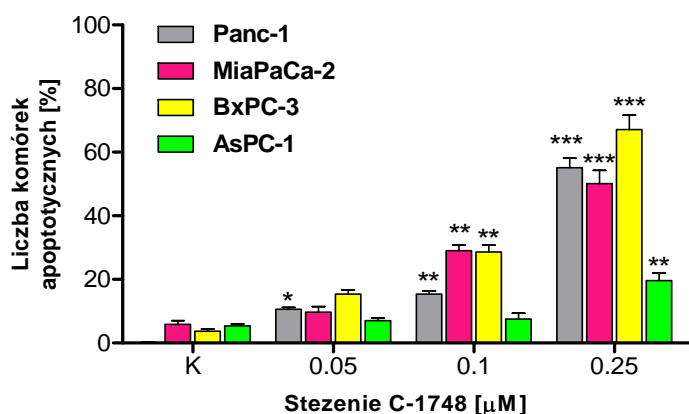
4.6.4. Komórki linii AsPC-1

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że pochodna C-1748 indukowała niewielkie zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej komórek linii AsPC-1. Inkubując komórki z trzema różnymi stężeniami związku obserwowałam niewielką ilość komórek wczesnoapoptotycznych, późnoapoptotycznych, czy nekrotycznych (jedynie kilka do kilkunastu procent). Przy stężeniu pochodnej C-1748 równym 0,1 μM obserwowałam nieznaczny wzrost (do ok. 7 %) liczby komórek wybarwionych aneksyną (A^+/PI^-). Populacja komórek wczesnoapoptotycznych wahała się w granicach kilku procent bez względu na zastosowane stężenie pochodnej C-1748. Przy zastosowaniu wyższego stężenia związku (0,25 μM) obserwowałam natomiast wzrost ilości komórek późnoapoptotycznych (A^+/PI^+). Ilość komórek AsPC-1 z zachowaną integralnością błony komórkowej wciąż była bardzo wysoka pomimo ekspozycji na wzrastające stężenie związku.



4.6.5. Podsumowanie

Cytometryczna analiza zmian zachodzących w budowie błony plazmatycznej komórek czterech badanych linii raka trzustki, po 48 godzinnej inkubacji z pochodną C-1748 o trzech różnych stężeniach pokrywała się z wynikami uzyskanymi z obserwacji mikroskopowych zmian w morfologii jąder komórkowych i potwierdziła różną wrażliwość komórek poszczególnych linii raka trzustki na działanie związku. Na wykresie 10 przedstawiłam wpływ wzrastającego stężenia pochodnej C-1748 na ilość komórek apoptotycznych (zarówno A^+/PI^- jak i A^+/PI^+) czterech badanych linii raka trzustki.



Wykres 10. Wykres przedstawiający odsetek komórek apoptotycznych (A+/PI-; A+/PI+) w całkowitej populacji komórek czterech linii raków trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748 o trzech różnych stężeniach. Czas inkubacji komórek ze związkiem: 48 godzin.

Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.

Uzyskane wyniki wskazują, że pochodna C-1748 najsilniej indukowała apoptozę w komórkach linii BxPC-3, co szczególnie można było zaobserwować przy stężeniu związku równym 0,25 μM, gdzie populacja komórek BxPC-3 umierających na drodze apoptozy wynosiła ok. 70 %. Związek zastosowany w stężeniu równym 0,25 μM indukował istotne zmiany również w przypadku komórek pozostałych trzech linii raka trzustki. Ilość komórek apoptotycznych wzrosła wówczas gwałtownie do wartości 60 % dla komórek Panc-1 oraz ok. 55 % dla komórek linii MiaPaCa-2. Komórki linii AsPC-1 były najbardziej odporne na działanie pochodnej C-1748 nawet przy najwyższym zastosowanym stężeniu związku.

4.7. Określenie zdolności pochodnej C-1748 do indukcji przyspieszonego starzenia komórkowego w komórkach czterech linii raka trzustki

W poprzednich eksperymentach wykazałam, że część komórek raka trzustki nawet po długich czasach inkubacji (192 godz.) z pochodną C-1748 o stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} , wciąż pozostaje żywa, co szczególnie miało miejsce w przypadku komórek linii AsPC-1. Celem kolejnego eksperymentu było sprawdzenie, czy komórki które pozostają żywe ulegają przyspieszonemu starzeniu komórkowemu.

W komórkach starzejących się dochodzi do podwyższonej aktywności i ekspresji enzymu SA-β-galaktozydazy, uwalnianego do cytoplazmy. Aktywność tego enzymu można zbadać dodając do pożywki jego substrat, jakim jest X-gal, ponieważ w pH równym 6,0 cytozolowa SA-β-galaktozydaza rozkłada X-gal na niebieski produkt widoczny pod mikroskopem świetlnym. Komórki starzejące się charakteryzują się ponadto zmienioną morfologią: są powiększone, mają wydłużony kształt i liczne ziarnistości w cytoplazmie.

Przedstawione poniżej wyniki są reprezentatywne dla dwóch powtórzeń wykonanego eksperymentu. Badania przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.9.

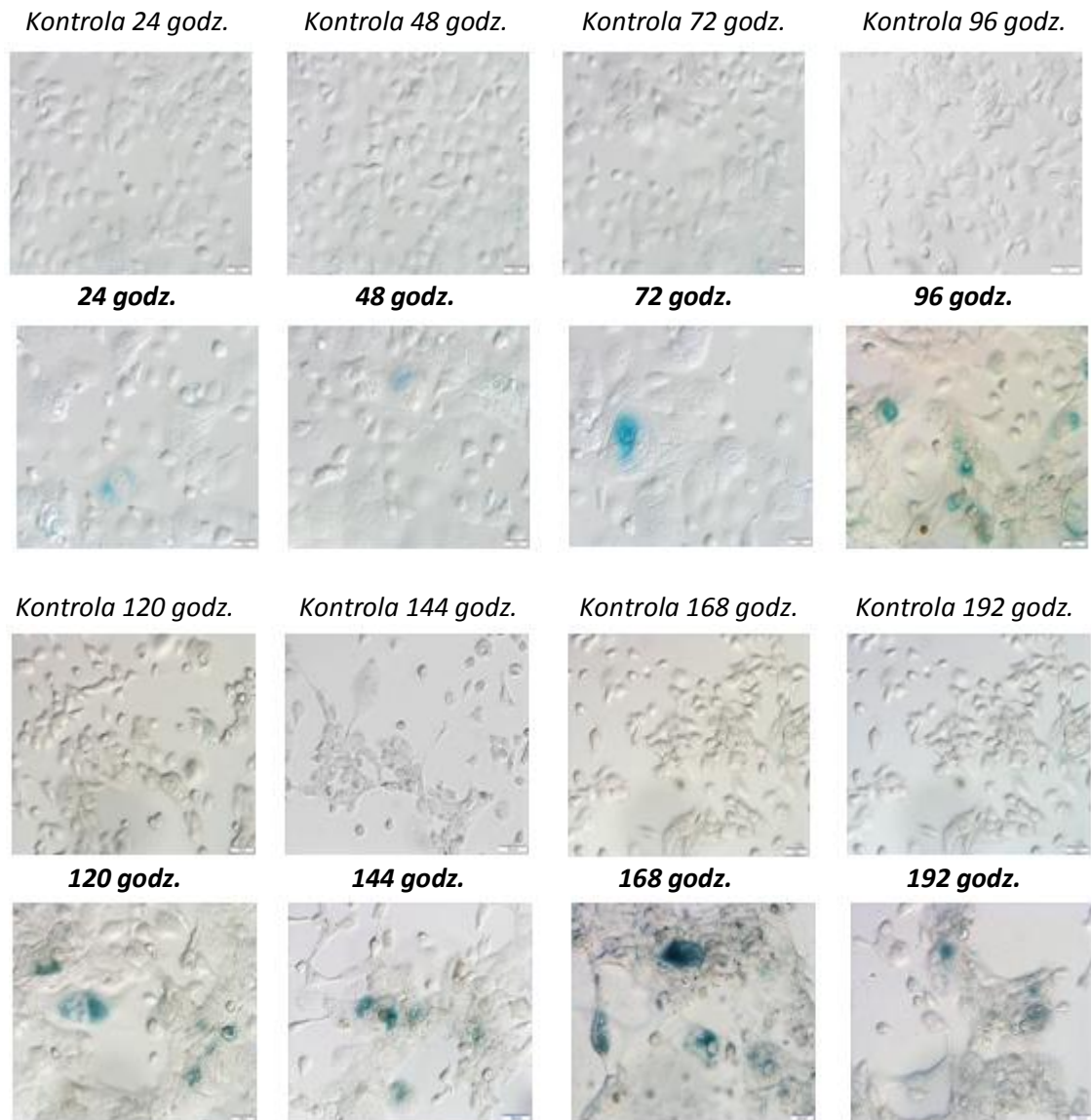
Analiza zdjęć mikroskopowych, wykazała, że inkubacja komórek czterech linii raka trzustki z pochodną C-1748 o stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} prowadziła do indukcji

przyspieszonego starzenia komórkowego jedynie w przypadku komórek linii AsPC-1. W przypadku komórek linii Panc-1, po 72 godz. inkubacji obserwowałam jedynie pojedyncze komórki o niebieskim zabarwieniu, jednak ich kształt był prawidłowy i zbliżony do kształtu komórek kontrolnych. Obecne były za to komórki powiększone, ale nie obserwowałam komórek o wydłużonym kształcie. Komórki linii BxPC-3 w ogóle nie ulegały procesowi przyspieszonego starzenia. Na skutek wydłużonej inkubacji ze związkiem malała jedynie ich ilość w stosunku do komórek kontrolnych. W przypadku komórek linii MiaPaCa-2, po 72 godzinnej ekspozycji na działanie pochodnej C-1748 obserwowałam zmieniony kształt komórek (powiększone, wydłużone) w porównaniu do komórek kontrolnych i liczne ziarnistości, jednak bez obecności niebieskiego zabarwienia charakterystycznego dla produktu powstającego po rozkładzie X-galu przez SA- β -galaktozydazę (rysunek 27).



Rysunek 27. Wpływ pochodnej C-1748 na zdolność do indukcji przyspieszonego stężenia komórkowego w komórkach trzech linii raka trzustki. Zdjęcia wykonałam pod mikroskopem świetlnym pod powiększeniem 20x.

Na rysunku 28 przedstawiłam zdjęcia ukazujące wpływ pochodnej C-1748 na indukcję procesu przyspieszonego starzenia komórkowego w komórkach linii AsPC-1, ponieważ tylko w tych komórkach doszło do indukcji tego procesu w wyniku działania związku. Dodatkowo, przedstawiłam również zdjęcia preparatów z komórkami kontrolnymi, nietraktowanymi związkiem, aby wykazać, że starzenie komórek AsPC-1 jest wynikiem działania związku, a nie braku składników odżywczych na skutek zbyt długiej inkubacji, czy nadmiernego zagęszczenia komórek.

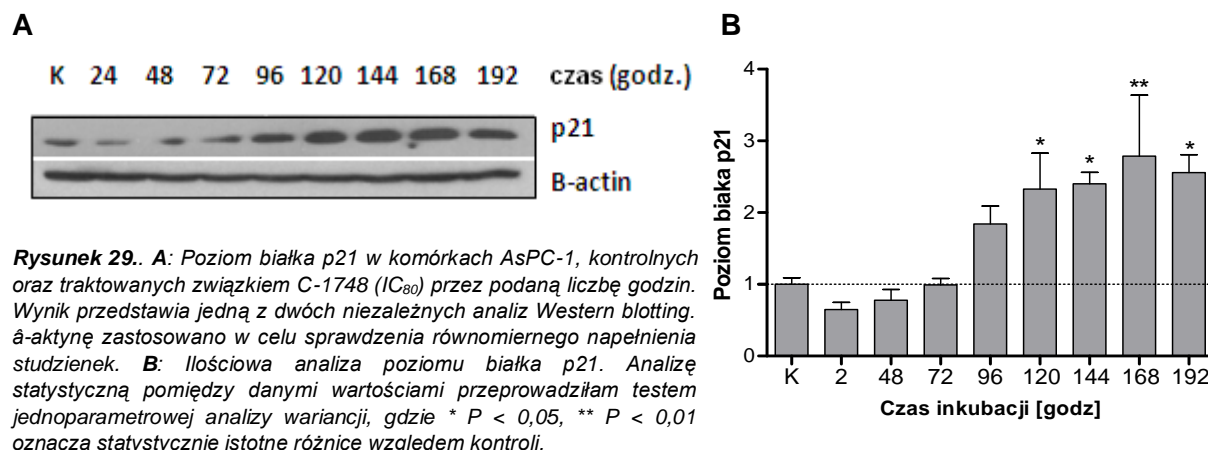


Rysunek 28. Wpływ pochodnej C-1748 na zdolność do indukcji przyspieszonego stężenia komórkowego w komórkach nowotworowych trzustki AsPC-1. Zdjęcia wykonana pod mikroskopem świetlnym pod powiększeniem 20x.

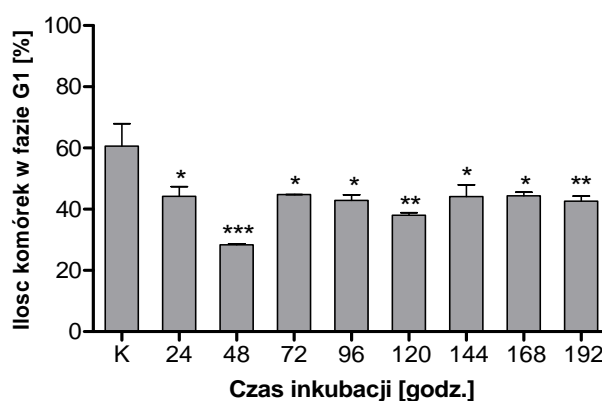
Analiza zdjęć mikroskopowych, wykazała, że inkubacja komórek AsPC-1 z pochodną C-1748 (stężenie odpowiadające wartości IC_{80}) prowadzi do indukcji przyspieszonego starzenia komórkowego. Począwszy od 24 godz. inkubacji ze związkiem obserwowałam pojedyncze komórki o niebieskim zabarwieniu pochodzącym od rozkładu X-galu przez SA- β -galaktozydazę. Komórki te były znacznie powiększone w porównaniu do komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem). Na skutek wydłużonej inkubacji z pochodną C-1748 ilość starzejących się komórek stopniowo wzrastała.

Wyniki mikroskopowej analizy zmian w morfologii komórek AsPC-1 poparałam również analizą western blotting poziomu ekspresji białka p21, będącego produktem genu ulegającego podwyższonej ekspresji w komórkach starzejących się. Produkt białkowy genu p21 jest inhibitorem cyklino-zależnych kinaz, takich jak CDK2 oraz CDK1. Zahamowanie

aktywności wspomnianych kinaz prowadzi do zatrzymania progresji komórek odpowiednio w fazie G1 lub G2/M cyklu życiowego, co jest niezbędne dla uruchomienia procesu starzenia.



Wyniki analizy western blotting wskazały na wzrost poziomu ekspresji białka p21 po 72 godzinach inkubacji ze związkiem (rysunek 29). Poziom tego białka wyraźnie wzrastał (w stosunku do komórek kontrolnych) w miarę wydłużenia czasu inkubacji z pochodną 1-nitroakrydyny. Obecność aktywnego białka p21 w komórkach kontrolnych (nie traktowanych związkiem) wynika z tego, że w komórkach nowotworowych trzustki większość genów kontrolujących proliferację i funkcje życiowe komórki ulega mutacji, co prowadzi do zwiększonego poziomu niektórych onkogenów lub genów supresorowych w komórce.



Wykres 11. Liczba komórek AsPC-1 znajdująca się w fazie G1 cyklu życiowego po inkubacji z pochodną C-1748 (stężenie IC_{80}). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.

Zmianom w morfologii komórek linii AsPC-1 wskazującym na indukcję procesu starzenia komórkowego, a także zwiększonej ekspresji białka p21 towarzyszyły zmiany zachodzące w cyklu życiowym komórek AsPC-1 traktowanych pochodną C-1748 (wykres 11). Począwszy od 72 godz. inkubacji komórek ze związkiem dochodziło do trwałej akumulacji znacznej populacji komórek AsPC-1 w fazie G1 cyklu życiowego, co jest kolejną cechą komórek starzejących się.

4.8. Badanie wpływu pochodnej C-1748 na proces autofagii w komórkach czterech linii raka trzustki

Komórki raka trzustki charakteryzują się wysokim, wyjściowym poziomem autofagii, co koreluje ze złym rokowaniem u pacjentów cierpiących na ten nowotwór [Hashimoto i wsp., 2014]. Wysoki poziom autofagii wynikać może z warunków jakie panują we wnętrzu guza, a głównie z niedotlenienia zwanego hipoksją, która jest jedną z cech warunkujących złośliwość nowotworu. Brak składników odżywczych, anaerobowe warunki panujące we wnętrzu guza oraz słabe ukrwienie powodują, że proces glikolizy, dostarczający komórkom energii nie jest wydajny. Pociąga to za sobą konieczność istnienia alternatywnego szlaku metabolicznego, który dostarczy komórkom energii, gdy zapasy tlenu i glukozy będą niewystarczające. W takiej sytuacji, proces autofagii prowadzi do kompletnej i nieodwracalnej degradacji wielkocząsteczkowych substratów przy udziale enzymów lizosomalnych. Ponadto, lizosomy w procesie autofagii biorą również udział w degradacji organelli komórkowych, takich jak: mitochondria i peroksosomy, fragmenty aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej [Lemasters i wsp., 2002]. Badania wskazują również, że wysoki poziom autofagii w komórkach raka trzustki może być związany z mutacją w genie *KRAS* [Bryant i wsp., 2014]. Wykazano, że w wyniku zastosowania chemicznego inhibitora autofagii - chlorochiny, dochodziło do zahamowania proliferacji i śmierci komórek ze zmutowaną formą tego genu na skutek nadmiernej akumulacji reaktywnych form tlenu (ROS) oraz uszkodzeń DNA [Bryant i wsp., 2014].

Proces autofagii może ulegać modulacji przez chemoterapeutyki. Wykazano bowiem, że w wyniku działania gemcytabiny i 5-fluorouracylu, chemoterapeutyków stosowanych w leczeniu raka trzustki, dochodziło do wzrostu poziomu autofagii w komórkach Panc-1 i BxPC-3, co wiązało się ze wzrostem ich oporności na te leki [Hashimoto i wsp., 2014].

Biorąc pod uwagę kluczową rolę autofagii w proliferacji komórek nowotworowych trzustki postanowiłam sprawdzić, jaki wpływ na proces autofagii w komórkach badanych linii raka trzustki będzie miała pochodna C-1748. W tym celu, w pierwszym etapie badań przeprowadziłam mikroskopowe obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli komórkowych (*ang. acidic vesicular organelles, AVO's*), w komórkach linii Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 oraz AsPC-1, poddanych działaniu pochodnej C-1748 i wybarwionych oranżem akrydyny.

Oranż akrydyny, w formie nieposiadającej ładunku elektrycznego, łatwo przenika przez błony biologiczne. Następnie jest akumulowany w kwaśnych organellach (w wyniku jego protonowania), gdzie tworzy agregaty, które emitują światło w zakresie fluorescencji czerwonej. Przyrost ilości kwaśnych organelli (a tym samym czerwonej fluorescencji), w stosunku do komórek nietraktowanych badanym związkiem, może świadczyć o indukcji

procesu autofagii, podczas gdy sytuacja odwrotna wskaże na zdolność związku do hamowania tego procesu [Mizushima i wsp., 2010].

Ze względu na wysoki, wyjściowy poziom autofagii w przypadku komórek wszystkich czterech badanych linii raka trzustki, analiza zmian intensywności fluorescencji pochodzącej od oranżu akrydyny w tychże komórkach pozwoliła jedynie na analizę jakościową. W związku z tym, w kolejnym eksperymencie, z zastosowaniem metody western blotting zbadałam przemiany białka LC3 jako jednego z markerów procesu autofagii [Mizushima i wsp., 2010]. W czasie przebiegu autofagii obecna w cytozolu forma LC3-I białka LC3 zostaje zmodyfikowana do postaci lipidowej: LC3-II, której poziom skorelowany jest z ilością autofagosomów. Analiza poziomu ekspresji białka LC3-II przy użyciu metody western blotting pozwoliła mi dokładniej zbadać wpływ pochodnej C-1748 na przebieg procesu autofagii w komórkach nowotworowych trzustki.

Mikroskopową analizę zmian w ilości kwaśnych organelli przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt 6.3.10., natomiast poziom ekspresji białka metodą western blotting przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.13. Każdy eksperyment przeprowadziłam dwukrotnie.

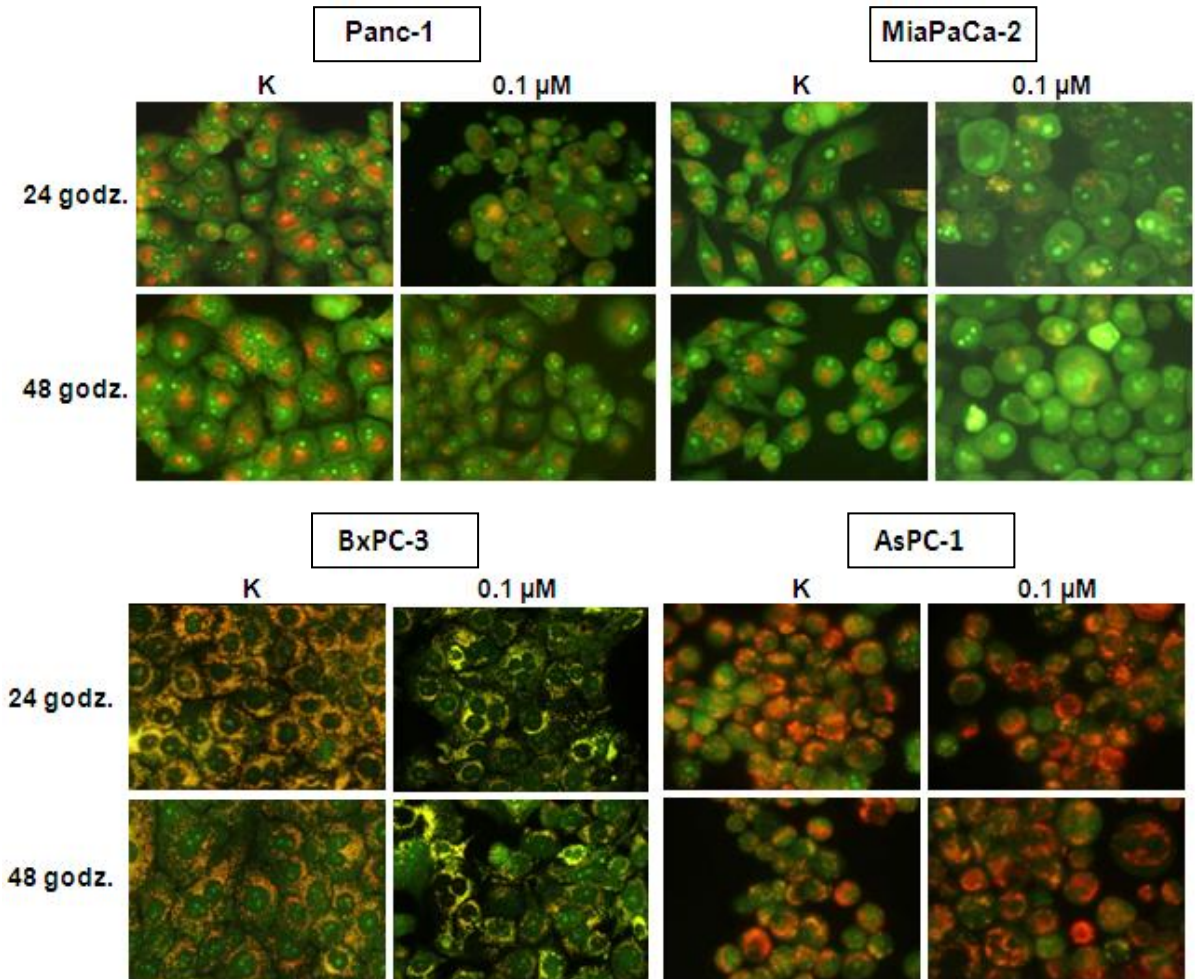
4.8.1. Mikroskopowa analiza ilości kwaśnych organelli (AVO's) w komórkach czterech linii raka trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748

Na rysunku 30 przedstawiłam wyniki mikroskopowej analizy zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 oraz AsPC-1 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM .

Stężenie związku równe 0,1 μM wybrałam ze względu na fakt, że przy tym stężeniu możliwe było wychwycenie różnic w działaniu związku w stosunku do komórek czterech badanych linii raka trzustki. Ponadto, jest to pośrednie stężenie spośród tych, które do tej pory stosowałam (IC_{80} , 0,05 μM , 0,1 μM , 0,25 μM). W zależności od rodzaju komórek, stężenia związku równe IC_{80} oraz 0,05 μM były zbyt niskie do ujawnienia aktywności pochodnej C-1748. Natomiast przy stężeniu związku równym 0,25 μM , większość komórek ulegała już śmierci.

Na zamieszczonych poniżej zdjęciach, widać, że w komórkach kontrolnych wszystkich czterech linii raka trzustki poziom autofagii jest wysoki, o czym świadczy pomarańczowa fluorescencja pochodząca od oranżu akrydyny. W wyniku działania pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM , już po 24 godzinach inkubacji obserwowałam niewielki spadek intensywności pomarańczowej fluorescencji oranżu akrydyny w komórkach linii Panc-1, MiaPaCa-2 i BxPC-3, co wskazuje na hamowanie procesu autofagii przez związek w tychże komórkach. Po 48 godzinach inkubacji zmiany te były jeszcze bardziej

zauważalne. Największy spadek w ilości kwaśnych organelli obserwowałam w przypadku komórek linii MiaPaCa-2 i BxPC-3. Komórki linii AsPC-1, w odróżnieniu od komórek pozostałych trzech badanych linii raka trzustki nie wykazywały spadku ilości AVO's pod wpływem działania związku. W tym przypadku fluorescencja oranżu akrydyny w komórkach traktowanych pochodną C-1748 była podobna do fluorescencji obserwowanej w komórkach nietraktowanych związkiem.



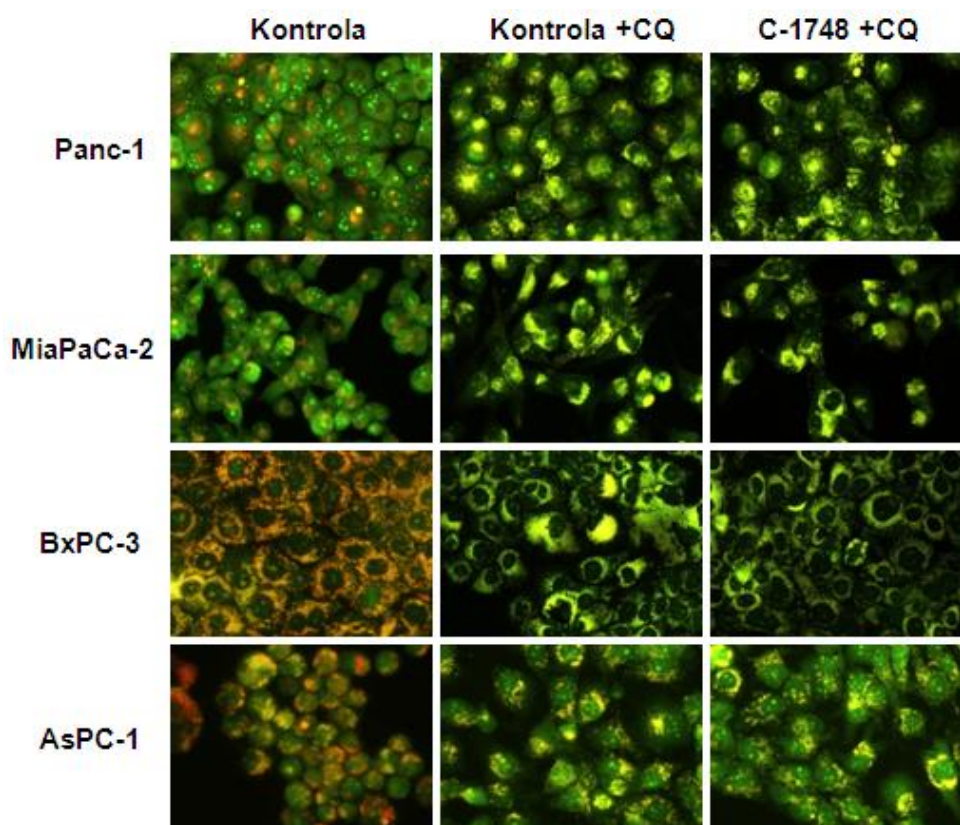
Rysunek 30. Obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach czterech linii raka trzustki, kontrolnych i traktowanych C-1748 o stężeniu równym $0,1 \mu\text{M}$ przez 24 i 48 godz.

Z doniesień literaturowych wynika, że równoczesne zastosowanie chemoterapeutyków takich jak np. gemcytabina, czy 5-fluorouracyl w kombinacji z inhibitorami autofagii (np. chlorochiną), wzmacniało ich cytotoksyczne i antyproliferacyjne działanie i powodowało śmierć komórek [Hashimoto i wsp., 2014]. Biorąc to pod uwagę, w kolejnym etapie badań postanowiłam sprawdzić działanie pochodnej C-1748 w kombinacji z dwoma inhibitorami autofagii: chlorochiną (o stężeniu $20 \mu\text{M}$) oraz wortmaniną (o stężeniu $2 \mu\text{M}$). Oba inhibitory działają na różnych etapach procesu autofagii. Wortmanina (W) jest wczesnym inhibitorem autofagii, hamującym ten proces na etapie inicjacji [Tanida i wsp., 2011]. Natomiast chlorochina (CQ), hamuje proces autofagii na jej końcowym etapie: fuzji

zewnątrznej błony autofagosomu z lizosomem, zapobiegając tym samym degradacji autolizosomu przez enzymy lizosomalne i uwolnieniu jego zawartości do cytoplazmy [Tanida i wsp., 2011]. Chlorochina zwiększa ponadto pH wewnątrz lizosomów oraz hamuje aktywność enzymów hydrolitycznych: sulfatazy arylowej i katepsyny B [Bhattacharyya i wsp., 2009; MacGregor i wsp., 1979]. Na podstawie zmian fluorescencji oranżu akrydyny z barwy czerwonej (prawidłowe lizosomy) do barwy zielonożółtej (lizosomy o podwyższonym pH) można określić kwasowość środowiska wewnątrz lizosomów.

4.8.2. Wpływ kombinacji pochodnej C-1748 z chlorochiną na proces autofagii w komórkach czterech linii raka trzustki

Na rysunku 31 przedstawiłam wyniki uzyskane z mikroskopowej analizy zmian zachodzących w komórkach czterech linii raka trzustki wybarwionych oranżem akrydyny i poddanych działaniu chlorochiny (20 μM) w kombinacji z pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM .

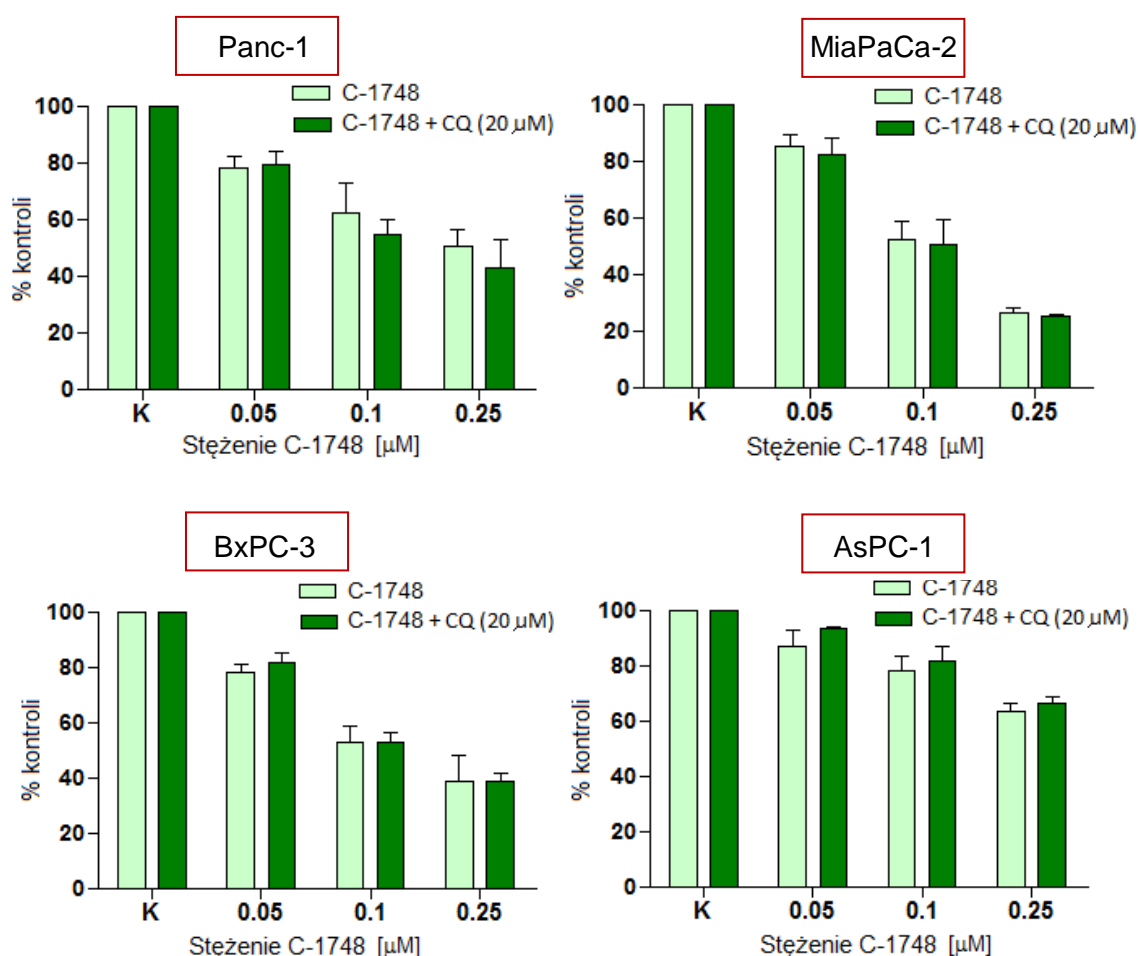


Rysunek 31. Przykładowe zdjęcia ukazujące zmiany intensywności fluorescencji oranżu akrydyny w komórkach czterech linii raka trzustki, kontrolnych, traktowanych jedynie CQ o stężeniu równym 20 μM , lub CQ (20 μM) w połączeniu z pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM przez 24 godz. inkubacji.

Morfologia komórek nowotworowych trzustki wybarwionych oranżem akrydyny i traktowanych chlorochiną wykazała powiększenie lizosomów, ze znacznym wzrostem

zielonej fluorescencji wskazującej na obrzęk lizosomów i wzrost pH wewnątrz organelli. Zgodnie z danymi literaturowymi, chlorochina stosowana w stężeniu równym 20 μM hamowała autofagię w komórkach Panc-1 oraz BxPC-3, co wykazał wcześniej Hashimoto i wsp. [Hashimoto i wsp., 2014]. Przeprowadzone przeze mnie obserwacje mikroskopowe wskazują na zahamowanie autofagii w komórkach czterech badanych linii raka trzustki. Zastosowanie inhibitora w połączeniu z pochodną C-1748 nie wpłynęło w istotny sposób na wzrost zahamowania procesu autofagii w porównaniu do działania samego C-1748.

W kolejnym etapie sprawdziłam, czy kombinacja chlorochiny i C-1748 wzmocni cytotoksyczne działanie pochodnej 1-nitroakrydyny.



Rysunek 32. Wykresy zahamowania wzrostu komórek czterech linii raków trzustki, traktowanych C-1748 w połączeniu z chlorochiną o stężeniu równym 20 μM przez 24 godz.

Analiza danych uzyskanych z pomiaru aktywności cytotoksycznej chlorochiny i pochodnej C-1748 w stosunku do komórek nowotworowych trzustki wykazała, że kombinacja związków nie wywierała synergistycznego efektu w porównaniu do zastosowania samej pochodnej 1-nitroakrydyny, bez obecności inhibitora autofagii (rysunek 32). Ponieważ chlorochina jest inhibitorem końcowych etapów autofagii, a kombinacja C-1748 z CQ nie

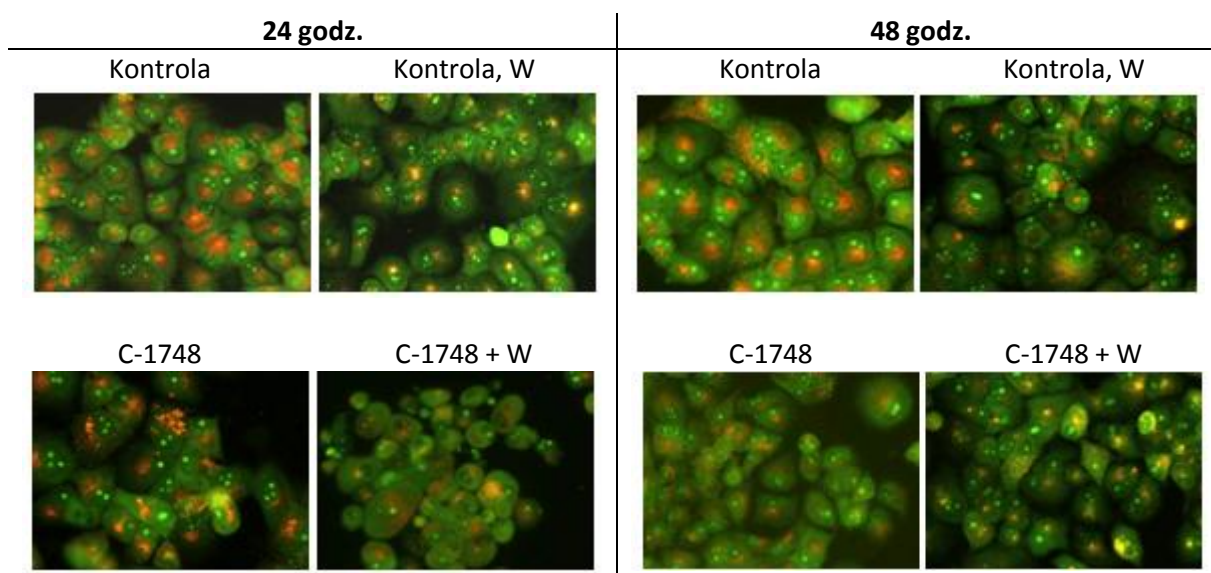
zwiększyła aktywności cytotoksycznej 1-nitroakrydyny można przypuszczać, że hamowanie końcowych etapów autofagii nie jest istotne dla aktywności biologicznej C-1748.

Dysfunkcja lizosomów, bez niszczenia komórek może być efektem działania specyficznych związków i określana jest jako fosfolipidoza lizosomalna. Niektóre organiczne aminy, takie jak np. chlorochina, amiodaron, perheksylina, czy aminoglikozydy gromadzą się w kwaśnym środowisku lizosomów i endosomów i powodują akumulację składników błon komórkowych oraz obrzęk i zaburzenia funkcji lizosomów [Van Dyke, 1996].

4.8.3. Wpływ kombinacji pochodnej C-1748 z chlorochiną na proces autofagii w komórkach czterech linii raka trzustki

Ponieważ chlorochina w zastosowanym przez mnie stężeniu równym 20 μM , pomimo zahamowania autofagii nie wywierała znaczącego efektu cytotoksycznego w kombinacji z pochodną C-1748, większość eksperymentów, których wyniki opisałam w dalszej części pracy przeprowadziłam z inhibitorem wczesnych etapów autofagii - wortmaniną.

4.8.3.1. Komórki linii Panc-1

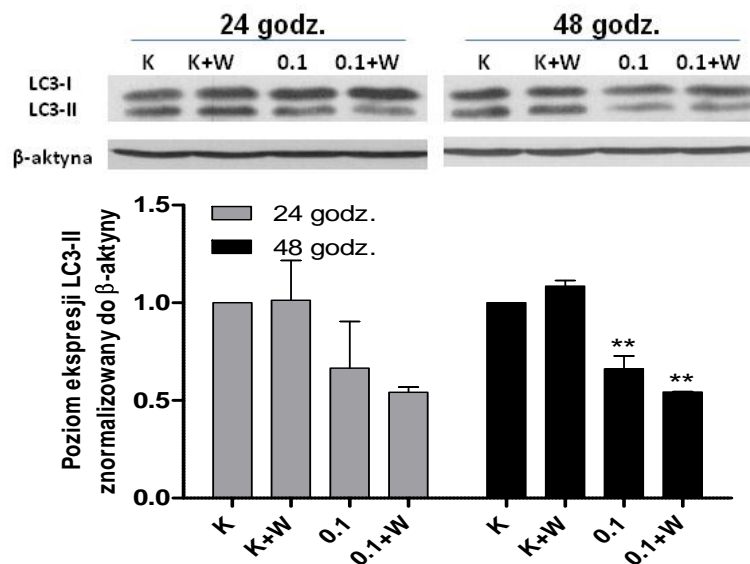


Rysunek 33. Obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach Panc-1, kontrolnych i traktowanych C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM lub C-1748 (0,1 μM) w kombinacji z wortmaniną o stężeniu równym 2 μM przez 24 i 48 godz.

Mikroskopowa analiza zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach Panc-1 wstępnie wykazała, że pod wpływem działania pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM dochodziło do zmniejszenia ilości kwaśnych organelli komórkowych w porównaniu do kontroli

(komórki nietraktowane związkiem), zarówno po 24 jak i 48 godzinach inkubacji ze związkiem. Komórki traktowane wortmaniną o stężeniu równym $2 \mu\text{M}$ i wybarwione oranżem akrydyny, również wykazały niewielki spadek ilości kwaśnych organelli (AVO's) o czym świadczył spadek intensywności fluorescencji pochodzącej od oranżu akrydyny. Jednoczesne potraktowanie komórek Panc-1 pochodną C-1748 i wortmaniną wywierało silniejszy efekt niż w przypadku zastosowania samego związku, czy inhibitora autofagii, co szczególnie było widoczne po 48 godzinach inkubacji (rysunek 33). Wówczas ilość kwaśnych organelli i intensywność fluorescencji oranżu akrydyny wyraźnie zmalała w stosunku do komórek kontrolnych.

Ponieważ obserwacje mikroskopowe komórek nowotworowych o wysokim, wyjściowym poziomie autofagii nastrożają wiele trudności i nie pozwalają na jednoznaczną ocenę wpływu związku na przebieg procesu autofagii, w następnym eksperymencie, metodą western blotting zbadalam przemiany białka LC3, będącego jednym z markerów procesu autofagii (rysunek 34).

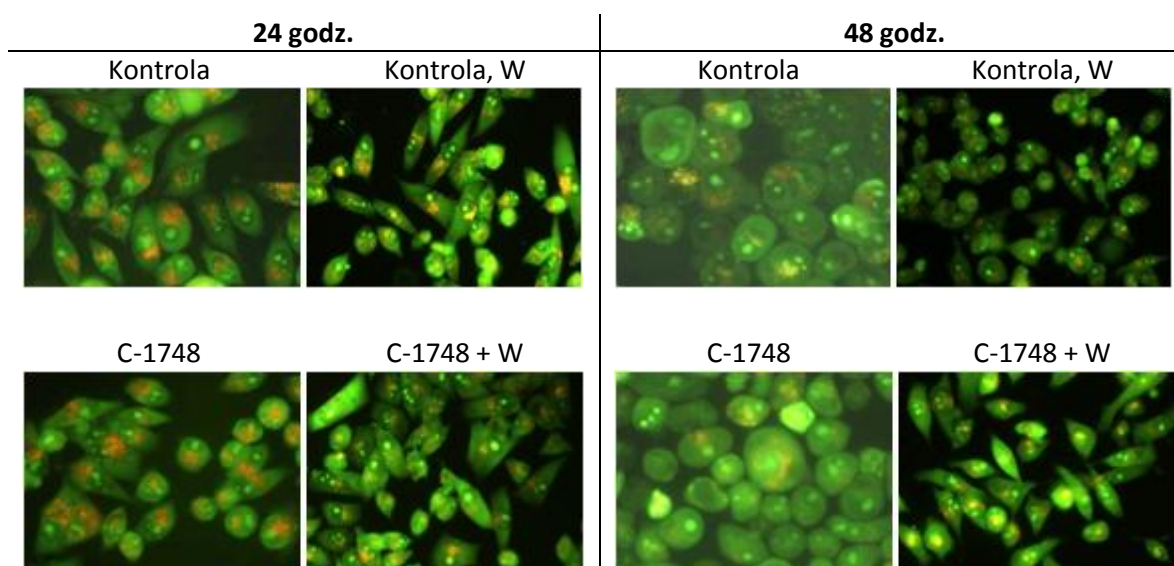


Rysunek 34. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka LC3-II w komórkach Panc-1, traktowanych pochodną C-1748 ($0,1 \mu\text{M}$) oraz wortmaniną ($2 \mu\text{M}$). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie ** $P < 0,01$, oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.

Analiza western blotting wykazała, że w komórkach Panc-1 nie dochodziło do zahamowania autofagii w wyniku działania jej inhibitora: wortmaniny o stężeniu $2 \mu\text{M}$. Zarówno po 24 godz. jak i po 48 godz. inkubacji ze związkiem nie obserwowałam zaniku formy LC3-II białka, co świadczyłoby o zahamowaniu procesu autofagii. Obie formy białka LC3 były obecne w komórkach na poziomie zbliżonym do poziomu w komórkach kontrolnych. Z kolei, zarówno po 24 godz. jak i po 48 godz. traktowania komórek Panc-1 pochodną C-1748 o stężeniu równym $0,1 \mu\text{M}$, dochodziło do przyrostu formy LC3-I białka, przy równoczesnym spadku ilości formy LC3-II białka (spadek o ok. 35 % w stosunku do

kontroli), co wskazuje na zmniejszenie ilości autofagosomów i zahamowanie procesu autofagii przez związek. Ponadto, zastosowanie pochodnej C-1748 (stężenie 0,1 μM) w kombinacji z wortmaniną (stężenie 2 μM) wykazało synergistyczne działanie związków w stosunku do komórek linii Panc-1. Kombinacja obydwu związków dawała silniejszy efekt hamowania procesu autofagii, niż każdy z nich zastosowany osobno (spadek ilości autofagosomów o 50 % w stosunku do kontroli), co można było zaobserwować szczególnie po 48 godz. inkubacji komórek ze związkami.

4.8.3.2. Komórki linii MiaPaCa-2

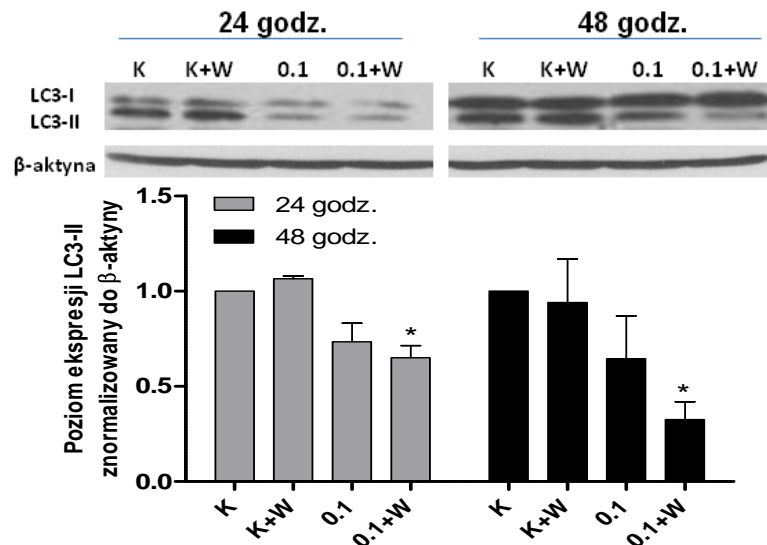


Rysunek 35. Obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach MiaPaCa-2, kontrolnych i traktowanych C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM lub C-1748 (0,1 μM) w kombinacji z wortmaniną o stężeniu równym 2 μM przez 24 i 48 godz.

Obserwacje mikroskopowe akumulacji oranżu akrydyny w kwaśnych organellach komórek linii MiaPaCa-2 wykazały, że zarówno w wyniku działania pochodnej C-1748 jak i wortmaniny dochodziło do obniżenia ilości kwaśnych organelli w porównaniu do komórek kontrolnych, o czym świadczył spadek intensywności fluorescencji pochodzącej od oranżu akrydyny, widoczny szczególnie po 48 godzinach inkubacji ze związkiem. Kombinacja dwóch związków, podobnie jak w przypadku komórek linii Panc-1, wywierała silniejszy efekt hamujący autofagię niż zastosowanie każdego z nich pojedynczo (rysunek 35).

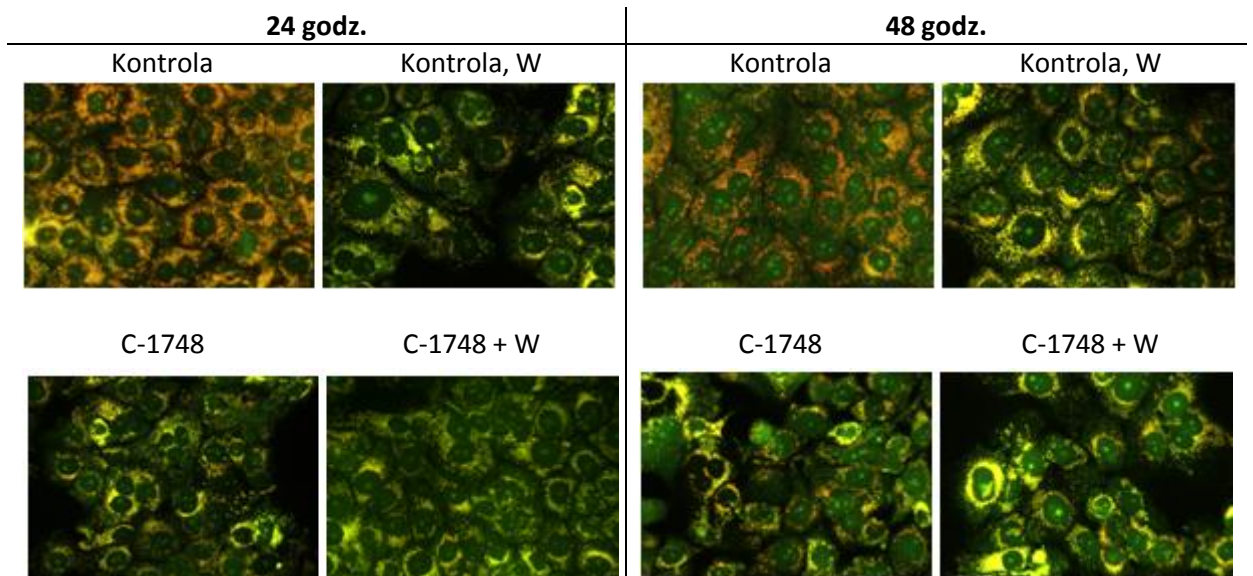
Podobnie jak w przypadku komórek linii Panc-1, w wyniku traktowania komórek linii MiaPaCa-2 pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM dochodziło do spadku poziomu formy lipidowej białka LC3, począwszy od 24 godzin inkubacji ze związkiem (spadek o ok. 25 % w stosunku do kontroli). Wortmanina w stężeniu równym 2 μM nie hamowała autofagii w komórkach linii MiaPaCa-2. Równoczesne zastosowanie pochodnej C-1748 i wortmaniny wzmacniało działanie samego związku, co szczególnie można było zaobserwować po 48 godzinnej ekspozycji komórek na kombinację związków. Ilość formy lipidowej białka LC3

spadła do ok. 60 % w komórkach linii MiaPaCa-2 poddanych działaniu jedynie pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM w porównaniu do ok. 25 % przy zastosowaniu kombinacji związków (rysunek 36).



