

mgr Anna Katarzyna Laskowska

Wybrane peptydomimetyki opioidowe jako potencjalne inhibitory wzrostu komórek w dwu- i trójwymiarowym modelu raka trzustki

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

w dyscyplinie: biologii medycznej

Promotor: prof. dr hab. n. chem. Aleksandra Misicka-Kęsik



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową

Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. M. Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2018

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować Pani prof. dr hab. n. chem. Aleksandrze Misickiej-Kęsik za nieustającą opiekę merytoryczną, wszechstronną pomoc, wsparcie oraz cenne uwagi.

Słowa podziękowania i uznania kieruję w stronę Pana dr hab. n. med. Marka Durlika. Szczególnie dziękuję za szereg odbytych dyskusji naukowych, które stanowiły inspirację do stworzenia tej pracy.

Jestem wdzięczna śp. prof. Andrzejowi W. Lipkowskiemu, który powierzył i umożliwił mi realizację tak interesującego zagadnienia.

Serdeczne podziękowania dla Dr Anny Puszko za wszystko i jeszcze więcej, szalone pomysły, sukcesy i porażki, ...bo liczba Ań w laboratorium musi się zgadzać...

Podziękowania dla Dr. Piotra Sosnowskiego za cenne porady, nieustanną motywację i cierpliwość w ciągłym tłumaczeniu „chemicznych niuansów”

Podziękowania kieruję także w stronę Koleżanek i Kolegów z Zakładu Neuropeptydów IMDiK PAN

Niniejsza praca została wykonana w Zakładzie Neuropeptydów Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk.

Badania były współfinansowane ze środków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013 w ramach projektu: Program Operacyjny Kapitał Ludzki - "Nowy lek dojelitowy zwalczający efekty uboczne opioidów" (POIG.01.04.00-14-213/12)

Wyniki niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane:

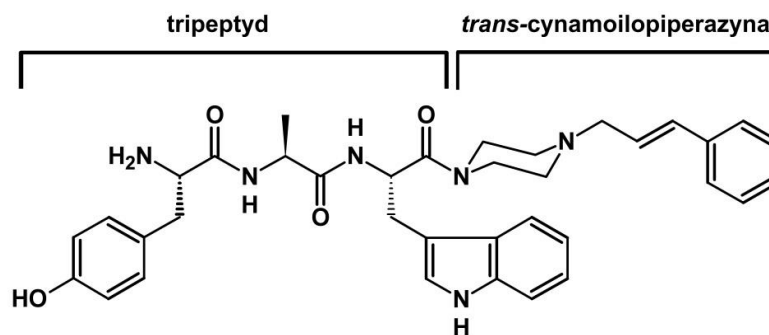
Laskowska A.K., Puszko A.K., Sosnowski P., Różycki K., Kosson P., Matalińska J., Durlik M., Misicka A. *“Opioid Tripeptides Hybridized with trans-1-Cinnamylpiperazine as Proliferation Inhibitors of Pancreatic Cancer Cells in Two- and Three-Dimensional in vitro Models.”* ChemMedChem. 2017 Oct 9;12(19):1637-1644

STRESZCZENIE

Przewodowy gruczolakorak trzustki to złośliwy nowotwór o złym rokowaniu. W wielu przypadkach rak rozwija się bezobjawowo, co skutkuje diagnozą w zaawansowanym stadium choroby. Leczenie farmakologiczne bazuje przede wszystkim na zastosowaniu gemcytabiny lub FOLFIRINOXu. Niestety terapia jest często nieskuteczna i obciążona wieloma efektami niepożądanymi, w związku z tym poszukiwanie nowych terapii przeciwnowotworowych stanowi ważne wyzwanie współczesnej medycyny. Jedną z możliwości są próby wykorzystania do tego celu peptydomimetyków wykazujących powinowactwo do specyficznych receptorów znajdujących się na powierzchni komórek nowotworowych trzustki i wykazujących aktywność przeciwnowotworową.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie właściwości biologicznych oraz aktywności przeciwnowotworowej peptydomimetyków o powinowactwie do receptorów opioidowych w dwu- i trójwymiarowym eksperymentalnym modelu raka trzustki *in vitro*. Postawiono hipotezę, że stabilna enzymatycznie hybryda peptydu opioidowego oraz pochodnej kwasu cynamonowego może wykazywać właściwości przeciwnowotworowe.

W oparciu o struktury związków opioidowych otrzymanych przez prof. Andrzeja W. Lipkowskiego, zaprojektowano serię peptydomimetyków (**APL1-4**), w których fragmenty peptydowe są połączone linkerem piperazynowym z pochodną kwasu cynamonowego. Otrzymane związki zawierały na N-końcu tripeptydy zaprojektowane w oparciu o sekwencję N-końcową naturalnych peptydów opioidowych – dermorfin (Tyr-D-Ala-Phe (**APL1**), Tyr-D-Thr-Phe (**APL2**), Tyr-D-Ala-Trp (**APL3**), i Tyr-D-Thr-Trp (**APL4**)) natomiast fragment C-końcowy stanowił lipofilowy fragment *trans*-cynamoilopiperazyny (Ryc.1).



Ryc.1. Przykładowa struktura badanych peptydomimetyków (**APL2**).

W pierwszym etapie badań otrzymane peptydomimetyki przebadano pod kątem stabilności w ludzkim osoczu, zdolności wiązania z receptorem opioidowym μ , właściwości hemotoksycznych, cytotoksycznych oraz przeciwbakteryjnych.

Badanie powinowactwa peptydomimetyków do receptorów opioidowych przeprowadzono metodą kompetycyjnego wiązania radioligandów. Badania te wykazały wysokie powinowactwo peptydomimetyków **APL1-4** do receptora opioidowego μ . Ponieważ zdolność wiązania peptydomimetyków do receptorów opioidowych mogła być jednym ze sposobów oddziaływania związków z komórkami, oznaczono obecność receptorów μ na powierzchni wszystkich typów badanych komórek. Badanie testem immunoenzymatycznym potwierdziło obecność receptorów opioidowych μ na wszystkich badanych komórkach. Dodatkowo wykazano, że badane peptydomimetyki charakteryzują się wysoką stabilnością w ludzkim osoczu, niską aktywnością hemolityczną oraz nie posiadają właściwości przeciwbakteryjnych.

Główny etap pracy stanowiły badania aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych peptydomimetyków prowadzone w warunkach *in vitro*. W badaniach wykorzystano trzy linie komórkowe ludzkiego przewodowego gruczolaka trzustki (PDAC): PANC-1 oraz dwie linie wyprowadzone z fragmentów guzów PDAC pobranych od pacjentów poddanych resekcji zmian nowotworowych trzustki (M-DS i M-Sr). Jako kontrolę wykorzystano linię prawidłowych fibroblastów ludzkich (BJ). Ocenę żywotności komórek poddanych działaniu peptydomimetyków **APL1-4** przeprowadzono w dwu- i trójwymiarowym modelu raka trzustki *in vitro*.

Badania w modelu dwuwymiarowym wykazały, że peptydomimetyki wpływają na żywotność komórek w sposób zależny od czasu i stężenia. W pierwszej kolejności, oddziaływanie na żywotność komórek oceniano dla gemcytabiny, będącej substancją kontrolną. Wykazano, że największą wrażliwością na działanie GEM charakteryzowały się komórki BJ i M-DS, najbardziej odporne były zaś komórki M-Sr. Następnie zbadano wpływ peptydomimetyków na żywotność komórek. Najlepszą aktywnością charakteryzował się związek **APL1**, który był szczególnie toksyczny dla prawidłowych fibroblastów BJ. Związki **APL2** i **APL3** cechowały się wysoką aktywnością przeciwnowotworową oraz umiarkowaną toksycznością wobec prawidłowych fibroblastów. Najniższą aktywność obserwowano dla

związku **APL4**. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że już 24 godz. ekspozycja badanych komórek na działanie peptydomimetyków powoduje większy spadek ich żywotności niż gemcytabina.

Przed rozpoczęciem badań z wykorzystaniem modelu trójwymiarowego sprawdzono zdolność komórek do tworzenia sferoidów, wykorzystując metodę wiszącej kropli. Sferoidy formowały jedynie wyizolowane komórki nowotworowe (M-DS i M-Sr).

Doświadczenia przeprowadzone w modelu trójwymiarowym *in vitro* wykazały, że aktywność peptydomimetyków **APL1-4** była zależna od stężenia oraz w mniejszym stopniu od czasu ekspozycji. Niezależnie od czasu inkubacji, najwyższą aktywność wykazywały związki **APL1-3**. Aktywność związku **APL4** była zależna od czasu inkubacji. Odnotowano natomiast, bardzo niską aktywność GEM wobec sferoidów nowotworowych.

Przeprowadzono również ocenę skojarzonego wpływu gemcytabiny i peptydomimetyku **APL2** lub **APL3** na żywotność badanych komórek. W modelu 2D zaobserwowano, że tylko kombinacja GEM z peptydomimetykiem **APL2** powodowała większy spadek żywotności komórek niż zastosowanie samej GEM. Efekt ten był obserwowany wyłącznie po 24 godz. ekspozycji. Natomiast badanie w modelu 3D wykazało, że jednoczesne zastosowanie GEM i peptydomimetyku **APL2** lub **APL3** istotnie obniża żywotność sferoidów. Efekt ten był niezależny od czasu ekspozycji.

Podsumowując, otrzymane peptydomimetyki **APL1-4** charakteryzują się wysokim powinowactwem do receptorów opioidowych μ , są stabilne enzymatycznie i nie wywołują hemolizy. Badane związki wykazują dobrą aktywność przeciwnowotworową, która jest zależna od stężenia oraz czasu ekspozycji. Spadek żywotności komórek poddanych działaniu peptydomimetyków **APL1-4** był obserwowany zarówno w modelu dwu-, jaki i trójwymiarowym. Badane peptydomimetyki okazały się toksyczne również dla prawidłowych fibroblastów. Uzyskane wyniki wskazują, że w celu uzyskania związków działających bardziej specyficznie na komórki nowotworowe, struktura badanych peptydomimetyków powinna ulec dalszym modyfikacjom.

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma is a malignant disease with a poor prognosis. Early diagnosis is difficult as most patient remains asymptomatic until an advanced stage of the disease. Chemotherapy mostly consists of gemcitabine or FOLRIRINOX. However, standard treatment is often ineffective and several clinically important side effects can occur. Therefore, there is an urgent need for novel anticancer agents with an improved activity profile. One of the possibility to achieve such is to use peptidomimetic compounds that possess the affinity towards specific receptors located on the tumor cells' surface of the pancreas and which additionally demonstrate antitumor activity.

The aim of this study was to investigate biological properties and antitumor activity of peptidomimetics with the affinity to opioid receptors in the two- and three-dimensional experimental *in vitro* model of pancreatic cancer. It has been hypothesized that by hybridizing an opioid peptide with a cinnamic acid derivative a stable peptidomimetic with anticancer properties can be obtained.

Based on the structures of opioid compounds obtained and described by Prof. Lipkowski, a series of peptidomimetics (**APL1-4**) with the peptide fragments hybridized with a piperazine linker and a cinnamic acid derivative were designed. Obtained peptidomimetics consist of N-terminally located tripeptides based on the N-terminal amino acid sequence of natural opioid peptides - dermorphin (i.e., Tyr-D-Ala-Phe (**APL1**), Tyr-D-Thr-Phe (**APL2**), Tyr-D-Ala-Trp (**APL3**), Tyr -D-Thr-Trp (**APL4**)) and the lipophilic *trans*-cinnamylpiperazine C-terminal fragment (Fig.1).

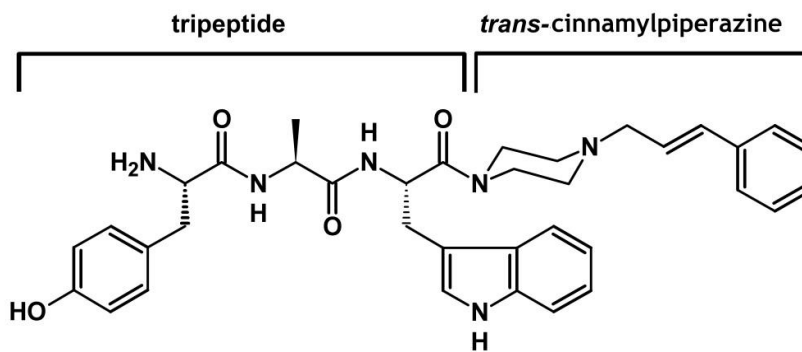


Fig.1. structure of peptidomimetic **APL2**

In the first stage of the study the tested peptidomimetics were studied for their enzymatic stability in human plasma. Furthermore, a determination of their affinity to μ opioid receptors was performed as well as experiments aimed at evaluating the peptidomimetics' hemolytic, cytotoxic and antibacterial properties.

The ability of peptidomimetics to bind to opioid receptors was determined using a competitive radioligand binding assay. This study confirmed a high affinity of peptidomimetics **APL1-4** to the μ opioid receptors. Assuming that the test peptidomimetics can interact with the tumor cells through their strong binding affinity towards opioid receptors, the presence of μ receptors on the surface of all types of cells was also determined. Indeed, the immunoenzymatic assay confirmed the presence of μ opioid receptors for all cells tested. In addition, it was reported that the peptidomimetics are characterized by high stability in human plasma, thus remain resistant to proteolytic activity, exert low hemolytic activity and do not possess antibacterial properties.

The main purpose of this research was to determine the antitumor activity of the peptidomimetics tested. Three human pancreatic adenocarcinoma (PDAC) cell lines were used in this study: PANC-1 and two lines derived from fragments of PDAC tumors obtained from patients undergoing pancreatic tumor resection (M-DS and M-Sr). A cell line of normal human fibroblasts (BJ) was used as a control. Evaluation of the viability of cells treated with peptidomimetics **APL1-4** was performed in a two- and three-dimensional *in vitro* model of pancreatic cancer.

Experiments in two-dimensional model have shown that peptidomimetics affect the cell viability in a time- and concentration-dependent manner. First, as a control substance, the effect of gemcitabine on the cell viability was evaluated. It was shown that BJ fibroblasts and M-DS tumor cells were characterized by the highest sensitivity to GEM while M-Sr tumor cells were the most resistant. The effect of peptidomimetics on the cell viability was then examined. Compound **APL1** was characterized by the best activity. Unfortunately, this molecule was found extremely toxic to normal fibroblasts. Compounds **APL2** and **APL3** were characterized by high anticancer activity and moderate toxicity to normal fibroblasts. The lowest anticancer activity was observed for compound **APL4**. Experiments have shown

that 24 h incubation with peptidomimetics caused a greater decrease in the cell viability than gemcitabine itself after the same time.

Prior to three-dimensional *in vitro* model studies, the ability of cells to form spheroids was tested. Using the hanging drop method, it was found that only isolated tumor cells (M-DS and M-Sr) are capable of forming spheroids. Experiments carried out in 3D *in-vitro* model showed that the activity of peptidomimetic **APL1-4** was depended on the concentration and to a lesser extent on exposure time. Regardless of the incubation time, compounds **APL1-3** exhibited the highest anticancer activity. The activity of compound **APL4** was time dependent. However, a very low GEM activity against tumor spheroids has been reported.

An assessment of the combined effect of gemcitabine and peptidomimetic **APL2** or **APL3** on the viability of the test cells was also performed. In the 2D *in vitro* model, it was observed that only the combination of GEM and peptidomimetic **APL2** resulted in a higher decrease in cell viability than in case of GEM alone. This effect was observed only after 24 h of incubation. On the other hand, the 3D *in vitro* model study showed that the simultaneous use of GEM and peptidomimetic **APL2** or **APL3** significantly reduces the spheroids viability; this effect was not time independent.

In summary, the peptidomimetics **APL1-4** tested possess desired properties as a high affinity for μ opioid receptors, enzymatic stability and lack of hemolytic activity were obtained. Additionally, the compounds show good anticancer activity which depends on concentration and time of exposure. The decrease in the viability of cells treated with peptidomimetics **APL1-4** was observed in both the two- and three-dimensional models. Unfortunately, it was revealed that the peptidomimetics were also toxic to normal fibroblasts. The obtained results indicate that in order to obtain compounds with specific anticancer activity, the structure of the peptidomimetics should undergo further modifications.

INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Synteza związków zawierających fragment peptydowy (oparty na strukturze peptydów opioidowych) połączony linkerem piperazynowym z pochodną kwasu cynamonowego (Peptydomimetyki **APL1-4**)
2. Wprowadzenie do badań trójwymiarowego modelu *in vitro* z zastosowaniem niemodyfikowanych komórek nowotworowych pochodzących z guzów pacjentów
3. Porównanie działania cytotoksycznego otrzymanych peptydomimetyków do stosowanych w terapii leków, w dwu- i trójwymiarowym modelu *in vitro*

WYKAZ SKRÓTÓW

5-dUMP –fosfodeoksyrybonukleotyd

5-FU - 5-fluorouracyl, fluorouracyl

ACP - peptydy przeciwnowotworowe

ADP - adenozy-5'-difosforan

Ala - alanina

AMP - peptydy przeciwbakteryjne

Arg - arginina

ATP - adenozynotrifosforan

ATCC - Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych

BJ - linia komórkowa ludzkich, normalnych fibroblastów

CA 19-9 - antygen węglowodanowy 19-9

CK-7 - cytokeratyna 7

CPP - peptydy penetrujące komórki

CSC - nowotworowe komórki macierzyste

CT - tomografia komputerowa

CYN - trans-1-cynamoilopiperazyna

DCM - dichrometan

DIPEA - N,N-diizopropylodetyloamina

DMEM - pożywka hodowlana wg Dulbecco

DMF - dimetyloformamid

ECACC - Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych

ECM - macierz zewnątrzkomórkowa

EGFR - receptor naskórkowego czynnika wzrostu

Ekw. - ekwiwalent

EMEM - pożywka hodowlana wg Eagle'a

EUS - ultrasonografia endoskopowa, endosonografia

EUS-FNAB - cienkoigłowa biopsja celowana pod kontrolą endosonografii

FBS - cieleńca surowica płodowa

FUTP - trifosforan fluorourydyny

GEM - gemcytabina

Gly - glicyna

GNAS - białka wiążące nukleotydy guaninowe

HCTU - heksafluorofosforan O-(1H-6-chlorobenzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy

HOBt - N-hydroksybenzotriazol

IPMN - wewnątrzprzewodowy brodawkowaty nowotwór

KRAS - wirusowy onkogen szczurzego mięsaka Kirstena

Lys - lizyna

MCN - śluzowe nowotwory torbielowate

MOR - receptor opioidowy μ

MRI - obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

MTS - sól tetrazolowa 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

NCTC - Narodowa Kolekcja Szczepów Hodowlanych

NEC - rak neuroendokryny

NET - guz neuroendokryny

OGF - opioidowy czynnik wzrostu, Met-enkefalina

p16/CDKN2A - cyklinozależny inhibitor kinazy p16

PANC-1 - linia komórkowa ludzkiego przewodowego gruczołakoraka trzustki

PanIN - śródnabłonkowa neoplazja trzustkowa
PBS - bufor fosforanowy
PDAC - przewodowy gruczolakorak trzustki
PDGF - płytkowy czynnik wzrostu
PEI - polietylenoimina
PFA – paraformaldehyd
Phe - fenyloalanina
Pro - prolina
RP-HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych
RNF43 - błonowa ligaza E3 ubikwityny
Ser - seryna
SPPS - synteza peptydów w fazie stałej
TBTU - tetrafluoroboran 2-(1H-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametyloaminowy
TIS - triizopropylosilan
TFA - kwas trifluorooctowy
TFE - trifluoroetanol
TGF- α - transformujący czynnik wzrostu α
TGF- β - transformujący czynnik wzrostu β
TMB - 3,3',5,5'-tetrametylobenzodyna
TNF- α - czynnik martwicy nowotworu α
TP53 - gen supresorowy p53
Thr - treonina
TRIS - tris(hydroksymetylo)aminometan
Trp - tryptofan
Tyr - tyrozyna

USG - ultrasonografia

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia

VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	vii
ABSTRACT	xi
INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	xv
WYKAZ SKRÓTÓW	xvii
1. WSTĘP.....	5
1.1. Rak trzustki – Etiologia i zmiany przednowotworowe	6
1.2. Epidemiologia i czynniki ryzyka raka trzustki	9
1.3. Diagnostyka raka trzustki	10
1.4. Współczesna farmakoterapia raka trzustki	12
1.4.1. Chemioterapia w raku trzustki.....	12
1.4.2. Kierunki poszukiwania nowych terapii raka trzustki	14
1.4.3. Wykorzystanie peptydów w terapiach przeciwnowotworowych	16
1.5. Opioidy w terapii przeciwnowotworowej	18
1.5.1. Opioidy jako substancje przeciwnowotworowe	18
1.6. Zastosowanie trójwymiarowych hodowli komórkowych w poszukiwaniu nowych leków	19
1.6.1. Rodzaje hodowli trójwymiarowych.....	20
1.6.2. Zastosowanie hodowli trójwymiarowych.....	22
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	24
3. MATERIAŁY I METODY	25
3.1. Synteza związków	25
3.1.1. Synteza i oczyszczanie peptydomimetyków	25
3.1.2. Synteza i oczyszczanie tripeptydów	26
3.2. Badanie stabilności proteolitycznej peptydomimetyków w ludzkim osoczu <i>in vitro</i>	27
3.3. Oznaczenie powinowactwa związków do receptorów opioidowych MOR	27
3.4. Oznaczenie aktywności hemolitycznej związków	28
3.5. Oznaczenie właściwości przeciwbakteryjnych peptydomimetyków.....	29
3.6. Linie komórkowe	30
3.7. Izolacja komórek z materiału klinicznego.....	30
3.8. Charakterystyka fenotypowa komórek nowotworowych	31

3.9. Oznaczenie obecności receptorów opioidowych μ na powierzchni komórek	31
3.10. Hodowla komórek w modelu trójwymiarowym - sferoidy	32
3.11. Badanie wpływu związków na żywotność komórek	33
3.11.1. Badanie wpływu związków na żywotność komórek w modelu dwuwymiarowym.....	33
3.11.2. Badanie wpływu związków na żywotność komórek nowotworowych w modelu trójwymiarowym.....	34
3.12. Badanie skojarzonego działania peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność komórek	35
3.13. Analiza statystyczna.....	36
4. WYNIKI	37
4.1. Charakterystyka otrzymanych związków	37
4.2. Charakterystyka właściwości badanych związków	38
4.2.1. Stabilność peptydomimetyków	38
4.2.2. Powinowactwo związków do receptora opioidowego MOR	39
4.2.3. Aktywność hemolityczna badanych związków	40
4.2.4. Właściwości przeciwbakteryjne peptydomimetyków	41
4.3. Charakterystyka komórek wyizolowanych z materiału klinicznego.....	41
4.4. Charakterystyka sferoidów	45
4.5. Właściwości biologiczne badanych związków	46
4.5.1. Wpływ gemcytabiny na żywotność komórek	47
4.5.2. Wpływ związku APL1 na żywotność komórek	48
4.5.3. Wpływ związku APL2 na żywotność komórek	49
4.5.4. Wpływ związku APL3 na żywotność komórek	50
4.5.5. Wpływ związku APL4 na żywotność komórek	51
4.5.6. Wpływ tripeptydów i <i>trans</i> -cynamoilopiperazyny na żywotność komórek	52
4.6. Wpływ peptydomimetyków na żywotność komórek w modelu trójwymiarowym	56
4.6.1. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność sferoidów M-DS.....	56
4.6.2. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność sferoidów M-Sr	57
4.7. Wpływ wzajemnego oddziaływania peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych.....	59
4.7.1. Wpływ wzajemnego oddziaływania związków w modelu dwuwymiarowym	59
4.7.2. Wpływ wzajemnego oddziaływania związków w modelu trójwymiarowym.....	65
4.8. Porównanie wyników uzyskanych w modelach dwu- i trójwymiarowym	68

4.8.1. Wpływ związków na komórki nowotworowe M-DS w modelu dwu- i trójwymiarowym	69
4.8.2. Wpływ związków na komórki nowotworowe M-Sr w modelu dwu- i trójwymiarowym..	72
4.9. Podsumowanie otrzymanych wyników	75
5. DYSKUSJA.....	80
5.1. Właściwości otrzymanych związków.....	80
5.2. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność komórek w modelu dwuwymiarowym.....	82
5.2.1. Wpływ peptydomimetyków na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych....	82
5.2.2. Wpływ gemcytabiny na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych	84
5.3. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność komórek w modelu trójwymiarowym	85
5.3.1. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność sferoidów	85
5.4. Interakcja gemcytabiny z peptydomimetykami w działaniu na komórki prawidłowe i nowotworowe w modelach dwu- i trójwymiarowym.....	87
5.4.1. Interakcja gemcytabiny z peptydomimetykami w działaniu na komórki prawidłowe i nowotworowe w modelach dwuwymiarowym.....	87
5.4.2. Interakcja gemcytabiny z peptydomimetykami w działaniu na komórki prawidłowe i nowotworowe w modelu trójwymiarowym.....	89
5.5. Różnice w odpowiedzi komórek na działanie peptydomimetyków i gemcytabiny w modelach dwu- i trójwymiarowym	89
5.5.1. Różnice w oddziaływaniu peptydomimetyków na komórki w modelu dwu- i trójwymiarowym	89
5.5.2. Różnice w oddziaływaniu gemcytabiny na komórki w modelu dwu- i trójwymiarowym ...	91
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	92
7. LITERATURA	93

1. WSTĘP

Przewodowy gruczolakorak trzustki to złośliwy nowotwór o bardzo złym rokowaniu. Wywodzi się z komórek nabłonkowych przewodów trzustki i jest najczęściej występującym rodzajem nowotworu tego narządu [1]. W wielu przypadkach nowotwór rozwija się bezobjawowo, co skutkuje diagnozą w zaawansowanym stadium choroby. Obecnie najskuteczniejszą metodą leczenia jest chirurgiczne usunięcie guza. Ze względu na późną diagnozę i przerzuty, do zabiegu kwalifikuje się jedynie 20% pacjentów [2]. Leczenie farmakologiczne (chemioterapia) opiera się przede wszystkim na zastosowaniu gemcytabiny lub FOLFIRINOXu. Niestety terapia jest często nieskuteczna i obciążona uciążliwymi działaniami niepożądanymi [3]. Z tego powodu tak ważne jest poszukiwanie nowych leków przeciwnowotworowych, selektywnie oddziałujących na wybrane aspekty biologii nowotworu. Jedną z możliwości jest terapia lekami peptydowymi, które cechują się wysoką specyficznością oraz niską toksycznością w stosunku do prawidłowych komórek. Efekt ten jest spowodowany silnym wiązaniem się leku z właściwym dla niego receptorem [4]. Wadą leków peptydowych jest ich niska stabilność proteolityczna skutkująca krótkim czasem aktywności. W celu zwiększenia odporności na działanie enzymów proteolitycznych projektuje się peptydomimetyki, zmodyfikowane chemicznie analogi peptydów, które wykazują dobrą aktywność biologiczną oraz wyższą stabilność w warunkach fizjologicznych [5,6].

Wykazano, że związki o właściwościach analgetycznych mogą również wykazywać aktywność przeciwnowotworową. Przykładem takiego związku jest Met-enkefalina, endogenny opioid, wykazujący aktywność przeciwo proliferacyjną wobec komórek nowotworowych trzustki [7]. Zwiększoną selektywność i aktywność peptydów jako leków przeciwnowotworowych można uzyskać dzięki modyfikacjom struktury związku, np. przez wprowadzenie grup lipofilowych [8]. Naukowcy udowodnili, że wprowadzenie lub dołączenie grupy lipofilowej do struktury neuropeptydów (np. Met-enkefaliny) może powodować istotne zahamowanie proliferacji komórek raka trzustki oraz zwiększyć stabilność związku. Badania wykazały, że opioidowy peptydomimetyk, bifalina, podobnie jak Met-enkefalina posiada właściwości przeciwbólowe i przeciwnowotworowe [9]. W

literaturze znajduje się również wiele doniesień o przeciwnowotworowych właściwościach kwasu cynamonowego i jego pochodnych oraz o tym, że mogą one łatwo przenikać przez błony komórkowe [10-12].

Na podstawie powyższych informacji postawiono hipotezę, że łącząc fragment peptydu opioidowego z pochodną kwasu cynamonowego można otrzymać stabilny peptydomimetyk o właściwościach przeciwnowotworowych. W oparciu o struktury związków opioidowych opisanych przez Prof. Lipkowskiego [142], zaprojektowano serię peptydomimetyków, w których fragmenty peptydowe połączone są z *trans*-cynamoilopiperazyną, będącą pochodną kwasu cynamonowego.

Celem niniejszej pracy było zbadanie właściwości biologicznych oraz aktywności przeciwnowotworowej uzyskanych peptydomimetyków w dwu- i trójwymiarowym modelu raka trzustki.

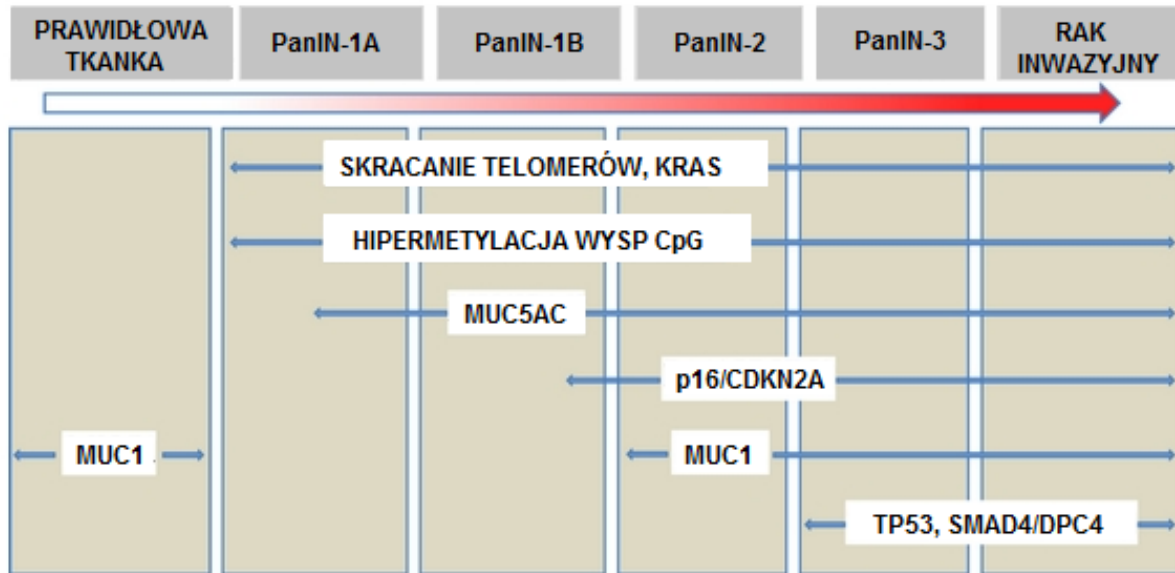
1.1. Rak trzustki – Etiologia i zmiany przednowotworowe

Rak trzustki to zmiana patologiczna wywodząca się z komórek wewnątrz- lub zewnątrzwydzielniczej części trzustki. Ponad 95% wszystkich przypadków raka trzustki dotyczy jej części egzokrynej. Nowotwory części zewnątrzwydzielniczej to najczęściej guzy lite, złośliwe, dające przerzuty do wątroby lub sąsiadujących węzłów chłonnych [13,14]. Najczęściej występującym nowotworem trzustki jest przewodowy gruczolakorak, zwany też rakiem przewodowym (PDAC). Stanowi on blisko 85% wszystkich przypadków nowotworów tego narządu [15,16]. PDAC rozwija się z komórek nabłonkowych przewodów wydzielniczych, głównie w głowie trzustki (70%), rzadziej umiejscawia się w trzonie (20%) lub ogonie (10%) trzustki [17]. Charakterystyczną cechą PDAC jest podścielisko guza, tworzące jego mikrośrodowisko. Badania wykazały, że w raku przewodowym, komórki nowotworowe mogą stanowić jedynie 10% całkowitej masy guza. Poza komórkami rakowymi podścielisko guza tworzą między innymi fibroblasty, trzustkowe komórki gwiaździste, makrofagi oraz komórki tuczne [18,19]. Aktywacja fibroblastów i komórek gwiaździstych obserwowana jest już w stadiach przednowotworowych, co prowadzi do wytwarzania dużych ilości składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang.

extracellular matrix), np. kwasu hialuronowego, kolagenu i fibronektyny, jak również dużej liczby czynników wzrostu oraz białek pogranicza macierzy i komórek (ang. *matricellular proteins*). Białka te określają właściwości biofizyczne i biochemiczną złożoność komórek nabłonkowych. Nienowotworowe elementy podścieliska odpowiadają za stymulację proliferacji komórek nowotworowych, zdolności do tworzenia przerzutów oraz proces angiogenezy [20-22]. Gęste, zbite podścielisko oraz ubogie unaczynienie prowadzi do hipoksji i deficytów składników odżywczych we wnętrzu guza. Hipoksja jest ściśle skorelowana ze wzrostem agresywności oraz nasileniem przejścia epitelialno-mezenchymalnego, co z kolei inicjuje powstawanie przerzutów [23,24]. Przyjmuje się, że PDAC rozwija się powoli wraz z postępującym nagromadzeniem mutacji genetycznych, nazywanym śródnabłonkową neoplazją trzustkową (PanIN) (Ryc.1). PanIN jest to zazwyczaj płaska lub brodawkowata, bezobjawowa zmiana, która wywodzi się z małych przewodów trzustkowych. PanIN tworzą komórki wytwarzające mucyny o atypii cytologicznej i architektonicznej różnego stopnia.

Wyróżnia się trzy klasy PanIN o wzrastającym ryzyku rozwoju nowotworu inwazyjnego. Podczas gdy neoplazja niskiego stopnia (PanIN-1) wiąże się z minimalną atypią cytologiczną i architektoniczną, neoplazja umiarkowanego stopnia (PanIN-2) jest tożsama z umiarkowaną atypią cytologiczną i architektoniczną, zaś neoplazja wysokiego stopnia (PanIN-3) - z nasilonymi zmianami cytologicznymi i architektonicznymi, i określana jest jako rak *in situ* [25,26].

Najczęściej występującą mutacją w PDAC jest mutacja onkogenu KRAS, obecna w ponad 90% wszystkich przypadków nowotworu. KRAS koduje białko uczestniczące w aktywacji kaskady szlaków sygnałowych [27]. Jednym z nich jest szlak sygnałowy receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Szlak ten reguluje proliferację i transformację nowotworową komórek. Aktywacja EGFR powoduje wzmożoną proliferację z jednoczesnym zahamowaniem apoptozy nieprawidłowych komórek [28]. Pojawiające się mutacje somatyczne genów supresorowych, takich jak p16/CDKN, p53 prowadzą do transformacji nabłonka, a w konsekwencji do progresji gruczolaka. [16,29-31].



Ryc. 1. Mutacje genetyczne występujące w modelu progresji PanIN do PDAC [25].

Rzadziej rak trzustki rozwija się z wewnątrzprzewodowego brodawkowatego nowotworu śluzowego (IPMN) lub śluzowego nowotworu torbielowatego (MCN). IPMN wywodzi się z nabłonka śluzowego wyściełającego przewód Wirsunga lub jego większe odgałęzienia. IPMN najczęściej lokalizuje się w głowie trzustki. Nowotwór ten wykazuje dużą zmienność w liczbie struktur brodawkowatych nabłonka, produkcji mucyn i śluzu oraz stopnia poszerzenia przewodu. IPMNs stanowią heterogenną grupę, w której część zmian ma charakter łagodny, inne natomiast mogą być zmianami złośliwymi [16,25]. Rozrastający się nabłonek oraz gromadzący się gęsty śluz powodują niedrożność przewodu, a w konsekwencji jego powiększenie, co jest widoczne w badaniach obrazowych. IPMN często nie daje objawów we wczesnych stadiach. W późniejszych stadiach mogą występować bóle brzucha i żółtaczka, będące wynikiem niedrożności przewodów trzustkowych [32,33].

Najrzadszym prekursorem PDAC są torbielowe nowotwory śluzowe - MCN. Są to najczęściej łagodne, wolno rosnące, bezobjawowe, jednoogniskowe zmiany, które powstają w trzonie lub ogonie trzustki [25,34]. MCN tworzy wysoki nabłonek walcowaty wydzielający śluz. MCN mogą być jedno- lub wielotorbielowe, a torbiele nie posiadają łączności z przewodami trzustki. Powstałe torbiele mają gładką powierzchnię i włóknistą pseudootoczkę. Ze względu na brak objawów, MCN diagnozowane są zwykle przy

badaniach wykonywanych z innych wskazań. Najskuteczniejszą metodą leczenia jest chirurgiczne usunięcie torbieli [35].

