



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Biochemiczno-Biofizyczne

Kamil Janusz Durka

Cytotoksyczność liposomalnych taksanów funkcjonalizowanych peptydem gH625 wobec ludzkich komórek śródbłónka mikrowaskularnego

Cytotoxicity of liposomal taxanes functionalized with
gH625 peptide against human microvascular
endothelial cells

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biofizyki Medycznej
Instytutu Biofizyki

Promotor:

- Prof. dr hab. Aneta Koceva-Chyła

Promotor pomocniczy:

- Dr Karolina Matczak

Składam najserdeczniejsze podziękowania

Promotorowi niniejszej rozprawy,

Pani Prof. dr hab. Anecie Kocevie-Chyle

Za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy,
przekazaną mi wiedzę, cierpliwość i wsparcie

Promotorowi pomocniczemu,

Dr Karolinie Matczak

Za niezastąpioną pomoc w wykonywaniu doświadczeń,
inspirację do badań i motywację na każdym etapie

Prof. Stefani Galdiero

z Dipartimento di Farmacia

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

NEAPOL, WŁOCHY

Za syntezę i udostępnienie związków do badań

Pracownikom oraz Koleżankom i Kolegom

z Katedry Biofizyki Medycznej Uniwersytetu Łódzkiego

Za życzliwość, pomoc i przyjemną atmosferę pracy naukowo-badawczej

Moim najbliższym, rodzinie oraz przyjaciołom

Za wsparcie, wyrozumiałość i motywację

Badania wykonano we współpracy z prof. Stefania Galdiero

Dipartimento di Farmacia

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Neapol, Włochy

Department of Pharmacy

University of Naples "Federico II"

Neapol, Włochy



SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP	9
1.1. Historia taksanów jako leków przeciwnowotworowych oraz metody ich otrzymywania	9
1.2. Budowa chemiczna taksanów	13
1.3. Zastosowanie kliniczne taksanów	14
1.3.1. Farmakokinetyka paklitakselu i docetakselu	15
1.3.2. Efekty uboczne chemioterapii z zastosowaniem taksanów	16
1.4. Molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej taksanów	16
1.4.1. Różnice w aktywności przeciwnowotworowej docetakselu i paklitakselu	19
1.5. Peptydy penetrujące błony komórkowe	20
1.5.1. Klasyfikacja peptydów penetrujących	22
1.5.2. Mechanizmy przenikania peptydów penetrujących przez błony komórkowe	23
1.5.3. Zastosowanie peptydów penetrujących w badaniach klinicznych	25
1.5.4. Charakterystyka i właściwości peptydu gH625	28
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	32
3. MATERIAŁY	35
3.1. Odczynniki i media do hodowli komórek	35
3.2. Odczynniki chemiczne	35
3.2.1. Sondy fluorescencyjne i barwniki	35
3.2.2. Pozostałe odczynniki	36
3.3. Leki przeciwnowotworowe	36
3.4. Nanonośniki leków przeciwnowotworowych	36
3.5. Drobnny sprzęt	37
3.6. Aparatura	37
3.7. Materiał biologiczny	37
3.7.1. Charakterystyka komórek linii HMEC-1	38
4. METODY	39
4.1. Ocena kształtu i morfologii nanonośnika liposomalnego przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego	39
4.2. Hodowla i pasażowanie komórek	39
4.3. Ocena żywotności komórek w hodowli metodą barwienia błękitem trypanu	40
4.4. Inkubacja komórek HMEC-1 z badanymi związkami	40
4.5. Metody oznaczenia cytotoksyczności	41
4.5.1. Mikropłytkowy test spektrofotometryczny z XTT	41
4.5.2. Mikropłytkowy test spektrofotometryczny z rezazuryną (REMA)	44
4.5.3. Mikropłytkowy test spektrofluorymetryczny z sulforodaminą B (SRB)	45
4.6. Ocena właściwości antyproliferacyjnych	47

4.6.1. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometryczną	47
4.7. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową w wersji alkalicznej (elektroforeza pojedynczej komórki)	48
4.8. Metody oceny stresu oksydacyjnego	50
4.8.1. Oznaczenie zawartości glutationu za pomocą monochlorobimanu	50
4.9. Pomiar kinetyki zmian potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) przy użyciu mikroplótkowej metody spektrofluorymetrycznej z sondą fluoroscencyjną JC-1 ..	52
4.10. Ocena indukcji autofagii metodą spektrofluorymetryczną	53
4.11. Analiza statystyczna	55
5. WYNIKI	56
5.1. Kształt i morfologia nanonośnika liposomalnego.....	56
5.2. Cytotoksyczność wolnych i liposomalnych taksanów wobec komórek endotelialnych linii HMEC-1.....	57
5.3. Właściwości antyproliferacyjne wolnych i liposomalnych taksanów.....	63
5.3.1. Zaburzenia cyklu komórkowego.....	63
5.4. Właściwości genotoksyczne wolnych i liposomalnych taksanów	76
5.5. Właściwości prooksydacyjne wolnych i liposomalnych taksanów – zmiany zawartości zredukowanego glutationu (GSH)	81
5.6. Zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$)	88
5.7. Indukcja autofagii przez wolne i liposomalne taksany	99
6. DYSKUSJA	108
7. WNIOSKI	120
8. STRESZCZENIE	121
9. SUMMARY	122
10. BIBLIOGRAFIA	123