Rysunek 36. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka LC3-II w komórkach MiaPaCa-2 traktowanych pochodną C-1748 (0,1 μM) oraz wortmaniną (2 μM). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.

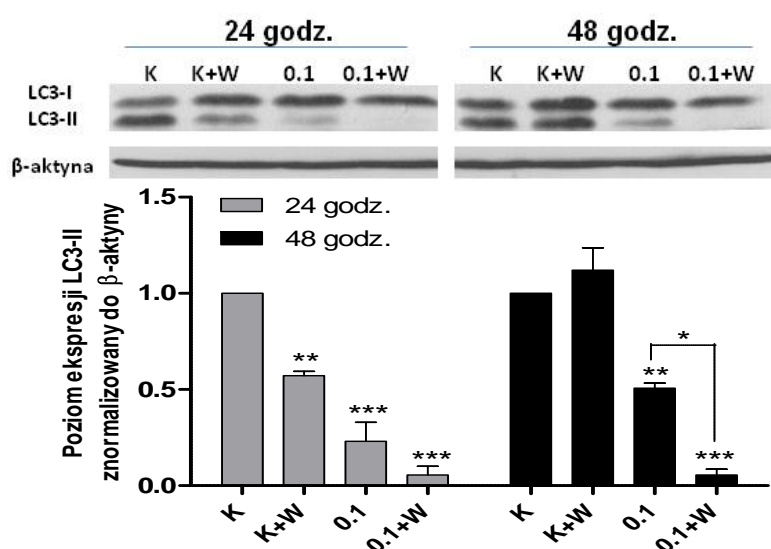
4.8.3.3. Komórki linii BxPC-3



Rysunek 37. Obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach BxPC-3, kontrolnych i traktowanych C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM lub C-1748 (0,1 μM) w kombinacji z inhibitorem autofagii, wortmaniną o stężeniu równym 2 μM przez 24 i 48 godz.

Obserwacje mikroskopowe ilości kwaśnych organelli wykazały, że w porównaniu do komórek nietraktowanych związkiem, już po 24 godzinnej inkubacji z C-1748 dochodziło do obniżenia ilości kwaśnych organelli i spadku intensywności czerwonej fluorescencji

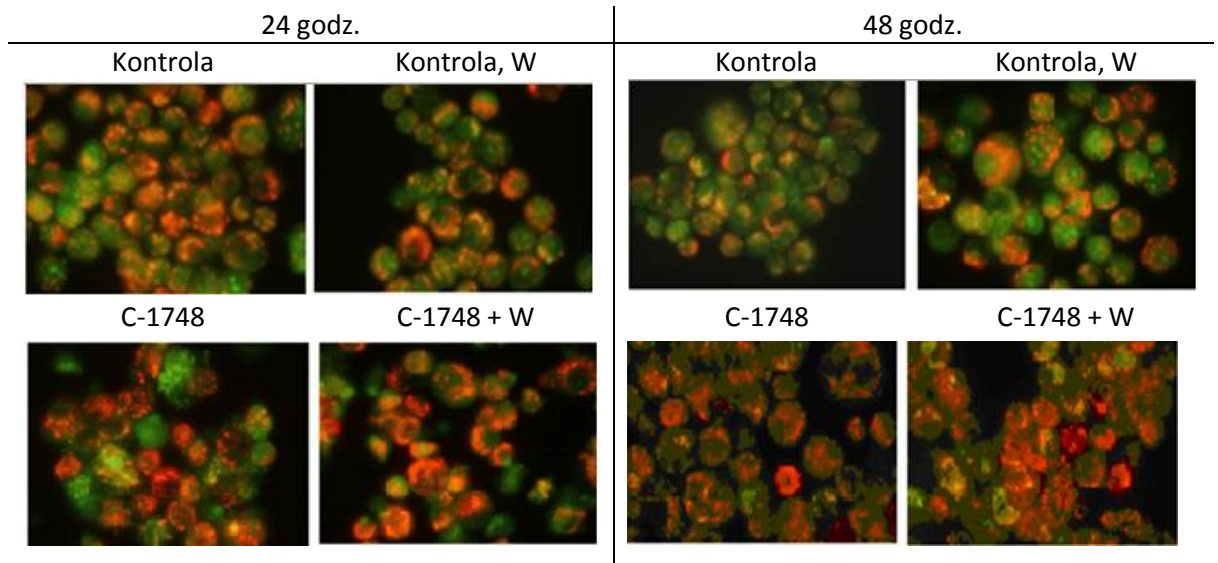
pochodzącej od agregatów oranżu akrydyny (rysunek 37). Efekt ten był jeszcze bardziej widoczny po 48 godzinach traktowania komórek związkami. Ponadto, w komórkach BxPC-3 w porównaniu do komórek pozostałych linii, dochodziło również do zahamowania autofagii w wyniku działania wortmaniny o stężeniu równym 2 μM , co jednak było widoczne tylko po 24 godzinach inkubacji. Równoczesne zastosowanie wortmaniny i pochodnej C-1748 wywierało jeszcze silniejszy efekt hamujący proces autofagii.



Rysunek 38. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka LC3-II w komórkach BxPC-3 traktowanych pochodną C-1748 (0,1 μM) oraz wortmaniną (2 μM). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.

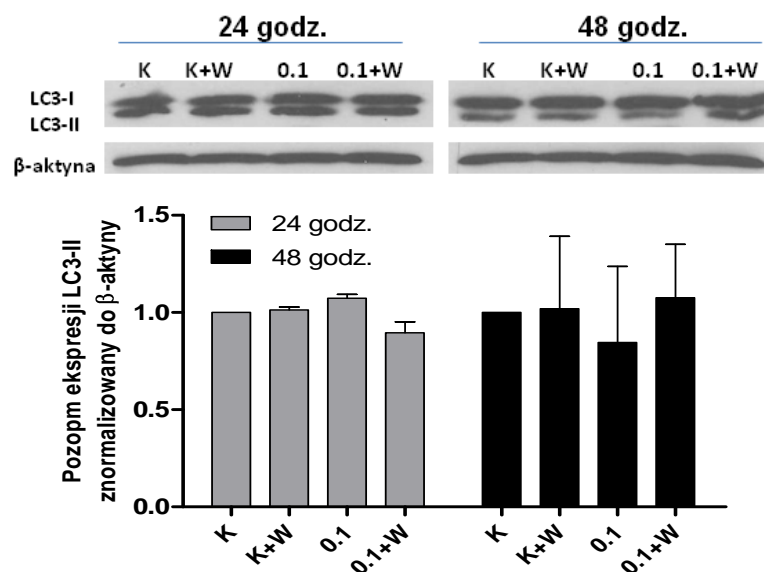
Analiza poziomu ekspresji białka LC3-I i LC3-II metodą western blotting wykazała, że w komórkach BxPC-3, po 24 godzinnej inkubacji z wortmaniną dochodziło do statystycznie istotnej inhibicji autofagii w stosunku do komórek kontrolnych (rysunek 38). Po traktowaniu komórek pochodną C-1748 obserwowałam znaczny spadek ilości formy lipidowej białka LC3 już po 24 godz. inkubacji. W porównaniu do komórek kontrolnych ilość białka LC3-II spadła do ok. 25 % przy stężeniu pochodnej C-1748 równym 0,1 μM . Równocześnie obserwowałam przyrost formy LC3-I białka. Ponadto, zastosowanie pochodnej C-1748 (stężenie 0,1 μM) w kombinacji z wortmaniną (stężenie 2 μM) wykazało synergistyczne działanie związków na zahamowanie autofagii w komórkach linii BxPC-3. Kombinacja obydwu związków silniej hamowała proces autofagii niż każdy z nich zastosowany osobno, co można było zaobserwować zarówno po 24 godzinach jak i po 48 godz. inkubacji komórek ze związkami. Poziom ekspresji białka LC3-II w komórkach BxPC-3 poddanych działaniu pochodnej C-1748 i wortmaniny wynosił jedynie ok. 10 % w stosunku do komórek kontrolnych zarówno po 24 godzinnej jak i 48 godzinnej ekspozycji komórek na działanie związków, co wskazuje na zmniejszenie ilości autofagosomów i silne zahamowanie procesu autofagii.

4.8.3.4. Komórki linii AsPC-1



Rysunek 39. Obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach AsPC-1 kontrolnych i traktowanych C-1748 o stężeniu równym $0,1 \mu\text{M}$ lub C-1748 ($0,1 \mu\text{M}$) w kombinacji z wortmaniną o stężeniu równym $2 \mu\text{M}$ przez 24 i 48 godz.

W komórkach linii AsPC-1 nie dochodziło do zahamowania autofagii w wyniku działania zarówno pochodnej C-1748 jak i kombinacji pochodnej C-1748 z wortmaniną (rysunek 39). W porównaniu do komórek kontrolnych, w wyniku działania C-1748 obserwowałam natomiast nieznacznie większą ilość komórek z kwaśnymi organellami, co mogłoby wskazywać na to, że związek zamiast hamować autofagię, w przypadku komórek AsPC-1 może ją nadmiernie indukować. Nadmierna indukcja autofagii również jest pożądanym efektem działania chemoterapeutyków w przypadku, gdy proces ten jest zbyt długi lub intensywny, ponieważ dochodzi wówczas do wzmożonej degradacji białek cytoplazmatycznych, lub eliminacji całych organelli.



Rysunek 40. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka LC3-II w komórkach AsPC-1 traktowanych pochodną C-1748 ($0,1 \mu\text{M}$) oraz wortmaniną ($2 \mu\text{M}$).

Analiza poziomu ekspresji dwóch form białka LC3 metodą western blotting wykazała, że zarówno po 24 jak i 48 godzinach inkubacji komórek z pochodną C-1748 poziom ekspresji form LC3-I i LC3-II białka LC3 utrzymywał się na stałym poziomie, co świadczy o niezaburzonym przebiegu procesu autofagii i tworzeniu autofagosomów (rysunek 40). Dodatkowo, po 24 godzinnej, równoczesnej inkubacji komórek AsPC-1 z pochodną C-1748 i wortmaniną obserwowałam nieznaczny wzrost poziomu ekspresji formy lipidowej białka LC3.

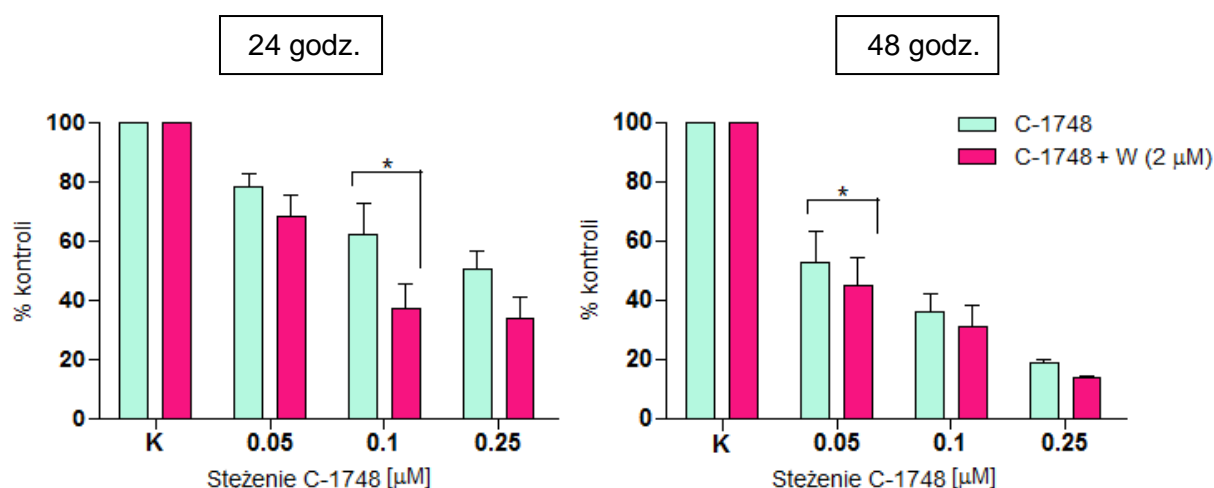
4.8.3.5. Podsumowanie

Podsumowując uzyskane wyniki, na podstawie mikroskopowych obserwacji zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach wybarwionych oranżem akrydyny oraz na podstawie analizy western blotting poziomu ekspresji formy cytoplazmatycznej i lipidowej białka LC3 wykazałam, że pochodna C-1748 jest inhibitorem autofagii w komórkach trzech badanych przeze mnie linii raka trzustki: Panc-1, MiaPaCa-2 oraz BxPC-3. W komórkach linii AsPC-1, badany związek nie hamował autofagii. Dodatkowo, pochodna C-1748 wykazała synergistyczne działanie w połączeniu z inhibitorem autofagii, wortmaniną. Wyniki te, wskazują na nowy, wcześniej nie przedstawiony mechanizm działania pochodnej C-1748 i stanowią podstawę do dalszych rozszerzonych badań w tym zakresie.

4.9. Zbadanie aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 w połączeniu z wortmaniną w stosunku do komórek czterech linii raka trzustki

Analiza aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 w kombinacji z chlorochiną, wykazała, że równoczesne zastosowanie tych dwóch związków nie wzmacniało cytotoksycznego działania pochodnej 1-nitroakrydyny. Poniżej zamieszczone badanie aktywności biologicznej pochodnej C-1748, w połączeniu z wortmaniną wobec komórek linii Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 i AsPC-1 miało na celu sprawdzenie, czy równoczesne zastosowanie inhibitora wczesnych etapów autofagii wzmacnia nie tylko efekt wywierany przez pochodną C-1748 na proces autofagii, ale również na inne procesy komórkowe, takie jak hamowanie proliferacji komórek nowotworowych trzustki oraz indukcja apoptozy. Badania cytotoksyczności przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.2., z użyciem anionowego barwnika - sulforodaminy B. Wyniki są średnią z trzech niezależnych powtórzeń.

4.9.1. Komórki linii Panc-1



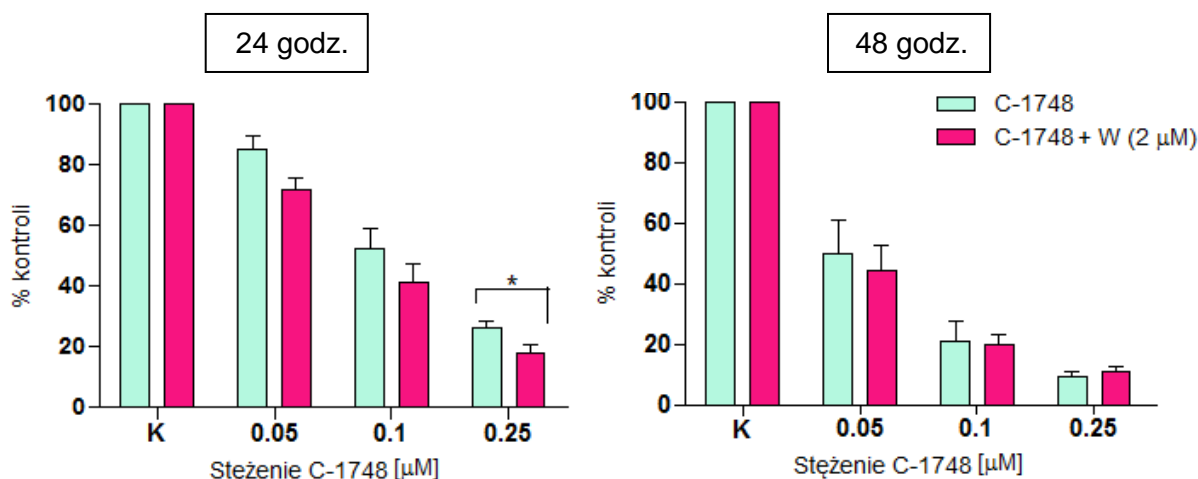
Rysunek 41. Wykresy zahamowania wzrostu komórek Panc-1, traktowanych trzema stężeniami pochodnej C-1748, samym i w kombinacji z wortmaniną (stężenie 2 μM) przez 24 i 48 godz. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie* $P < 0,05$.

Ilość proliferujących komórek Panc-1 malała wraz ze wzrostem stężenia związku i czasu inkubacji któremu poddane były komórki (rysunek 41). Komórki linii Panc-1 były wrażliwe na działanie pochodnej C-1748 już po 24 godz. inkubacji ze związkiem i przy stężeniu związku równym 0,05 μM. Po 48 godz. traktowania komórek związkiem o tym samym stężeniu dochodziło do spadku ich proliferacji o ok. 50 %. Po 48 godz. inkubacji i stężeniu związku równym 0,25 μM, ilość komórek, w których na skutek działania związku dochodziło do zahamowania wzrostu, wynosiła już ok. 80 %. Równoczesne zastosowanie pochodnej C-1748 i wortmaniny spotęgowało antyproliferacyjne działanie C-1748. Szczególnie dużą różnicę obserwowałam po 24 godz. inkubacji komórek Panc-1 z wortmaniną i pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM. Ilość komórek w których dochodziło do zahamowania proliferacji była o ok. 30 % wyższa w przypadku komórek poddanych działaniu kombinacji związków w porównaniu do traktowania ich jedynie pochodną C-1748.

4.9.2. Komórki linii MiaPaCa-2

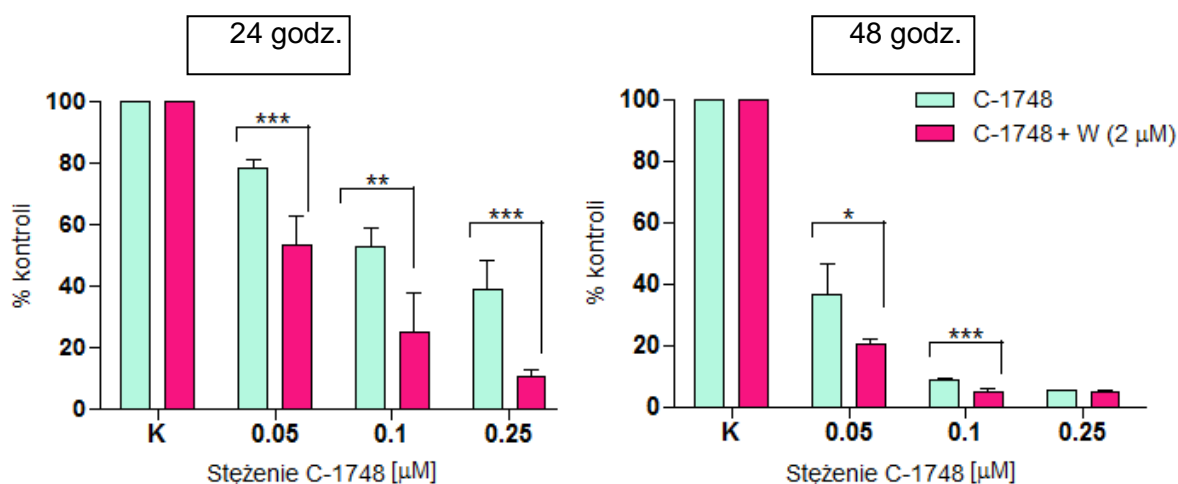
W komórkach linii MiaPaCa-2 w wyniku traktowania pochodną C-1748 dochodziło do zahamowania ich proliferacji począwszy od 24 godz. inkubacji komórek ze związkiem (rysunek 42). Wraz z wydłużającym się czasem inkubacji i wzrastającym stężeniem związku, liczba prawidłowo dzielących się komórek stopniowo malała, wynosząc zaledwie 10 % po 48 godzinnej ekspozycji na działanie pochodnej 1-nitroakrydyny o stężeniu równym 0,25 μM. Zastosowanie kombinacji wortmaniny z pochodną C-1748 nieznacznie wpływało na wzrost aktywności związku, co szczególnie było widocznie po 24 godz. inkubacji komórek MiaPaCa-2 z pochodną C-1748 o stężeniu związku wynoszącym zarówno 0,05 μM, 0,1 μM

jak i 0,25 μM . Ilość komórek z zahamowaną proliferacją była o 10 % mniejsza po traktowaniu ich równocześnie dwoma związkami w porównaniu do traktowania ich jedynie pochodną C-1748.



Rysunek 42. Wykresy zahamowania wzrostu komórek MiaPaCa-2, traktowanych trzema stężeniami pochodnej C-1748, samym i w kombinacji z wortmaniną (stężenie 2 μM) przez 24 i 48 godz. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie* $P < 0,05$.

4.9.3. Komórki linii BxPC-3

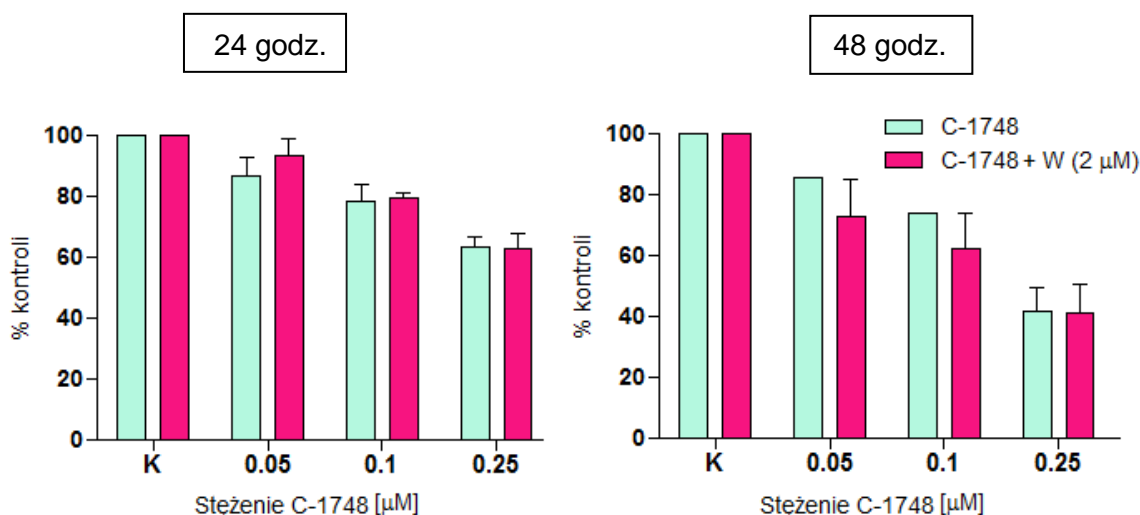


Rysunek 43. Wykresy zahamowania wzrostu komórek BxPC-3, traktowanych trzema stężeniami pochodnej C-1748, samym i w kombinacji z wortmaniną (stężenie 2 μM) przez 24 i 48 godz. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Ilość komórek BxPC-3 z zahamowaną proliferacją stopniowo wzrastała wraz z wydłużającym się czasem inkubacji ze związkiem, jak i wzrastającym stężeniem związku (rysunek 43). Po 48 godzinnej ekspozycji komórek na działanie pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,25 μM , ilość komórek dzielących się wynosiła zaledwie 5 %. W przypadku komórek BxPC-3 obserwowałam największe zmiany w aktywności cytotoksycznej C-1748 w połączeniu z wortmaniną. Równoczesne zastosowanie wortmaniny i pochodnej

1-nitroakrydyny dawało silny, synergistyczny efekt, co szczególnie było widoczne po 24 godz. inkubacji z pochodną C-1748 (aktywność cytotoksyczna samego związku była mniejsza o ok. 25-30 % w porównaniu z działaniem związku w kombinacji z wortmaniną). Po 48 godzinnej ekspozycji komórek BxPC-3 na kombinację związków, największy efekt cytotoksyczny obserwovałam przy stężeniu pochodnej C-1748 równym 0,05 μM i 0,1 μM .

4.9.4. Komórki linii AsPC-1



Rysunek 44. Wykresy zahamowania wzrostu komórek AsPC-1, traktowanych trzema stężeniami pochodnej C-1748, samym i w kombinacji z wortmaniną (stężenie 2 μM) przez 24 i 48 godz.

Komórki AsPC-1 były najbardziej odporne na działanie pochodnej C-1748. Wraz ze wzrostem stężenia związku oraz czasu inkubacji ze związkiem, ilość komórek proliferujących stopniowo malała, jednak zmiany te były dużo słabsze w porównaniu do zmian indukowanych w komórkach pozostałych trzech linii raka trzustki (rysunek 44). Po 48 godz. inkubacji z pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,25 μM dochodziło do zahamowania proliferacji u około 60 % komórek w porównaniu do komórek kontrolnych. Równoczesne traktowanie komórek linii AsPC-1 pochodną C-1748 i wortmaniną nie wpłynęło istotnie na wzrost wrażliwości komórek.

4.9.5. Podsumowanie

Podsumowując, równoczesne zastosowanie kombinacji pochodnej C-1748 z wortmaniną o stężeniu równym 2 μM nie tylko wzmacniało hamujące działanie C-1748 na proces autofagii, ale również wzmacniało w sposób statystycznie istotny cytotoksyczne działanie pochodnej 1-nitroakrydyny w stosunku do komórek linii Panc-1, MiaPaCa-2 oraz BxPC-3. W przypadku komórek linii AsPC-1, C-1748 nie hamował autofagii, jak i jego efekt

cytotoksyczny nie różnił się istotnie w porównaniu do zastosowania kombinacji związku z wortmaniną.

4.10. Badanie wpływu pochodnej C-1748 w połączeniu z wortmaniną na homeostazę lipidów w komórkach czterech linii raka trzustki

Komórki nowotworowe mają zdolność do syntezy niezbędnej puli aktywnych biologicznie lipidów, niezależnie od szlaków regulujących ich syntezę w prawidłowych komórkach. W szczególności mają zdolność do syntezy dużej ilości niezbędnych produktów pośrednich wykorzystywanych następnie do syntezy aktywnych biologicznie związków wspomagających proliferację komórek i zdolnych do generowania kwasów tłuszczowych, sfingolipidów, lizolipidów, fosfoinozytów błonowych oraz cholesterolu w wyniku lipogenezy *de novo* (synteza lipidów z substratów nielipidowych). Aktywność biologiczna tych związków, związana jest ze szlakami sygnalizacyjnymi zaangażowanymi w rozwój nowotworu i proces przerzutowania, tak więc przyczyny ich nietypowej syntezy w komórkach nowotworowych są przedmiotem wielu badań [DeBerardinis i wsp., 2008].

Jednym z podejść terapeutycznych mogącym mieć zastosowanie w leczeniu np. raka trzustki jest oddziaływanie na pulę lipidów wewnątrzkomórkowych w wyniku działania chemoterapeutyków. Skutkiem indukowanej przez związki śmierci np. na drodze apoptozy, czy nekrozy, powinno być zahamowanie biosyntezy lipidów. Jednakże, pomimo oczekiwanego zahamowania syntezy lipidów komórkowych, po indukcji apoptozy, obserwuje się nagromadzenie cytoplazmatycznych kropli lipidowych (*ang. lipid droplets - LD*). Nie jest do końca jasne dlaczego LD gromadzą się podczas procesu apoptozy. Sugeruje się, że może to wynikać np. z przemieszczania się lipidów pomiędzy organellami, zwiększonej syntezy neutralnych lipidów podczas aktywnej fazy apoptozy, wzrostem ilości lipidów spowodowanym degradacją organelli, lub zwiększoną aktywnością fosfolipazy A-2 [Singh i wsp., 2012].

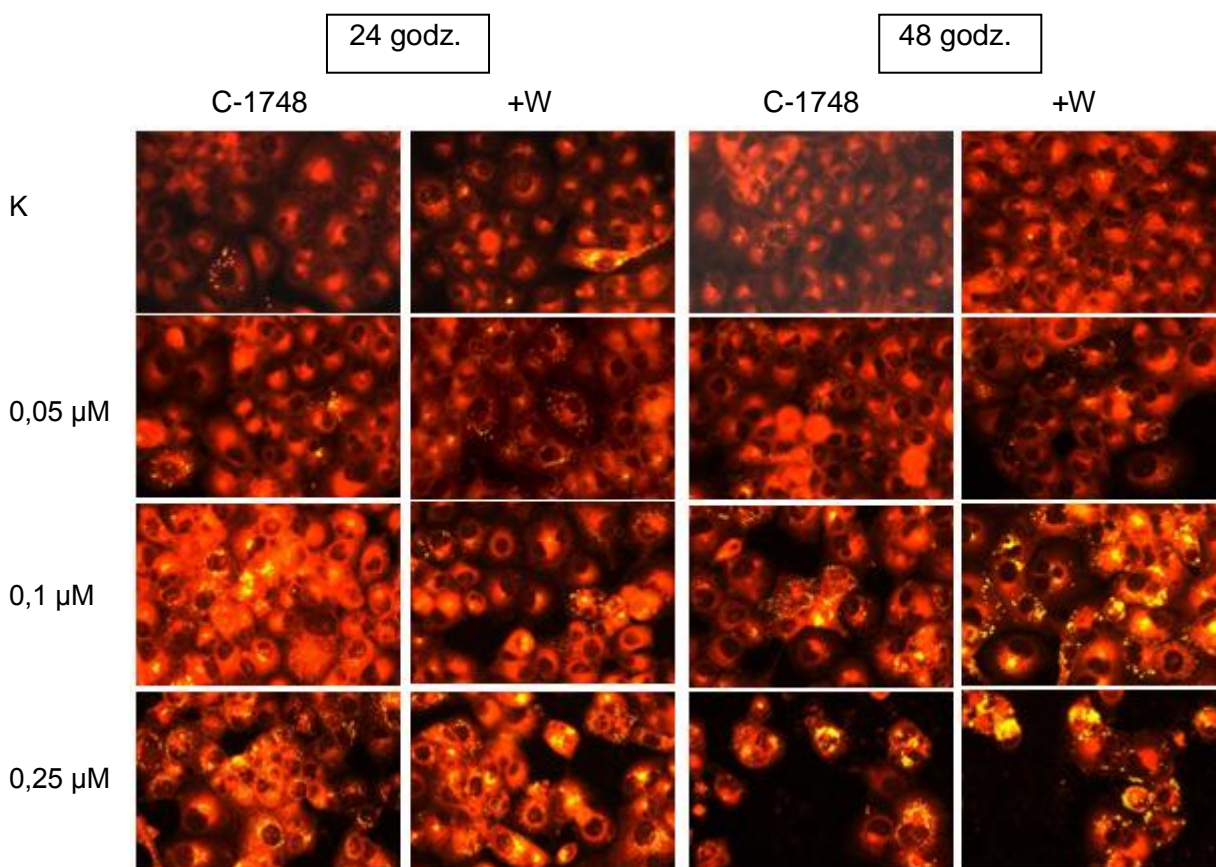
Do nadmiernej akumulacji lipidów w kroplach tłuszczowych może dochodzić również, gdy zaburzony jest proces autofagii, ponieważ autofagia jest jednym z mechanizmów umożliwiających degradację LD i sprzyjających uwolnieniu zmagazynowanych tłuszczów. Proces ten nazwano hipofagią [Singh i wsp., 2011].

Ponieważ wykazałam, że pochodna C-1748 może być inhibitorem autofagii w komórkach raków trzustki, w kolejnym etapie pracy sprawdziłam jaki wpływ na homeostazę lipidów i poziom kropli tłuszczowych w komórkach czterech linii raków trzustki będzie miało poddanie ich działaniu pochodnej 1-nitroakrydiny. W tym celu wykonałam mikroskopową i cytometryczną analizę poziomu LD stosując barwnik Czerwień Nilu (*ang. Nile Red*). Czerwień Nilu jest selektywnym, lipofilowym barwnikiem wykorzystywanym do obserwacji wewnątrzkomórkowych neutralnych lipidów, głównie LD. Czerwień Nilu praktycznie nie

wykazuje fluorescencji w środowisku wodnym lub polarnym, ale wykazuje wysoką fluorescencję w środowisku bogatym w lipidy [Greenspan i wsp., 1985].

Mikroskopową i cytometryczną analizę poziomu lipidów w komórkach czterech linii raka trzustki przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt 6.3.12. Wyniki są reprezentatywne dla dwóch niezależnych powtórzeń.

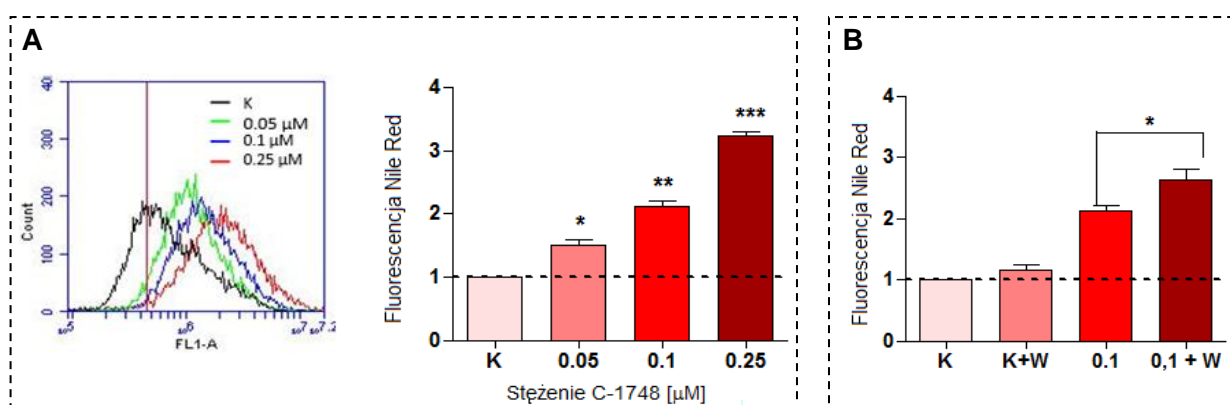
4.10.1. Komórki linii Panc-1



Rysunek 45. Mikroskopowa analiza ilości lipidów i LD w komórkach Panc-1, traktowanych trzema różnymi stężeniami pochodnej C-1748 i wortmaniną (stężenie 2 μM) oraz wybarwionych Czerwiecią Nilu. Zdjęcia wykonałam pod powiększeniem 20x.

Analizując wyniki przedstawione na rysunku 45 i 46 A można zauważyć, że w komórkach Panc-1, poddanych działaniu pochodnej C-1748 dochodziło do akumulacji kropli tłuszczowych. W komórkach kontrolnych obserwowałam jedynie śladowe ilości LD, natomiast ich ilość rosła wraz ze wzrastającym stężeniem związku i czasem inkubacji komórek z pochodną 1-nitroakrydyny. Pierwsze widoczne zmiany w puli lipidów komórek Panc-1 można było zaobserwować już przy stężeniu związku równym 0,1 μM po 24 godzinach inkubacji z pochodną C-1748. Dochodziło wówczas do wzrostu nie tylko ilości lipidów, ale także powierzchni kropli tłuszczowych, a barwnik zakumulowany w bogatym w lipidy środowisku wewnątrz kropli wykazywał intensywną żółtą fluorescencję.

Poddanie komórek Panc-1 działaniu wortmaniny o stężeniu równym 2 μM nieznacznie wpłynęło na zmianę poziomu kropli tłuszczowych (rysunek 45). Natomiast w wyniku równoczesnego traktowania komórek Panc-1 pochodną 1-nitroakrydyny i wortmaniną, obserwowałam wyraźny wzrost poziomu LD już po 24 godz. inkubacji komórek ze związkami. Przy stężeniu pochodnej C-1748 równym 0,05 μM obserwowałam większą akumulację lipidów w porównaniu do komórek traktowanych jedynie pochodną C-1748 (rysunek 45). Tendencja ta utrzymywała się po zwiększeniu stężenia C-1748 i czasu inkubacji komórek ze związkami. Zmiany te były szczególnie widoczne po 48 godzinnej ekspozycji na związki i przy stężeniu C-1748 równym 0,1 μM (rysunek 46 B). Obserwowałam wówczas bardzo wyraźne, powiększone krople tłuszczowe o intensywnej, żółtej fluorescencji.



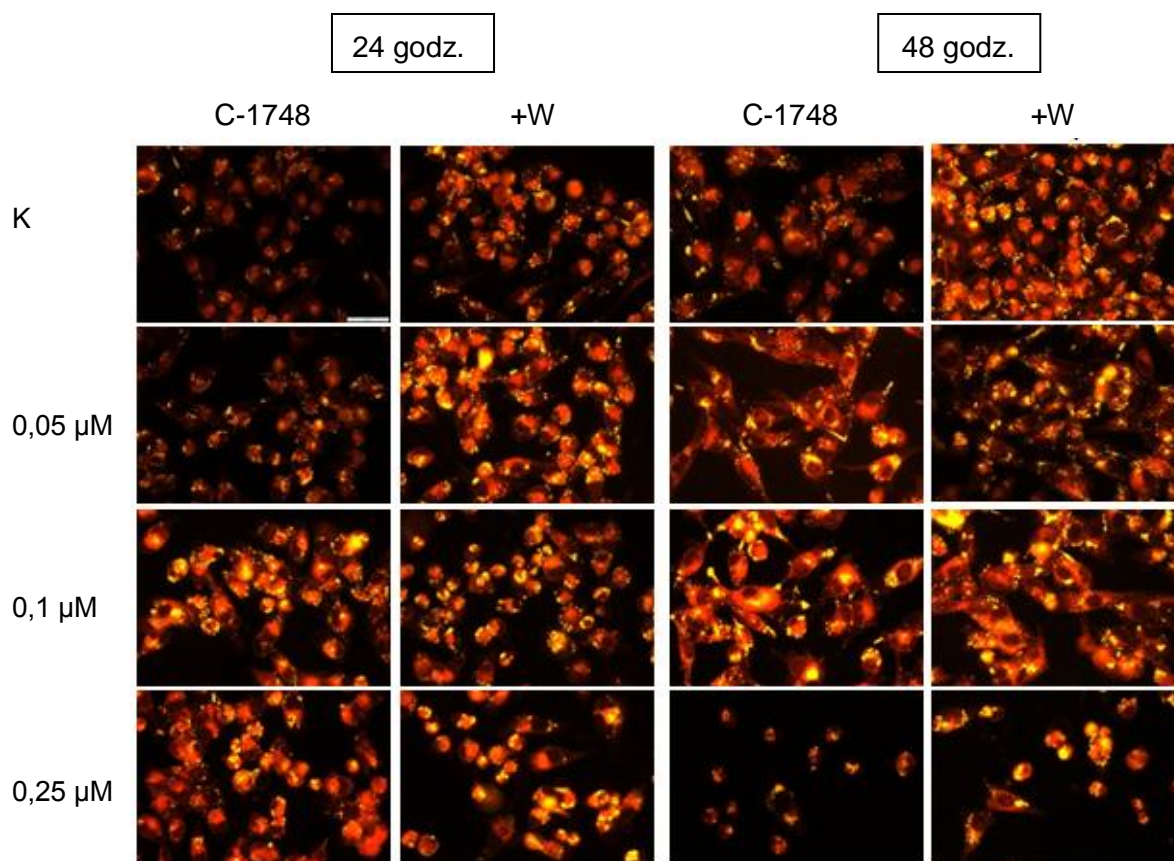
Rysunek 46. Cytometryczna analiza poziomu neutralnych lipidów w komórkach Panc-1 poddanych 24 godz. ekspozycji na:

A - działanie pochodnej C-1748 o trzech różnych stężeniach (**lewy panel:** histogramy uzyskane podczas analizy cytometrycznej, **prawy panel:** analiza ilościowa wyników uzyskanych za pomocą cytometrii przepływowej),

B - działanie pochodnej C-1748 o stężeniu 0,1 μM w kombinacji z wortmaniną o stężeniu 2 μM i wybarwionych Czerwienią Nilu (1 $\mu\text{g/ml}$). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Zwiększony poziom lipidów i kropli tłuszczowych w komórkach Panc-1 najprawdopodobniej związany jest z indukcją apoptozy i hamowaniem autofagii, będących efektem działania badanych związków. Dodatkowo, równoczesne zastosowanie C-1748 i wortmaniny wywierało silne, synergistyczne działanie hamujące autofagię i prawdopodobnie silne działanie proapoptotyczne, co tłumaczy wzrost ilości LD w porównaniu do komórek Panc-1 poddanych działaniu jedynie pochodnej C-1748.

4.10.2. Komórki linii MiaPaCa-2

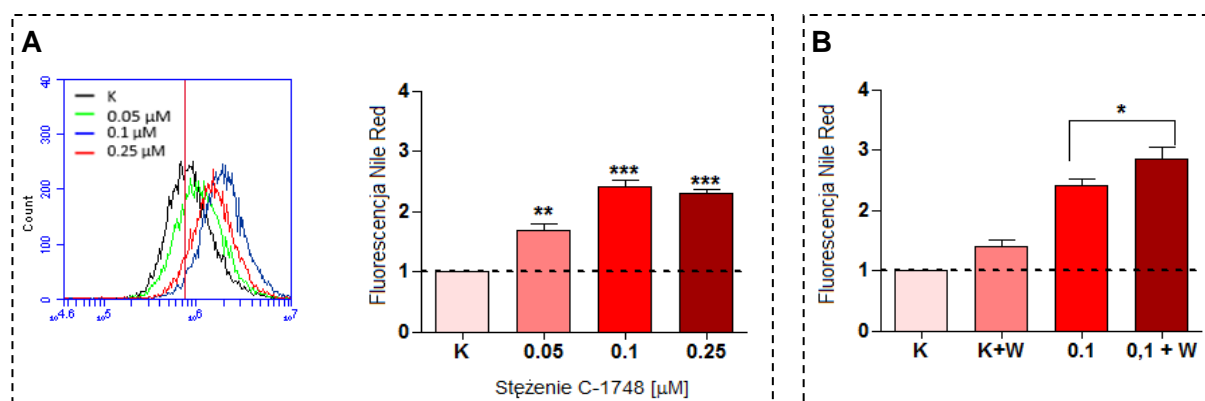


Rysunek 47. Mikroskopowa analiza ilości lipidów i LD w komórkach MiaPaCa-2, traktowanych trzema różnymi stężeniami pochodnej C-1748 i wortmaniną (stężenie 2 μM) oraz wybarwionych Czerwienią Nilu. Zdjęcia wykonałam pod powiększeniem 20x.

W przypadku komórek linii MiaPaCa-2 obserwowałam znaczną ilość kropli tłuszczowych już w komórkach kontrolnych. Jest to zjawisko normalne, ponieważ lipidy zmagazynowane w LD, takie jak triglicerydy, cholesterol, czy estry tłuszczowe stanowią zapasowe źródło energii, wykorzystywane przez komórkę w celu utrzymania homeostazy wewnątrzkomórkowej. W komórkach linii MiaPaCa-2 w porównaniu do komórek pozostałych linii ich ilość była znacznie wyższa.

Podobnie jak w przypadku komórek linii Panc-1, w komórkach MiaPaCa-2 traktowanych pochodną C-1748 dochodziło do nadmiernej akumulacji LD już po 24 godz. inkubacji ze związkiem o stężeniu równym 0,05 μM (rysunek 47). Dłuższa ekspozycja komórek na badany związek oraz wzrost jego stężenia, skutkowały postępującym wzrostem ilości kropli tłuszczowych. Było to szczególnie widoczne przy stężeniu związku równym 0,1 μM po 24 i 48 godzinach inkubacji. Natomiast przy stężeniu pochodnej C-1748 równym 0,25 μM ilość kropli tłuszczowych nieznacznie zmalała w stosunku do ilości obserwowanej w komórkach poddanych działaniu związku o stężeniu równym 0,1 μM . Przyczyną tego, może

być fakt, że przy tak dużym stężeniu związku część komórek może znajdować się już w późnej fazie apoptozy i ulegać stopniowej degradacji.



Rysunek 48. Cytometryczna analiza poziomu neutralnych lipidów w komórkach MiaPaCa-2 poddanych 24 godz. ekspozycji na:

A - działanie pochodnej C-1748 o trzech różnych stężeniach (**lewy panel:** histogramy uzyskane podczas analizy cytometrycznej, **prawy panel:** analiza ilościowa wyników uzyskanych za pomocą cytometrii przepływowej),

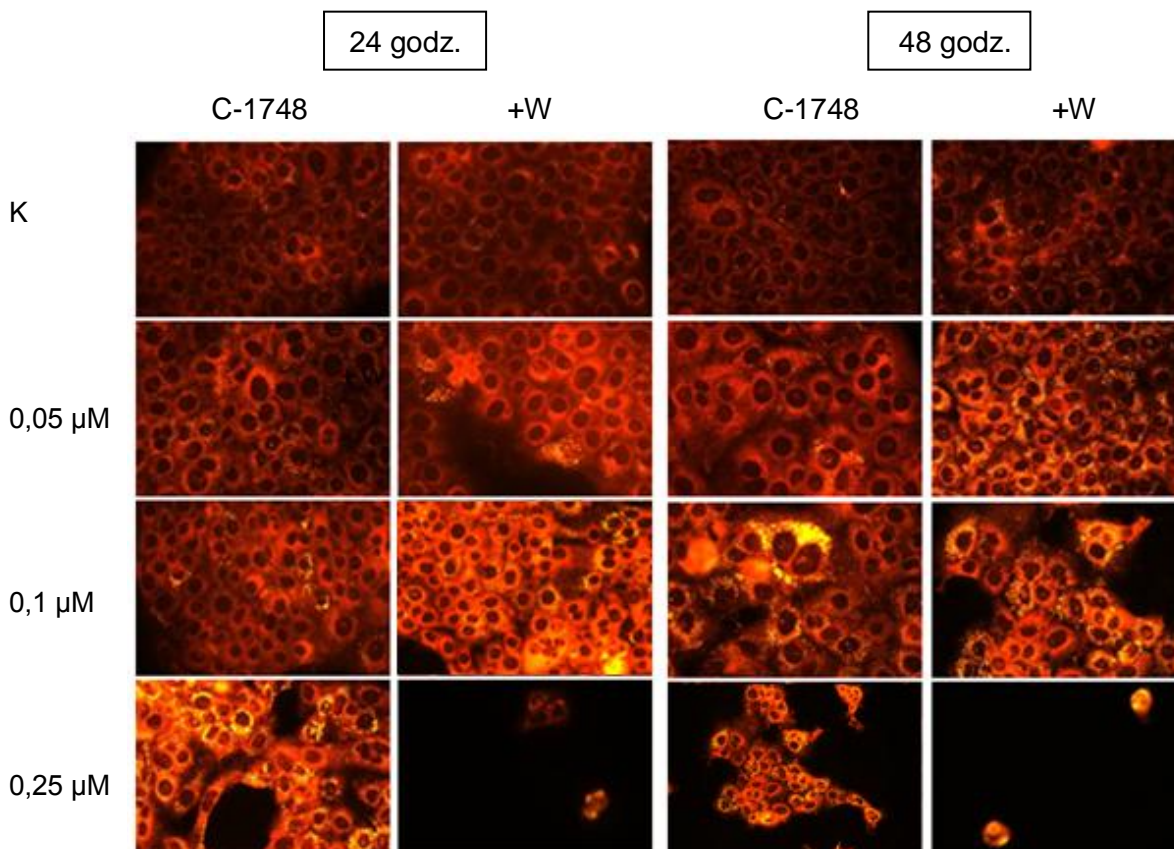
B - działanie pochodnej C-1748 o stężeniu 0,1 μM w kombinacji z wortmaniną o stężeniu 2 μM i wybarwioną Czerwinią Nilu (1 $\mu\text{g/ml}$). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Zastosowanie samej wortmaniny spowodowało nieznaczny wzrost poziomu lipidów w komórkach MiaPaCa-2. Natomiast równoczesne poddanie komórek działaniu C-1748 i wortmaniny znacząco wpłynęło zarówno na akumulację, formowanie jak i wzrost powierzchni kropli tłuszczowych, co można było zaobserwować już po 24 godzinnej ekspozycji komórek na wortmaninę w kombinacji z pochodną 1-nitroakrydyny o stężeniu równym 0,05 μM (rysunek 47).

4.10.3. Komórki linii BxPC-3

Mikroskopowa i cytometryczna analiza poziomu LD w komórkach linii BxPC-3 traktowanych pochodną C-1748 również wykazała nadmierne formowanie kropli tłuszczowych do którego dochodziło na skutek działania związku (rysunek 49 i 50 A). W komórkach kontrolnych obserwowałam jedynie pojedyncze komórki z widocznymi sferycznymi organellami. Po 24 godzinnej inkubacji z pochodną 1-nitroakrydyny obserwowałam stopniowy wzrost zarówno całkowitej puli neutralnych lipidów jak i ilości kropli tłuszczowych w komórkach BxPC-3. Jednak dopiero zastosowanie związku o stężeniu równym 0,25 μM spowodowało nie tylko znaczną akumulację LD, ale również wzrost ich powierzchni. Nieco inne zmiany widoczne były po 48 godzinnej inkubacji komórek ze związkiem. Największą ilość kropli lipidowych obserwowałam przy stężeniu związku równym 0,1 μM . Natomiast zastosowanie ponad dwukrotnie wyższego stężenia (0,25 μM) skutkowało już zmniejszeniem całkowitej ilości komórek, które wciąż jednak wykazywały obecność kropli

tłuszczowych. Zmniejszona populacja komórek widoczna na zdjęciu wynika z wysokiej aktywności związku stosowanego w stężeniu równym $0,25 \mu\text{M}$, a obserwowane zmiany są wynikiem ogólnej degradacji komórek i ich składników zarówno na drodze apoptozy, autofagii, czy nekrozy.

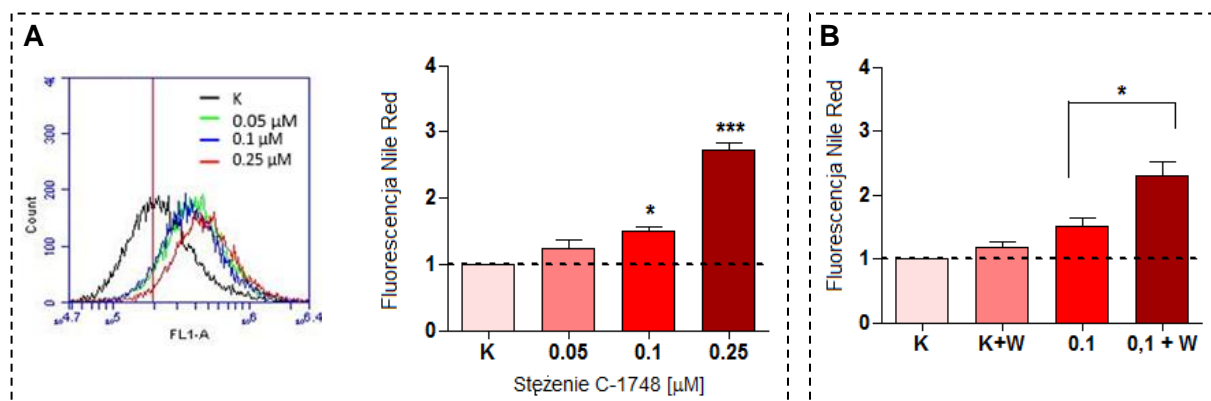


Rysunek 49. Mikroskopowa analiza ilości lipidów i LD w komórkach BxPC-3, traktowanych trzema różnymi stężeniami pochodnej C-1748 i wortmaniną (stężenie $2 \mu\text{M}$) oraz wybarwionych Czerwiecią Nilu. Zdjęcia wykonana pod powiększeniem 20x.