1.2. Epidemiologia i czynniki ryzyka raka trzustki

Według statystyk liczba zgonów z powodu nowotworów spada, niestety jednak w przypadku raka trzustki śmiertelność utrzymuje się na wysokim poziomie z tendencją wzrostową w kolejnych latach [16]. Zapadalność na raka trzustki w Europie Zachodniej i USA wynosi około 10 przypadków na 100 tys. osób. W Stanach Zjednoczonych rak trzustki stanowi czwartą przyczynę zgonów spowodowanych chorobą nowotworową [36]. Naukowcy przewidują, że w 2030 roku rak trzustki znajdzie się na drugim miejscu pod względem umieralności spowodowanej nowotworami [37]. Ponad 70% pacjentów z rakiem trzustki umiera w ciągu roku od diagnozy, natomiast wskaźnik 5-letniego przeżycia wynosi zaledwie 4-6%.

Występowanie nowotworów trzustki różni się pomiędzy regionami świata. Najwięcej zachorowań i zgonów odnotowuje się w krajach rozwiniętych, w Stanach Zjednoczonych oraz krajach Europy zachodniej. Najniższe wskaźniki zapadalności i umieralności z powodu nowotworów trzustki obserwuje się w krajach Afryki środkowej i południowo-centralnej Azji [36,38,39]. Prawdopodobieństwo wystąpienia choroby jest wyższe u osób, u których w rodzinie występowały przypadki nowotworów [40,41] oraz u palaczy. Związek pomiędzy rozwojem choroby a paleniem tytoniu jest najlepiej zbadany i udokumentowany [42,43]. Badania sugerują również podwyższone ryzyko zachorowania u osób z otyłością [44], cukrzycą typu 2 [45] oraz przewlekłym zapaleniem trzustki [46]. Do czynników ryzyka należy także spożywanie alkoholu [47,48] oraz podeszły wiek [15,39]. Osoby, u których występuje podwyższone ryzyko wystąpienia raka trzustki powinny być regularnie poddawane badaniom kontrolnym. Niestety obecnie nie ma ustalonego modelu monitorowania tych osób. Nie ma też dobrego schematu badań przesiewowych, które umożliwiłyby wczesne wykrycie choroby.

1.3. Diagnostyka raka trzustki

Prawidłowa diagnoza nowotworów trzustki stanowi wyzwanie dla lekarzy. Większość pacjentów przez długi czas nie wykazuje objawów, co znacznie utrudnia postawienie diagnozy i wdrożenie leczenia. Objawy, jeżeli występują, są bardzo niespecyficzne. Najczęściej są to: nudności, bóle brzucha, utrata apetytu, spadek masy ciała, świąd skóry, gorączka czy biegunka. U niektórych pacjentów może rozwinąć się cukrzyca typu 2 lub żółtaczka. Niestety brak wczesnych, specyficznych objawów przekłada się na późne rozpoznanie. Średni wiek pacjenta w momencie diagnozy wynosi 71 lat [16,26,49]. Diagnoza stawiana jest na podstawie badań obrazowych oraz histopatologicznych.

Zazwyczaj pierwszym badaniem jakiemu poddawany jest pacjent z podejrzeniem zmian patologicznych w trzustce jest **ultrasonografia (USG)**. USG jest metodą czułą, ale niespecyficzną. Na podstawie jej wyniku nie można określić stopnia zaawansowania choroby czy naciekania na naczynia krwionośne. Metoda ta znacznie lepiej sprawdza się w przypadku wykrywania zmian usytuowanych w głowie trzustki niż odpowiednio w trzonie lub ogonie. Na słabą wykrywalność guzów trzustki metodą USG może wpływać wiele czynników takich, jak: nagromadzenie płynu w jamie otrzewnowej, guzy żołądka lub jelit czy tkanka tłuszczowa u pacjentów otyłych [50]. Bardziej precyzyjną nieinwazyjną techniką diagnostyki obrazowej jest **ultrasonografia endoskopowa (endosonografia, EUS)**. Jest to metoda bardzo czuła i specyficzna [51]. Wykrywalność drobnych zmian nowotworowych (<2 cm) wynosi ok. 90% [52]. EUS ma kluczowe znaczenie dla dokładnej przedoperacyjnej oceny raka trzustki. Wysoka negatywna wartość predykcyjna EUS pozwala wykluczyć raka trzustki u pacjentów ze zmianami patologicznymi trzustki. Pod kontrolą EUS można przeprowadzić ponadto celowaną biopsję cienkoigłową (EUS-FNAB), która niesie ze sobą niewielkie ryzyko powikłań (2%). Wynik EUS-FNAB stanowi uzupełnienie podstawowych badań takich jak USG czy rezonans magnetyczny [53]. Kolejną metodą diagnostyczną jest **tomografia komputerowa (CT) jamy brzusznej**, która służy zarówno do rozpoznaniu guza, jak i oceny stopnia jego zaawansowania oraz resekcyjności. Metoda cechuje się wysoką pozytywną wartością predykcyjną, czułością i specyficznością. Czułość CT, w przypadku zmian >1,5 cm średnicy, jest wysoka i wynosi ok 90% i 67% - w przypadku zmian o wielkości <1,5 cm. [54,55]. U pacjentów, u których badanie USG lub CT nie dało

jednoznacznych rezultatów można zastosować obrazowanie metodą **rezonansu magnetycznego** (MRI).

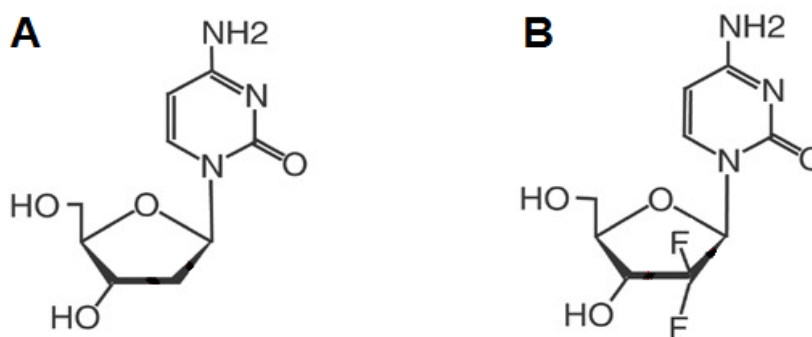
Istotnie, MRI i CT cechują się zbliżoną czułością w wykrywaniu i ocenie zaawansowania zmiany. MRI jest lepszym narzędziem diagnostycznym w przypadku guzów torbielowatych. Badanie trzustki magnetycznym rezonansem wykonuje się zwykle przy podawaniu dożylnym środka kontrastującego. MRI jest bezpieczniejszym badaniem niż CT i może być wykonywane kilkakrotnie. Niestety MRI nie może być przeprowadzone u pacjentów z rozrusznikiem serca [50,55]. Same badania obrazowe są niewystarczające do postawienia diagnozy. Ostateczna diagnoza i rozpoznanie dokonywane jest na podstawie wyników biopsji. Materiał do badania histopatologicznego pobierany jest zazwyczaj metodą EUS-FNAB. Pobranie materiału odpowiedniej jakości jest skomplikowanym zadaniem ze względu na umiejscowienie trzustki w jamie brzusznej. W uzyskaniu prawidłowego biopratu wiele zależy od wiedzy i doświadczenia osoby wykonującej biopsję. Obraz cytologiczny jest charakterystyczny dla poszczególnych zmian. Przykładowo w PDAC rozmiar i stopień atypii komórek jest zróżnicowany. Chromatyna ma obraz drobnoziarnisty, a kontury komórek są bardzo nieregularne [56,57]. Z kolei dla IPMN charakterystyczne są brodawkowe układy komórek produkujących śluz [32].

Obecnie brak jest markerów nowotworowych specyficznych dla raka trzustki. Wprawdzie głównym markerem nowotworowym oznaczanym u pacjentów z podejrzeniem nowotworu jest antygen węglowodanowy **CA 19-9**. Antygen ten jest jednak wytwarzany zarówno przez prawidłowe, jak i nowotworowe komórki układu pokarmowego. U osób zdrowych stężenie CA 19-9 w surowicy nie przekracza 37 U/ml. Należy podkreślić, że zmiany stężenia tego antygeny występują również w przypadku podejrzenia innych nowotworów przewodu pokarmowego [58]. Oznaczenie CA 19-9 - jako badanie przesiewowe - nie znajduje zastosowania u pacjentów, u których nie występują objawy. Nawet w przypadku pacjentów z podejrzeniem raka trzustki, podwyższone stężenie CA 19-9 nie jest jednoznaczne z wystąpieniem choroby. Oznaczenie stężenia tego antygeny znacznie lepiej sprawdza się w określeniu stadium i operacyjności zmiany nowotworowej. Wykazano również, że pooperacyjne stężenie antygeny koreluje z rokowaniem [59,60].

1.4. Współczesna farmakoterapia raka trzustki

1.4.1. Chemioterapia w raku trzustki

Dobór chemioterapii zależy przede wszystkim od stanu sprawności i wydolności pacjenta. Podeszły wiek pacjentów często ogranicza lub uniemożliwia dobranie właściwej terapii. Złotym standardem w chemioterapii raka trzustki jest **gemcytabina** (GEM). Jest to lek cytostatyczny, należący do grupy antymetabolitów pirymidynowych. GEM jest analogiem deoksycytydyny, w którym atomy wodoru przy węglu C2' zastąpiono atomami fluoru (Ryc.2). Gemcytabina jest lekiem fazowo-specyficzny, działającym w fazie S cyklu komórkowego.



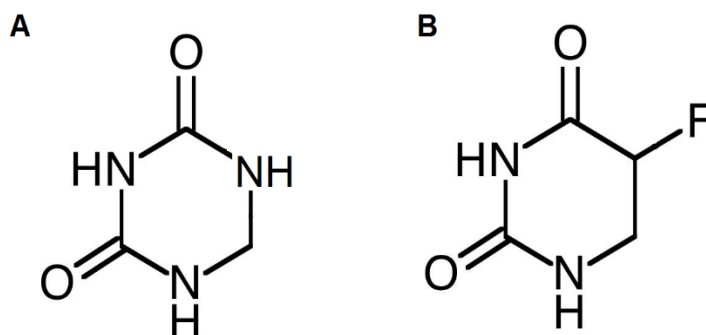
Ryc. 2. Struktury 2' deoksycytydyny (A) i gemcytabiny (B)

We wnętrzu komórki, GEM jest przekształcana do trifosforanu i difosforanu gemcytabiny. Polimeraza DNA wbudowuje trifosforan gemcytabiny do syntetyzowanej nici DNA. Difosforan gemcytabiny uniemożliwia działanie reduktazy rybonukleotydowej, powodując spadek stężenia deoksynukleotydów w komórce. Obydwa procesy hamują replikację DNA prowadząc do apoptozy komórki [61,62].

GEM jest transportowana do komórek poprzez ludzki równowagowy transporter nukleozydów 1 (hENT-1) [160,161]. Ekspresja hENT1 na powierzchni komórek nowotworowych może być niska, co przekłada się na odpowiedź komórek na działanie GEM

[63]. Gemcytabina może być stosowana samodzielnie lub w skojarzeniu np. z paksitakselem, cisplatiną czy erlotynibem [64-66].

Podobnie jak gemcytabina, lekiem cytostatycznym należącym do grupy antymetabolitów pirymidynowych jest **fluorouracyl** (5-fluorouracyl, 5-FU), będący fluorową pochodną uracylu, która również charakteryzuje się działaniem w fazie S cyklu komórkowego (Ryc.3).



Ryc. 3. Struktury uracylu (A) i fluorouracylu (B)

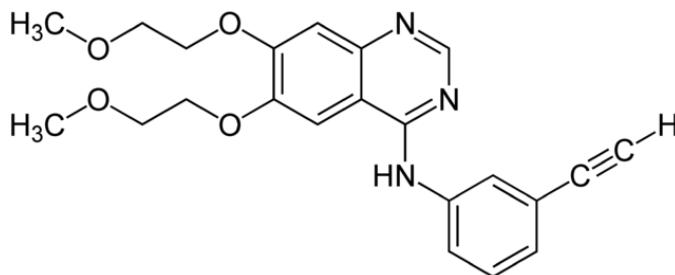
W komórce 5-FU jest przekształcany do fosfodeoksyrybonukleotydu (5-dUMP) i trifosforanu fluorourydy (FUTP). 5-dUMP blokuje syntetazę tymidylową, uniemożliwiając syntezę kwasu tymidynowego, a w rezultacie syntezę DNA. Z kolei FUTP blokuje fosfatazę uracylową, prowadząc do powstania nieprawidłowego RNA. Zahamowana synteza kwasów nukleinowych powoduje zaburzenie wzrostu, uszkodzenie i śmierć komórki [67]. Efekt działania 5-FU jest szczególnie widoczny w tkankach dobrze zróżnicowanych i szybko rosnących. Podany dożylnie przenika do wielu tkanek, np. szpiku kostnego, błony śluzowej przewodu pokarmowego i tkanki nowotworowej, a także przez barierę krew–mózg i łożysko [68].

W leczeniu raka trzustki, fluorouracyl stosowany jest jako element schematu terapeutycznego **FOLFIRINOX**. Jest to kombinacja chemioterapeutyków stosowanych w ściśle określonej kolejności. Schemat terapii oparty jest na zastosowaniu czterech substancji aktywnych, tj.:

- leukowirin (kwas folinowy, FOL) - pochodna witaminy B, łagodzi on działania niepożądane stosowania 5-FU;
- fluorouracyl (F) - antymetabolit pirymidynowy;
- irinotekan (IRIN) - inhibitor topoizomerazy, hamuje rozwijanie i powielanie nici DNA;
- oksaliplatyna (OX) - hamuje procesy naprawcze i syntezę DNA.

Ogólne przeżycie u pacjentów poddanych schematowi FOLFIRINOX jest dłuższe niż w przypadku zastosowania GEM. Schemat FOLFIRINOXu cechuje się jednak większą toksycznością niż terapia samym 5-FU czy GEM [69,70].

Pierwszym preparatem stosowanym w tzw. terapii celowanej raka trzustki jest Erlotinib (Ryc.4). Jest on inhibitorem kinazy tyrozynowej EGFR. Lek wiąże się kompetycyjnie z miejscem wiązania trifosforanu adenozy (ATP) receptora EGF, hamując tym samym wewnątrzkomórkową fosforylację EGFR. W efekcie tej blokady do komórek nowotworowych nie docierają sygnały konieczne do wzrostu, progresji i migracji. Skuteczność leku jest zatem zależna od poziomu ekspresji EGFR na powierzchni komórek nowotworowych. Przyjmowanie Erlotinibu wiąże się z mniejszą liczbą towarzyszących działań niepożądanych niż w przypadku stosowania GEM czy 5-FU. Erlotinib może być stosowany samodzielnie lub w skojarzeniu z GEM [71,72].



Ryc. 4. Struktura Erlotinibu

1.4.2. Kierunki poszukiwania nowych terapii raka trzustki

Złe rokowanie w raku przewodowym trzustki, związane z jego opornością na chemioterapię, nie uległo istotnej zmianie przez ostatnie trzy dekady [73]. Niestety

chemioterapia oparta głównie na GEM często nie przynosi satysfakcjonujących rezultatów. Poszukiwanie nowych leków, nawet celowanych molekularnie, jest bardzo skomplikowane ze względu na złożoność genetyczną i metaboliczną nowotworu trzustki. Faktem jest bowiem, iż –jak wskazują badania - w raku trzustki aż 12 szlaków sygnałowych może ulegać mutacji. Mutacje te występują w 67 - 100% guzów i dotyczą między innymi szlaków sygnałowych KRAS, transformującego czynnika wzrostu (TGF- β), Wnt, Notch oraz Hedgehog [74]. Dodatkowo szybki postęp choroby jest spowodowany tym, że mutacje te występują jednocześnie, a nie kolejno po sobie [75].

Obecnie prowadzone badania skupiają się między innymi na terapiach o specyficznym ukierunkowanym działaniu. Należą do nich m.in. przeciwciała monoklonalne, drobnocząsteczkowe inhibitory onkogenów i szlaków sygnałowych. Wykazanie kluczowej roli nowotworowych komórek macierzystych i mikrośrodowiska nowotworu trzustki ukierunkowało badania na poszukiwanie inhibitorów szlaków sygnałowych Hedgehog, Notch czy Wnt [76,77]. Ścieżki te pełnią istotną rolę w różnicowaniu, proliferacji i apoptozie komórek. Przykładem inhibitora ścieżki Notch jest Terextumab (antagonista Notch2/Notch3), który zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z GEM, hamował proliferację komórek nowotworowych [78]. Molekularnym celem terapeutycznym jest również receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF). Guzy trzustki są słabo unaczynione, ale aktywacja VEGFR może prowadzić do wzmożonej proliferacji i migracji komórek. Niestety, przeciwciała monoklonalne (bevacizumab) [79] czy rekombinowane białka fuzyjne (aflibercept) [80], blokujące aktywność receptora VEGF, okazały się nieskuteczne. Innym celem terapii są poszczególne elementy podścieliska guza, stanowiące barierę (fizyczną i chemiczną) utrudniającą leczenie. PEG-yłowana rekombinowana ludzka hialuronidaza (PEGPH20) degradowuje kwas hialuronowy (HA) obecny w macierzy guza. Degradacja HA może ułatwiać penetrację leków do wnętrza guza. Dobre rezultaty otrzymano w terapii skojarzonej PEGPH20 z FOLFIRINOX [81].

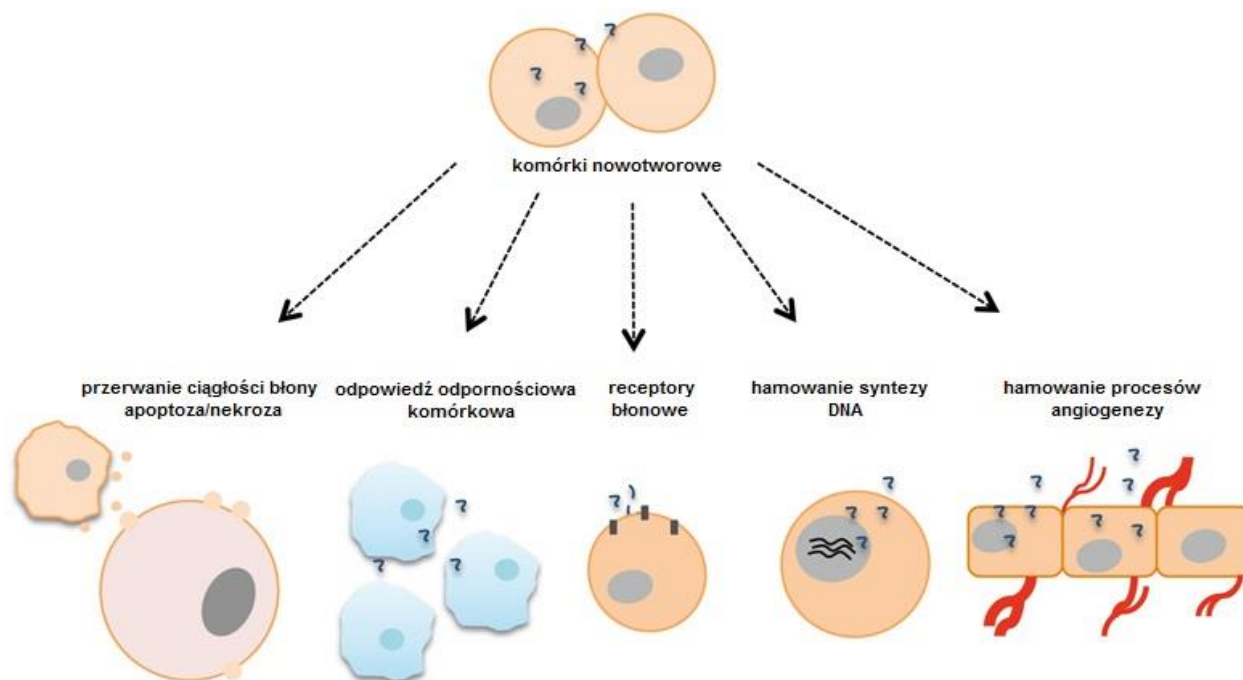
Przedstawione powyżej przykłady terapii ukierunkowanych stanowią jedynie ułamek wszystkich obecnie prowadzonych badań. Niestety ze względu na heterogenność raka trzustki, wiele nowych substancji aktywnych okazuje się być nieskuteczna.

1.4.3. Wykorzystanie peptydów w terapiach przeciwnowotworowych

Atrakcyjną klasę leków przeciwnowotworowych stanowią peptydy. Leki peptydowe charakteryzują się wysoką swoistością, dobrą rozpuszczalnością i zdolnością do penetracji tkanki nowotworowej [82-87]. Peptydy przeciwnowotworowe (ACP) dzielą się na peptydy naturalne i syntetyczne. Syntetyczne peptydy mogą być projektowane tak, aby działały w określony sposób np. oddziaływały ze specyficznymi receptorami lub białkami powierzchniowymi (Ryc.5). ACP pochodzenia naturalnego to małe, najczęściej amfipatyczne cząsteczki, z których większość zawiera reszty kationowe i hydrofobowe. Peptydy te często posiadają też właściwości przeciwbakteryjne (ang. *antimicrobial peptides*) [88-90].

Komórki nowotworowe posiadają na swojej powierzchni więcej ujemnie naładowanych cząsteczek (np. glikozylowana mucyna) niż komórki prawidłowe, jak również charakterystyczne wypustki zwiększające powierzchnię komórki [91,92]. Dzięki swoim właściwościom kationowym, ACP łączą się specyficznie z ujemnie naładowaną błoną zaburzając jej strukturę i ciągłość. Dodatkowo większa powierzchnia komórki sprawia, że więcej cząsteczek peptydu może oddziaływać z błoną.

Powierzchnia komórek nowotworowych charakteryzuje się także zwiększoną ekspresją poszczególnych receptorów, takich jak VEGFR czy EGFR. Receptory wiążą peptydy, blokując w ten sposób przesyłanie sygnałów inicjujących wzrost i proliferację komórki. Przykładem takiego peptydu jest Erlotinib, który oddziałuje z receptorem EGF uniemożliwiając jego fosforylację [71]. Z kolei zablokowanie aktywności receptora VEGF poprzez jego związanie z peptydami F56, SP5.2 czy K237 prowadzi do zahamowania proliferacji i migracji komórek rakowych [93,94]. Często celem dla ACP są również integryny lub lamininy obecne na powierzchni komórek. Przykładowo, ACP zawierające motyw Arg-Gly-Asp (iRDG) łączą się swoiście z integryną α i β prowadząc do zahamowania wzrostu nowych naczyń krwionośnych (angiogenezy) i migracji komórek nowotworowych [95,96].



Ryc. 5. Wybrane mechanizmy działania peptydów przeciwnowotworowych na komórki nowotworowe [86].

Pomimo, że istnieje wiele naturalnych i syntetycznych peptydów o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, tylko niewielka ich liczba znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych. Wynika to głównie z licznych wyzwań związanych z wykorzystaniem peptydów jako leków farmaceutycznych. Niektóre peptydy są wysoko toksyczne w stosunku do prawidłowych komórek lub/oraz wykazują wysoką aktywność hemolityczną [97,98]. Kolejną przeszkodą w stosowaniu peptydów jest ich podatność na proteolizę. Wrażliwość na degradację enzymatyczną można zmniejszyć np. poprzez zastąpienie naturalnie występujących aminokwasów nienaturalnymi lub modyfikację wiązania peptydowego [99,100]. Ponadto, czas półtrwania, niezbędny do skutecznego działania leku, nie jest łatwy do określenia. W celu rozwiązania tego problemu, ACP można sprzęgać z peptydami penetrującymi komórki (CPP) lub wykorzystywać bakteriofagi jako nośniki ACP. Powlekanie lub koniugacja peptydów z polimerami, takimi jak glikol polietylenowy, również może poprawiać farmakokinetykę i farmakodynamikę leku [101]. Negatywne skutki działania ACP próbuje się znosić poprzez modyfikacje struktury przy jednoczesnym zachowaniu ich aktywności przeciwnowotworowej.

Pomimo ograniczeń, łatwość otrzymywania i modyfikacji oraz wysoka skuteczność sprawiają, że ACP są obiecującą grupą leków w terapii nowotworów.

1.5. Opioidy w terapii przeciwnowotworowej

Chorobom nowotworowym nierzadko towarzyszy przewlekły ból, znacznie pogarszający komfort życia pacjenta. W celu uśmierzania lub złagodzenia bólu stosuje się zróżnicowane środki przeciwbólowe. Jedną z klas leków o właściwościach analgetycznych są leki opioidowe. W praktyce klinicznej stosowana jest między innymi: kodeina, dihydrokodeina, tramadol, morfina czy fentanyl [102]. Najczęściej stosowana jest morfina, która oddziałuje z receptorem opioidowym μ (MOR). Oddziaływanie to powoduje analgezję, czyli zniesienie uczucia bólu. Niestety przyjmowaniu morfiny towarzyszy szereg działań niepożądanych takich, jak: zaparcia, nudności, senność, depresja oddechowa, euforia. Z kolei długotrwałe stosowanie morfiny oraz innych opioidów może skutkować rozwojem tolerancji i uzależnieniem tak fizycznym, jak i psychicznym [103].

1.5.1. Opioidy jako substancje przeciwnowotworowe

Poza działaniem przeciwbólowym, sugeruje się, że opioidy mogą wpływać na proliferację, zdolność komórek do adhezji i migracji, a także stymulować proces angiogenezy [104,105]. Według doniesień literaturowych, właściwości przeciwnowotworowe mogą wykazywać np. morfina czy Met-enkefalina oraz wybrane peptydomimetyki opioidowe (bifalina) [3-8]. Należy jednak podkreślić, że przeprowadzone dotychczas badania nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy i w jaki sposób opioidy egzo- i endogenne wpływają na wzrost komórek nowotworowych. Faktem jest bowiem, iż dostępnych jest szereg prac opisujących zarówno pro-, jak i przeciwnowotworowe właściwości morfiny, w zależności od rodzaju badanego nowotworu. Przykładowo, w raku piersi, zastosowanie morfiny może skutkować wyraźnym zahamowaniem wzrostu guza lub przeciwnie, stymulować proliferację komórek nowotworowych oraz proces angiogenezy. [106-108]. Morfina może również stymulować proliferację komórek glejaka wielopostaciowego (T98G) [9], a jednocześnie nie wpływać na proliferację komórek raka odbytu (HT-29) [109,110].

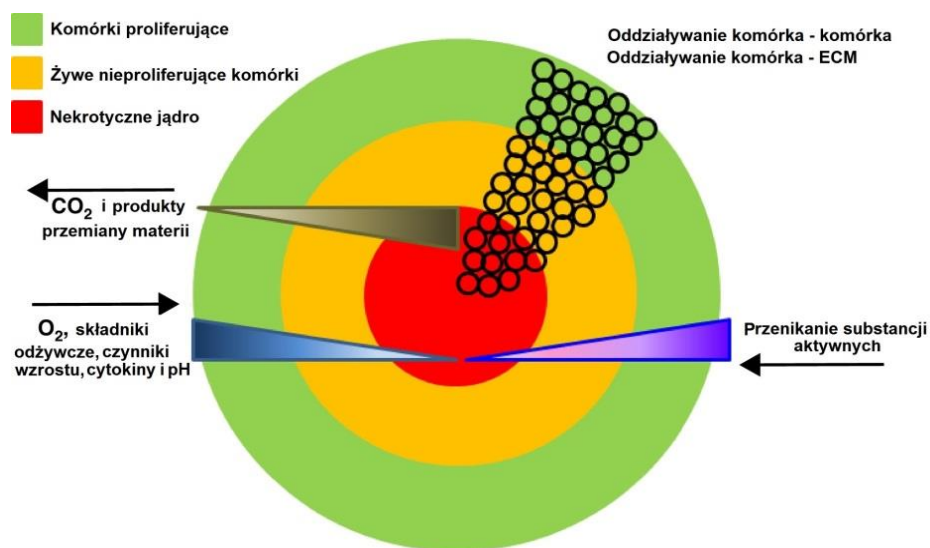
Inny endogenny opioid, Met-enkefalina, zwana też opioidowym czynnikiem wzrostu (OGF), hamuje syntezę DNA i wzrost komórek raka trzustki *in vitro* [111]. Zastosowanie GEM lub 5-FU w skojarzeniu z OGF, silniej hamowało proliferację komórek raka trzustki *in vitro* i *in vivo* niż w przypadku zastosowania każdej z tych substancji osobno [6,112]. Met-enkefalina hamowała także proliferację komórek czerniaka linii B16 *in vitro* i *in vivo* oraz komórek A375 *in vitro* [113,114]. Powyższe przykłady wskazują, że opioidy egzo- i endogenne mogą regulować wzrost i aktywność komórek nowotworowych. Konieczne są jednak dalsze badania w celu dokładnego poznania roli opioidów i mechanizmu oddziaływania na komórki nowotworowe.

1.6. Zastosowanie trójwymiarowych hodowli komórkowych w poszukiwaniu nowych leków

Badania w dwuwymiarowym (2D) modelu komórkowym *in vitro* stanowią pierwszy etap selekcji biologicznie aktywnych substancji. W badaniach tych wykorzystuje się hodowle komórek adherentnych lub w zawieszynie. Komórki te rosną w postaci monowarstwy lub swobodnie unosząc się w pożywce. Warunki w hodowlach 2D są skrajnie różne od warunków panujących w tkance. W żywej tkance komórki tworzą trójwymiarowe mikrośrodowisko wraz ze skomplikowaną siecią oddziaływań międzykomórkowych, produkcją ECM oraz złożoną dynamiką transportu tlenu i składników odżywczych. Tradycyjne hodowle 2D nie odzwierciedlają tych warunków. W związku z tym, komórki rosnące w modelu 2D poddawane działaniu związków aktywnych mogą dawać fałszywie pozytywne lub negatywne wyniki, które nie znajdują potwierdzenia w badaniach *in vivo* [115,116].

W celu jak najlepszego odwzorowania warunków panujących w organizmie powstały trójwymiarowe (3D) modele badawcze *in vitro*. Wielowarstwowość modeli 3D sprawia, że lepiej odwzorowują one warunki fizjologiczne. W układach 3D komórki oddziałują ze sobą, wytwarzana jest ECM oraz mechaniczne połączenia między komórkami (desmosomy). ECM umożliwia ruch i komunikację komórek w hodowli 3D, wpływa również na dyfuzję substancji oraz oddziaływanie z czynnikami wzrostu i enzymami (Ryc.6) [117,118].

Hodowle 3D zapewniają właściwą polaryzację komórek oraz ich niezakłócony wzrost, podczas gdy w hodowli 2D komórki mogą być tylko częściowo spolaryzowane, a ich proliferację ogranicza powierzchnia naczynia hodowlanego [118]. W porównaniu do hodowli 2D, hodowle 3D charakteryzuje większa stabilność i żywotność dzięki czemu lepiej nadają się do długoterminowych badań działania substancji aktywnej [116,119]. W przeciwieństwie do hodowli w monowarstwie, komórki hodowane w modelu 3D dodatkowo wykazują ekspresję genów zbliżoną do komórek w tkankach *in vivo* [120]. Podsumowując, modele 3D stanowią ulepszoną wersję modeli do badania różnicowania, migracji, przeżycia i proliferacji komórek w warunkach *in vitro*.

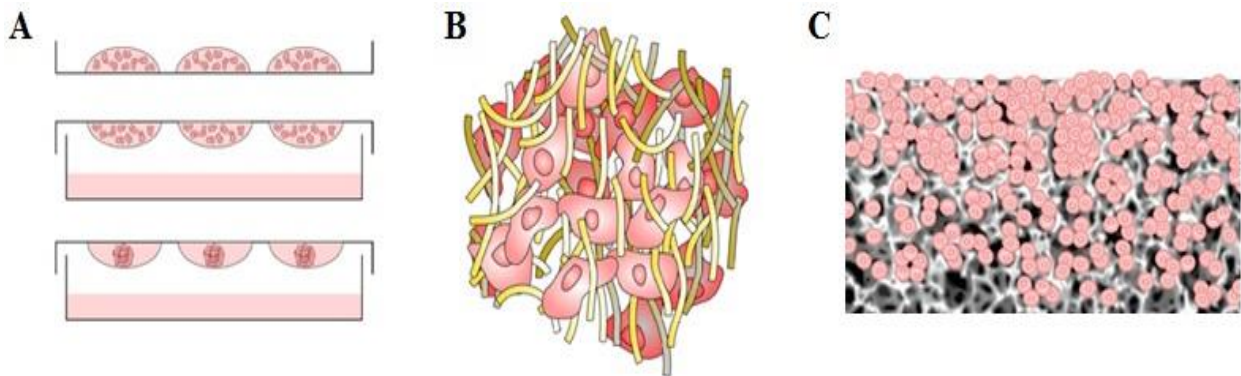


Ryc. 6. Procesy zachodzące w hodowlach trójwymiarowych - gradient stężenia substancji pokarmowych i aktywnych, tlenu oraz intensywności proliferacji komórek [118].

1.6.1. Rodzaje hodowli trójwymiarowych

Wzrost popularności modeli 3D odzwierciedla wzrost liczby dostępnych narzędzi hodowlanych. Obecnie hodowle trójwymiarowe prowadzi się z wykorzystaniem rusztowania lub bez rusztowania. Jednym z podstawowych i zarazem najprostszych modeli 3D są sferoidy, czyli sferyczne agregaty komórkowe. Sferoidy są samoorganizującymi się skupiskami komórek, które powstają w warunkach uniemożliwiających przytwierdzenie do

podłoża. Istnieje wiele metod uzyskiwania sferoidów, w tym technika mikroprzepływów, ciał embrioidalnych, żeli kolagenowych czy kultur wiszących [121-124]. Innym rodzajem hodowli 3D są hodowle na rusztowaniach (ang. *scaffolds*). Rusztowaniem mogą być np. biopolimery. Biopolimery otrzymywane z tkanek zwierzęcych są szczególnie popularne. Ze względu na ich biochemiczne podobieństwo do mikrośrodowiska tkanki, mogą promować regenerację tkanek. Do najczęściej stosowanych naturalnych polimerów należą: kwas hialuronowy, żelatyna, kolagen i siarczan chondroityny. Biopolimery pochodzenia innego niż ssacze, takie jak alginiany i chitozan, również są wykorzystywane do wytwarzania rusztowań 3D (Ryc.7) [125,126].



Ryc.7. Podstawowe technologie wykorzystywane do hodowli komórek w modelu 3D. (A) Formowanie sferoidów komórkowych z wykorzystaniem metody wiszącej kropli. Zawieszona w kropli komórki łączą się tworząc kompaktowy agregat. (B) Hodowla 3D z wykorzystaniem hydrożeli (np. Matrigel). Komórki są zawieszona w macierzy zawierającej białka, które tworzą mikrośrodowisko naśladujące strukturę ECM. (C) Porowate stałe rusztowanie wspierające hodowlę komórkową. Komórki wykorzystują porowatą powierzchnię rusztowania, dzięki czemu nie ulegają spłaszczeniu; zachowują swoją strukturę i polaryzację [126].

Coraz częściej w badaniach wykorzystywane są systemy mikroprzepływowe (ang. *microfluidic chip*). Systemy te zbudowane są z wielu elementów umieszczonych na niewielkiej powierzchni. Każdy z elementów takiego systemu pełni określoną funkcję. Odpowiednio zaprojektowane moduły umożliwiają kontrolę mikrośrodowiska hodowli i stały przepływ pożywki, dzięki czemu warunki panujące w układzie są zbliżone do warunków *in vivo* [127,128]. Dzięki temu systemy mikroprzepływowe pełnią funkcję zintegrowanego mikrolaboratorium, które umożliwia prowadzenie kompleksowych badań mikrostruktur.

Dostępność i różnorodność modeli trójwymiarowych pozwala na wykorzystanie ich w badaniach nad procesem karcynogenezy, regeneracji tkanek czy oddziaływań patogen - gospodarz.

1.6.2. Zastosowanie hodowli trójwymiarowych

Modele trójwymiarowe *in vitro* znajdują szerokie zastosowanie w badaniach naukowych i medycynie. Najczęściej hodowle 3D wykorzystuje się w badaniach przesiewowych nowych leków przeciwnowotworowych. Odpowiedź sferoidów i guzów *in vivo* na substancje przeciwnowotworowe jest zbliżona. Szczególnie dobrze sferoidy odwzorowują słabo unaczynione guzy lite, takie jak guzy przewodowego raka trzustki [129]. Podobnie jak w warunkach *in vivo*, struktura sfery sprawia, że działanie substancji aktywnych jest niejednorodne w jej obrębie [130].

Sferoidy mogą również stanowić model do badania nowotworowych komórek macierzystych (ang. *cancer stem cells*, CSC). CSC są subpopulacją komórek nowotworowych zdolnych do samoodnawiania i różnicowania. Badania wykazały, że w sferoidach jest obecnych więcej CSC niż w przypadku modelu 2D. Może być to wynikiem charakteru mikrośrodowiska panującego we wnętrzu sfery. Czynniki takie jak hipoksja, wartość pH oraz obecność ECM sprzyjają utrzymaniu fenotypu CSC [131-133]. Dodatkowo sferoidy otrzymywane z kilku rodzajów komórek (kokultury) stanowią wygodny i łatwo dostępny model do badania oddziaływań między komórkami prawidłowymi i nowotworowymi [111,112]. Komórki podścieliska istotnie wpływają na rozwój i biologię guza. Łatwość otrzymywania sfer zbudowanych z poszczególnych rodzajów komórek pozwala na badanie wybranych aspektów biologii nowotworu tj., inwazyjności, intensywności procesów angiogenezy czy odpowiedzi na działanie substancji przeciwnowotworowych [134-136].