WYKAZ SKRÓTÓW

10-DAB	10-Deacetylobakatylna III (<i>ang. 10-<u>d</u>e<u>a</u>cetyl<u>b</u>accatin III</i>)
9 KB	Ludzka linia komórkowa raka nabłonkowego (<i>ang. Human epithelial carcinoma cell line</i>)
AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności (<i>ang. <u>A</u>cquired <u>I</u>mmune <u>D</u>eficiency <u>S</u>ndrome</i>)
ATG geny	geny związane z autofagią (<i>ang. autophagy-related genes</i>)
Bax	białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (<i>ang. <u>B</u>cl-2 <u>a</u>ssociated <u>X</u>protein</i>)
Bcl-2	rodzina białek antyapoptotycznych (<i>ang. <u>B</u>-<u>c</u>ell <u>l</u>ymphoma 2</i>)
CCCP	m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu (<i>ang. <u>c</u>arbonyl <u>c</u>yanide <u>m</u>-<u>c</u>hloro<u>p</u>henyl hydrazone</i>)
CPP	peptydy penetrujące komórkę (<i>ang. <u>c</u>ell-<u>p</u>enetrating <u>p</u>eptides</i>)
CTGF	czynnik wzrostu tkanki łącznej (<i>ang. <u>c</u>onnective <u>t</u>issue <u>g</u>rowth <u>f</u>actor</i>)
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol (<i>ang. 4',6-<u>d</u>iamidino-2-<u>p</u>henyl<u>i</u>ndole</i>)
DEHP	ftalan bis(2-etyloheksyl) (<i>ang. <u>d</u>iethyl<u>h</u>exyl <u>p</u>htalate</i>)
DTX	docetaksel (<i>ang. <u>D</u>ocet<u>a</u>xel, Taxotere®</i>)
EDTA	kwas wersenowy (<i>ang. <u>e</u>thylenediaminetetraacetic <u>a</u>cid</i>)
EGF	czynnik wzrostu naskórki (<i>ang. <u>e</u>pidermal <u>g</u>rowth <u>f</u>actor</i>)
GS•	rodnik glutationylowy (<i>ang. glutathionyl radical</i>)
GSH	tripeptyd γ -glutamylcysteinylglycyna, glutation (<i>ang. glutathione</i>)
GSSG	disiarczek glutationu (<i>ang. glutathione disulfide</i>)
GTP	guanozyna-5'-trifosforan (<i>ang. <u>g</u>uanosine <u>t</u>ri<u>p</u>hosphate</i>)
HIV-1	ludzki wirus niedoboru odporności 1 (<i>ang. <u>H</u>uman <u>I</u>mmunodeficiency <u>V</u>irus type 1</i>)
HSP	białka szoku cieplnego (<i>ang. <u>h</u>eat <u>s</u>hock <u>p</u>roteins</i>)
HSV-1	wirus opryszczki typu 1 (<i>ang. <u>H</u>erpes <u>S</u>implex <u>V</u>irus type 1</i>)
HVEM	mediator wejścia wirusa opryszczki (<i>ang. the <u>H</u>erpes <u>V</u>irus <u>E</u>ntry <u>M</u>ediator</i>)
JC-1	jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny (<i>ang. 5,5',6,6'tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide</i>)
JNK	kinaza fosforylująca N-końcowy rejon białka c-Jun (<i>ang. c-<u>J</u>un <u>N</u>-terminal protein <u>k</u>inase</i>)
L1210	Linia L1210 komórek białaczki mysiej (<i>ang. L1210 murine leukemia cell line</i>)
LMP	agarozą o niskim punkcie topnienia (<i>ang. <u>l</u>ow <u>m</u>elting <u>p</u>oint agarose</i>)
MAP	modelowy peptyd amfipatyczny (<i>ang. <u>m</u>odel <u>a</u>mphipathic <u>p</u>eptide</i>)
MCB	monochlorobiman (<i>ang. <u>m</u>ono<u>c</u>hloro<u>b</u>imane</i>)