Poddanie komórek BxPC-3 działaniu wortmaniny o stężeniu równym $2 \mu\text{M}$ nie wpłynęło w istotny sposób na poziom lipidów wewnątrzkomórkowych (rysunek 49). Natomiast równoczesne poddanie komórek działaniu zarówno pochodnej C-1748 jak i wortmaniny spowodowało nadmierne formowanie i akumulację kropli tłuszczowych, co szczególnie było widoczne po 48 godzinnej ekspozycji komórek na działanie badanych związków przy stężeniu pochodnej C-1748 równym $0,05 \mu\text{M}$ lub $0,1 \mu\text{M}$ (rysunek 49, 50 B). Zarówno po 24 jak i 48 godzinach równoczesnej inkubacji komórek BxPC-3 z wortmaniną i pochodną C-1748 o stężeniu równym $0,25 \mu\text{M}$, obserwowałam jedynie pojedyncze komórki, ponieważ silne działanie kombinacji obydwu związków spowodowało degradację i śmierć znacznej populacji komórek BxPC-3.

Podobnie jak w przypadku komórek linii Panc-1 i MiaPaCa-2, wraz z wydłużającym się czasem inkubacji z pochodną C-1748 oraz wzrastającym stężeniem związku, liczba kropli

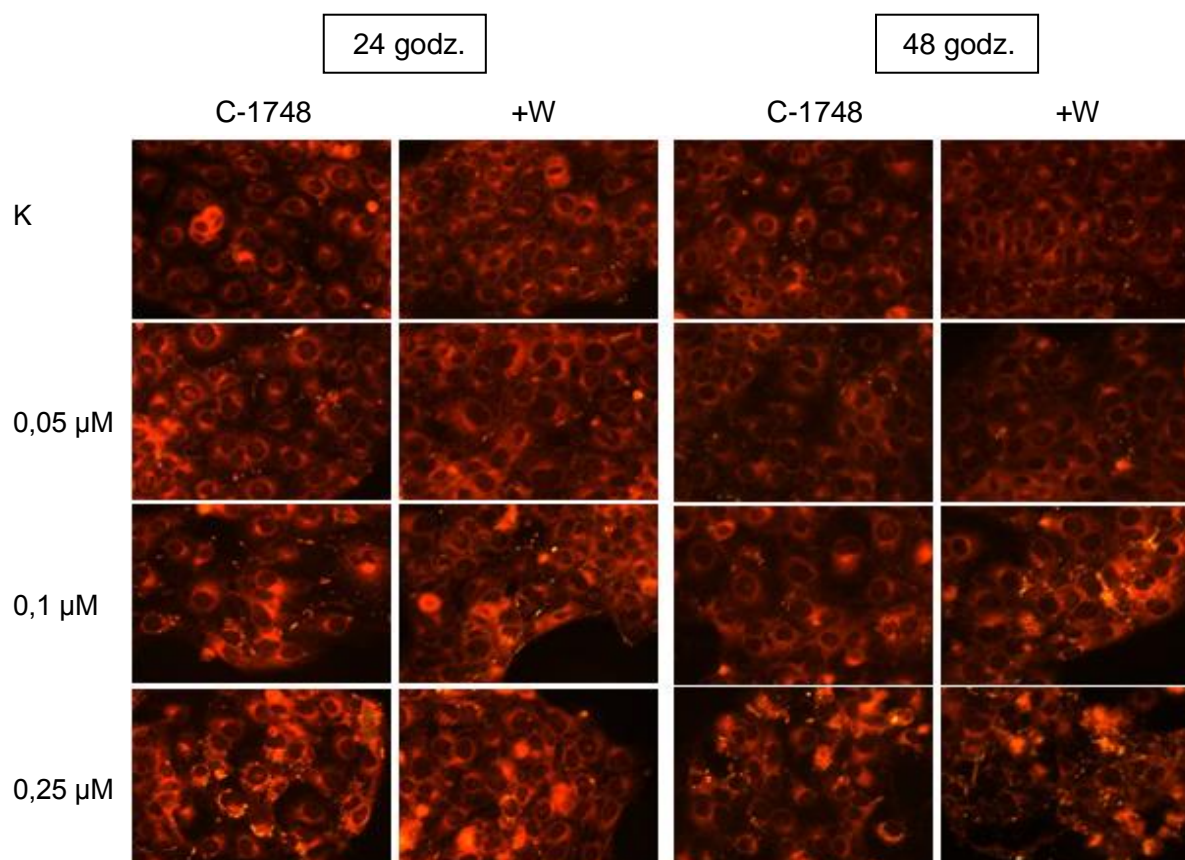
tłuszczowych w komórkach BxPC-3 stopniowo wzrastała, co najprawdopodobniej było konsekwencją indukcji procesu apoptozy do której dochodzi na skutek działania badanego związku.



Rysunek 50. Cytometryczna analiza poziomu neutralnych lipidów w komórkach BxPC-3 poddanych 24 godz. ekspozycji na:

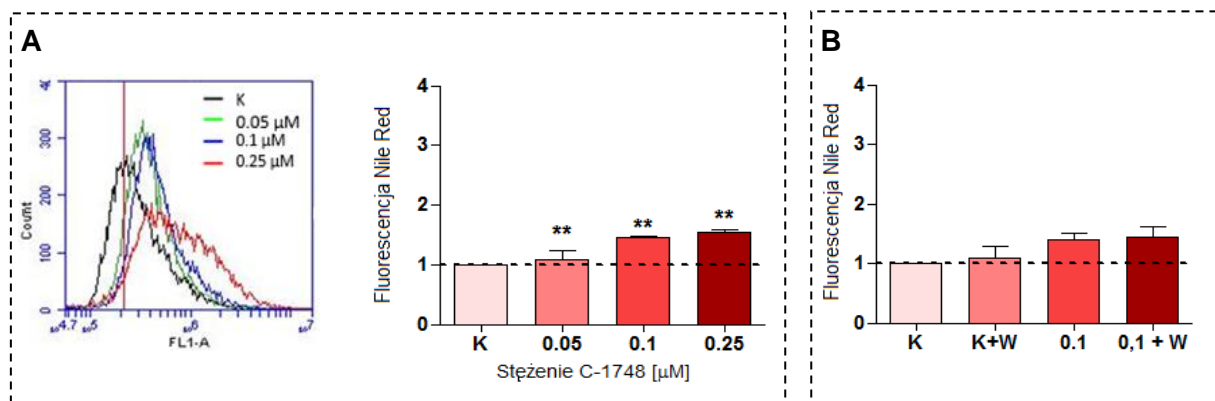
A - działanie pochodnej C-1748 o trzech różnych stężeniach (**lewy panel**: histogramy uzyskane podczas analizy cytometrycznej, **prawy panel**: analiza ilościowa wyników uzyskanych za pomocą cytometrii przepływowej), **B** - działanie pochodnej C-1748 o stężeniu 0,1 μM w kombinacji z wortmaniną o stężeniu 2 μM i wybarwionych Czerwiecią Nilu (1 $\mu\text{g/ml}$). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

4.10.4. Komórki linii AsPC-1



Rysunek 51. Mikroskopowa analiza ilości lipidów i LD w komórkach AsPC-1, traktowanych trzema różnymi stężeniami pochodnej C-1748 i wortmaniną (stężenie 2 μM) oraz wybarwionych Czerwiecią Nilu. Zdjęcia wykonałam pod powiększeniem 20x.

W komórkach linii AsPC-1 traktowanych pochodną C-1748 powstawało najmniej kropli tłuszczowych w porównaniu do komórek pozostałych badanych linii raka trzustki. W porównaniu do komórek kontrolnych, po inkubacji z pochodną C-1748 bez względu na zastosowane stężenie związku obserwowałam jedynie niewielki wzrost puli wewnątrzkomórkowych lipidów i formowanie kropli tłuszczowych (rysunek 51). Zmiany te były najbardziej widoczne po zastosowaniu związku o stężeniu równym 0,25 μM , zarówno po 24 jak i 48 godzinach inkubacji.



Rysunek 52. Cytometryczna analiza poziomu neutralnych lipidów w komórkach AsPC-1 poddanych 24 godz. ekspozycji na:

A - działanie pochodnej C-1748 o trzech różnych stężeniach (**lewy panel:** histogramy uzyskane podczas analizy cytometrycznej, **prawy panel:** analiza ilościowa wyników uzyskanych za pomocą cytometrii przepływowej), **B** - działanie pochodnej C-1748 o stężeniu 0,1 μM w kombinacji z wortmaniną o stężeniu 2 μM i wybarwionych Czerwienią Nilu (1 $\mu\text{g/ml}$). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie ** $P < 0,01$.

Poddanie komórek AsPC-1 działaniu wortmaniny powodowało jedynie niewielki wzrost ilości LD. Natomiast zastosowanie pochodnej C-1748 w połączeniu z wortmaniną, było co prawda nieco bardziej efektywne niż działanie samego C-1748, lecz ilość formujących się kropli tłuszczowych wciąż była niewielka (rysunek 52 B) w porównaniu do zmian obserwowanych w komórkach linii Panc-1, MiaPaCa-2 oraz BxPC-3.

4.10.5. Podsumowanie

Podsumowując wyniki uzyskane z mikroskopowej i cytometrycznej analizy ilości lipidów i kropli lipidowych w komórkach raków trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748 i wybarwionych Czerwienią Nilu, wykazałam, że w komórkach czterech badanych linii dochodziło do zaburzenia homeostazy neutralnych lipidów wewnątrzkomórkowych i nadmiernej akumulacji lipidów w kroplach tłuszczowych. Zmiany te najbardziej widoczne były w komórkach linii Panc-1, MiaPaCa-2 oraz BxPC-3, a więc w tych, w których dochodzi do efektywnego hamowania autofagii. W przypadku komórek linii AsPC-1 ilość LD była podobna w komórkach kontrolnych oraz tych poddanych działaniu pochodnej 1-nitroakrydyny.

Dodatkowo, równoczesne zastosowanie pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną wzmacniało efekt działania związku, co szczególnie było widoczne przy wyższych jego stężeniach, takich jak 0,1 μM , czy 0,25 μM .

Nadmierne formowanie kropli tłuszczowych i zaburzenie homeostazy lipidów, do których dochodzi na skutek działania związku są prawdopodobnie konsekwencją zahamowania autofagii w badanych komórkach raka trzustki. Autofagia podobnie jak lipoliza uznawana jest za mechanizm rozkładu i degradacji lipidów, szczególnie w sytuacji stresowej dla komórki. Dochodzi wówczas do otoczenia kropli tłuszczowej przez podwójną błonę i utworzenie autofagosomów, które następnie ulegają fuzji z lizosomami, co prowadzi do powstania autofagolizosomów, w których zachodzi ostateczny proces niszczenia ich zawartości przy użyciu hydrolaz lizosomalnych. W wyniku degradacji kropli lipidowych triacyloglicerole rozkładane są do wolnych kwasów tłuszczowych, które następnie ponownie ulegają estryfikacji i magazynowane są w postaci triacylogliceroli, lub ulegają β -oksydacji w macierzy mitochondrialnej czemu towarzyszy utworzenie ATP [Singh i wsp., 2011].

Nadmierne formowanie kropli tłuszczowych powiązane jest również z indukcją apoptozy i może stanowić jeden z markerów tego procesu. Dokładny mechanizm tego zjawiska jak narazie jest jednak tylko częściowo poznany.

4.11. Analiza aktywności kaspazy-3 w komórkach czterech linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748 w kombinacji z wortmaniną

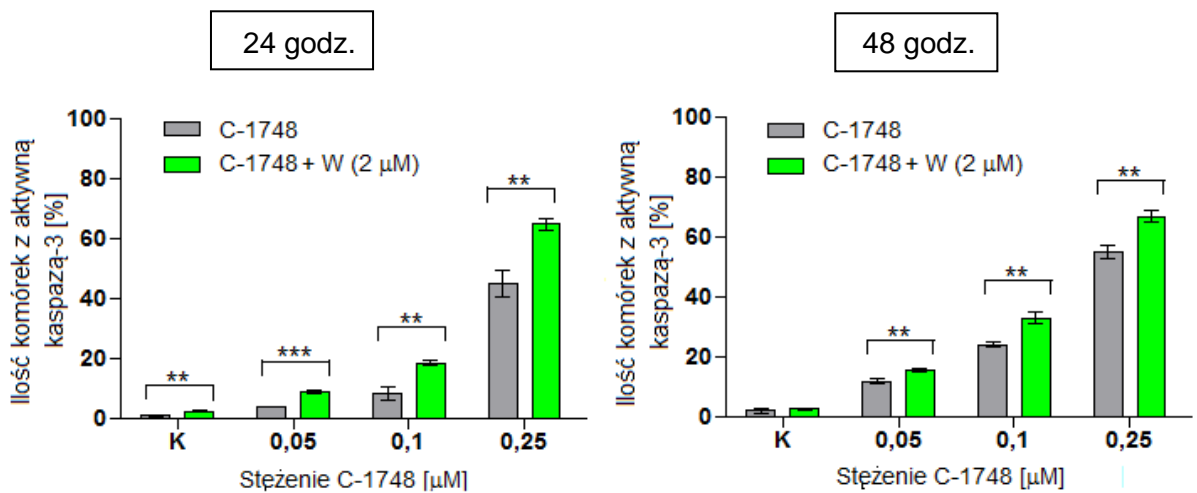
W następnym etapie badań postanowiłam sprawdzić jaki wpływ na proces apoptozy będzie miało zastosowanie pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną.

Detekcji kaspazy-3, w komórkach traktowanych pochodną C-1748 i wortmaniną, dokonałam za pomocą gotowego zestawu analitycznego (Active Caspase-3 Apoptosis Kit), zawierającego królicze przeciwciało poliklonalne, skoniugowane z fikoerytryną. Badania przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.6. Wyniki będące średnią z trzech niezależnych eksperymentów przedstawiłam w postaci wykresów zależności ilości komórek z aktywną kaspazą-3 od stężenia związków.

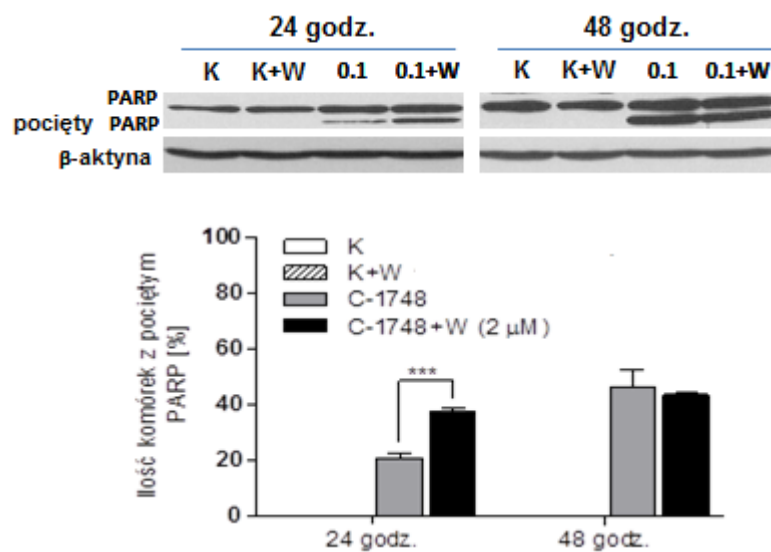
Detekcji pociętego substratu dla kaspaz: białka PARP, w komórkach traktowanych związkiem C-1748 i wortmaniną, dokonałam posługując się techniką western blotting, stosując przeciwciało rozpoznające antygen formy całkowitej oraz pociętej białka PARP. Badania przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt 6.3.7. Eksperyment powtórzyłam trzykrotnie.

4.11.1. Komórki linii Panc-1

W komórkach Panc-1 wraz z wydłużającym się czasem inkubacji ze związkiem oraz wzrastającym stężeniem związku dochodziło do wzrostu ilości komórek z aktywną kaspazą-3, czyli komórek apoptotycznych (rysunek 53). Połączenie C-1748 z wortmaniną o stężeniu równym 2 μM dawało synergistyczny efekt i dodatkowo wzmacniało proapoptotyczne działanie związku. Po 24 godzinach inkubacji ilość komórek Panc-1 z aktywną kaspazą-3, traktowanych równocześnie pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,25 μM i wortmaniną (2 μM) była o 20 % wyższa niż w przypadku traktowania komórek jedynie pochodną C-1748. Podobne zmiany obserwowałam również po 48 godzinach inkubacji komórek ze związkami.



Rysunek 53. Zmiany w ilości komórek z aktywną kaspazą-3 w komórkach linii Panc-1, traktowanych różnymi stężeniami pochodnej C-1748 i pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną o stężeniu 2 μM . Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

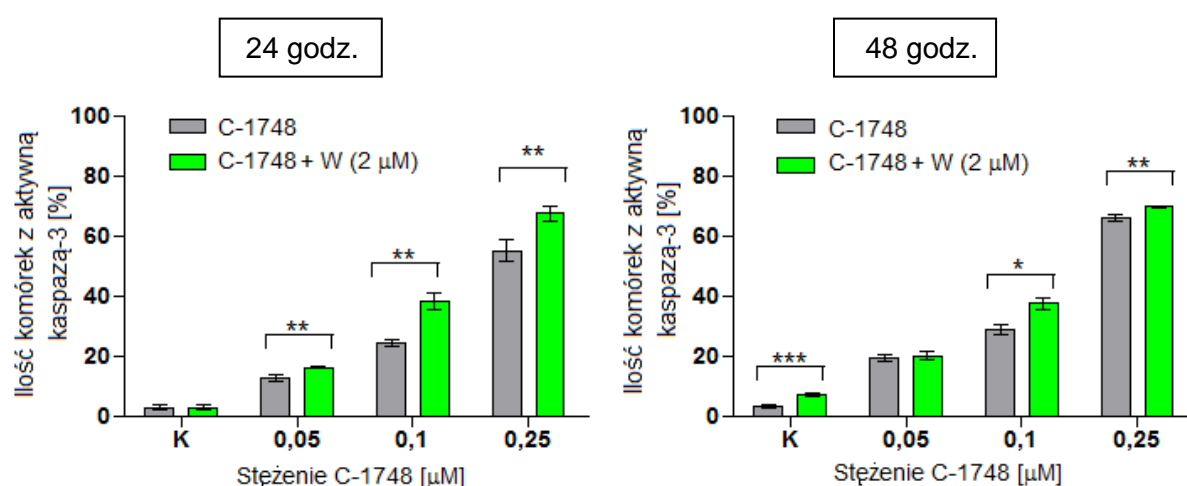


Rysunek 54. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka PARP: formy całkowitej i pociętej w komórkach Panc-1 traktowanych pochodną C-1748 (stężenie 0,1 μM) w połączeniu z wortmaniną (stężenie 2 μM) - **górnny panel**. Densytometryczna analiza prążków - **dolny panel**. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie *** $P < 0,001$.

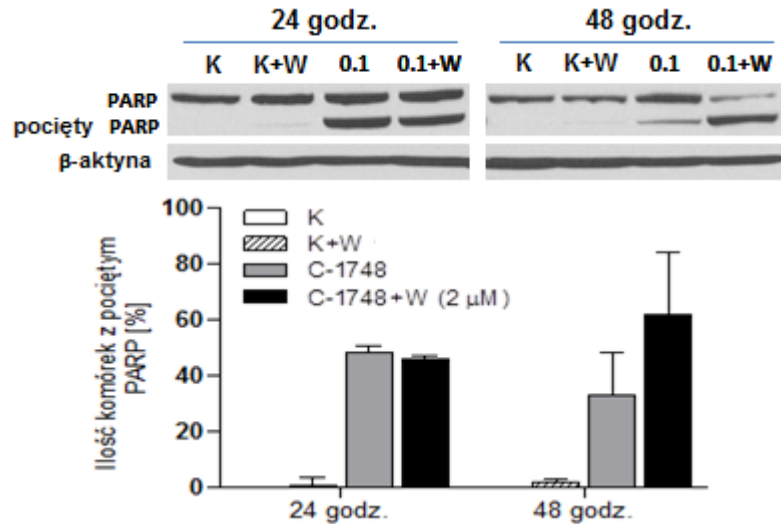
Dodatkowo, analiza western blotting poziomu ekspresji białka PARP potwierdziła wzrost ilości pociętej formy PARP w komórkach Panc-1 traktowanych pochodną C-1748 a działanie związku dodatkowo wzmocnione było przy równoczesnym zastosowaniu pochodnej 1-nitroakrydyny w kombinacji z wortmaniną (rysunek 54). Synergistyczny efekt działania związków był szczególnie widoczny po 24 godzinnej inkubacji dla stężenia C-1748 równego 0,1 μM . Obserwowałam wówczas wzrost ilości komórek z pociętym PARP z 20 % w przypadku zastosowania jedynie C-1748 do ok. 40 %, przy równoczesnym zastosowaniu C-1748 i wortmaniny. Z kolei po 48 godzinach inkubacji ilość komórek Panc-1 z pociętym PARP poddanych działaniu pochodnej C-1748 i pochodnej C-1748 w połączeniu z wortmaniną była zbliżona.

4.11.2. Komórki linii MiaPaCa-2

W komórkach linii MiaPaCa-2 do indukcji apoptozy w wyniku działania pochodnej C-1748 dochodziło już przy stężeniu związku równym 0,05 μM , a ilość komórek z aktywną kaspazą-3 rosła wraz ze wzrostem stężenia związku i czasu inkubacji komórek (rysunek 55). Po 48 godz. traktowania komórek MiaPaCa-2 pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,25 μM , ilość komórek apoptotycznych wynosiła ok. 70 %. Kombinacja wortmaniny z C-1748 wzmocniała proapoptotyczny efekt działania samego związku, co było szczególnie widoczne po 24 godzinach inkubacji komórek ze związkami. Populacja komórek apoptotycznych wzrosła o dodatkowe 20 % po zastosowaniu kombinacji związków, w porównaniu do ekspozycji komórek jedynie na pochodną C-1748.



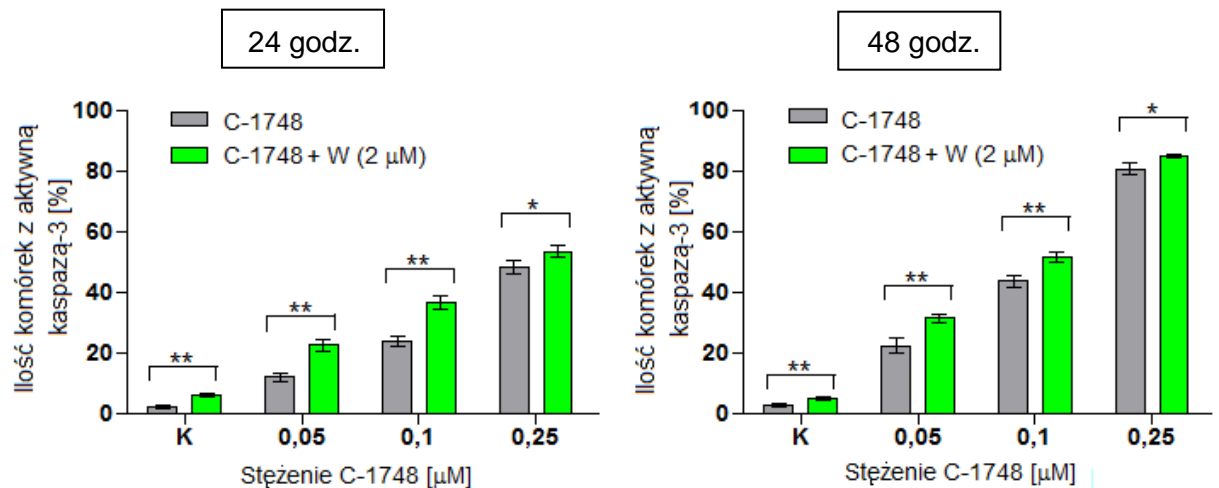
Rysunek 55. Zmiany w ilości komórek z aktywną kaspazą-3 w komórkach linii MiaPaCa-2, traktowanych różnymi stężeniami pochodnej C-1748 i pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną o stężeniu 2 μM . Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.



Rysunek 56. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka PARP: formy całkowitej i pociętej w komórkach MiaPaCa-2 traktowanych pochodną C-1748 (stężenie 0,1 μM) w połączeniu z wortmaniną (stężenie 2 μM) - **górny panel**. Densytometryczna analiza prążków - **dolny panel**.

Na przedstawionym powyżej wykresie densytometrycznej analizy wyników uzyskanych metodą western blotting pomiaru poziomu ekspresji białka PARP (rysunek 56) widać, że po 48 godzinach inkubacji dochodziło do wzrostu ilości komórek z pociętym PARP o ok. 20 % przy równoczesnym zastosowaniu pochodnej C-1748 i wortmaniny (ok. 60 % komórek apoptotycznych) w stosunku do komórek MiaPaCa-2 traktowanych jedynie pochodną C-1748 (ok. 40 % komórek apoptotycznych).

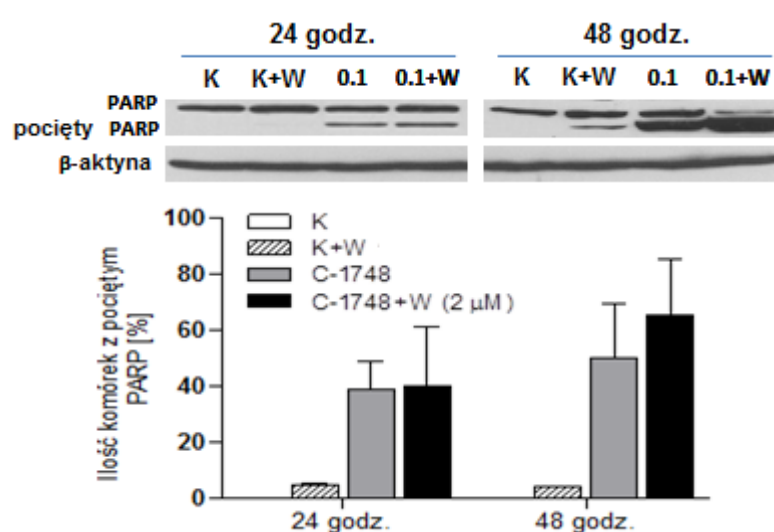
4.11.3. Komórki linii BxPC-3



Rysunek 57. Zmiany w ilości komórek z aktywną kaspazą-3 w komórkach linii BxPC-3, traktowanych różnymi stężeniami pochodnej C-1748 i pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną o stężeniu 2 μM . Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Komórki linii BxPC-3 również ulegały apoptozie w wyniku działania pochodnej C-1748 zastosowanej w trzech różnych stężeniach już po 24 godzinach inkubacji komórek ze

związkiem (rysunek 57). Ponadto, ilość komórek z aktywną kaspazą-3 dodatkowo wzrastała po dłuższym czasie inkubacji komórek z pochodną 1-nitroakrydyny. Po 48 godzinnej ekspozycji komórek linii BxPC-3 na działanie pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,25 μM , ilość komórek apoptotycznych wynosiła już ponad 80 % w stosunku do kontroli. Równoczesne zastosowanie pochodnej 1-nitroakrydyny i wortmaniny dodatkowo uwrażliwiało komórki na działanie związku, co szczególnie było widoczne dla niższych stężeń C-1748 wynoszących 0,05 μM i 0,1 μM . W całym zakresie stężeń i po dwóch czasach inkubacji ilość komórek apoptotycznych była wyższa po inkubacji z dwoma związkami w porównaniu do inkubacji jedynie z pochodną C-1748, a różnice te były statystycznie istotne.



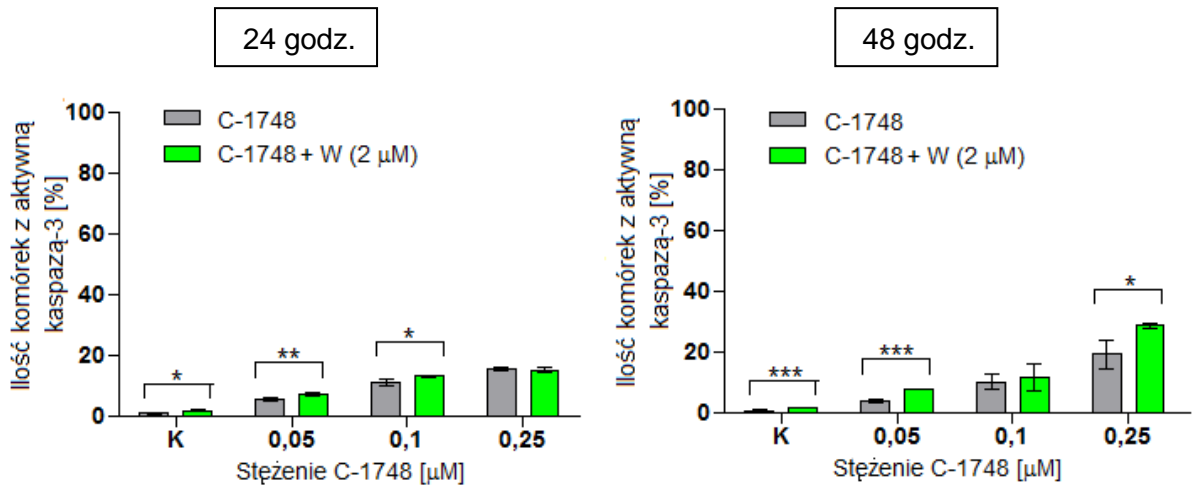
Rysunek 58. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka PARP: formy całkowitej i pociętej w komórkach BxPC-3 traktowanych pochodną C-1748 (stężenie 0,1 μM) w połączeniu z wortmaniną (stężenie 2 μM) - **górnny panel**. Densytometryczna analiza prążków - **dolny panel**.

Analiza poziomu ekspresji pociętego białka PARP, dodatkowo potwierdziła synergistyczne działanie pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną w komórkach linii BxPC-3. Po 48 godzinnej inkubacji komórek ze związkami obserwowałam ponad 60 % komórek apoptotycznych w porównaniu do około 40 % po inkubacji komórek jedynie z pochodną C-1748 (rysunek 58).

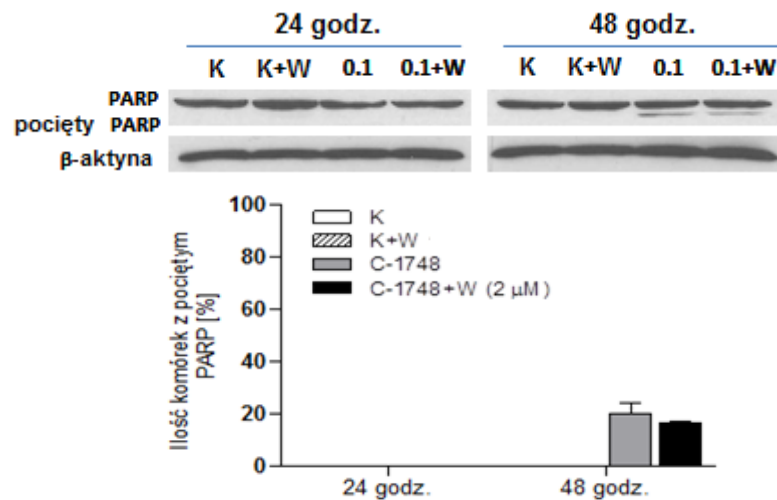
4.11.4. Komórki linii AsPC-1

Komórki linii AsPC-1 były najbardziej odporne na indukowaną przez pochodną C-1748 apoptozę. Nawet po 48 godz. inkubacji ze związkiem o stężeniu równym 0,25 μM ilość komórek z aktywną kaspazą-3 była nieznaczna i wynosiła ok. 20 % (rysunek 59). Równoczesna inkubacja komórek AsPC-1 z pochodną C-1748 i wortmaniną skutkowałą,

nieznacznym, lecz statystycznie istotnym wzrostem ilości komórek apoptotycznych, szczególnie po 48 godzinach inkubacji.



Rysunek 59. Zmiany w ilości komórek z aktywną kaspazą-3 w komórkach linii AsPC-1, traktowanych różnymi stężeniami pochodnej C-1748 i pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną o stężeniu 2 μM. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.



Rysunek 60. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka PARP: formy całkowitej i pociętej w komórkach BxPC-3 traktowanych pochodną C-1748 (stężenie 0,1 μM) w połączeniu z wortmaniną (stężenie 2 μM) - **górny panel**. Densytometryczna analiza prążków - **dolny panel**.

Analiza western blotting obecności pociętej formy białka PARP potwierdziła indukcję apoptozy w komórkach AsPC-1 dopiero po 48 godzinach inkubacji z pochodną C-1748. W przypadku komórek tej linii równoczesna inkubacja komórek z C-1748 i wortmaniną skutkowała nieznacznym spadkiem ilości komórek apoptotycznych w porównaniu do zastosowania samej pochodnej 1-nitroakrydyny (rysunek 60).

4.11.5. Podsumowanie

Cytometryczna analiza aktywności kaspazy-3 oraz analiza western blotting poziomu ekspresji formy całkowitej i pociętej białka PARP będącego substratem dla kaspaz, pozwoliły określić wpływ zastosowania kombinacji pochodnej C-1748 z wortmanią na przebieg procesu apoptozy w komórkach czterech badanych linii raka trzustki. Zarówno w komórkach Panc-1, MiaPaCa-2, jak i BxPC-3 dodatek inhibitora autofagii wzmacniał proapoptotyczne działanie pochodnej 1-nitroakrydyny nawet o kilkanaście procent w stosunku do komórek poddanych działaniu jedynie pochodnej C-1748, co szczególnie było widoczne po 24 godzinnej ekspozycji komórek na związki i przy stężeniu C-1748 równym 0,1 μM . W przypadku komórek linii AsPC-1 synergistyczny efekt działania związków nie był już tak widoczny, a ok. 5 % wzrost ilości komórek apoptotycznych z aktywną kaspazą-3 po ekspozycji na kombinację związków w porównaniu do działania samej pochodnej C-1748 obserwovałam jedynie po 48 godzinnej inkubacji komórek AsPC-1 z wortmanią i C-1748 o stężeniu równym 0,05 μM i 0,25 μM .

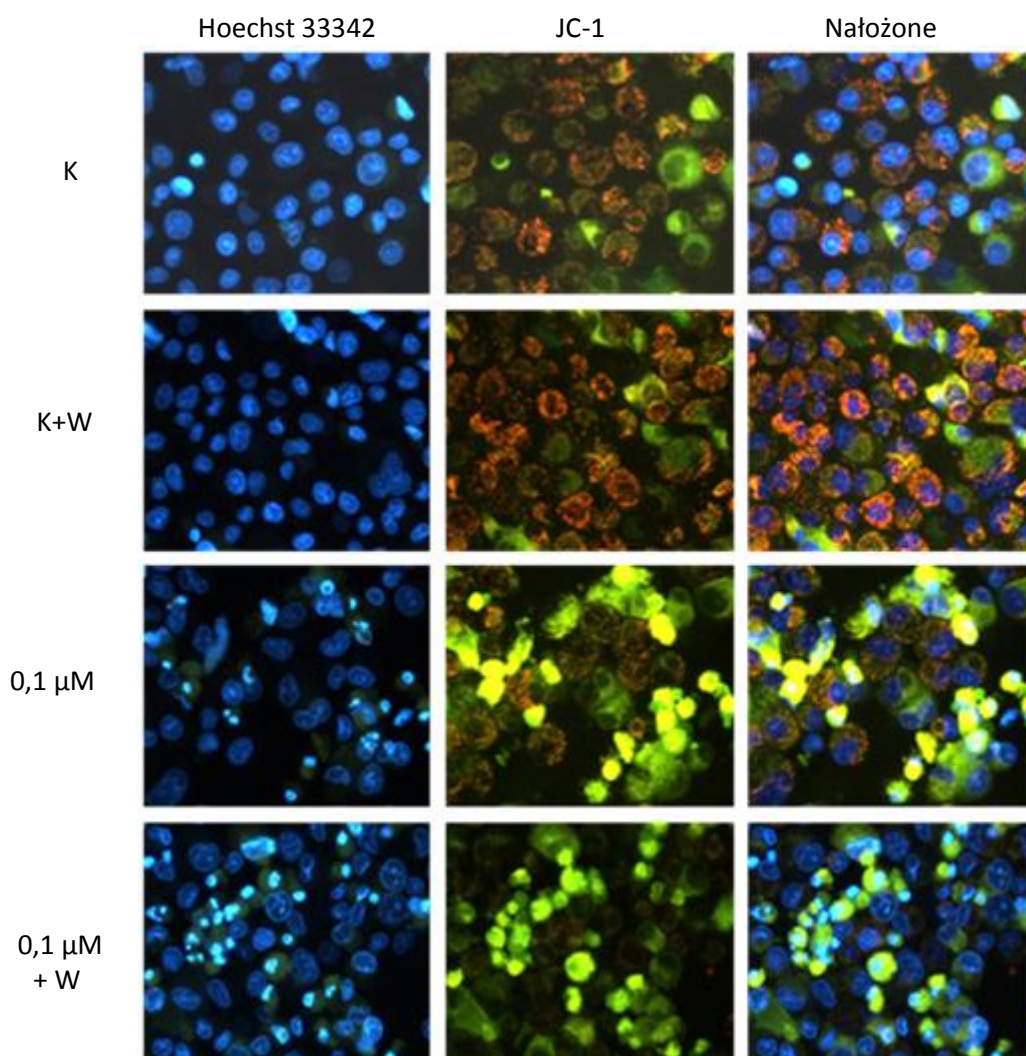
4.12. Analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego i morfologii jąder komórkowych w komórkach czterech linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748 i wortmaniną

Wyniki cytometrycznej analizy aktywności kaspazy-3 wraz z analizą western blotting poziomu ekspresji pociętego białka PARP, będącego substratem dla kaspaz wykazały, że w komórkach czterech badanych linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748 lub pochodną C-1748 w połączeniu z wortmaniną dochodziło w różnym stopniu do indukcji apoptozy. Ponieważ szereg doniesień literaturowych wskazuje na istotny udział mitochondriów w kontrolowaniu procesu apoptozy [Ly i wsp., 2003], indukowanej przez związki przeciwnowotworowe, w dalszej części pracy postanowiłam określić ich rolę w mechanizmie indukcji tego typu śmierci. Zanik potencjału elektrochemicznego ($\Delta\Psi_m$) na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, następujący przed pojawieniem się fragmentacji DNA jest jednym z kluczowych parametrów określających zaburzenie funkcji tychże organelli podczas apoptozy. Spadek potencjału $\Delta\Psi_m$ poniżej krytycznej wartości, świadczy o otwieraniu megakanalów mitochondrialnych i uwalnianiu z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej czynników proapoptotycznych, co w sposób nieodwracalny kieruje komórkę na drogę apoptozy [Kroemer i wsp., 2007]. W celu oznaczenia depolaryzacji błony mitochondriów komórek nowotworowych trzustki poddanych działaniu związku C-1748 w kombinacji z inhibitorem autofagii, zastosowałam lipofilowy barwnik kationowy JC-1, który posiada zdolność do selektywnego wnikania do mitochondriów. Kiedy błona mitochondrialna jest spolaryzowana, barwnik tworzy agregaty emitujące światło w zakresie fluorescencji pomarańczowej. Wraz ze spadkiem wartości potencjału, maleje również ilość agregatów fluorochromu, który zaczyna występować w formie monomerów, emitujących światło w zakresie fluorescencji zielonej [Perelman i wsp., 2012].

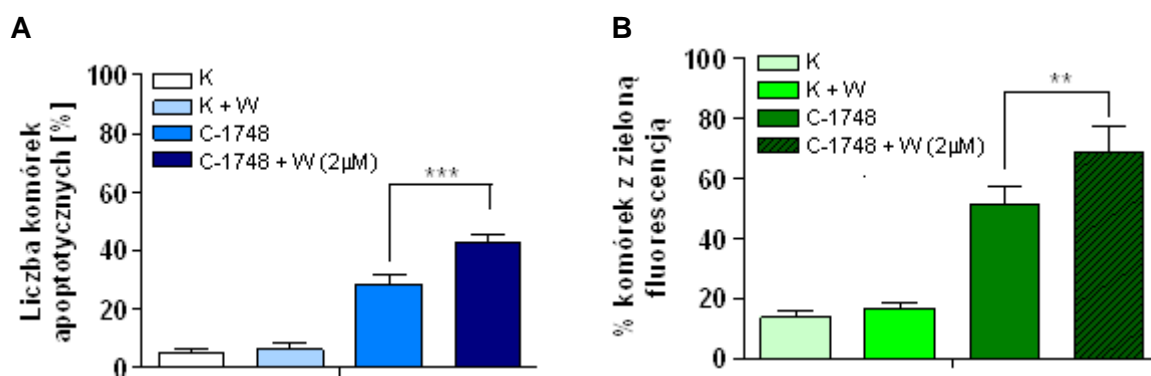
Równocześnie, zbadałam wpływ pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną na zmiany w morfologii jąder komórkowych komórek czterech badanych linii raka trzustki. Zastosowałam barwnik Hoechst 33342, który wnika do komórek przez błonę komórkową i interkaluje preferencyjnie do rejonów DNA bogatych w pary AT. Po wzbudzeniu światłem ultrafioletowym, Hoechst wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 358$ nm oraz maksimum emisji przy $\lambda = 461$ nm, dzięki czemu możliwa jest mikroskopowa obserwacja wybarwionego materiału genetycznego [Chazotte, 2011]. Apoptotyczne komórki mają jądra o nieregularnych kształtach, skondensowaną chromatynę, intensywniejszą fluorescencję i cechują się wzmożoną fragmentacją jądra. Dla porównania jądra prawidłowych komórek są okrągłe, o gładkich krawędziach i jednakowo wybarwione [Häcker, 2000].

Wyniki są średnią z dwóch niezależnych eksperymentów, a badania przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.5. i pkt. 6.3.11.

4.12.1 Komórki linii Panc-1



Rysunek 61. Mikroskopowa analiza zmian w morfologii jąder komórkowych i zmian potencjału mitochondrialnego komórek Panc-1 po 48 godzinnej inkubacji z C-1748 i kombinacji C-1748 z wortmaniną (2 μM), wybarwionych Hoechstem 33342 i JC-1. Kolor czerwony: żywe komórki z wysokim potencjałem mitochondrialnym błony. Kolor zielony: komórki apoptotyczne z niskim potencjałem mitochondrialnym błony. Kolor niebieski-jądra kom. wybarwione Hoechstem 33342. Powiększenie 20x.



Rysunek 62. Ilościowa analiza: **A)** zmian w morfologii jąder komórkowych, **B)** zmian $\Delta\Psi_m$ na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, komórek Panc-1 poddanych 48 godzinnej inkubacji z samym C-1748 (0,1 μM) lub w kombinacji z wortmaniną (2 μM). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie ** P < 0,01, *** P < 0,001.

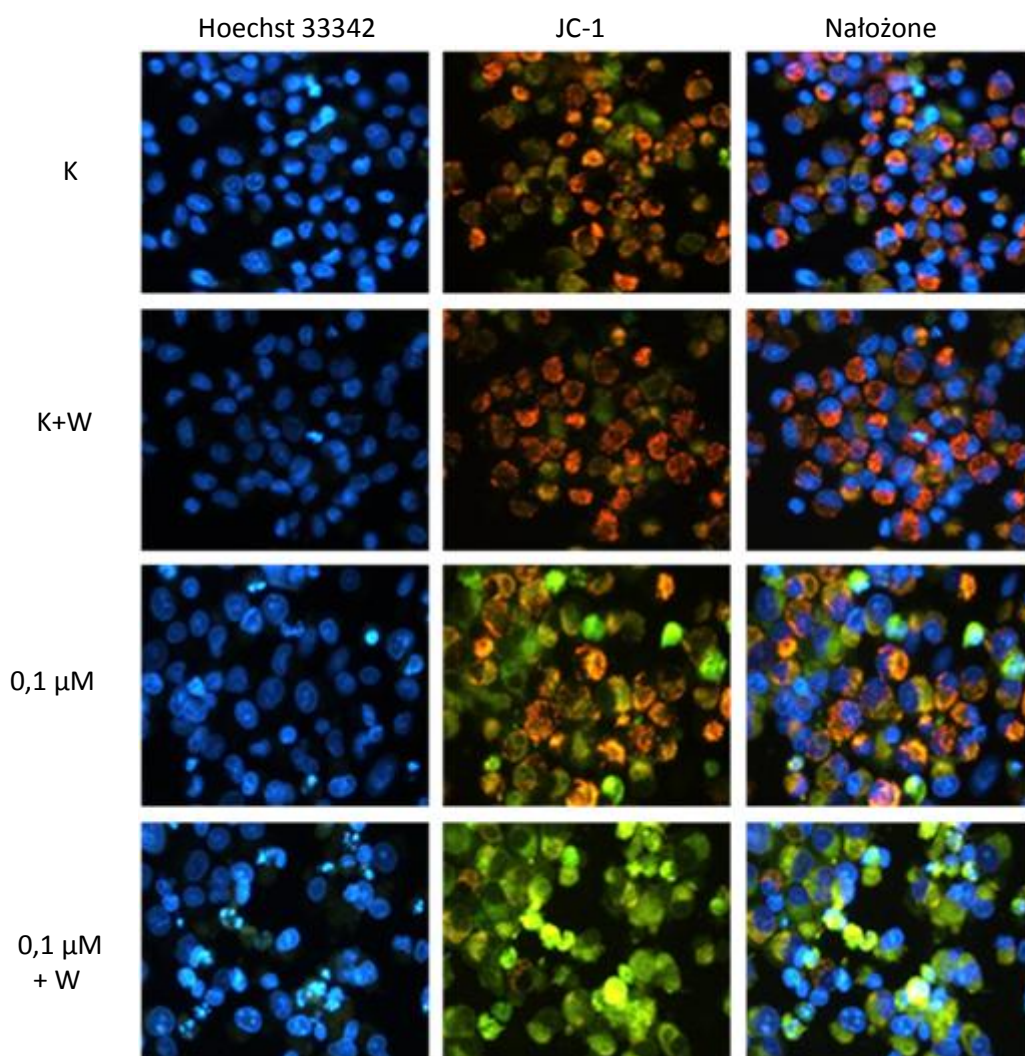
Mikroskopowa analiza zmian w morfologii jąder komórkowych i zmian potencjału elektrochemicznego na wewnętrznej błonie mitochondrialnej w komórkach Panc-1 traktowanych pochodną C-1748 lub C-1748 w kombinacji z wortmaniną dodatkowo potwierdziła indukcję apoptozy w tych komórkach.

W odniesieniu do komórek kontrolnych, 48 godzinna inkubacja z pochodną C-1748 prowadziła do istotnych zmian w ilości komórek o niskim potencjale mitochondrialnym błony, co doskonale można było zaobserwować na zdjęciach wykonanych pod mikroskopem fluorescencyjnym (rysunek 61). W komórkach nietraktowanych związkiem lub poddanych działaniu jedynie wortmaniny o stężeniu równym 2 μM obserwowałam pojedyncze komórki o zielonej fluorescencji pochodzącej od monomerów JC-1. Po ekspozycji komórek Panc-1 na pochodną 1-nitroakrydyny o stężeniu równym 0,1 μM obserwowałam wzrost populacji komórek z uszkodzonymi mitochondriami do ok. 50 % w porównaniu do 10 % w komórkach kontrolnych (rysunek 62 B). Równoczesne zastosowanie wortmaniny i C-1748 dodatkowo wzmacniało działanie pochodnej C-1748 i obserwowałam już ok. 80 % komórek z obniżonym potencjałem mitochondrialnym błony. Po 48 godzinach inkubacji komórek ze związkami (C-1748 + wortmanina), populacja komórek Panc-1 z uszkodzonymi mitochondriami była znacznie wyższa niż populacja komórek Panc-1 z aktywną kaspazą-3 (ok. 35 %), co świadczy o tym, że podczas apoptozy indukowanej w tych komórkach przez pochodną C-1748, spadek mitochondrialnego potencjału błonowego poprzedza apoptotyczną fragmentację DNA.

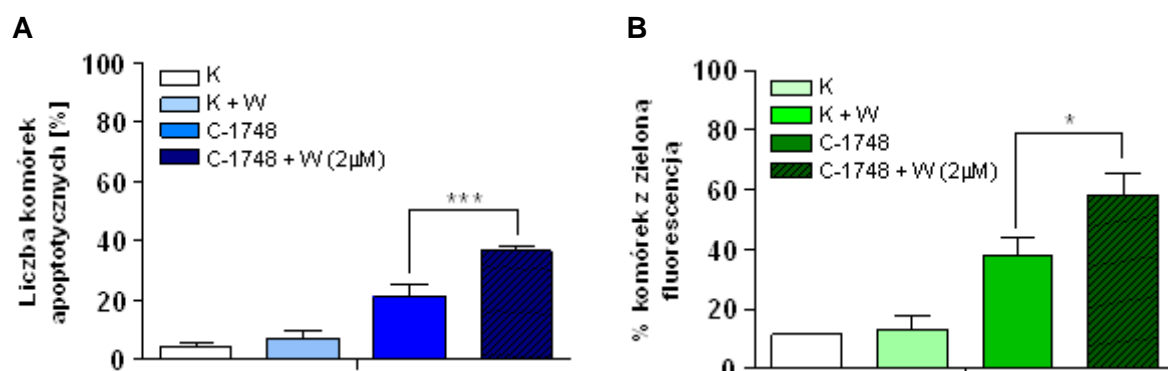
Zmianom zachodzącym w mitochondriach, do których dochodziło po ekspozycji komórek Panc-1 na działanie pochodnej C-1748 lub pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną towarzyszyły również zmiany w morfologii jąder komórkowych, wybarwionych Hoechstem 33342 (rysunek 61). Mikroskopowa analiza wykazała, że w komórkach kontrolnych, jak i tych poddanych działaniu jedynie wortmaniny, większość komórek posiadała prawidłową morfologię bez zmian wskazujących na apoptozę. Po 48 godzinnej ekspozycji komórek na działanie pochodnej 1-nitroakrydyny obserwowałam wzrost populacji komórek apoptotycznych do około 30 %. Dochodziło wówczas do kondensacji chromatyny i pojawienia się tzw. ciałek apoptotycznych. Równoczesne zastosowanie pochodnej C-1748 i wortmaniny spowodowało wzrost ilości komórek o morfologii charakterystycznej dla procesu apoptozy o kolejne 15 % w porównaniu do komórek traktowanych jedynie C-1748.

Analizując wykresy przedstawione na rysunku 61 można zauważyć, że ilość komórek Panc-1 ze zmianami morfologicznymi wskazującymi na apoptozę jest znacznie mniejsza niż ilość komórek z uszkodzonymi mitochondriami, co jest jednak prawidłową zależnością, gdyż zmiany w DNA do których dochodzi na skutek działania chemoterapeutyków pojawiają się później niż zmiany w obrębie błony mitochondrialnej [Barroso i wsp., 2006].

4.12.2. Komórki linii MiaPaCa-2



Rysunek 63. Mikroskopowa analiza zmian w morfologii jąder komórkowych i zmian potencjału mitochondrialnego komórek MiaPaCa-2 po 48 godzinnej inkubacji z C-1748 i kombinacji C-1748 z wortmaniną (2 μ M), wybarwionych Hoechstem 33342 i JC-1. Kolor czerwony: żywe komórki z wysokim potencjałem mitochondrialnym błony. Kolor zielony: komórki apoptotyczne z niskim potencjałem mitochondrialnym błony. Kolor niebieski- jądra kom. wybarwione Hoechstem 33342. Powiększenie 20x.