Hodowle trójwymiarowe znajdują również szerokie zastosowanie w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej. Najlepiej poznanym i opisanym przykładem hodowli 3D w medycynie jest sztuczna skóra. Jest to stelaż kolagenowy ułatwiający i stymulujący wzrost komórek w miejscu uszkodzenia. Wiele zespołów badawczych pracuje obecnie nad uzyskaniem sztucznej wątroby, która mogłaby być wykorzystywana do oczyszczania krwi przepływowej pacjentów, oczekujących na przeszczep tego narządu. Do prawidłowego

funkcjonowania tego systemu konieczne jest jednak utrzymanie dużej liczby aktywnych, zdolnych do różnicowania hepatocytów. Hodowle trójwymiarowe mogą zapewnić odpowiednie warunki do różnicowania hepatocytów, zatem stanowią obiecujący model badawczy [137,138].

Hodowle 3D mogą być również stosowane do wykrywania patogenów lub toksyn [139] oraz badania oddziaływań komórka-biomateriał [140].

Powyższe przykłady wskazują na ogromną użyteczność trójwymiarowych modeli komórkowych *in vitro*. Łatwość modyfikacji i aplikacyjność czyni je jeszcze bardziej atrakcyjnymi modelami badawczymi.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W literaturze znaleźć można doniesienia wskazujące na przeciwnowotworowe właściwości peptydów i peptydomimetyków opioidowych oraz kwasu cynamonowego i jego pochodnych. Dodatkowo istnieją badania sugerujące, że kwas cynamonowy i jego pochodne mogą zwiększać przepuszczalność błon komórkowych.

W Zakładzie Neuropeptydów, zostały zaprojektowane i zsyntezowane 4 nowe peptydomimetyki, składające się z dwóch fragmentów – krótkiego peptydu opioidowego oraz lipofilowej *trans*-cynamylopiperazyny (CYN):

Tyr-D-Ala-Phe-CYN (**APL1**)

Tyr-D-Ala-Trp-CYN (**APL2**)

Tyr-D-Thr-Phe-CYN (**APL3**)

Tyr-D-Thr-Trp-CYN (**APL4**)

Opierając się na powyższych informacjach sformułowano hipotezę badawczą, że otrzymane peptydomimetyki będą charakteryzować się aktywnością przeciwnowotworową oraz dobrą przenikalnością przez błony komórkowe. Stąd celem badań było:

1. Ocena biologicznych właściwości otrzymanych peptydomimetyków opioidowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich stabilności i toksyczności.
2. Wypracowanie trójwymiarowego modelu raka trzustki w warunkach *in vitro*.
3. Ocena aktywności przeciwaproliferacyjnej peptydomimetyków w dwu- i trójwymiarowym modelu raka trzustki *in vitro*.
4. Ocena aktywności przeciwaproliferacyjnej części składowych peptydomimetyków tzn. tripeptydów oraz *trans*-cynamoilopiperazyny.
5. Zbadanie skojarzonego wpływu peptydomimetyków i gemcytabiny, ze szczególnym uwzględnieniem różnic pomiędzy modelem dwuwymiarowym i trójwymiarowym.

3. MATERIAŁY I METODY

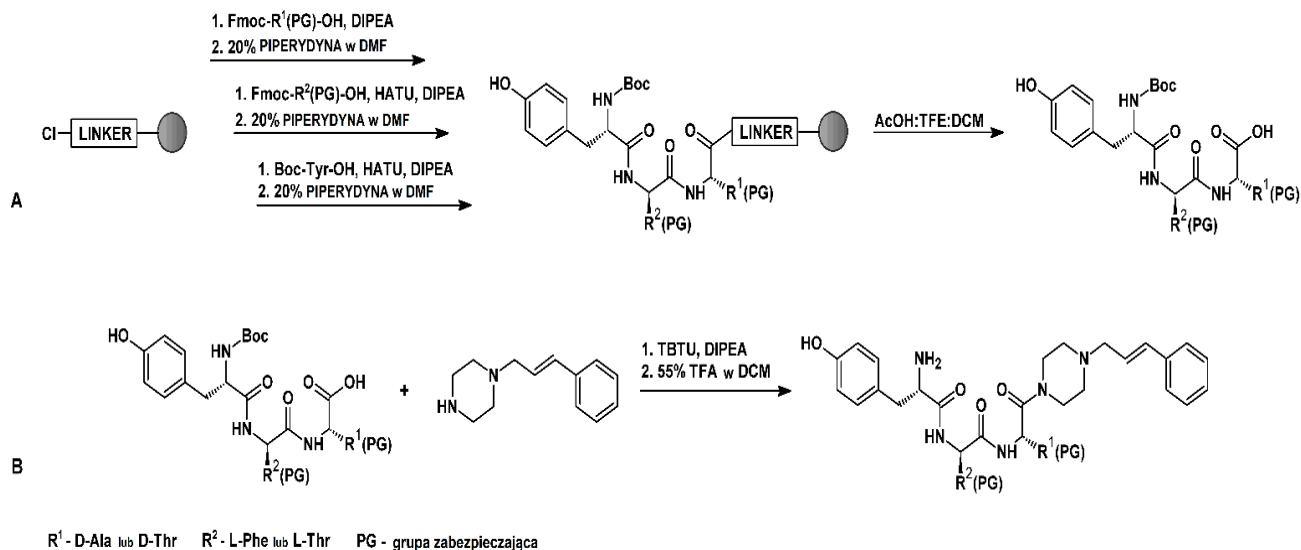
3.1. Synteza związków

Syntezę i oczyszczanie związków wykonali dr Anna Puszko i dr Piotr Sosnowski z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

3.1.1. Synteza i oczyszczanie peptydomimetyków

Fragmety peptydowe zsyntezowano manualnie na fazie stałej (SPPS) zgodnie z procedurą Fmoc, wykorzystując żywicę 2-chlorotrytylowa (500 mg) o obsadzeniu 0,83 mmol/g. Do żywicy przyłączono Fmoc-Phe-OH (1,04 mM) lub Fmoc-Trp(Boc)-OH (1,04 mM) w dichlorometanie (DCM) w obecności 3 ekwiwalentów (ekw.) N,N-diizopropylloetyloaminy (DIPEA). Sprzęganie prowadzono przez 3 godz. przy użyciu 2,5 ekw. aminokwasów rozpuszczonych w 5 ml N,N-dimetyloformamidu (DMF) w obecności 2,5 ekw. heksafluorofosforanu O-(1H-6-chlorobenzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowego (HCTU; 1,04 mM) i 6 ekw. DIPEA (2,5 mM). Grupę zabezpieczającą Fmoc zdejmowano za pomocą 20% (v/v) roztworu piperidyny w DMF przez 20 minut. Reakcje sprzęgania i deprotekcji monitorowano przy użyciu testu Kaiser. Po zakończonej syntezie, peptydy odczepiano od fazy stałej za pomocą 5 ml mieszaniny kwasu octowego, trifluoroetanolu i dichlorometanu (1:1:8 v/v/v) przez okres 45 min, zachowując wszystkie grupy zabezpieczające. Obecność związków potwierdzono za pomocą HPLC-ESI-Q-MS. Następnie surowe peptydy (0,3 mM) sprzęgano w 5 ml DMF z 1,1 ekw. *trans*-1-cynamoilopiperazyny (Cyn; 0,33 mM) w obecności 1,1 ekw. tetrafluoroboranu 2-(1H-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametyloaminowego (TBTU; 0,33 mM), 1,1 ekw. hydroksybenzotriazolu (HOBt; 0,33 mM) i 5 ekw. DIPEA (1,5 mM). Reakcję prowadzono przez 12 godz. w temp. pokojowej. Surowe produkty wytrącano za pomocą nasyconego roztworu NaHCO₃, filtrowano i płukano wodą destylowaną do osiągnięcia neutralnego pH. Związki rozpuszczano następnie w 15 ml kwasu trifluorooctowego (TFA) i mieszano w temp. 0°C (łaźnia woda/lód) przez 1 godz. w celu usunięcia grup zabezpieczających. Po odparowaniu TFA, związki odparowano dodatkowo 3 razy z toluenem i 2 razy z eterem. Struktury surowych związków potwierdzano za pomocą HPLC-ESI-Q-MS, a następnie

oczyszczano z wykorzystaniem preparatywnego RP-HPLC (kolumna C₁₂, fazy woda/acetonitryl z dodatkiem 0,1% TFA). Oczyszczone produkty zliofilizowano i zanalizowano przy użyciu HPLC-ESI-Q-MS oraz LC-MS-IT-TOF.



Schemat 1. Synteza peptydomimetyków. Synteza prowadzona była w dwóch etapach: w fazie stałej (A) i w roztworze (B).

3.1.2. Synteza i oczyszczanie tripeptydów

Syntezę tripeptydów prowadzono na fazie stałej (SPPS) przy użyciu żywicy Wang'a z przyłączoną Fmoc-Phe-OH (0,63 mM/g) lub Fmoc-Trp(Boc)-OH (0,55 mM/g), zgodnie ze strategią Fmoc. Sprzężanie prowadzono w obecności 2,5 ekw. aminokwasów, 2,5 ekw. HCTU (0,63 mM) i 6 ekw. DIPEA (1,5 mM) w 5 ml w DMF przez 3 godz. Grupę zabezpieczającą Fmoc zdejmowano 20% (v/v) roztworem piperydyny w DMF przez 20 minut. Reakcje sprzężania i deprotekcji monitorowano przy użyciu testu Kaisera. Po zakończonej syntezie, peptyd odczepiano od żywicy przy użyciu mieszaniny TFA, wody i triizopropylsilanu (TIS) (92:2,5:2,5 v/v/v) przez 3 godz. Obecność surowych peptydów potwierdzono za pomocą HPLC-ESI-Q-MS, a następnie oczyszczano z wykorzystaniem preparatywnego RP-HPLC (kolumna C₁₂, fazy woda/acetonitryl z dodatkiem 0,1% TFA).

Oczyszczone produkty zliofilizowano i zanalizowano przy użyciu HPLC-ESI-Q-MS oraz LC-MS-IT-TOF.

3.2. Badanie stabilności proteolitycznej peptydomimetyków w ludzkim osoczu *in vitro*

Badania z wykorzystaniem obwodowej krwi żyłnej pobranej od zdrowych wolontariuszy (n=4), przeprowadzono za zgodą Komisji Etycznej CSK-MSWiA (decyzja nr 67/2017). Krew pobierano do probówek zawierających heparynę. W celu zapobiegnięcia ewentualnej aktywacji płytek krwi, krew wirowano natychmiast po pobraniu (2500 rpm, 10 min, 4°C). Osocze delikatnie zebrano i przeniesiono do sterylnych mikroprobówek (1,5 ml) i zamrażano w temperaturze -80°C do momentu użycia. Osocze preaktywowano przez 20 min w temp. 37°C. Po tym czasie, dodawano wodny roztwór badanego związku (5 µM) w stosunku 1:1 i kontynuowano inkubację. W wyznaczonych interwałach czasowych (0 - 96 godz.) pobierano 100 µl mieszaniny i przerywano reakcję enzymatyczną dodając 100 µl 98% etanolu w celu wytrącenia białek. Otrzymaną zawiesinę wytrząsano przez 1 min, a następnie wirowano (15000 rpm, 10 min, 4°C). Pobierano 100 µl supernatantu, zamrażano i liofilizowano. Próbkę odtwarzano poprzez dodanie 100 µl wody destylowanej i nastrzykiwano na analityczne RP-HPLC. Wybrane próbki analizowano za pomocą LC-ESI-Q-MS w celu identyfikacji metabolitów.

3.3. Oznaczenie powinowactwa związków do receptorów opioidowych MOR

W celu zmierzenia powinowactwa związków do receptorów opioidowych MOR zastosowano metodę izotopową, polegającą na oznaczeniu stopnia powinowactwa znakowanego ligandu do specyficznego receptora. W metodzie wykorzystuje się tkankę zawierającą badany receptor oraz ligand znakowany izotopem.

W celu przygotowania homogenatu, pobierany mózg szczura (bez mózdzku) umieszczano w zimnym (4°C) 50 mM buforze Tris (pH 7,4) i homogenizowano. Następnie

homogenat wirowano (23000 rpm, 20 min., 4°C). Supernatant odrzucono, a osad ponownie zawieszono w buforze TRIS i inkubowano w temp. 25°C przez 30 min. Etap wirowania i zawieszenia w buforze powtórzono dwukrotnie. Ostateczne stężenie zawiesiny tkanki w buforze wynosiło 5%. Homogenat przechowywano w temp. -25°C. Do badań użyto trytowanego ligandu [H^3]DAMGO, specyficznego dla receptora μ . Homogenaty inkubowano w temp. 25°C przez 60 min z 0,5 nM [H^3]DAMGO wraz z odpowiednim stężeniem badanych związków (10^{-5} – 10^{-11} M). Wiązanie niespecyficzne wyznaczono przy zastosowaniu 10 μ M naloxonu. Reakcje prowadzono w 1 ml buforu zawierającego albuminę z surowicy bydłowej (0,1 mg/ml, BSA), bacytracynę (30 μ /ml), bestatynę (30 μ M) oraz kaptopril (30 μ M). Doświadczenie wykonano w dwóch powtórzeniach. Po inkubacji, próbki filtrowano z wykorzystaniem urządzenia Brandel Harvester i filtrów GF/B nasączonych 0,5% polietylenoiminą (PEI). Filtry trzykrotnie przemywano solą fizjologiczną (4°C). Następnie filtry przekładano na 24-dółkową płytkę i zalewano roztworem scyntylicyjnym. Dla każdego stężenia [H^3]DAMGO i badanego związku wykonano dwa powtórzenia, sam zaś eksperyment przeprowadzono dwukrotnie. Oznaczenie poziomu radioaktywności wykonano z wykorzystaniem aparatu MicroBeta LS, 3 detectorowym, TriLux.

Poziom wiązania specyficznego dla danego receptora jest wynikiem różnicy wiązania całkowitego radioliganda i wiązania niespecyficznego radioliganda. Im niższy poziom radioaktywności w próbce tym wyższe powinowactwo liganda do receptora. Wartości powinowactwa receptorowego badanych związków wyznaczono używając programu GraphPad Prism. Procent wiązania związku wyliczono ze wzoru i przedstawiono jako IC₅₀ +/- SEM.

$$\% \text{ wiązania} = \frac{\text{średni poziom radioaktywności próbki} - \text{wiązanie niespecyficzne}}{\text{wiązanie specyficzne}} \times 100\%$$

3.4. Oznaczenie aktywności hemolitycznej związków

Badanie aktywności hemolitycznej związków wykonano zmodyfikowaną metodą opracowaną przez Knopik i współ. [141]. Hemolizę, indukowaną działaniem badanych związków, oznaczano z wykorzystaniem elementów morfotycznych krwi obwodowej i

porównano z aktywnością hemolityczną GEM. Krew od zdrowych ochotników (n=4) ze znanym poziomem hematokrytu pobierano do próbek zawierających EDTA (zgodą Komisji Etycznej CSK-MSWiA, decyzja nr 67/2017); poziom próbki zaznaczano na probówce. Krew wirowano (2500 rpm, 10 min, 4°C), supernatant odrzucono, a osad zawieszono w PBS do wcześniej zaznaczonego poziomu. Etap wirowania i zawieszania powtórzono trzykrotnie. Otrzymaną zawiesinę rozcieńczono odpowiednio dla hematokrytu danego dawcy, tak aby uzyskać 10% zawiesinę. Zawiesina 10% posłużyła do przygotowania próby 100% hemolizy (w H₂O destylowanej, 1:9) oraz 2% zawiesiny elementów morfotycznych (w PBS, 1:4). Następnie do mikroprobówek dodawano 200 µl 2% zawiesiny i 200 µl odpowiedniego stężenia badanego związku w PBS (0 - 250 µM). Mieszaniny inkubowano w łaźni wodnej przez okres 60 min w temp. 37°C. Kontrolę pozytywną (100% hemolizy) stanowiły komórki krwi zawieszono w wodzie destylowanej, a kontrolę negatywną (0% hemolizy) komórki krwi zawieszono w PBS. Próbę ślełą stanowiły właściwe stężenia związków rozcieńczone PBS (1:1). Po zakończonej inkubacji, próbki wirowano (4500 rpm, 5 min., 4°C), pobierano supernatant (100 µM) i odczytywano absorbancję ($\lambda = 540$ nm). Procent hemolizy przedstawiono jako procentowy stosunek absorbancji związku do absorbancji kontroli pozytywnej według wzoru:

$$\% \text{ Hemolizy} = \frac{\text{absorbancja próbki ze związkiem} - \text{absorbancja próby ślepej}}{\text{absorbancja próby 100\%} - \text{absorbancja próby 0\%}} \times 100\%$$

3.5. Oznaczenie właściwości przeciwbakteryjnych peptydomimetyków

W celu określenia właściwości przeciwbakteryjnych peptydomimetyków zastosowano metodę dyfuzyjno-krażkową. W badaniach wykorzystano niepatogenny szczep *Escherichia coli* C600 (ATCC 23724) oraz *Staphylococcus aureus* (NCTC 8325-4). Pożywkę płynną Luria-Bertani (20 ml) zaszczepiano 1 kolonią *E. coli* lub *S. aureus* i inkubowano w temp. 37°C z wytrząsaniem (120 rpm) przez noc. Następnie z hodowli nocnej przygotowano zawiesinę o gęstości 0,5 w skali McFarland, którą następnie rozcieńczono 1000 razy. Na płytkę ze stałym podłożem Luria-Bertani naniesiono 50 µl zawiesiny *E. coli* lub *S. aureus* i

rozprowadzono głaszczką. Sterylne krążki bibułowe nasączono 10 µl właściwego stężenia peptydomimetyku (1 - 10 mM) lub ampicyliny (10 mg/ml). Po 20 min na płytce z bakteriami, sterylną pincetą nałożono po 3 krążki zawierające różne stężenia peptydomimetyków oraz 1 krążek zawierający ampicylinę (kontrola pozytywna). Płytki inkubowano przez 18-20 godzin w temp. 37°C. Strefy zahamowania wzrostu mierzono z wykorzystaniem suwmiarki.

3.6. Linie komórkowe

Do badań wykorzystano linie komórkowe zakupione z kolekcji ATCC i ECACC:

- PANC-1 - ludzki, przewodowy gruczolakorak trzustki (ECACC 87092802);
- BJ - ludzkie prawidłowe fibroblasty (ATCC CRL-2522)

Komórki PANC-1 hodowano w pożywce DMEM z dodatkiem 10% obj. inaktywowanej cielęcej surowicy płodowej (FBS), 2 mM L-glutaminy oraz 1% obj. antybiotyku (penicylina/ streptomycyna). Komórki BJ hodowano w pożywce EMEM z dodatkiem 10% obj. inaktywowanej FBS, 2 mM L-glutaminy oraz 1% obj. antybiotyku (penicylina/streptomycyna). Komórki inkubowano w temp. 37°C w atmosferze z 5% zawartością CO₂ i wilgotnością 95%.

3.7. Izolacja komórek z materiału klinicznego

W doświadczeniach wykorzystano komórki wyizolowane z fragmentów guzów trzustki. Biopaty uzyskano od pacjentów poddanych chirurgicznemu usunięciu guza. Biopaty otrzymano w ramach współpracy z Kliniką Chirurgii Gastroenterologicznej i Transplantologii Centralnego Szpitala Klinicznego Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji (CSK-MSWiA) w Warszawie. Badania z wykorzystaniem materiału klinicznego przeprowadzono za zgodą Komisji Etycznej CSK-MSWiA (decyzja nr 67/2017).

Komórki wyizolowano metodą trawienia enzymatycznego z wykorzystaniem kolagenazy IV. Tkankę nowotworową rozdrabniano mechanicznie (skalpel), umieszczano w probówce 50 ml i zalewano 5 ml pożywki DMEM z kolagenazą IV (1 mg/ml). Pożywka nie zawierała surowicy (FBS). Trawienie prowadzono w temp. 37°C z wytrząsaniem. Czas trawienia był zależny od struktury guza i wahał się od 30 min do 4 h. Po trawieniu, zawiesinę

filtrowano (0,22 μm) i wirowano (2000 rpm, 10 min). Osad zawieszono w pożywce DMEM z 10% FBS oraz antybiotykiem, a następnie inkubowano w temp. 37°C. Obserwacje komórek prowadzono w mikroskopie kontrastowo-fazowym.

3.8. Charakterystyka fenotypowa komórek nowotworowych

W celu scharakteryzowania wyizolowanych komórek zastosowano przeciwciała pierwszorzędowe skierowane przeciwko fibronektynie i cytokeratynie 7 (CK-7). Komórki hodowano na okrągłych szkiełkach nakrywkowych pokrytych poli-L-lizyną. Celem usunięcia resztek pożywki hodowlanej, szkiełka płukano 3 razy roztworem PBS. Następnie, przez 20 min, komórki utrwalano w 4% paraformaldehydzie (PFA). Blokowanie wiązań niespecyficznych prowadzono przez 60 min w 10% roztworze koziej surowicy w PBS z dodatkiem 0,25% Triton X. Następnie, komórki inkubowano z właściwym przeciwciałem I-rzędowym (1:200) w temp. 4°C przez noc. Po zakończonej inkubacji, komórki płukano 3 razy PBS i inkubowano z właściwym przeciwciałem II-rzędowym (1:1000) przez 45 min w temp. pokojowej. Do detekcji używano przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z AlexaFluor 488 i AlexaFluor 546. Jądra komórkowe znakowano z wykorzystaniem Hoechst®33342. W badaniach wykorzystano przeciwciała firmy Invitrogen.

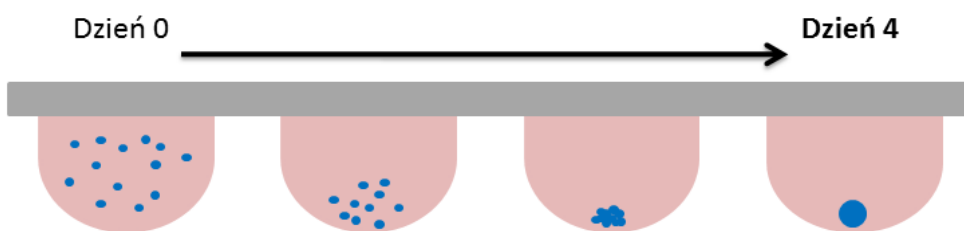
3.9. Oznaczenie obecności receptorów opioidowych μ na powierzchni komórek

Obecność receptorów opioidowych μ na powierzchni badanych komórek oznaczano z wykorzystaniem komercyjnego testu Opioid Receptor Colorimetric Cell-Based ELISA Kit firmy Assay Biotechnology. Na 96-dołkową płytkę wysiano po 200 tys. komórek na dołek i inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C. Komórki płukano buforem TBS i utrwalono w 4% PFA (20 min, temp. pokojowa). Celem zablokowania wiązań niespecyficznych, komórki inkubowano z buforem blokującym przez 60 min. Następnie, komórki inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym (1:100) skierowanym przeciwko receptorowi opioidowemu μ przez noc w temp. 4°C. Po zakończonej inkubacji, komórki płukano 3 razy Wash Buffer i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z peroksydazą

chrzanową przez 90 min w temp. pokojowej. W celu wizualizacji wyników, komórki inkubowano z roztworem 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyny (TMB) przez 30 min. Pomiaru intensywności absorbancji dokonywano przy długości fali 450 nm.

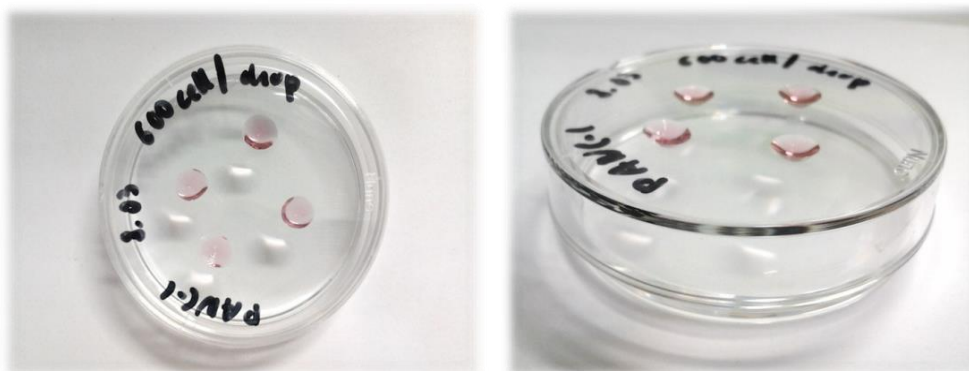
3.10. Hodowla komórek w modelu trójwymiarowym - sferoidy

Zdolność do tworzenia sferoidów badano dla wszystkich testowanych linii komórkowych. Do otrzymywania sferoidów wykorzystywano metodę wiszącej kropli. Metoda polega na samoczynnym powstawaniu agregatów komórkowych (Ryc.8).



Ryc. 8. Formowanie sferoidu w kropli

Na wieczku szalki Petriego (\varnothing 6 cm) umieszczano kilka (4-5) 20 μ l kropli zawiesiny komórkowej (\sim 20 tys. komórek/ml). Następnie wieczko delikatnie odwracano i umieszczano na dolnej części szalki wypełnionej wodą destylowaną (Ryc.9). Komórki inkubowano przez 3 dni bez zmiany pożywki w temp. 37°C. Po tym czasie zmieniano medium i kontynuowano inkubację. Do doświadczeń wykorzystywano 5-dniowe sferoidy o średnicy 300 - 400 μ m.



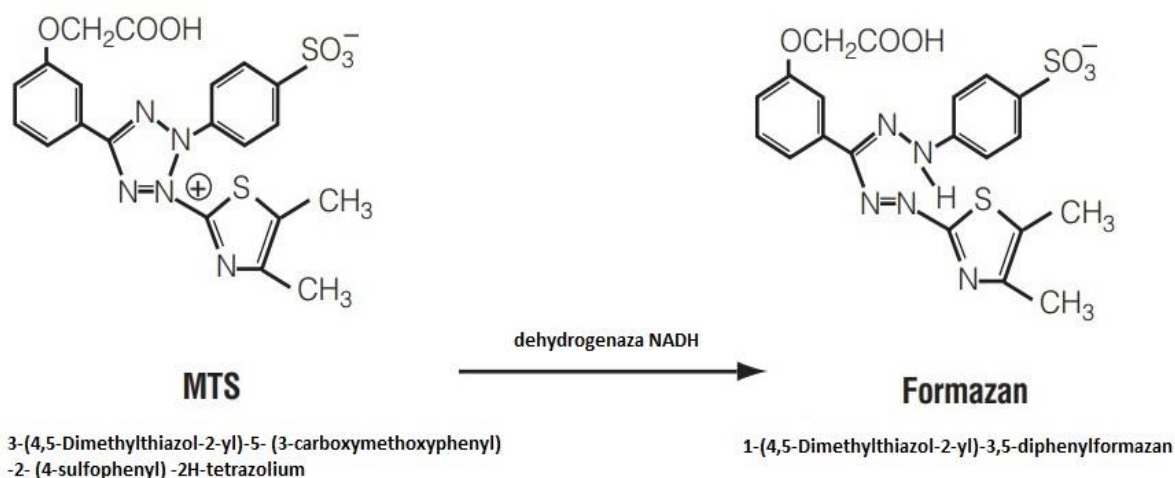
Ryc.9. Hodowla sferoidów komórek nowotworowych PANC-1 metodą wiszącej kropli.

3.11. Badanie wpływu związków na żywotność komórek

Aktywność biologiczną wszystkich związków badano z wykorzystaniem dwu- i trójwymiarowego doświadczalnego modelu *in vitro*.

3.11.1. Badanie wpływu związków na żywotność komórek w modelu dwuwymiarowym

Żywotność komórek oceniano przy użyciu odczynnika CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Działanie odczynnika polega na redukcji soli tetrazolowej 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) do formazanu pod wpływem dehydrogenazy NADH (Ryc.10). Intensywność barwy roztworu jest wprost proporcjonalna do liczby aktywnych metabolicznie komórek.



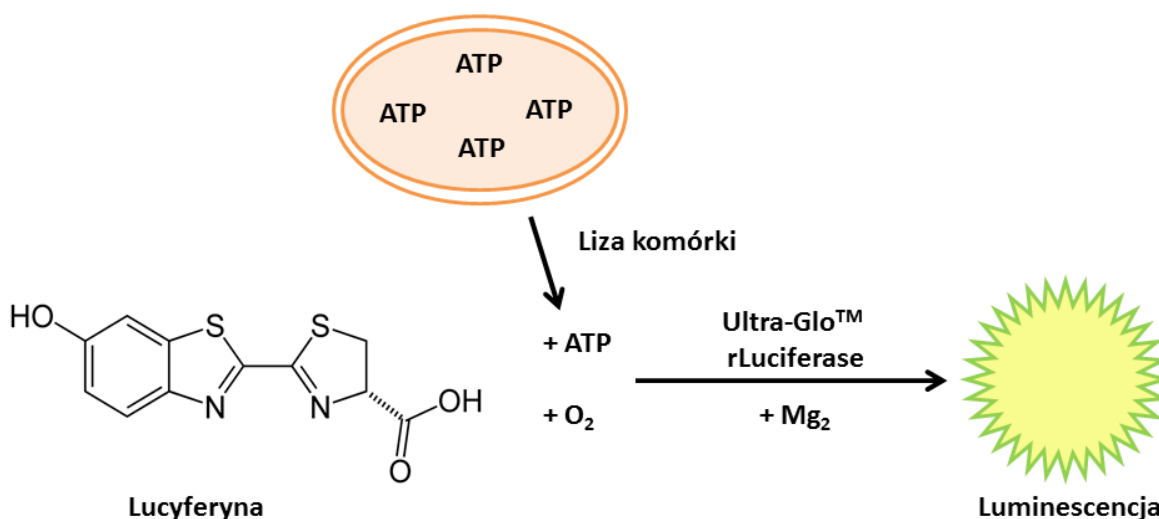
Ryc.10. Schemat redukcji soli tetrazolowej MTS do formazanu w obecności dehydrogenazy NADH.

Na 96-dołkowe płytki wysiano zawiesinę komórkową o gęstości 30 tys. komórek/ml i inkubowano przez 24 godz. w temp. 37°C. Następnie do komórek dodano badane związki tak, aby końcowe stężenie w dołkach wynosiło: 0-500 μM. Po 24 i 72 godz. inkubacji do wszystkich dołków dodano 20 μl roztworu MTS i inkubowano przez 60 min w temp. 37°C.

Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali równej 490 nm. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

3.11.2. Badanie wpływu związków na żywotność komórek nowotworowych w modelu trójwymiarowym

Kondycję sferoidów oceniano z wykorzystaniem odczynnika CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega). Działanie odczynnika opiera się na pomiarze ilościowym adenozyno-5'-trifosforanu (ATP), uwalnianego podczas lizy komórek (Ryc.11). Liza sferoidu pozwala na uwolnienie ATP z komórek wewnątrz sfery. Intensywność luminescencji jest wprost proporcjonalna do liczby komórek aktywnych metabolicznie.



Ryc.11. Schemat działania testu CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay

Pożywkę, w której były hodowane sferoidy, delikatnie usuwano pipetą, tak aby nie uszkodzić sfer. Następnie w to samo miejsce nakraplano 20 µl świeżej pożywki i 5 µl związków tak, aby końcowe stężenie związków w kropli wynosiło 0-500 µM. Sfery ze związkami inkubowano przez 24 i 72 godz. w temp. 37°C. Po tym czasie sferoidy wraz z pożywką przenoszono pipetą na 384-dołkową białą płytkę. Następnie do wszystkich dołków dodawano 25 µl odczynnika CellTiter-Glo 3D. Płytkę wytrząsano przez 30 min. i inkubowano w ciemności przez następne 30 min. Po zakończonej inkubacji dokonywano

pomiaru luminescencji. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

3.12. Badanie skojarzonego działania peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność komórek

Wzajemne oddziaływanie peptydomimetyków z GEM oraz ich wpływ na żywotność komórek badano z wykorzystaniem metody szachownicy. Na 96-dołkowe płytki wysiewano zawiesinę komórkową o gęstości 30 tys. komórek/ml i inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C. Następnie do komórek dodawano GEM (końcowe stężenia 0, 10, 50, 100, 200 µM) oraz właściwy peptydomimetyk **APL1-4** (końcowe stężenie 0, 10, 50 µM). Związki nanoszono na płytkę według poniższego schematu (Ryc.12). Końcowa objętość w dołku wynosiła 100 µl. Kontrolę negatywną stanowiły komórki inkubowane bez dodatku badanych związków. Po 24 i 72 godzinach inkubacji do wszystkich dołków dodano 20µl MTS i inkubowano przez 60 min. w temp. 37°C.

Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali 490 nm. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Wpływ skojarzonego działania oceniano w odniesieniu do wyników otrzymanych dla GEM bez dodatku związków **APL1-4**.

	związek (1)	0 µM			10 µM			50 µM	
GEM (µM)		↓			↓			↓	
0	→				↓				
10								↓	
50	→								
100									
200	→								
blank									

Ryc.12. Metoda szachownicy – schemat rozplanowania płytki 96-dołkowej zastosowany w przeprowadzonych doświadczeniach

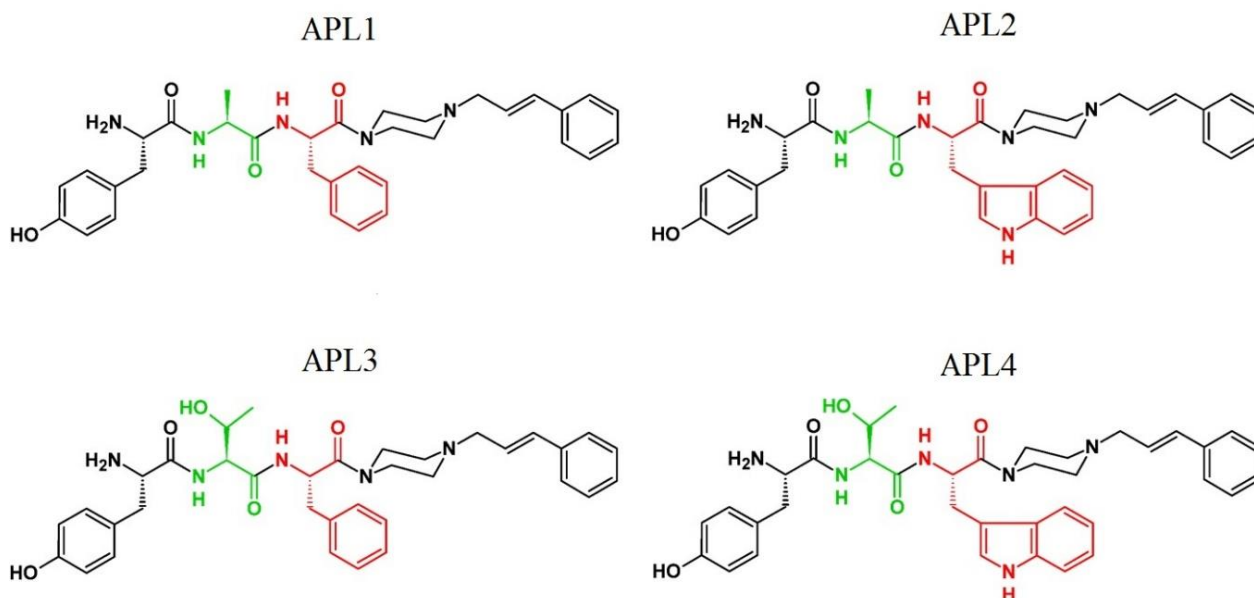
3.13. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM (standardowy błąd pomiaru). Analizę statystyczną wpływu związków na komórki w odniesieniu do kontroli przeprowadzono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Dunnett'a. Analizę statystyczną oddziaływania związków na komórki nowotworowe w odniesieniu do fibroblastów oraz różnice pomiędzy modelem 2D i 3D analizowano przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Bonferroni'ego. Wyniki uznawano za istotne statystycznie przy wartości $p < 0,05$. Obliczenia wykonano w programie GraphPad Prism 5. Różnice istotne statystycznie oznaczono: * - $p < 0,05$, # - $p < 0,01$, X - $p < 0,001$, brak istotności $p > 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka otrzymanych związków

Zaprojektowane i zsyntetyzowane peptydomimetyki (Ryc.13) są analogami związków zaprojektowanych przez prof. Andrzeja W. Lipkowskiego [137].



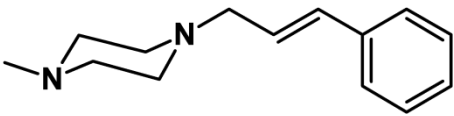
Ryc.13. Wzory strukturalne peptydomimetyków **APL1-4**.

Peptydomimetyki **APL1-4** są zbudowane z dwóch fragmentów (Tabela 1):

- N-koniec stanowi fragment tripeptydowy, którego sekwencje są oparte na zmodyfikowanych peptydach opioidowych
- C-koniec w każdym ze związków stanowi lipofilowy układ *trans*-cynamoilopiperazyny (CYN).