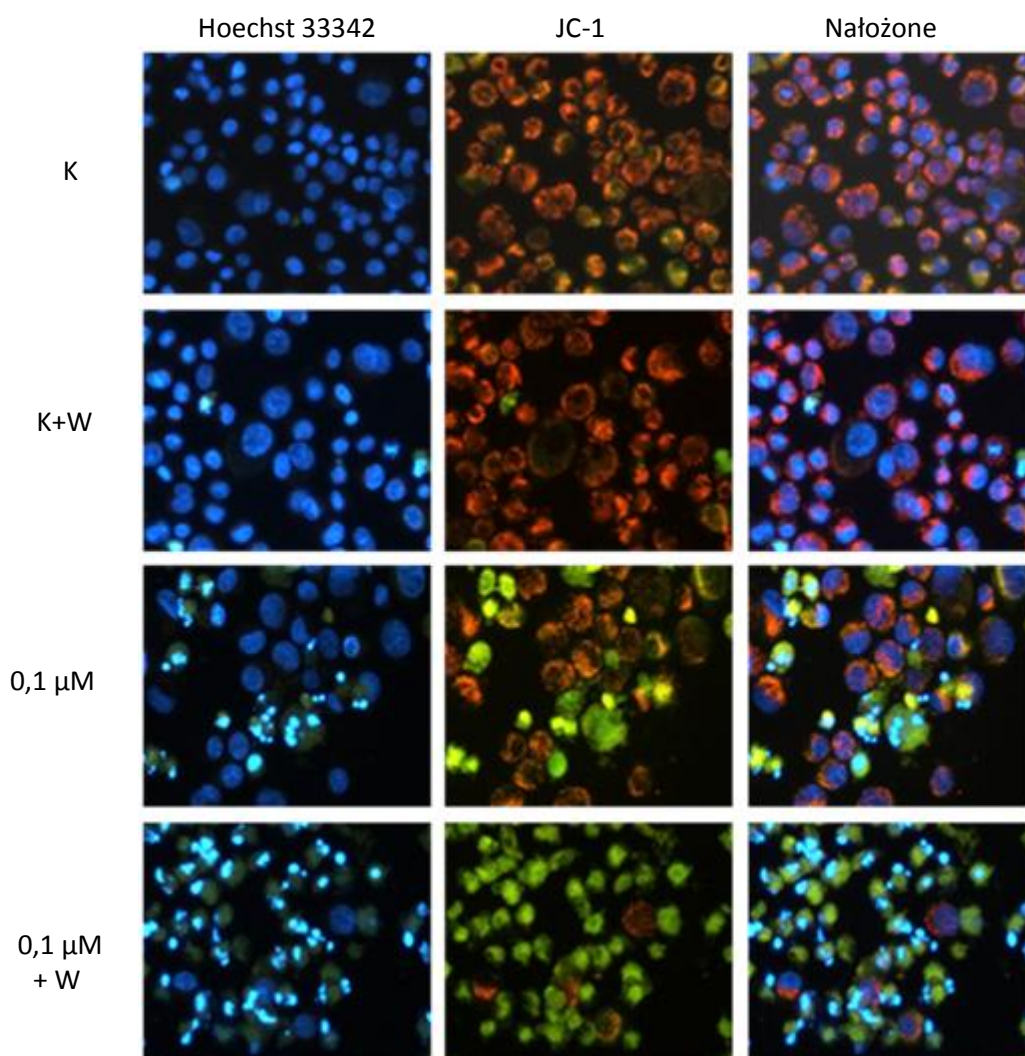
Rysunek 64. Ilościowa analiza: A) zmian w morfologii jąder komórkowych, B) zmian $\Delta\Psi_m$ na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, komórek MiaPaCa-2 poddanych 48 godzinnej inkubacji z samym C-1748 (0,1 μ M) lub w kombinacji z wortmaniną (2 μ M). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Wyniki uzyskane z trzyparametrowej analizy mikroskopowej komórek MiaPaCa-2 traktowanych pochodną C-1748 lub C-1748 w połączeniu z wortmaniną i wybarwionych JC-1 oraz Hoechstem 33342, wyraźnie świadczą o depolaryzacji błon mitochondrialnych i zmianach zachodzących w morfologii jąder komórek MiaPaCa-2 (rysunek 63).

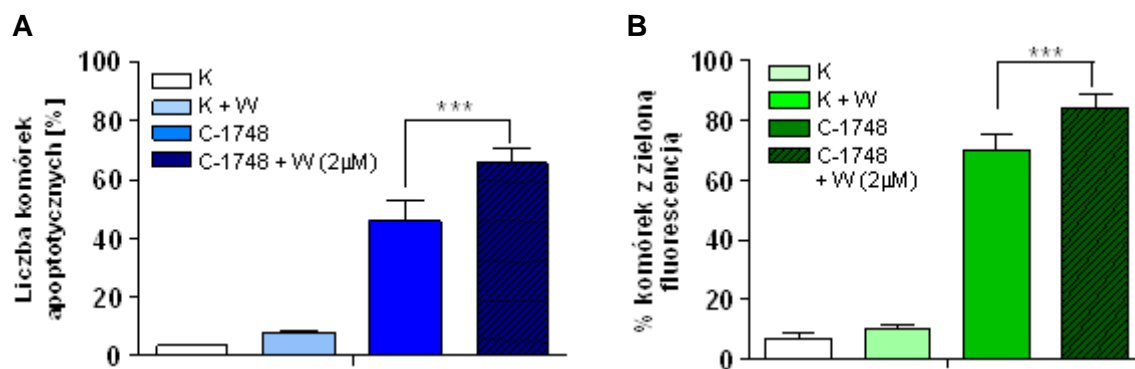
Po 48 godzinnej inkubacji jedynie nieliczne komórki (ok. 10 %) nietraktowane związkami, lub poddane działaniu jedynie wortmaniny o stężeniu równym 2 μM wykazywały zieloną fluorescencję pochodzącą od monomerów JC-1 zakumulowanych w komórkach. W porównaniu do komórek kontrolnych, w komórkach traktowanych pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM dochodziło do zmiany potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej u około 40 % populacji komórek MiaPaCa-2. Dodatkowo, równoczesne zastosowanie pochodnej C-1748 i wortmaniny wzmacniało działanie związku. Na podstawie ilościowej analizy populacji komórek wykazujących zieloną fluorescencję wyraźnie widać, że równoczesne zastosowanie kombinacji związków wywierało silny, synergistyczny efekt, a ilość komórek o zaburzonej funkcji mitochondriów wzrastała do ponad 60 % w porównaniu do 40 % populacji komórek o niskim potencjale mitochondrialnym błony po traktowaniu ich jedynie pochodną C-1748 (rysunek 64 B). Podobnie jak w przypadku komórek linii Panc-1, populacja komórek MiaPaCa-2 z uszkodzonymi mitochondriami była dużo wyższa (ok. 60 %) w porównaniu do ilości komórek z aktywną kaspazą-3 (ok. 40 %) po 48 godzinnej inkubacji komórek ze związkami. Świadczy to o tym, że zmiany wyindukowane przez związki w mitochondriach zachodzą dużo wcześniej, a ich konsekwencją może być aktywacja szlaków apoptozy prowadzących do uwolnienia kaspaz i uszkodzenia DNA.

W wyniku uszkodzenia mitochondriów i aktywacji procesu apoptozy, na skutek działania związków dochodziło również do zmian w morfologii jąder komórek MiaPaCa-2. Na zdjęciach uzyskanych z mikroskopowej analizy morfologii jąder komórkowych wybarwionych Hoechstem 33342 (rysunek 63) można zauważyć, że zarówno komórki kontrolne, jak i komórki poddane działaniu jedynie wortmaniny charakteryzowały się prawidłową morfologią, bez zmian wskazujących na indukcję procesu apoptozy. Po 48 godzinnej ekspozycji komórek MiaPaCa-2 na działanie pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM obserwowałam wzrost ilości komórek apoptotycznych do ok. 20 % w porównaniu do kontroli. Równoczesne zastosowanie pochodnej 1-nitroakrydyny i wortmaniny spowodowało dodatkowy wzrost populacji komórek wykazujących zmiany charakterystyczne dla procesu apoptozy w komórkach MiaPaCa-2 w stosunku do efektu uzyskanego przez samą pochodną C-1748 (rysunek 64 A). Widoczne były wówczas charakterystyczne dla końcowego stadium przebiegu apoptozy ciała apoptotyczne oraz komórki ze skondensowaną chromatyną.

4.12.3. Komórki linii BxPC-3



Rysunek 65. Mikroskopowa analiza zmian w morfologii jąder komórkowych i zmian potencjału mitochondrialnego komórek BxPC-3 po 48 godzinnej inkubacji z C-1748 i kombinacji C-1748 z wortmaniną (2 μM), wybarwionych Hoechstem 33342 i JC-1. Kolor czerwony: żywe komórki z wysokim potencjałem mitochondrialnym błony. Kolor zielony: komórki apoptotyczne z niskim potencjałem mitochondrialnym błony. Kolor niebieski-jądra kom. wybarwione Hoechstem 33342. Powiększenie 20x.



Rysunek 66. Ilościowa analiza: **A)** zmian w morfologii jąder komórkowych, **B)** zmian $\Delta\Psi_m$ na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, komórek BxPC-3 poddanych 48 godzinnej inkubacji z samym C-1748 (0,1 μM) lub w kombinacji z wortmaniną (2 μM). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie *** $P < 0,001$.

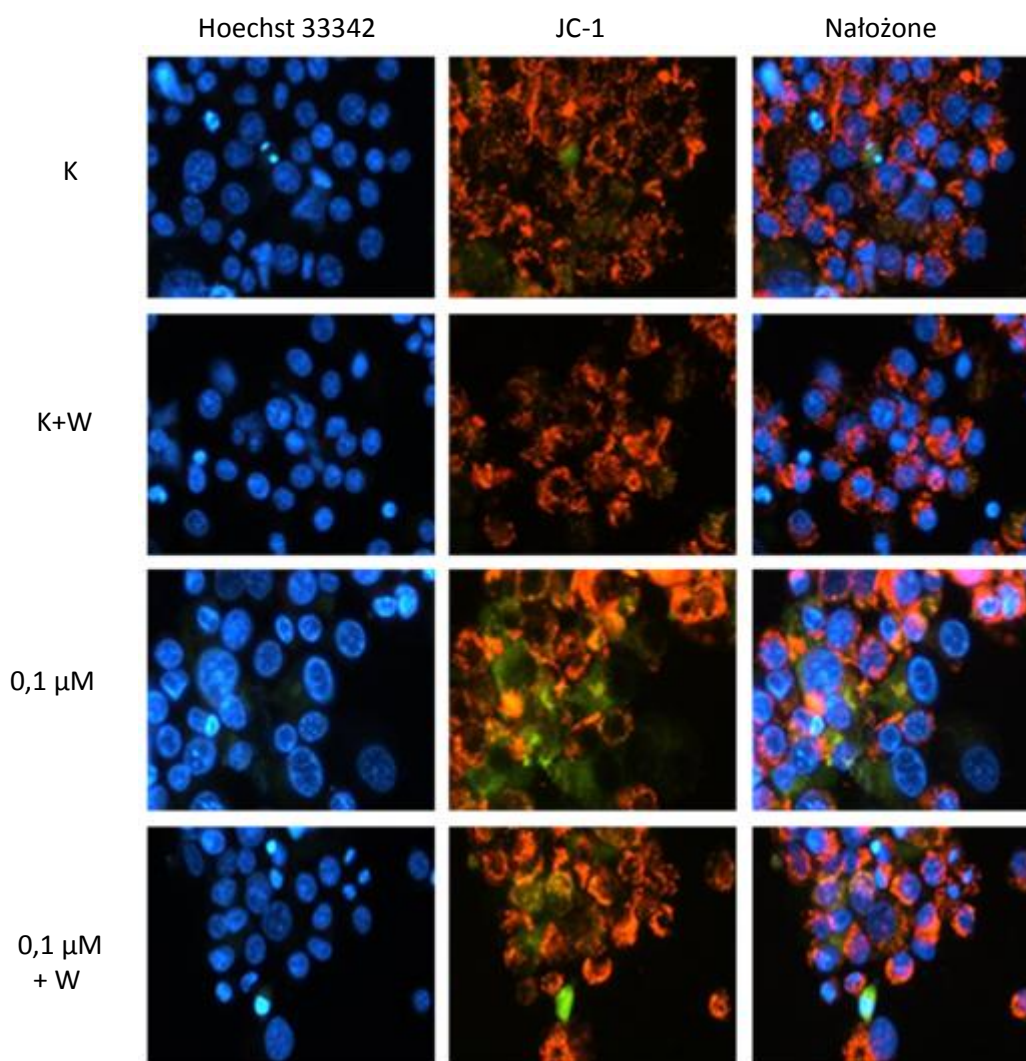
Komórki linii BxPC-3, spośród komórek czterech badanych przez mnie linii raka trzustki, były najbardziej wrażliwe na indukowaną w wyniku działania pochodnej C-1748 oraz kombinacji pochodnej C-1748 z wortmaniną apoptozę, o czym świadczą wyniki uzyskane z mikroskopowych obserwacji zmian w morfologii jąder komórkowych i zmian potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Po 48 godzinach inkubacji jedynie pojedyncze komórki kontrolne i poddane działaniu wortmaniny wykazywały zieloną fluorescencję pochodzącą od monomerów JC-1. Znacznie większą populację stanowiły komórki, których błona mitochondrialna była prawidłowo spolaryzowana, a barwnik JC-1 kumulował się w postaci agregatów emitujących światło w zakresie fluorescencji pomarańczowej (rysunek 65). W wyniku 48 godzinnej ekspozycji komórek BxPC-3 na działanie pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM dochodziło do znacznego wzrostu populacji komórek o obniżonym potencjale błony mitochondrialnej w porównaniu do komórek kontrolnych. Ilość komórek, w których na skutek działania związku doszło do spadku potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej wynosiła ponad 60 % w stosunku do ok. 5 % w przypadku komórek nietraktowanych związkiem (rysunek 66 B). Zastosowanie pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną o stężeniu równym 2 μM dodatkowo wzmacniało działanie samego związku. Dochodziło wówczas do wzrostu ilości komórek wykazujących zieloną fluorescencję do ponad 80 %.

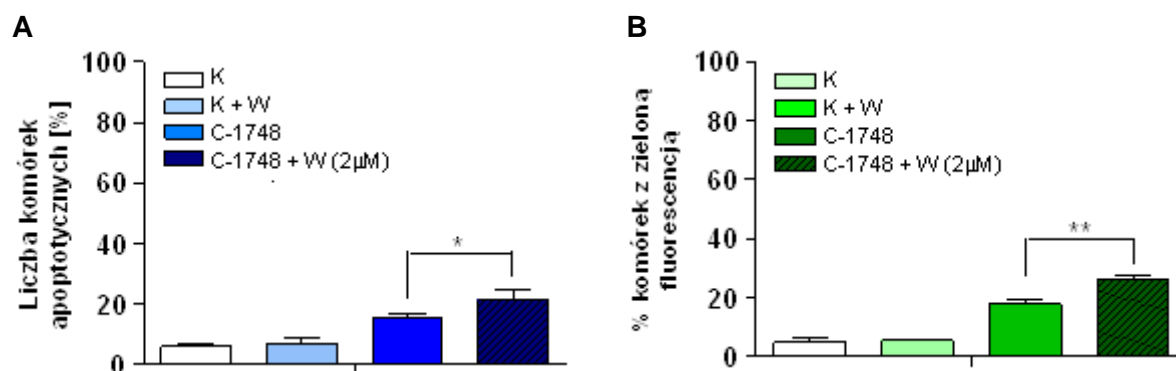
Mikroskopowa analiza zmian w morfologii jąder komórek BxPC-3 wybarwionych Hoechstem 33342 wykazała obecność znacznej populacji komórek o zmienionej morfologii. Komórki BxPC-3 nietraktowane pochodną C-1748, lub poddane działaniu jedynie wortmaniny, podobnie jak komórki linii Panc-1, czy MiaPaCa-2 charakteryzowały się prawidłową, niezmienną morfologią jąder komórkowych. 48 godzinna ekspozycja komórek BxPC-3 na działanie pochodnej C-1748 skutkowałą wzrostem populacji komórek ze zmianami morfologicznymi charakterystycznymi dla procesu apoptozy do ponad 40 %. Obserwowałam wówczas komórki ze skondensowaną chromatyną, intensywną fluorescencją i licznymi ciałkami apoptotycznymi. Ponadto, ilość tych komórek wzrosła o kolejne 20 %, po traktowaniu ich równocześnie wortmaniną i pochodną C-1748 (rysunek 66 A).

Porównanie wyników cytometrycznej analizy aktywacji kaspazy-3 i mikroskopowej analizy zmian potencjału mitochondrialnego komórek linii BxPC-3, podobnie jak w przypadku komórek linii Panc-1 oraz MiaPaCa-2 wskazuje, że uszkodzenie mitochondriów poprzedza indukcję apoptozy zależnej od kaspaz i fragmentację DNA.

4.12.4. Komórki linii AsPC-1



Rysunek 67. Mikroskopowa analiza zmian w morfologii jąder komórkowych i zmian potencjału mitochondrialnego komórek AsPC-1 po 48 godzinnej inkubacji z C-1748 i kombinacji C-1748 z wortmaniną (2 μ M), wybarwionych Hoechstem 33342 i JC-1. Kolor czerwony: żywe komórki z wysokim potencjałem mitochondrialnym błony. Kolor zielony: komórki apoptotyczne z niskim potencjałem mitochondrialnym błony. Kolor niebieski- jądra kom. wybarwione Hoechstem 33342. Powiększenie 20x.



Rysunek 68. Ilościowa analiza: **A)** zmian w morfologii jąder komórkowych, **B)** zmian $\Delta\Psi_m$ na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, komórek AsPC-1 poddanych 48 godzinnej inkubacji z z samym C-1748 (0,1 μ M) lub w kombinacji z wortmaniną (2 μ M). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Trzyparametrowa analiza zmian w morfologii jąder komórkowych i zmian potencjału mitochondrialnego komórek AsPC-1 poddanych działaniu pochodnej C-1748 i wortmaniny potwierdziła, że komórki te były najbardziej odporne na indukcję apoptozy.

Analizując wyniki przedstawione na rysunku 67 i uzyskane z mikroskopowej analizy zmian polaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej, zachodzących na skutek działania pochodnej C-1748 lub pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną widać, że ilość komórek wybarwionych JC-1 i wykazujących zieloną fluorescencję różni się tylko nieznacznie w komórkach kontrolnych jak i tych traktowanych związkami. W porównaniu do komórek kontrolnych, bądź komórek poddanych działaniu jedynie wortmaniny, około 20 % komórek AsPC-1 traktowanych pochodną 1-nitroakrydyny wykazywało zieloną fluorescencję, która wskazywała na obecność komórek ze zdepolaryzowaną błoną mitochondrialną. Populacja takich komórek wzrosła o kolejne 5 % po równoczesnym traktowaniu ich pochodną C-1748 i wortmaniną (rysunek 68 B).

Analizując zdjęcia uzyskane w z mikroskopowych obserwacji zmian w morfologii jąder komórek AsPC-1 wybarwionych Hoechstem 33342 i poddanych działaniu pochodnej C-1748, lub C-1748 w kombinacji z wortmaniną, obserwowałam niewielką ilość komórek o morfologii jąder charakterystycznej dla procesu apoptozy, ok. 15-20 % populacji (rysunek 68 A).

4.12.5. Podsumowanie

Mikroskopowa analiza zmian w morfologii jąder komórkowych i zmian potencjału na wewnętrznej błony mitochondrialnej wykazała, że komórki czterech badanych linii raka trzustki wykazują różną wrażliwość na działanie pochodnej C-1748. W komórkach wszystkich czterech linii dochodziło do uszkodzenia mitochondriów z różną intensywnością, a wyindukowane przez związek zmiany najbardziej widoczne były w przypadku komórek linii BxPC-3 (ponad 60 % komórek o niskim potencjale błony mitochondrialnej po 48 godzinach inkubacji z pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM). Nieco mniej wrażliwe na zmiany zachodzące w obrębie mitochondriów były komórki linii Panc-1 oraz MiaPaCa-2. W przypadku komórek AsPC-1 obserwowałam jedynie 20 % komórek wykazujących zieloną fluorescencję po ekspozycji na badaną pochodną. Zastosowanie pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną dodatkowo wzmacniało działanie związku. Uzyskane wyniki wskazują, że apoptoza indukowana przez pochodną 1-nitroakrydyny przebiega z równoczesnym uszkodzeniem mitochondriów, co jest wczesnym wskaźnikiem indukcji tego procesu, aktywację kaspaz.

4.13. Analiza western blotting poziomu ekspresji białka Bcl-2 w komórkach czterech linii raka trzustki traktowanych pochodną C-1748 i wortmaniną

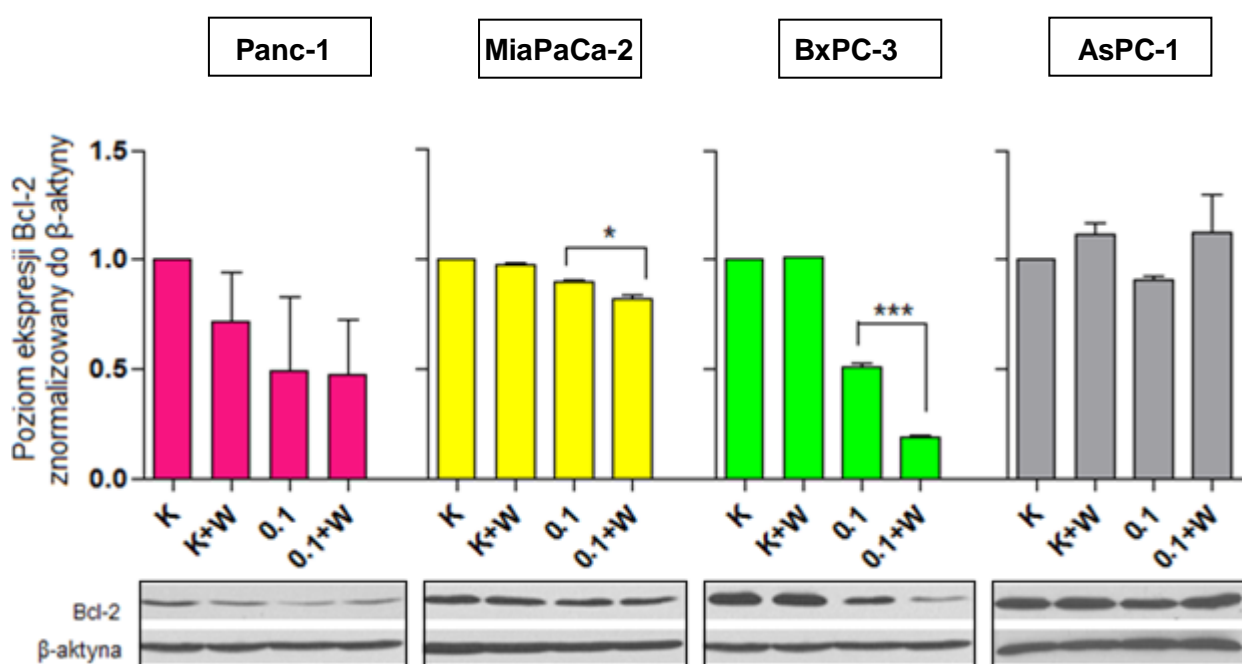
Białka z rodziny Bcl-2 stanowią grupę onkogenów komórkowych, które regulują proces śmierci komórki. Do grupy białek Bcl-2 zaliczyć można zarówno białka proapoptotyczne jak i antyapoptotyczne. Białka proapoptotyczne ułatwiają tworzenie kanałów jonowych w błonie mitochondrium, czego wynikiem jest uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytozolu czynników apoptotycznych takich jak: cytochrom c, czynnik AIF, białko Smac/DIABLO i endonukleazy G. Uwalnianie tych czynników może być zahamowane przez białka antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2, do których zalicza się m.in. białko Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 i Bcl-B [Tilly, 2001]. Najlepiej poznanym przedstawicielem białek z rodziny Bcl-2 o działaniu antyapoptotycznym jest białko Bcl-2. Nadekspresję białka Bcl-2 stwierdzono w wielu typach nowotworów, co powiązane jest z ich zwiększoną opornością na radio- i chemoterapię [Adams i wsp., 2007]. Ze względu na kluczową rolę w regulacji procesu apoptozy, białka Bcl-2 stanowią kolejny cel molekularny w strategiach terapeutycznych stosowanych w chorobach nowotworowych. Wykazano, że nadekspresja Bcl-2 i innych białek antyapoptotycznych hamuje śmierć komórek między innymi na skutek braku czynników wzrostu, stresu oksydacyjnego oraz hipoksji [Saitohi i wsp., 2003, Sermeus i wsp., 2012]. Jednak to właśnie zdolność białek antyapoptotycznych do hamowania śmierci indukowanej w wyniku działania cytotoksycznych chemoterapeutyków czyni je interesującym celem dla poszukiwania nowych chemoterapeutyków. Zastosowanie inhibitorów białek Bcl-2, szczególnie w kombinacji z inhibitorami innych konkretnych cząsteczek może być podstawą spersonalizowanej terapii u pacjentów cierpiących na nowotwory charakteryzujące się podwyższonym poziomem ekspresji tych białek.

Z dotychczas przeprowadzonych przeze mnie badań wynika, że pochodna C-1748 indukuje apoptozę w komórkach badanych linii raków trzustki. Aby sprawdzić, czy indukcja procesu śmierci komórkowej związana jest z zaburzeniem poziomu ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2, przeprowadziłam analizę jego poziomu techniką western blotting w komórkach czterech badanych linii poddanych ekspozycji na działanie samego C-1748 lub C-1748 w kombinacji z wortmaniną.

Wyniki są średnią z dwóch niezależnych eksperymentów, a badania przeprowadziłam wg metodyki zawartej w pkt. 6.3.13.

Wyniki przedstawione na rysunku 69 wskazują, że w wyniku działania pochodnej C-1748 w badanych komórkach raka trzustki dochodzi do obniżenia poziomu ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2. Na wykresach przedstawiających wyniki densytometrycznej analizy prążków uzyskanych metodą western blotting widać, że C-1748 był najbardziej

aktywny w komórkach linii BxPC-3. 48 godzinna inkubacja z pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM prowadziła do spadku ilości białka o ok. 50 % w porównaniu do kontroli. Równoczesne zastosowanie pochodnej 1-nitroakrydyny i wortmaniny znacznie wzmacniało działanie związku. Zaobserwowałam spadek ilości białka o ok. 80 % w porównaniu do ilości w komórkach kontrolnych. Poziom ekspresji białka Bcl-2 ulegał obniżeniu również w komórkach linii Panc-1, jednak w mniejszym stopniu w porównaniu do komórek linii BxPC-3 oraz nieznacznie w komórkach linii MiaPaCa-2. W komórkach AsPC-1, niewrażliwych na działanie C-1748 samego, jak i w kombinacji z wortmaniną, poziom białka Bcl-2 nie ulegał zmianie.



Rysunek 69. Wpływ działania pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM (oraz pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną o stężeniu 2 μM) na poziom ekspresji białka Bcl-2 w komórkach czterech linii raka trzustki. Czas inkubacji: 48 godzin. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Poziom białka Bcl-2 był badany, aby pokazać, że pochodna C-1748 hamując autofagię, indukuje apoptozę, czemu towarzyszył spadek poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2. Nie można wykluczyć, że wpływ C-1748 na poziom białka Bcl-2 w komórkach raka trzustki jest kolejnym, niezależnym od hamowania autofagii i indukcji apoptozy mechanizmem działania związku. Ponieważ zwiększona ekspresja białka Bcl-2 w komórkach nowotworowych związana jest ich z opornością na apoptozę, taka właściwość związku jest bardzo pożądana. Spadek ilości białka Bcl-2, do którego dochodzi po ekspozycji na badaną pochodną 1-nitroakrydyny wpływa prawdopodobnie na większą wrażliwość komórek na indukcję apoptozy, co szczególnie widać w przypadku komórek linii BxPC-3. Wyjątkiem są komórki linii MiaPaCa-2, w których poziom białka antyapoptotycznego nie zmieniał się pod

wpływem działania C-1748, co może świadczyć o tym, że białko to nie jest istotne w przebiegu apoptozy indukowanej przez badany związek w tychże komórkach.

CZĘŚĆ II. Określenie roli ekspresji enzymów metabolizujących C-1748 w końcowej odpowiedzi biologicznej komórek raka trzustki na działanie związku

Podsumowując dotychczas uzyskane wyniki, wykazałam, że pochodna C-1748 jest aktywna cytotoksycznie w stosunku do komórek wszystkich czterech badanych przeze mnie linii raka trzustki. Najbardziej wrażliwe na działanie związku były komórki linii MiaPaCa-2. Równie wrażliwe na działanie pochodnej C-1748 okazały się być komórki linii Panc-1 oraz BxPC-3. Z kolei komórki linii AsPC-1 można określić jako odporne na działanie C-1748.

Komórki wszystkich czterech linii różnie reagowały na traktowanie związkiem, zarówno w zależności od jego stężenia jak i czasów inkubacji którym były poddawane. W przypadku komórek linii AsPC-1 zastosowanie ponad dwa razy wyższej dawki związku w porównaniu do innych linii, nie wpływało istotnie na wzrost ich wrażliwości.

Badając mechanizmy działania związku w stosunku do wybranych przeze mnie komórek, wykazałam, że ulegają one apoptozie. Ponadto w zależności od badanej linii komórkowej, związek indukował różne zmiany w dystrybucji komórek w cyklu życiowym, hamował autofagię oraz w przypadku komórek AsPC-1- indukował przedwczesne starzenie komórkowe. Ponieważ komórki nowotworowe czterech badanych przeze mnie linii, wykazały odmienną wrażliwość na działanie związku, próbowałam znaleźć zależność pomiędzy różnicami w odpowiedzi komórkowej a genotypem komórek, porównując mutacje w genach najczęściej zmutowanych w raku trzustki, takich jak *K-Ras*, *p53*, *p16* oraz *Smad4*. Jedynie komórki BxPC-3 posiadają niezmutowaną formę genu *K-Ras*, co może tłumaczyć ich wrażliwość na działanie pochodnej C-1748. Analizując mutacje w innych genach, nie znalazłam zależności pomiędzy wrażliwością komórek raków trzustki na działanie związku a ich profilem genetycznym.

Oporność komórek nowotworowych trzustki na apoptozę może być związana m.in. z ekspresją genów regulujących apoptozę co wykazano w badaniach nad mechanizmem działania gemcytabiny i 5-fluorouracylu. Ekspozycja komórek nowotworowych trzustki na działanie tych chemoterapeutyków prowadziła do wzrostu poziomu anty-apoptotycznych białek co odpowiadało za ich chemooporność [*Shi i wsp., 2002*]. W innych badaniach z użyciem gemcytabiny wykazano również, że za oporność komórek Panc-1 na działanie związku odpowiada wysoki poziom ufosforylowanej formy kinazy ERK. Zastosowanie inhibitora szlaku MAPK/ERK spowodowało wzrost aktywności gemcytabiny w stosunku do komórek Panc-1, a ilość komórek apoptotycznych wzrosła z 30 % do 60 %. Komórki

MiaPaCa-2, najbardziej wrażliwe na gemcytabinę wykazały najniższy poziom ekspresji białka pERK [Fryer i wsp., 2011]. Tak więc, chemooporność komórek nowotworowych i mechanizmy oporności na apoptozę są bardzo złożone i różne w zależności od badanych komórek i stosowanych leków.

W ramach swojej pracy doktorskiej próbowałam zweryfikować inny mechanizm odpowiedzialny za oporność komórek nowotworowych, niezbadany jak dotychczas dla komórek nowotworowych trzustki.

Z danych literaturowych oraz wyników badań uzyskanych dotychczas w naszym zespole, wynika, że na odpowiedź biologiczną komórek na działanie związku przeciwnowotworowego może mieć wpływ ekspresja enzymów odpowiedzialnych za jego przemiany metaboliczne w komórce [Augustin i wsp., 2013, Gut i wsp., 2000, Hołownia i wsp., 2003, Pawłowska i wsp., 2011]. Jeżeli związek w wyniku transformacji metabolicznej obniża swoją aktywność, to komórki o wysokiej ekspresji enzymów metabolizujących będą odporne na jego działanie ze względu na zbyt krótką ekspozycję na formę aktywną związku. Z kolei w sytuacji, gdy związek jest prolekiem i w wyniku przemian metabolicznych ulega transformacji do reaktywnych metabolitów, wysoki poziom metabolizujących go enzymów w komórce spowoduje powstawanie większej puli aktywnych metabolitów. Jako przykład można wymienić 5-fluorouracyl, który w organizmie przekształcany jest w 5-fluorocytozynę, aktywną postać leku. W metabolizmie 5-fluorouracylu bierze udział szereg enzymów takich jak transferaza fosforybozylowa, fosforylaza tymidyny oraz fosforylaza urydynowa. Niski poziom dowolnego z tych enzymów spowoduje niewystarczającą transformację leku w komórce, konieczną do wywarcia pożądanego efektu terapeutycznego. Dodatkowo, oporność komórek nowotworowych na 5-fluorouracyl może powstawać również w wyniku zbyt wysokiej ilości dehydrogenazy dihydropyrimidynowej, rozkładającej 5-fluorouracyl do nieaktywnego metabolitu [Fukuda i wsp., 2006].

Wcześniejsze badania przeprowadzone w naszym zespole wykazały, że pochodną C-1748 można również zaliczyć do proleków i do pełnej aktywności wymaga ona transformacji metabolicznej. Dochodzi wówczas do powstawania większej ilości aktywnych metabolitów (szczególnie w warunkach niedotlenienia), stąd komórki w których ekspresja enzymów metabolizujących C-1748 zachodzi na wysokim poziomie będą bardziej wrażliwe na działanie związku [Wiśniewska, 2008, Gorlewska, 2001].

Na pierwszym roku studium doktoranckiego przeprowadziłam wstępne badania metabolizmu pochodnej C-1748 w komórkach czterech linii raka trzustki i wykazałam, że związek metabolizowany jest w tych komórkach z różną intensywnością. Wykazano też wcześniej w naszym zespole, że pochodna C-1748 metabolizowana jest głównie przez enzymy pierwszej fazy metabolizmu, cytochromy P450, takie jak m.in.: CYP3A4, CYP2C9,

oraz reduktazę cytochromu P450 (CPR) [Wiśniewska, 2008]. Postanowiłam więc zbadać, czy obecność wyżej wymienionych enzymów w komórkach nowotworu trzustki może mieć wpływ na różnice w odpowiedzi komórkowej na działanie C-1748, obserwowanej wcześniej dla komórek poszczególnych linii. W pierwszym etapie badań określiłam poziom ekspresji białek wybranych enzymów CYP i reduktazy cytochromu P450 (CPR) w komórkach linii Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 oraz AsPC-1.

Poszczególne eksperymenty przeprowadziłam co najmniej dwukrotnie wg metodyki zawartej w punktach:

- 6.3.1.3. analiza western blotting (wyniki, punkt 4.1)
- 6.3.14. przejściowa transfekcja komórek (wyniki, punkt 4.2.1.)
- 6.3.15. metabolizm C-1748 w komórkach (wyniki, punkt 4.2.2.)
- 6.3.3. oznaczanie aktywności cytotoksycznej (wyniki, punkt 4.2.3.)
- 6.3.11. oznaczanie zmian potencjału $\Delta\Psi_m$ (wyniki, punkt 4.2.4.)
- 6.3.6. oznaczanie aktywności kaspazy-3 (wyniki, punkt, 4.2.5.)

4.1. Analiza metodą western blotting poziomu ekspresji wybranych enzymów I fazy metabolizmu w komórkach czterech raków trzustki

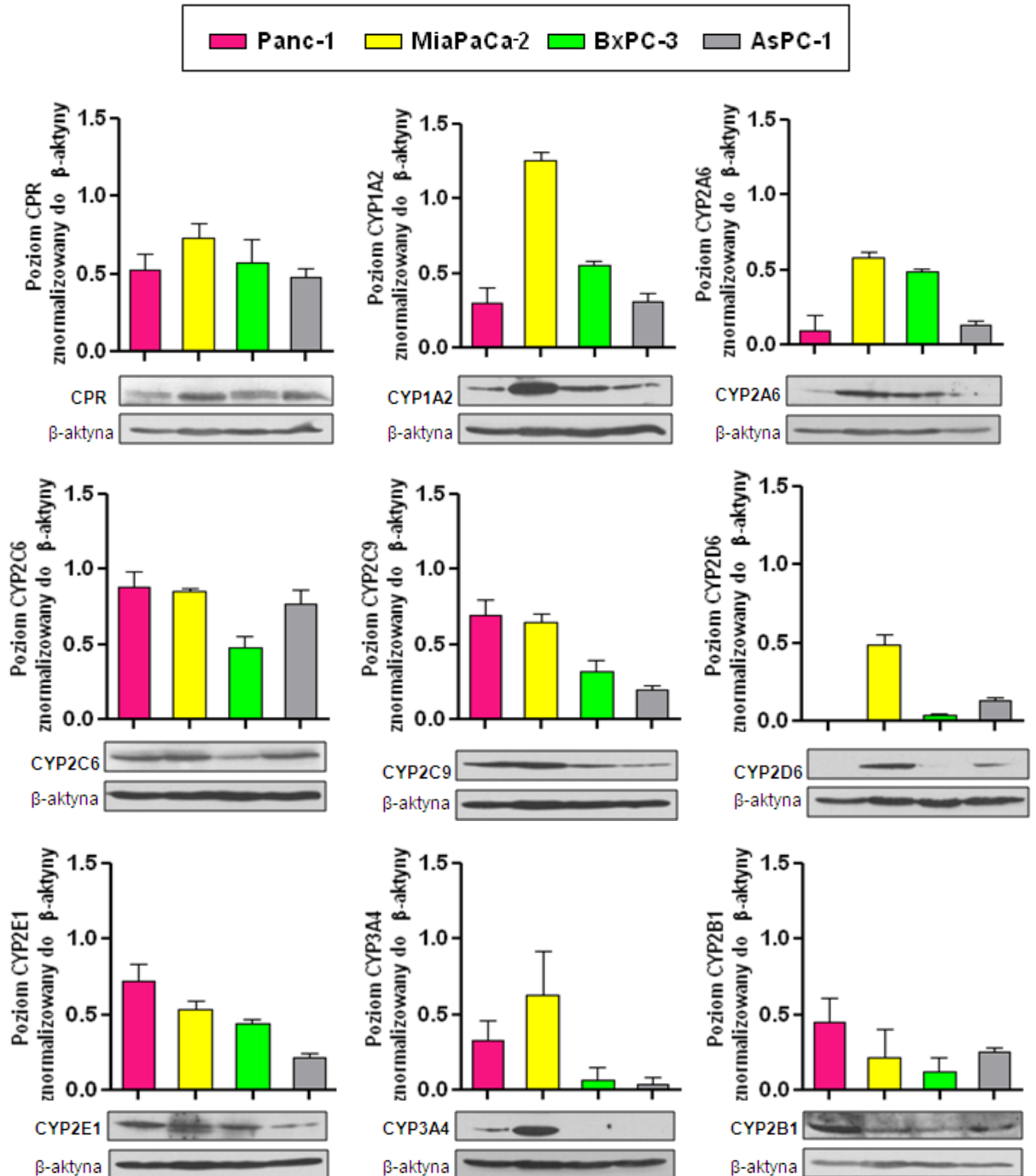
W pierwszym etapie badań, stosując technikę western blotting dokonałam analizy poziomu białek wybranych enzymów cytochromu P450 w komórkach czterech linii raka trzustki. Wyboru białek enzymatycznych dokonałam na podstawie wspomnianych wcześniej badań *in vitro* metabolizmu pochodnej C-1748 [Wiśniewska, 2008]. Dodatkowo wzięłam pod uwagę enzymy odpowiedzialne m.in. za metabolizm chemoterapeutyków stosowanych w leczeniu raka trzustki [Ling i wsp., 2006, Projean i wsp., 2003, Santos i wsp., 2006].

Wybrane enzymy:

1. **Metabolizujące C-1748:** CPR, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4.
2. **Pozostałe:** CYP2C6, CYP2E1, CYP2A6, CYP2B1 oraz CYP2D6.

Analiza otrzymanych wyników, wskazała, że ekspresja wybranych enzymów I fazy metabolizmu zachodzi na różnym poziomie w komórkach czterech badanych przeze mnie linii raka trzustki (rysunek 70). Najwyższą ekspresję większości enzymów poza CYP2C9, CYP2E1 oraz CYP2B1 obserwowałam w komórkach linii MiaPaCa-2. W komórkach tych dochodziło również do najwyższej ekspresji enzymów metabolizujących pochodną C-1748, takich jak CYP1A2 (gdzie poziom ekspresji białka był ponad dwukrotnie wyższy niż w komórkach BxPC-3 i trzykrotnie wyższy niż w komórkach Panc-1), CYP3A4 (ponad dwukrotnie wyższy poziom niż w komórkach Panc-1), CYP2C9 oraz reduktazy cytochromu P450. Również komórki linii Panc-1 charakteryzowały się dosyć wysoką ekspresją większości badanych enzymów, w szczególności tych metabolizujących związek. Ponadto w komórkach Panc-1 obserwowałam najwyższą ekspresję enzymów CYP2E1 oraz CYP2B1. Natomiast nie stwierdziłam w nich ekspresji białka CYP2D6. Nieco niższy poziom ekspresji

badanych enzymów obserwovałam w komórkach linii BxPC-3. W komórkach tych, ekspresja CPR zachodziła na poziomie zbliżonym do pozostałych linii, ekspresja CYP1A2 była wyższa niż w komórkach Panc-1 i AsPC-1, natomiast poziom ekspresji CYP2C9, a w szczególności CYP3A4 był niski. Zdecydowanie najniższy poziom ekspresji enzymów obserwovałam w komórkach AsPC-1. Jedynie enzymy CYP2C6 oraz CPR ulegały ekspresji na dosyć wysokim poziomie zbliżonym do pozostałych linii komórkowych. Z kolei ekspresja enzymu CYP1A2, CYP2C9 oraz CYP3A4 zachodziła na dosyć niskim poziomie.



Rysunek 70. Analiza Western blott poziomu ekspresji białek wybranych enzymów cytochromu P450 oraz reduktazy cytochromu P450 w komórkach czterech raków trzustki. Jako kontrolę załadowania studzienek zastosowałam β -aktynę.

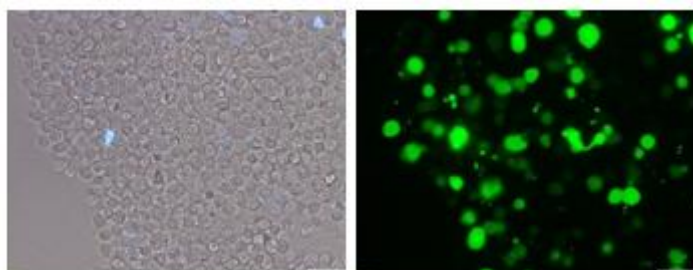
4.2. Wpływ nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4 na metabolizm C-1748 i odpowiedź biologiczną indukowaną przez pochodną C-1748 w komórkach AsPC-1

Pomimo stosowania ponad dwukrotnie wyższego stężenia C-1748 w porównaniu do komórek pozostałych linii, komórki AsPC-1 były wciąż odporne na indukowaną przez pochodną apoptozę. W związku z tym postanowiłam sprawdzić, czy nadekspresja wybranych enzymów metabolizujących związek wpłynie na zmniejszenie oporności komórek AsPC-1 na działanie C-1748 i czy będzie to związane z powstawaniem większej ilości aktywnych metabolitów w komórkach z sekwencją *CPR* lub *CYP3A4*, w porównaniu do komórek typu dzikiego.

4.2.1. Przejściowa transfekcja komórek AsPC-1 plazmidami CPR lub CYP3A4

Pierwszym etapem przedstawionego zadania było przeprowadzenie przejściowej transfekcji komórek AsPC-1 plazmidami kodującymi geny reduktazy cytochromu P450 (*CPR*) i izoenzymu *CYP3A4*. Enzymy te zostały wybrane ze względu na kluczowe znaczenie w metabolizmie pochodnej C-1748. Transfekcję komórek AsPC-1 przeprowadziłam używając lipofektaminę. Zastosowałam 3 różne stężenia plazmidu, aby dobrać najbardziej optymalne, unikając cytotoksycznego efektu działania samego plazmidu na komórki.

Określenie ekspresji białka GFP:



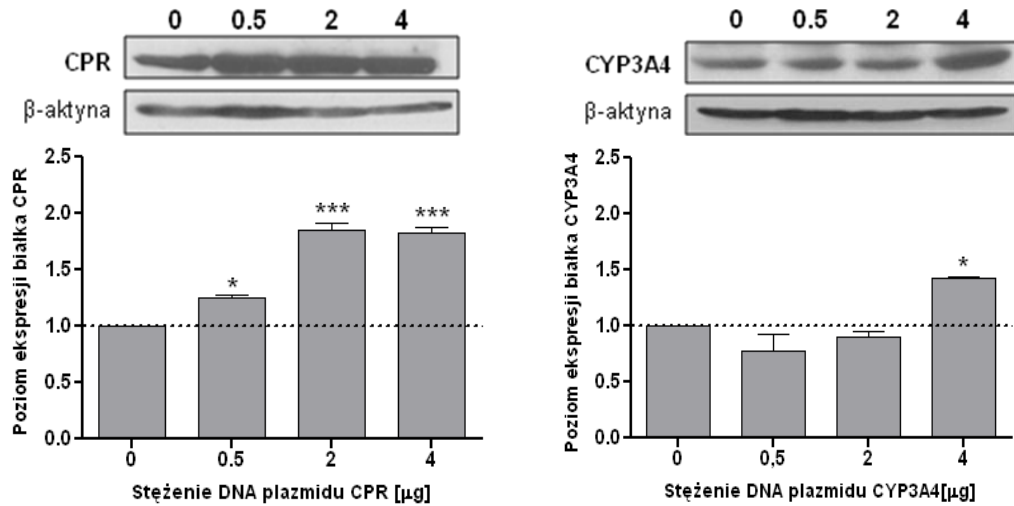
Rysunek 71. Zdjęcia komórek APC-1 poddanych transfekcji białkiem GFP (ang. *green fluorescent protein*) wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w zakresie światła niebieskiego (prawy panel) i mikroskopu świetlnego (lewy panel) po 48 godzinach od transfekcji. Powiększenie 20x. Transfekcji poddałam jednorazowo 1 mln komórek wprowadzając 4 μ g plazmidu. Przedstawione zdjęcia są reprezentatywne dla trzech wykonanych doświadczeń.

Warunki i wydajność transfekcji określiłam jednocześnie wprowadzając do komórek plazmid kodujący białko GFP (ang. *green fluorescent protein*), dzięki czemu w łatwy sposób za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej mogłam sprawdzić, czy przyjęte warunki etransfekcji są korzystne dla komórek a wprowadzany plazmid ulega ekspresji (zielona barwa komórek).

Na rysunku 71 wyraźnie widać, że w ok. 40- 50 % komórek AsPC-1 poddanych transfekcji plazmidem kodującym *gfp* dochodziło do ekspresji białka zielonej fluorescencji, co w przypadku tych komórek jest bardzo dobrym wynikiem.

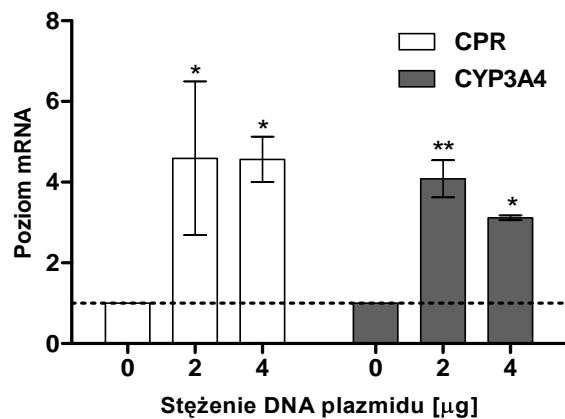
Określenie poziomu białka i mRNA kodującego CPR i CYP3A4:

W następnym etapie, wydajność transfekcji w komórkach AsPC-1 sprawdziłam również poprzez analizy: poziomu białek CPR i CYP3A4 metodą western blotting (rysunek 72) oraz poziomu ekspresji genów tych białek, metodą RT-PCR (wykres 12).



Rysunek 72. Analiza western blotting poziomu ekspresji białek CPR i CYP3A4 (znormalizowanego do β -aktyny) w komórkach AsPC-1 - **górny panel**. Densytometryczna analiza prążków - **dolny panel**. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

Na rysunku 72 i wykresie 12 widać, że w wyniku przejściowej transfekcji dochodziło do nadekspresji zarówno białek jak i mRNA genów CPR oraz CYP3A4 w komórkach AsPC-1. Stężenie plazmidu równe 0,5 μ g okazało się być zbyt niskie i jedynie w przypadku genu reduktazy CPR obserwowałam nieznaczny wzrost jego ekspresji. Najwyższy poziom zarówno białka jak i ekspresji mRNA dla obydwu genów obserwowałam przy stężeniu plazmidu równym 4 μ g, w związku z tym do dalszych eksperymentów wybrałam właśnie to stężenie.

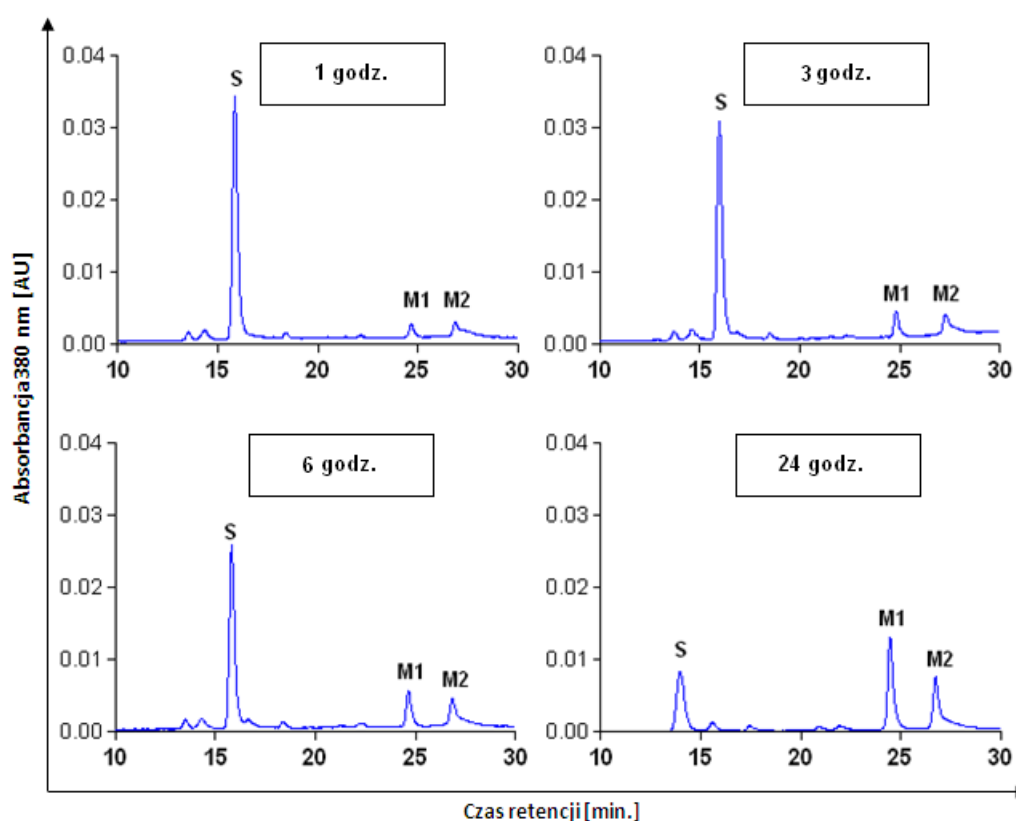


Wykres 12. Poziom ekspresji mRNA CPR i CYP3A4 w komórkach AsPC-1 poddanych transfekcji plazmidami zawierającymi DNA kodujące CPR i CYP3A4. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

4.2.2. Metabolizm pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1 o nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4

Opisane, „nowe” linie komórek nowotworu trzustki AsPC-1 o nadekspresji enzymów metabolizujących pochodną C-1748 zastosowałam w pierwszej kolejności do określenia różnic metabolizmu pochodnej 1-nitroakrydyny, C-1748 w komórkach nowotworowych AsPC-1 typu dzikiego (AsPC-1-WT) oraz poddanych przejściowej transfekcji izoenzymami CPR (AsPC-1-CPR) i CYP3A4 (AsPC-1-3A4). Komórki traktowałam pochodną C-1748 o stężeniu równym 50 μ M i inkubowałam od 1 do 24 godzin. Analizowałam z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej, HPLC, zarówno przygotowywane z komórek metanolowe ekstrakty jak i pożywkę hodowlaną pozostałą po inkubacji komórek ze związkiem.

4.2.2.1. Metabolizm pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1-WT

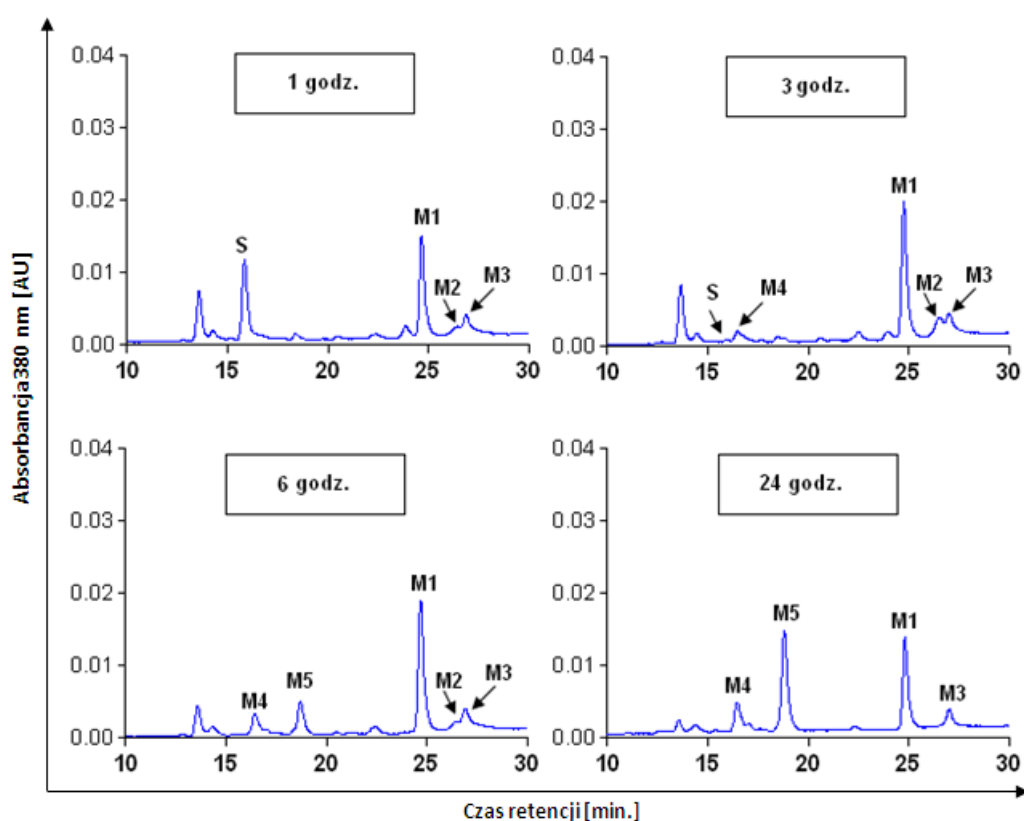


Rysunek 73. Chromatogramy uzyskane z analizy metabolizmu pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1-WT przy długości fali 380 nm. S- oznacza substrat, czyli związek wyjściowy C-1748, M1, M2 – poszczególne metabolity związku C-1748.

Przemiany metaboliczne pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1 typu dzikiego ilustrują chromatogramy otrzymane z analizy HPLC pożywki hodowlanej, przedstawione na rysunku 73. Wskazują one, że po upływie pierwszej godziny inkubacji komórek AsPC-1 ze związkiem stopień przemiany substratu był nieznaczny. Obserwowałam też dwa metabolity

związku: M1 o czasie retencji równym ok. 25 minut oraz M2 o czasie retencji równym ok. 26 minut. Wraz z upływem czasu intensywność pików produktów M1 i M2 rosła. Po 3 godzinach inkubacji stężenie substratu nieznacznie zmalało, natomiast stężenie obydwu metabolitów wzrosło. Po kolejnych 3 godzinach inkubacji komórek AsPC-1-WT ze związkiem obserwowałam postępujący zanik substratu kosztem przyrostu stężenia dwóch głównych metabolitów. Po 24 godzinach inkubacji stężenie substratu zmalało o połowę w stosunku do ilości obserwowanej po godzinnej inkubacji. W pożywce przeważał natomiast metabolit M1, którego stężenie było nieco wyższe niż stężenie metabolitu M2.

4.2.2.2. Metabolizm pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1-CPR

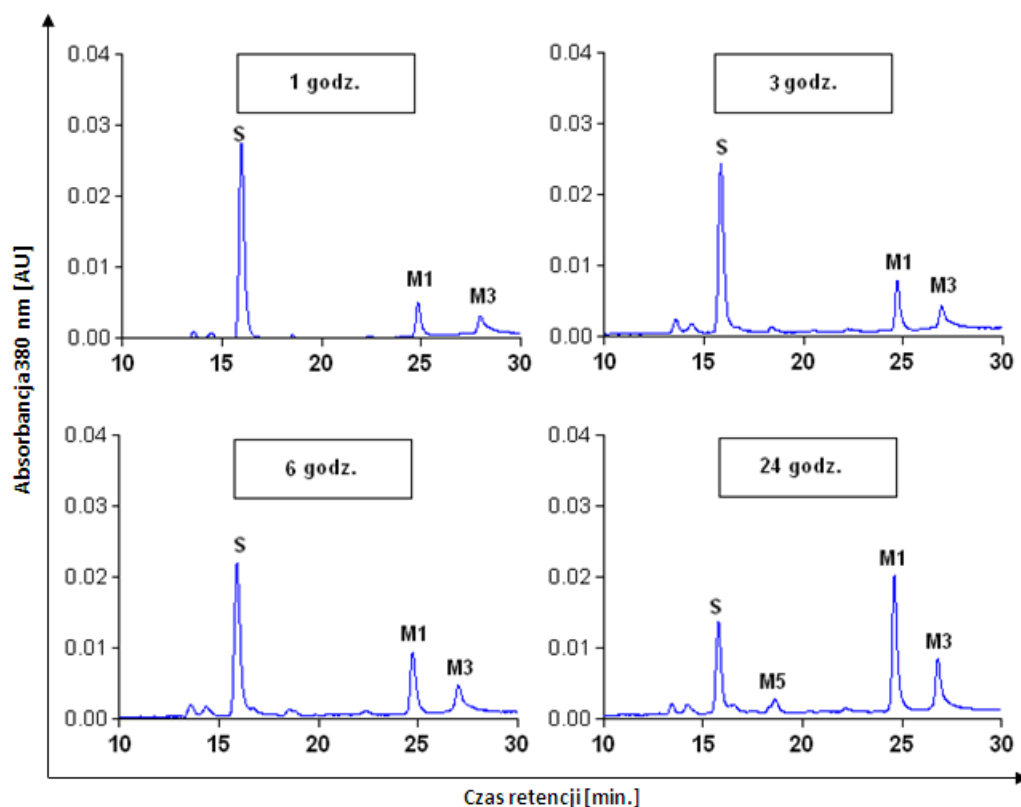


Rysunek 74. Chromatogramy uzyskane z analizy metabolizmu pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1-CPR przy długości fali 380 nm. S- oznacza substrat, czyli związek wyjściowy C-1748, M1 do M5 – poszczególne metabolity związku C-1748.

Badanie przemian metabolicznych pochodnej 1-nitroakrydyny, C-1748 w komórkach linii AsPC-1 z nadekspresją enzymu CPR (AsPC-1-CPR) wykazało, że już po pierwszej godzinie inkubacji, oprócz metabolitów M1 i M2 obserwowałam dodatkowy metabolit M3 o czasie retencji zbliżonym do czasu retencji metabolitu M2 (ok. 27 minuta). Po pierwszej godzinie inkubacji obserwowałam również intensywną przemianę substratu. Po upływie 3 godzin inkubacji, w pożywce hodowlanej praktycznie nie obserwowałam już obecności C-1748. Stężenie metabolitów (szczególnie M1) wzrosło w porównaniu do wartości

obserwowanej po godzinnej inkubacji, Dodatkowo w okolicy 16 minuty czasu retencji pojawił się nowy metabolit, M4. Po kolejnych trzech godzinach inkubacji ilość metabolitu M1 nieznacznie wzrosła, stężenie metabolitu M2 uległo zmniejszeniu, prawdopodobnie kosztem wzrostu stężenia metabolitu M3. Natomiast oprócz metabolitu M4, który pojawił się po raz pierwszy po 3 godzinach inkubacji ze związkiem, obserwowałam nowy metabolit M5 o czasie retencji w okolicy 18 minuty. Po 24 godzinach inkubacji, poziom metabolitu M1 obniżył się, nie obserwowałam już metabolitu M2, natomiast stężenie zarówno metabolitu M3 jak i M4 utrzymywało się na stałym, niskim poziomie. Z kolei poziom metabolitu M4 w pożywce hodowlanej wzrósł ponad dwukrotnie w porównaniu do poziomu obserwowanego po godzinnej inkubacji ze związkiem.

4.2.2.3. Metabolizm pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1-3A4



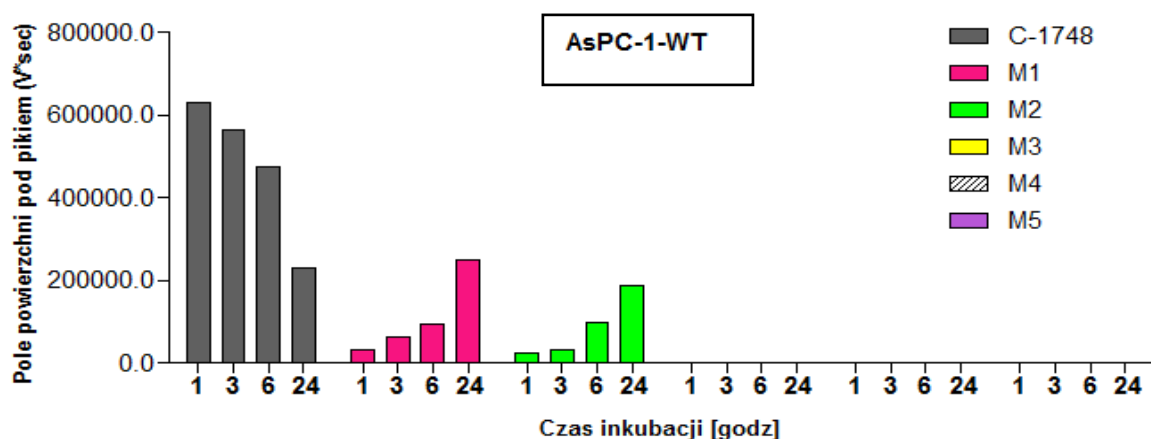
Rysunek 75. Chromatogramy uzyskane z analizy metabolizmu pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1-3A4 przy długości fali 380 nm. S- oznacza substrat, czyli związek wyjściowy C-1748, M1 do M5 – poszczególne metabolity związku C-1748.

Na rysunku 75 przedstawiłam przemiany metaboliczne pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1 z nadekspresją enzymu CYP3A4. Po pierwszej godzinie inkubacji ze związkiem, w pożywce hodowlanej obserwowałam przede wszystkim substrat o czasie retencji równym 16 minut i dwa metabolity, metabolit M1 o czasie retencji 25 minut i pojawiający się przy 27 minucie czasu retencji metabolit M3. Po 3 godzinach inkubacji

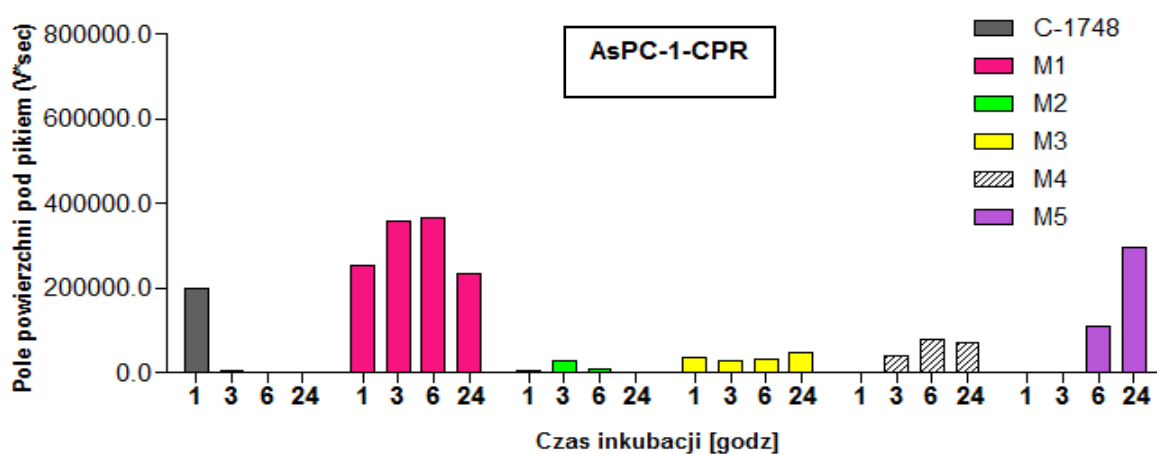
stężenie substratu w pożywce hodowlanej nieznacznie zmalało, metabolitu M1 wzrosło, natomiast poziom metabolitu M3 był podobny jak po godzinnej inkubacji komórek ze związkim. Znaczne zmiany stężenia reagentów w medium hodowlanym obserwowałam po 24 godzinnej inkubacji. Poziom substratu zmniejszył się o ponad połowę w porównaniu do początkowych czasów inkubacji, metabolit M1 był głównym metabolitem obserwowanym w pożywce, a jego stężenie było wyższe niż stężenie substratu. Poziom metabolitu M3 również wzrósł, natomiast dodatkowo obserwowałam również pojawienie się metabolitu M5 o czasie retencji 18 minut.

4.2.2.4. Podsumowanie

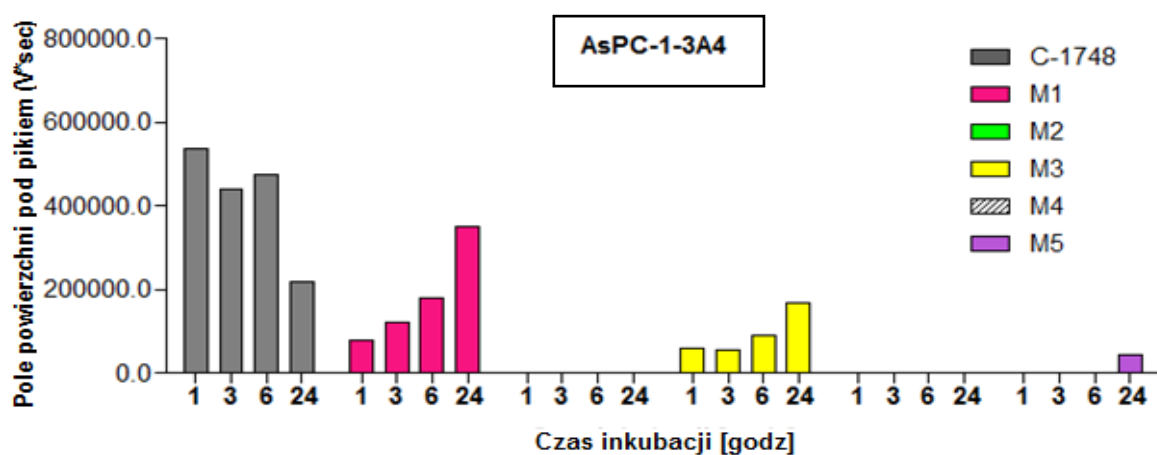
Metabolizm pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1 wszystkich trzech linii zachodził w różnym stopniu (wykres 13, 14, 15). Analiza chromatograficzna pożywki w której hodowane były komórki wykazała, że substrat ulegał przemianom metabolicznym najintensywniej i najszybciej w komórkach AsPC-1 o nadekspresji enzymu CPR. W porównaniu do komórek pozostałych linii po 3 godzinach inkubacji cały związek uległ transformacji do metabolitów. W komórkach AsPC-1 typu dzikiego po różnych czasach inkubacji ze związkiem obserwowałam tylko dwa główne metabolity M1 i M2, których stężenie wzrastało w miarę upływu czasu inkubacji i osiągnęło wartość maksymalną po 24 godzinach inkubacji. Badanie przemian metabolicznych pochodnej 1-nitroakrydyny w komórkach linii AsPC-1-CPR wykazało, że już po pierwszej godzinie inkubacji z pochodną C-1748 w porównaniu do komórek AsPC-1 typu dzikiego, oprócz metabolitów M1 i M2 obserwowałam dodatkowy metabolit M3 o czasie retencji zbliżonym do czasu retencji metabolitu M2 (ok. 27 minuta). Z kolei po tym samym czasie inkubacji w przypadku komórek AsPC-1-3A4 w pożywce hodowlanej również obserwowałam metabolit M3, natomiast metabolit M2 w ogóle nie powstawał przez cały okres inkubacji ze związkiem. Ponadto, po 3 godz. inkubacji w przypadku komórek AsPC-1-CPR obserwowałam pojawienie się nowego metabolitu, M4, którego obecności nie stwierdziłam w pożywce, w której hodowane były komórki pozostałych linii, czyli AsCP-1-WT i AsPC-1-3A4. Rezultatem dalszej inkubacji komórek AsPC-1-CPR oraz AsPC-1-3A4 było pojawienie się w pożywce kolejnego metabolitu, M5, nie obserwowanego w przypadku komórek AsPC-1 typu dzikiego. Stężenie metabolitu M5 było szczególnie wysokie w komórkach AsPC-1 z nadekspresją CPR. Po 24 godzinach inkubacji, metabolit M5 wraz z metabolitem M1 były głównymi metabolitami obserwowanymi w pożywce hodowlanej.



Wykres 13. Wykres przedstawiający zmiany pola powierzchni pod pikiem substratu i powstających metabolitów w pożywce hodowlanej wraz z upływem czasu inkubacji komórek AsPC-1-WT z pochodną C-1748.



Wykres 14. Wykres przedstawiający zmiany pola powierzchni pod pikiem substratu i powstających metabolitów w pożywce hodowlanej wraz z upływem czasu inkubacji komórek AsPC-1-CPR z pochodną C-1748.

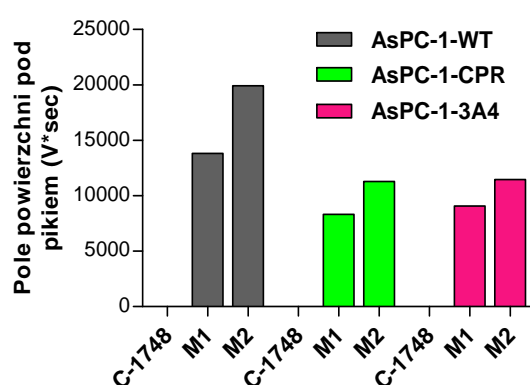


Wykres 15. Wykres przedstawiający zmiany pola powierzchni pod pikiem substratu i powstających metabolitów w pożywce hodowlanej wraz z upływem czasu inkubacji komórek AsPC-1-3A4 z pochodną C-1748.

W sumie, w porównaniu z komórkami linii dzięki AsPC-1-WT, w komórkach APC-1-CPR i AsPC-1-3A4 pojawiły się trzy dodatkowe metabolity. Ich struktury są przedmiotem dalszych badań prowadzonych w zespole. Ponadto, w odróżnieniu od komórek linii AsPC-1-

CPR, nadekspresja CYP3A4 nie wywołała całkowitej przemiany substratu, ale spowodowała wyższe stężenie M1.

Poza analizą chromatograficzną pożywki hodowlanej prowadziłam też analizy HPLC ekstraktu komórkowego. Największą ilość produktów obserwowałam po 24 godzinnej inkubacji komórek ze związkiem. Po tym czasie, w komórkach trzech linii AsPC-1 o różnej ekspresji enzymów metabolizujących obecne były jedynie dwa metabolity M1 oraz M2 (wykres 16). Najwyższy poziom metabolitów obserwowałam w komórkach AsPC-1 typu dzikiego. Natomiast w komórkach AsPC-1-CPR i AsPC-1-3A4 w porównaniu do komórek AsPC-1 WT poziom metabolitów był niższy.



Wykres 16. Wykres przedstawiający zmiany pola powierzchni pod pikami substratu i powstających metabolitów w ekstraktach komórkowych wraz z upływem czasu inkubacji komórek AsPC-1 z pochodną C-1748.

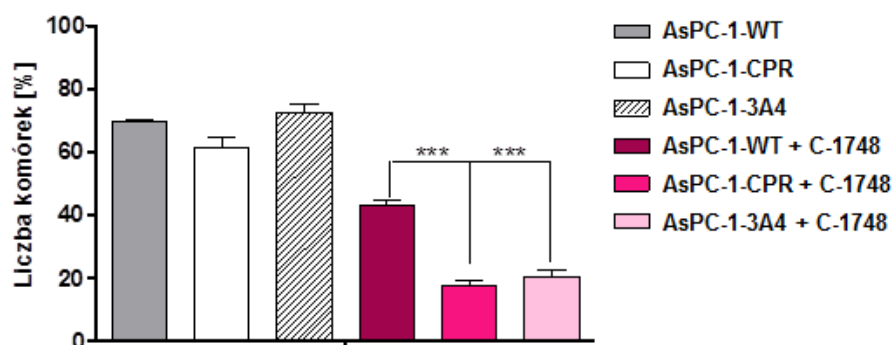
Uzyskane wyniki świadczą o tym, że nadekspresja enzymów CPR i CYP3A4 w komórkach linii AsCP-1 prowadziła do istotnych zmian w przemianach metabolicznych pochodnej C-1748. Metabolity obserwowałam głównie w pożywce hodowlanej, gdyż analiza ekstraktów komórkowych dawała niskie stężenie metabolitów. Trudno jednak porównywać stężenia metabolitów w tych dwóch frakcjach. Można z kolei przypuszczać, że związek ulegał intensywnym przemianom metabolicznym wewnątrz komórek, a produkty transformacji metabolicznej bardzo szybko wydalane były na zewnątrz komórki.

4.2.3. Analiza aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 wobec komórek AsPC-1 o nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4

Celem kolejnych badań było wykazanie, czy obserwowane różnice w poziomie produktów metabolizmu pochodnej C-1748 w komórkach linii AsPC-1 charakteryzujących się odmiennym poziomem ekspresji enzymów CPR i CYP3A4 będą miały wpływ na odpowiedź biologiczną indukowaną w tychże komórkach przez badany związek.

W pierwszym etapie określiłam poziom zahamowania wzrostu komórek AsPC-1 typu dzikiego oraz o nadekspresji izoenzymów CPR i CYP3A4. Uzyskane wyniki przedstawione na wykresie 17 świadczą o tym, że nadekspresja izoenzymu zarówno reduktazy cytochromu

P450 (CPR) jak i CYP3A4 znacznie wpłynęła na wrażliwość komórek AsPC-1 na badaną pochodną 1-nitroakrydyny.



Wykres 17. Wykres przedstawiający zahamowanie wzrostu, mierzony przy użyciu testu SRB w komórkach AsPC-1 typu dzikiego oraz po transfekcji CPR i CYP3A4 (4 μ g) po 48 godzinnej ekspozycji na działanie pochodnej C-1748 (stężenie równe 0,25 μ M). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie *** $P < 0,001$.

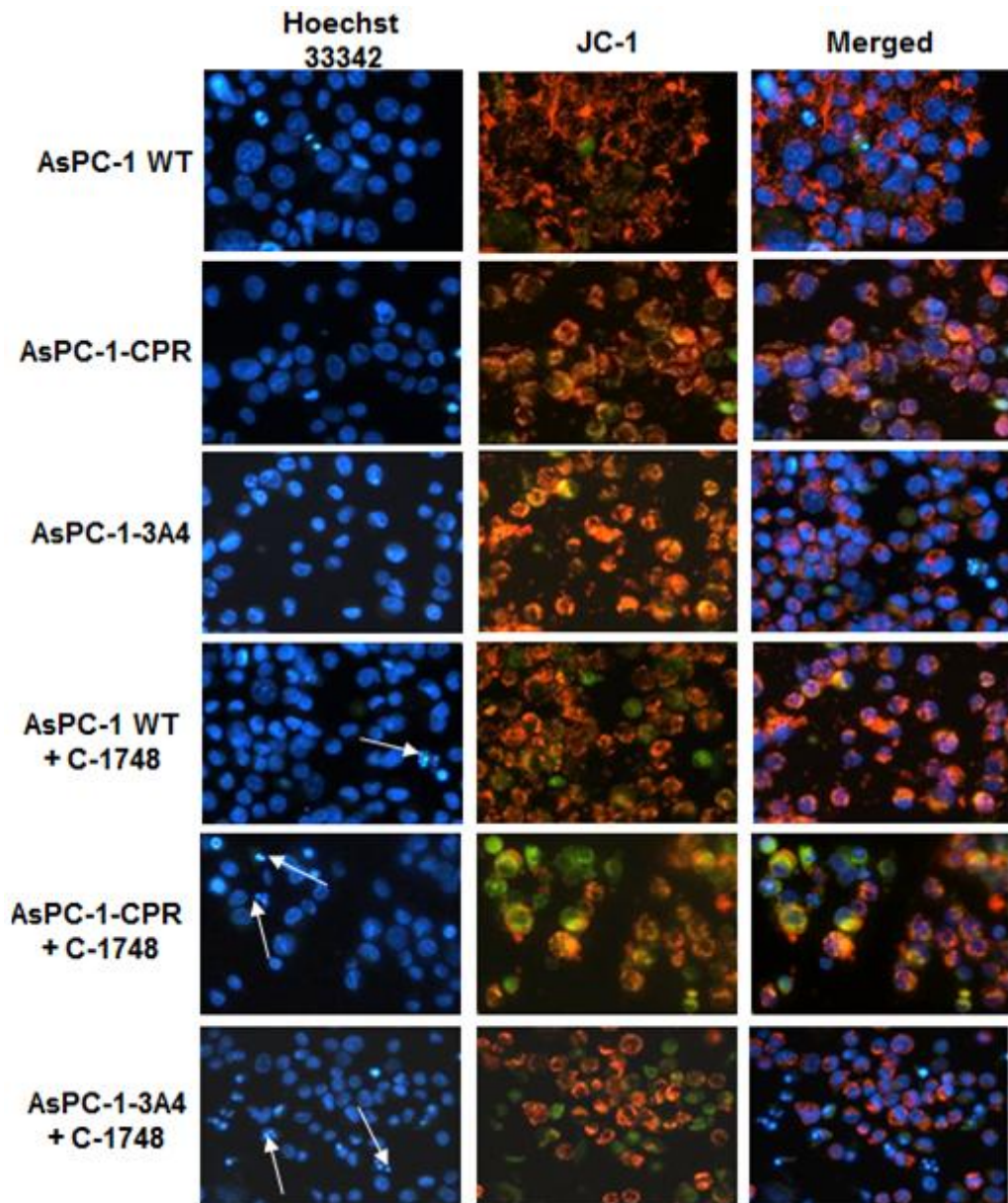
W komórkach AsPC-1-WT, w wyniku zastosowania pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,25 μ M, dochodziło do zahamowania wzrostu ok. 40 % komórek w stosunku do kontroli. W komórkach AsPC-1-CPR oraz AsPC-1-3A4 ilość komórek z zahamowaną proliferacją wynosiła już prawie 75 %. Aby dodatkowo potwierdzić, że uzyskane efekty są jedynie wynikiem działania związku, a nie toksyczności plazmidów wprowadzonych do komórek, przeprowadziłam również analizę stopnia zahamowania wzrostu komórek wykazujących nadekspresję badanych enzymów, bez traktowania ich pochodną C-1748. To pozwoliło potwierdzić, że transfekcja komórek AsPC-1 plazmidami zawierającymi geny enzymów CPR i CYP3A4, nie wywierała cytotoksycznego efektu w stosunku do badanych komórek. Na wykresie 17 widać, że liczba proliferujących komórek AsPC-1-CPR i AsPC-1-3A4 po 48 godzinnej inkubacji jest zbliżona do liczby proliferujących komórek kontrolnych, AsPC-1-WT.

2.2.4. Analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego i morfologii jąder komórkowych w komórkach Aspc-1 z nadekspresją enzymów CPR lub CYP3A4, traktowanych pochodną C-1748

W kolejnych badaniach sprawdziłam wpływ nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4 na indukowaną przez pochodną C-1748 apoptozę w komórkach linii AsPC-1, ponieważ wykazałam wcześniej, że komórki te, spośród komórek czterech badanych linii raka trzustki są najbardziej odporne na indukcję tego procesu.

W pierwszym etapie, po 48 godzinnej inkubacji komórek AsPC-1-WT oraz AsPC-1-CPR i AsPC-1-3A4 z pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,25 μ M, określiłam zmiany w morfologii jąder komórkowych (stosując barwnik Hoechst 33342) oraz wpływ związku na

depolaryzację błon mitochondrialnych, będącą wczesnym wskaźnikiem indukcji apoptozy, stosując lipofilowy barwnik JC-1.



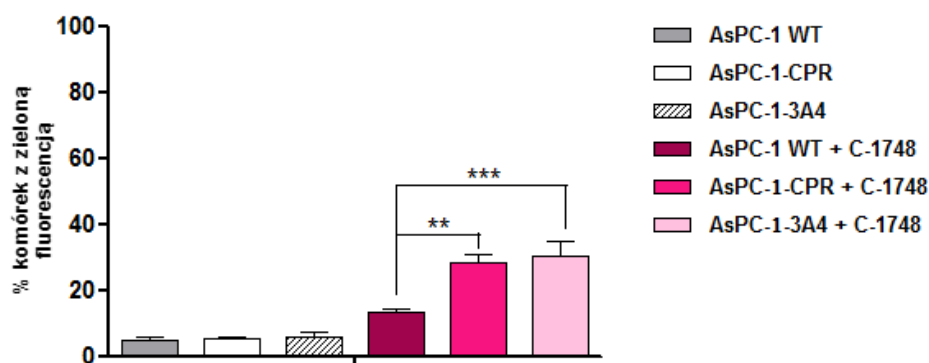
Rysunek 76. Mikroskopowa analiza zmian w morfologii jąder komórkowych i zmian potencjału mitochondrialnego komórek AsPC-1 po 48 godzinnej inkubacji z C-1748 (0,25 μ M) wybarwionych Hoechstem 33342 i JC-1. Kolor czerwony: żywe komórki z wysokim potencjałem mitochondrialnym błony. Kolor zielony: komórki apoptotyczne z niskim potencjałem mitochondrialnym błony.

W komórkach AsPC-1 typu dzikiego, lub z nadekspresją enzymów reduktazy-P450 lub izoenzymu CYP3A4, po 48 godzinnej inkubacji, bez ekspozycji na badaną pochodną 1-nitroakrydyny obserwowałam pojedyncze komórki o zielonej fluorescencji pochodzącej od monomerów JC-1. Po ekspozycji komórek AsPC-1-WT na działanie pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,25 μ M obserwowałam wzrost populacji komórek z uszkodzonymi mitochondriami do ok. 17 % w porównaniu do 5 % w komórkach kontrolnych (wykres 18).

Komórki AsPC-1, w których dochodziło do nadekspresji enzymów CPR oraz CYP3A4 wykazały większą wrażliwość na indukowaną przez związek apoptozę, w porównaniu do komórek typu dzikiego (ponad 30 % komórek ze zdepolaryzowaną błoną mitochondriów w porównaniu do 17 % w przypadku komórek AsPC-1-WT).

Podsumowując, w odniesieniu do komórek kontrolnych (AsPC-1-WT), 48 godzinna inkubacja komórek AsPC-1-CPR i AsPC-1-3A4 z pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,25 μM prowadziła do istotnych zmian w ilości komórek o niskim potencjale mitochondrialnym błony, co doskonale można było zaobserwować na zdjęciach wykonanych pod mikroskopem fluorescencyjnym (rysunek 76).

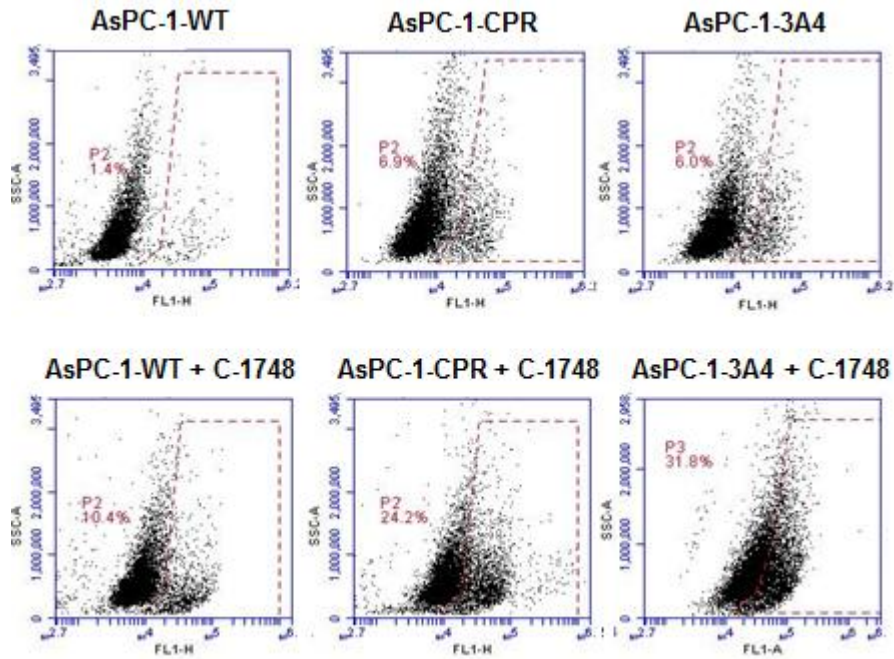
Zmianom zachodzącym w mitochondriach, do których dochodziło po ekspozycji komórek AsPC-1 na działanie pochodnej C-1748 towarzyszyły również zmiany w morfologii jąder komórkowych, wybarwionych barwnikiem Hoechst 33342 (rysunek 76). Analiza mikroskopowa wykazała, że zarówno komórki typu dzikiego jak i komórki poddane przejściowej transfekcji CPR i CYP3A4 po 48 godzinach inkubacji bez pochodnej C-1748 wykazywały prawidłową morfologię bez zmian wskazujących na apoptozę. Z kolei, po ekspozycji komórek na działanie związku o stężeniu równym 0,25 μM obserwowałam wzrost populacji komórek apoptotycznych w komórkach AsPC-1-CPR i AsPC-1-3A4 w porównaniu do komórek AsPC-1-WT.



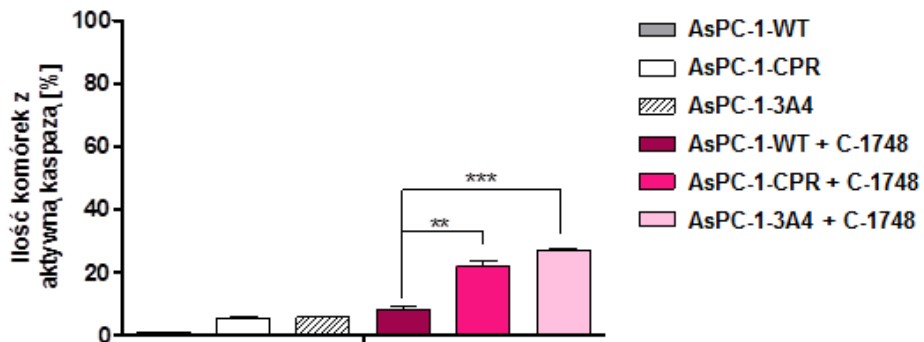
Wykres 18. Ilościowa analiza zmian $\Delta\Psi_m$ na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, komórek AsPC-1-WT oraz z nadekspresją CPR lub CYP3A4, poddanych 48 godzinnej inkubacji z pochodną C-1748 (0,25 μM). Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.2.5. Zbadanie wpływu nadekspresji enzymów CPR i CYP3A4 na aktywację kaspazy-3 przez pochodną C-1748 w komórkach AsPC-1

W kolejnym eksperymencie, zbadalam wpływ nadekspresji tych enzymów CPR oraz CYP3A4 na aktywację kaspazy-3 w komórkach AsPC-1 poddanych działaniu pochodnej C-1748.



Rysunek 77. Cytogramy ukazujące zmiany w ilości komórek AsPC-1 z aktywną kaspazą-3. Zaznaczony na cytogramie obszar P2 reprezentuje komórki zawierające aktywną kaspazę-3. FL1- intensywność fluorescencji fluoresceiny skoniugowanej z przeciwciałem przeciwko aktywnej kaspazie -3.



Wykres 19. Analiza aktywacji kaspazy-3 w komórkach AsPC-1 typu dzikiego lub o nadekspresji CPR bądź CYP3A4, poddanych 24 godzinnej inkubacji z pochodną C-1748 o stężeniu równym 0,25 μ M. Eksperyment przeprowadziłam dwukrotnie. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

W komórkach AsPC-1-CPR i AsPC-1-3A4 poddanych 48 godzinnej ekspozycji na działanie pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,25 μ M, obserwowałam wzrost populacji komórek z aktywną kaspazą-3 do odpowiednio 24 % i 30 % w stosunku do kontroli (ok. 8 %).

Równocześnie, sprawdziłam też toksyczność samego plazmidu na komórki, aby monitorować zmiany aktywności kaspazy-3 w komórkach transferowanych bez udziału związku. Ilość komórek AsPC-1 z aktywną kaspazą-3, po przejściowej transfekcji plazmidami niosącymi geny *CPR* i *CYP3A4* wynosiła odpowiednio ok. 7 % i 6 %, w porównaniu do 1,4 % w przypadku komórek AsPC-1-WT, co świadczy o tym, że transfekcja powoduje śmierć jedynie niewielkiej populacji komórek.

Podsumowując, cytometryczna analiza aktywności kaspazy-3 w komórkach AsPC-1, wykazała, że nadekspresja enzymu CPR i CYP3A4 uwrażliwiała komórki raka trzustki na działanie pochodnej C-1748 (wykres 19). W komórkach AsPC-1-WT traktowanych pochodną 1-nitroakrydyny o stężeniu równym 0,25 μ M obserwowałam ok. 10 % populacji komórek z aktywną kaspazą-3.

5. Dyskusja i wnioski końcowe

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowią kontynuację badań prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej nad mechanizmem działania związków przeciwnowotworowych. W zespole prof. Jerzego Konopy od lat trwają badania mające na celu poszukiwanie nowego leku przeciwnowotworowego. Po sukcesie jakim było wprowadzenie do leczenia pierwszego polskiego leku przeciwnowotworowego – Ledakrinu (Nitroacridine^R) [Radzikowski i wsp., 1974] (który po pewnym czasie został jednak wycofany ze względu na efekty uboczne), poszukiwano nowych analogów tego leku o udoskonalonych właściwościach i obniżonej toksyczności. Zsyntetyzowano wówczas nową grupę pochodnych akrydyny: imidazoakrydony, triazoloakrydony i pochodne 1-nitroakrydyny. Spośród imidazoakrydonów, najbardziej aktywny związek o symbolu C-1311 (SymadexTM) dotarł do II fazy badań klinicznych prowadzonych na pacjentkach z przerzutowym rakiem piersi [Capizzi i wsp., 2008]. Najbardziej aktywny przedstawiciel triazoloakrydonów, C-1305 jest obecnie przedmiotem szeroko zakrojonych badań przedklinicznych. Z kolei, spośród pochodnych 1-nitroakrydyny, najwyższą aktywność wykazała pochodna o symbolu C-1748 (Capridine β). Związek ten jest obecnie przygotowywany do I fazy badań klinicznych i był on przedmiotem badań realizowanych przeze mnie w ramach prezentowanej pracy doktorskiej.

Dla każdego potencjalnego leku istotne jest poznanie mechanizmu jego działania na poziomie molekularnym i komórkowym oraz określenie przemian metabolicznych jakim podlega w komórce. Dzięki temu możliwe jest przewidywanie końcowego efektu jego działania. Jest to szczególnie istotne w przypadku chemoterapeutyków, ponieważ komórki nowotworowe wywodzące się z różnych tkanek mogą odmiennie reagować na działanie leków. Ponadto, odmiennie reagują na leki komórki prawidłowe i nowotworowe wywodzące się z tej samej tkanki [Fei i wsp., 2002].

Dotychczasowe, szeroko zakrojone badania przedkliniczne pozwoliły określić niektóre elementy mechanizmu działania pochodnej C-1748. Wykazano, że aktywne metabolity związku wiążą się kowalencyjnie do DNA i tworzą wiązania sieciujące [Konopa i wsp., 1983, Konopa i wsp., 2003, Szostek i wsp., 2002]. Badania aktywności cytotoksycznej *in vitro* wykazały wysoką aktywność C-1748 w stosunku do komórek nowotworowych wielu linii, m.in.: raka prostaty, piersi, pęcherza, płuc oraz wątroby, a także aktywność przeciwnowotworową w stosunku do ksenoprzeszczepów u nagich myszy ludzkich raków prostaty: LnCaP, PC-3 i TSU, ludzkiego raka jelita grubego HCT8, raka płuc, jajnika oraz czerniaka [Chen i wsp., 2002]. Jak do tej pory, mechanizm działania pochodnej C-1748 na poziomie komórkowym najlepiej zbadano w komórkach raka jelita grubego: HCT-116, HCT8

i HT-29. Wykazano m.in., że związek indukuje zmiany w przebiegu cyklu życiowego komórek, apoptozę oraz starzenie komórkowe [Augustin i wsp., 2010, Moś-Rompa, 2007, Nowak-Ziatyk, 2011]. W innych badaniach prowadzonych na komórkach raka prostaty – LnCaP, wykazano ponadto, że pochodna C-1748 obniża aktywność receptora androgenowego oraz indukuje działanie receptora estrogenowego [Tadi i wsp., 2007].

Ponieważ C-1748 do pełnej aktywności biologicznej wymaga transformacji metabolicznej, dosyć dobrze poznano również przemiany metaboliczne związku, zarówno z zastosowaniem enzymów rekombinantowych, enzymów frakcji mikrosomalnych komórek wątroby oraz w komórkach nowotworowych, m.in. wątroby i jelita grubego [Wiśniewska, 2008, Niemira, 2012]. Wykazano, że C-1748 metabolizowany jest głównie przez enzymy I fazy metabolizmu, a kluczowe znaczenie w tym procesie miały: reduktaza cytochromu P450 oraz izoenzymy CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 [Wiśniewska, 2008].

W pierwszym etapie badań przeprowadziłam wstępną ocenę aktywności cytotoksycznej wybranych pochodnych akrydyny w stosunku do komórek raka trzustki pochodzenia ludzkiego. Aktywność pochodnych akrydyny nie była wcześniej badana wobec komórek tego nowotworu. Wybór komórek raka trzustki pochodzenia ludzkiego jako przedmiotu badań niniejszej pracy wynikał z faktu, że rak trzustki wciąż pozostaje najbardziej złośliwym i opornym na różne metody terapii. Konieczne są więc badania zmierzające do rozszerzenia wiedzy w zakresie prewencji, diagnostyki, rozwoju nowotworu, czy mechanizmów działania związków przeciwnowotworowych oraz przyczyn rozwoju lekooporności. Wyniki obserwacji eksperymentalnych i klinicznych stanowić będą źródło wiedzy dla oceny możliwości wdrażania nowych terapii u chorych cierpiących na ten nowotwór. Ponieważ 5-letni wskaźnik przeżywalności pacjentów z rakiem trzustki wynosi jedynie 5 %, za sukces uznaje się już poszerzenie wiedzy na temat biologii tego nowotworu oraz czynników leżących u podstaw jego oporności na leczenie.

Wstępne wyniki aktywności cytotoksycznej wykazały, że to właśnie pochodna 1-nitroakrydyny, o symbolu C-1748, spośród najbardziej aktywnych pochodnych imidzoakrydonów, triazoloakrydonów i pochodnych 1-nitroakrydyny, wykazała najwyższą aktywność w stosunku do komórek czterech badanych przez mnie linii raka trzustki: Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 oraz AsPC-1 (tabela 8). Podjęcie badań nad mechanizmem działania związku w tych komórkach było więc w pełni uzasadnione.

Komórki wybranych linii raka trzustki różnią się pomiędzy sobą zarówno wrażliwością na standardowo stosowaną w leczeniu raka trzustki gemcytabinę, zdolnością do tworzenia przerzutów, mutacjami w genach kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki,

takich jak m.in. *K-RAS*, *Smad4*, *p53*, *p16* oraz poziomem ekspresji białek szlaków apoptozy [Deer i wsp., 2010, Ulrich i wsp., 2002].

W związku z powyższym, pierwszym celem moich badań było **określenie w warunkach *in vitro* typów odpowiedzi biologicznej indukowanej przez pochodną 1-nitroakrydyny, C-1748 w komórkach czterech linii raka trzustki pochodzenia ludzkiego: Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 oraz AsPC-1.**

Jak już wcześniej wspominałam, podczas badania aktywności cytotoksycznej wybranych pochodnych akrydyny wykazałam, że aktywność pochodnej C-1748 wobec komórek czterech badanych linii raka trzustki, była porównywalna do tej obserwowanej dla gemcytabiny, a wyższa od aktywności związku C-1305 - przedstawiciela pochodnych triazoloakrydonów, jak i stosowanego w leczeniu raka trzustki - erlotinibu (tabela 8).

Tabela 8. Aktywność cytotoksyczna C-1748, C-1305, gemcytabiny i erlotinibu w stosunku do komórek wybranych linii raka trzustki uzyskana przy użyciu testu z SRB.

Linia komórkowa	Stężenie odpowiadające IC ₅₀ [μM]			
	C-1748	C-1305	Gemcytabina*	Erlotinib*
Panc-1	0,017	0,63	0,0214	>20
MiaPaCa-2	0,015	2,33	0,0064	>20
BxPC-3	0,017	2,40	0,0074	1,26
AsPC-1	0,075	6,77	0,0873	5,80

* Dane dla gemcytabiny i erlotinibu pochodzą z [Ioannou i wsp., 2011].

Badania **cytotoksyczności** potencjalnych leków przeciwnowotworowych stanowią pierwszy etap badań przedklinicznych, które służą do wyselekcjonowania związków o niskiej toksyczności i najbardziej korzystnych właściwościach farmakologicznych. Przedmiotem badań przedklinicznych jest również poznawanie mechanizmów działania związków w stosunku do komórek danego typu nowotworu, aby lepiej planować potencjalną terapię, szczególnie, gdy wymaga ona stosowania kombinacji kilku leków. Znając dobrze podłoże molekularne transformacji nowotworowej oraz czynniki warunkujące oporność danego typu nowotworu na chemioterapię, można przypuszczać, jakie właściwości powinien posiadać potencjalny lek przeciwnowotworowy, aby był skuteczny wobec tego nowotworu.

W kolejnym etapie badań skupiłam się więc na określeniu mechanizmów działania C-1748 w komórkach badanych linii raka trzustki.

Wiele związków cytotoksycznych oddziałuje na komórki nowotworowe indukując **zmiany w ich cyklu życiowym**. Niektóre leki działają tylko na komórki znajdujące się w określonej fazie cyklu. Hamed i wsp. oraz Zhu i wsp. wykazali, że np. gemcytabina stosowana w niskich stężeniach zakłócała fazę S cyklu życiowego komórek raka trzustki

Panc-1, AsPC-1, BxPC-3 i MiaPaCa-2 [Hamed i wsp., 2013, Zhu i wsp., 2010]. W wyższych stężeniach związek indukował akumulację komórek we wszystkich fazach cyklu (G1, S, G2/M), czego następstwem, po dłuższym czasie inkubacji z gemcytabiną była ich śmierć na drodze apoptozy [Hamed i wsp., 2013, Zhu i wsp., 2010]. Podobnie, 5-fluorouracyl indukował zahamowanie cyklu życiowego znacznej populacji komórek BxPC-3 w fazie S i G1 [Huang i ap., 2007]. Inny związek stosowany w leczeniu skojarzonym raka trzustki – erlotinib, indukował akumulację komórek Panc-1 w fazie G1 cyklu życiowego, co prowadziło do zahamowania ich proliferacji [Torres i wsp., 2016]. Hoffman i wsp. wskazali na istotny problem w terapii guzów litych, do których zalicza się rak trzustki [Hoffman i wsp., 2015]. Prowadzili oni badania z użyciem nab-paklitakselu, który stosowany jest w kombinacji z gemcytabiną w leczeniu raka trzustki z przerzutami. Nab-paklitaksel zaliczany jest do tzw. leków fazowo-specyficznych i indukuje zahamowanie komórek w fazie G2/M cyklu życiowego, co potwierdzono m.in. w badaniach na komórkach nowotworowych jajnika, piersi, trzustki, czy jamy nosowo-gardłowej [Kampan i wsp., 2015, Shi i wsp., 1997]. Hoffman i wsp. przy użyciu systemu reporterowego FUCCI (*ang. fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator*), który pozwala śledzić przechodzenie komórek przez kolejne fazy cyklu życiowego wykazali, że liczba komórek nowotworowych trzustki znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu, różniła się w zależności od ich umiejscowienia w guzie [Hoffman i wsp., 2015]. Większość komórek obecnych w niewielkiej warstwie zewnętrznej guza znajdowała się w fazie G2/M lub S cyklu. Natomiast w warstwie wewnętrznej guza przeważała populacja komórek znajdujących się w fazie G₀/G1. Najbardziej aktywne w tym przypadku będą więc leki oddziałujące na komórki znajdujące się w fazie wzrostu: G1. Aby zwiększyć skuteczność nab-paklitakselu, który oddziałuje jedynie na komórki dzielące się, zastosowano auksotroficzny szczep bakterii *Salmonella typhimurium* A1-R. Wykazano, że obecność szczepu w tkance nowotworowej trzustki skutkowało m.in. zmianą dystrybucji komórek znajdujących się we wnętrzu guza w cyklu życiowym [Zhao i wsp., 2005, 2006, 2007; Hoffman i wsp., 2012]. W tkance, w której dodatkowo znajdowały się kolonie szczepu *Salmonella typhimurium* A1-R obserwowano znaczny wzrost populacji komórek w fazie S i G2/M cyklu, przez co stały się one bardziej wrażliwe na działanie nab-paklitakselu [Hoffman i wsp., 2015]. Wyniki powyższych badań byłyby obiecujące pod warunkiem, że zostaną przeprowadzone badania dodatkowe, które ocenią bezpieczeństwo stosowania u pacjentów terapii z zastosowaniem bakterii. Niemniej, powyższy przykład wskazuje rolę badań podstawowych w poprawie skuteczności terapii przeciwnowotworowej.