Struktury związków potwierdzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych sprzężonej ze spektrometrią mas (RP-HPLC-MS). Dodatkowo badaniom poddano części składowe peptydomimetyków tzn. tripeptydy oraz CYN, stanowiące odpowiednio peptydową i niepeptydową część testowanych peptydomimetyków.

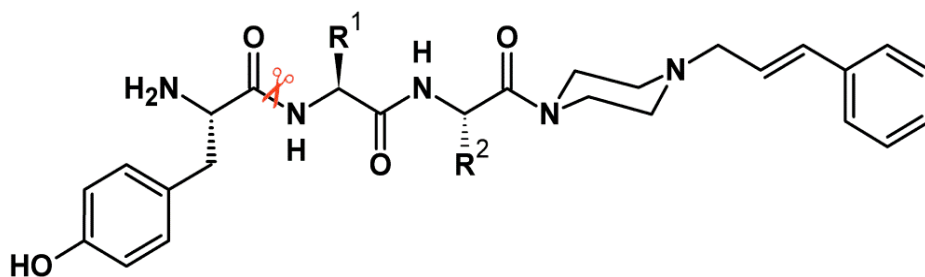
Tabela 1. Struktury peptydomimetyków z wyróżnieniem N- i C-końca

Nazwa związku	N-końiec tripeptyd	C-końiec <i>trans</i> -cynamoilopiperazyna
APL1	H-Tyr- <i>D</i> -Ala-Phe	
APL2	H-Tyr- <i>D</i> -Ala-Trp	
APL3	H-Tyr- <i>D</i> -Thr-Phe	
APL4	H-Tyr- <i>D</i> -Thr-Trp	

4.2. Charakterystyka właściwości badanych związków

4.2.1. Stabilność peptydomimetyków

Badanie stabilności peptydomimetyków **APL1-4** przeprowadzono poprzez monitorowanie zmian chromatogramów próbek pobranych w przedziale czasowym 0-96 godz. Do analizy zanikania substratu w czasie wykorzystano RP-HPLC, natomiast do identyfikacji metabolitów zastosowano HPLC-ESI-Q-MS. Analiza RP-HPLC jest metodą ilościową, natomiast HPLC-ESI-Q-MS dostarcza informacji na temat miejsc cięcia peptydu przez proteazy. Otrzymane wyniki wykazały, że badane peptydomimetyki charakteryzują się wysoką stabilnością enzymatyczną. Po 96 godz. inkubacji w ludzkim osoczu stężenie substratu wynosiło 80-90% stężenia początkowego. Po 96 godz. inkubacji związki **APL3** i **APL4** nie ulegały dalszej degradacji. W przypadku związków **APL1** i **APL2** w nieznacznym stopniu obserwowano hydrolizę enzymatyczną wiązania amidowego Tyr-*D*-Ala (Ryc.14). Zastosowanie HPLC-ESI-Q-MS pozwoliło zidentyfikować fragment *D*-Ala-Phe/Trp-CYN, natomiast nie zaobserwowano sygnału pochodzącego od tyrozyny. Może to świadczyć o tym, że aminokwas ten nie wiązał się ze złożem kolumny i był z niej wypłukiwany.



Ryc.14. Miejsce hydrolizy enzymatycznej wiązania amidowego zidentyfikowane dla związków **APL1** i **APL2**.

4.2.2. Powinowactwo związków do receptora opioidowego MOR

Powinowactwo związków do receptora opioidowego MOR oznaczano metodą kompetycyjnego wiązania radioligandów. Peptydomimetyki **APL1-4** wykazywały wysokie powinowactwo do MOR. Najsilniejsze wiązanie z receptorem zaobserwowano dla związków **APL1**, **APL3** i **APL4**. Związek **APL2** wykazywał słabsze powinowactwo do MOR. W przeciwieństwie do badanych peptydomimetyków, wchodzące w ich skład tripeptydy (**TP1-4**) charakteryzowały się bardzo niskim powinowactwem do badanych receptorów. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 2.

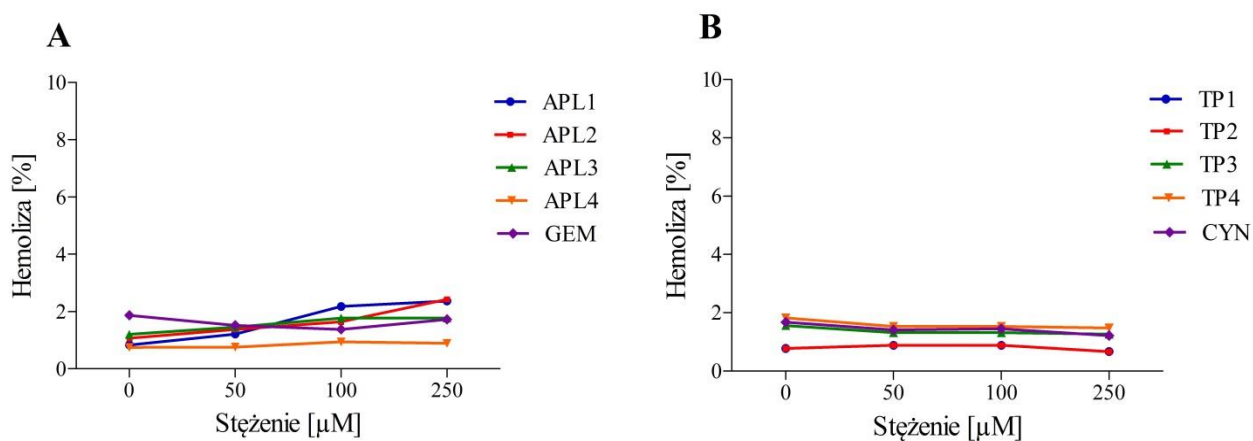
Tabela 2. Powinowactwo badanych związków do receptora opioidowego MOR

Związek	Sekwencja	IC ₅₀ (nM)
APL1	H-Tyr- <i>D</i> -Ala-Phe-Cyn	15,1 ± 0,5
APL2	H-Tyr- <i>D</i> -Ala-Trp-Cyn	77,6 ± 2,8
APL3	H-Tyr- <i>D</i> -Thr-Phe-Cyn	12,9 ± 0,4
APL4	H-Tyr- <i>D</i> -Thr-Trp-Cyn	19,5 ± 0,7
TP1	H-Tyr- <i>D</i> -Ala-Phe-OH	>1000
TP2	H-Tyr- <i>D</i> -Ala-Trp-OH	977 ± 35,2
TP3	H-Tyr- <i>D</i> -Thr-Phe-OH	616 ± 14,1
TP4	H-Tyr- <i>D</i> -Thr-Trp-OH	1000 ± 20,0

4.2.3. Aktywność hemolityczna badanych związków

Aktywność hemolityczna związków jest jednym z parametrów określających możliwość zastosowania danego związku jako potencjalnej substancji leczniczej. W celu zbadania aktywności hemolitycznej peptydomimetyków przeprowadzono doświadczenie, w którym elementy morfotyczne ludzkiej krwi obwodowej zostały poddane działaniu związków.

Doświadczenie wykazało, że stopień hemolizy wywołanej przez peptydomimetyki **APL1-3** był zależny od stężenia badanego związku. Związki **APL1-3** wykazywały zbliżoną aktywność hemolityczną, wzrastającą stopniowo wraz ze wzrostem stężenia związku, która jednak nie przekraczała 4% w stężeniu 250 μM . Największą zależność pomiędzy stopniem hemolizy a stężeniem związku obserwowano dla związku **APL1** ($p < 0,01$). Niezależnie od stężenia, najniższą aktywność hemolityczną wykazywał związek **APL4**, dla którego stopień hemolizy utrzymywał się poniżej 2%. Hemoliza wywołana działaniem związków **APL1-4** była zbliżona do aktywności hemolitycznej GEM (Ryc.15.A). Zależności pomiędzy stężeniem związku, a stopniem hemolizy nie zaobserwowano dla związków **TP1-4** oraz CYN. Hemoliza wywołana działaniem tych związków utrzymywała się na stałym poziomie 1-2% (Ryc.15.B).



Ryc.15. Hemoliza wywołana działaniem badanych związków: peptydomimetyków **APL1-4** i GEM (A) oraz tripeptydów **TP1-4** i CYN (B).

4.2.4. Właściwości przeciwbakteryjne peptydomimetyków

Właściwości przeciwbakteryjne związków **APL1-4** badano z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krążkowej. Przeprowadzone doświadczenie wykazało brak stref zahamowania wzrostu wokół krążków zawierających związki **APL1-4**. Wyraźne strefy zahamowania wzrostu obserwowano jedynie dla ampicyliny. Poniżej zaprezentowano wyniki doświadczenia dla związków **APL2** i **APL3** (Ryc.16).

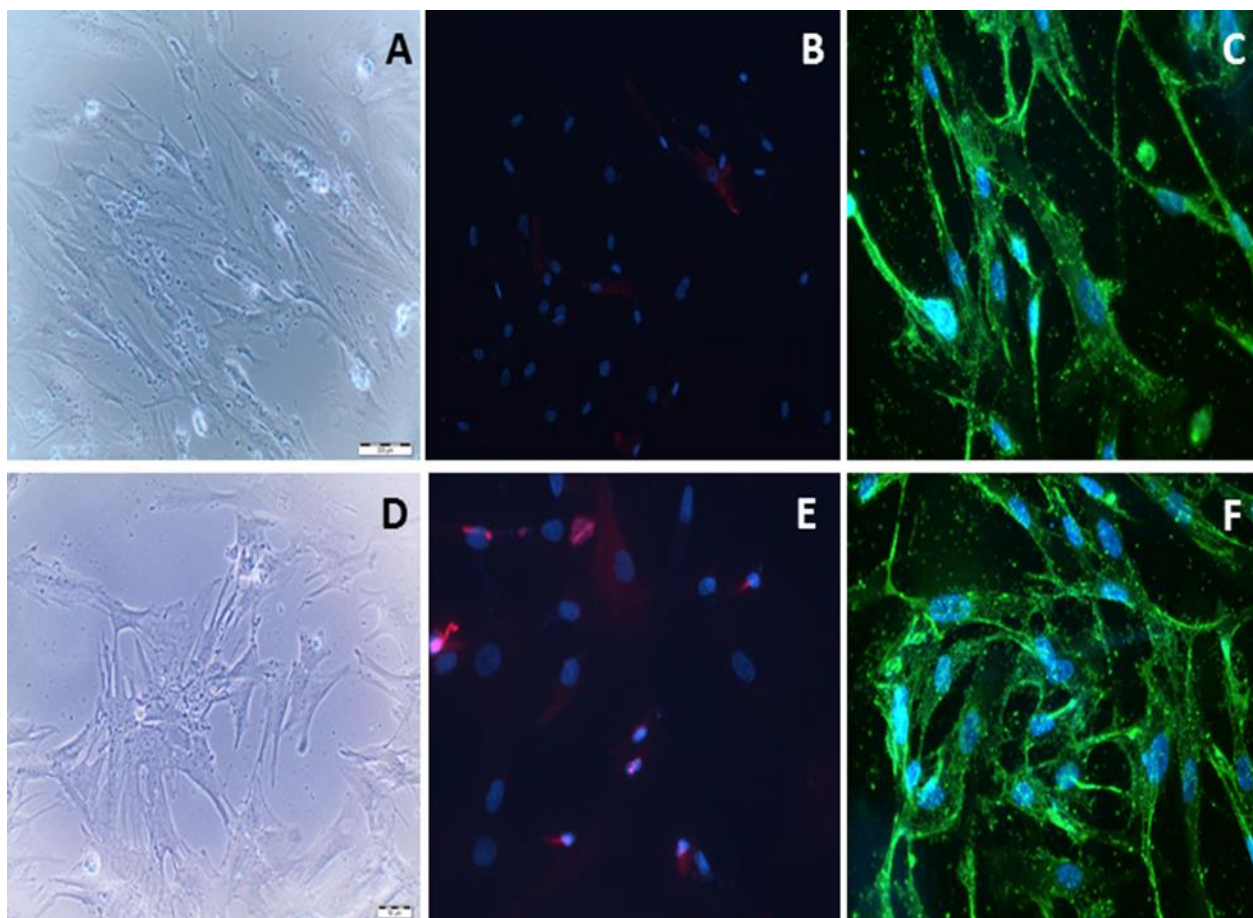
Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że peptydomimetyki **APL1-4** nie wykazują właściwości przeciwbakteryjnych.



Ryc.16. Wpływ peptydomimetyków **APL2** i **APL3** na wzrost bakterii *S. aureus* (A, C) i *E. coli* (B, D) w odniesieniu do ampicyliny (Amp).

4.3. Charakterystyka komórek wyizolowanych z materiału klinicznego

Z otrzymanych fragmentów guzów trzustki wyizolowano dwa rodzaje komórek, różniące się fenotypowo. Pierwszy rodzaj komórek to duże komórki charakteryzujące się wydłużonym, rozgałęzionym kształtem (Ryc.17.D), podobnie jak fibroblasty linii BJ (Ryc.17.A). Drugi to małe komórki charakteryzujące się nieregularnym kształtem, dużym jądrem i niewielką ilością cytoplazmy. Komórki te rosły w klastrach podobnie jak nowotworowe komórki linii PANC-1 (Ryc.18.D,G).

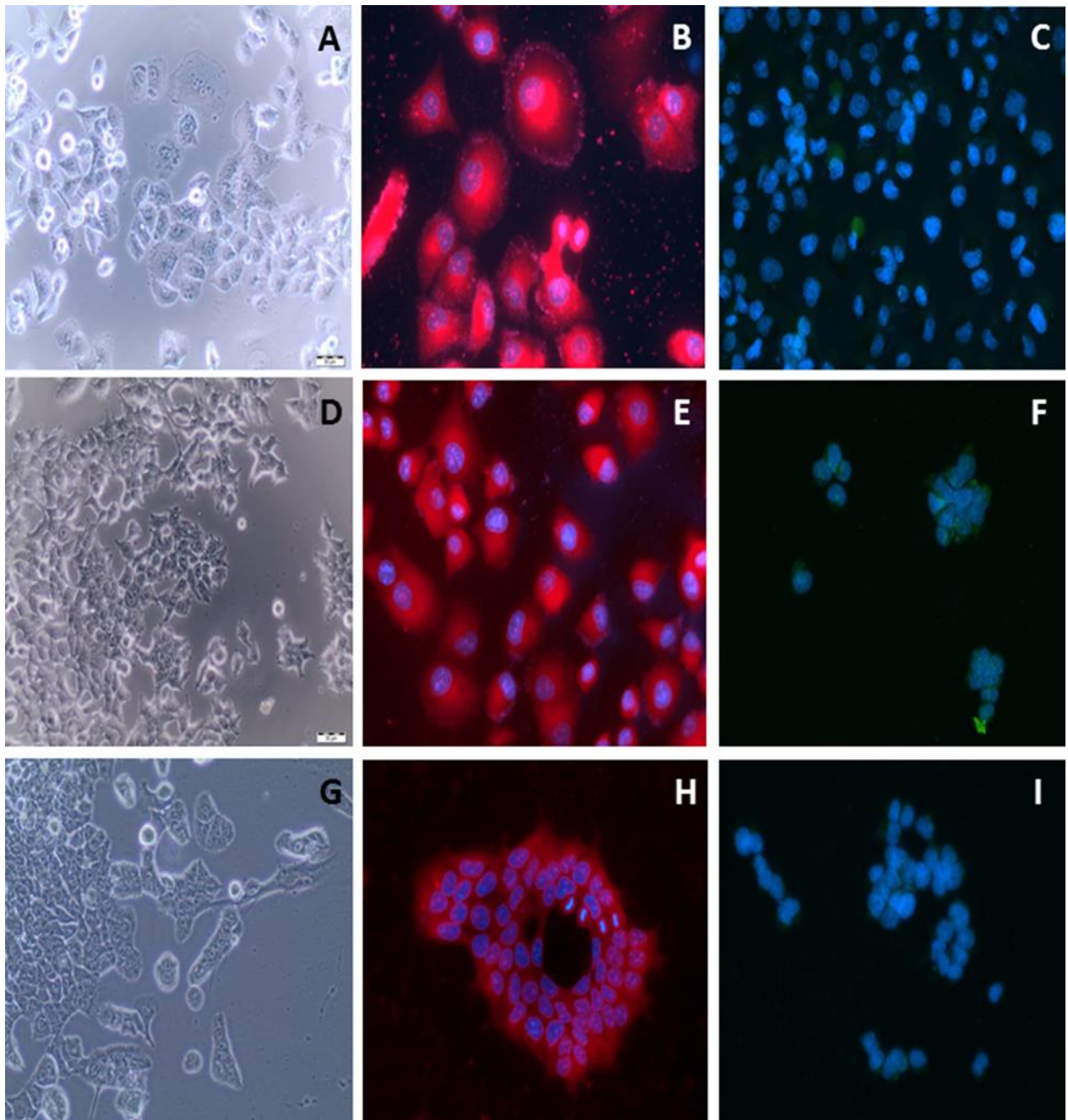


Ryc.17 Komórki linii BJ: w jasnym polu (A), znakowane CK7 (B), oraz znakowane fibronektyną (C); wyizolowane komórki podścieliska guza: w jasnym polu (D), znakowane CK7 (E), oraz znakowane fibronektyną (F). (powiększenie 40x)

Spośród 25 izolatów, dwa scharakteryzowano jako komórki nowotworowe. Komórki te cechowała obecność CK7 oraz brak fibronektyny, podobnie jak w przypadku komórek linii PANC-1. Wyizolowane komórki oznaczono jako **M-DS** i **M-Sr** (Ryc.18.D,G):

- M-DS - nabłonkowe komórki nowotworowe;
- M-Sr - nabłonkowe komórki nowotworowe;

Komórki M-DS i M-Sr zostały uzyskane z bioptatów, pochodzących od dwóch pacjentów. Badanie histopatologiczne, przeprowadzone w Zakładzie Histopatologii CSK-MSWiA, potwierdziło diagnozę przewodowego gruczolakoraka trzustki.



Ryc.18 Komórki linii PANC-1: w jasnym polu (A), znakowane CK-7 (B) oraz znakowane fibronektyną (C); komórki linii M-DS: w jasnym polu (D), znakowane CK-7 (E) oraz znakowane fibronektyną (F); komórki linii M-Sr: w jasnym polu (G), znakowane CK-7 (H) oraz znakowane fibronektyną (I). (powiększenie 100x)

Pozostałe 23 izolaty scharakteryzowano jako fibroblasty podścieliska guza. Barwienie specyficznymi przeciwciałami wykazało obecność fibronektyny i brak CK7, podobnie jak w przypadku fibroblastów BJ (Ryc.17). Kolejne doświadczenia prowadzono z wykorzystaniem wyizolowanych komórek nowotworowych M-DS i M-Sr oraz PANC-1 i BJ.

Co istotne, na powierzchni wszystkich 4 badanych linii komórkowych wykazano obecność receptorów opioidowych MOR. Największą gęstością receptorów μ charakteryzowały się wyizolowane komórki nowotworowe M-DS oraz M-Sr. Dla linii BJ i PANC-1 stwierdzono najmniejszą gęstość receptorów MOR. Wyniki doświadczenia przedstawiono w tabeli 3.

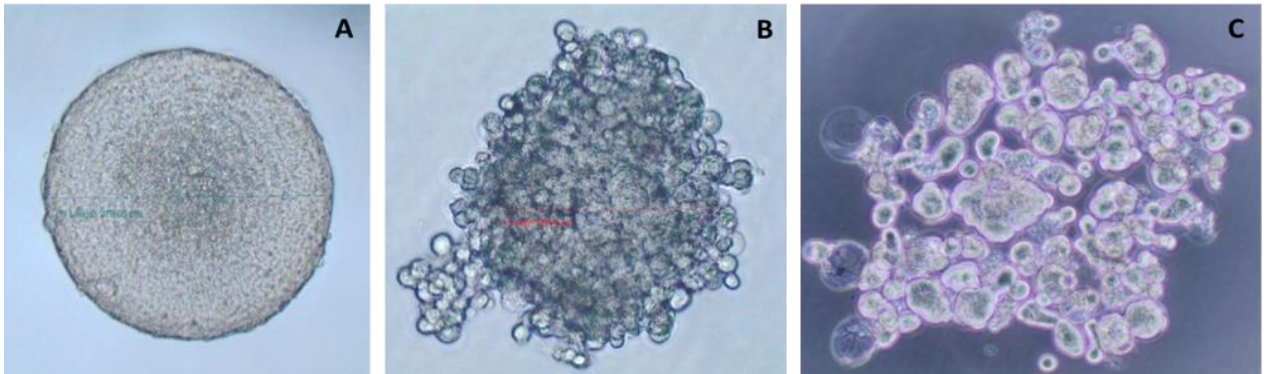
Tabela 3. Oznaczenie obecności receptorów opioidowych MOR na powierzchni komórek.

	BJ	PANC-1	M-DS	M-Sr
MOR	+	+	+++	++

+ - najniższa gęstość receptorów, ++ - średnia gęstość receptorów, +++ - najwyższa gęstość receptorów.

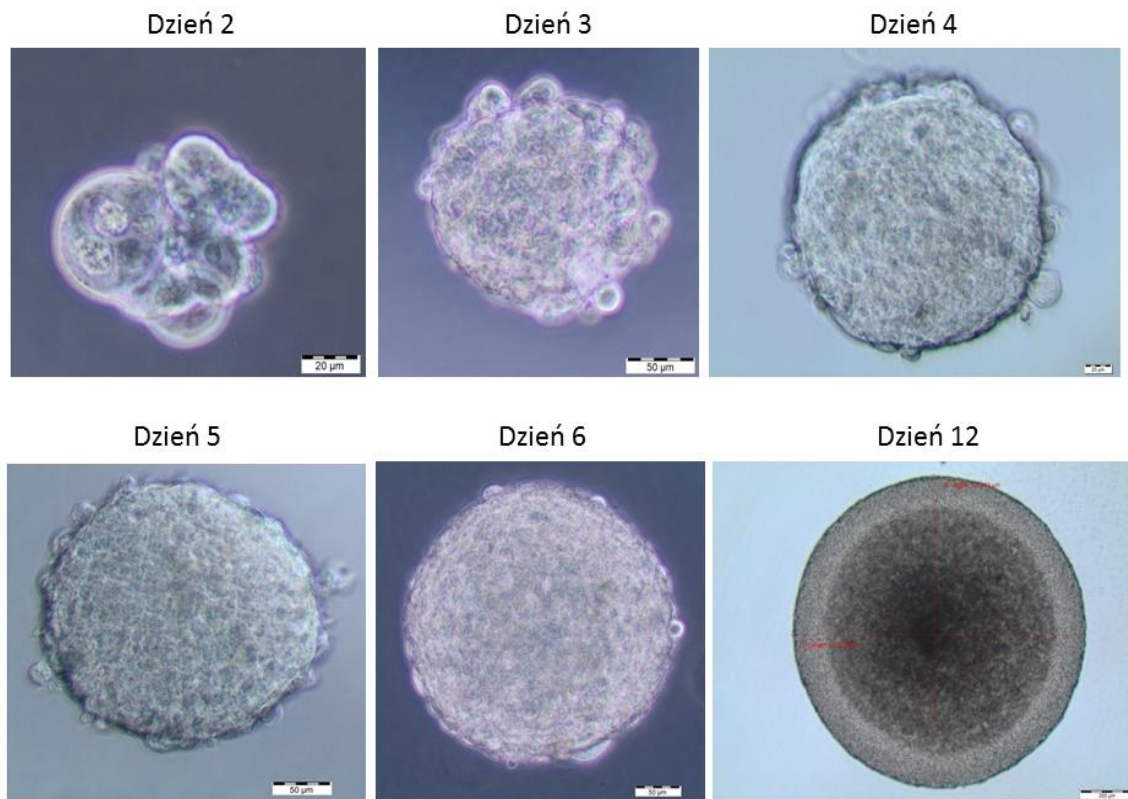
4.4. Charakterystyka sferoidów

Sferoidy uzyskano z wyizolowanych uprzednio komórek nowotworowych M-DS i M-Sr. Otrzymane sferoidy charakteryzowały się regularnym kolistym kształtem bez możliwości wyróżnienia poszczególnych komórek (Ryc.19.A). Wyizolowane komórki wykazywały zdolność do tworzenia sfer tylko do 4 pasaży. Transfer sferoidu do naczynia hodowlanego (płytką 24-dółkową) skutkowało przytwierdzeniem sfery do dna naczynia, a następnie migracją komórek ze sfery. Komórki te posiadały zdolność do wzrostu w modelu 2D oraz ponownego tworzenia sfer. Formowanie sfer następowało w ciągu 48 godz. od momentu założenia hodowli. W kolejnych dniach obserwowano regularny wzrost sferoidów (Ryc.20). Nie obserwowano różnic w szybkości wzrostu sfer utworzonych przez komórki M-DS i M-Sr.



Ryc.19. Zdjęcia z mikroskopu kontrastowo-fazowego: 5-dniowa sfera utworzona przez komórki M-DS (A), agregat utworzony przez komórki PANC-1 (B) oraz agregaty utworzone przez komórki BJ (C). (powiększenie 40x)

Sferoidów nie uzyskano z komórek linii PANC-1 oraz BJ. Komórki linii PANC-1 formowały agregaty, w których można było wyróżnić poszczególne komórki (Ryc.19.B). Agregaty PANC-1 charakteryzowały się nieregularnym kształtem oraz większą podatnością na uszkodzenia mechaniczne podczas wszelkich manipulacji, np. zmiany pożywki hodowlanej. W przypadku fibroblastów BJ obserwowano małe skupiska luźno ze sobą połączonych lub pojedynczych komórek (Ryc.19.C).



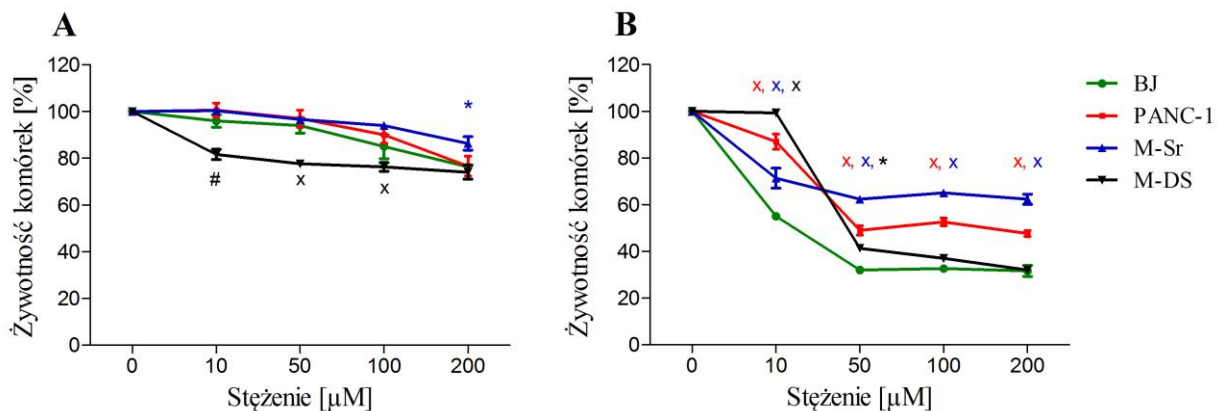
Ryc.20. Zdjęcia z mikroskopu kontrastowo-fazowego przedstawiające formowanie i wzrost sferoidu linii M-DS.

4.5. Właściwości biologiczne badanych związków

Wpływ odpowiednio: peptydomimetyków, tripeptydów, CYN oraz GEM na żywotność komórek oceniano z wykorzystaniem komercyjnego testu CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). W pierwszej kolejności zbadano wrażliwość komórek prawidłowych (BJ) i nowotworowych (PANC-1, M-DS, M-Sr) na gemcytabinę. Następnie określono wpływ peptydomimetyków **APL1-4** na żywotność komórek. Na końcu sprawdzono wpływ tripeptydów **TP1-4** i CYN na żywotność komórek. Testowane związki charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością biologiczną w stosunku do poszczególnych komórek. Wyniki otrzymane dla komórek nowotworowych odnoszono do wyników otrzymanych dla fibroblastów. Kontrolę pozytywną (100% żywotności komórek) stanowiły komórki inkubowane bez dodatku badanych związków. Dla zachowania przejrzystości, wykresy przedstawiają wyniki uzyskane dla stężeń 0-200 μM .

4.5.1. Wpływ gemcytabiny na żywotność komórek

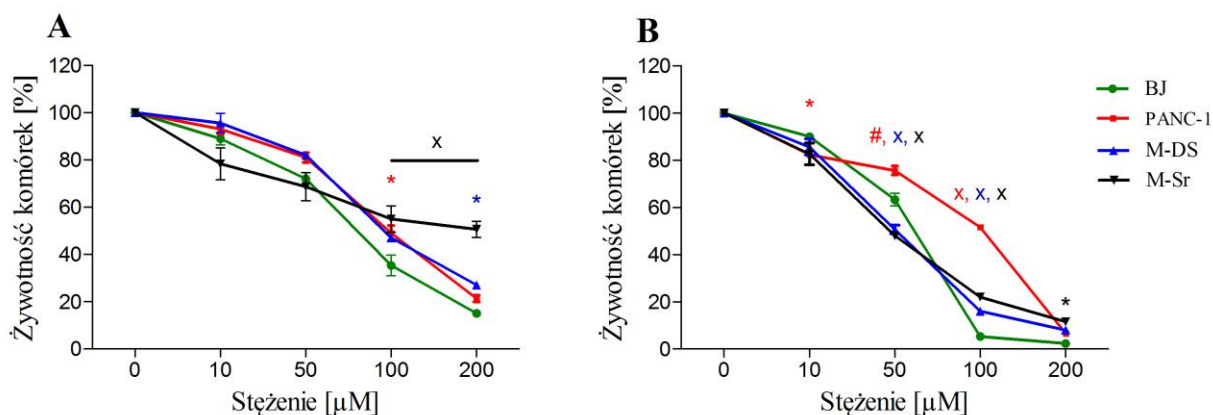
W badaniach, jako substancję referencyjną, zastosowano gemcytabinę. Wpływ gemcytabiny na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych był zależny od stężenia i czasu inkubacji. Zaobserwowano, że w czasie 24 godzinnej inkubacji wszystkie badane linie komórkowe wykazywały podobną niską wrażliwość na działanie GEM. Po 24 godz. inkubacji, największy spadek żywotności odnotowano dla komórek rakowych M-DS (ryc.21). Wydłużenie czasu ekspozycji komórek na GEM do 72 godz. skutkowało istotnym spadkiem żywotności komórek, nawet o 60% przy stężeniu $>50 \mu\text{M}$ ($p < 0,001$) (ryc.21). Zaobserwowano, że długo prowadzona inkubacja najbardziej wpływała na żywotność prawidłowych fibroblastów BJ. Spośród badanych komórek, największą opornością na GEM charakteryzowały się wyizolowane komórki nowotworowe M-Sr.



Ryc.21. Wpływ gemcytabiny na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

4.5.2. Wpływ związku APL1 na żywotność komórek

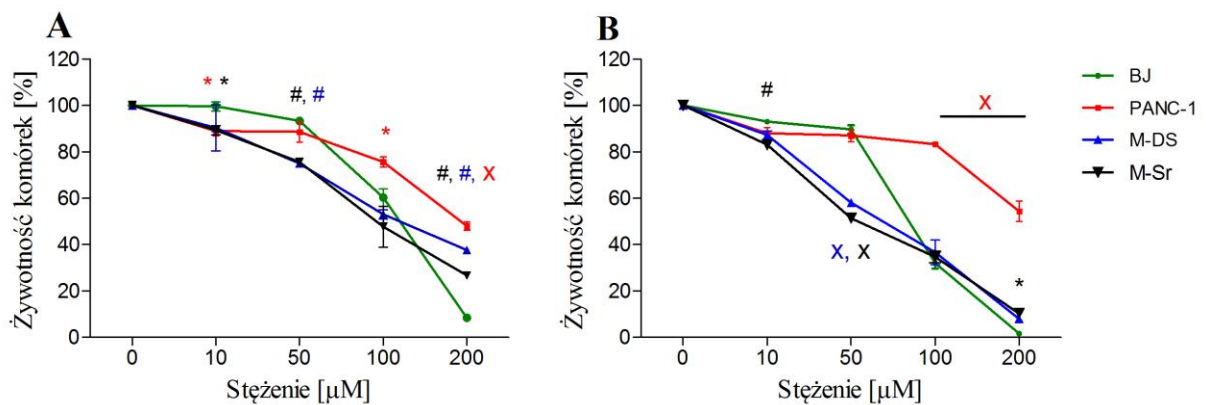
Wpływ związku **APL1** na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych był zależny od stężenia. Po 24 godz. inkubacji komórki PANC-1 i M-DS były nieznacznie bardziej odporne na działanie **APL1** niż fibroblasty. Komórki M-Sr wykazywały większą oporność niż BJ w stężeniach powyżej 100 μM ($p>0,001$) (Ryc.22). Wydłużenie inkubacji do 72 godz. powodowało wyraźny wzrost oporności PANC-1 w stężeniach $>50 \mu\text{M}$.



Ryc.22. Wpływ związku **APL1** na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- $p<0,05$; #- $p<0,01$; x- $p<0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

4.5.3. Wpływ związku APL2 na żywotność komórek

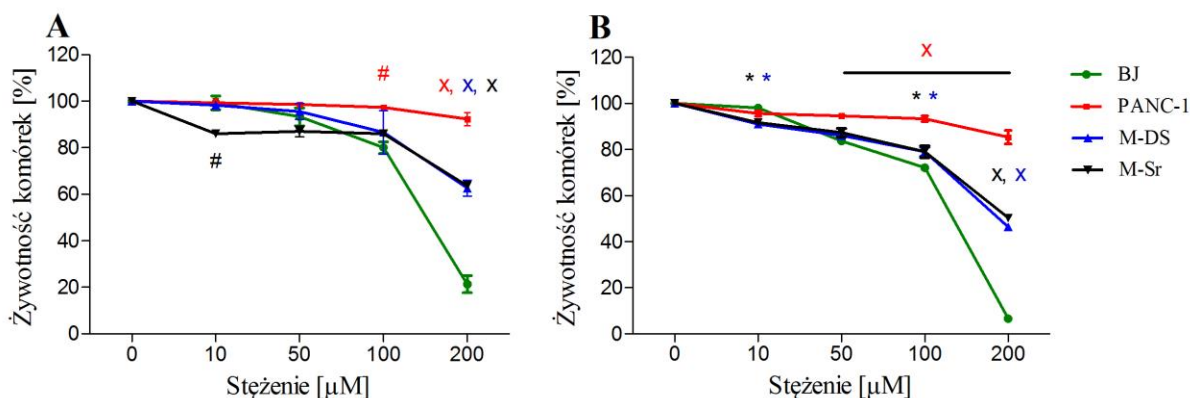
Wpływ związku **APL2** na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych był zależny od stężenia. Komórki M-DS i M-Sr, w stężeniach <100 μM , były bardziej wrażliwe niż fibroblasty BJ. Efekt ten obserwowano zarówno po 24 jak i 72 godz. inkubacji. W stężeniach <50 μM , PANC-1 cechowały się zdecydowanie większą podatnością na działanie związku **APL2** niż BJ, natomiast powyżej stężenia 50 μM fibroblasty wykazywały większą wrażliwość niż PANC-1 (Ryc.23).



Ryc.23. Wpływ związku **APL2** na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych, po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

4.5.4. Wpływ związku **APL3** na żywotność komórek

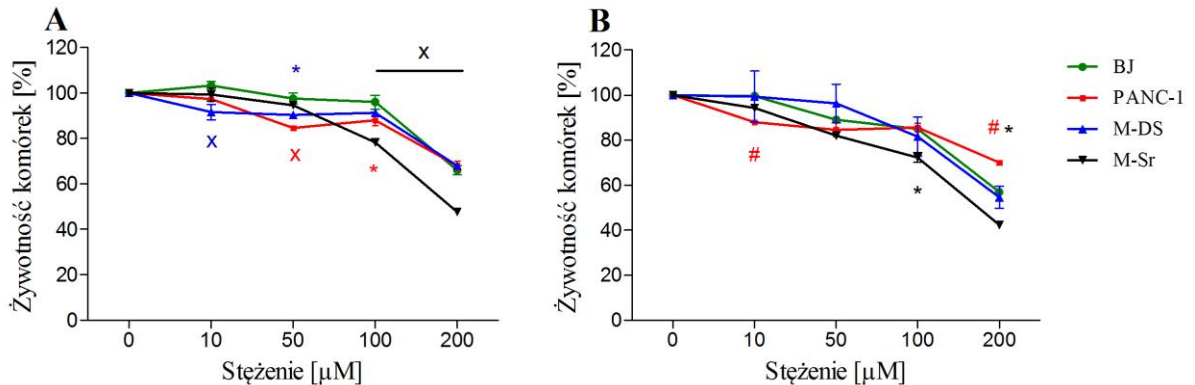
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż wpływ związku **APL3** na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych był wysoce zależny od stężenia. Po 24 godz. ekspozycji obserwowano spadek żywotności komórek M-Sr o ~15% w porównaniu do kontroli. W stężeniach <100 μM żywotność komórek BJ, PANC-1 i M-DS utrzymywała się na poziomie kontroli. Efekt ten był szczególnie widoczny w przypadku PANC-1 zarówno po 24, jak i 72 godz. inkubacji. W porównaniu do BJ, komórki PANC-1 charakteryzowały się najwyższą opornością na działanie związku **APL3**. Wydłużenie inkubacji nie wpływało istotnie na obniżenie żywotności wszystkich badanych linii ($p > 0,05$) (Ryc.24).