We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w naszym zespole na komórkach raka jelita grubego HCT8 i HT-29 wykazano, że pochodna C-1748 nie indukowała istotnych zmian w przebiegu cyklu życiowego tych komórek [Moś-Rompa, 2007]. Z kolei komórki

HCT-116, pod wpływem działania związku, ulegały przejściowej akumulacji w fazie G2/M [Nowak-Ziatyk, 2011]. Cytometryczna analiza zmian w przebiegu cyklu życiowego komórek czterech linii raka trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748 o stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} wykazała, że związek indukował różne zmiany w zależności od badanej linii komórkowej. W przypadku komórek linii Panc-1 i MiaPaCa-2, po krótszych czasach inkubacji ze związkiem dochodziło do przejściowej akumulacji komórek w fazie G2/M cyklu. Po dłuższych czasach inkubacji komórki były zdolne do przekroczenia punktu kontrolnego G2, lecz najprawdopodobniej ulegały apoptozie, o czym świadczył znaczny wzrost populacji komórek we frakcji sub-G1. Inne zmiany obserwowałam w komórkach linii AsPC-1. Po krótkim czasie inkubacji ze związkiem, komórki linii AsPC-1 również ulegały akumulacji w fazie G2/M cyklu. Następnie, po dłuższych czasach inkubacji z C-1748 znaczną część populacji komórek AsPC-1 stanowiły komórki zablokowane w fazie G1, a ich ilość utrzymywała się na stałym poziomie aż do 192 godzin inkubacji ze związkiem. Zablokowanie komórek w fazie G1 może świadczyć o indukcji przyspieszonego starzenia komórkowego i zahamowaniu proliferacji komórek [Kong i wsp., 2011], za czym przemawiał fakt, że nawet po długich czasach inkubacji z C-1748, ilość komórek AsPC-1 we frakcji sub-G1 wynosiła jedynie ok. 10 %. W przypadku komórek linii BxPC-3, przez pierwsze trzy doby inkubacji z pochodną C-1748, ilość komórek w poszczególnych fazach cyklu życiowego utrzymywała się na stałym poziomie. Dopiero po 96 godzinach obserwowałam spadek ilości komórek w fazie G1 i wzrost w fazie G2/M. Po dłuższym czasie inkubacji ze związkiem, ilość komórek w poszczególnych fazach cyklu ponownie utrzymywała się na tym samym poziomie. Dodatkowo, nie dochodziło do istotnego wzrostu ilości komórek we frakcji sub-G1. Komórki BxPC-3 nie były zdolne do przekroczenia punktu kontrolnego fazy G2/M i przejścia do mitozy. Nie obserwowałam również żeby następstwem zablokowania komórek w fazie G2 była apoptoza. Prawdopodobnie występuje tutaj tzw. „zamrożenie” cyklu komórkowego (*ang. frozen cells in position through-out cell cycle*). Może to być kolejna droga eliminacji komórek nowotworowych, gdyż „zamrożone” w cyklu, nie dzielące się komórki mogą być uszkodzane i niszczone przez makrofagi [Whitworth i wsp., 1990]. Obserwowane zjawisko „zamrożenia” komórek nowotworowych po ekspozycji na działanie C-1748 obserwowano już wcześniej dla komórek HCT8 i HT-29 [Moś-Rompa, 2007]. Podobne wyniki dla silnie cytotoksycznego związku ditercallinium jako pierwszy opisał Traganos [Traganos i wsp., 1987].

Obecność populacji komórek we frakcji sub-G1 może świadczyć o indukcji przez pochodną C-1748 procesu apoptozy. W przypadku raka trzustki apoptozę indukują między innymi gemcytabina i 5-fluorouracyl w kombinacji z innymi lekami [de Sousa Cavalcante i wsp., 2014; Gu i wsp., 2013], kannabinoidy [Carracedo i wsp., 2006], FOLFIRINOX [Zhan i wsp., 2013] i inne. Problemem w leczeniu raka trzustki jest nabywanie przez komórki

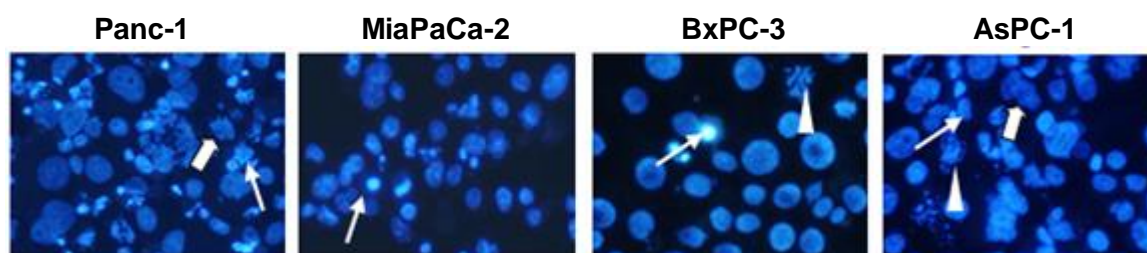
nowotworowe oporności na stosowane chemoterapeutyki. Shi i wsp. wykazali, że długotrwałe traktowanie komórek raka trzustki gemcytabiną lub 5-fluorouracyłem skutkowało nabywaniem przez te komórki oporności na leki, a oporność ta była między innymi związana z poziomem ekspresji białek anti-apoptotycznych [Shi i wsp., 2002]. Problem ten omówię szerzej w dalszej części dyskusji.

W kolejnym etapie badań określiłam jaki rodzaj śmierci komórkowej pochodna C-1748 indukowała w komórkach badanych linii raka trzustki. Badania przeprowadzone na komórkach raka jelita grubego i raka prostaty przez innych autorów wykazały, że w zależności od badanej linii komórkowej, pod wpływem działania związku dochodziło m.in. do indukcji apoptozy, katastrofy mitotycznej i nekrozy [Nowak-Ziatyk, 2011, Moś-Rompa, 2007].

Mikroskopowa ocena morfologii jąder komórkowych wykazała, że w komórkach Panc-1 i MiaPaCa-2 traktowanych C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} dochodziło głównie **do indukcji apoptozy**. Po dłuższym czasie inkubacji, w komórkach Panc-1 obserwowałam zmiany charakterystyczne dla katastrofy mitotycznej. Pojawiły się komórki zawierające mikrojądra, co wskazuje, że proces mitozy nie zakończył się prawidłowym podziałem na dwie komórki potomne. Prawdopodobnie, komórki Panc-1 po przejściowej akumulacji w fazie G2 cyklu weszły w mitozę, która nie zaszła jednak prawidłowo. Następstwem katastrofy mitotycznej była śmierć komórek na drodze apoptozy, co jest zjawiskiem obserwowanym przez wielu badaczy [Chu i wsp., 2004, Portugal i wsp 2010]. Oba procesy mogły przebiegać również niezależnie od siebie.

Przeważająca populacja komórek linii BxPC-3 wykazywała prawidłową morfologię jąder komórkowych. Niewielki procent stanowiły komórki ulegające apoptozie i komórki, w których proces mitozy nie przebiegał prawidłowo. Obserwowane chromosomy nie były w pełni skondensowane i często chaotycznie ułożone.

W przypadku komórek linii AsPC-1 obserwowałam wszystkie typy komórek. Zarówno apoptotyczne, ulegające katastrofie mitotycznej, czy komórki w których proces mitozy nie przebiegał prawidłowo. Jednak odsetek tych komórek był niewielki w odniesieniu do całej populacji.



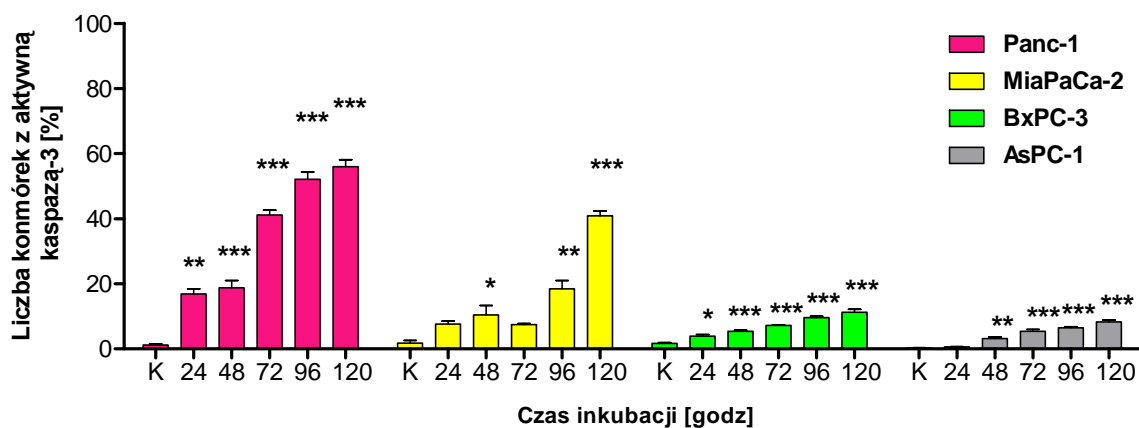
Rysunek 78. Obserwacje mikroskopowe jąder komórek raka trzustki traktowanych pochodną C-1748 (stężenie IC_{80}) przez 120 godzin. Komórki zostały wybarwione DAPI a następnie oglądane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego przy powiększeniu 20. Cienka strzałka wskazuje apoptozę, gruba strzałka – katastrofę mitotyczną, grot – nieprawidłową mitozę.

Jądro komórkowe, które wydaje się być skondensowane i pofragmentowane do ciałek apoptotycznych niekiedy obserwuje się także przy nekrozie [Elmore, 2001], dlatego też na podstawie zmian morfologicznych, bez badań biochemicznych trudno jest jednoznacznie określić jaki rodzaj śmierci komórkowej indukuje badany związek.

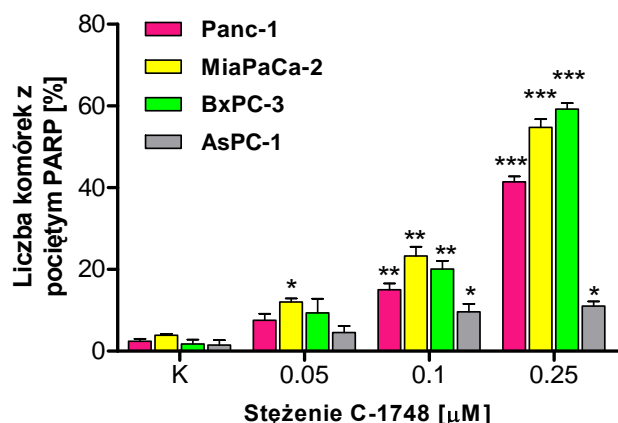
Badanie procesu apoptozy w oparciu o znaczniki biochemiczne, takie jak np. aktywacja kaspazy-3 potwierdziło, że w komórkach czterech badanych linii raka trzustki dochodziło do indukcji apoptozy z różną intensywnością. Najwięcej komórek z aktywną kaspazą-3 obserwowałam dla linii Panc-1 i MiaPaCa-2. Komórki linii BxPC-3 i AsPC-1 były bardziej odporne na indukowaną przez C-1748 apoptozę, nawet po długich czasach inkubacji ze związkiem o stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} .

Niewielki wpływ pochodnej C-1748 stosowanej w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} na indukcję apoptozy w komórkach linii BxPC-3 i AsPC-1, skłaniał do sprawdzenia, czy i w jaki sposób zwiększenie stężenia związku wpłynie na indukcję apoptozy, katastrofy mitotycznej, czy nekrozy. W związku z tym, skróciłam czas inkubacji komórek ze związkiem do 48 godzin, a badania prowadziłam stosując trzy wzrastające stężenia pochodnej C-1748: 0,05 μ M, 0,1 μ M i 0,25 μ M.

Zwiększenie stężenia C-1748 wpłynęło przede wszystkim na przyrost liczby komórek BxPC-3 ulegających apoptozie. Porównując wyniki przedstawione na wykresach 20 i 21 wyraźnie widać, że nawet po 120 godzinnej inkubacji komórek BxPC-3 z pochodną C-1748 o stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} , liczba komórek apoptotycznych wynosiła ok. 10 %. Z kolei, po 48 godzinach inkubacji ze związkiem o stężeniu równym 0,25 μ M, ilość komórek BxPC-3 z aktywną kaspazą-3 wynosiła już ok. 60 %. Komórki linii Panc-1 i MiaPaCa-2, podobnie jak po zastosowaniu stężenia C-1748 odpowiadającego wartości IC_{80} wykazały wysoką wrażliwość również na związek zastosowany w trzech różnych stężeniach. Natomiast w przypadku komórek linii AsPC-1, podwyższenie stężenia pochodnej C-1748 nie wpłynęło w istotny sposób na wzrost ilości komórek apoptotycznych.



Wykres 20. Wpływ czasu inkubacji komórek czterech linii raka trzustki z pochodną C-1748 (stężenie IC_{80}) na aktywację kaspazy-3. Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.



Wykres 21. Odsetek komórek nowotworowych trzustki z pociętym substratem dla kaspaz - PARP, w zależności od stężenia pochodnej C-1748. Czas inkubacji 24 godz.

Analizę statystyczną pomiędzy danymi wartościami przeprowadziłam testem jednoparametrowej analizy wariancji, gdzie * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oznacza statystycznie istotne różnice względem kontroli.

Aktywacji kaspazy-3 towarzyszyły również zmiany w rozmieszczeniu fosfolipidów błonowych. W komórkach linii Panc-1, MiaPaCa-2 i BxPC-3 poddanych działaniu C-1748 o trzech różnych stężeniach, dochodziło do wzrostu ilości komórek wyznakowanych Aneksyną V (komórki wczesnoapoptotyczne) lub Aneksyną V i jodkiem propidyny (komórki późnoapoptotyczne). W przypadku komórek linii AsPC-1 nie obserwowałam widocznych zmian w budowie błony.

W związku z faktem, że komórki nie wszystkich czterech badanych linii raka trzustki ulegały procesowi apoptozy pod wpływem C-1748, postanowiłam sprawdzić, czy komórki które pozostają żywe ulegają procesowi **przyspieszonego starzenia komórkowego**. Komórki ulegające starzeniu po wejściu w stan trwałego zahamowania wzrostu w fazie G1 lub G2/M pozostają żywe, zachowując jednak zdolność do syntezy RNA i białek oraz wrażliwość na sygnały pozakomórkowe [Campisi, 2001]. Indukcję starzenia komórkowego w wyniku działania C-1748 obserwowano już wcześniej dla komórek raka jelita grubego linii HCT8 i HCT-116 oraz komórek raka prostaty LnCaP [Nowak-Ziatyk, 2007, Moś-Rompa, 2007]. Do indukcji starzenia komórkowego dochodziło również w komórkach raka trzustki w wyniku m.in. nadekspresji miR-137 [Neault i wsp., 2016], działania gemcytabiny [Modrak i wsp., 2009], działania antrachinonu [Yu i wsp., 2011], czy obniżenia poziomu ekspresji białka sirtuiny-1 po ekspozycji na gemcytabinę lub inhibitor EX527 [Zhang i wsp., 2014]. Niejednokrotnie dawka leku potrzebna do zainicjowania procesu starzenia jest znacznie niższa niż dawka wymagana do indukcji śmierci komórkowej [Eom i wsp., 2005, Mansilla i wsp., 2006], tak więc badania indukcji starzenia komórkowego przeprowadziłam przy stężeniu pochodnej C-1748 odpowiadającym wartości IC_{80} . Połączona ocena morfologiczna i histochemiczna komórek badanych linii raka trzustki wykazała, że ich ekspozycja na działanie C-1748 prowadziła do indukcji starzenia komórkowego jedynie w komórkach linii AsPC-1 (zwiększona aktywność β -galaktozydazy, wzrost poziomu białka p21, trwała akumulacja komórek w fazie G1 cyklu życiowego).

Kolejnym, ważnym zagadnieniem dotyczącym raka trzustki, będącym przedmiotem mojej pracy doktorskiej było zbadanie zdolności pochodnej C-1748 **do indukcji lub inhibicji procesu autofagii**. Liczne badania pokazują, że oporność wielu nowotworów na chemioterapię, radioterapię, czy terapię ukierunkowaną molekularnie może być związana z nadmierną indukcją autofagii [Hu i wsp., 2012, Zou i wsp., 2012]. Dodatkowo, wiele dowodów wskazuje na to, że zahamowanie autofagii wzmacnia cytotoksyczne działanie chemoterapeutyków [Carew i wsp., 2007, Firat i wsp., 2012, Zou i wsp., 2012]. Jak już wcześniej wspominałam komórki raka trzustki charakteryzują się wysokim „wyjściowym” poziomem autofagii i korzystne z terapeutycznego punktu widzenia byłoby zahamowanie tego procesu, co spowodowałoby pozbawienie komórek nowotworowych składników odżywczych w sytuacji stresowej i przyczyniłoby się do spadku ich proliferacji i przeżycia [Hashimoto i wsp., 2014]. Nadmierna indukcja autofagii w komórkach nowotworowych trzustki mogłaby z kolei prowadzić do wzmożonej degradacji składników komórkowych, szybszej śmierci komórek, a także eliminacji uszkodzonych komórek, co zapobiegałoby dalszym mutacjom i progresji nowotworu [Li i wsp., 2013]. Warto również zaznaczyć, że poziom autofagii jest dużo wyższy w tkance nowotworowej trzustki w porównaniu do tkanki prawidłowej [Hashimoto i wsp., 2014], co czyni ten proces dobrym celem molekularnym dla chemoterapeutyków. Wyniki badań Hashimoto i wsp. wskazują, że do nadmiernej indukcji autofagii w komórkach raka trzustki linii Panc-1 i BxPC-3 dochodziło w wyniku działania gemcytabiny i 5-fluorouracylu [Hashimoto i wsp., 2014]. W tym przypadku wzrost poziomu autofagii był mechanizmem obronnym komórek, dzięki któremu stawały się one mniej wrażliwe na działanie związków. Dopiero zastosowanie inhibitora autofagii - 3-metyloadeniny, w kombinacji z tymi lekami wzmocniło ich antyproliferacyjne działanie. Znaczenie procesu autofagii potwierdzają również wyniki badań Li i wsp. Wykazali oni, że wyciszenie ekspresji genu kluczowego białka regulatorowego procesu autofagii - bekliny-1, powodowało zahamowanie procesu autofagii, czego następstwem był spadek ilości komórek apoptotycznych linii MiaPaCa-2 po ich ekspozycji na działanie gemcytabiny [Li i wsp., 2013]. Yang i wsp. wykazali z kolei, że skutkiem zahamowania autofagii w wyniku wyciszenia ekspresji genów *Atg-5*, *Atg-7* i *bekliny-1* lub przy użyciu inhibitora autofagii – chlorochiny, było obniżenie populacji nowotworowych komórek macierzystych trzustki (CSC) [Yang i wsp., 2015].

Mikroskopowa analiza ilości kwaśnych organelli w komórkach Panc-1, MiaPaCa-2 i BxPC-3 wstępnie wykazała, że pod wpływem działania pochodnej C-1748 o stężeniu równym 0,1 μM dochodziło do zmniejszenia ilości kwaśnych organelli w porównaniu do kontroli. Wyjątek stanowiły komórki linii AsPC-1, w przypadku których nie obserwowałam istotnych zmian w ilości AVO's. W komórkach, w których dochodziło do spadku AVO's

obserwowałam również spadek ilości formy LC3-II białka LC3 (co oznacza spadek ilości autofagosomów). Uzyskane wyniki wskazały na nowy, jak dotąd nieopisany mechanizm działania pochodnej C-1748, przy czym najbardziej podatne na zahamowanie autofagii przez związek były komórki linii BxPC-3.

Kontynuując badania nad procesem autofagii, sprawdziłam również, jak na komórki nowotworowe trzustki wpłynie równoczesne traktowanie ich pochodną C-1748 w połączeniu **z inhibitorami autofagii**. W badaniach wykorzystałam dwa powszechnie stosowane inhibitory autofagii, hamujące ten proces na różnym etapie. Wortmanina, hamuje autofagię już na etapie inicjacji, natomiast chlorochina, na końcowym jej etapie, nie dopuszczając do degradacji autofagolizosomu [Tanida i wsp., 2011]. Wykazano już wcześniej, że równoczesne zastosowanie kombinacji gemcytabiny, czy 5-fluorouracylu z chlorochiną, bądź 3-metyloadeniną zwiększało wrażliwość komórek raka trzustki, porównując do efektu uzyskanego po traktowaniu ich związkami bez dodatku inhibitorów autofagii [Hashimoto i wsp., 2014].

Wstępne badania przeprowadzone z użyciem chlorochiny wykazały, że związek ten hamował autofagię w komórkach badanych linii raka trzustki, lecz zastosowanie go w kombinacji z C-1748 nie wzmacniało efektu działania pochodnej 1-nitroakrydyny. Kombinacja chlorochiny z pochodną C-1748 nie wykazywała również synergistycznego działania cytotoksycznego w porównaniu do zastosowania samego C-1748. Obserwowana w tym przypadku dysfunkcja lizosomów bez niszczenia komórek może być efektem działania niektórych związków i określana jest jako fosfolipidoza lizosomalna. Akumulacja takich związków w kwaśnym środowisku lizosomów i endosomów powoduje obrzęk i zaburzenia funkcji tych organelli, a odpowiednio wysokie stężenie związków może ostatecznie spowodować śmierć komórki [Van Dyke, 1996].

W toku dalszych badań wykazałam, że wortmanina jest lepszym inhibitorem autofagii w komórkach raków trzustki niż chlorochina. Ponadto, pochodna C-1748 wykazała synergistyczne działanie w połączeniu z wortmaniną i zastosowanie kombinacji związków wywierało jeszcze silniejszy efekt na hamowanie autofagii w komórkach Panc-1, MiaPaCa-2 i BxPC-3 w porównaniu do zastosowania samej pochodnej 1-nitroakrydyny. Następnie wykazałam również, że zastosowanie kombinacji związków miało wpływ nie tylko na silniejsze zahamowanie autofagii, ale także na obniżenie proliferacji komórek nowotworowych trzustki oraz indukcję apoptozy.

Biorąc pod uwagę rolę procesu autofagii w oporności komórek raka trzustki na działanie chemoterapeutyków, zdolność do hamowania tego procesu jest pożądaną cechą potencjalnych leków, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu tego schorzenia. Pochodna C-1748 wykazała tą cechę. Obecnie w różnych ośrodkach naukowych trwają

liczne próby otrzymania nowych inhibitorów autofagii. Niedawno zsyntetyzowano nową grupę pochodnych chlorochiny, które cechują się nie tylko wyższą aktywnością cytotoksyczną w porównaniu do związku wyjściowego, ale również silniejszym działaniem w hamowaniu autofagii [Nordstrøm i wsp., 2015].

Autofagia jest ściśle powiązana z **homeostazą lipidów wewnątrzkomórkowych** [Singh i wsp., 2011]. W procesie autofagii dochodzi nie tylko do degradacji białkowych składników komórkowych do aminokwasów, ale również do powstawania bardziej wydajnych energetycznie, niezbędnych składników komórkowych, takich jak kwasy tłuszczowe oraz cukry [Gozuacik i wsp., 2004]. W normalnych warunkach triacyloglicerol, cholesterol oraz inne tłuszcze ulegają rozkładowi w procesie lipolizy. Tłuszcze te zmagazynowane są w sferycznych organellach zwanych kroplami lipidowymi (*ang. lipid droplets, LD*) [Ducharme i wsp., 2008]. W warunkach niedoboru składników odżywczych, białka związane z autofagią formują podwójną błonę w obrębie kropli tłuszczowej, powodując oddzielenie jej części, która następnie w postaci autofagolizosomu łączy się z lizosomem, a jej składniki ulegają degradacji. Konsekwencją zahamowania procesu autofagii jest więc nagromadzenie się kropli tłuszczowych [Singh i wsp. 2011]. Di Vito i wsp. oraz Hakumäki i wsp. wykazali, że krople tłuszczowe zaangażowane są w wiele procesów zachodzących w komórce takich jak ich proliferacja, apoptoza, zahamowanie wzrostu, czy nekroza [Di Vito i wsp., 2001, Hakumäki i wsp., 2000]. Wyniki uzyskane z mikroskopowej i cytometrycznej analizy ilości lipidów i kropli lipidowych w komórkach raka trzustki poddanych działaniu pochodnej C-1748 i wybarwionych Czerwienią Nilu wykazały, że w komórkach Panc-1, MiaPaCa-2 oraz BxPC-3 dochodziło do nadmiernej akumulacji kropli tłuszczowych. Dodatkowo, równoczesne zastosowanie pochodnej C-1748 w kombinacji z wortmaniną wzmacniało efekt działania związku. W przypadku komórek linii AsPC-1, ilość LD była podobna w komórkach kontrolnych oraz tych poddanych działaniu C-1748. Akumulację LD w komórkach raka trzustki linii MiaPaCa-2, do której dochodziło na skutek działania symwastatyny wykazała wcześniej Gbelcová i wsp. [Gbelcová i wsp., 2013]. Efekt ten powiązano z antyproliferacyjnym działaniem związku wobec komórek raka trzustki. Boren i Brindle zaobserwowali z kolei, że do nadmiernej akumulacji cytoplazmatycznych kropli tłuszczowych dochodziło również po uruchomieniu procesu apoptozy [Boren i Brindle, 2012]. Akumulacji LD towarzyszyła zwiększona synteza *de novo* lipidów, do której dochodziło prawdopodobnie na skutek zahamowania zachodzącego w mitochondrium procesu β -oksydacji kwasów tłuszczowych. Wobec powyższego, nie można wykluczyć, że akumulacja kropli tłuszczowych w komórkach raka trzustki poddanych działaniu C-1748 była konsekwencją indukcji procesu apoptozy.

Kolejne badania miały na celu określenie jaki efekt na proces apoptozy będzie miało zastosowanie kombinacji pochodnej C-1748 z wortmaniną. Cytometryczna analiza aktywacji kaspazy-3 oraz analiza western blotting poziomu dwóch form białka PARP wykazały, że kombinacja pochodnej C-1748 z wortmaniną wywierała synergistyczny efekt i dodatkowo wzmacniała proapoptotyczne działanie C-1748 w komórkach linii Panc-1, MiaPaCa-2 i BxPC-3. Komórki AsPC-1 pozostawały odporne na indukowaną przez związek apoptozę, a równoczesna inkubacja z wortmaniną jedynie nieznacznie wpłynęła na wzrost ilości tychże komórek z aktywną kaspazą-3.

Szereg doniesień literaturowych wskazuje na istotny udział mitochondriów w kontrolowaniu i przebiegu procesu apoptozy indukowanej przez chemoterapeutyki [Ly i wsp., 2003]. Mikroskopowe obserwacje zmian polaryzacji błony mitochondrialnej wykazały, że do spadku potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej dochodziło głównie w komórkach linii BxPC-3, MiaPaCa-2 i Panc-1. Najmniejsze zmiany dotyczyły komórek linii AsPC-1. Dodatkowo, równoczesne zastosowanie kombinacji C-1748 i wortmaniny, wzmacniało działanie pochodnej 1-nitroakrydyny. Obserwowana dysfunkcja mitochondriów może być przyczyną wspomnianej wcześniej akumulacji kropli lipidowych w komórkach trzech badanych linii raka trzustki. Dodatkowo, populacja komórek nowotworowych trzustki z uszkodzonymi mitochondriami była większa, niż populacja komórek z aktywną kaspazą-3 i zmienioną morfologią jąder komórkowych, co wskazuje na to, że spadek potencjału na błonie mitochondrialnej poprzedza aktywację kaspaz [Barroso i wsp., 2006]. Jest to zgodne z powszechnie panującym poglądem, że zmiany indukowane przez chemoterapeutyki w mitochondriach zachodzą dużo wcześniej, a ich konsekwencją jest aktywacja szlaków apoptozy prowadzących do uwolnienia kaspaz i uszkodzenia DNA [Barroso i wsp., 2006].

Jednym z czynników odpowiadających za oporność komórek nowotworowych trzustki na apoptozę jest **nadekspresja białek anty-apoptotycznych z rodziny Bcl-2**. Potwierdzają to wyniki badań Shi i wsp. Wykazali oni, że komórki nowotworowe trzustki, w których ekspresja Bcl-2 zachodziła na wysokim poziomie nabywały oporności na działanie gemcytabiny i 5-fluorouracylu [Shi i wsp., 2002]. Zahamowanie ekspresji genu *Bcl-2*, prowadziło z kolei do zwiększonej wrażliwości komórek na działanie tych związków. Analiza western blotting wykazała, że apoptozie indukowanej przez C-1748 w komórkach raka trzustki towarzyszył spadek poziomu białka Bcl-2. Efekt ten jeszcze silniej obserwowany był po zastosowaniu kombinacji C-1748 z wortmaniną. Wpływ C-1748 na poziom białka Bcl-2 w komórkach raka trzustki może być kolejnym, niezależnym mechanizmem działania tego związku. Ponieważ zwiększona ekspresja białka Bcl-2 w komórkach nowotworowych związana jest z ich opornością na apoptozę, taka właściwość związku jest bardzo pożądana. Spadek ilości białka Bcl-2 wpływa prawdopodobnie na większą wrażliwość komórek na

apoptozę, co szczególnie widać w przypadku komórek linii BxPC-3. Wyjątkiem są komórki linii MiaPaCa-2, w których poziom białka antyapoptotycznego nie zmieniał się pod wpływem działania C-1748, co może świadczyć o tym, że białko to nie jest istotne w przebiegu apoptozy indukowanej przez badany związek w tychże komórkach. Zjawisko to obserwował już między innymi Balkham na przykładzie komórek białaczki [Balkham i wsp., 1999].

W pierwszej części badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazałam, że **komórki czterech linii raka trzustki charakteryzują się różną wrażliwością na badaną pochodną 1-nitroakrydyny. Komórki linii Panc-1, MiaPaCa-2 i BxPC-3, w zależności od zastosowanego stężenia związku i czasu inkubacji ze związkiem wykazały wysoką wrażliwość zarówno na cytotoksyczne, jak i proapoptotyczne działanie pochodnej C-1748. Natomiast komórki linii AsPC-1 pozostawały odporne na działanie związku.**

Lekooporność raka trzustki wynika z wielu czynników, do których można zaliczyć między innymi: mutacje w niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki genach, nieprawidłową ekspresję genów, rozregulowanie podstawowych szlaków sygnalizacyjnych oraz szlaków apoptozy, zdolność komórek do tranzycji epithelialno-mezenchymalnej, nasilony proces angiogenezy, występowanie populacji nowotworowych komórek macierzystych, czy obecność we wnętrzu guza mikrośrodowiska hipoksyjnego [Donghui i wsp., 2004, Duffy i wsp., 2003, Long i wsp., 2011]. Badania wielu autorów skupiają się obecnie na próbach przełamania oporności raka trzustki wynikającej z wymienionych powyżej cech nowotworu. W drugiej części swojej pracy, biorąc pod uwagę dane literaturowe oraz wyniki uzyskane wcześniej przez innych członków zespołu, postanowiłam zbadać w jaki sposób można uwrażliwić komórki nowotworowe trzustki AsPC-1 na działanie pochodnej 1-nitroakrydyny.

Wyniki badań uzyskanych dotychczas w naszym zespole wskazują, że poziom ekspresji enzymów metabolizujących chemoterapeutyki ma istotny wpływ na zmianę wrażliwości komórek nowotworowych wobec tych związków [Pawłowska i wsp., 2014]. Przy podwyższonej ekspresji danych enzymów mogą powstawać dodatkowe metabolity, które w większym stopniu niż związek wyjściowy będą oddziaływać na komórki. Wcześniejsze badania przeprowadzone w naszym zespole wykazały również, że pochodną C-1748 można zaliczyć do proleków, która do pełnej aktywności wymaga transformacji metabolicznej. Dochodzi wówczas do powstawania większej ilości aktywnych metabolitów (szczególnie w warunkach niedotlenienia), stąd komórki, w których ekspresja enzymów metabolizujących C-1748 zachodzi na wysokim poziomie będą bardziej wrażliwe na działanie związku [Gorlewska, 2001, Wiśniewska, 2008].

Poszukując drogi pokonania lekooporności komórek raka trzustki jako cel drugiej części pracy postawiłam poznanie **wpływu nadekspresji wybranych enzymów I fazy metabolizmu ksenobiotyków w komórkach nowotworowych trzustki** (które wykazały najwyższą oporność na działanie C-1748) **na końcową odpowiedź biologiczną indukowaną w tychże komórkach przez ten związek.**

Ze wstępnych badań przeprowadzonych przez innych członków zespołu wynika, że pochodna C-1748 **ulegała przemianom metabolicznym** w różnym stopniu w komórkach czterech badanych linii raka trzustki [dane nieprzedstawione]. Ponieważ za biotransformację związku odpowiadają enzymy pierwszej fazy metabolizmu, głównie reduktaza cytochromu P450 (CPR) i wybrane izoenzymy *P450* [Wiśniewska, 2008, Wiśniewska i wsp., 2012], postanowiłam określić poziom ekspresji tych enzymów w komórkach czterech badanych przeze mnie linii raka trzustki. Oprócz enzymów metabolizujących C-1748: CPR, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, wybrałam również inne enzymy: CYP2A6, CYP2B1, CYP2C6, CYP2D6 oraz CYP2E1, biorące udział w biotransformacji związków stosowanych w leczeniu raka trzustki [Ling i wsp., 2006, Projean i wsp., 2003, Santos i wsp., 2006]. Wyniki uzyskane z analizy western blotting poziomu ekspresji wybranych enzymów I fazy metabolizmu świadczą o tym, że ich ekspresja zachodziła na różnym poziomie w komórkach czterech badanych linii raka trzustki. Najwyższą ekspresję większości enzymów obserwowałam w komórkach linii MiaPaCa-2. W komórkach tych dochodziło również do najwyższej ekspresji enzymów metabolizujących pochodną C-1748, takich jak CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 oraz CPR. Wysokim poziomem ekspresji wybranych enzymów charakteryzowały się również komórki linii Panc-1. Nieco niższy poziom ekspresji enzymów obserwowałam w komórkach linii BxPC-3, dotyczyło to głównie enzymów CYP2C9 i CYP3A4. Najniższy poziom ekspresji badanych enzymów wykazały komórki linii AsPC-1. Jedynie enzymy CYP2C6 oraz CPR ulegały ekspresji na poziomie zbliżonym do poziomu ekspresji obserwowanego w komórkach pozostałych linii.

Powyższe wyniki wskazują, że **odmienna ekspresja wybranych enzymów cytochromu P450** w komórkach czterech badanych przeze mnie linii raka trzustki może mieć wpływ na końcową odpowiedź biologiczną indukowaną przez pochodną C-1748. Komórki linii MiaPaCa-2 oraz Panc-1, w których enzymy metabolizujące C-1748 ulegały ekspresji na najwyższym poziomie spośród wszystkich czterech badanych linii, wykazały wysoką wrażliwość na cytotoksyczne działanie związku oraz indukcję apoptozy. Co prawda w komórkach BxPC-3 obserwowałam niższy poziom enzymów, ale ich wrażliwość na działanie C-1748 może wynikać z faktu, że jest to jedyna linia z prawidłową, niezmutowaną formą genu *K-RAS*. Poszukując odpowiedzi na pytanie, czy wyższy poziom enzymów metabolizujących pochodną C-1748, jest skorelowany ze zwiększoną aktywnością związku,

jako pierwsze zbadalam przemiany metaboliczne C-1748 w komórkach linii najbardziej odpornej na działanie C-1748 - AsPC-1, po transfekcji plazmidami z sekwencją CPR lub CYP3A4. Na podstawie analizy HPLC pożywki hodowlanej oraz ekstraktu komórkowego, wykazałam, że przemiany metaboliczne związku były najbardziej intensywne w komórkach linii AsPC-1-CPR i AsPC-1-3A4. W komórkach AsPC-1 typu dzikiego po różnych czasach inkubacji ze związkiem obserwowałam tylko dwa główne metabolity M1 i M2. Najintensywniej i najszybciej C-1748 ulegał przemianom metabolicznym w komórkach AsPC-1 o nadekspresji enzymu CPR. W porównaniu do komórek AsPC-1-WT obserwowałam pojawienie się trzech nowych metabolitów M3, M4 i M5. W komórkach AsPC-1-3A4 metabolit M2 w ogóle nie powstawał, obserwowałam natomiast metabolity M3 i M5. Stężenie wszystkich powstających metabolitów było znacznie wyższe w pożywce hodowlanej w porównaniu do ich stężenia w ekstraktach komórkowych. Fakt, że większość metabolitów obecna była w pożywce hodowlanej świadczy o tym, że bardzo szybko są one wydalane na zewnątrz komórki. Bardziej pożądane byłoby zatrzymanie metabolitów we wnętrzu komórki, aby zapewniony był odpowiednio długi czas ich działania. Sprawdziłam więc, czy nasilony metabolizm C-1748 w komórkach linii AsPC-1-CPR i AsPC-1-3A4, znajduje potwierdzenie w aktywności cytotoksycznej związku wobec tych komórek. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że nadekspresja zarówno CPR jak i CYP3A4 znacznie wpłynęła na wrażliwość komórek AsPC-1 na badaną pochodną 1-nitroakrydyny. Zahamowanie wzrostu z 40 % dla komórek linii wyjściowej AsPC-1-WT osiągnęło prawie 77 % dla komórek linii z nadekspresją CPR lub CYP3A4. Podobnie, badając zmiany w morfologii jąder komórkowych, zmiany potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, jak i aktywność kaspazy-3, wykazałam, że nadekspresja enzymów CPR i CYP3A4 uwrażliwiła komórki linii AsPC-1 na indukowaną przez pochodną C-1748 apoptozę.

Opisany powyżej wzrost aktywności związku o działaniu cytotoksycznym i przeciwnowotworowym w warunkach podwyższonej ekspresji izoenzymów P450 był już wcześniej obserwowany m.in. dla cyklofosfamidu, dla którego podwyższony poziom izoenzymu CYP3A4 zwiększał cytotoksyczne działanie leku wobec komórek m.in raka płuc [Gut i wsp., 2000]. Podobny efekt obserwowano również dla tamoksifenu będącego substratem dla CYP3A4 w komórkach nowotworu wątroby HepG2 [Hołownia i wsp., 2003], czy ifosfamidu metabolizowanego przez CYP3A4, CYP2C9 i CYP2B6 w komórkach raka piersi [Schmidt i wsp., 2004]. Warto podkreślić, że otrzymane przeze mnie wyniki dotyczą po raz pierwszy komórek raka trzustki.

Mechanizm prowadzący do modulacji aktywności C-1748 w komórkach linii AsPC-1 z nadekspresją CPR lub CYP3A4 nie został całkowicie zbadany. Z jednej strony za wyższą aktywność związku może odpowiadać **większa ilość aktywnych metabolitów** powstająca

po transformacji C-1748 w komórkach z nadekspresją enzymów odpowiedzialnych za jego metabolizm. Odpowiedź komórek AsPC-1 na działanie C-1748 może być również niezależna od jego metabolizmu i przebiegać poprzez **aktywację wewnętrznych szlaków komórkowych** lub receptorów aktywujących inne enzymy metabolizujące ksenobiotyki, lub kierujących komórkę na drogę apoptozy [Pawłowska, 2014]. Jedną z przyczyn może być fakt, że w warunkach nadekspresji CYP3A4 dochodzi do zmiany metabolizmu endogennych związków będących jego substratami. Te z kolei, mogą być zaangażowane w szlaki związane ze wzrostem i śmiercią komórki nowotworowej [Niemira i wsp., 2014]. CYP3A4 uczestniczy m.in. w biotransformacji kwasów arachidonowych, a dokładnie 14,15-epoksyekoizatrienowych. Produkty metabolizmu tych kwasów mogą pośredniczyć np. w fosforylacji białka Stat3 [Mitra i wsp., 2006, Mitra i wsp., 2011], które wpływa nie tylko na proliferację i wzrost komórki, ale ma również właściwości antyapoptotyczne [Hirano i wsp., 2000]. W przypadku komórek z nadekspresją reduktazy P450 (CPR), wpływ na śmierć komórek może mieć również nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu. Badania wielu autorów pokazały, że nadekspresja reduktazy P450 prowadzi do zwiększenia stresu oksydacyjnego w komórce, czego konsekwencją jest wyższy poziom karbonylacji białek i bardziej intensywnej konsumpcji wewnątrzkomórkowego tlenu [Fussel i wsp., 2011, Heine i wsp., 2006, Pillai i wsp., 2011].

Podsumowując, wyniki badań przeprowadzonych przeze mnie w ramach pracy doktorskiej poszerzyły wiedzę na temat mechanizmu działania pochodnej C-1748 w komórkach czterech linii raka trzustki. Pochodna C-1748 ze względu na niską toksyczność ogólną i wysoką aktywność biologiczną jest interesującym związkiem modelowym, który może stanowić podstawę do opracowania nowych analogów, charakteryzujących się jeszcze wyższą aktywnością oraz bardziej selektywnym mechanizmem działania. W trakcie badań wykazałam nowe, jak dotąd niezbadane elementy mechanizmu działania związku. Oprócz indukcji zmian w cyklu życiowym, indukcji apoptozy przebiegającej z udziałem kaspaz oraz mitochondriów, hamowania poziomu ekspresji białek anty-apoptotycznych oraz selektywnej indukcji starzenia komórkowego, związek hamował również proces autofagii. Nowym elementem jest także indukcja przez związek akumulacji wewnątrzkomórkowych kropli tłuszczowych. Wykazałam poza tym, że równoczesne zastosowanie pochodnej C-1748 z inhibitorem autofagii, wortmaniną, dawało synergistyczny efekt, a kombinacja tych związków silniej hamowała autofagię i indukowała apoptozę, niż sama pochodna 1-nitroakrydyny.

Wyniki drugiej części badań dostarczyły wiedzy na temat różnic w poziomie ekspresji wybranych enzymów I fazy metabolizmu ksenobiotyków w komórkach nowotworowych trzustki. Standop i wsp. wykazali dotychczas, że ekspresja wybranych enzymów P450 zachodziła na wyższym poziomie w tkance nowotworowej trzustki w porównaniu do tkanki

prawidłowej [Standop i wsp., 2003]. W doniesieniach literaturowych nie znalazłam informacji na temat poziomu ekspresji enzymów I fazy metabolizmu w komórkach badanych linii raka trzustki. Wiedza ta może być przydatna w opracowywaniu nowych modeli komórkowych do badań podstawowych metabolizmu ksenobiotyków oraz interakcji pomiędzy chemoterapeutykami w zakresie aktywacji szlaków komórkowych oraz modulacji aktywności receptorów lub enzymów. Posłużyć może również do badań zależności pomiędzy poziomem ekspresji enzymów i podatnością na metabolizm chemoterapeutyków a końcową odpowiedzią biologiczną komórek nowotworowych na działanie danego związku. Jest to szczególnie istotne, ponieważ ten sam lek może wywoływać różne efekty ze względu na indywidualny poziom ekspresji enzymów metabolizujących dany chemoterapeutyk u pacjentów.

Badania mechanizmu działania pochodnej C-1748 w komórkach raków trzustki, w szczególności badania nad procesem autofagii, podobnie jak dokładne określenie mechanizmu odpowiadającego za wzrost aktywności pochodnej C-1748 w stosunku do komórek linii AsPC-1 z nadekspresją izoenzymów CPR i CYP3A4 wymagają dalszej kontynuacji i będą przedmiotem badań prowadzonych w przyszłości przez innych członków zespołu.

Wnioski końcowe:

Przeprowadzone i opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków końcowych:

CZĘŚĆ I:

1. Pochodna C-1748 wykazała wysoką aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek czterech linii raka trzustki linii: Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 oraz AsPC-1.
2. Najbardziej wrażliwe na cytotoksyczne działanie związku były komórki linii MiaPaCa-2.
3. Badana pochodna w stężeniu odpowiadającym IC_{80} indukowała istotne zmiany w przebiegu cyklu życiowego komórek raka trzustki. W przypadku komórek linii Panc-1 i MiaPaCa-2 dochodziło przede wszystkim do znacznego wzrostu tzw. frakcji sub-G1, określanej jako frakcja komórek apoptotycznych ze zdegradowanym DNA. Komórki linii AsPC-1 oraz BxPC-3 ulegały z kolei akumulacji w fazie G1 lub G2/M cyklu podziałowego.
4. Po długim czasie inkubacji z pochodną C-1748 w stężeniu odpowiadającym IC_{80} w komórkach linii Panc-1 dochodziło do indukcji katastrofy mitotycznej.

5. Komórki czterech badanych linii pod wpływem działania związku ulegały apoptozie z różną intensywnością, zarówno w zależności od zastosowanego stężenia, jak i czasu inkubacji ze związkiem.
6. Apoptoza indukowana przez związek w komórkach raków trzustki została potwierdzona m.in.:
 - a) cytometryczną analizą zmian w dystrybucji komórek w cyklu życiowym, która wykazała wzrost populacji komórek ze zdegradowanym DNA (DNA <2N),
 - b) mikroskopową analizą zmian w morfologii jąder komórkowych (widoczne tzw. ciała apoptotyczne, kondensacja chromatyny),
 - c) cytometryczną analizą aktywacji kaspazy-3,
 - d) analizą western blotting poziomu ekspresji pociętej formy białka PARP, oraz białka Bcl-2,
 - e) cytometryczną analizą zmian w strukturze błony cytoplazmatycznej,
 - f) mikroskopową analizą zmian potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej.
7. Badany związek w stężeniu odpowiadającym IC₈₀ indukuje przyspieszone starzenie komórkowe w komórkach linii AsPC-1.
8. Pochodna C-1748 hamowała autofagię w komórkach trzech badanych linii, co zostało potwierdzone mikroskopowymi obserwacjami ilości kwaśnych organelli (AVO's) w komórkach wybarwionych oranżem akrydyny oraz analizą western blotting poziomu ekspresji dwóch form białka LC-3.
9. Kombinacja pochodnej C-1748 z wortmaniną wywierała silniejszy efekt hamowania autofagii niż związek zastosowany pojedynczo.
10. Kombinacja związków (pochodna C-1748 + wortmanina) silniej indukowała apoptozę oraz wpływała na wzrost poziomu kropli tłuszczowych w komórkach raków trzustki niż sam C-1748.

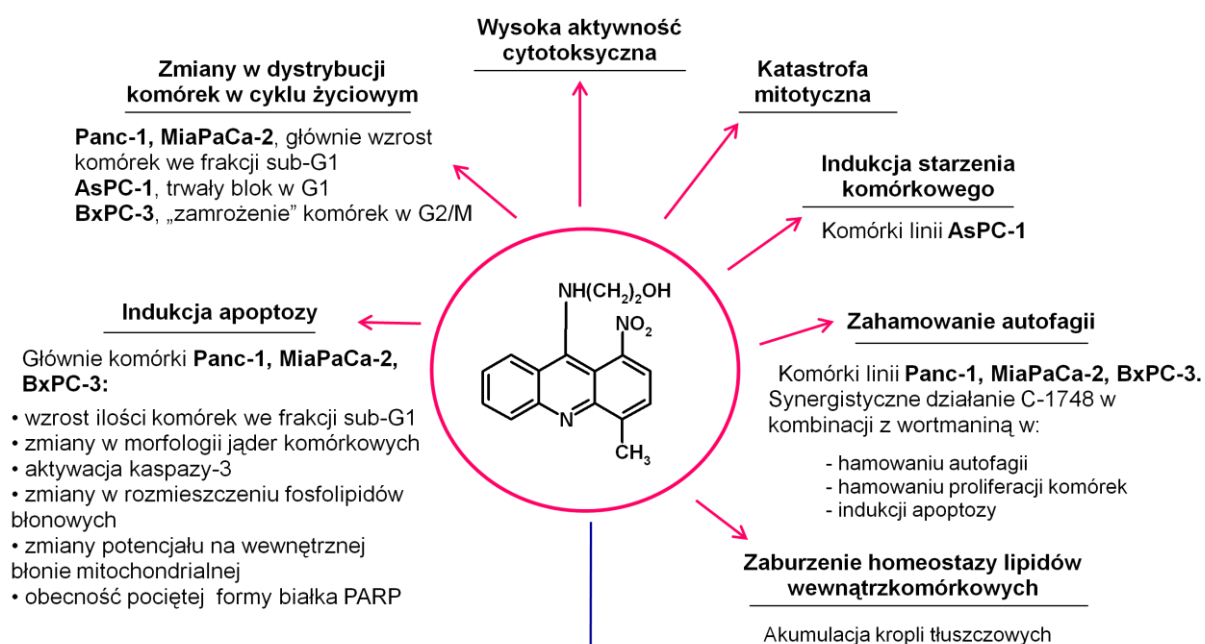
CZĘŚĆ II:

1. Komórki czterech badanych linii raka trzustki wykazały różny poziom ekspresji wybranych enzymów I fazy metabolizmu ksenobiotyków.
2. W wyniku przejściowej transfekcji najbardziej opornych na działanie związku komórek linii AsPC-1 plazmidami CPR lub CYP3A4, dochodziło do zmian w ilości i stężeniu produktów metabolizmu związku w komórkach.
3. W przypadku komórek AsPC-1-CPR i AsPC-1-3A4 powstawały nowe metabolity, nieobserwowane w przypadku komórek AsPC-1 typu dzikiego.

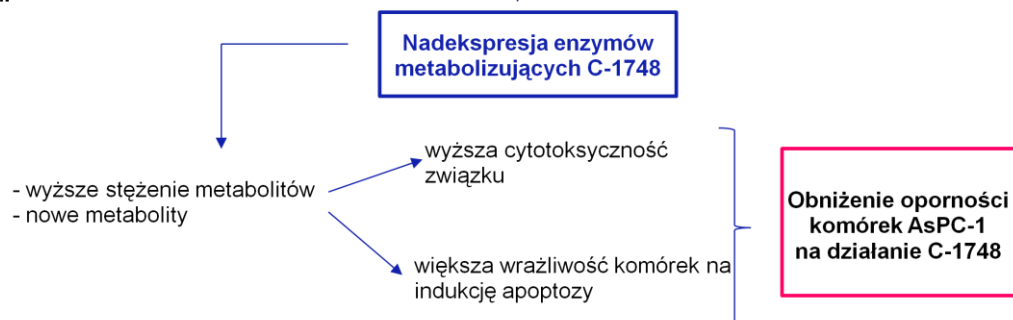
4. Nadekspresja enzymów CPR i CYP3A4 w komórkach linii AsPC-1 wpłynęła na wzrost aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748, a także wzrost ilości komórek apoptotycznych w porównaniu do komórek linii AsPC-1-WT.

Schemat przedstawiający najważniejsze uzyskane wyniki:

CZĘŚĆ I



CZĘŚĆ II



Rysunek 78. Schemat przedstawiający w skrócie wyniki badań otrzymanych w ramach pracy doktorskiej. I- wyniki otrzymane po realizacji pierwszej części badań. II- wyniki otrzymane po realizacji drugiej części badań.

6. Część doświadczalna

6.1. Materiały

6.1.1. Badany związek

C-1748: pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny, C-1748, związek cytotoksyczny zsyntetyzowany w postaci monochlorowodoru w Katedrze Technologii Leków i Biochemii w zespole naukowym Profesora Jerzego Konopy [Konopa i wsp., 1981]. W przeprowadzonych doświadczeniach stosowałam pochodną w postaci roztworu przygotowanego w 50 % alkoholu etylowym o stężeniu wyjściowym 1mM. Stężenia efektywne związku przygotowywałam bezpośrednio przed zastosowaniem.

6.1.2. Odczynniki chemiczne i zestawy analityczne

Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): akrylamid, aldehyd glutarowy 25 %, β -merkptoetanol, chlorek magnezu ($MgCl_2$), chlorek potasu (KCl), chlorek sodu (NaCl), chlorek wapnia ($CaCl_2$), chlorochina (CQ), dimetylosulfotlenek (DMSO), ditiotreitrol (DTT), diwodorofosforan potasu, dodecylosiarczan sodu (SDS), fluorek sodu (NaF), fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF), formaldehyd 36-38 %, heksacyjanożelazian(III) potasu ($K_3Fe(CN)_6$), heksacyjano-żelazian(II) potasu ($K_4Fe(CN)_6$), nadsiarczan amonu (APS), ortovanadan sodu, sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA), surowicza albumina wołowa (BSA), TEMED (N,N,N',N'-tetraetylenodimamina), Tris-Base (tris(hydroksylometylo)aminometan), oraz jego chlorowodorek, Tween-20 (monoluarynian polioksyetylenosorbitanu), wanadan sodu, wodorofosforan disodu (Na_2HPO_4), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd), wodorofosforan dipotasu, wodorowęglan sodu, wodorofosforan disodu, wortmanina.

PoCH (Gliwice, Polska): aldehyd glutarowy, alkohol etylowy, alkohol metylowy, lodowaty kwas octowy (CH_3COOH), kwas trichlorooctowy ($C_2HCl_3O_2$), diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4), fluorek sodu (NaF).