Ryc.24. Wpływ związku **APL3** na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

4.5.5. Wpływ związku APL4 na żywotność komórek

Wpływ związku **APL4** na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych był zależny od stężenia. Po 24 godz. inkubacji, wszystkie linie nowotworowe wykazywały większą wrażliwość na działanie związku **APL4** niż fibroblasty (Ryc.25.A). W porównaniu do BJ, związek **APL4** istotnie obniżał żywotność komórek PANC-1 i M-Ds. Dla komórek M-Sr, istotny statystycznie spadek żywotności był obserwowany w stężeniach >100 μ M po 24 i 72 godz. inkubacji. Dla wszystkich linii, po 24 i 72 godz. ekspozycji, związek **APL4** osiągał najwyższą aktywność w stężeniach >100 μ M.

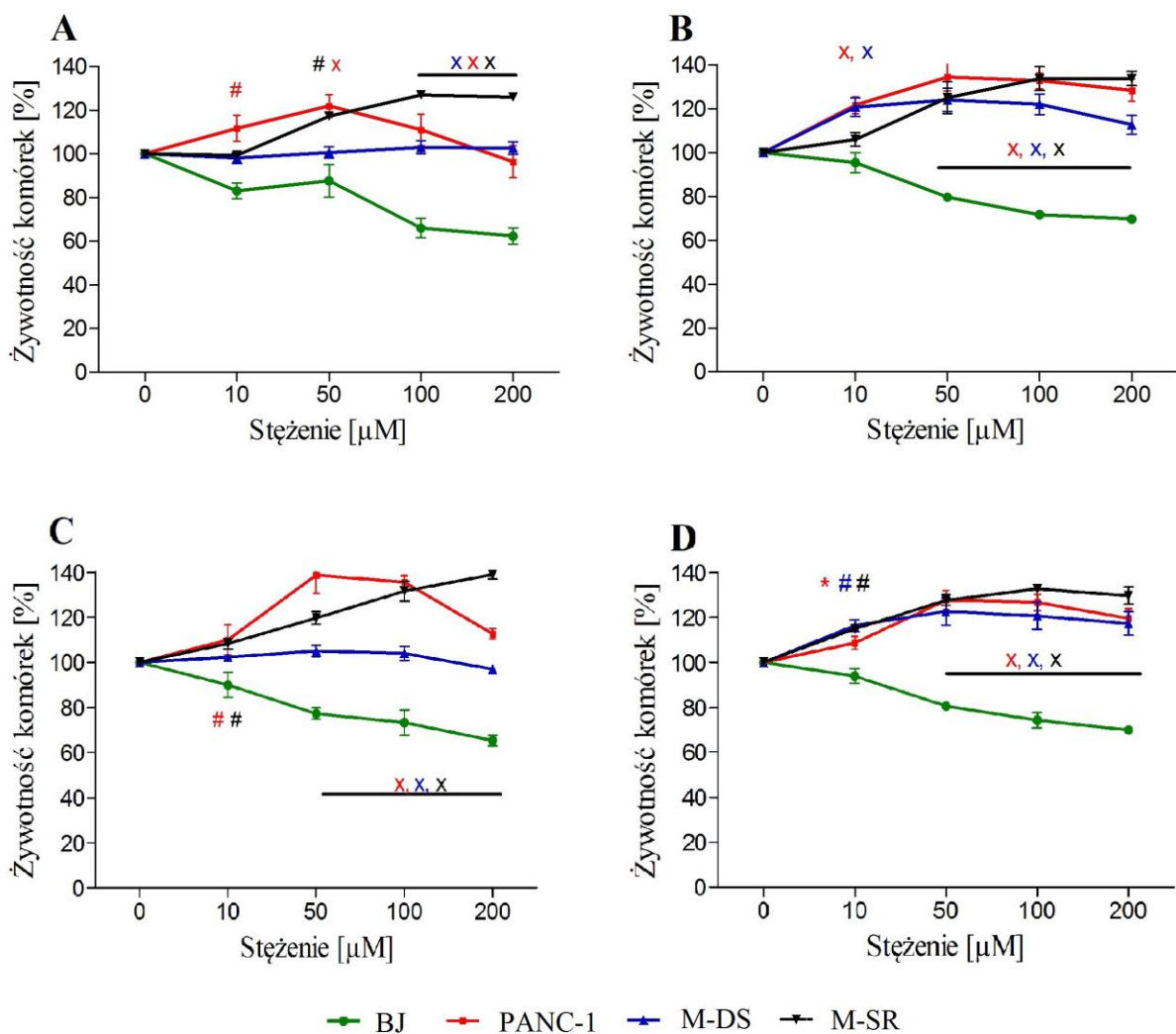


Ryc.25. Wpływ związku **APL4** na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

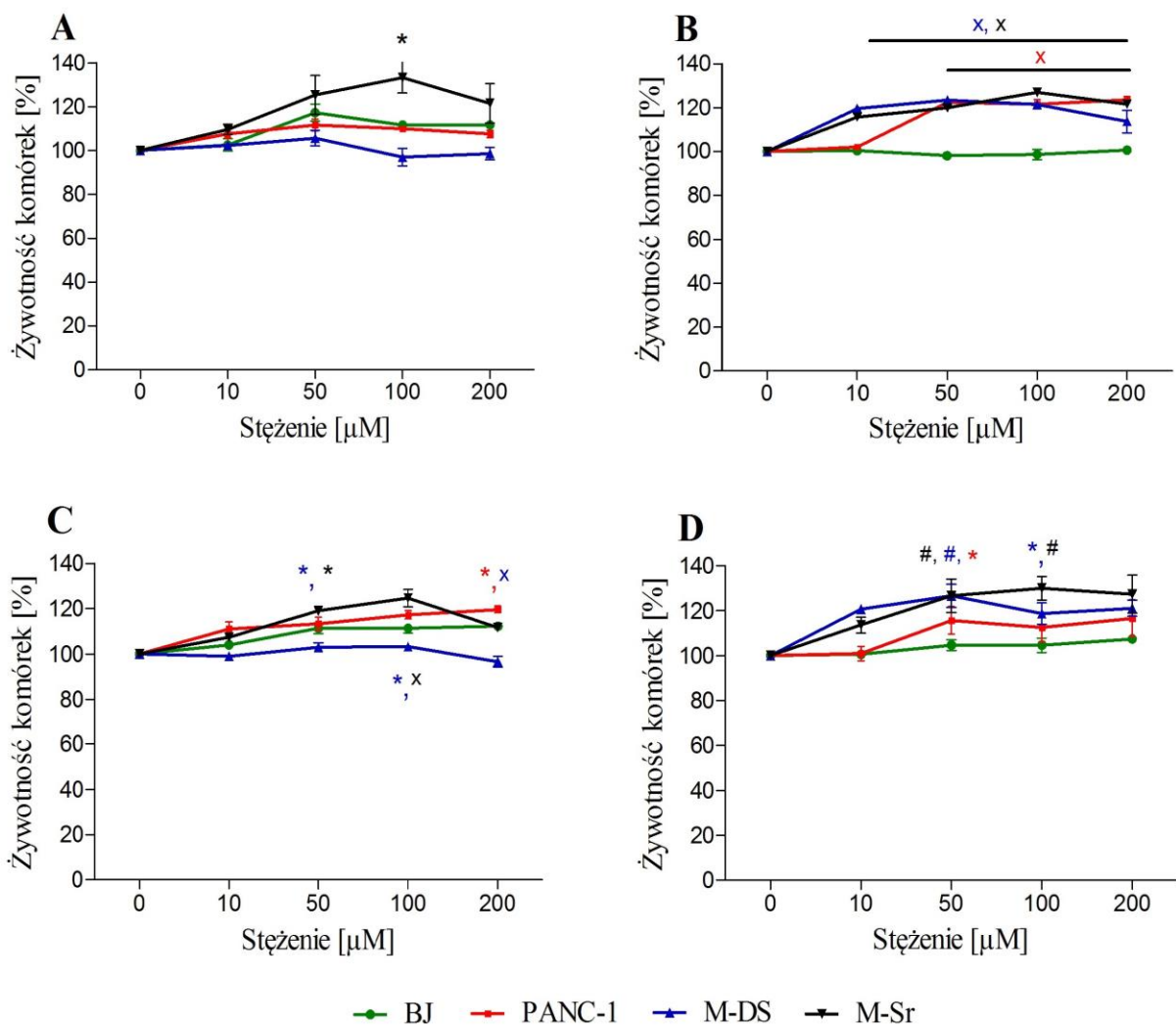
4.5.6. Wpływ tripeptydów i *trans*-cynamoilopiperazyny na żywotność komórek

Wpływ tripeptydów **TP1-4** na żywotność komórek różnił się pomiędzy badanymi liniami komórkowymi. Zaobserwowano, że - niezależnie od czasu inkubacji i stężenia - fibroblasty BJ były istotnie bardziej wrażliwe na działanie związków **TP1** i **TP2** niż komórki nowotworowe (Ryc.26). Po 24 i 72 godz. inkubacji, dla komórek PANC-1, M-DS i M-Sr poddanych działaniu **TP1** i **TP2** obserwowano znaczący wzrost żywotności w stosunku do kontroli. Związki **TP3** i **TP4** powodowały wzrost żywotności komórek w porównaniu do kontroli (Ryc.27). Po 24 godz. inkubacji wzrost odnotowano dla wszystkich badanych linii komórkowych. Przy 72 godz. ekspozycji, żywotność fibroblastów była zbliżona do kontroli, natomiast żywotność komórek nowotworowych była wyższa niż komórek kontrolnych. Spośród badanych linii komórkowych, fibroblasty BJ wykazywały największą wrażliwość na działanie tripeptydów **TP1-4**. Najbardziej odporne na działanie tripeptydów były komórki M-Sr.

Po przeanalizowaniu otrzymanych wyników, tripeptydy **TP1-4** nie zostały wytypowane do dalszych badań z wykorzystaniem trójwymiarowego modelu *in vitro*.

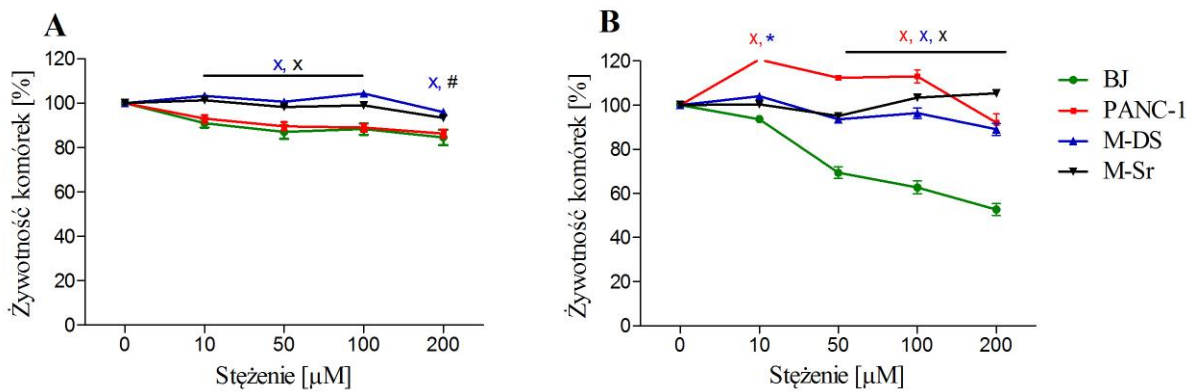


Ryc.26. Wpływ tripeptydów na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych: wpływ związku **TP1** po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji, wpływ związku **TP2** po 24 (C) i 72 godz. (D) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: * - $p < 0,05$; # - $p < 0,01$; x - $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.



Ryc.27. Wpływ tripeptydów na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych: wpływ związku **TP3** po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji, wpływ związku **TP4** po 24 (C) i 72 godz. (D) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

Wpływ *trans*-cynamoilopiperazyny na żywotność komórek był zależny do czasu inkubacji i badanych komórek. Po 24 godz. inkubacji odnotowano obniżenie żywotności komórek BJ i PANC-1 o ~10% w stosunku do kontroli. Żywotność komórek M-DS i M-Sr była zbliżona do żywotności komórek inkubowanych bez dodatku CYN. Po 72 godz. inkubacji, zaobserwowano wzrost żywotności PANC-1 w porównaniu do komórek nie poddanych działaniu CYN. Podobnego wzrostu nie odnotowano dla M-DS i M-Sr. Po 72 godz. inkubacji obserwowano istotny spadek żywotności fibroblastów wraz ze wzrostem stężenie CYN. W porównaniu do BJ, komórki M-DS i M-Sr były mniej wrażliwe na działanie CYN, zarówno po 24 jak i po 72 godz. inkubacji (Ryc.28).



Ryc.28. Wpływ CYN na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

4.6. Wpływ peptydomimetyków na żywotność komórek w modelu trójwymiarowym

Wpływ peptydomimetyków oraz GEM na żywotność komórek oceniano z wykorzystaniem komercyjnego testu CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega). W pierwszej kolejności zbadano wrażliwość sferoidów M-DS i M-Sr na GEM. Następnie, sferoidy poddano działaniu peptydomimetyków **APL1-4**. Badane sferoidy charakteryzowały się zróżnicowaną wrażliwością na działanie poszczególnych związków. Wyniki otrzymane dla peptydomimetyków odnoszono do wyników otrzymanych dla GEM. Kontrolę pozytywną (100% żywotności sferoidów) stanowiły sferoidy inkubowane bez dodatku badanych związków. Dla zachowania przejrzystości, wykresy przedstawiają wyniki uzyskane dla stężeń 0-100 μM .

4.6.1. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność sferoidów M-DS

Wpływ peptydomimetyków i GEM na żywotność sferoidów M-DS, po 24 i 72 godz. inkubacji przedstawiono na poniższych wykresach (Ryc.29.A,B). Kontrolę stanowiły sferoidy hodowane bez dodatku peptydomimetyków.

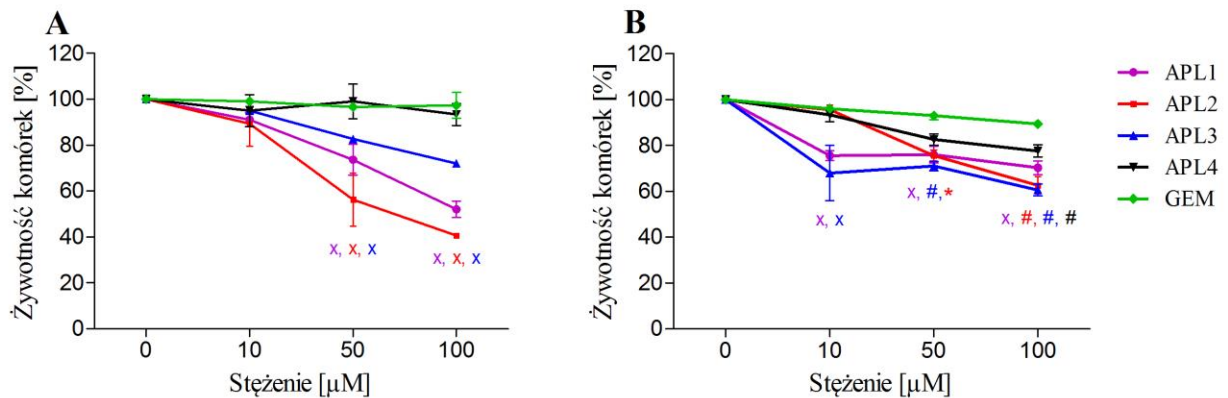
Jak można zauważyć, sferoidy M-DS poddane działaniu GEM wykazywały żywotność porównywalną z żywotnością sferoidów kontrolnych. Aktywność GEM utrzymywała się na stałym poziomie, niezależnie od stężenia. Wydłużenie inkubacji do 72 godz. nie wpływało istotnie na zwiększenie aktywności GEM ($p > 0,05$).

Po 24 godz. inkubacji, peptydomimetyk **APL1** w stężeniu 100 μM , obniżał żywotność komórek o ok. 40%. Wydłużenie czasu inkubacji do 72 godz. powodowało wzrost aktywności związku w stężeniu 10 μM oraz nieznaczny spadek w stężeniu 100 μM .

W przypadku peptydomimetyku **APL2**, po 24 godz. ekspozycji obserwowano spadek żywotności komórek sferoidu, w porównaniu do kontroli, o ok. 40% w stężeniu związku równym 50 μM . Po 72 godz. inkubacji obserwowano częściową utratę aktywności związku **APL2** w zakresie stężeń 0-50 μM ($p < 0,05$).

Peptydomimetyk **APL3** skuteczniej obniżał żywotność komórek sfery po 72 godz. inkubacji. Żywotność sferoidów poddanych działaniu związku **APL3** w stężeniu 10 μM , była niższa o ok. 30% w porównaniu ze kontrolą. Krótkotrwała inkubacja (24 godz.) ze związkiem **APL3** w stężeniu 100 μM powodowała spadek żywotności sferoidu o 20%.

Żywotność sferoidów poddanych działaniu związku **APL4** przez 24 godz. była zbliżona do żywotności sferoidów kontrolnych, niezależnie od stężenia. Przy wydłużonej inkubacji obserwowano wzrost aktywności związku **APL4** zależnie od stężenia.



Ryc.29. Wpływ peptydomimetyków **APL1-4** i GEM na żywotność sferoidów M-DS po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: * - $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

4.6.2. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność sferoidów M-Sr

Wpływ peptydomimetyków i GEM na żywotność sferoidów M-Sr po 24 i 72 godz. inkubacji przedstawiono na poniższych wykresach (Ryc.30.A,B).

Wpływ GEM na żywotność sferoidów M-Sr był zależny od stężenia jedynie w nieznacznym stopniu. Żywotność sferoidów M-Sr poddanych działaniu GEM była średnio o 5% niższa w porównaniu z kontrolą. Wydłużenie inkubacji do 72 godz. nie wpływało istotnie na zwiększenie negatywnego wpływu GEM na komórki ($p > 0,05$).

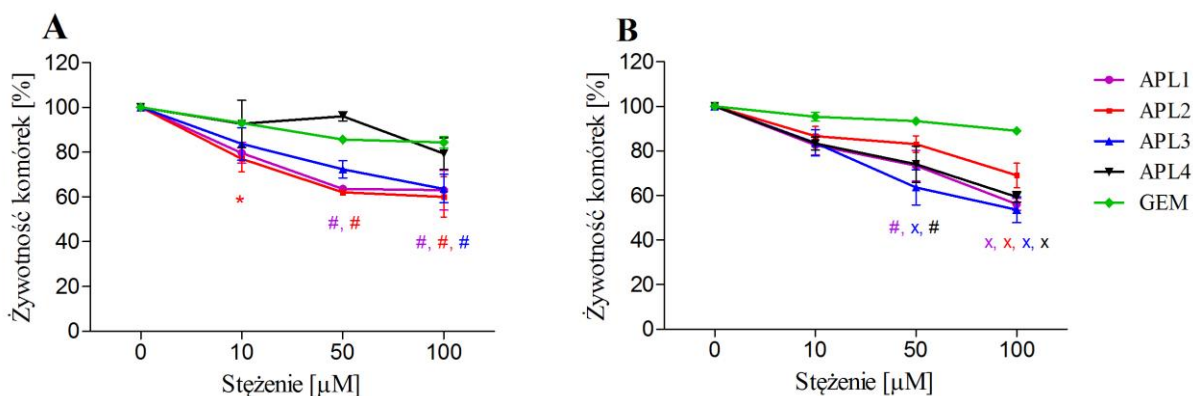
Działanie peptydomimetyku **APL1** było zależne od stężenia i czasu inkubacji. Krótkotrwała inkubacja istotnie wpływała na obniżenie żywotności komórek sferoidu. Po 72 godz.

inkubacji zaobserwowano niewielki spadek aktywności związku **APL1** w stężeniach powyżej 50 μM .

Działanie peptydomimetyku **APL2** było zależne od stężenia i czasu inkubacji. Krótkotrwała inkubacja istotnie wpływała na obniżenie żywotności komórek sferoidu. Natomiast, po 72 godz. ekspozycji obserwowano częściowy spadek aktywności związku **APL2**.

Wpływ peptydomimetyku **APL3** na żywotność komórek był zależny od stężenia i niezależny od czasu inkubacji. Największy spadek żywotności sferoidu obserwowano dla stężeniu 100 μM związku.

Aktywność peptydomimetyku **APL4** była zależna od czasu inkubacji. Sfery poddane działaniu związku **APL4** przez 24 godz. wykazywały żywotność zbliżoną do kontroli. Tylko przy stężeniu 100 μM odnotowano spadek żywotności komórek o ok. 15%. Natomiast po 72 godz. inkubacji, aktywność związku **APL4** znacząco wzrastała ($p < 0,01$).



Ryc.30. Wpływ peptydomimetyków **APL1-4** i GEM na żywotność sferoidów M-Sr po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

4.7. Wpływ wzajemnego oddziaływania peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych

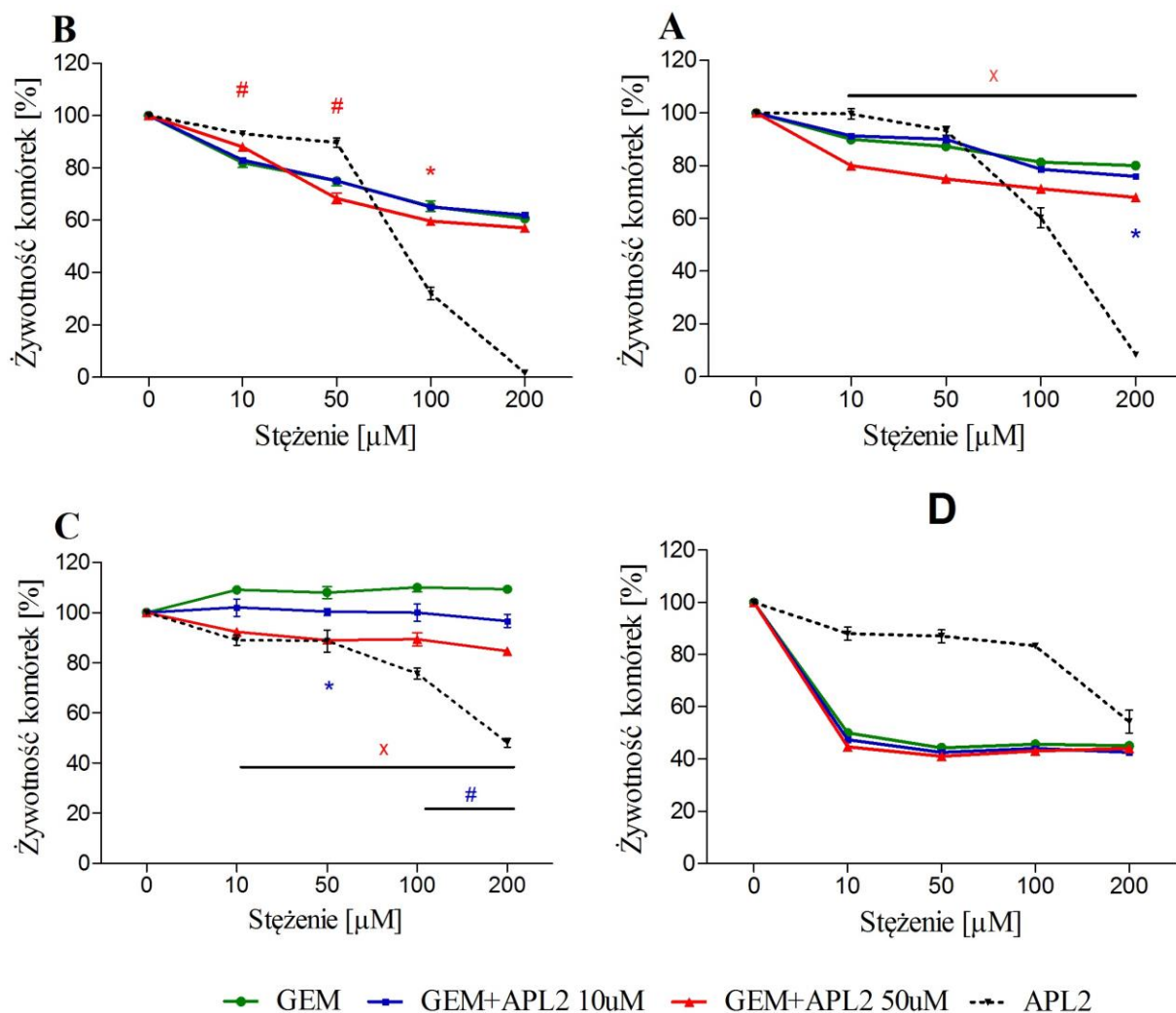
Na podstawie uprzednio otrzymanych wyników, peptydomimetyki **APL2** i **APL3** zostały wybrane do zbadania skojarzonego wpływu GEM i peptydomimetyku na żywotność komórek. Doświadczenia przeprowadzono w modelach 2D i 3D. Badanie wykazało różnice w odpowiedzi komórek poddanych jednoczesnemu działaniu GEM i peptydomimetyku.

4.7.1. Wpływ wzajemnego oddziaływania związków w modelu dwuwymiarowym

Przeprowadzone badania wykazały, że jednoczesne zastosowanie GEM i związku **APL2** istotnie wpływa na zmianę żywotności badanych komórek, w porównaniu do samej GEM. Uzyskane wyniki w porównaniu do GEM przedstawiono na rycinach 31 - 34.

W przypadku fibroblastów BJ zaobserwowano, że komórki poddane jednoczesnemu działaniu GEM+**APL2** (10 μM) wykazują zbliżoną żywotność do komórek poddanych działaniu samej GEM. Efekt ten był niezależny od czasu inkubacji. Po 24 godz., dla kombinacji GEM+ **APL2** (50 μM) spadek żywotności komórek był istotnie większy niż dla samej GEM ($p < 0,001$). Natomiast po 72 godz. różnica ta była mniejsza i obserwowana w stężeniach powyżej 50 μM (Ryc.31.B).

W porównaniu do GEM, po 24 godz. inkubacji, GEM z dodatkiem **APL2** (10 i 50 μM) skuteczniej obniżała żywotność komórek PANC-1. Różnica ta była szczególnie widoczna w przypadku kombinacji GEM i 50 μM stężeniem związku **APL2** ($p < 0,001$). Po 72 godz. inkubacji wyniki otrzymane dla kombinacji GEM+**APL2** były porównywalne z wynikami otrzymanymi dla GEM (Ryc.31.D).

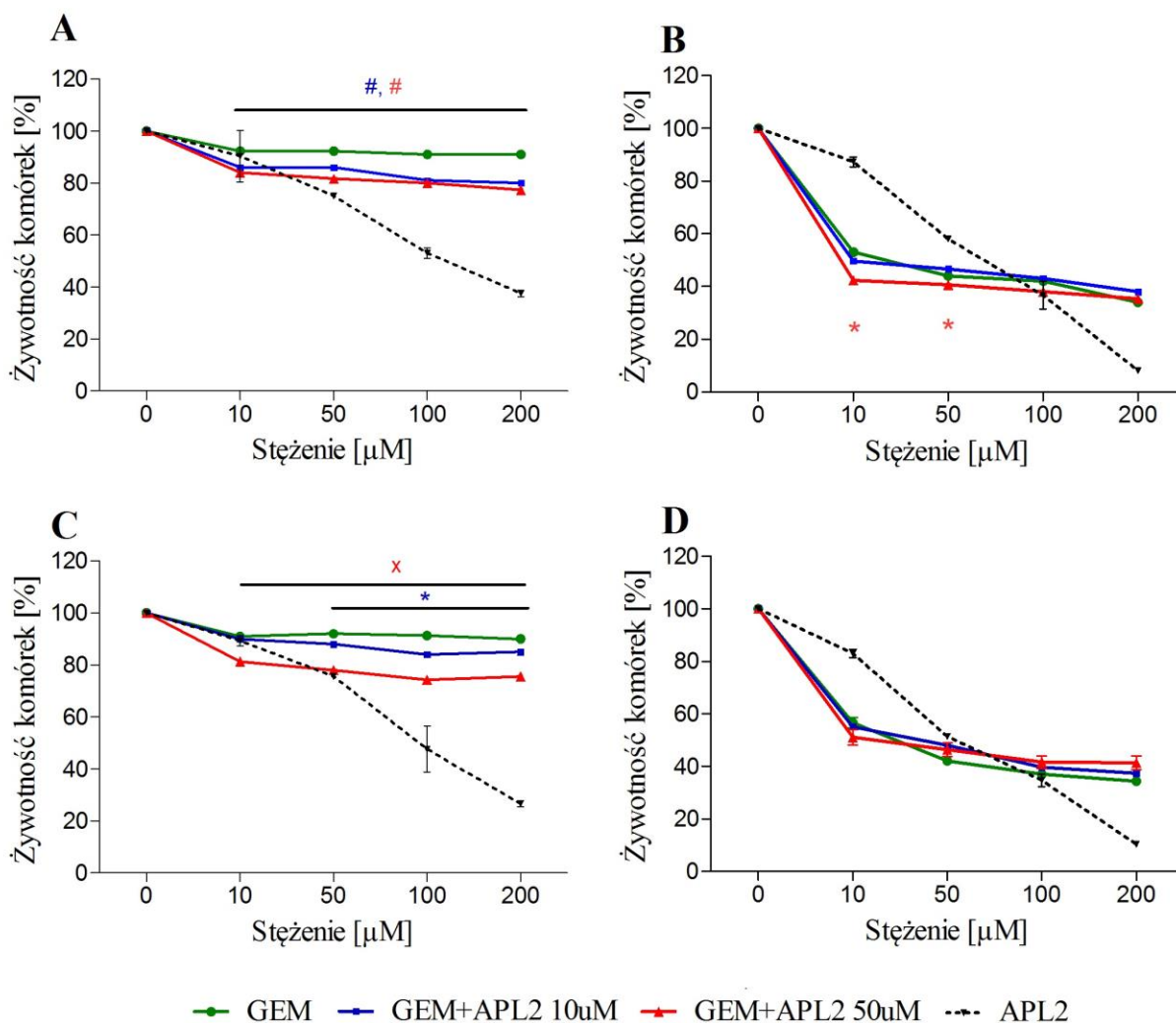


Ryc.31. Wpływ kombinacji związku **APL2** i GEM na żywotność komórek: fibroblastów BJ po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji, komórek nowotworowych PANC-1 po 24 (C) i 72 godz. (D) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: * - $p < 0,05$; # - $p < 0,01$; x - $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

Również w przypadku komórek M-DS, w porównaniu do GEM, po 24 godz. inkubacji, GEM z dodatkiem **APL2** (10 i 50 μM) skuteczniej obniżała żywotność komórek. Nie obserwowano różnic pomiędzy kombinacjami GEM i **APL2** (10 i 50 μM). Po 72 godz. inkubacji wyniki otrzymane dla kombinacji GEM i **APL2** były porównywalne z wynikami otrzymanymi dla GEM. W porównaniu do GEM, istotną różnicę w żywotności komórek

odnotowano dla kombinacji GEM+**APL2** (50 μM) w stężeniach GEM 10 - 50 μM ($p < 0,05$) (Ryc.32).

Zaobserwowano, że w porównaniu do GEM, po 24 godz. inkubacji, kombinacji GEM z dodatkiem związku **APL2** (10 i 50 μM) skuteczniej obniżała żywotność komórek M-Sr. Różnica ta była szczególnie widoczna w przypadku kombinacji GEM+**APL2** (50 μM) ($p < 0,001$). Po 72 godz. inkubacji wyniki otrzymane dla kombinacji GEM i **APL2** (10 i 50 μM) były porównywalne z wynikami otrzymanymi dla GEM (Ryc.32.D).

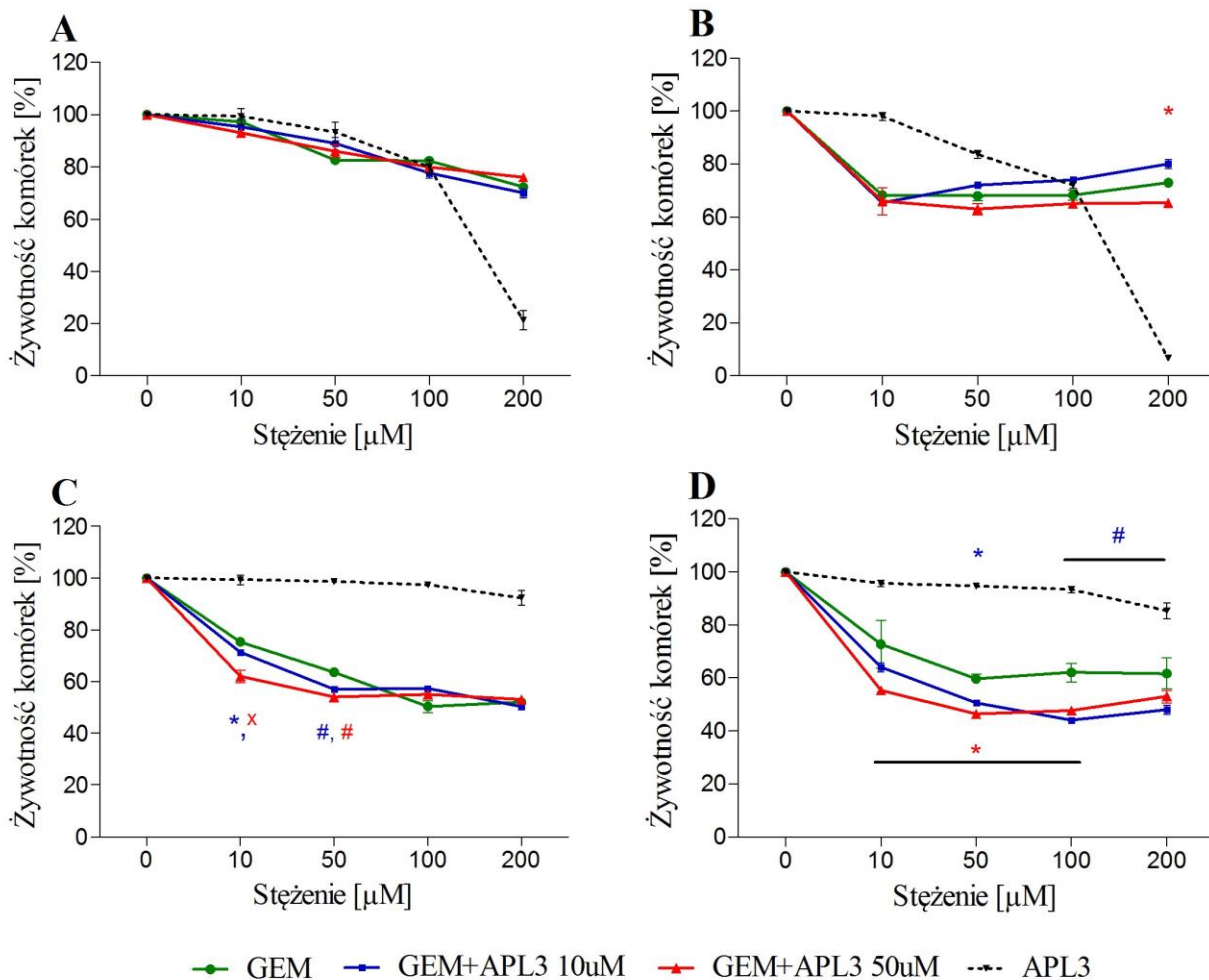


Ryc.32. Wpływ kombinacji związku **APL2** i GEM na żywotność komórek nowotworowych: M-DS po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji, M-Sr po 24 (C) i 72 godz. (D) inkubacji Przyjęte poziomy istotności: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

Zaobserwowano różnice w żywotności komórek poddanych jednoczesnemu działaniu GEM i związku **APL3**.

Po 24 godz. inkubacji żywotność fibroblastów BJ poddanych działaniu kombinacji GEM i **APL3** (10 i 50 μM) była porównywalna z żywotnością komórek traktowanych GEM. Zbliżone wyniki otrzymano dla inkubacji wydłużonej do 72 godz. Odnotowano słabsze działanie kombinacji GEM i **APL3** (10 μM) w stosunku do samej GEM. Różnica ta nie była jednak istotna statystycznie (Ryc.33.A,B).

Dla komórek PANC-1 zaobserwowano, że kombinacja GEM i **APL3** (10 i 50 μM) skuteczniej obniżała żywotność komórek po 24 godz. inkubacji, niż sama GEM. Różnica była szczególnie widoczna dla stężeń GEM 10-50 μM . Natomiast po 72 godz. inkubacji, największą różnicę w żywotności komórek obserwowano w stężeniach GEM 50-200 μM . Różnica pomiędzy wpływem kombinacji GEM+**APL3** (10 μM) a GEM+**APL3** (50 μM) była niewielka i nie osiągnęła istotności statystycznej (Ryc.33.C,D).

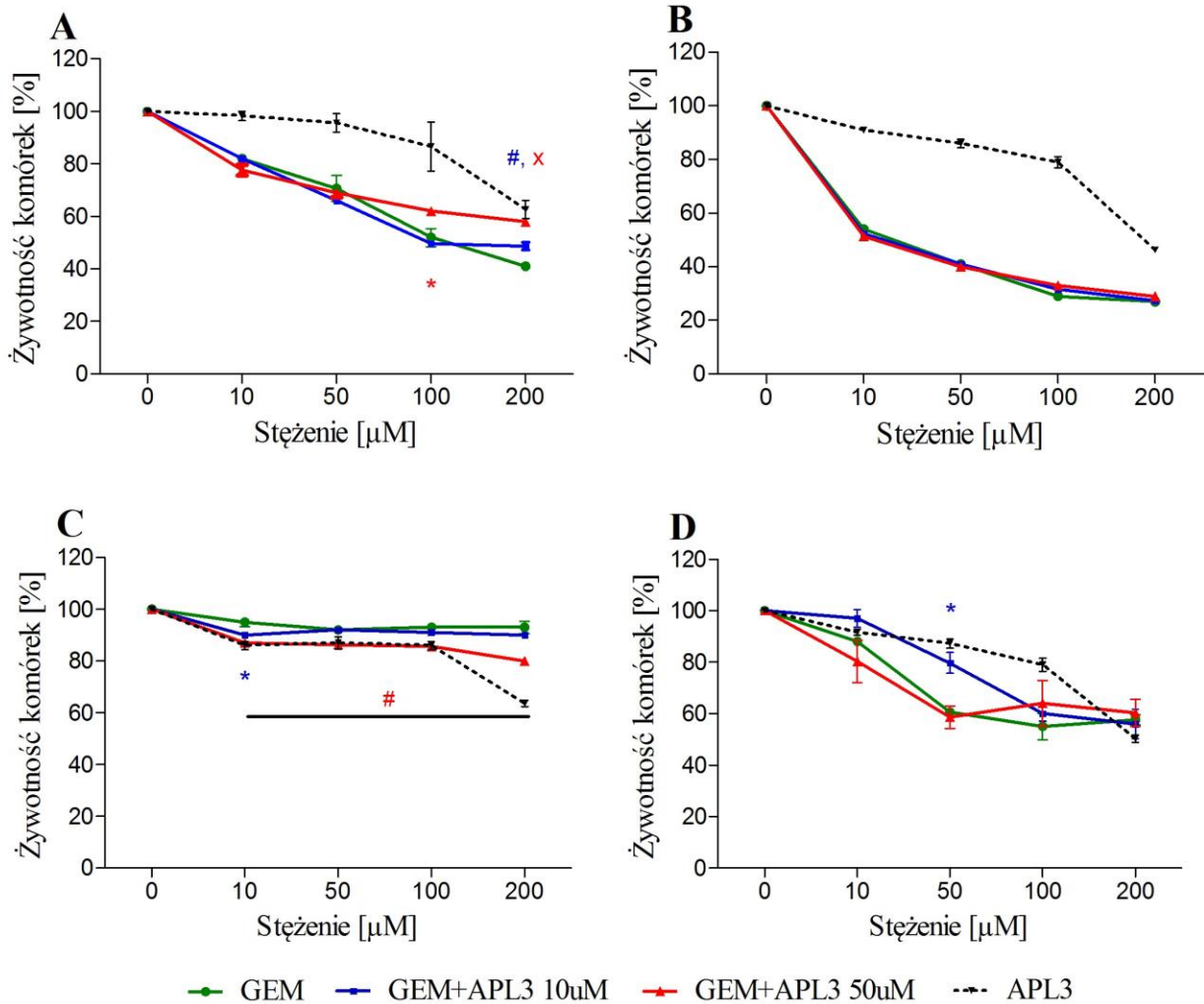


Ryc.33. Wpływ kombinacji związku **APL3** i GEM na żywotność komórek: fibroblastów BJ po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji, komórek nowotworowych PANC-1 po 24 (C) i 72 godz. (D) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- p<0,05; #- p<0,01; x- p<0,001. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

Zaobserwowano, że po 24 godz. inkubacji GEM+**APL3** (10 μM) oraz GEM wpływają na żywotność komórek M-DS w porównywalnym stopniu. Natomiast, w stężeniach >50 μM, GEM+**APL3** (50 μM) oddziaływała słabiej na żywotność komórek niż sama GEM oraz kombinacja GEM i **APL3** (10 μM) (Ryc.34).

Natomiast w przypadku komórek M-Sr zaobserwowano, że po 24 godz. inkubacji kombinacja GEM+**APL3** (50 μM) skuteczniej obniżała żywotność komórek niż GEM (p<0,01). Dla GEM+**APL3** (10 μM) otrzymano wyniki porównywalne z samą GEM.

Natomiast po 72 godz. inkubacji, GEM+APL3 (10 μ M) oddziaływały słabiej na komórki niż GEM. Różnica ta nie była jednak istotna statystycznie. Dla GEM+APL3 (50 μ M) otrzymano wyniki porównywalne z GEM (Ryc.33).

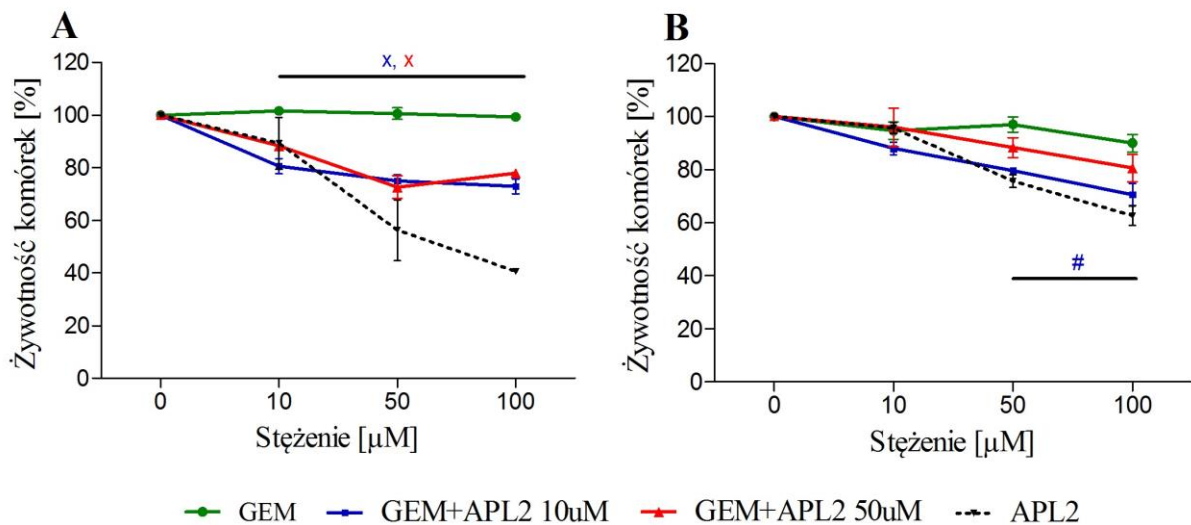


Ryc.34. Wpływ kombinacji związku **APL3** i GEM na żywotność komórek nowotworowych: M-DS po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji, M-Sr po 24 (C) i 72 godz. (D) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: *- $p < 0,05$; #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

4.7.2. Wpływ wzajemnego oddziaływania związków w modelu trójwymiarowym

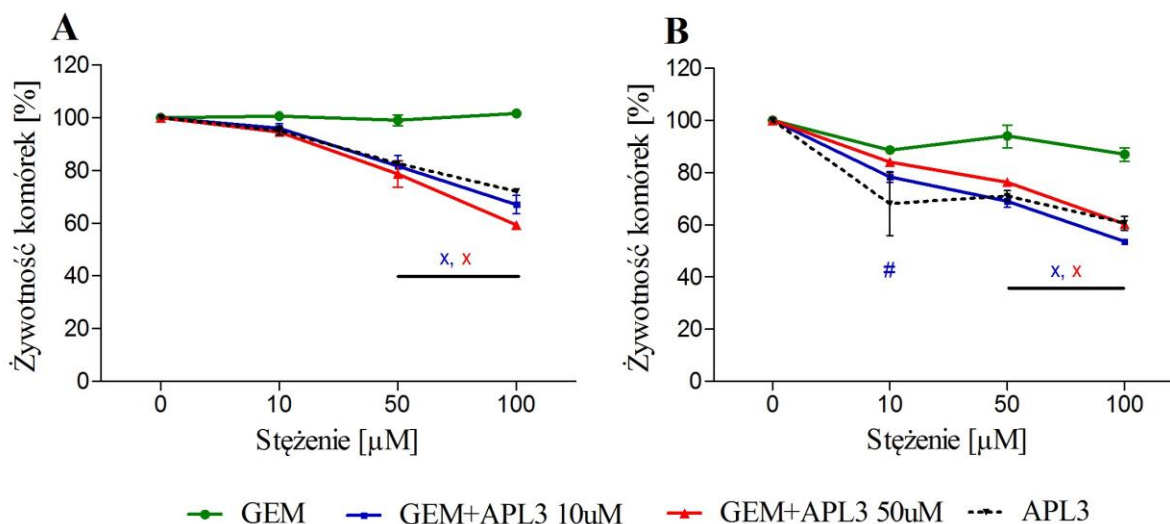
Przeprowadzone badania wykazały, że jednoczesne zastosowanie GEM ze związkiem **APL2** lub **APL3** istotnie wpływa na żywotność komórek nowotworowych M-DS w porównaniu do samej GEM. Uzyskane wyniki w porównaniu do GEM przedstawiono na rycinie 35.

Zastosowanie kombinacji GEM+**APL2** powodowało istotne obniżenie żywotności komórek M-DS w porównaniu do samej GEM ($p < 0,001$) po 24 godz. inkubacji. Natomiast po 72 godz. ekspozycji, różnica w żywotności komórek była obserwowana dla GEM w stężeniach $> 50 \mu\text{M}$. Badanie nie wykazało istotniejszej różnicy w efekcie pomiędzy dodatkiem 10 a $50 \mu\text{M}$ **APL2** po 24 godz. inkubacji. Po 72 godz. większy spadek żywotności obserwowano dla kombinacji GEM+**APL2** w stężeniu $10 \mu\text{M}$. Obecność GEM w hodowli powodowała częściowy spadek aktywności związku **APL2** zastosowanego w stężeniu $50 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$).



Ryc.35. Wpływ kombinacji związku **APL2** i GEM na żywotność sferoidów M-DS po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych

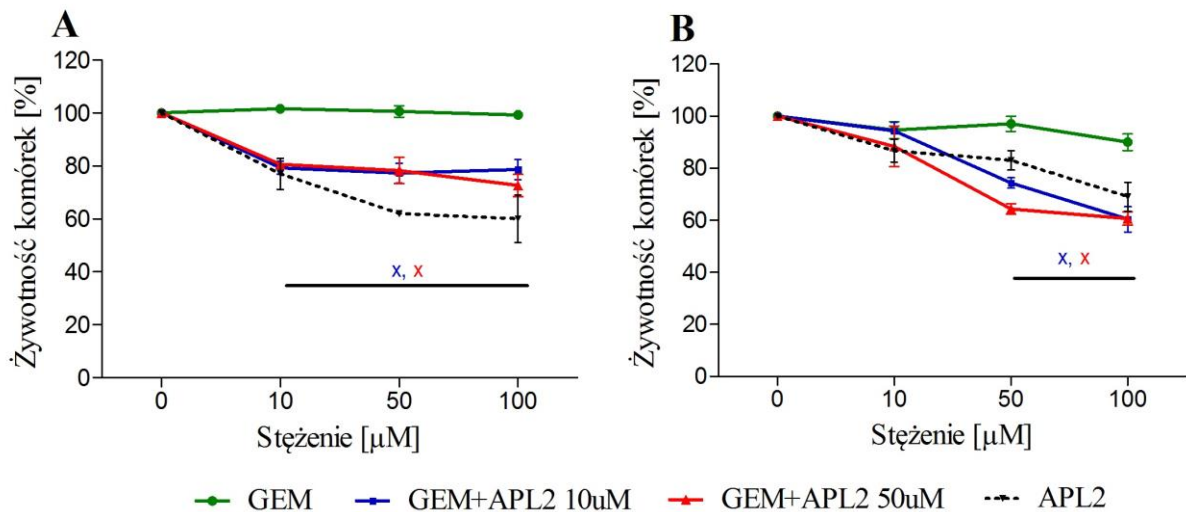
Zastosowanie kombinacji GEM i **APL3**, zarówno po 24 jak i 72 godz. inkubacji, istotnie obniżało żywotność komórek w porównaniu do samej GEM. Różnica ta była szczególnie widoczna przy stężeniach GEM powyżej stężenia 50 μM ($p < 0.001$). Badanie nie wykazało istotnej różnicy w obserwowanym efekcie pomiędzy dodatkiem 10 a 50 μM **APL3** w przypadku 24 godz. ekspozycji. Natomiast przy 72 godz. inkubacji, dodatek 10 μM powodował większy spadek żywotności niż dodatek 50 μM **APL3**. Obecność GEM w hodowli nie wpływała na aktywność **APL3**.



Ryc.36. Wpływ kombinacji związku **APL3** i GEM na żywotność sferoidów M-DS po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

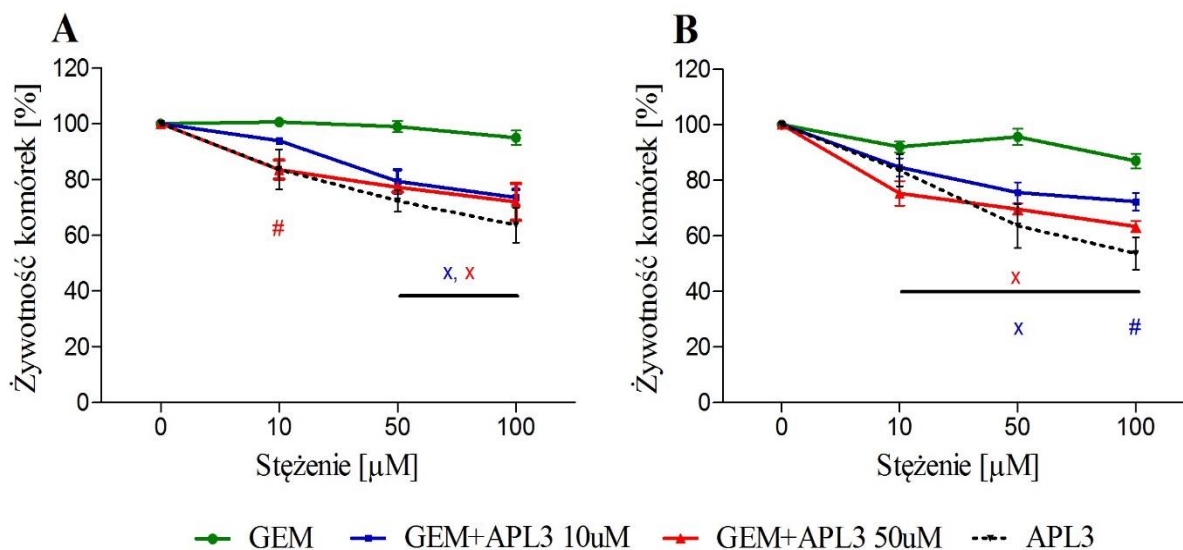
Badania wykazały, że jednocześnie zastosowanie GEM ze związkiem **APL2** lub **APL3** istotnie wpływa na zmianę żywotności komórek nowotworowych M-Sr w porównaniu do samej GEM. Uzyskane wyniki w porównaniu do GEM przedstawiono na rycinach 37 i 38.

Zastosowanie kombinacji GEM+**APL2** powodowało istotne obniżenie żywotności komórek M-Sr w porównaniu do samej GEM ($p < 0,001$) zarówno po 24, jak i 72 godz. inkubacji. Badanie nie wykazało istotnej różnicy pomiędzy dodatkiem 10 a 50 μM stężenia **APL2** przy 24 godz. inkubacji. Po 72 godz. większy spadek żywotności obserwowano dla kombinacji GEM+**APL2** (50 μM). Obecność GEM w hodowli powodowała częściowy spadek aktywności **APL2** w stężeniu 50 μM ($p < 0,05$).



Ryc.37. Wpływ kombinacji związku **APL2** i GEM na żywotność sferoidów M-Sr po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

Kombinacja GEM+**APL3**, zarówno po 24 jak i 72 godz. inkubacji, istotnie obniżała żywotność komórek w porównaniu do samej GEM. Różnica ta była szczególnie widoczna przy stężeniach GEM powyżej 50 μM ($p < 0,001$). Nie obserwowano istotnej różnicy pomiędzy dodatkiem 10 a 50 μM **APL3** przy 24 godz. Po 72 godz. inkubacji dodatek 50 μM związku **APL3** powodował większy spadek żywotności niż dodatek 10 μM . Obecność GEM w hodowli nie wpływała na aktywność związku **APL3**.



Ryc.38. Wpływ kombinacji związku **APL3** i GEM na żywotność sferoidów M-Sr po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: #- $p < 0,01$; x- $p < 0,001$. Kolory oznaczeń statystycznych odpowiadają kolorom poszczególnych linii komórkowych.

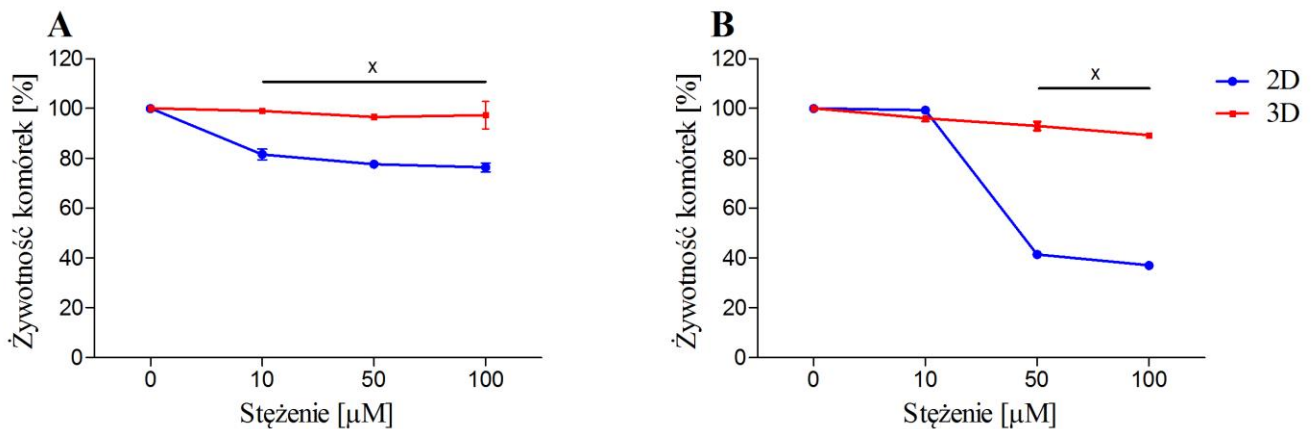
4.8. Porównanie wyników uzyskanych w modelach dwu- i trójwymiarowym

Porównano wyniki uzyskane w doświadczeniach prowadzonych w modelach 2D i 3D dla nowotworowych komórek M-DS i M-Sr. Zaobserwowano różnice w żywotności komórek, hodowanych w modelach 2D i 3D, poddanych działaniu peptydomimetyków i gemcytabiny. W modelu 3D związki **APL1-4** obniżały żywotność komórek skuteczniej niż GEM. W modelu 2D i 3D wrażliwość komórek M-DS i M-Sr na działanie związków była zależna od czasu inkubacji. Różnica w spadku żywotności komórek po 72 godz. inkubacji w modelu 2D w porównaniu do 3D była istotna statystycznie ($p < 0,01$).

4.8.1. Wpływ związków na komórki nowotworowe M-DS w modelu dwu- i trójwymiarowym

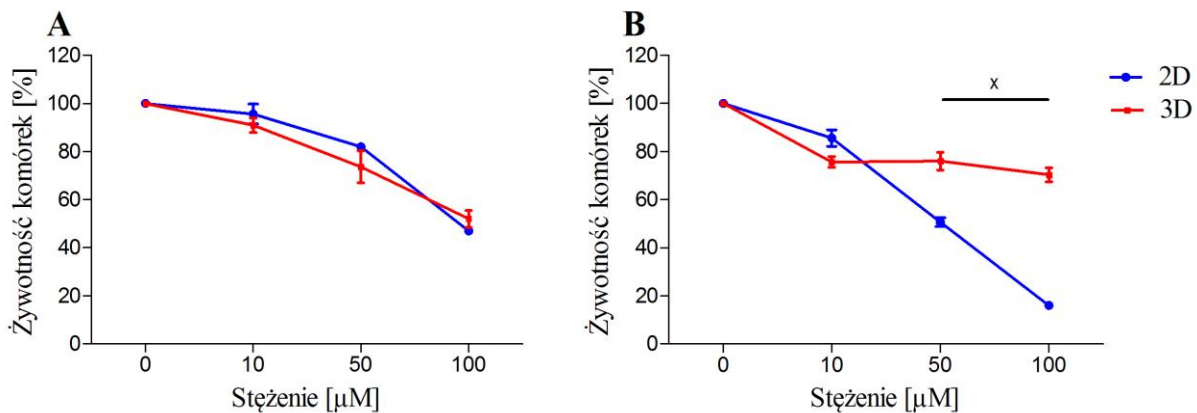
Porównano wyniki uzyskane dla komórek M-DS w modelach 2D i 3D. Badania wykazały, istotne różnice w żywotności komórek M-DS poddanych działaniu związków i GEM w modelu 2D i 3D.

Niezależnie od czasu inkubacji sfery poddane działaniu GEM były bardziej odporne niż komórki rosnące w monowarstwie. Po 24 godz. inkubacji komórki w modelu 2D były średnio o 15% bardziej wrażliwe niż sferoidy. Różnica ta była większa po 72 godz. inkubacji i wynosiła średnio 45%. Różnice w żywotności komórek po 24 i 72 godz. inkubacji były istotne statystycznie (Ryc.39).



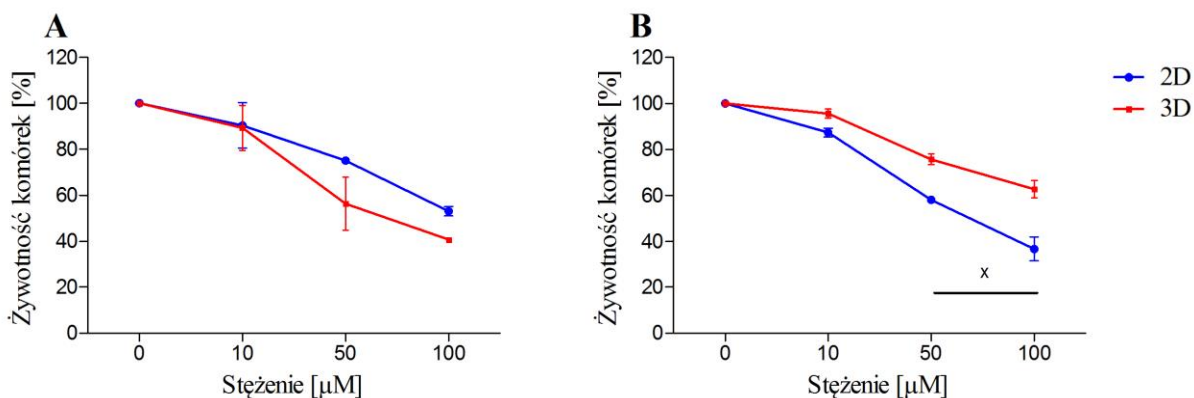
Ryc.39. Wpływ GEM na żywotność komórek M-DS w modelach 2D i 3D po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: x - $p < 0,001$.

Podczas krótkotrwałej (24 godz.) inkubacji ze związkiem **APL1** nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic w żywotności komórek w badanych modelach. Przy inkubacji wydłużonej do 72 godz., komórki rosnące w hodowli 2D były istotnie bardziej wrażliwe niż sferoidy (Ryc.40).



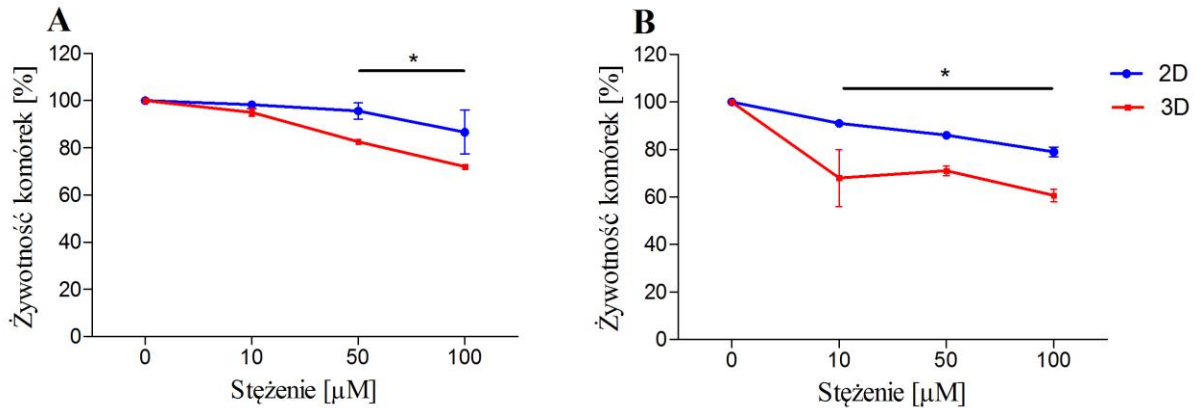
Ryc.40. Wpływ związku **APL1** na żywotność komórek M-DS w modelach 2D i 3D po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: x - $p < 0,001$.

Po 24 godz. inkubacji komórki rosnące jako monowarstwa były mniej wrażliwe na działanie związku APL2 niż sferoidy. Różnica ta nie była istotna statystycznie. Po 72 godz. inkubacji, sferoidy charakteryzowały się większą opornością na działanie związku. Różnica była istotna statystycznie dla stężeń $> 50 \mu\text{M}$ (Ryc.41).



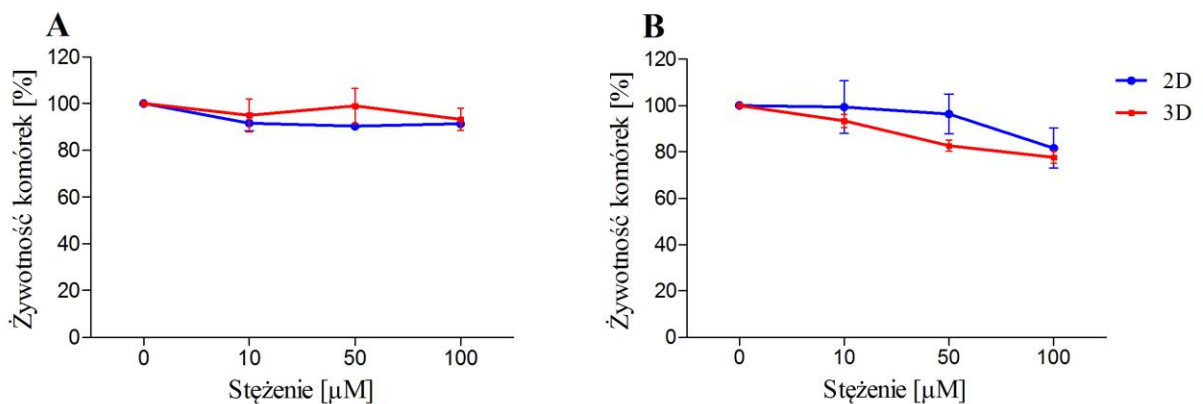
Ryc.41. Wpływ związku **APL2** na żywotność komórek M-DS w modelach 2D i 3D po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: x - $p < 0,001$.

Zaobserwowano, że po 24 i 72 godz. inkubacji sferoidy były bardziej wrażliwe na działanie związku **APL3** niż komórki w hodowli 2D. Różnica we wrażliwości komórek hodowanych w modelu 2D w porównaniu do 3D była istotna statystycznie (Ryc.42).



Ryc.42. Wpływ związku **APL3** na żywotność komórek M-DS hodowanych w modelach 2D i 3D, po 24 i 72 godz. inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: * - $p < 0,05$.

Sferoidy poddane 24 godz. inkubacji ze związkiem **APL4** były mniej wrażliwe niż komórki w modelu 2D. Natomiast po 72 godz. inkubacji obserwowano sytuację odwrotną, jednak różnice w żywotności komórek nie osiągnęły istotności statystycznej (Ryc.43).

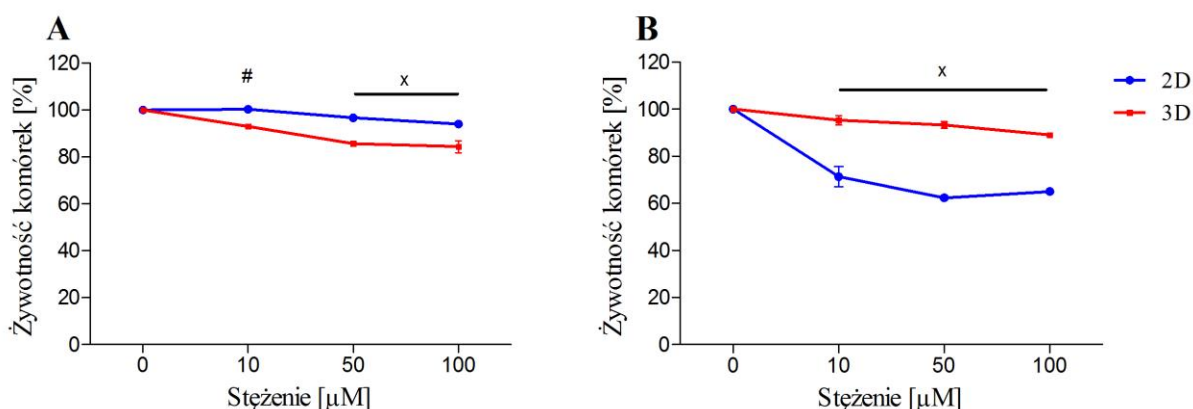


Ryc.43. Wpływ związku **APL4** na żywotność komórek M-DS w modelach 2D i 3D po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji.

4.8.2. Wpływ związków na komórki nowotworowe M-Sr w modelu dwu- i trójwymiarowym

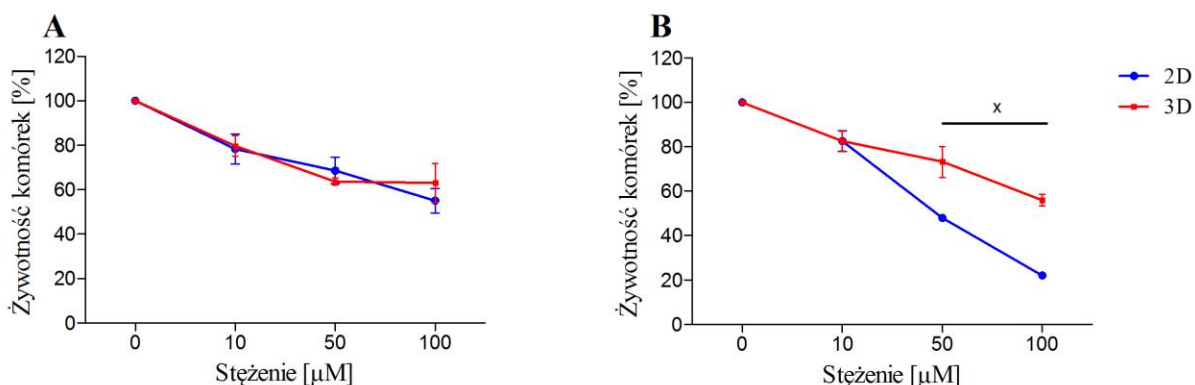
Porównano wyniki uzyskane dla komórek M-Sr w modelach 2D i 3D. Badania wykazały, istotne różnice w żywotności komórek M-Sr poddanych działaniu związków i GEM w modelu 2D i 3D.

Zarówno po 24 jak i 72 godz. inkubacji, sferoidy były bardziej odporne na działanie GEM niż komórki w hodowli 2D. Po 24 godz. inkubacji komórki w modelu 2D były średnio o 10% bardziej wrażliwe niż sferoidy. Różnice w żywotności komórek po 24 i 72 godz. inkubacji były istotne statystycznie (Ryc.44).



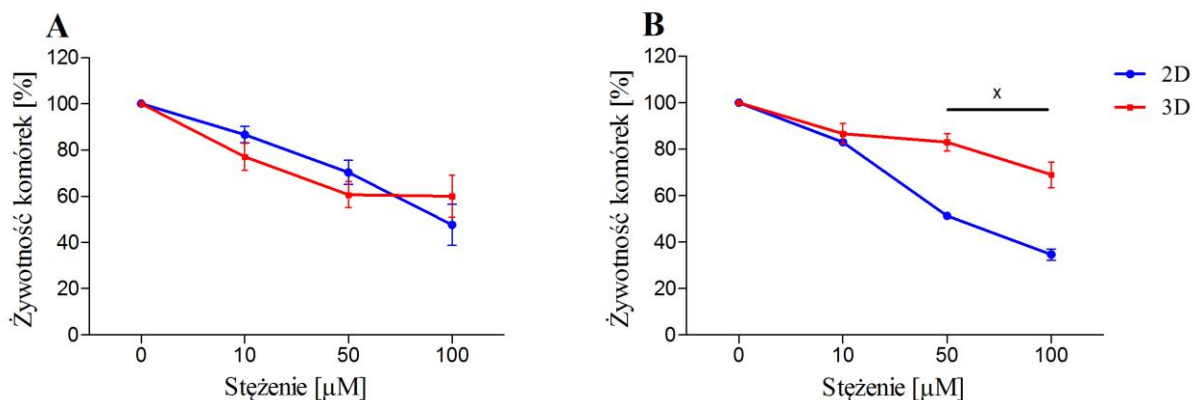
Ryc.44. Wpływ GEM na żywotność komórek M-Sr w modelach 2D i 3D po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: # - $p < 0,01$; x - $p < 0,001$.

Po 24 godz. inkubacji komórki hodowane w modelu 2D i 3D wykazywały porównywalną wrażliwość na działanie związku **APL1**. Przy wydłużonej inkubacji (72 godz.) sferoidy były bardziej odporne niż komórki w hodowli 2D. Różnica ta była widoczna dla stężeń powyżej 50 μM i była istotna statystycznie (Ryc.45).



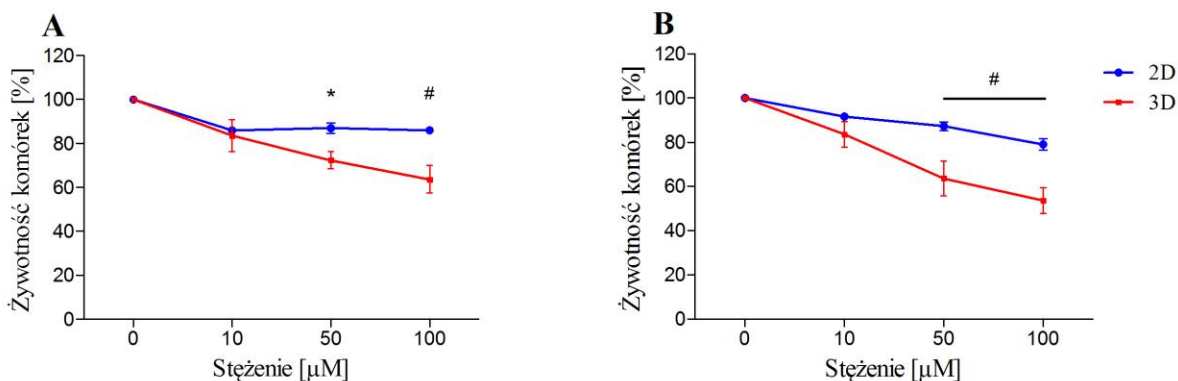
Ryc.45. Wpływ związku **APL1** na żywotność komórek M-Sr w modelach 2D i 3D po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: x - $p < 0,001$.

W przypadku 24 godz. inkubacji, komórki w hodowli 2D były mniej wrażliwe na działanie związku **APL2** niż sferoidy, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. Po 72 godz. inkubacji sfery wykazywały większą oporność, szczególnie przy zastosowaniu wyższych stężeń związku **APL2** ($>50 \mu\text{M}$) (Ryc.46).



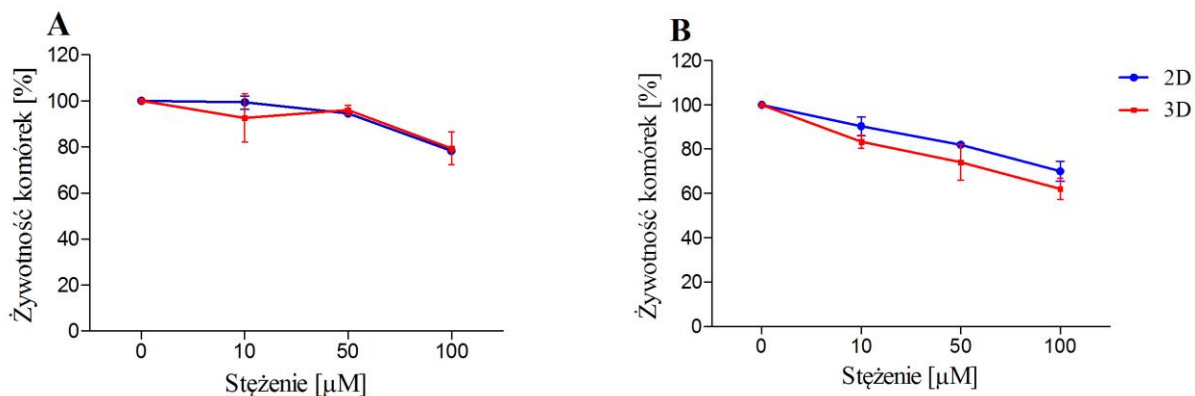
Ryc.46. Wpływ **APL2** na żywotność komórek M-Sr w modelach 2D i 3D po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: x - $p < 0,001$.