6.1.3. Zestawy analityczne

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, Propidium iodide staining solution- zestaw do badania zmian w budowie błony plazmatycznej (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Active Caspase-3 Apoptosis Kit- phycoerythrin-conjugated polyclonal rabbit anti-active caspase-3 antibody, Cytotfix/CytopermTM; Perm/WashTM; zestaw do badania aktywności kaspazy-3 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

PI Staining Kit- zestaw do analizy zmian w cyklu życiowym (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Bradford Protein Assay Kit- zestaw do oznaczania stężenia białka (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

High Pure RNA Isolation Kit- zestaw do izolacji RNA (Roche, Mannheim, Niemcy).

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit- zestaw do syntezy cDNA (Roche, Mannheim, Niemcy).

FastStart DNA Master SYBR Green I- zestaw do reakcji Real-time PCR (Roche, Mannheim, Niemcy).

6.1.4. Barwniki

- Barwnik do nanoszenia próbek na żel poliakrylamidowy, Laemmli Sample Buffer – (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).
- Barwnik Giemsa – (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- DAPI- (4,6-diaminoino-2-fenylindol) – (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Hoechst 33342 - (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- JC-1 - (Molecular Probes, Eugene, USA).
- Jodek propidyny – (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Nile Red – (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Oranż akrydyny – (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Sulforodamina B – (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

6.1.5. Enzymy

- Inhibitory proteaz: aprotinina, leupeptyna, pepstatyna, PMSF – (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Proteinaza K- (SERVA, Heidelberg, Niemcy).
- RNAza A (EC 3.1.27.5, aktywność 78 jednostek Kunitza/mg substancji (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Trypsyna -EDTA - (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

6.1.6. Startety do reakcji Real-time PCR

- **CYP3A4for:** 5' TTTCCACCACCCCGAGTTAG 3'
CYP3A4rev: 5' CCACGCCAACAGTGATTACA 3'
- **CPRfor:** 5' TCTACGACATCGTGGCTGAG 3'
CPRrev: 5' CCAAACACACCCAGGAGACT 3'
- **GAPDHfor:** 5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3'
GAPDHrev: 5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'

6.1.7. Markery

- **Marker wielkości białka** (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Precision Plus Protein™ All Blue Standards 161-0373: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa.

6.1.8. Bufory

- **Izoton** (5000 ml wody destylowanej, 39,5 g NaCl, 23,8 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 2 g KCl, 2 g EDTA·3 Na, 1,3 g (0,005 M) NaH₂PO₄·2 H₂O, 1,5 g NaF)- przygotowywany samodzielnie.
- **Bufor do RNAzy A** (10 mg/ml RNAza A w 10mM Tris-HCl, 15mM NaCl pH 7.5; rozcieńczony do 2mg/ml)- przygotowywany samodzielnie.
- **Bufor do zamykania preparatów mikroskopowych** (90% glicerol, 10% 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0) - przygotowywany samodzielnie.
- **Bufor fosforanowy PBS 5x stężony** (1000 ml wody destylowanej, 685 mM NaCl, 7mM KH₂PO₄, 40 mM Na₂HPO₄, 13 mM KCl)- przygotowywany samodzielnie.
- **Faza ruchoma do analizy HPLC** – bufor mrówczanowy o stężeniu 0,05 M, pH=3,4 (3,15 g HCOONH₄/ 1000 ml H₂O, pH stabilizowano 88 – 91 % kwasem mrówkowym) – przygotowywany samodzielnie.

6.1.9. Roztwory i bufory do elektroforezy poliakrylamidowej

- Żel poliakrylamidowy do rozdzielania białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE):
 - a) 30% roztwór akrylamidów (29% akrylamidu, 1% N,N-metylenobisakrylamidu),
 - b) 10% SDS,
 - c) 1,5 M Tris-HCl pH = 8,8,
 - d) 0,5 M Tris-HCl pH = 6,8,
 - e) 10% nadsiarazan amonu,
 - f) TEMED,
- Barwnik do nanoszenia próbek na żel: Laemmli Sample Buffer (161-0737, Bio-Rad), β-merkaptioetanol (Sigma-Aldrich); przygotowanie: 950 µl Laemmli + 50 µl β-ME.
- Marker wielkości białka firmy Bio-Rad Precision Plus Protein™ All Blue Standards (161-0373, Bio-Rad) : 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa.
- Bufor do przeprowadzania elektroforezy poliakrylamidowej: bufor Tris-glicyna: 25 mM Tris-Base; 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH = 8,3.

6.1.10. Przeciwciała, bufory i inne materiały do techniki western blotting

Przeciwciała pierwszorzędowe:

- Królicze poliklonalne przeciwciało anti-LC3 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Królicze monoklonalne przeciwciało anti-p21, królicze poliklonalne przeciwciała anti: Bcl-2, PARP, p/t-Akt, p/t-MAPK (Cell Signaling, Beverly, USA).
- Mysie monoklonalne anti-KRAS (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).
- Mysie poliklonalne anti-CYP3A4 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Mysie monoklonalne anti- β -aktyna (clone AC-15, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Przeciwciała anti-CRP, CYP3A4, CYP2C6, CYP2C9, CYP2E1, CYP2A6, CYP1A2, CYP2B1, CYP2D6 oraz anti-CPR zostały udostępnione do badań dzięki uprzejmości Prof. Rolanda C. Wolf z Cancer Research UK Molecular Pharmacology Unit, Biomedical Research Center, Dundee, Scotland.

Tabela 9. Stosowane rozcieńczenia przeciwciał I rzędowych.

Przeciwciało anti-	Rozcieńczenie	Roztwór (przeciwciało I rz.)	Przeciwciało II rz. (rozcieńczenie)
LC-3	1:500	5 % mleko w TBST	1:1500
Bcl-2	1:1000	5 % BSA w TBST	1:2000
p-21	1:1000	5 % BSA w TBST	1:2000
p/t- Akt	1:1000	5 % BSA w TBST	1:2000
p/t- MAPK	1:1000	5 % BSA w TBST	1:2000
PARP	1:1000	5 % mleko w TBST	1:2000
CPR	1:1000	5 % mleko w TBST	1:2000
B-aktyna	1:10000	0,5 % mleko w TBST	1:10000
CYP3A4, CYP2C6, CYP2C9, CYP2E1, CYP2A6, CYP1A2, CYP2B1, CYP2D6	1:2000	5 % mleko w TBST	1:5000

Przeciwciała drugorzędowe:

- Królicze anti-mysie skoniugowane z HRP (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA).
- Owce anti-mysie skoniugowane z HRP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
- Owce anti-królicze skoniugowane z HRP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Inne materiały:

- Bufor TBST: 10 mM Tris-Base, 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20, pH = 7,4.
- Bufor do elektrotransferu białek z żelu poliakrylamidowego na błonę nitrocelulozową: 192 mM glicyna, 25 mM Tris-base, 20% CH₃OH.
- Błona nitrocelulozowa - wielkość porów 0,22 μm (EP2HYA0010, Osmonics, Minnesota, USA).
- Bibuła MN218B, 3MM Chr – 742113 (Macherey-Nagel, Duren, Niemcy).
- Bufor blokujący: 150 mM NaCl, 20 mM Tris-Base, 5% odtłuszczone mleko w proszku, pH = 7,4.

6.1.11. Plazmidy i materiały potrzebne do transfekcji

- pCMV6-XL4-POR - plazmid kodujący reduktazę cytochromu P450 (Origene, Rockville, MD, USA; nr kat. SC100401).
- pcDNA3/CYP3A4/c-myc/His – plazmid kodujący izoenzym CYP3A4, posiadający gen oporności na genetycnę oraz markery obecności plazmidu (białko c-myc, reszty histydynowe), udostępniony przez Dr Petera Espenshade'a z Johns Hopkins University School of Medicine z Baltimore, MD, USA;
- plazmid pmaxGFPTM – AmexaTM Cell Line NucleofectorTM Kit (Lonza, Bazylea Szwajcaria).
- Lipofektamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Pożywka Opti-MEM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

6.1.12. Materiały niezbędne do prowadzenia hodowli

- Płodowa surowica bydlęca FBS (*ang. Fetal Bovine Serum*)- inaktywowana termicznie (56°C, 30 min.), (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria).
- Surowica końska (*ang. Horse Serum*), (CYTOGEN, Niemcy).
- Trypsyna EDTA 10x stężona (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA).
- bufor fosforanowy PBS 1x stężony (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,0 mM Na₂HPO₄) - przygotowywany samodzielnie.
- antybiotyki: PenStrep (10000 unit/ml penicyliny, 10000 μg/ml streptomycyny), (GIBCO Life Technologies, Paisley, Wielka Brytania).

Tabela 10. Rodzaj medium i hodowane w nim komórki.

Rodzaj medium hodowlanego	Komórki hodowane w medium
DMEM High glucose, (Sigma Aldrich, St. Luois, MO, USA)	Panc-1, MiaPaCa-2
RPMI-1640 Medium, (Sigma Aldrich, St. Luois, MO, USA)	AsPC-1, BxPC-3

6.1.13. Linie komórkowe

Panc-1 - linia komórkowa wyizolowana z raka trzustki umiejscowionego w głowie gruczołu i naciekającego na dwunastnicę u 56-letniego mężczyzny. Podczas operacji wycięcia głowy trzustki wraz z przylegającym odcinkiem dwunastnicy zaobserwowano przerzuty w okołotrzustkowym węźle chłonnym. Komórki Panc-1 dzielą się co ok. 30 godzin.

MiaPaCa-2 - linia komórkowa wyizolowana w 1975 roku przez Yunisa i wsp. z raka trzustki od 65 letniego mężczyzny pochodzenia kaukaskiego odczuwającego ból brzucha przez 6 miesięcy przed zdiagnozowaniem nowotworu. Czas podziału komórek: 20 godzin.

BxPC-3 - linia komórkowa wyizolowana z gruczolakoraka trzustki u 61 letniej kobiety. Pacjentka zmarła 6 miesięcy po operacji, pomimo zastosowania radioterapii w połączeniu z chemioterapią. Nowotwór nie wykazał przerzutów. Guzy wyhodowane u nagich myszy, wykazują podobieństwo do pierwotnych nowotworów diagnozowanych u pacjentów i produkują antygen rakowy, antygeny związane z rakiem trzustki i śladowe ilości mucyny 8. Czas podziału komórek w hodowli *in vitro* wynosił ok. 30 godzin.

AsPC-1 - linia komórkowa została wyizolowana od 62-letniej kobiety z rakiem w głowie trzustki i przerzutami do kilku narządów w jamie brzusznej. Pacjentka zmarła dwa tygodnie później pomimo zastosowania radioterapii w połączeniu z chemioterapią. Czas podziału komórek to ok. 24 godziny.

Tabela 11. Podłoże molekularne i charakterystyka użytych do badań linii komórkowych raka trzustki. Na podstawie [Deer i wsp., 2010, Ulrich i wsp., 2002].

Linia komórkowa	KRAS	p16	Smad4	p53	wrażliwość na gemcytabinę	inwazyjność	pochodzenie: nabłonkowe (N), mezenchymalne (M)
Panc-1	Mt	Mt	Wt	Mt	oporny	+++	M
MiaPaca-2	Mt	Mt	Wt	Mt	wrażliwy	+	M
AsPC-1	Mt	Wt*	Wt*	Mt	oporny	+	M
BxPC-3	Wt	Wt	Mt	Mt	wrażliwy	++	N

* Dane na temat statusu genów p26 oraz Smad4 w komórkach AsPC-1 są niejednoznaczne. **Mt**- mutacja genu. **Wt**- typ dziki.

Wszystkie linie komórkowe na których prowadziłam badania zostały zakupione z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC, ang. *The American Type Culture Collection*). Dostępne w kolekcji linie przechodzą testy jakościowe oraz procedury identyfikacyjne, co jest gwarancją ich czystości, autentyczności oraz wysokiej jakości.

6.2. Stosowana aparatura

- Aparat do transferu białek – SCIE PLAS, Wielka Brytania.
- Inkubator do prowadzenia hodowli komórek NUAIRE IR Autoflow CO₂, Water-Jacked, model NU-8700 - NuAire (Plymouth, MN, USA).
- Komora z przepływem laminarnym umożliwiającą pracę w sterylnych warunkach: NUAIRE Biological Safety Cabinets, model NO.NU-425-400E - NuAire (Plymouth, MN, USA).
- Licznik komórek Z1 Coulter* Particle Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).
- Mikroskop fluorescencyjny OLYMPUS BX 60, lampa OLYMPUS U-RFL-T (Olympus, Japonia).
- Mikroskop świetlny: Carl Zeiss TELAVAL 3 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy).
- Czytnik płytek: iMark™, Microplate Reader (BIO-RAD, USA).
- Aparat do czyszczenia wody Milli-Q® Integral Water Purification System (Millipore, Billerica, MA, USA).
- Cytometr przepływowy Accuri C6™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA).
- Cytometr przepływowy: FaCS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lake, NY, USA).
- Palnik z elektronicznym sterowaniem: Fireboy Plus (IBS Integra Biosciences).
- Wagi: analityczna - PRLT A14 (Polska), laboratoryjna -KERNEG 220-3NM.
- Vortex: Yellow Line TTS 2 (IKA, Staufen, Niemcy).
- Wirówki: Eppendorf Centrifuge, model 5810R oraz 5417R (Eppendorf, Westbury, NY, USA).
- Wytrząsarka orbitalna, RotoMix Type 50800, Thermolyne (Barnstead International, Dubuque, IA, USA).
- Cytowirówka: Cytofuge 2, Cytocentrifuge, Stat Spin, (IRIS Company, USA).
- Lodówki i zamrażarki (Electrolux).
- Łaźnia wodna: Jouan (St. Herblain, Francja).
- Ciepłarka 37°C.
- Termoblok Grant (Grant Instruments Ltd., Wielka Brytania).
- Wytwornica lodu (Ziegra Eismaschinen, Niemcy).
- Zestaw do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).
- Chromatograf HPLC „Millennium” (Waters Co., Milford, Massachusetts, USA):

- inżektor (Rheodyne 7725i);
- detektor wielodiodowy 996;
- system kontrolny 600E.
- Kolumny chromatograficzne, typu RP (SUPELCO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA):
 - kolumna analityczna – Suplex pKb-100, 25 cm x 4,6 mM, 5 μ m;
 - prekolumna – Suplex pKb-100, 2 cm.
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).
- pH-metr ORION, model 710A (Orion, USA).
- LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Szwajcaria).
- Łażnia ultradźwiękowa Badelin Sonorex, RK52 (Bandelin Electronic, Berlin, Niemcy).

6.3. Metody doświadczalne

6.3.1. Hodowla komórkowa

Komórki wszystkich badanych przeze mnie linii raka trzustki rosły w postaci monowarstwy. Ich hodowlę prowadziłam w inkubatorze firmy NUAIRE, zapewniającym w mieszaninie gazowej wypełniającej inkubator dostępność tlenu, 5 % CO₂, temperaturę 37°C, a także 95 % wilgotność. Komórki hodowałam w odpowiednich pożywkach z dodatkiem 10 % płodowej surowicy bydlęcej i antybiotyków: penicyliny (100 unit/ml) i streptomycyny (100 μ g/ml). Pożywkę w której hodowałam komórki linii MiaPaCa-2 dodatkowo wzbogacałam 5 % surowicy końskiej.

6.3.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748- płytka 96 dołkowa

Efektywne stężenia badanych związków wyznaczałam metodą z zastosowaniem barwnika SRB. Zawiesinę komórek będących w fazie logarytmicznego wzrostu wysiewałam na płytce 96-dołkowe w ilości zależnej od czasu podziału badanej linii komórkowej (tabela 12). Objętość końcowa w studzience wynosiła 200 μ l. Po 24 godzinnej preinkubacji, której celem było przyklejenie komórek do naczynia hodowlanego, do każdej studzienki z wyjątkiem kontroli dodawałam roztwory związków o różnych stężeniach (w ilości 2 μ l). Do studzienek kontrolnych dodawałam 2 μ l 50 % etanolu. Serię rozcieńczeń związku przygotowywałam tak, aby osiągnąć stężenia końcowe w komórkach w zakresie: od 0,0001 μ M do 10 μ M. Po 72 godzinach inkubacji ze związkiem, do każdej studzienki dodawałam 50 μ l zimnego, 50 % roztworu TCA i inkubowałam płytke przez godzinę w lodówce. Następnie studzienki pięciokrotnie płukałam pod bieżącą wodą i pozostawiałam płytkę do wyschnięcia. Po wyschnięciu do każdej studzienki dodawałam po 50 μ l 0,4 % roztworu sulforodaminy B w 1 % kwasie octowym i pozostawiałam na 30 min na orbitalnej wytrząsarce. Następnie płytke

płukałam czterokrotnie roztworem 1% kwasu octowego, pozostawiałam do wyschnięcia i dodawałam 150 μ l roztworu 10 mM Trizma-base. Po 5 minutowym wytrząsaniu płytek odczytywałam wyniki za pomocą czytnika płytek przy długości fali 515 nm. Średnią absorbancję w studzienkach kontrolnych uznałam jako 100% żywych komórek. Pozostałe absorbancje w danych studzienkach potraktowałam jako wprost proporcjonalne do wartości kontrolnej. Eksperyment powtórzyłam trzykrotnie dla każdej linii, a wyniki przedstawiłam jako średnia z trzech zliczeń z uwzględnieniem odchylenia standardowego.

Tabela 12. Liczba komórek wysiewanych na studzienkę płytki 96 dołkowej, w zależności od linii komórkowej.

Linia komórkowa	Liczba komórek wysiewanych na studzienkę (płytki 96 dołkowa)
Panc-1, MiaPaCa-2, AsPC-1	4 tys.
BxPC-3	4,5 tys.

6.3.3. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnej C-1748 - płytki 24 dołkowa

Zawiesinę komórek w fazie logarytmicznego wzrostu wysiewałam na płytkę 24-dołkową w ilości zależnej od badanej linii komórkowej (20 tys. komórek/studz. w przypadku komórek MiaPaCa-2 i AsPC-1 oraz 25 tys. komórek/studz. dla komórek linii BxPC-3 i Panc-1). Końcowa objętość zawiesiny w pojedynczej studzience wynosiła 2 ml. Po 24 godzinnej inkubacji, której celem było przyklejenie komórek do podłoża, do każdej studzienki z wyjątkiem kontroli dodawałam roztwory związku C-1748:

- W przypadku badania procesu autofagii dodawałam C-1748 o trzech różnych stężeniach (0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,25 μ M) oraz roztwory inhibitorów autofagii (wortmanina - 2 μ M, chlorochina – 20 μ M) i prowadziłam inkubację przez 24 lub 48 godzin.
- W przypadku badania cytotoksyczności związku wobec komórek AsPC-1 z nadekspresją CPR lub CYP3A4, dodawałam C-1748 w stężeniu równym 0,25 μ M i prowadziłam inkubację przez 48 godzin.

Do studzienek kontrolnych dodawałam 50 % roztwór etanolu. Następnie, odpowiednio po 24 lub 48 godzinnej inkubacji ze związkiem i inhibitorami, dodawałam 500 μ l zimnego, 50 % roztworu TCA i inkubowałam płytki przez godzinę w lodówce. W kolejnym etapie, pięciokrotnie płukałam studzienki pod bieżącą wodą i pozostawiałam płytkę do wyschnięcia. Po wyschnięciu do każdej studzienki dodawałam po 500 μ l 4 % roztworu sulforodaminy B i pozostawiałam na 30 min. na orbitalnej wytrząsarce. Następnie płytki płukałam roztworem 1% kwasu octowego, pozostawiałam do wyschnięcia i dodawałam 1500 μ l roztworu Trizma-base. Po 5 minutowym wytrząsaniu płytek odczytywałam wyniki za pomocą czytnika płytek

przy długości fali 515nm. Badania dla każdej linii powtórzyłam trzykrotnie, a wyniki zostały przedstawione jako średnia z uwzględnieniem odchylenia standardowego.

6.3.4. Cytometryczna analiza dystrybucji komórek w cyklu życiowym

Analizę dystrybucji komórek w cyklu życiowym przeprowadziłam za pomocą metody pozwalającej na określenie zawartości DNA w komórkach barwionych jodkiem propidyny (PI), który stechiometrycznie wiąże się z kwasami nukleinowymi. Analizy dokonywałam przy użyciu cytometru przepływowego Acuri C6 firmy BD.

Pierwszym etapem eksperymentu było wysianie zawiesiny komórek na płytce Petriego (10 ml) w ilości zależnej od czasu inkubacji ze związkiem: $1,2 \times 10^6$ komórek dla kontroli (bez dodatku związku), $1,0 \times 10^6$ dla czasów 24, 48, 72 godzin oraz $0,8 \times 10^6$ dla dłuższych czasów, czyli: 96, 120, 144, 168, 192 godzin. Następnie, komórki inkubowałam przez 24 godziny w celu przyklejenia ich do naczynia hodowlanego i po tym czasie dodawałam 100 μ l związku o stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} . Po określonych czasach inkubacji zlewałam pożywkę z komórek, przepłukiwałam je roztworem PBS w celu usunięcia resztek pożywki, oraz odklejałam od podłoża przy użyciu trypsyny (1,5 ml na płytkę). Tak przygotowane komórki wirowałam wraz z pożywką w warunkach: 1000 rpm, 5 minut, 4°C, a uzyskane po wirowaniu pelety komórek płukałam zimnym roztworem PBS i ponownie wirowałam w tych samych warunkach. Czynności te powtarzałam dwukrotnie. Po usunięciu supernatantu komórki zawieszałam w 5 ml zimnego, 80 % alkoholu etylowego w celu ich utrwalenia (m.in zachowania zdegradowanego DNA w komórce) i przechowywałam w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

W dniu planowanej analizy cytometrycznej utrwalone zawiesiny komórkowe wirowałam (2000 rpm, 5 minut, 4°C), pelety komórkowe uzyskane po wirowaniu płukałam zimnym PBS-em i ponownie wirowałam powtarzając czynność dwukrotnie. Następnie po odessaniu supernatantu barwiłam komórki gotowym roztworem barwiącym PI/RNase Staining Buffer firmy BD przez 15 minut w temp. pokojowej bez dostępu światła. Po upływie 15 minut inkubacji komórki przenosiłam do probówek cytometrycznych i analizowałam za pomocą cytometru przepływowego. Długość fali wzbudzenia i emisji dla jodku propidyny wynosiła odpowiednio 488 nm i 617 nm. Z każdej próbki cytometr pobierał do analizy 10 000 komórek i analizował w kanale fluorescencji FL-2. Eksperyment powtórzyłam trzykrotnie dla każdej linii komórkowej, a otrzymane histogramy analizowałam za pomocą programu Accuri C6 Software firmy BD.

6.3.5. Obserwacje mikroskopowe zmian w morfologii jąder komórkowych

Zawiesinę komórek wysiewałam na 100 mm płytce Petriego w ilości $0,5 \times 10^6$ na 10 ml pożywki i poddawałam 24 godzinnej preinkubacji. Następnie do każdej płytki dodawałam

badany związek w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} (zależność od czasu inkubacji), lub odpowiednio: 0,1 μM i 0,5 μM (zależność od dawki). W przypadku oznaczania zmian w morfologii jąder komórkowych w komórkach poddanych działaniu C-1748 w kombinacji z inhibitorami autofagii, dodawałam odpowiednio 100 μl C-1748 o stężeniach: 0,05 μM , 0,1 μM , 0,25 μM oraz roztwory inhibitorów autofagii (stężenia końcowe w komórkach: wortmanina - 2 μM , chlorochina – 20 μM). Po upływie określonego czasu inkubacji pożywkę przenosiłam do probówki typu falkon, a komórki odklejałam od podłoża przy użyciu trypsyny i pozostawiałam w 37°C przez około 3-5 minut. Następnie komórki wirowałam i przepłukiwałam dwukrotnie zimnym roztworem PBS (1000obr./min, 5 min., 4°C). Supernatant odsysałam przy użyciu pompki próżniowej, a komórki zawieszałam w 1,5 ml roztworu PBS i po dokładnym rozpipetowaniu, 200 μl zawiesiny komórkowej nawirowywałam na szkiełko podstawowe przy użyciu cytowirówki w warunkach: 600 obr./min., 4 min., temp. pokojowa. Nawirowane na szkiełko podstawowe komórki utrwalalam za pomocą roztworu Carnoy'a (99,5% metanol: kwas octowy, 3:1) przez 15 minut. Następnie preparaty płukałam przez 5 minut w roztworze PBS, suszyłam szkiełka i barwiłam przez 7 minut w ciemności za pomocą wodnego roztworu DAPI (o stężeniu końcowym 0,1 $\mu\text{g/ml}$ H_2O). Po tym czasie komórki przemywałam roztworem PBS, na warstwę komórek nanosiłam 10 μl buforu do zamykania preparatów i przykrywałam szkiełkiem nakrywkowym. Boki szkiełka zamalowywałam lakierem, by zapobiec wypłynięciu buforu. Tak przygotowane preparaty oglądałam za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego firmy OLYMPUS BX60 przy długości fali 450 nm i fotografowałam przy powiększeniu 10, 20 i 40x. Fotografie preparatów wykonałam przy użyciu kamery, wykorzystując oprogramowanie Studio Lite.

6.3.6. Cytometryczna analiza aktywności kaspazy-3

Eksperyment rozpoczynałam od wysiania odpowiedniej ilości zawiesiny komórek na płytce Petriego (10 ml). Dla kontroli i krótszych czasów inkubacji wysiewałam po 1×10^6 komórek. Dla dłuższych $0,7 \times 10^6$ komórek. Po 24 godzinnej inkubacji do zawiesiny komórek dodawałam 100 μl związku C-1748 o stężeniu odpowiadającym wartości IC_{80} . W przypadku oznaczania aktywności kaspazy-3 w komórkach poddanych działaniu C-1748 w kombinacji z inhibitorami autofagii, dodawałam odpowiednio 100 μl C-1748 (stężenia końcowe w komórkach: 0,05 μM , 0,1 μM , 0,25 μM) oraz 100 μl wortmaniny (stężenie końcowe w komórkach: 2 μM). Badaniach aktywacji kaspazy-3 w komórkach z nadekspresją CPR lub CYP3A4 prowadziłam na płytce 6 – dołkowej i dodawałam 30 μl C-1748 (stężenie końcowe C-1748 równe 0,25 μM). Następnie komórki inkubowałam przez określony czas, a po jego upływie przystępowałam do obróbki przed analizą cytometryczną. W tym celu musiałam

odkleić komórki za pomocą trypsyny (1,5 ml na płytkę) i policzyć je używając licznika komórek.

Do kolejnego etapu potrzebowałam 1 mln komórek i po wyliczeniu odpowiedniej objętości zawiesiny komórek jaką należało pobrać do dalszych analiz, przenosiłam ją do probówek typu falkon i dopełniłam roztworem PBS do tej samej objętości. Następnie zawiesinę komórek wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C), uzyskane pelety płukałam roztworem PBS i ponownie wirowałam powtarzając czynność dwukrotnie. Po wirowaniu odessałam supernatant, zawiesiłam pelet w 0,5 ml buforu Cytotfix/Cytoperm™ i inkubowałam przez 20 minut w lodzie. Po upływie wskazanego czasu komórki ponownie wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C), odsysałam supernatant i płukałam pelety 0,5 ml roztworu Perm/Wash™ w celu usunięcia pozostałości roztworu utrwalającego i permeabilizującego, dwukrotnie wirując w warunkach: 1000 rpm, 5 minut, 4°C. Po odessaniu supernatantu dodawałam 120 µl mieszaniny (100 µl roztworu Perm/Wash™ + 20 µl roztworu przeciwciała króliczego skoniugowanego z fluoresceiną) i następnie inkubowałam przez 30 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Po upływie czasu inkubacji próbki wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C) oraz płukałam roztworem Perm/Wash™ w celu usunięcia nieskoniugowanego przeciwciała i ponownie wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C). Na koniec pelety komórkowe zawieszam w 0,5 ml roztworu Perm/Wash™ i tak przygotowane komórki analizowałam w cytometrze przepływowym Acuri C6. Z każdej próbki cytometr pobierał do analizy 10 000 komórek i analizował w kanale fluorescencji FL-1. Pomiar intensywności fluorescencji emitowanej przez fikoerytrynę skoniugowaną z króliczym przeciwciałem poliklonalnym rozpoznającym odcinek aktywnej kaspazy-3 prowadziłam przy fali wzbudzenia $\lambda = 488$ nm. Eksperyment powtórzyłam trzykrotnie a otrzymane histogramy analizowałam za pomocą oprogramowania Accuri C6 Software firmy BD.

6.3.7. Badanie zmian ilości komórek nowotworowych z pofragmentowanym PARP

Obecność pofragmentowanego substratu dla kaspaz, białka PARP badałam przy wykorzystaniu techniki cytometrii przepływowej. Zawiesinę komórek wysiewałam na 100 mm płytki Petriego w ilości $1,5 \times 10^6$ komórek i po wstępnej preinkubacji dodawałam pochodną C-1748 w stężeniach: 0,05 µM, 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM i poddawałam 24 godzinnej inkubacji ze związkiem. Po upływie wskazanego czasu, komórki płukałam dwukrotnie zimnym roztworem PBS poprzez wirowanie (1000 rpm, 5 minut, 4°C) i utrwalałam w 0,5 ml buforu Cytotfix/Cytoperm™ (4% formaldehyd z dodatkiem saponiny) umieszczając próbki na 30 minut w lodzie. Następnie komórki płukałam dwukrotnie buforem Perm/Wash™ (FBS, NaN₃, saponina, 1000 rpm, 5 minut, 4°C) i zawieszałam w 120 µl tego buforu, dodając jednocześnie 20 µl przeciwciała anty-cleaved PARP związanego z fluoresceiną. Tak

przygotowane próbki inkubowałam przez 30 minut w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła. Po zakończonej inkubacji, komórki ponownie płukałam dwukrotnie buforem Perm/Wash™ i za pomocą cytometru przepływowego mierzyłam intensywność fluorescencji emitowanej przez fluoresceinę, skoniugowaną z przeciwciałem anty-cleaved PARP. Uzyskane cytogramy analizowałam wykorzystując oprogramowanie Accuri C6 Software firmy BD.

6.3.8. Badanie zmian w budowie błony komórkowej- test Aneksyna V/PI

Zawiesinę komórek wysiewałam na 100 mm płytki Petriego w ilości 1×10^6 komórek dla kontroli i 24 godzin inkubacji na 10 ml pożywki i inkubowałam ze związkiem C-1748 o stężeniach: 0,05 μM , 0,1 μM i 0,25 μM . Po inkubacji, do dalszych badań pobierałam 1×10^6 komórek i wirowałam przy 1000 obr./min, przez 5 min. w 4°C. Po kolejnych dwóch wirowaniach i przepłukiwaniu peletu komórek roztworem PBS, za pomocą pompki próżniowej odsysałam supernatant, a do peletu dodawałam po 50 μl roztworu barwiącego z zestawu firmy Becton Dickinson (5 μl FITC Annexin V, 5 μl PI, 100 μl Binding Buffer) i inkubowałam przez 15 minut bez dostępu światła. Po inkubacji do wszystkich próbek dodawałam 400 μl roztworu Binding Buffer i tak przygotowane próbki poddawałam analizie cytometrycznej. Pomiar intensywności fluorescencji emitowanej przez fluoresceinę skoniugowaną z Aneksyną V (fluorescencja zielona, długość fali emisji 518 nm) oraz jodku propidyny (fluorescencja pomarańczowa, długość fali emisji 617 nm) prowadziłam przy fali wzbudzenia o długości 488 nm. Każdorazowo analizie poddawałam 10 000 komórek. Uzyskane cytogramy obrazujące zmiany w asymetrii i integralności błony komórkowej analizowałam wykorzystując oprogramowanie Accuri C6 Software firmy BD.

6.3.9. Mikroskopowe obserwacje indukcji przyspieszonego starzenia komórkowego

Badanie indukcji procesu starzenia komórkowego pod wpływem pochodnej C-1748 przeprowadziłam z zastosowaniem enzymu X-Gal będącego 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozydem, który łączy się z kwaśną β -galaktozydazą - markerem procesu starzenia komórkowego w pH równym 6,0. Pierwszym etapem eksperymentu było wysianie $0,5 \times 10^6$ komórek na 50 mm płytki Petriego i umieszczenie w każdej płytce sterylnego szkiełka nakrywkowego. Po 24 godzinnej preinkubacji dodawałam po 50 μl związku o stężeniu odpowiadającemu wartości IC_{80} i inkubowałam komórki przez określone czasy. Po upływie określonego czasu inkubacji usuwałam pożywkę z nad komórek i przemywałam je trzykrotnie roztworem PBS o pH 7,2. Następnie dodawałam roztwór utrwalający (Fixative Solution: 0,5 ml aldehydu glutarowego + 0,5 ml formaldehydu + 4ml PBS o pH 7,2 na jedną próbkę) i pozostawiłam na 5 minut w temp. pokojowej. W kolejnym

etapie szkiełka nakrywkowe pokryte komórkami przenosiłam do 20 mm płytek Petriego, przemywałam je dwukrotnie roztworem PBS o pH 6,0 i dodawałam 2 ml mieszaniny Staining Solution (5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄) zawierającej X-Gal o stężeniu końcowym 1 mg/ml (1,8 ml Staining Solution + 0,2 ml X-Gal o stężeniu 10mg/ml). Po 16 godzinach inkubacji komórek w temp. 37°C, w inkubatorze nie zawierającym CO₂, przepłukiwałam je dwukrotnie 2 ml roztworu PBS o pH 6,0, tak przygotowane szkiełka nakrywkowe przenosiłam na szkiełka podstawowe i dokonywałam obserwacji za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS BX 60 pod powiększeniem 20x oglądając płytki w świetle widzialnym. Zdjęcia komórek wykonywałam za pomocą kamery oraz stosując oprogramowanie Studio Lite (Pixera Corporation, Los Gatos, CA, USA).

6.3.10. Mikroskopowa analiza zmian w ilości kwaśnych organelli

Zawiesinę komórek wysiewałam na 50 mm płytki Petriego w ilości $0,4 \times 10^6$ na 5 ml pożywki i poddawałam 24 godzinnej preinkubacji. Następnie do każdej płytki dodawałam pochodną C-1748 w stężeniach: 0,05 μ M, 0,1 μ M i 0,25 μ M na określony czas. Po zakończeniu inkubacji ze związkami do każdej z płytek dodawałam oranż akrydyny (stężenie końcowe 0,5 μ g/ml) i barwiłam komórki przez 15 minut w 37°C bez dostępu światła. W kolejnym etapie komórki odklejałam za pomocą trypsyny, wirowałam, płukałam dwukrotnie PBSem (1000 obr./min, 5min., 4°C) i nanosiłam zawiesinę komórek na mikroskopowe szkiełka podstawowe przy użyciu cytowirówki (600 rpm, 4min.). Przygotowane w ten sposób preparaty analizowałam za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS BX60, przy powiększeniu 20x, 40x. Fotografie preparatów wykonywałam przy użyciu kamery, korzystając z oprogramowania Studio Lite.

6.3.11. Mikroskopowa analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$

Zawiesinę komórek wysiewałam na 50 mm płytki Petriego w ilości $0,5 \times 10^6$ i poddawałam 24 godzinnej preinkubacji. Następnie dodawałam do komórek pochodną C-1748 w trzech różnych stężeniach: 0,05 μ M, 0,1 μ M i 0,25 μ M oraz wortmaninę (stężenie końcowe w komórkach: 2 μ M) i inkubowałam komórki przez 24 godziny. Badania zmian potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ w komórkach AsPC-1 z nadekspresją CPR lub CYP3A4 prowadziłam na płytce 6 – dołkowej i dodawałam 30 μ l C-1748 (stężenie końcowe C-1748 równe 0,25 μ M). Po zakończonej inkubacji komórki płukałam zimnym roztworem PBS i traktowałam trypsyną w celu odklejenia ich od płytki Petriego. W tym samym czasie przygotowywałam mieszaninę pożywki i barwnika JC-1 i inkubowałam ją przez 15 min w

ciemności, w temp. 37°C. Po 15 min. inkubacji, mieszaninę barwnika z pożywką dodawałam do odklejonych komórek i całość inkubowałam ponownie przez 10 min. w tym samych warunkach eksperymentalnych. Następnie wybarwioną zawiesinę komórek wirowałam i płukałam dwukrotnie roztworem PBS ponownie wirując (1000 rpm, 5 minut, 4°C). Po zwirowaniu, 200 µl zawiesiny wybarwionych komórek nawirowywałam na szkiełka podstawowe przy użyciu cytowirówki i tak przygotowane preparaty oglądałam przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Długość fali emisji dla agregatów JC-1 obecnych w zdrowych komórkach wynosiła 590 nm. W komórkach apoptotycznych, długość fali emisji monomerów JC-1 wynosiła 530 nm.

6.3.12. Mikroskopowa i cytometryczna analiza poziomu kropli tłuszczowych

Zawiesinę komórek wysiewałam w ilości $0,5 \times 10^6$ na 50 mm płytki Petriego i po 24 godzinnej preinkubacji inkubowałam przez 24 lub 48 godzin z pochodną C-1748 o stężeniu 0,05 µM, 0,1 µM i 0,25 µM, w obecności lub bez inhibitorów autofagii (stężenia końcowe w komórkach: wortmanina - 2 µM, chlorochina – 20 µM). Następnie komórki płukałam dwukrotnie roztworem PBS (komórki przeznaczone do analizy cytometrycznej były płukane przez odwirowanie: 1000 rpm, 5 minut, 4°C). Następnie komórki utrzymywałam przez 10 min. w temperaturze pokojowej, w 4 % formaldehydzie i ponownie płukałam roztworem PBS. W kolejnym etapie dodawałam roztwór Czerwieni Nilu (stężenie końcowe 1 µg/ml) i inkubowałam próbki przez 15 min. w ciemności, w temp. pokojowej. Po inkubacji, ponownie płukałam roztworem PBS i próbki przeznaczone do obserwacji mikroskopowej nawirowywałam na szkiełka podstawowe, natomiast próbki do analizy cytometrycznej, przenosiłam bezpośrednio do probówek cytometrycznych i analizowałam na cytometrze przepływowym. Długość fali wzbudzenia dla Czerwieni Nilu to 450-500 nm, długość fali emisji: 528 nm.

6.3.13. Analiza poziomu białek metodą western blotting

- Przygotowanie lizatów komórkowych

Zawiesinę komórek wysiewałam na 100 mm płytki Petriego ($1,5 \times 10^6$ komórek na płytkę) i inkubowałam z pochodną C-1748 (stężenia związku: 0,05 µM, 0,1 µM i 0,25 µM) w obecności, lub bez inhibitorów autofagii (stężenia końcowe inhibitorów w komórkach: wortmanina - 2 µM, chlorochina – 20 µM) przez 24 lub 48 godzin. Po zakończonej inkubacji zawiesinę komórkową wirowałam (1000 rpm, 5 min., 4°C), dwukrotnie przemywałam zimnym roztworem PBS i znów wirowałam (1000 rpm, 5 min., 4°C). Otrzymany osad komórek zawieszalam w buforze lizującym (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Igepal CA-

630, 0.5% deoksycholan sodu, 50 mM Tris-HCl pH=8.0), zawierającym dodatkowo inhibitory fosfataz (50 mM NaF, 1mM PMSF, 1 mM ortowanadan sodu, 50 mM aldehyd β fosfoglicerynowy) oraz inhibitory proteaz (Protease Inhibitor Cocktail Set III). Lizę komórek prowadziłam przez 30 minut w temperaturze 4°C. Następnie zawiesinę komórkową wirowałam (13 000 rpm, 15 min., 4°C), a otrzymany supernatant przechowywałam w temperaturze – 80°C do czasu kolejnych badań. Przed analizą western blotting oznaczałam stężenie białka metodą Bradford, stosując w tym celu zestaw Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories).

- Elektroforeza SDS-PAGE

Próbki zawierające odpowiednią ilość białka całkowitego (35 μ g białka) łączyłam z równą objętością buforu Laemmli (62.5 mM Tris-HCl pH=6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 0.01% błękit bromofenolowy), denaturowałam przez 7 minut w temperaturze 95°C i poddawałam elektroforezie w żelu poliakrylamidowym (5% żel zagęszczający; 12% żel rozdzielający). Elektroforezę prowadziłam przez 15 minut przy 90 V, a następnie przez 120 minut przy 120 V w buforze zawierającym 25 mM Tris-Base o pH=8.3, 192 mM glicyny i 0.1% SDS.

- Immunobarwienie (Immunoblotting)

Po zakończeniu elektroforezy, przeprowadziłam transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową, wykorzystując w tym celu metodę tzw. elektrotransferu półsuchego. Transfer białek, po uprzednim nasączeniu żelu, membrany oraz bibuły w buforze zawierającym 25 mM Tris-Base o pH=8.3, 192 mM glicyny, 20% metanolu, prowadziłam przez 40 minut przy stałym natężeniu prądu 8 mA/cm². Po zakończonym transferze, potencjalne miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał blokowałam poprzez umieszczenie membrany w buforze blokującym (50 mM Tris-HCl o pH=7.5, 120 mM NaCl, 5% (w/v) odtłuszczonego mleka w proszku) na dwie godziny w temperaturze pokojowej. Następnie, membranę płukałam trzykrotnie po 15 minut w buforze TBST (150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 10 mM Tris-HCl o pH=7.4) i inkubowałam z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym, zawieszonym w buforze TBST z dodatkiem 0.5% (w/v) odtłuszczonego mleka w proszku lub 0.5% (w/v) BSA przez noc w temperaturze 4°C. Po kolejnym płukaniu w TBST (3 x 15 minut), inkubowałam membranę w buforze TBST z dodatkiem 0.5% (w/v) odtłuszczonego mleka w proszku, zawierającym odpowiednie przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową. Inkubację prowadziłam przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Detekcję białek na błonie przeprowadziłam wykorzystując substrat luminescencyjny dla peroksydazy chrzanowej (zestaw ECL) po odpowiednim czasie

ekspozycji kliszy fotograficznej ECL Hyperfilm (Kodak, Polska). Równomierne napełnienie studzienek sprawdziłam oznaczając poziom aktywności.

6.3.14. Przejściowa transfekcja komórek AsPC-1 plazmidami CPR i CYP3A4

Transfekcji komórek nowotworowych trzustki AsPC-1 plazmidami CPR i CYP3A4 dokonałam przy użyciu lipofektaminy 2000. W pierwszym etapie transfekcji, zawiesinę komórek w ilości $0,75 \times 10^6$ wysiewałam na płytkę 6 dołkową i poddałam 24 godzinnej preinkubacji. Następnie przygotowałam roztwory lipofektaminy (8 μ l) w pożywce Opti-Mem i roztwory plazmidu (stężenia plazmidu: 0,5 μ g, 2 μ g, 4 μ g, 8 μ g oraz 10 μ g) w pożywce Opti-Mem. Przygotowane mieszaniny inkubowałam przez 5 min. w temp. pokojowej. W czasie inkubacji, zmieniałam pożywkę w studzienkach płytki 6 dołkowej na pożywkę Opti-Mem. Następnie łączyłam kompleksy lipofektamina-Opti-Mem i DNA-Opti-Mem i inkubowałam przez 20 min. w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji, dodawałam kompleks DNA-lipofektamina do komórek i inkubowałam w 37°C przez 6 godzin. Po 6 godzinach, zmieniałam pożywkę na świeżą, przeznaczoną dla danej linii komórkowej, wzbogaconą o 20 % FBS i prowadziłam dalszą 24 godzinną inkubację transfekowanych komórek. Tak przygotowane komórki wykorzystywałam w dalszych eksperymentach poddając je działaniu pochodnej C-1748 lub prowadząc badania na komórkach transfekowanych, nietraktowanych związkiem.

6.3.15. Badanie metabolizmu pochodnej C-1748 w komórkach AsPC-1 z nadekspresją enzymów CPR i CYP3A4 z zastosowaniem techniki HPLC

Przemiany metaboliczne pochodnej C-1748 zbadałam w komórkach AsPC-1 typu dzikiego i poddanych transfekcji plazmidami CPR i CYP3A4. Komórki AsPC-1 wysiewałam w ilości $0,75 \times 10^6$ komórek na studzienkę płytki 6- dołkowej i przeprowadzałam przejściową transfekcję wybranymi plazmidami. Po upływie 48 godzin od transfekcji, dodawałam związek o stężeniu końcowym wynoszącym 50 μ M i prowadziłam inkubację przez 1, 3, 6 i 24 godziny. Zastosowanie tak wysokiego stężenia C-1748 było konieczne aby obserwować powstające produkty metabolizmu związku. Równocześnie przygotowywałam próbkę kontrolną stanowiącą komórki nietraktowane związkiem. Po zakończonej inkubacji komórki zbierałam z płytek za pomocą „scrapera”, a otrzymaną zawiesinę komórkową wirowałam (1000 rpm, 5 min., 4°C), przemywałam zimnym roztworem PBS i ponownie wirowałam (1000 rpm, 5 min., 4°C). Pożywkę hodowlaną zebraną z komórek pozostawiałam do dalszej analizy. Po wirowaniu osad komórek zawieszałam w 200 μ l 60% roztworu metanolu, poddawałam sonifikacji (150W, 15 min., w lodzie) i odstawiałam do lodu na około 1 godzinę. Następnie

zawiesinę komórek oraz zebraną pożywkę wirowałam (14 000 rpm, 15 min., 4°C). Otrzymane supernatanty poddawałam analizie techniką RP-HPLC z zastosowaniem chromatografu firmy Waters z udziałem detektora absorbancji Dual λ Absorbance Detector. Stasowaną fazą ruchomą w analizie HPLC był mrówczan amonu – metanol, której skład podałam w tabeli nr 13.

Warunki analizy chromatograficznej:

Skład otrzymywanych mieszanin reakcyjnych analizowałam metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, RP-HPLC. Rozpatrywałam czasy retencji pików i substratów reakcji. Każdą analizę przeprowadzałam co najmniej dwukrotnie.

Tabela 13. Zmiany składu fazy ruchomej zastosowane w analizach chromatograficznych.

Czas (min)	Przepływ (ml/min)	Skład fazy ruchomej [%]		Krzywa zmian
		A	B	
-	1	85	15	-
25	1	20	80	6
28	1	0	100	6
30	1	85	15	6
40	1	85	15	11

Fazę ruchomą stanowiły:

A: bufor mrówczanowy o stężeniu 0,05 M, pH~3,4 (3,15 g HCOONH₄/l H₂O, pH stabilizowano 88 – 91% kwasem mrówkowym) z 5% dodatkiem alkoholu metylowego o czystości HPLC.

B: alkohol metylowy o czystości HPLC z 5% dodatkiem H₂O.

6.3.16. Badanie poziomu ekspresji genów metodą Real-time PCR

- Izolacja RNA

Komórki AsPC-1 wysiałam w ilości 0,75 x 10⁶ na studzienkę płytki 6- dołkowej, przeprowadzałam przejściową transfekcję plazmidami CPR i CYP3A4 i po 48 godzinnej post-inkubacji izolowałam całkowite RNA komórek AsPC-1 typu dzikiego i transfekowanych. W tym celu komórki przemywałam dwukrotnie zimnym buforem PBS (1000 rpm, 5 min., 4°C) i przeprowadzałam izolację RNA według instrukcji zawartej w zestawie High Pure Isolation Kit (Roche Diagnostics). Komórki zawieszałam w 200 μ l buforu PBS, dodawałam 400 μ l buforu lizującego i lizowałam komórki przez 15 s. Tak przygotowane lizaty komórkowe nanosiłam na kolumny i wirowałam (15 s, 8 000 x g). Następnie na kolumny nanosiłam roztwór DNazy w celu eliminacji z próbek zawartego DNA i inkubowałam przez 15 min w temp. pokojowej. W kolejnych etapach płukałam kolumnę roztworami Wash Buffer I (raz po 500 μ l) i Wash Buffer II (2 razy po 500 i 200 μ l) za każdym razem wirując (2 x 15s, 8 000 x g; 1 x 2 minuty, 13 000 x g). Na koniec przeprowadziłam elucję RNA poprzez dodanie na złożo

kolumny 50 μ l buforu do elucji (Elution Buffer). Ilość wyizolowanego RNA i jego czystość określiłam z zastosowaniem NanoDrop 2000 a wyizolowane RNA przechowywałam w temp. -80 °C do czasu dalszych analiz.

- Synteza cDNA

Syntezę cDNA przeprowadziłam na matrycy otrzymanego RNA. Całą procedurę wykonałam w komorze laminarnej, w lodzie, według protokołu dołączonego do zestawu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics). W pierwszym etapie reakcji syntezy, do 1 μ g RNA dodałam 1 μ l starterów oligo(dT)18 (stężenie wyjściowe 50 pmol/ μ l) i uzupełniłam wodą wolną od RNaz do objętości 13 μ l. Zawartość próbki inkubowałam w temp. 65°C przez 10 minut. Następnie próbkę przenieśliśmy do lodu na 1 min, wirowaliśmy, ponownie umieszczaliśmy w lodzie i dodawałam następujące składniki:

- ✓ 4 μ l buforu Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer 5x zawierającego 40 mM MgCl₂;
- ✓ 0,5 μ l inhibitora rybonukleaz, RNaz, Protector RNase Inhibitor zawierający 8 mM DTT (stężenie wyjściowe 40 U/ μ l);
- ✓ 2 μ l mieszaniny deoksyrybonukleotydów, Deoxynucleotide Mix (stężenie 10 mM);
- ✓ 0,5 μ l odwrotnej transkryptazy, Transcriptor Reverse Transcriptase (stężenie 20 U/ μ l).

Próbkę delikatnie wytrząsałam i umieszczałam w termobloku. Syntezę cDNA prowadziłam przez 30 minut w temperaturze 55°C. Po zakończeniu syntezy próbki poddałam działaniu temperatury 85°C przez 5 minut w celu zatrzymania reakcji. Po zakończeniu reakcji próbki z cDNA przechowywałam w 4°C. Uzyskany cDNA wykorzystałam jako matryca do reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*).

- Real-time PCR – określenie względnego poziomu ekspresji badanych genów

Dla oszacowania zmian w poziomie ekspresji badanych genów zastosowałam reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z użyciem specyficznych par starterów (Genomed, Polska) komplementarnych do fragmentu kodującego, pozwalające na uzyskanie specyficznego produktu reakcji wyłącznie z cDNA badanych genów.

Reakcję PCR prowadziłam w czasie rzeczywistym na płytce 96- dołkowej z wykorzystaniem cDNA pozyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji oraz zestawu FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics). Do amplifikacji wykorzystałam aparat LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Dołączone do aparatu oprogramowanie pozwoliło na analizowanie uzyskanych wyników oraz porównanie względnych różnic ilości początkowej matrycy. Poziom analizowanych transkryptów standaryzowałam względem genu referencyjnego – GAPDH należącego do rodziny housekeeping gene, którego poziom

ekspresji jest stały w warunkach eksperymentu. Reakcję dla badanych genów prowadziłam w warunkach określonych poniżej. Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę przygotowywanej w celu amplifikacji transkryptów genu CPR i CYP3A4:

- ✓ 2 μ l cDNA
- ✓ 0,8 μ l MgCl₂
- ✓ 0,2 μ l starter Forward (stężenie końcowe 0,2 μ M)
- ✓ 0,2 μ l starter Reverse (stężenie końcowe 0,2 μ M)
- ✓ 2 μ l LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I 10x
- ✓ H₂O wolna od RNaz – objętość stanowi uzupełnienie mieszaniny reakcyjnej do 20 μ l.

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym przebiegała według warunków określonych w tabeli poniżej:

Tabela 14. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Liczba cykli	Proces	Temperatura	Czas
Preinkubacja			
1		95°C	10 min.
Amplifikacja			
45	Denaturacja	95°C	10 s.
	Hybrydyzacja	59°C	15 s.
	Wydłużanie łańcucha	72°C	20 s.
Chłodzenie			
1		40°C	30 s.

Uzyskane wyniki pochodzące z dwóch niezależnych doświadczeń standaryzowałam wobec genu referencyjnego GAPDH, po czym przedstawiłam je jako wartość względną w odniesieniu do grupy niepoddanej transfekcji. Dzięki temu, że wydajność amplifikacji badanych genów i genu referencyjnego była w przybliżeniu taka sama w zakresie badanych ilości DNA, zastosowałam obliczenia względnej ilości produktu PCR z użyciem porównywalnej metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak i wsp., 2001].

6.3.17. Analiza statystyczna wyników

Wyniki wszystkich eksperymentów zaprezentowanych w niniejszej pracy wyraziłam jako średnia z odchyleniem standardowym (SD). Dane dla poszczególnych parametrów poddałam analizie statystycznej przy użyciu programu GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA). Dla oceny różnic pomiędzy dwiema niezależnymi próbkami zastosowałam test t-Studenta. Analizę statystyczną dla większych niż dwuparametrowe zmienne wykonałam przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (One-way ANOVA). Przyjęłam istotną różnicę statystyczną przy wartościach: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Literatura

- Adams J.M.:** Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.*, 2003; 17: 2481–2495;
- Adams J.M., Cory S.:** The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 2007; 26: 1324–1337;
- Anuchapreeda S.,** Leechanachai P., Smith M.M., Ambudkar S.V., Limtrakul P.N.: Modulation of p-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human kb cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 64: 573–582;
- Arico S.,** Petiot A., Bauvy C., et al.: The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 35243–35246;
- Arumugam T.,** Ramachandran V., Fournier K.F., Wang H., Marquis L., Abbruzzese J.L., Gallick G.E., Logsdon C.D., McConkey D.J., Choi W.: Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 2009; 69: 5820-5828;
- Ashkenazi A.,** Dixit V.M.: Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998; 281: 1305–1308;
- Ashok B.T.,** Tadi K., Banerjee D., Konopa J., Iatropoulos M., Tiwari R.K.: Pre-clinical toxicology and pathology of 9-(2'-hydroxyethylamino)-4-methyl-1-nitroacridine (C1748), a novel anti-cancer agent in male Beagle dogs. *Life Science*, 2006; 79: 1334-1342;
- Ashok B.T.,** Tadi K., Garikaputy V.P., Chen Y., Huang Q., Banerjee D., Konopa J., Tiwari R.K.: Preclinical toxicological examination of putative prostate cancer specific 4-methyl-1-nitroacridine derivative in rodents. *Anti-Cancer Drugs*, 2007; 18: 87-94;
- Augustin E.,** Borowa-Mazgaj B., Kikulska A., Kordalewska M., Pawłowska M.: CYP3A4 overexpression enhances the cytotoxicity of the antitumor triazoloacridinone derivative C-1305 in CHO cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2013; 34 (1): 146-156;
- Augustin E.,** Moś-Rompa A., Nowak-Ziatyk D., Konopa J.: Antitumor 1-nitroacridine derivative C-1748, induces apoptosis, necrosis or senescence in human colon carcinoma HCT8 and Ht29 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2010; 79: 1231-1241;
- Augustin E.,** Pawłowska M., Polewska J., Potega A., Mazerska Z.: Modulation of CYP3A4 activity and induction of apoptosis, necrosis and senescence by the anti-tumour imidazoacridinone C-1311 in human hepatoma cells. *Cell Biol. Int.* 2013; 37 (2): 109-120;
- Baenke F.,** Peck B., Miess H., Schulze A.: Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis. Model Mech.*, 2013; 6: 1353-1363;
- Balkham S.E.,** Sargent J.M., Elgie A.W., Williamson C.J., Taylor C.G.: Comparison of BCL-2 and BAX protein expression with in vitro sensitivity to ARA-C and 6TG in AML. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1999; 457: 335-340;
- Barnes D.,** Sato G.: Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.*, 1980; 102: 255-270;
- Barroso G.,** Taylor S., Morshedi M., Manzur F., Gaviño F., Oehninger S.: Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil. Steril.*, 2006; 85(1): 149-154;
- Barth S.,** Glick D., Macleod K.F.: Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.*, 2010; 221: 117-124;
- Barton-Burke M.:** Gemcitabine: A pharmacologic and clinical overview. *Cancer Nursing*. 1999; 22 (2): 176-183;
- Bhattacharyya S.,** Solakyildirim K., Zhang Z., Linhardt R.J., Tobacman J.K.: Chloroquine reduces arylsulphatase B activity and increases chondroitin-4-sulphate: implications for mechanisms of action and resistance. *Malar. J.*, 2009; 8: 303;
- Bisht S.,** Mizuma M., Feldmann G., Ottenhof N.A., Hong S.M., Pramanik D., Chenna V., Karikari C., Sharma R., Goggins M.G., Rudek M.A., Ravi R., Maitra A.: Systemic administration of polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (nanocurc) blocks tumor growth and metastases in preclinical models of pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2010; 9: 2255–2264;

- Bloomston M.**, Frankel W.L., Petrocca F., Volinia S., Alder H., Hagan J.P., Liu C.G., Bhatt D., Taccioli C., Croce C.M.: MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*, 2007; 297: 1901-1908;
- Bold R.J.**, Chandra J., McConkey D.J.: Gemcitabine-induced programmed cell death (apoptosis) of human pancreatic carcinoma is determined by Bcl-2 content. *Ann. Surg. Oncol.*, 1999; 6(3): 279-285;
- Boren J.**, Brindle K.M.: Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ.*, 2012; 19: 1561-1570;
- Boyce M.**, Yuan J.: Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ.*, 2006; 13: 363-373;
- Bracci P.M.**: Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol. Carcinog.*, 2012; 51(1): 53-63;
- Bryant K.L.**, Mancias J.D., Kimmelman A.C., Der C.J.: KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem. Sci.*, 2014; 39: 91-100;
- Büchler P.**, Reber H.A., Lavey R.S., Tomlinson J., Büchler M.W., Friess H., Hines O.J.: Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. *J. Surg. Res.*, 2004; 120: 295-303;
- Burchell B.**, Brierley C.H., Rance D.: Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci.*, 1995; 57:1819-1831;
- Burris III H. A.**, Moore M. J., Andersen J., Green M. R., Rothenberg M.L., Modiano M. R., et al.: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.*, 1997; 15(6): 2403-2413;
- Calin G.A.**, Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M.: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002; 99: 15524-15529;
- Campisi J.**: Cellular senescence as a tumor suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.*, 2001; 11: 27-31;
- Cannito S.**, Novo E., Compagnone A., Valfre di Bonzo L., Busletta C., Zamara E., Paternostro C., Povero D., Bandino A., Bozzo F., Cravanzola C., Bravoco V., Colombatto S., Parola M.: Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*, 2008; 29: 2267-2278;
- Capizzi R.**, Roman L., Tjulandin S., Smirnova I., et al.: Phase II trial of C1311, a novel inhibitor of topoisomerase II in advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology annual ASCO meeting*, 2008, abstract #1055(54s);
- Carew J.S.**, Nawrocki S.T., Kahue C.N., Zhang H., Yang C., Chung L. et al.: Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood*, 2007; 110: 313-322;
- Carmeliet P.**, Dor, Y., Herbert J.M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M., Neeman M., Bono F., Abramovitch R., Maxwell P., Koch C.J., Ratcliffe P., Moons L., Jain R.K., Collen D., Keshert E.: Role of HIF-1 in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 1998; 34: 485-490;
- Carracedo A.**, Gironella M., Lorente M., Garcia S., Guzmán M., Velasco G., Iovanna J.L.: Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res.*, 2006; 66 (13): 6748-655;
- Cascorbi I.**: Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol. Ther.*, 2006; 112: 457-473;
- Chang T.C.**, Wentzel E.A., Kent O.A., Ramachandran K., Mullendore M., Lee K.H., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C.J., Arking D.E., Beer M.A., Maitra A., Mendell J.T.: Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell.*, 2007; 26: 745-752;
- Chari S. T.**, Leibson C. L., Rabe K. G., Ranson J., de Andrade M., Petersen G.M.: Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology*, 2005; 129: 504-511;
- Chazotte B.**: Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011; 2011(1), doi: 10.1101/pdb.prot5557;

- Chen Y.**, Badithe A.T., Garikapaty V.P.S., Liu X., Szostek A., Wysocka-Skrzela B., Banerjee D., Konopa J., Miller D., Tiwari R.T.: Pre-clinical studies of 1-nitroacridine derivatives: effective anti-tumor agents for prostate cancer. 93rd Annual AACR Meeting, Washington, USA, 2002; abs. nr 390, str. 77;
- Chu K.**, Teele N., Dewey M. W., Albright N., Dewey W. C.: Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3 δ and CDKN1A (p21) knockout cell lines. *Radiat. Res.*, 2004; 162: 270-286;
- Chung J.Y.**, Kim J.Y., Kim W.R., Lee S.G., Kim Y.J., Park J.E., Hong Y.P., Chun Y.J., Park Y.C., Oh S., Yoo K.S., Yoo Y.H., Kim J.M.: Abundance of aryl hydrocarbon receptor potentiates benzo[a]pyrene-induced apoptosis in Hepa1c1c7 cells via CYP1A1 activation. *Toxicology*, 2007; 235: 62-72;
- Clerc P.**, Bensaadi N., Pradel P., Estival A., Clemente F., Vaysse N.: Lipid-dependent proliferation of pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res.*, 1991; 51 (14): 3633-3638;
- Colell A.**, Ricci J.E., Tait S., et al.: GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome c Release in the Absence of Caspase Activation. *Cell*, 2007; 129: 983-997;
- Conroy T.**, Desseigne F., Ychou F., Bouché O., Guimbaud R., Bécouarn Y., Adenis A., Raoul J. L., Gourgou-Bourgade S., de la Fouchardière C., Bennouna J., Bachet J.B., Akouz F.K., Péré-Vergé D., Delbaldo C., Assenat E., Chauffert B., Michel P., Montoto-Grillot C., and Ducreux M.: FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2011; 364: 1817-1825;
- Court H.**, Philips M.R., Bar-Sagi D.: Molecular Genetics of Pancreatic Cancer, *Springer*, 2013;
- Crighon D.**, Wilkinson S., O'Prey J., et al.: DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. *Cell*, 2006; 126: 121-134;
- Cuervo A.M.**: Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.*, 2004; 14: 70-77;
- Czernik P.**, Radomska-Pandya A.: Transfecting an ovarian tumor cell with a vector encoding human UDP-glucuronosyltransferase 2B7, wherein constant or temporal expression of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 in that cell results growth arrest of tumor cells. Patent nr. US20020198167 A1, Data publikacji: 26 Gr.u 2002;
- DeBerardinis R.J.**: Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genet. Med.*, 2008; 10: 767-777;
- Deer E.L.**, González-Hernández J., Coursen J.D., Shea J.E., Ngatia J., Scaife C.L., Firpo M.A., Mulvihill S.J.: Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 2010; 39(4): 425-435;
- de Sousa Cavalcante L.**, Monteiro G.: Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur. J. Pharmacol.*, 2014; 741: 8-16;
- Demarchi F.**, Bertoli C., Copetti T., et al.: Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 2006; 175: 595-605;
- Djavaheri-Mergny M.**, Maiuri M.C., Kroemer G.: Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene*, 2010; 29: 1717-1719;
- Donghui L.I.**, Keping X., Wolf R., Abbruzzese J.L.: Pancreatic cancer. *Lancet*, 2004; 363: 1049-1057;
- Du C.**, Fang M., Li Y., Li L., Wang X.: Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000; 102: 33-42;
- Ducharme N.A.**, Bickel P.E.: Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology*. 2008; 149 (3): 942-949;
- Duffy J.P.**, Eibl G., Reber H.A., Hines O.J.: Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol. Cancer.*, 2003; 22: 2:12;
- Elliott R.L.**, Blobe G.C.: Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 2078-2093;
- Elmore S.**: Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 2007; 35: 495-516;

- Eom** Y.W., Kim M. A., Park S. S., Goo M. J., Kwon H. J., Sohn S., Kim W.-H., Yoon G., Choi K. S.: Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene*, 2005; 24: 4765-4777;
- Fei** P., Bernhard E.J., El-Deiry W.S.: Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res.*, 2002; 62: 7316-7327;
- Flavin** R., Peluso S., Nguyen P.L., Loda M.: Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Fut. Oncol.*, 2010; 6: 551-562;
- Fisher** W. E.: Diabetes: risk factor for the development of pancreatic cancer or manifestation of the disease? *World Journal of Surgery*, 2001; 25: 503-508;
- Firat** E., Weyerbrock A., Gaedicke S., Grosu A.L., Niedermann G.: Chloroquine or chloroquine-PI3K/Akt pathway inhibitor combinations strongly promote γ -irradiation-induced cell death in primary stem-like glioma cells. *PLoS One*, 2012; 7: e47357;
- Fryer** R.A., Barlett B., Galustian C., Dalglish A.G.: Mechanisms underlying gemcitabine resistance in pancreatic cancer and sensitisation by the iMiD™ lenalidomide. *Anticancer Res.*, 2011; 31 (11): 3747-3756;
- Fukuda** H., Takiguchi N., Koda K., Oda K., Seike K., Miyazaki M. Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase are related to histological effects of 5-Fluorouracil and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for primary gastric cancer patients. *Cancer Invest.*, 2006; 24: 235-241;
- Fukunaga** A. K., Marsh S., Murry D. J., et al. Identification and analysis of single nucleotide polymorphism in the gemcitabine pharmacologic pathway. *Pharmacogenomics J.*, 2004; 4: 307-314;
- Fussell** K.C., Udasin R.G., Gray J.P., Mishin V., Smith P.J.S., Heck D.E., Laskin J.D.: Redox cycling and increased oxygen utilization contribute to diquat-induced oxidative stress and cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells overexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 50: 874-882;
- Gbelcová** H., Svěda M., Laubertová L., Varga I., Vitek L., Kolář M., Strnad H., Zelenka J., Böhmer D., Ruml T.: The effect of simvastatin on lipid droplets accumulation in human embryonic kidney cells and pancreatic cancer cells. *Lipids Health Dis.*, 2013; 12: 126. doi: 10.1186/1476-511X-12-126;
- Gibson** P., Gill J.H., Khan P.A., Seargent J.M., Martin S.W., Batman P.A., Griffith J., Bradley C., Double J.A., Bibby M.C., Loadman P.M.: Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) is overexpressed in human colon adenocarcinomas relative to normal colon: implications for drug development. *Mol. Cancer Ther.*, 2003; 2 (6): 527-34;
- Giovannetti** E., Mey V., Nannizzi S., Pasqualetti G., Del Tacca M., Danesi R.: Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 1387-1395;
- Glick** D., Barth S., Macleod K.F.: Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.*, 2010; 221 (1): 3-12;
- Green** D.R., Kroemer G.: The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 2004; 305: 626-629;
- Griffin** J. F., Poruk K. E., Wolfgang C. L.: Pancreatic cancer surgery: past, present, and future. *Chin. J. Cancer Res.*, 2015; 27 (4): 332-348;
- Goldstein** D., El-Maraghi R. H., Hammel P., Heinemann V., Kunzmann V., Sastre J., Scheithauer W., Siena S., Taberero J., Teixeira L., Tortora G., Van Laethem J. L., Young R., Penenberg D. N., Lu B., Romano A., Von Hoff D. D.: nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer: Long-Term Survival From a Phase III Trial. *NCI J. Natl. Cancer Inst.*, 2015; 107 (2);
- Gorlewska** K., Mazerska Z., Sowiński P., Konopa J.: Products of metabolic activation of the antitumor drug Ledakrin (Nitracrine) in vitro, *Chemical Res Toxicol.*, 2001; 14(1): 1-10;
- Gozuacik** D., Kimchi A.: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 2004; 23: 2891-2906;
- Greenspan** P., Mayer E.P., Fowler S.D.: Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.*, 1985;100 (3): 965-973;
- Gu** W.J., Liu H.L.: Induction of pancreatic cancer cell apoptosis, invasion, migration, and enhancement of chemotherapy sensitivity of gemcitabine, 5-FU, and oxaliplatin by hnRNP A2/B1 siRNA. *Anticancer Drugs*, 2013; 24(6): 566-576;

- Guillemette C.:** Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J.*, 2003; 3:136-158;
- Guo J.Y., Chen H.Y., Mathew R., Fan J., Strohecker A.M., Karsli-Uzunbas G., Kamphorst J.J., Chen G., Lemons J.M., Karantza V., Collier H.A., Dipaola R.S., Gelinas C., Rabinowitz J.D., White E.:** Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.*, 2011; 25: 460–470;
- Gut I., Danielova V., Holuboa J., Soucek P., Kluckova H.:** Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel, and docetaxel for tumor cell lines in vitro effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism. *Mol. Toxicol.*, 2000; 74: 437-446;
- Häcker G.:** The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.*, 2000; 301(1): 5-17;
- Hacker G., Weber A.:** BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007; 462: 150–155;
- Hagmann W., Jesnowski R., Faissner R., Guo C., Lohr J.M.:** Atp-binding cassette c transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatology*, 2009; 9:136–144;
- Hagmann W., Jesnowski R., Löhr J.M.:** Interdependence of gemcitabine treatment, transporter expression, and resistance in human pancreatic carcinoma cells. *Neoplasia*, 2010; 12: 740-747;
- Hamed S.S., Straubinger R.M., Jusko W.J.:** Pharmacodynamic modeling of cell cycle and apoptotic effects of gemcitabine on pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2013; 72(3): 553-563;
- Hashimoto D., Bläuer M., Hirota M., Ikonen N.H., Sand J., Laukkanen J.:** Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. *Eur. J. Cancer.*, 2014; 50(7): 1382-1390;
- Heine T., Glatt H., Epe B.:** Human cytochrome P450 reductase can act as a source of endogenous oxidative DNA damage and genetic instability. *Free Radic. Biol. Med.*, 2006; 40: 801–807;
- Heinemann V., Xu Y. Z., Chubb S. et al.:** Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5' triphosphate: a mechanism of self-potential. *Cancer Res.*, 1992; 52: 533-539;
- Hansen R., Quebbeman E., Ritch P., Chitambar C., Anderson T.:** Continuous 5-fluorouracil (5FU) infusion in carcinoma of the pancreas: a phase II study. *Am. J. Med. Sci.*, 1988; 295 (2): 91-93;
- Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J.W., Guba M., Bruns C.J., Heeschen C.:** Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007; 1: 313-323;
- Herreros-Villanueva M., Zubia-Olascoaga A., Bujanda L.:** c-Met in pancreatic cancer stem cells: therapeutic implications. *World J. Gastroenterol.*, 2012; 18: 5321-5323;
- Hertel L. W., Kroin J. S., Misner J. W., Tustin J. M.:** Synthesis of 2'-deoxy-2',2'-difluoro-D-ribose and 2'-deoxy-2',2'-difluoro-D-ribofuranosyl nucleosides. *J. Org. Chem.*, 1988; 53: 2406–2409;
- Heywood G., Vezeridis M. P., Wanebo H. J.:** Surgical therapy of pancreatic cancer. *Frontiers in Bioscience*, 1998; 3: E-175-E180;
- Hindriksen S., Bijlsma M.F.:** Cancer Stem Cells, EMT, and Developmental Pathway Activation in Pancreatic Tumors. *Cancers*, 2012; 4: 989–1035;
- Hirano T., Ishihara K., Hibi M.:** Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 2000; 19: 2548-2556;
- Höckel M., Vaupel P.:** Tumour Hypoxia: definitions and current clinical, biological, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 266–276;
- Höckel M., Vorndran B., Schlenger K., Bausmann E., Knapstein P.G.:** Tumour oxygenation: a new predictive parameter in locally advanced cancer of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.*, 1993; 52: 141–149;
- Hoffman R.M., Bouvet M.:** Nanoparticle albumin-bound-paclitaxel: a limited improvement under the current therapeutic paradigm of pancreatic cancer. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2015; 16(7): 943-947;

- Hofmanová J.**, Soucek K., Dusek L., Netíková J., Kozubík A.: Inhibition of the cytochrome P-450 modulates all-trans-retinoic acid-induced differentiation and apoptosis of HL-60 cells. *Cancer Detect. Prev.*, 2000; 24(4): 325-342;
- Hołownia A.**, Cederbaum A.I.: Threshold for antiproliferative and proapoptotic activity of txaxol in HepG2 cells expressing human CYP3A4: effect of P-glycoprotein transporters. *Pharmacology*, 2003; 69: 142-149;
- Hosotani R.**, Miyamoto Y., Fujimoto K., Doi R., Otaka A., Fujii N., Imamura M.: Trojan p16 peptide suppresses pancreatic cancer growth and prolongs survival in mice. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 1271-1276;
- Hoyer-Hansen M.**, Bastholm L., Szyniarowski P., et al.: Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase-beta, and Bcl-2. *Mol. Cell*, 2007; 25: 193–205;
- Hu Y.L.**, Jahangiri A., Delay M., Aghi M.K.: Tumor cell autophagy as an adaptive response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy. *Cancer Res.*, 2012; 72: 4294–4299;
- Huang P.**, Chubb S., Hertel L. W., et al.: Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.*, 1991; 51: 6110-6117;
- Huang Z.**, Guo K.J., Guo R.X., He S.G.: Effects of 5-fluouracil combined with sulfasalazine on human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 proliferation and apoptosis *in vitro*. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, 2007; 6(3): 312-320;
- Huang Z.**, Roy P., Waxman D.J.: Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 59 (8): 961-972;
- Huber M.A.**, Kraut N., Beug H.: Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2005; 17: 548-558;
- Hugo H.**, Ackland M.L., Blick T., Lawrence M.G., Clements J.A., Williams E.D., Thompson E.W.: Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.*, 2007; 213: 374-383;
- Hurley L.H.**: DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2 (3):188-200;
- Igney F.H.**, Krammer P.H.: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*. 2002; 2: 277–288;
- Ioannou N.**, Dalglish A.G., Seddon A.M., Mackintosh D., Guertler U., Solca F., Modjtahedi H.: Anti-tumour activity of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in human pancreatic tumour cells. *Br. J. Cancer*, 2011; 105 (10): 1554-1562;
- Iwatsuki M.**, Mimori K., Yokobori T., Ishi H., Beppu T., Nakamori S., Baba H., Mori M.: Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.*, 2012; 101: 293-299;
- Javle M.M.**, Gibbs J.F., Iwata K.K., Pak Y., Rutledge P., Yu J., Black J.D., Tan D., Khoury T.: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-Erk) in surgically resected pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 2007; 14: 3527-3533;
- Jang J. H.**, Cotterchio M., Borgida A., Liu G., Gallinger S., Cleary S. P.: Interaction of polymorphisms in mitotic regulator genes with cigarette smoking and pancreatic cancer risk. *Mol. Carcinog.*, 2013; 52 Suppl 1: E103-109;
- Jemal A.**, Murray T., Samuels A., Ghafoor A., Ward E., Thun M. J.: Cancer Statistics, CA *Cancer J. Clin.*, 2003; 53: 5-26;
- Kalluri R.**, Weinberg R.A.: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119: 1420-1428;
- Kampan N.C.**, Madondo M.T., McNally O.M., Quinn M., Plebanski M.: Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *Biomed. Res. Int.*, 2015; 2015:413076. doi: 10.1155/2015/413076;
- Klein A.P.**: Genetic susceptibility to pancreatic cancer. *Mol. Carcinog.*, 2012; 51: 14-24;
- Kong Y.**, Cui H., Ramkumar C., Zhang H.: Regulation of senescence in cancer and aging. *J. Aging Res.*, 2011; 2011:963172. doi: 10.4061/2011/963172;

- Konig J.**, Hartel M., Nies A.T., Martignoni M.E., Guo J., Buchler M.W., Friess H., Keppler D.: Expression and localization of human multidrug resistance protein (abcc) family members in pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2005; 115 (3): 359–367;
- Konopa J.**, Pawlak J., Pawlak K.: The mode of action of cytotoxic and antitumor 1-nitroacridines. III. In vivo interstrand crosslinking of DNA of mammalian or bacterial cells by 1-nitroacridines. *Chemico-Biological Interactions*, 1983; 43: 175-197;
- Konopa J.**, Wysocka-Skrzela B., Szostek A., Tiwari R.: Potent antitumor 4-substituted 1-nitroacridines DNA crosslinking agents. In: Proc EORTC-NCI-AACR, 2003; p.66;
- Koong A.C.**, Mehta V.K., Le Q.T., Fisher G.A., Terris D.J., Brown J.M., Bastidas A.J., Vierra M.: Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2000; 48: 919-922;
- Kubbutat M.H.**, Jones S.N., Vousden K.H.: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 1997; 387: 299-303;
- Kroemer G.**, Galluzzi L., Brenner C.: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.*, 2007; 87(1): 99-163;
- Kroep J. R.**, Loves W. J., van der Wilt C. L., et al.: Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol. Cancer Ther.*, 2002; 1: 371-376;
- Kunnumakkara A.B.**, Guha S., Krishnan S., Diagaradjane P., Gelovani J., Aggarwal B.B.: Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Res.*, 2007; 67 (8): 3853–3861;
- Laghi L.**, Orbetegui O., Bianchi P., Zerbi A., Di Carlo V., Boland C.R., Malesci A.: Common occurrence of multiple K-Ras mutations in pancreatic cancers with associated precursor lesions and in biliary cancers. *Oncogene*, 2002; 21: 4301-4306;
- Lass A.**, Zimmermann R., Oberer M., Zechner R.: Lipolysis, a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in Lipid Research*, 2011; (50): 14–27;
- Lee J.S.**, Li Q., Lee J.Y., Lee S.H., Jeong J.H., Lee H.R., Chang H., Zhou F.C., Gao S.J., Liang C., Jung J.U.: FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 1355–1362;
- Legendre C.**, Hori T., Loyer P., Aninat C., Ishida S., Glaise D., Lucas-Clerc C., Boudjema K., Guguen-Guillouzo C., Corlu A., Morel F.: Drug-metabolising enzymes are down-regulated by hypoxia in differentiated human hepatoma HepaRG cells: HIF-1alpha involvement in CYP3A4 repression. *Eur. J. Cancer*, 2009; 45 (16): 2882-2892;
- Lemasters J.J.**, Qian T., He L., Kim J.S., Elmore S.P., Cascio W.E., Brenner D.A.: Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid. Redox Signal.*, 2002; 4 (5): 769-781;
- Levine B.**, Sinha S., Kroemer G.: Bcl-2 family members. Dual role of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 2008; 4: 600–606;
- Li C.**, Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M.F., Simeone D.M.: Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.*, 2007; 67: 1030-1037;
- Li X.**, Yan J., Wang L., Xiao F., Yang Y., Guo X., Wang H.: Beclin1 inhibition promotes autophagy and decreases gemcitabine-induced apoptosis in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. *Cancer Cell Int.*, 2013; 13 (1): 26. doi: 10.1186/1475-2867-13-26;
- Limtrakul P.**, Chearwae W., Shukla S., Phisalpong C., Ambudkar S.V.: Modulation of function of three abc drug transporters, p-glycoprotein (abcb1), mitoxantrone resistance protein (abcg2) and multidrug resistance protein 1 (abcc1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin. *Mol. Cell Biochem.*, 2007; 296: 85–95;
- Ling J.**, Johnson K. A., Miao Z., Rakhit A., Pantze M. P., Hamilton M., Lum B. L., Prakash C. Metabolism and excretion of erlotinib, a small molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in healthy male volunteers. *Drug Metab. Dispos.*, 2006; 34 (3): 420-426;
- Livak K.J.**, Schmittgen T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001; 25 (4): 402-408;

- Lobo** N.A., Shimono Y., Qian D., Clarke M.F.: The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2007; 23: 675-699;
- Long** J., Zhang Y., Yu X., Yang J., LeBrun D.G., Chen C., Yao Q., Li M.: Overcoming drug resistance in pancreatic cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2011; 15: 817-828;
- Lowenfels** A. B., Maisonneuve P.: Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. *Japanese J. Clin. Oncol.*, 2004; 34 (5): 238-244;
- Lonardo** E., Hermann P.C., Mueller M.T., Huber S., Balic A., Miranda-Lorenzo I., Zagorac S., Alcalá S., Rodríguez-Arabaolaza I., Ramirez J.C., Torres-Ruiz R., Garcia E., Hidalgo M., Cebrián D.Á., Heuchel R., Löhner M., Berger F., Bartenstein P., Aicher A., Heeschen C.: Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *Cell Stem Cell*. 2011; 9: 433-446;
- Lum** J.J., Bauer D.E., Kong M., et al.: Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 2005; 120: 237-248;
- Luo** X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X.: Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998; 94: 481-490;
- Luthi** A.U., Martin S.J.: The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.*, 2007; 14: 641-650;
- Ly** J.D., Grubb D.R., Lawen A.: The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 2003; 8 (2): 115-128;
- MacGregor** R.R., Hamilton J.W., Kent G.N., Shofstall R.E., Cohn D.V.: The degradation of parathormone and parathormone by parathyroid and liver cathepsin B. *J. Biol. Chem.*, 1979; 254: 4428-4433;
- Maiuri** M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G.: Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 741-752;
- Mansilla** S., Bataller M., Portugal J.: Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy, *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.*, 2006; 6: 589-602;
- Martinvalet** D., Zhu P., Lieberman J.: Granzyme A induces caspase- independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 2005; 22: 355-370;
- Maxwell** P.H., Dachs G.U., Gleadle J.M., Nicholls L.G., Harris A.L., Stratford I.J., Hankinson O., Pugh C.W., Ratcliffe P.J.: Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumours and influences both angiogenesis and tumour growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997; 94: 8104-8109;
- Martin** S. J., Green D. R.: Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell*, 1995; 82; 3: 349-352;
- Mazerska** Z., Łukowicz J., Konopa J.: Antitumor activity of 1-nitro-9-aminoacridines including nitracrine against ascitic experimental tumors, *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, 1990: 472-477;
- Medes** G., Thomas A., Weinhouse S.: Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res.*, 1953; 13: 27-29;
- McFadyen** M.C., McLeod H.L., Jackson F.C., Melvin W.T., Doehmer J., Murray G.I.: Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance. *Biochem. Pharmacol.*, 2001; 62 (2): 207-212;
- McKeehan** W.L.: The role of nutrients in control of normal and malignant cell growth. *Molecular Interrelations of Nutrition and Cancer*, New York: Raven Press, 1982; 249- 263;
- Mini** E., Nobii S., Caciagli B., Landini I., Mazzei T.: Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*. 2006; 17 (5): 7-12;
- Mitra** R., Guo Z., Milani M., Mesaros C., Rodriguez M., Nguyen J., Luo X., Clarke D., Lamba J., Schuetz E., Donner D.B., Puli N., Falck J.R., Capdevila J., Gupta K., Blair L.A., Potter D.A.: CYP3A4 mediates growth of estrogen receptor-positive breast cancer cells in part by inducing nuclear translocation of phospho-Stat3 through biosynthesis of (\pm)-14,15-epoxyeicosatrienoic acid (EET). *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 17543-17559;
- Mitra** R., Srirangam A., Capdevila J., Potter D.A.: Cytochrome P450 promotes breast cancer cell proliferation. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 2006; 47: 5204 [Abstrakt];

- Mizushima N.:** Autophagy: process and function. *Genes Dev.*, 2007; 2861–2873;
- Mizushima N., Yoshimori T., Levine B.:** Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*, 2010; 140 (3): 313–326;
- Modrak D.E., Leon E., Goldenberg D.M., Gold D.V.:** Ceramide regulates gemcitabine-induced senescence and apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.*, 2009; 7 (6): 890-896;
- Moore M., Narasimhan T.R., Steinberg M.A., Wang X., Safe S.:** Potentiation of CYP1A1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells cotreated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993; 305 (2): 483-488;
- Moriyama T., Ohuchida K., Mizumoto K., Yu J., Sato N., Nabae T., Takahata S., Toma H., Nagai E., Tanaka M.:** MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol. Cancer Ther.*, 2009; 8: 1067-1074;
- Morton J.P., Timpson P., Karim S.A., Ridgway R.A., Athineos D., Doyle B., Jamieson N.B., Oien K.A., Lowy A.M., Brunton V.G., Frame M.C., Evans T.R., Sansom O.J.:** Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2010; 107: 246-251;
- Moś-Rompa A.:** Pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 oraz 1-nitroakrydyny C-857- wpływ na przebieg cyklu życiowego oraz indukcję apoptozy lub starzenia komórek nowotworowych. *Rozprawa doktorska*, 2007, Katedra Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej;
- Nakajima S., Doi R., Toyoda E., Tsuji S., Wada M., Koizumi M., Tulachan S.S., Ito D., Kami K., Mori T., Kawaguchi Y., Fujimoto K., Hosotani R., Imamura M.:** N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 4125-4133;
- Narayanan R., Tiwari P., Inoa D., Ashok B.T.:** Comparative analysis of mutagenic potency of 1-nitro-acridine derivatives. *Life Science*, 2005; 77: 2312-2323;
- Natalwala A., Spychal R., Tselepis C.:** Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol.*, 2008; 14: 3792-3797;
- Neault M., Mallette F.A., Richard S.:** miR-137 Modulates a Tumor Suppressor Network-Inducing Senescence in Pancreatic Cancer Cells. *Cell Rep.*, 2016; 14 (8): 1966-1978;
- Niemira M.:** Specyficzny metabolizm I wpływ na aktywność receptora jądrowego PXR, jako nowy element mechanizmu działania przeciwnowotworowych pochodnych akrydyny. *Rozprawa doktorska*, 2012, Katedra Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej;
- Niemira M., Dastych J., Mazerska Z.:** Pregnane X receptor dependent up-regulation of CYP2C9 and CYP3A4 in tumor cells by antitumor acridine agents, C-1748 and C-1305, selectively diminished under hypoxia. *Biochem. Pharmacol.*, 2013; 15; 86 (2): 231-241;
- Nishimura M., Naito S.:** Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2006; 21(5): 357-374;
- Nitsche C., Simon P., Weiss F.U., Fluhr G., Weber E., Gärtner S., Behn C.O., Kraft M., Ringel J., Aghdassi A., Mayerle J., Lerch M.M.:** Environmental risk factors for chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis.* 2011; 29: 235-242;
- Nordstrøm L.U., Sironi J., Aranda E., Maisonet J., Perez-Soler R., Wu P., Schwartz E.L.:** Discovery of autophagy inhibitors with antiproliferative activity in lung and pancreatic cancer cells. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2015; 6(2) :134-139;
- Nowak-Ziatyk D.:** Wpływ pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na indukcję stresu oksydacyjnego, apoptozy, katastrofy mitotycznej, autofagii oraz starzenia komórek nowotworowych. *Rozprawa doktorska*, 2011; Katedra technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej;
- Olive K. P., Jacobetz M.A., Davidson C.J., Gopinathan A., McIntyre D., Honess D., Madhu B., Goldgraben M.A., Caldwell M.E., Allard D.:** Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 2009; 324: 1457–1461;

- Pannala R.**, Leirness J. B., Bamlet W. R., Basu A., Petersem G. M., Chari S.T.: Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer associated diabetes-mellitus. *Gastroenterology*, 2008; 134 (4): 981-987;
- Patel B.B.**, Sengupta R., Qazi S., Vachhani H., Yu Y., Rishi A.K., Majumdar A.P.: Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating egfr and igf-1r. *Int. J. Cancer*, 2008; 122: 267–273;
- Pawłowska M.**: Zmiany w odpowiedzi biologicznej komórek nowotworowych indukowanej przez pochodne akrydonu C-1311 i C-1305 wobec podwyższonej ekspresji izoenzymów CYP3A4 i UGT1A10. *Rozprawa doktorska*, 2014, Katedra Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej;
- Pawłowska M.**, Augustin E., Mazerska Z.: CYP3A4 overexpression enhances apoptosis induced by anticancer agent imidazoacridinone C-1311, but does not change the metabolism of C-1311 in CHO cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2014; 35 (1): 98-112;
- Peng B.**, Fleming J.B., Breslin T., Grau A.M., Fojjoka S., Abbruzzese J.L., Evans D.B., Ayers D., Wathen K., Wu T., Robertson K.D., Chiao P.J.: Suppression of tumorigenesis and induction of p15(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 3628-3638;
- Perelman A.**, Wachtel C., Cohen M., Haupt S., Shapiro H., Tzur A.: JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.*, 2012; 3:e430. doi: 10.1038/cddis.2012.171;
- Peters G. J.**, van der Wilt C. L., van Moorsel C. J., Kroep J. R., Bergman A. M., Ackland S. P.: Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol Ther.*, 2000; 87: 227–253;
- Pillai V.C.**, Snyder R.O., Gumaste U., Thekkumkara T.J., Mehvar R.: Effects of transient overexpression or knockdown of cytochrome P450 reductase on reactive oxygen species generation and hypoxia reoxygenation injury in liver cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2011; 38 (12): 846-853;
- Portugal J.**, Mansilla S., Bataller M.: Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells, *Curr. Pharm. Des.*, 2010; 16: 69-78;
- Potter G.A.**, Patterson L.H., Wanogho E., Perry P.J., Butler P.C., Ijaz T., Ruparelia K.C., Lamb J.H., Farmer P.B., Stanley L.A., Burke M.D.: The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br. J. Cancer.*, 2002; 86 (5): 774-778;
- Pratt S.**, Shepard R.L., Kandasamy R.A., Johnston P.A., Perry W., Dantzig A.H.: The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol. Cancer Ther.*, 2005; 4: 855–863;
- Projean D.**, Baune B., Farinotti R., Flinois J. P., Beaune P., Taburet A. M., Ducharme J. In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4, and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metab. Dispos.*, 2003, 31 (6): 748-754;
- Radomska-Pandya A.**, Czernik P.J., Little J.M., Battaglia E., Mackenzie P.I.: Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism Reviews*, 1999; 31: 817-899;
- Radzikowski C.**, Ledóchowski A., Hrabowska M., Horowska B., Stefańska B., Konopa J., Jereczek-Morawska E.: A search for antitumor compounds. Biological studies, VI. *Arch. Imm. Ther. Exp.*, 1969; 17: 99;
- Ravikumar B.**, Berger Z., Vacher C., O'Kane C.J., Rubinsztein D.C.: Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Hum. Mol. Genet.*, 2006; 15: 1209–1216;
- Reya T.**, Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001; 414: 105-111;
- Riddick D.S.**, Lee C., Ramji S., Chinje E.C., Cowen R.L., Williams K.J., Patterson A.V., Stratford I.J., Morrow C.S., Townsend A.J., Jounaidi Y., Chen C.S., Su T., Lu H., Schwartz P.S., Waxman D.J.: Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metab. Dispos.*, 2005; 33 (8): 1083-1096;
- Risch H. A.**: Etiology of Pancreatic Cancer, With a Hypothesis Concerning the Role of N-Nitroso Compounds and Excess Gastric Acidity. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, 2003; 95 (13): 948-960;
- Roy P.**, Waxman D.J.: Activation of oxazaphosphorines by cytochrome P450: application to gene-directed enzyme prodrug therapy for cancer. *Toxicol. In Vitro.*, 2006; 20 (2): 176-186;

- Saitoh Y.**, Ouchida R., Miwa N.: Bcl-2 prevents hypoxia/reoxygenation-induced cell death through suppressed generation of reactive oxygen species and upregulation of Bcl-2 proteins. *J. Cell. Biochem.*, 2003; 90 (5): 914-924;
- Salnikov A.V.**, Liu L., Platen M., Gladkich J., Salnikova O., Ryschich E., Mattern J., Moldenhauer G., Werner J., Schemmer P., Büchler M.W., Herr I.: Hypoxia induces EMT in low and highly aggressive pancreatic tumor cells but only cells with cancer stem cell characteristics acquire pronounced migratory potential. *PLoS One*, 2012; 7: e46391;
- Santos A.**, Zanetta S., Cresteil T., Deroussent A., Pein F., Raymond E., Vernillet L., Risse M. L., Boige V., Gouyette A., Vassal G.: Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Clin Cancer Res.*, 2006, 6 (5): 2012-2020;
- Sarkar S.**, Davies J.E., Huang Z., Tunnacliffe A., Rubinsztein D.C.: Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 5641–5652;
- Sarkar F.H.**, Li Y., Wang Z., Kong D.: Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir.*, 2009; 64: 489-500;
- Shmidt R.**, Baumann F., Knüpfer H., Brauckhoff M., Horn L.C., Schönfelder M., Köhler U., Preiss R.: CYP3A4, CYP2C9 and CYP2B6 expression and ifosfamide turnover in breast cancer tissue microsomes. *Br. J. Cancer*, 2004; 90(4): 911–916;
- Sermeus A.**, Genin M., Maincent A., Fransolet M., Notte A., Leclere L., Riquier H., Arnould T., Michiels C.: Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. *PLoS One*, 2012; 7 (11): e47519. doi:10.1371/journal.pone.0047519;
- Shah U.A.**, Saif M.W.: Tumor markers in pancreatic cancer: 2013. *JOP*. 2013; 14: 318-321;
- Shah A.N.**, Summy J.M., Zhang J., Park S.I., Parikh N.U., Gallick G.E.: Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann. Surg. Oncol.*, 2007; 14: 3629-3637;
- Shi Q.**, Abruzzese J.L., Huang S., Fidler I.J., Xiong Q., Xie K.: Constitutive and inducible Interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cells more tumorigenic and metastatic. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 3711-3721;
- Shi X.**, Liu S., Kleeff J., Friess H., Büchler M.W.: Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncology*, 2002; 62 (4): 354-362;
- Shimizu S.**, Kanaseki T., Mizushima N., et al.: Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.*, 2004; 6: 1221–1228;
- Shin S.J.**, Kim K.O., Kim M.K., Lee K.H., Hyun M.S., Kim K.J., Choi J.H., Song H.S.: Expression of E-cadherin and uPA and their association with the prognosis of pancreatic cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2005; 35: 342-348;
- Shi X.**, Liu S., Kleeff J., Friess H., Büchler M.W.: Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncology*, 2002; 62 (4): 354-362;
- Shu C.H.**, Yang W.K., Shih Y.L., Kuo M.L., Huang T.S. Cell cycle G2/M arrest and activation of cyclin-dependent kinases associated with low-dose paclitaxel-induced sub-G1 apoptosis. *Apoptosis*, 1997; 2 (5): 463-470;
- Shukla S.**, Wu C.P., Ambudkar S.V.: Development of inhibitors of atp binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2008; 4: 205–223;
- Singh R.**, Cuervo A.M.: Lipophagy: Connecting Autophagy and Lipid Metabolism. *Inter. J. of Cell Biology*, 2012; DOI: 10.1155/2012/282041;
- Singh R.**, Cuervo A.M.: Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metabolism*, 2011; (13): 495–504;
- Singh R.**, Kaushik S., Wang Y. et al.: Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 2009; 458: 1131–1135;
- Spratlin J.**, Sangha R., Glubrecht D., Dabbagh L., Young J. D., Dumontet C., Cass C., Lai R., Mackey J. R.: The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 6956-6961;

- Standop J.**, Schneider M., Ulrich A., Büchler M. W., Pour P. M.: Differences in immunohistochemical expression of xenobiotic-metabolizing enzymes between normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Toxicol. Pathol.*, 2003; 31 (5): 506-513;
- Strimpakos A.**, Skif M.W.: Pancreatic cancer: from molecular pathogenesis to targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, 2008; 27: 495-522;
- Szakacs G.**, Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C., Gottesman M.M.: Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006; 5 (3): 219–234;
- Szostek A.**: Wiązanie się do DNA pochodnych 4-metylo-1-nitroakrydyny wykazujących właściwości przeciwnowotworowe, *Rozprawa doktorska*, Uniwersytet Gdański, 2003;
- Szostek A.**, Wysocka-Skrzela B., Tiwari R.K., Konopa J.: Interstrand crosslinking of DNA in tumor cells by a new group of antitumor 1-nitroacridines. *International Journal of Cancer*, 2002; 13: 441;
- Tadi K.**, Ashok B. T., Chen Y., Banerjee D., Wysocka-Skrzela B., Konopa J., Darzynkiewicz Z., Tiwari R.K.: Pre-clinical evaluation of 1-nitroacridine derivative chemotherapeutic agent that has preferential cytotoxic activity towards prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 2007; 6 (10): 1632-1637;
- Tadi K.**, Chen Y., Ashok B. T., Garikapaty V. P. S., Banerjee D., Wysocka-Skrzela B., Konopa J., Darzynkiewicz Z., Tiwari R.K.: Capridine β (C-1748): a novel 1-nitroacridine derivative targets the cyclin dependent kinase, cdk 4 and the tumor suppressor gene, p16 in prostate cancer. *Proc. Ann. Meet. AACR*. 2004; 3036;
- Tanida I.**: Autophagy basics. *Microbiol. Immunol.*, 2011; 55 (1): 1-11.;
- Thiam A.R.**, Farese R.V. Jr, Walther T.C.: The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2013; 14 (12): 775-786;
- Thiery**, J.P. Aclouque H., Huang R.Y., Nieto M.A.: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009; 139: 871-890;
- Thorburn A.**: Apoptosis and Autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*, 2008; 13 (1): 1–9;
- Thorburn J.**, Moore F., Rao A., et al.: Selective Inactivation of a FADD-dependent Apoptosis and Autophagy Pathway in Immortal Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell*, 2005; 16: 1189–1199;
- Tilly J. L.**: Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001; 2: 838-848;
- Torres C.**, Linares A., Alejandro M.J., Palomino-Morales R.J., Delgado J.R., Perales S.: Interplay Between Gemcitabine and Erlotinib Over Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Pancreas*, .2016; 45(2): 269-280;
- Traganos F.**, Bueti C., Melamed M.R., Darzynkiewicz Z.: Cytokinetic effects of bifunctional antitumor intercalator ditercalinium on frind erythroleukemia cells. *Leukemia*, 1987; 1 (5): 411-416;
- Ulrich A.B.**, Schmied B.M., Standop J., Schneider M.B., Pour P.M.: Pancreatic cell lines: a review. *Pancreas*, 2002; 24(2): 111-120;
- Wang J.**, Sen S.: MicroRNA functional network in pancreatic cancer: from biology to biomarkers of disease. *J. Biosci.*, 2011; 36: 481-491;
- Wei Y.**, Sinha S., Levine B.: Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy*, 2008; 4: 949–951;
- Whitworth P.W.**, Pak C.C., Esagro J., Kleinerman E.S., Fidler I.J.: Macrophages and cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 1990; 8 (4): 319-351;
- Wirawan E.**, Vande Walle L., Kersse K., Cornelis S., Claerhout S., Vanoverberghe I., Roelandt R., De Rycke R., Verspurten J., Declercq W., Agostinis P., Vanden Berghe T., Lippens S., Vandenabeele P.: Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.*, 2010; 1: e18;
- Wiśniewska A.**: Metaboliczna transformacja in vitro przeciwnowotworowych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w aspekcie ich działania przeciwnowotworowego i toksyczności ogólnej. *Rozprawa doktorska*, 2008; Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej;

- Wiśniewska A.**, Niemira M., Jagiełło K., Potęga A., Świst M., Henderson C., Skwarska A., Augustin E., Konopa J., Mazerska Z.: Diminished toxicity of C-1748, 4-methyl 9hydroxyethylamino-1-nitroacridine, compared with its demethyl analog, C-857, in HepG2 cells, correspond to its resistance to metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 2012; 84 (1): 30-42;
- Van Dyke R.:** part III The lysosome in its cytoplasmic environment. Acidification of endosomes and lysosomes. Lysosomal membrane bodies. In *Subcellular Biochemistry, Vol 27 Biology of the lysosome*. 23rd edition. Edited by: Lloyd J, Mason R. Plenum Press, London, New York; 1996;
- van Moorsel C.J.**, Veerman G., Bergman A.M., Guechev A., Vermorken J.B., Postmus P.E., Peters G.J.: Combination chemotherapy studies with gemcitabine. *Semin. Oncol.*, 1997; 24 (2 Suppl 7): S7-17-S7-23;
- Von Hoff D. D.**, Ervin T., Arena F.P., Chiorean G., Infante J., Moore M., Seay T., Jjulandin S.A., Wee Ma W., Saleh M.N., Harris, M., Reni M., Dowden S., Laheru D., Bahary N., Ramanathan R.K., Tabernero J., Hidalgo M., Goldstein D., Van Cutsem E., Wei X., Iglesias J., Renschler M.F.: Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N. Engl. J. Med.*, 2013; 369: 1691-1703;
- Xia F.**, Taghian D.G., DeFrank J.S., Zeng Z.C., Willers H., Iliakis G., Powell, S.N.: Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2001; 17: 8644-8649;
- Yang Y.**, Liu H., Li Z., Zhao Z., Yip-Schneider M., Fan Q.: Role of fatty acid synthase in gemcitabine and radiation resistance of pancreatic cancers. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, 2011; 2: 89–98;
- Yang M.C.**, Wang H.C., Hou Y.C., Tung H.L., Chiu T.J., Shan Y.S.: Blockade of autophagy reduces pancreatic cancer stem cell activity and potentiates the tumoricidal effect of gemcitabine. *Mol. Cancer*, 2015; 12; 14 (1): 179. doi: 10.1186/s12943-015-0449-3;
- Yorimitsu T.**, Klionsky D.J.: Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.*, 2005; 12, Suppl. 2: 1542-1552;
- Yousefi S.**, Perozzo R., Schmid I., et al.: Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 2006; 8: 1124–1132;
- Yu L.**, Alva A., Su H., et al.: Regulation of an Atg7-beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8. *Science*, 2004; 304:1500–1502;
- Yu C.C.**, Chiang P.C., Lu P.H., Kuo M.T., Wen W.C., Chen P., Guh J.H.: Antroquinonol, a natural ubiquinone derivative, induces a cross talk between apoptosis, autophagy and senescence in human pancreatic carcinoma cells. *J. Nutr. Biochem.*, 2012; 23 (8): 900-907;
- Yu S.**, Lu Z., Liu C., Meng Y., Ma Y., Zhao W., Liu J., Yu J., Chen J.: miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 2010; 70: 6015-6025;
- Zhan Q.**, Shen B., Deng X., Chen H., Jin J., Zhang X., Peng C., Li H.: Drug-eluting scaffold to deliver chemotherapeutic medication for management of pancreatic cancer after surgery. *Int. J. Nanomedicine*, 2013; 8: 2465-2472;
- Zhang J.G.**, Hong D.F., Zhang C.W., Sun X.D., Wang Z.F., Shi Y., Liu J.W., Shen G.L., Zhang Y.B., Cheng J., Wang C.Y., Zhao G.: Sirtuin 1 facilitates chemoresistance of pancreatic cancer cells by regulating adaptive response to chemotherapy-induced stress. *Cancer Sci.*, 2014; 105 (4): 445-454;
- Zhang Y.**, Li M., Wang H., Fisher W.E., Lin P.H., Yao Q., Chen C.: Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J. Surg.*, 2009; 33: 698-709;
- Zhao M.**, Geller J., Ma H., Yang M., Penman S., Hoffman R.M.: Monotherapy with a tumor-targeting mutant of *Salmonella typhimurium* cures orthotopic metastatic mouse models of human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 10170–10174;
- Zhao M.**, Yang M., Li X.M., Jiang P., Baranov E., Li S., Xu M., Penman S., Hoffman R.M.: Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 755–760;

Zhao M., Yang M., Ma H., Li X., Tan X., Li S., Yang Z., Hoffman R.M.: Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer Res.*, 2006; 66: 7647–7652;

Zhu Z.X., Zhang W.M., Jia G., Zhou J.: Effects of gemcitabine and pemetrexed on the proliferation of pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and Panc-1 in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.*, 2010; 30(1): 149-152;

Zou Z., Yuan Z., Zhang Q., Long Z., Chen J., Tang Z. *et al.*: Aurora kinase A inhibition-induced autophagy triggers drug resistance in breast cancer cells. *Autophagy*, 2012; 8: 1798–1810.