Odnotowano, że komórki rosnące w postaci monowarstwy wykazują istotnie większą oporność na działanie związku **APL3** niż sferoidy. Różnice te były obserwowane po 24 i 72 godz. inkubacji (Ryc.47).



Ryc.47. Wpływ związku **APL3** na żywotność komórek M-Sr w modelach 2D i 3D po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji. Przyjęte poziomy istotności: * - $p < 0,05$; # - $p < 0,01$.

Po 24 godz. inkubacji nie obserwowano różnic w żywotności komórek hodowanych w modelach 2D i 3D poddanych działaniu **APL4**. Po 72 godz. ekspozycji sferoidy były bardziej wrażliwe na działanie związku **APL4** niż komórki w hodowli 2D. Różnica ta nie była istotna statystycznie (Ryc.48).



Ryc.48. Wpływ związku **APL4** na żywotność komórek M-Sr w modelach 2D i 3D po 24 (A) i 72 godz. (B) inkubacji.

4.9. Podsumowanie otrzymanych wyników

Badania przeprowadzone w modelu 2D wykazały zróżnicowany wpływ związków na komórki nowotworowe i fibroblasty BJ. Aktywność związków różniła się pomiędzy badanymi liniami komórkowymi. Zaobserwowano, że po 72 godz. inkubacji aktywność GEM była wyższa niż po 24 godz. inkubacji. Aktywność związków **APL1** i **APL2** wobec komórek BJ i M-Sr wzrastała wraz z czasem inkubacji. Natomiast dla komórek PANC-1 i M-DS obserwowano spadek ich aktywności wraz z wydłużeniem inkubacji. Dla wszystkich badanych komórek zaobserwowano wzrost aktywności związku **APL3** wraz z czasem inkubacji. W przypadku związku **APL4**, zaobserwowano wzrost aktywności związku po 72 godz. inkubacji wobec komórek BJ i M-DS. Dla komórek PANC-1 i M-Sr obserwowano spadek jego aktywności wraz z wydłużeniem inkubacji. Aktywność tripeptydów **TP1**, **TP2** oraz CYN wobec komórek BJ i PANC-1 wzrastała nieznacznie wraz z czasem inkubacji. W przypadku komórek M-DS i M-Sr odnotowano wzrost żywotności komórek poddanych działaniu tych tripeptydów **TP1** i **TP2**. Tripeptydy **TP3** i **TP4** powodowały wzrost żywotności wszystkich badanych komórek.

Tabela 4. Wpływ badanych związków na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych hodowanych w modelu dwuwymiarowym

	EC ₅₀ [μM]*							
	BJ		PANC-1		M-DS		M-Sr	
	24 godz.	72 godz.	24 godz.	72 godz.	24 godz.	72 godz.	24 godz.	72 godz.
GEM	>500	46,8 ± 5,8	>500	157,2 ± 9,7	>500	45,7 ± 6,8	>500	>500
APL1	81,7 ± 4,0	56,3 ± 2,1	91,8 ± 2,2	102,1 ± 5,6	77,8 ± 3,6	85,3 ± 2,7	154,7 ± 8,7	59,8 ± 3,7
APL2	135,6 ± 2,3	68,3 ± 2,3	175,4 ± 6,4	207,0 ± 3,1	106,8 ± 9,8	93,0 ± 6,9	83,9 ± 4,0	62,5 ± 6,8
APL3	130,2 ± 2,9	121,2 ± 4,0	312,7 ± 9,3	270,3 ± 8,1	241,6 ± 4,1	150,4 ± 4,2	230,6 ± 5,3	177,1 ± 5,5
APL4	221,4 ± 7,5	205,80 ± 4,0	243,4 ± 2,7	320,7 ± 5,3	252,9 ± 4,3	158,0 ± 7,8	188,1 ± 7,8	201,0 ± 7,1
TP1	>500	>500	321,1 ± 9,9	301,6 ± 8,8	>500	>500	>500	>500
TP2	>500	>500	311,8 ± 9,3	298,1 ± 4,9	>500	>500	>500	>500
TP3	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TP4	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CYN	>500	279,9 ± 3,2	>500	265,2 ± 2,7	>500	>500	>500	>500

*Stężenia związków powodujące spadek żywotności komórek o 50% w porównaniu do kontroli. Wartości przedstawiają średnią + SEM

Badania przeprowadzone w modelu trójwymiarowym *in vitro* wykazały zróżnicowany wpływ peptydomimetyków **APL1-4** oraz GEM na żywotność sferoidów. Aktywność GEM wobec sferoidów M-DS i M-Sr była niezależna od stężenia i czasu inkubacji. Zaobserwowano spadek aktywności peptydomimetyków **APL1** i **APL2** wobec sferoidów obu linii komórkowych wraz z wydłużeniem czasu inkubacji. Dla związku **APL3** odnotowano wzrost aktywności po 72 godz. inkubacji w porównaniu do 24 godz. ekspozycji. Aktywność związku **APL4** wobec sferoidów M-DS była niezależna od czasu inkubacji. W przypadku sferoidów M-Sr, aktywność związku **APL4** wzrastała wraz z czasem inkubacji. Podsumowanie uzyskanych wyników przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Wpływ badanych związków na żywotność fibroblastów i komórek nowotworowych hodowanych w modelu trójwymiarowym

	EC₅₀ [μM]			
	M-DS		M-Sr	
	24 godz.	72 godz.	24 godz.	72 godz.
GEM	>500	>500	>500	>500
APL1	109,3 ± 8,9	175,4 ± 16,7	192,1 ± 10,2	205,5 ± 6,5
APL2	84,9 ± 3,2	210,3 ± 17,1	162,7 ± 10,6	189,3 ± 18,1
APL3	163,2 ± 4,5	141,0 ± 9,6	181,1 ± 14,2	174,2 ± 4,0
APL4	>500	>500	>500	245,8 ± 16,2

Stężenia związków powodujące spadek żywotności komórek o 50% w porównaniu do kontroli.

Wartości przedstawiają średnią + SEM

Zaobserwowano różnice w oddziaływaniu peptydomimetyków **APL1-4** na żywotność komórek hodowanych w modelach 2D i 3D. Sferoidy poddane działaniu GEM, niezależnie od stężenia i czasu inkubacji, były bardziej odporne na jej działanie niż komórki hodowane w postaci monowarstwy. Sferoidy M-DS i M-Sr były mniej wrażliwe na działanie związku **APL1** niż komórki w modelu 2D. W przypadku związku **APL2** zaobserwowano, że w porównaniu do hodowli 2D, sferoidy M-DS były bardziej odporne na jego działanie po 72 godz. inkubacji. Natomiast, po 24 godz. inkubacji sferoidy były bardziej wrażliwe niż komórki rosnące w monowarstwie. Sferoidy M-Sr charakteryzowały się większą opornością na działanie związku **APL2** niż komórki w hodowli 2D. Zaobserwowano, że sferoidy M-DS i M-Sr były bardziej wrażliwe na działania związku **APL3** niż komórki rosnące w modelu 2D. Podobnie jak w przypadku związku **APL1**, sferoidy były bardziej odporne na działanie związku **APL4**. Podsumowanie wyników otrzymanych dla modeli 2D i 3D przedstawiono w tabeli

6.

Tabela 6. Wpływ badanych związków na żywotność komórek nowotworowych hodowanych w modelu dwuwymiarowym i trójwymiarowym.

	EC ₅₀ [μM]*							
	M-DS				M-Sr			
	2D		3D		2D		3D	
	24 godz.	72 godz.	24 godz.	72 godz.	24 godz.	72 godz.	24 godz.	72 godz.
GEM	>500	45,7 ± 6,8	>500	>500	>500	>500	>500	>500
APL1	77,8 ± 3,6	85,3 ± 2,7	109,3 ± 8,9	175,4 ± 16,7	154,7 ± 8,7	59,8 ± 3,7	192,1 ± 10,2	205,5 ± 6,5
APL2	106,8 ± 9,8	93,0 ± 6,9	84,9 ± 3,2	210,3 ± 17,1	83,9 ± 4,0	62,5 ± 6,8	162,7 ± 10,6	189,3 ± 18,1
APL3	241,6 ± 4,1	150,4 ± 4,1	163,2 ± 4,5	141,0 ± 9,6	230,6 ± 5,3	177,1 ± 5,5	181,1 ± 14,2	174,2 ± 4,0
APL4	252,9 ± 4,3	158,0 ± 7,8	>500	>500	188,1 ± 7,8	201,0 ± 7,1	>500	245,8 ± 16,2

*Stężenia związków powodujące spadek żywotności komórek o 50% w porównaniu do kontroli. Wartości przedstawiają średnią + SEM

5. DYSKUSJA

5.1. Właściwości otrzymanych związków

Otrzymane peptydomimetyki **APL1-4** są analogami związków zaprojektowanych i opisanych przez prof. Andrzeja W. Lipkowskiego [142], charakteryzującymi się wysokim powinowactwem do receptorów opioidowych MOR. Peptydowa sekwencja tych związków została zaprojektowana w oparciu o strukturę opioidów endogennych (np. dermorfin). Peptydomimetyki **APL1-4** otrzymano w wyniku hybrydyzacji fragmentów peptydowych (N-koniec) z *trans*-cynamoilopiperazyną (CYN) (C-koniec), będącą pochodną kwasu cynamonowego. CYN jest cząsteczką lipofilową, dzięki czemu związek może łatwo przenikać przez błony komórkowe na zasadzie dyfuzji [143,144]. Lipofilowość związku odgrywa ważną rolę w jego zdolności do przenikania przez błony komórkowe oraz oddziaływaniu z receptorami [145]. Wykazano, że aktywność biologiczna wielu substancji koreluje z ich lipofilowością, dlatego też właściwość ta jest wykorzystywana w projektowaniu bioaktywnych związków [146].

Jak już wspomniano, sekwencja peptydowa badanych związków powstała w oparciu o sekwencję opioidów endogennych. N-końcowy fragment opioidów endogennych zawiera aminokwasy aromatyczne: tyrozynę (Tyr) i fenyloalaninę (Phe) lub tryptofan (Trp). Te aminokwasy biorą udział w wiązaniu się peptydu z receptorem opioidowym. Badania wykazały, że modyfikacje struktury tych peptydów wpływają na ich aktywność biologiczną [147]. W przypadku badanych peptydomimetyków zaobserwowano, że zmiana Phe w pozycji 3 na równie hydrofobowy tryptofan (Trp) w strukturze związków **APL2** i **APL4** tylko w nieznacznym stopniu obniżała powinowactwo związków do MOR. Powinowactwo peptydomimetyków **APL1**, **APL3** i **APL4** do MOR było wyższe niż powinowactwo Met-enkefalin (IC₅₀ = 25,2 nM) [148,149]. Wyjątek stanowił związek **APL2**, który wykazywał nieco niższe powinowactwo do MOR (77,6 ± 2,8). Interesujące jest to, że wchodzące w skład peptydomimetyków tripeptydy nie wykazywały powinowactwa do MOR (IC₅₀ >616 nM). Brak powinowactwa tripeptydów względem MOR może być powodowany obecnością grupy karboksylowej na ich C-końcu, a nie grupy amidowej, która warunkuje lepsze powinowactwo do receptora opioidowego.

Ważną zaletą badanych peptydomimetyków jest ich odporność na działanie proteaz, co doskonale zostało zademonstrowane w przypadku związków APL3 i APL4; po 96 godz. inkubacji w ludzkim osoczu nie ulegały one degradacji. W przypadku związków **APL1** i **APL2**, w nieznacznym stopniu obserwowano hydrolizę enzymatyczną wiązania aminowego Tyr-*D*-Ala. Zastosowanie HPLC-ESI-Q-MS pozwoliło zidentyfikować fragment *D*-Ala-Phe/Trp-Cyn, natomiast nie zaobserwowano sygnału pochodzącego od tyrozyny. Otrzymane wyniki sugerują, że wiązanie pomiędzy Tyr a *D*-Ala może być bardziej podatne na proteolizę w porównaniu do wiązania pomiędzy Tyr a *D*-Thr. Zazwyczaj peptydy mają krótki czas półtrwania i są szybko degradowane przez enzymy proteolityczne. Ochronę przed działaniem proteaz można osiągnąć poprzez modyfikacje struktury peptydu, spośród których wymienić można: zamianę aminokwasów naturalnych na nienaturalne, skrócenie sekwencji lub ich cyklizację; to jednak wiąże się również zasadniczo z wpływem na aktywność biologiczną cechującą daną cząsteczkę [150-152]. Na podstawie powyższych doniesień można wnioskować, że wysoka stabilność badanych peptydomimetyków wynika zarówno z obecności aminokwasów aromatycznych w ich strukturze, jak i zastosowania nienaturalnych enancjomerów *D* w przypadku Ala lub Thr.

Istotną cechą substancji leczniczych jest ich niska aktywność hemolityczna. Peptydy przeciwnowotworowe pochodzenia naturalnego mogą posiadać właściwości hemolityczne (np. mellityna) [154]. Modyfikacja ich struktury pozwala na zniesienie hemotoksyczności z jednoczesnym zachowaniem właściwości przeciwnowotworowych. Przykładem takiego peptydu jest peptyd CA(1-8)MA(1-12) zbudowany z fragmentów cekropiny A i magaininy 2. Peptyd ten posiada wysoką aktywność przeciwnowotworową przy jednoczesnym braku właściwości hemolitycznych [154]. Podobne właściwości wykazuje peptyd D-K₄R₂L₉, zbudowany z 3 rodzajów aminokwasów: Leu, Lys i Arg. Niszczy on komórki czerniaka nie uszkadzając prawidłowych fibroblastów, a także nie posiada właściwości hemolitycznych [155]. Według wytycznych *Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles*, związek nie powoduje uszkodzenia czerwonych krwinek jeżeli jego aktywność hemolityczna nie przekracza 5% [153]. Hemoliza indukowana przez peptydomimetyki **APL1-4** nie przekracza 3% nawet w wysokim stężeniu (250 µM). Otrzymane wyniki nie dają jednak informacji o aktywności hematotoksycznej związków

APL1-4, czyli ich oddziaływania na narządy krwiotwórcze. W celu zbadania hematotoksyczności peptydomimetyków konieczne są dalsze badania w modelu *in vivo*.

Peptydy przeciwnowotworowe pochodzenia naturalnego często posiadają właściwości przeciwbakteryjne. Przykładami takich peptydów są cekropina A i B, magainina 2, tachyplesyna czy defensyna (HNP-2) [156]. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że peptydomimetyki **APL1-4** nie posiadają właściwości przeciwbakteryjnych. Brak aktywności obserwowano zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*), jak i Gram-ujemnych (*E. coli*).

W aspekcie właściwości przeciwnowotworowych, peptydomimetyki często projektowane są w taki sposób, aby oddziaływały na specyficzne receptory obecne na powierzchni komórek nowotworowych. Powierzchnia komórek bakteryjnych nie posiada tych receptorów, uniemożliwiając tym samym działanie peptydu. Dodatkowo komórka bakteryjna posiada ścianę komórkową, stanowiącą dodatkową barierę [157].

5.2. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność komórek w modelu dwuwymiarowym

5.2.1. Wpływ peptydomimetyków na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych

Badania z wykorzystaniem dwuwymiarowej hodowli komórek pozwalają na wstępną ocenę aktywności biologicznej nowych związków. Przeprowadzone badania wykazały, że związki **APL1-4** w zróżnicowany sposób wpływają na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych. Zaobserwowano, że wyizolowane komórki nowotworowe M-DS i M-Sr charakteryzowały się większą wrażliwością na działanie związków **APL1-4** niż komercyjnie dostępne komórki nowotworowe PANC-1 i prawidłowe fibroblasty BJ. Najbardziej obiecujące rezultaty otrzymano dla związku **APL2**. Charakteryzował się on dobrą aktywnością biologiczną oraz istotnie mniejszą toksycznością względem fibroblastów w porównaniu do komórek nowotworowych. Peptydomimetyk **APL3** znacząco obniżał żywotność komórek, ale wykazywał większą toksyczność w stosunku do fibroblastów niż w

stosunku do komórek nowotworowych. Oddziaływanie związków **APL1** i **APL4** na komórki prawidłowe i nowotworowe było podobne. Komórki M-DS były mniej wrażliwe na działanie związku **APL1**, natomiast komórki M-Sr cechowała większa oporność na działanie związku **APL4**. Związki **APL1–4**, podobnie jak wcześniej wspomniane peptydy CA(1-8)MA(1-12) oraz D-K4R2L9, posiadają dobre właściwości przeciwnowotworowe oraz nie powodują hemolizy [154,155]. Należy jednak zauważyć, że peptydy CA(1-8)MA(1-12) lub D-K4R2L9 nie wykazują toksyczności względem prawidłowych komórek, natomiast peptydomimetyki **APL1–3** negatywnie oddziałują na fibroblasty. Należy zatem przypuszczać, że badane związki są nieselektywne względem komórek nowotworowych.

Uzyskane wyniki sugerują, że selektywność związków jest niezależna od gęstości MOR na powierzchni komórek. Zaobserwowano, że fibroblasty charakteryzowały się najmniejszą gęstością MOR, a mimo to związek **APL3** wykazywał silniejsze działanie względem fibroblastów niż komórek nowotworowych PANC-1. Dodatkowo nie odnotowano różnic w żywotności fibroblastów i komórek rakowych M-DS i M-Sr poddanych działaniu związku **APL3**, pomimo, że komórki M-DS i M-Sr cechowały się wysoką gęstością MOR na powierzchni. Jedynie w przypadku peptydomimetyku **APL2** widoczna była zależność pomiędzy gęstością MOR a negatywnym oddziaływaniem związku na żywotność komórek. Fibroblasty BJ i komórki PANC-1 były mniej wrażliwe na działanie związku **APL2** niż na komórki M-DS i M-Sr. Należy jednak podkreślić, że wrażliwość komórek BJ i PANC-1 zmieniała się wraz ze wzrostem stężenia i czasem ekspozycji na związek **APL2**. Otrzymane wyniki sugerują, że zahamowanie wzrostu komórek mogło bezpośrednio wynikać z działania *trans*-cynamoilopiperazyny. Brak jednoznacznej relacji pomiędzy gęstością MOR na powierzchni komórki a aktywnością związków **APL1-4**, może sugerować dwojaki mechanizm wnikania peptydomimetyków do komórki.

Istotnie, jednym z możliwych, postulowanych mechanizmów jest wnikanie związku do wnętrza komórki poprzez wiązanie związku z receptorem MOR i internalizacja całego kompleksu. Drugi mechanizm może opierać się na właściwościach lipofilnych CYN, dzięki którym peptydomimetyki mogą wnikać do komórki na drodze dyfuzji, co może dodatkowo zwiększać aktywność związku. Należy jednak rozważyć również inne możliwości. Badania sugerują, że niektóre pochodne kwasu cyjankowego (np. kwas kawowy) mogą oddziaływać na aktywność metaloproteinazy oraz szlaki sygnałowe takie jak: MAPK lub

JAK/STST, odpowiedzialne ze regulację proliferacji, apoptozę, różnicowanie czy ekspresję genów [158,159]. W celu poznania dokładnego mechanizmu działania peptydomimetyków **APL1-4** konieczne są dalsze badania.

Zaobserwowano, że tripeptydy **TP1-4** istotnie obniżały żywotność prawidłowych fibroblastów przy jednoczesnym zwiększaniu żywotności komórek nowotworowych (PANC-1, M-DS, M-Sr). W przypadku CYN odnotowano silne, toksyczne działanie na prawidłowe fibroblasty. Uzyskane wyniki wykazały, że tylko peptydomimetyki **APL1-4**, czyli hybrydy tripeptydów i CYN, wykazują właściwości przeciwnowotworowe oraz wykazują powinowactwo do MOR. Mimo, iż uzyskane wyniki jasno sugerują o konieczności posiadania przez związek w swojej strukturze fragmentu CYN celem możliwości wiązania do receptorów MOR, to jednak oczywistym staje się przeprowadzenie badań skupiających się na określeniu zależności SAR (struktura-aktywność) w przypadku pojedynczych fragmentów opioidowych.

5.2.2. Wpływ gemcytabiny na żywotność komórek prawidłowych i nowotworowych

W badaniach, jako substancję referencyjną, zastosowano gemcytabinę w celu oznaczenia wrażliwości badanych komórek na komercyjnie dostępny chemioterapeutyk. Zaobserwowano, że po 24 godz. inkubacji badane peptydomimetyki charakteryzowały się wyższą aktywnością niż GEM. Słaba aktywność GEM po 24 godz. może wynikać z jej mechanizmu działania. Gemcytabina dostaje się do komórek poprzez ludzki równowagowy transporter nukleozydów APL1 [160,161]. Wewnątrz komórki GEM ulega trzykrotnej fosforylacji do trifosforanu gemcytabiny (dFdCTP). dFdCTP jest następnie wbudowywany do syntetyzowanej nici DNA zamiast deoksycytydyny, prowadząc do zahamowania elongacji nici DNA [61]. Faza cyklu komórkowego, w której znajdują się komórki w chwili podania GEM, wpływa na jej efektywność. GEM oddziałuje wyłącznie na komórki w fazie S cyklu komórkowego. Biorąc pod uwagę czas podwojenia populacji komórek PANC-1, który wynosi 52 godz. [162], istotne zahamowanie proliferacji może być obserwowane nawet po 72 godz. ekspozycji na GEM. Dodatkowo na efektywność GEM może wpływać poziom ekspresji transporterów hENT1 obecnych na powierzchni komórek. Im mniejsza ekspresja

hENT1, tym mniej GEM dostaje się do wnętrza komórki. Badania wykazały, że komórki nowotworowe trzustki charakteryzują się mniejszą ekspresją hENT1 niż komórki prawidłowe [160,163]. Na podstawie tych informacji można przypuszczać, że komórki M-DS charakteryzują się wyższą ekspresją transporterów hENT1, niż pozostałe badane linie komórkowe (tj. BJ, M-Sr, PANC-1), co z kolei sprawia, że są one bardziej wrażliwe na działanie GEM.

5.3. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność komórek w modelu trójwymiarowym

Badania nad trójwymiarowymi hodowlami komórek *in vitro* zapoczątkował, w latach 70-tych ubiegłego wieku, Sutherland. Jego badania wykazały, że hodowle 3D pod wieloma względami przypominają strukturę guzów litych, stanowiąc tym samym adekwatny eksperymentalny model *in vitro* [164,166].

Jednymi z pierwszych i najprostszych hodowli 3D *in vitro* są sferoidy. Wielowarstwowość sferoidów sprawia, że poszczególne komórki tworzące sferę nie są w jednakowym stopniu narażone na działanie substancji bioaktywnej. Przekłada się to na uzyskiwanie bardziej wiarygodnych wyników aktywności biologicznej badanych związków niż w przypadku hodowli 2D [116].

W prowadzonych badaniach zastosowano trójwymiarowy model hodowli (sferoidy) komórek nowotworowych M-DS i M-Sr. Komórki PANC-1 tworzyły luźno połączone ze sobą agregaty komórkowe, podatne na uszkodzenia mechaniczne, w związku z czym nie zostały one wytypowane do dalszych badań. Istnieje jednak wiele prac wykorzystujących sferoidy utworzone przez komórki PANC-1, zarówno w mono, jak i w ko-kulturze [167-169]. W zaprezentowanych pracy badaniach nie udało się otrzymać sferoidów dla fibroblastów BJ. Jednak w literaturze istnieją badania z wykorzystaniem sferoidów powstałych z fibroblastów [170].

5.3.1. Wpływ peptydomimetyków i gemcytabiny na żywotność sferoidów

Sferoidy M-DS i M-Sr poddano działaniu peptydomimetyków **APL1-4** oraz GEM. Zaobserwowano, że niezależnie od stężenia i czasu inkubacji, GEM nie wpływa istotnie na

żywołność sferoidów. Z kolei porównując wyniki uzyskane dla analizowanych związków z GEM, można stwierdzić, iż związki **APL1-3** istotnie obniżały żywołność sferoidów już po 24 godz. inkubacji. Najwyższą aktywnością nacechowane były peptydomimetyki **APL1** i **APL2**. Aczkolwiek, przy wydłużonym czasie ekspozycji (72 godz.) obserwowano niewielki spadek aktywności **APL1-2** w porównaniu do aktywności po okresie 24 godz. Utraty aktywności wraz z czasem inkubacji nie odnotowano dla związków **APL3-4**. Aktywność związku **APL4**, po 24 godz. inkubacji, była porównywalna z aktywnością GEM. Wydłużona inkubacja ze związkiem **APL4** prowadziła do wzrostu jego aktywności i znaczącego spadku żywołności sferoidu. Na podstawie uzyskanych wyników można zatem przypuszczać, że peptydomimetyki lepiej przenikają do wnętrza sferoidu. Niska aktywność GEM może być spowodowana jej słabą przenikalnością w głąb sferoidu lub niższą ekspresją transporterów hENT1 na powierzchni komórek. Transportery hENT1 stanowią drogę wejścia GEM do wnętrza komórek [160,161]. Wykazano również, że przenikalność GEM spada wraz ze wzrostem liczby warstw komórek tworzących guz [171-173]. Dodatkowo, w sferoidach, pomiędzy warstwą komórek proliferujących a nekrotycznym jądrem, znajduje się warstwa komórek „uśpionych”, które nie dzielą się lub ich podział zachodzi znacznie wolniej. W związku z tym GEM, oddziałująca na fazę S cyklu komórkowego, nie może zadziałać [61].

Większa aktywność peptydomimetyków może wynikać z obecności fragmentu lipofilowego - *trans*-cynamoilopiperazyny. Przepuszczalność błon komórkowych jest niezbędna dla cytotoksycznego działania związków na komórki nowotworowe, zatem zwiększenie hydrofobowości i lipofilowości cząsteczki jest pożądane [174,175]. Przykładem takiego związku jest cynarazyna, lek zawierający *trans*-cynamoilopiperazynę sprzężoną z difenylometanolem. Jest to cząsteczka wysoce lipofilowa, która łatwo przenika przez barierę krew-mózg [176]. Bardzo dobra aktywność peptydomimetyków **APL1-4** może zatem wynikać z ich struktury – hydrofobowych ugrupowań aromatycznych (Phe/Trp i kwas cynamonowy). Dowiedziono, że obecność hydrofobowych aminokwasów w strukturze, zwłaszcza tryptofanu, znacząco zwiększa przenikalność peptydów przez błony komórkowe. Istotnie, tryptofan oddziałuje z białkami błonowymi oraz glikozaminoglikanami, dzięki czemu peptyd przenika do wnętrza komórki [177,178].

Dobra aktywność peptydomimetyków wobec sferoidów M-DS i M-Sr może również wynikać z ich wysokiego powinowactwa do receptora MOR, obecnego na powierzchni

badanych komórek. Wykazano, że komórki nowotworowe trzustki wykazują zwiększoną ekspresję receptorów opioidowych, w tym MOR [179]. Wyizolowane komórki nowotworowe M-DS i M-Sr posiadają na swojej powierzchni więcej receptorów MOR niż fibroblasty BJ i komórki PANC-1 (Tabela. 6). Jednak uzyskane wyniki nie wykazały korelacji pomiędzy ilością MOR na powierzchni komórki a aktywnością peptydomimetyków. Związek **APL2**, wykazujący najniższe powinowactwo spośród badanych peptydomimetyków ($IC_{50} = 77,6 \pm 2,8$ nM), skuteczniej obniżał żywotność sferoidów niż związek **APL4**, charakteryzujący się znacznie wyższym powinowactwem ($IC_{50} = 19,5 \pm 0,7$ nM).

5.4. Interakcja gemcytabiny z peptydomimetykami w działaniu na komórki prawidłowe i nowotworowe w modelach dwu- i trójwymiarowym

W terapii nowotworów coraz częściej stosuje się terapie skojarzone takie jak FOLFIRINOX lub GEM z Erlotynibem czy paksitakselem. Taki schemat terapeutyczny może opierać się o zastosowanie substancji oddziaływujących na dwa różne aspekty biologii nowotworu. Przykładem terapii jest zastosowanie GEM i Erlotynibu, gdzie GEM hamuje syntezę DNA, a Erlotynib blokuje aktywację receptora EGF [66].

Jak przedstawiono w rozdziale 5, badania w modelu 2D i 3D wykazały, że związki **APL2** i **APL3** charakteryzują się najlepszymi właściwościami, dobrą bioaktywnością i umiarkowaną toksycznością wobec fibroblastów. Stąd, mając na uwadze powyższe, te dwa związki zostały wytypowane do zbadania ich skojarzonego działania z gemcytabiną.

5.4.1. Interakcja gemcytabiny z peptydomimetykami w działaniu na komórki prawidłowe i nowotworowe w modelach dwuwymiarowym

Odpowiedź komórek na jednoczesne zastosowanie gemcytabiny z peptydomimetykiem **APL2** lub **APL3** była wysoce zależna od badanej linii komórkowej. Prawidłowe fibroblasty (BJ) wykazywały porównywalną wrażliwość na samą GEM oraz na zastosowane kombinacje substancji aktywnych. W porównaniu do GEM, zwiększoną wrażliwość fibroblastów

odnotowano jedynie dla kombinacji GEM+**APL2** (50 μ M); przy czym różnica ta była większa po 24 godz. inkubacji. W przypadku komórek nowotworowych PANC-1, M-DS i M-Sr zaobserwowano, że jednoczesne zastosowanie GEM ze związkami **APL2** lub **APL3** skuteczniej obniża żywotność komórek. Efekt ten był widoczny jedynie po 24 godz. ekspozycji na działanie substancji aktywnych. Najbardziej wrażliwe na zastosowanie związku **APL3** z GEM były komórki PANC-1. Faktem jest, że żywotność komórek poddanych działaniu GEM i związku **APL3** była niższa niż w przypadku zastosowania samej GEM. Wrażliwość PANC-1 na działanie GEM i **APL3** zwiększała się wraz z czasem ekspozycji. Istotny spadek żywotności komórek M-DS, w porównaniu z GEM, obserwowano jedynie dla GEM+**APL2** (50 μ M). Pozostałe kombinacje GEM i **APL2** lub **APL3** wykazywały aktywność porównywalną z GEM, niezależnie od czasu inkubacji. W przypadku komórek M-Sr, zastosowanie GEM ze związkiem **APL2** (50 μ M) lub **APL3** (50 μ M) lepiej redukowało żywotność komórek niż sama GEM. Działanie obserwowano jedynie po 24 godz. inkubacji komórek ze związkami.

Uzyskane wyniki są niejednoznaczne. Większość z zastosowanych kombinacji nie wspomaga działania gemcytabiny. Zwiększona wrażliwość komórek na działanie GEM i peptydomimetyku była obserwowana głównie przy zastosowaniu peptydomimetyku **APL2** lub **APL3** w stężeniu 50 μ M. Dodatkowo odnotowano, że krzywa żywotności komórek dla GEM jest zbliżona do krzywych uzyskanych dla kombinacji związków. Otrzymane wyniki nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, czy zastosowanie kombinacji gemcytabiny z peptydomimetykami jest skuteczniejsze niż działanie samej GEM. Uzyskane wyniki sugerują brak lub tylko nieznaczną aktywność peptydomimetyków w obecności gemcytabiny. Ze względu na nieznaną mechanizm działania peptydomimetyków nie można stwierdzić, dlaczego związki **APL2** i **APL3** nie wykazują aktywności. W literaturze znajdują się doniesienia dotyczące jednoczesnego zastosowania GEM z endogennym opioidem – Met-enkefaliną (OGF). Jednoczesne zastosowanie GEM i OGF skuteczniej hamowało proliferację komórek raka trzustki niż zastosowanie samej gemcytabiny. Badania te nie wykazały spadku aktywności GEM w obecności OGF, ale nie analizowały wpływu obecności GEM na aktywność OGF [6].

5.4.2. Interakcja gemcytabiny z peptydomimetykami w działaniu na komórki prawidłowe i nowotworowe w modelu trójwymiarowym

Badanie wzajemnego oddziaływania gemcytabiny z peptydomimetykami **APL2** lub **APL3** w modelu 2D nie dało jasnych wyników. W modelu trójwymiarowym zastosowanie kombinacji GEM ze związkiem **APL2** lub **APL3** powodowało większy spadek żywotności sferoidów niż w przypadku samej GEM. Efekt ten był widoczny dla wszystkich badanych kombinacji związków i stężeń. Wrażliwość sferoidów M-Sr była zależna od stężenia danego peptydomimetyku i zwiększała się wraz z czasem ekspozycji. Sferoidy M-DS były bardziej wrażliwe na działanie kombinacji GEM i związku **APL2** niż samej GEM. Odnotowano jednak, że oddziaływanie kombinacji GEM i związku **APL2** na sfery spada wraz czasem inkubacji. Natomiast oddziaływanie kombinacji GEM ze związkiem **APL3** zwiększa się z czasem ekspozycji na substancje aktywne. Otrzymane wyniki sugerują, że obecność peptydomimetyku skutkuje zahamowaniem aktywności gemcytabiny. Podobnie jak w przypadku modelu 2D, aktywność peptydomimetyków jest niższa niż w przypadku ich samodzielnego zastosowania.

5.5. Różnice w odpowiedzi komórek na działanie peptydomimetyków i gemcytabiny w modelach dwu- i trójwymiarowym

5.5.1. Różnice w oddziaływaniu peptydomimetyków na komórki w modelu dwu- i trójwymiarowym

Dwuwymiarowy model doświadczalny *in vitro* nie odzwierciedla prawidłowego mikrośrodowiska tkanki ani oddziaływań międzykomórkowych. Odpowiedź komórkowa w istotnym stopniu zależy od warunków hodowli, a wyniki uzyskiwane z zastosowaniem modelu 2D mogą być fałszywie pozytywne lub negatywne [180]. Przeprowadzone badania wykazały różnicę w odpowiedzi komórek hodowanych w modelach 2D i 3D na działanie wszystkich badanych peptydomimetyków, tj. **APL1-4**. Wrażliwość komórek M-DS i M-Sr hodowanych w modelach 2D i 3D, poddanych działaniu związku **APL1** przez 24 godz., była

porównywalna. Natomiast wydłużona ekspozycja na działanie peptydomimetyku **APL1** skutkowało istotnym spadkiem żywotności komórek w modelu 2D. Oporność sferoidów na działanie **APL1** była porównywalna, niezależnie od czasu inkubacji. W przypadku związku **APL2** zaobserwowano, że po 72 godz. sferoidy obydwu linii były bardziej odporne na działanie peptydomimetyku **APL2** niż komórki rosnące w monowarstwie. Natomiast, przy 24 godz. Inkubacji, obserwowano sytuację odwrotną – komórki w modelu 2D były bardziej odporne niż sferoidy. Obserwowane różnice nie były jednak istotne statystycznie. Podobne wyniki uzyskano dla związku **APL3**. Wrażliwość sferoidów była większa niż komórek w hodowli 2D niezależnie od czasu inkubacji i linii komórkowej (M-DS lub M-Sr). W tym przypadku różnica ta była istotna statystycznie. Wrażliwość komórek na krótkotrwałe (24 godz.) działanie związku **APL4** była porównywalna oraz niezależna od modelu i linii komórkowej. Żywotność komórek poddanych działaniu peptydomimetyku **APL4** przez 72 godz. była porównywalna dla modelu 2D i 3D.

Otrzymane wyniki znajdują swoje odzwierciedlenie w doniesieniach literaturowych. Przykładowo, sferoidy raka kolczystokomórkowego (CAL27) były bardziej wrażliwe na działanie erlotynibu niż komórki rosnące w modelu 2D. Indeks proliferacji CAL27 w modelu 3D był istotnie wyższy niż w przypadku komórek w modelu 2D [181]. Podobne rezultaty otrzymano dla komórek glejaka wielopostaciowego (U-87MG) poddanych działaniu PI-103, będącego inhibitorem kinazy mTOR. Badania wykazały, że sferoidy U-87MG były bardziej wrażliwe na działanie inhibitora [130]. W przypadku komórek raka płuca również obserwowano większą wrażliwość sferoidów na działanie erlotynibu. Wrażliwość komórek na erlotynib korelowała z ekspresją receptora EGF na powierzchni komórek [182]. Cytotoksyczne działanie leków przeciwnowotworowych jest zależne od ich mechanizmu działania. Zatem zdolność do proliferacji i częstotliwość podziałów, ekspresja białek, obecność ECM oraz dynamika oddziaływań międzykomórkowych, w hodowli lub w tkance, wpływają na efektywność zastosowanej substancji [130,181].

5.5.2. Różnice w oddziaływaniu gemcytabiny na komórki w modelu dwu- i trójwymiarowym

Sferoidy M-DS poddane działaniu GEM były na nią bardziej odporne niż komórki w hodowli 2D, niezależnie od czasu inkubacji. Natomiast, w przypadku komórek M-Sr zaobserwowano, że po 24 godz. inkubacji z GEM, sferoidy były bardziej wrażliwe niż komórki w modelu 2D. Z kolei po 72 godz. ekspozycji na GEM, sfery wykazywały istotnie większą oporność niż komórki rosnące w postaci monowarstwy. Różnica między żywotnością komórek w modelach 2D i 3D może wynikać z wielowarstwowości sferoidów oraz słabej przenikalności gemcytabiny do wnętrza komórek nowotworowych [172]. Zwiększona wrażliwość sfer M-Sr na działanie GEM może być spowodowana liczbą proliferujących komórek lub natężenia ekspresji transportera hENT1 na powierzchni komórek [61].

Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w literaturze. Przykładowo, paksitaksel obniżał żywotność komórek raka jajnika w hodowli 2D o 80%, natomiast w hodowli 3D tylko o 40-60% [183]. Podobne rezultaty uzyskano dla sferoidów raka jelita grubego (HCT-116). Komórki nowotworowe, w modelu 2D i 3D, poddawano działaniu m.in. 5-FU, irinotekanu oraz oksaliplatyny. W porównaniu do hodowli 2D, sferoidy charakteryzowały się większą opornością na działanie każdej z zastosowanych substancji [184]. Również sferoidy brodawczaka pęcherza moczowego (RT-4) wykazywały większą oporność na działanie doksorubicyny niż komórki w hodowli 2D [185]. Wiele badań wskazuje na większą oporność komórek hodowanych w modelach trójwymiarowych [186-188]. Zazwyczaj większa oporność hodowli 3D wynika z większej dynamiki oddziaływań międzykomórkowych oraz komórka-macierz [116]. Wielowarstwowość modeli 3D sprawia, że ekspozycja komórek na działanie substancji aktywnych jest zróżnicowana. Warunki panujące wewnątrz sferoidu, takie jak wartość pH lub deficyt tlenu (hipoksja), wpływają na aktywność leków. Zwiększona oporność hodowli 3D może również wynikać ze słabej dyfuzji substancji aktywnej do wnętrza sfery. Również hipoksja może przyczyniać się słabej odpowiedzi sfery na substancje aktywne [189,190].

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Niniejsza praca doktorska opisuje wybrane właściwości biologiczne nowych peptydomimetyków zbudowanych z tripeptydów opartych na sekwencji opioidów oraz lipofilowej *trans*-cynamoilopiperazyny. Przeprowadzone badania wykazały, że:

1. Peptydomimetyki **APL1-4** wykazują wysokie powinowactwo do receptora opioidowego MOR, są odporne na działanie proteaz, nie posiadają właściwości hemolitycznych oraz przeciwbakteryjnych.
2. Aktywność peptydomimetyków **APL1-4** wobec komórek nowotworowych i prawidłowych jest zależna od stężenia i czasu ekspozycji, zarówno w modelu dwu- jak i trójwymiarowym.
3. Badane peptydomimetyki charakteryzują się niską selektywnością w stosunku do komórek nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych.
4. Spośród badanych związków, peptydomimetyk **APL3** charakteryzuje się najlepszymi właściwościami bioaktywnymi oraz umiarkowaną toksycznością wobec prawidłowych fibroblastów.
5. Wyprowadzony model trójwymiarowej hodowli komórek nowotworowych trzustki jest stabilny, a uzyskiwane wyniki są powtarzalne oraz mogą stanowić podstawę do przeprowadzenia badań *in vivo*.

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że struktura badanych peptydomimetyków może stanowić podstawę do dalszego projektowania i syntezy nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych.

7. LITERATURA

- 1 Conroy T, Bachet JB, Ayav A, Huguet F, Lambert A, Caramella C, Marechal JL, Van Laethem M, Ducreux. Current standards and new innovative approaches for treatment of pancreatic cancer. *Eur J Cancer*. 2016;57:10-22
- 2 Falasca M, Kim M, Casari I. Pancreatic cancer: Current research and future directions. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Apr;1865(2):123-132.
- 3 Tugyi R, Uray K, Iván D, Fellingner E, Perkins A, Hudecz F. Partial d-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jan 2005, 102 (2) 413-418.
- 4 Knappe D, Henklein P, Hoffmann R, Hilpert K. Easy Strategy To Protect Antimicrobial Peptides from Fast Degradation in Serum . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(9):4003-4005.
- 5 Gentilucci L, De Marco R, Cerisoli L. Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization. *Curr Pharm Des*. 2010;16(28):3185-3203.
- 6 Zagon IS, Jaglowski JR, Verderame MF, Smith JP, Leure-Dupree AE, McLaughlin PJ. Cancer Combination chemotherapy with gemcitabine and biotherapy with opioid growth factor (OGF) enhances the growth inhibition of pancreatic adenocarcinoma. *Chemother Pharmacol*. 2005 Nov;56(5):510-520.
- 7 Gopalakrishnan G, Lepetre S, Maksimenko A, Mura S, Desmaële D, Couvreur P. Lipid-Conjugation of Endogenous Neuropeptides: Improved Biotherapy against Human Pancreatic Cancer. *Advanced Healthcare Materials*. 2015;4(7):1015-1022.
- 8 Horvat S, Mlinarić-Majerski K, Glavas-Obrovac L, Jakas A, Veljković J, Marzi S, Kragol G, Rosčić M, Matković M, Milostić-Srb A. Tumor-cell-targeted methionine-enkephalin analogues containing unnatural amino acids: design, synthesis, and in vitro antitumor activity. *J Med Chem*. 2006 Jun 1;49(11):3136-3142.
- 9 Lazarczyk M, Matyja E, Lipkowski AW. A comparative study of morphine stimulation and biphalin inhibition of human glioblastoma T98G cell proliferation in vitro. *Peptides*. 2010 Aug;31(8):1606-1612.
- 10 Kornhuber J, Henkel AW, Groemer TW, Städtler S, Welzel O, Tripal P, Rotter A, Bleich S, Trapp S. Lipophilic cationic drugs increase the permeability of lysosomal membranes in a cell culture system. *J Cell Physiol*. 2010 Jul;224(1):152-164.
- 11 De P, Baltas M, Bedos-Belval F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. *Curr Med Chem*. 2011;18(11):1672-1703.
- 12 Lipkowski AW, Misicka A, Davis P, Stropova D, Janders J, Lachwa M, Porreca F, Yamamura HI, Hruby VJ. Biological activity of fragments and analogues of the potent dimeric opioid peptide, biphalin. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999 Sep 20;9(18):2763-2766.
- 13 Chen, W. WHO classification of tumors. PathologyOutlines.com website. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/pancreaswho.html>. Accessed April 1st, 2018
- 14 <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer.html>
- 15 Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(44):9694-9705.

- 16 Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2014 Sep 11;371(11):1039-1049.
- 17 Hruban RH, Klimstra DS. Adenocarcinoma of the pancreas. *Semin Diagn Pathol*. 2014 Nov; 31(6): 443–451.
- 18 Neesse A, Algül H, Tuveson DA, Gress TM. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut*. 2015 Sep;64(9):1476-1484.
- 19 Korc M. Pancreatic cancer associated stroma production. *American journal of surgery*. 2007;194:84-86.
- 20 Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2007 Apr;6(4):1186-1197.
- 21 Waghray M, Yalamanchili M, di Magliano MP, Simeone DM. Deciphering the Role of Stroma in Pancreatic Cancer. *Current opinion in gastroenterology*. 2013;29(5):537-543.
- 22 Lunardi S, Muschel RJ, Brunner TB. The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets? *Cancer Lett*. 2014 Feb 28;343(2):147-155.
- 23 Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015 Dec 11;3:83-92.
- 24 Vasseur S, Tomasini R, Tournaire R, Iovanna JL. Hypoxia Induced Tumor Metabolic Switch Contributes to Pancreatic Cancer Aggressiveness. *Cancers*. 2010;2(4):2138-2152.
- 25 Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R. Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Research International*. 2014;2014:474905.
- 26 Hidalgo M. New insights into pancreatic cancer biology. *Ann Oncol*. 2012 Sep;23 Suppl 10:135-138.
- 27 Zeitouni D, Pylayeva-Gupta Y, Der CJ, Bryant KL. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. Cicens J, ed. *Cancers*. 2016;8(4):45.
- 28 Grossmann AH, Samowitz WS. Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Mutations and Colorectal Cancer Therapy. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Oct;135(10):1278-1282.
- 29 Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, Neoptolemos JP. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Apr 21;2:16022.
- 30 Hong S-M, Park JY, Hruban RH, Goggins M. Molecular Signatures of Pancreatic Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(6):716-727.
- 31 Yabar CS, Winter JM. Pancreatic Cancer: A Review. *Gastroenterol Clin North Am*. 2016 Sep;45(3):429-445.
- 32 Klöppel G, Basturk O, Schlitter AM, Konukiewitz B, Esposito I. Intraductal neoplasms of the pancreas. *Semin Diagn Pathol*. 2014 Nov;31(6):452-466.
- 33 Patra KC, Bardeesy N, Mizukami Y. Diversity of Precursor Lesions For Pancreatic Cancer: The Genetics and Biology of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm. *Clin Transl Gastroenterol*. 2017;8(4):e86.

- 34 Crippa S, Salvia R, Warshaw AL, Domínguez I, Bassi C, Falconi M, Thayer SP, Zamboni G, Lauwers GY, Mino-Kenudson M, Capelli P, Pederzoli P, Castillo CF. Mucinous Cystic Neoplasm of the Pancreas is Not an Aggressive Entity: Lessons From 163 Resected Patients. *AnnSurgery*. 2008;247(4):571-579.
- 35 Fukushima N, Zamboni G. Mucinous cystic neoplasms of the pancreas: update on the surgical pathology and molecular genetics. *Semin Diagn Pathol*. 2014 Nov;31(6):467-474.
- 36 Siegel LR, Miller KD, Jemal A, Cancer Statistics, 2018. *Ca Cancer J Clin* 2018;68:7–30
- 37 Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014 Jun 1;74(11):2913-2921.
- 38 Wong MCS, Jiang JY, Liang M, Fang Y, Yeung MS, Sung JY. Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Scientific Reports*. 2017;7:3165.
- 39 Zhang Q, Zeng L, Chen Y, Lian G, Qian C, Chen S, Li J, Huang K. Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2016, Article ID 8962321.
- 40 Carrera S, Sancho A, Azkona E, Azkuna J, Lopez-Vivanco G. Hereditary pancreatic cancer: related syndromes and clinical perspective. *Hered Cancer Clin Pract*. 2017;15:9.
- 41 Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC. Inherited Pancreatic Cancer Syndromes. *Cancer J*. 2012;18(6):485-491.
- 42 Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of Oncology*. 2012;23(7):1880-1888.
- 43 Lea CS, Holly EA, Bracci PM. Cigarette smoking and risk of pancreatic cancer: a clinic-based case-control study in the San Francisco Bay Area. *Ann Epidemiol*. 2015 Nov;25(11):816-823.
- 44 Bracci PM. Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Carcinog*. 2012;51(1):53-63.
- 45 Andersen DK, Korc M, Petersen GM, Eibl G, Li D, Rickels MR, Chari ST, Abbruzzese JL. Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. *Diabetes*. 2017 May;66(5):1103-1110.
- 46 Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(6):1252-1261.
- 47 Rahman F, Cotterchio M, Cleary SP, Gallinger S. Association between Alcohol Consumption and Pancreatic Cancer Risk: A Case-Control Study. *Abulseoud OA, ed. PLoS ONE*. 2015;10(4):e0124489.
- 48 Herreros-Villanueva M, Hijona E, Bañales JM, Cosme A, Bujanda L. Alcohol consumption on pancreatic diseases. *World J Gastroenterol*. 2013;19(5):638-647.
- 49 Stark, Alexander. Eibl, Guido. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 2015.

- 50 Tummala P, Junaidi O, Agarwal B. Imaging of pancreatic cancer: An overview. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2011;2(3):168-174.
- 51 Lee ES, Lee JM. Imaging diagnosis of pancreatic cancer: A state-of-the-art review. *World Journal of Gastroenterology* : WJG. 2014;20(24):7864-7877.
- 52 Gonzalo-Marin J, Vila JJ, Perez-Miranda M. Role of endoscopic ultrasound in the diagnosis of pancreatic cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2014;6(9):360-368.
- 53 Kalogeraki A, Papadakis GZ, Tamiolakis D, Karvela-Kalogeraki I, Karvelas-Kalogerakis M, Segredakis J, Papadakis M, Moustou E, Datseri G, Tzardi M. EUS - Fine- Needle Aspiration Biopsy (FNAB) in the Diagnosis of Pancreatic Adenocarcinoma: A Review. *Rom J Intern Med*. 2016 Jan-Mar;54(1):24-30.
- 54 Tamm EP, Balachandran A, Bhosale PR, Katz MH, Fleming JB, Lee JH, Varadhachary GR. Imaging of Pancreatic Adenocarcinoma: Update on Staging/Resectability. *Radiologic Clinics* , Volume 50 , Issue 3 , 407- 428
- 55 Heiken JP. Carcinoma of the pancreas: detection and staging using CT and MRI. *Cancer Imaging*. 2001;2(1):19-22.
- 56 Hruban RH, Klimstra DS. Adenocarcinoma of the pancreas. *Seminars in diagnostic pathology*. 2014;31(6):443-451.
- 47 Wood LD, Hruban RH. Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2012;18(6):492-501.
- 58 Ballehaninna UK, Chamberlain RS. Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer—A Comprehensive Review. *Indian journal of surgical oncology*. 2011;2(2):88-100.
- 59 Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL, Fripo MA, Mulvihill SJ. (2013). The Clinical Utility of CA 19-9 in Pancreatic Adenocarcinoma: Diagnostic and Prognostic Updates. *Current Molecular Medicine*, 13(3), 340–351.
- 60 Wu E, Zhou S, Bhat K, Ma Q. CA 19-9 and Pancreatic Cancer. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*. 2013;11(1):53-55.
- 61 de Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct 15;741:8-16.
- 62 Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol*. 2006 May;17 Suppl 5:v7-12.
- 63 Binenbaum Y, Na'ara S, Gil Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resist Updat*. 2015 Nov;23:55-68.
- 64 Ouyang G, Liu Z, Huang S, Li Q, Xiong L, Miao X, Wen Y. Gemcitabine plus cisplatin versus gemcitabine alone in the treatment of pancreatic cancer: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*. 2016;14:59.
- 65 Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Renschler MF. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine*. 2013; 369(18), 1691-1703.

- 66 Wang Y, Hu GF, Zhang QQ, Tang N, Guo J, Liu LY, Han X, Wang X, Wang ZH. Efficacy and safety of gemcitabine plus erlotinib for locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016 Jun 13;10:1961-1972.
- 67 Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003 May;3(5):330-338.
- 68 Im JK, Biswas G, Kim WI, Kim KT, Chung SK. A Blood-brain Barrier Permeable Derivative of 5-Fluorouracil: Preparation, Intracellular Localization, and Mouse Tissue Distribution. *Bulletin of the Korean Chemical Society.* 2011;32;3: 873-879
- 69 Lewandowski T, Biernacka R, Szmyd M. Folfirinox i co dalej? : ewolucja leczenia zaawansowanego raka trzustki. *Onkologia w Praktyce Klinicznej.* 2013;9; 5: 191-196
- 70 Suker M, Beumer BR, Sadot E, Marthey L, Faris JE, Mellon EA, El-Rayes B, Wang-Gillam A. FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *The Lancet Oncology.* 2016;17; 6: 801 - 810
- 71 Kelley RK, Ko AH. Erlotinib in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Biologics : Targets & Therapy.* 2008;2(1):83-95.
- 72 Schettino C, Bareschino MA, Ricci V, Ciardiello F. Erlotinib: an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor in non-small-cell lung cancer treatment. *Expert Rev Respir Med.* 2008 Apr;2(2):167-178.
- 73 Wong HH, Lemoine NR. Novel therapies for pancreatic cancer: setbacks and progress. *Future oncology (London, England).* 2010;6(7):1061-1064.
- 74 Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1801-1806.
- 75 Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, Li Y, Wilson GW, Connor AA, Denroche RE, Liang SB, Brown AM, Kim JC1, Wang T, Simpson JT, Beck T, Borgida A, Buchner N, Chadwick D, Hafezi-Bakhtiari S, Dick JE, Heisler L, Hollingsworth MA, Ibrahimov E, Jang GH, Johns J, Jorgensen LG1, Law C, Ludkovski O, Gallinger S. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature.* 2016 Oct 20;538(7625):378-382.
- 76 Ercan G, Karlitepe A, Ozpolat B. Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches. *Anticancer Res.* 2017 Jun;37(6):2761-2775.
- 77 Kota J, Hancock J, Kwon J, Korc M. Pancreatic cancer: Stroma and its current and emerging targeted therapies. *Cancer Lett.* 2017 Apr 10;391:38-49.
- 78 Yen WC, Fischer MM, Axelrod F, Bond C, Cain J, Cancilla B, Henner WR, Meisner R, Sato A2, Shah J, Tang T, Wallace B, Wang M, Zhang C, Kapoun AM, Lewicki J, Gurney A, Hoey T. Targeting Notch signaling with a Notch2/Notch3 antagonist (tarextumab) inhibits tumor growth and decreases tumor-initiating cell frequency. *Clin*

Cancer Res. 2015 May 1;21(9):2084-2095.

- 79 Zhang Y, Yang C, Cheng H, Fan Z, Huang Q, Lu Y, Fan K, Luo G, Jin K, Wang Z, Liu C, Yu X. Novel agents for pancreatic ductal adenocarcinoma: emerging therapeutics and future directions. *J Hematol Oncol*. 2018 Jan 31;11(1):14.
- 80 Rougier P, Riess H, Manges R, Karasek P, Humblet Y, Barone C, Santoro A, Assadourian S, Hatteville L, Philip PA. Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49(12):2633–2642.
- 81 Gourd E. PEGPH20 for metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lancet Oncol*. 2018 Feb;19(2):e81.
- 82 Felício MR, Silva ON, Gonçalves S, Santos NC, Franco OL. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry*. 2017;5:5.
- 83 Riedl S, Zweytick D, Lohner K. Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2011;164(8):766-781.
- 84 Figueiredo CR, Matsuo AL, Massaoka MH, Polonelli L, Travassos LR. Anti-tumor activities of peptides corresponding to conserved complementary determining regions from different immunoglobulins. *Peptides*. 2014 Sep;59:14-19.
- 85 Wu D, Gao Y, Qi Y, Chen L, Ma Y, Li Y. Peptide-based cancer therapy: opportunity and challenge. *Cancer Lett*. 2014 Aug 28;351(1):13-22.
- 86 Gaspar D, Veiga AS, Castanho MARB. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4:294.
- 87 Domalaon R, Findlay B, Ogunsina M, Arthur G, Schweizer F. Ultrashort cationic lipopeptides and lipopeptoids: Evaluation and mechanistic insights against epithelial cancer cells. *Peptides*. 2016 Oct;84:58-67.
- 88 Arouri A, Kiessling V, Tamm L, Dathe M, Blume A. Morphological changes induced by the action of antimicrobial peptides on supported lipid bilayers. *The journal of physical chemistry B*. 2011;115(1):158-167.
- 89 Brandenburg LO, Merres J, Albrecht LJ, Varoga D, Pufe T. Antimicrobial peptides: multifunctional drugs for different applications. *Polymers*. 2012; 4: 539–560
- 90 Seo MD, Won HS, Kim JH, Mishig-Ochir T, Lee BJ. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules*. 2012; 17: 12276–12286
- 91 Raz A, Bucana C, McLellan W, Fidler IJ. Distribution of membrane anionic sites on B16 melanoma variants with differing lung colonising potential. *Nature*. 1980 Mar 27;284(5754) :363-364.
- 92 Utsugi T1, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res*. 1991 Jun 1;51(11):3062-3066.
- 93 An P, Lei H, Zhang J, Song S, He L, Jin G, Liu X, Wu J, Meng L, Liu M, Shou C. Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library. *Int. J. Cancer*, 2004;

- 94 D'Andrea LD, Del Gatto A, Pedone C, Benedetti E. Peptide-based molecules in angiogenesis. *Chem Biol Drug Des.* 2006 Feb;67(2):115-126.
- 95 Tucker GC1. Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003 Jun;4(6):722-731.
- 96 Dal Corso A, Pignataro L, Belvisi L, Gennari C. $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Integrin-Targeted Peptide/ Peptidomimetic-Drug Conjugates: In-Depth Analysis of the Linker Technology. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(3):314-329.
- 97 Xiao YF, Jie MM, Li BS, Hu CJ, Xie R, Tang B, Yang SM. Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy. *Journal of Immunology Research.* 2015 vol. 2015, Article ID 761820.
- 98 Kao C, Lin X, Yi G, Zhang Y, Rowe-Magnus DA, Bush K. Cathelicidin antimicrobial peptides with reduced activation of toll-like receptor signaling have potent bactericidal activity against colistin-resistant bacteria. *MBio.* 2016; 7, e01418–16.
- 99 Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.* 2005; 30, 505–515.
- 100 Uggerhøj LE, Poulsen TJ, Munk JK, Fredborg M, Sondergaard TE, Frimodt-Moller N. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides: do's and don'ts. *ChemBioChem.* 2015; 16, 242–253.
- 101 Kelly GJ, Kia AFA, Hassan F, O'Grady S, Morgan MP, Creaven BS. Polymeric prodrug combination to exploit the therapeutic potential of antimicrobial peptides against cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* 2016; 14, 9278–9286.
- 102 Wiffen PJ, Cooper TE, Anderson AK, Gray AL, Grégoire MC, Ljungman G, Zernikow B. Opioids for cancer-related pain in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Jul 19;7:CD012564.
- 103 Donnelly S, Davis MP, Walsh D, Naughton M. Morphine in cancer pain management: a practical guide. *Support Care Cancer.* 2002 Jan;10(1):13-35.
- 104 Dai X, gang Cui S, Wang T, Liu Q, jin Song H, Wang R. Endogenous opioid peptides, endomorphin-1 and -2 and deltorphin I, stimulate angiogenesis in the CAM assay. *European Journal of Pharmacology* 2008; 579(1–3):269-275.
- 105 Boehncke S, Hardt K, Schadendorf D, Henschler R, Boehncke WH, Duthey B. Endogenous μ -opioid peptides modulate immune response towards malignant melanoma. *Experimental Dermatology* 2011; 20(1):24–28.
- 106 Gupta K, Kshirsagar S, Chang L, Schwartz R, Law PY, Yee D, Hebbel RP. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Research* 2002; 62(15):4491–4498.
- 107 Gach K, Wyrebska A, Fichna J, Janecka A. The role of morphine in regulation of cancer cell growth. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2011; 384(3):221–230. ISSN 0028-1298.
- 108 Sueoka N, Sueoka E, Okabe S, Fujiki H. Anti-cancer effects of morphine through inhibition of tumour necrosis factor-alpha release and mRNA expression. *Carcinogenesis.* 1996 Nov;17(11):2337-2341.
- 109 Nylund G, Pettersson A, Bengtsson C, Khorram-Manesh A, Nordgren S, Delbro DS. Functional expression of mu-opioid receptors in the human colon cancer cell line, HT-29, and their localization in human colon. *Dig Dis Sci.*

2008 Feb;53(2):461-466.

- 110 Janecka A, Fichna J, Kosson P, Zalewska-Kaszubska J, Krajewska U, Mirowski M, Rozalski M. 2004. Binding of the new morphiceptin analogs to human MCF-7 breast cancer cells and their effect on growth. *Regul. Pept.* 120: 237-241
- 111 Zagon IS, Wu Y, McLaughlin PJ. Opioid growth factor and organ development in rat and human embryos. *Brain Res.* 1999 Aug 28;839(2):313-322.
- 112 Zagon IS, McLaughlin PJ. Opioid growth factor and the treatment of human pancreatic cancer: A review. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2014;20(9):2218-2223.
- 113 Wang D, Wang G, Yang J, Plotnikoff NP, Griffin N, Han Y, Qi R, Gao X, Shan F. Inhibition of the growth of human melanoma cells by methionine enkephalin. *Molecular Medicine Reports.* 2016;14(6):5521-5527.
- 114 Wang DM, Jiao X, Plotnikoff NP, Griffin N, Qi RQ, Gao XH, Shan FP. Killing effect of methionine enkephalin on melanoma in vivo and in vitro. *Oncology Reports.* 2017;38(4):2132-2140.
- 115 Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 2015; 17, 1–15.
- 116 Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay and Drug Development Technologies.* 2014;12(4):207-218.
- 117 Asghar W, El Assal R, Shafiee H, Pitteri S, Paulmurugan R, Demirci U. Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Mater Today (Kidlington).* 2015 Dec;18(10):539-553.
- 118 Sant S, Johnston PA. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* 2017 Mar;23:27-36.
- 119 Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. Rahaman MN, ed. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015;16(3):5517-5527.
- 120 Luca AC, Mersch S, Deenen R. Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. Cordes N, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e59689.
- 121 Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* 2013 Feb;31(2):108-115.
- 122 Pineda ET, Nerem RM, Ahsan T. Differentiation patterns of embryonic stem cells in two versus three dimensional culture. *Cells, tissues, organs.* 2013;197(5):399-410.
- 123 Torisawa YS, Takagi A, Nashimoto Y, Yasukawa T, Shiku H, Matsue T. A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip. *Biomaterials.* 2007 Jan;28(3):559-566.
- 124 Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *The Analyst.* 2011;136:473-478.
- 125 Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology.* 2017;32(4):266-277.

- 126 Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro . *Journal of Anatomy*. 2015;227(6):746-756.
- 127 Liu Y, Gill E, Shery Huang YY. Microfluidic on-chip biomimicry for 3D cell culture: a fit-for-purpose investigation from the end user standpoint. *Future Science OA*. 2017;3(2):FSO173.
- 128 Gupta N, Liu JR, Patel B, Solomon DE, Vaidya B, Gupta V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2016;1(1):63-81.
- 129 Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, Osterland M, Golfier S, Räse S, Ansari N, Esner M, Bickle M, Pampaloni F, Mattheyer C, Stelzer EH, Parczyk K, Prechtel S, Steigemann P. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res*. 2014 Apr 15;323(1):131-143.
- 130 Vinci M, Gowan S, Boxall F. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol*. 2012; 10:29.
- 131 Borovski T, De Sousa EMF, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res*. 2011; 71: 634-639
- 132 Debeb BG, Zhang X, Krishnamurthy S, Gao H, Cohen E, Li L, Rodriguez AA, Landis MD, Lucci A, Ueno NT, Robertson F, Xu W, Lacerda L, Buchholz TA, Cristofanilli M, Reuben JM, Lewis MT, Woodward WA. Characterizing cancer cells with cancer stem cell-like features in 293T human embryonic kidney cells. *Mol Cancer*. 2010; 9:180
- 133 Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 3722-3727
- 134 Correa de Sampaio P, Auslaender D, Krubasik D, Failla AV, Skepper JN, Murphy G, English WR. A heterogeneous in vitro three dimensional model of tumour-stroma interactions regulating sprouting angiogenesis. *PLoS One*. 2012; 7: e30753
- 135 Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Kreutz M. Brave little world - Spheroids as an in vitro model to study tumor-immune-cell interactions. *Cell Cycle*. 2006; 5: 691-695
- 136 Lonardo E, Frias-Aldeguer J, Hermann PC, Heeschen C. Pancreatic stellate cells form a niche for cancer stem cells and promote their self-renewal and invasiveness. *Cell Cycle*. 2012; 11: 1282-1290
- 137 Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. Eglen RM, Klein J-L, eds. *Slas Discovery*. 2017;22(5):456-472.
- 138 Park J, Wetzel II, Dréau D1, Cho H. 3D Miniaturization of Human Organs for Drug Discovery. *Adv Healthc Mater*. 2018 Jan;7(2).
- 139 Banerjee P, Lenz D, Robinson JP, Rickus JL, Bhunia AK. A novel and simple cell-based detection system with a collagen-encapsulated B-lymphocyte cell line as a biosensor for rapid detection of pathogens and toxins. *Lab Invest*. 2008 Feb;88(2):196-206.
- 140 Zhou L, Huang G, Wang S, Wu J, Lee WG, Chen Y, Xu F, Lu T. Advances in cell-based biosensors using three-

dimensional cell-encapsulating hydrogels. *Biotechnol J.* 2011 Dec;6(12):1466-1476.

- 141 Knopik-Skrocka A, Bielawski J. Differences in amphotericin B-induced hemolysis between human erythrocytes from male and female donors *Biol. Lett.* 2005;42, 49-60
- 142 Lipkowski AW. Mossakowski Medical Research Center, Polish Academy of Science, Warsaw. Int. PCTPub. No. WO2014102571 A1. 2014
- 143 Bennion BJ, Be NA, McNERney MW, Lao V, Carlson EM, Valdez CA, Malfatti MA, Enright HA, Nguyen TH, Lightstone FC, Carpenter TS. Predicting a Drug's Membrane Permeability: A Computational Model Validated With in Vitro Permeability Assay Data. *J Phys Chem B.* 2017 May 25;121(20):5228-5237
- 144 Morganti P, Ruocco E, Wolf R, Ruocco V. Percutaneous absorption and delivery systems. *Clin Dermatol.* 2001 Jul-Aug;19(4):489-501.
- 145 Pliška V, Testa B, van de Waterbeemd H. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology* Edited VCH, Weinheim, Germany. 1996. ISBN 3-527-29383-3.
- 146 Dołowy M. Wyznaczenie lipofilowości acidum dehydrocholicum różnymi metodami, *Farmacja Polska.* 2009; 65: 10: 689-693
- 147 Morley JS. Structure-activity relationships of enkephalin-like peptides. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1980; 20(1):81–110.
- 148 Lipkowski AW, Misicka A, Davis P, Stropova D, Janders J, Lachwa M, Porreca F, Yamamura HI, Hruby VJ. Biological activity of fragments and analogues of the potent dimeric opioid peptide, biphalin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1999; 9(18):2763–2766.
- 149 Janecka A, Fichna J, Janecki T. Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem.* 2004;4:1–17.
- 150 Gautam A, Chaudhary K, Kumar R, Sharma A, Kapoor P, Tyagi A: Open source drug discovery consortium. Raghava GPS: In silico approaches for designing highly effective cell penetrating peptides. *J Transl Med* 2013,11:74.
- 151 Sharma A, Kapoor P, Gautam A, Chaudhary K, Kumar R, Chauhan JS, Tyagi A, Raghava GPS: Computational approach for designing tumor homing peptides. *Sci Rep* 2013, 3:1607.
- 152 Tyagi A, Kapoor P, Kumar R, Chaudhary K, Gautam A, Raghava GPS: In silico models for designing and discovering novel anticancer peptides. *Sci Rep* 2013, 3:2984.
- 153 ASTM E2524-08, Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013.
- 154 Bastos M., Bai G., Gomes P., Andreu D., Goormaghtigh E., Prieto M.: Energetics and partition of two cecropin-melittin hybrid peptides to model membranes of different composition. *Biophys. J.*, 2008; 94: 2128–2141
- 155 Papo N., Braunstein A., Eshhar Z., Shai Y.: Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic D-, L-amino Acid Peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion. *Cancer Res.*, 2004; 64: 5779–5786

- 156 Ebbensgaard A, Mordhorst H, Overgaard MT, Nielsen CG, Aarestrup FM, Hansen EB. Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. Mergaert P, ed. PLoS ONE. 2015;10(12):e0144611.
- 157 Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2010;2(5):a000414.
- 158 Tsai CM, Yen GC, Sun FM, Yang SF, Weng CJ. Assessment of the anti-invasion potential and mechanism of select cinnamic acid derivatives on human lung adenocarcinoma cells. Mol Pharm. 2013 May 6;10(5):1890-1900.
- 159 Zhang J, Xiao A, Wang T, Liang X, Gao J, Li P, Shi T. Effect and mechanism of action of cinnamic acid on the proliferation and apoptosis of leukaemia cells. Biomedical Research. 2014;25: 3:405-408.
- 160 Greenhalf W, Ghaneh P, Neoptolemos JP, Palmer DH, Cox TF, Lamb RF, Garner E, Campbell F, Mackey JR, Costello E, Moore MJ, Valle JW, McDonald AC, Carter R, Tebbutt NC, Jackson R, Rawcliffe CL, Scarpa A, Bassi C, Büchler MW; European Study Group for Pancreatic Cancer. Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial. J Natl Cancer Inst. 2014 Jan;106(1):djt347.
- 161 Deng T, Pan H, Han R. Gemcitabine sensitivity factors, hENT1 and RRM1 as potential prognostic biomarker for advanced biliary tract cancer. International Journal of Clinical and Experimental Medicine. 2014;7(12):5041-5049.
- 162 www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1469
- 163 Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, Lai R, Ammar A, Regine WF, Abrams R, Benson AB, Macdonald J, Cass CE, Dicker AP, Mackey JR. Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. Gastroenterology. 2009 Jan;136(1):187-195.
- 164 Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR (1971) Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. J Natl Cancer Inst 46: 113-120.
- 165 Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J (1970) A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 18: 491-495.
- 166 Sutherland RM, Durand RE (1976) Radiation response of multicell spheroids - an in vitro tumour model. Curr Top Radiat Res Q 11: 87- 139.
- 167 Paškevičiūtė M, Petrikaitė V. Differences of statin activity in 2D and 3D pancreatic cancer cell cultures. Drug Design, Development and Therapy. 2017;11:3273-3280.
- 168 Wen Z, Liao Q, Hu Y, You L, Zhou L, Zhao Y. A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2013;46(7):634-642.
- 169 Shoal H, Karsch-Bluman A, Brill-Karniely Y, Stern T, Zamir G, Hubert A, Benny O. Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids. Scientific Reports. 2017;7: 10428
- 170 Salmenperä P, Kankuri E, Bizik J, Sirén V, Virtanen I, Takahashi S, Leiss M, Fässler R, Vaheri A. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin-integrin interaction. Exp Cell Res. 2008 Nov 15;314(19):3444-3452.

- 171 Binenbaum Y, Na'ara S, Gil Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resist Updat.* 2015 Nov;23:55-68.
- 172 Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2006 Aug;6(8): 583-592.
- 173 Grantab RH, Tannock IF. Penetration of anticancer drugs through tumour tissue as a function of cellular packing density and interstitial fluid pressure and its modification by bortezomib. *BMC Cancer.* 2012;12:214.
- 174 Gredicak M, Supek F, Kralj M, Majer Z, Hollósi M, Smuc T, Mlinarić-Majerski K, Horvat S. Computational structure-activity study directs synthesis of novel antitumor enkephalin analogs. *Amino Acids.* 2010 Apr;38(4):1185-1191.
- 175 Magzoub M, Eriksson LE, Gräslund A. Comparison of the interaction, positioning, structure induction and membrane perturbation of cell-penetrating peptides and non-translocating variants with phospholipid vesicles. *Biophys Chem.* 2003 Mar 25;103(3):271-288.
- 176 van de Waterbeemd H, Karajiannis H, El Tayar N. Lipophilicity of amino acids. *Amino Acids.* 1994 Jun;7(2):129-145.
- 177 Bechara C, Pallerla M, Zaltsman Y, Burlina F, Alves ID, Lequin O, Sagan S. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB J.* 2013 Feb;27(2):738-749.
- 178 Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep;1758(9):1184-1202.
- 179 Jorand R, Biswas S, Wakefield DL, Tobin SJ, Golfetto O, Hilton K, Jovanovic-Talisman T. Molecular signatures of mu opioid receptor and somatostatin receptor 2 in pancreatic cancer. *Molecular Biology of the Cell.* 2016;27(22), 3659–3672.
- 180 Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):839-845.
- 181 Adcock AF, Trivedi G, Edmondson R, Spearman C, Yang L. Three-Dimensional (3D) cell cultures in cell-based assays for in vitro evaluation of anticancer drugs. *J. Anal. Bioanal. Technol.* 2015;6:247.
- 182 Ekert JE, Johnson K, Strake B. Three-Dimensional Lung Tumor Microenvironment Modulates Therapeutic Compound Responsiveness In Vitro – Implication for Drug Development. Chai KX, ed. *PLoS ONE.* 2014;9(3):e92248.
- 183 Loessner D, Stok KS, Lutolf MP, Hutmacher DW, Clements JA, Rizzi SC. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials.* 2010 Nov;31(32):8494-8506.
- 184 Karlsson H, Fryknäs M, Larsson R, Nygren P. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Exp Cell Res.* 2012 Aug 1;318(13):1577-1585.
- 185 Amaral RLF, Miranda M, Marcato PD, Swiech K. Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Frontiers in Physiology.* 2017;8:605.
- 186 Hongisto V, Jernström S, Fey V, Mpindi JP, Kleivi Sahlberg K, Kallioniemi O. High-throughput 3D screening

- reveals differences in drug sensitivities between culture models of JIMT1 breast cancer cells. *PLoS ONE*. 2013;8:e77232.
- 187 Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov. Today*. 2013; 18, 240–249.
- 188 Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*. 2016; 5, 45745–45756.
- 189 Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007; 99, 1441–1454.
- 190 Swietach P, Hulikova A, Patiar S, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Importance of intracellular pH in determining the uptake and efficacy of the weakly basic chemotherapeutic drug, doxorubicin. *PLoS ONE*. 2012; 7, 1–9.