MDC	monodansylokadawaryna (<i>ang. <u>m</u>onod<u>a</u>nsyl<u>c</u>adaverine)</i>)
MMP	mitochondrialny potencjał błonowy (<i>ang. <u>m</u>itochondrial <u>m</u>embrane <u>p</u>otential)</i>)
NADP⁺	utleniony fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (<i>ang. oxidized <u>n</u>icotinamide <u>a</u>denine <u>d</u>inucleotide <u>p</u>hosphate)</i>)
NADPH	Zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (<i>ang. <u>n</u>icotinamide <u>a</u>denine <u>d</u>inucleotide <u>p</u>hosphate)</i>)
NLS	sekwencja lokalizacji jądrowej (<i>ang. <u>n</u>uclear <u>l</u>ocalization <u>s</u>equences)</i>)
NMDAR	receptor N-metylo-D-asparaginianowy (<i>ang. <u>N</u>-<u>m</u>ethyl-<u>D</u>-<u>a</u>sparatate <u>r</u>eceptor)</i>)
NMP	agaroza o normalnym punkcie topnienia (<i>ang. <u>n</u>ormal <u>m</u>elting <u>p</u>oint <u>a</u>garose)</i>)
P1534	Linia P1534 komórek białaczki mysiej (<i>ang. P1534 mouse leukemia cells</i>)
p388	Linia p388 komórek białaczki mysiej (<i>ang. murine P388 lymphocytic leukemia cells</i>)
PBS	zbuforowany roztwór soli fizjologiczne (<i>ang. <u>p</u>hosphate-<u>b</u>uffered <u>s</u>aline)</i>)
PCF	fermentacja komórek roślinnych (<i>ang. <u>p</u>lant <u>c</u>ell <u>f</u>ermentation)</i>)
PMS	metosiarczan fenazyny (<i>ang. <u>p</u>henazine <u>m</u>etho<u>s</u>ulfate)</i>)
PSA	swoisty antygen sterczowy (<i>ang. <u>p</u>rostate-<u>s</u>pecific <u>a</u>ntygen)</i>)
PSD-95	białko kotwiczące zagęszczenia postsynaptycznego o masie 95 kDa z rodziny MAGUC (<i>ang. <u>p</u>ost<u>s</u>ynaptic <u>d</u>ensity protein 95 kDa)</i>)
PTD	peptydy białkowej domeny transdukcji (<i>ang. <u>p</u>rotein <u>t</u>ransduction <u>d</u>omain)</i>)
PTP	por przejściowej przepuszczalności błony mitochondrialnej (<i>ang. <u>p</u>ermeability <u>t</u>ransition <u>p</u>ore complex)</i>)
PTX	Paklitaksel (taksol) – (<i>ang. <u>P</u>aclit<u>a</u>xel, Taxol®)</i>)
PVC	polichlorek winylu (<i>ang. <u>p</u>oly<u>v</u>inyl chloride)</i>)
REMA	test mikroplótkowy z resazuryną (<i>ang. <u>r</u>esazurin <u>m</u>icroplate <u>a</u>ssay)</i>)
Rho	białko należące do rodziny małych białek G (<i>ang. Ras homologous</i>)
SAC	punkt kontrolny formowania wrzeciona kariokinetycznego (<i>ang. <u>s</u>pindle <u>a</u>ssembly <u>c</u>heckpoint)</i>)
SRB	sulforodamina B (<i>ang. <u>s</u>ulfor<u>h</u>odamine <u>B</u>)</i>)
SV40	małpi wirus 40 (<i>ang. <u>s</u>imian <u>v</u>irus <u>40</u>)</i>)
TAT	transaktywator transkrypcji (<i>ang. <u>t</u>rans-<u>a</u>ctivator of <u>t</u>ranscription)</i>)
TCA	kwas trichlorooctowy (<i>ang. <u>t</u>richloroacetic acid)</i>)
TCA I	cykl kwasów trikarboksylowych (<i>ang. <u>t</u>ricarboxylic acid cycle)</i>)
TEM	transmisyjny mikroskop elektronowy (<i>ang. <u>t</u>ransmission <u>e</u>lectron <u>m</u>icroscopy)</i>)

Tris	2-amino-2-(hydroksymetyl)propan 1,3-diol (<i>ang. 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol</i>)
Walker 256	Linia Walker 256 komórek raka piersi (<i>ang. Walker 256 mammary gland carcinoma cells, Walker 256 breast cancer cells</i>)
XTT	2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-5-[(fenylamino)karbonyl]-2H-tetrazol (<i>ang. 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyl-amino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide</i>)
δPKC	izoforma δ kinazy białkowej C (<i>ang. <u>p</u>rotein <u>k</u>inase <u>δ</u></i>)
ΔΨ_m	transbłonowy potencjał mitochondrialny (<i>ang. mitochondrial membrane potential</i>)
εPKC	izoforma ε kinazy białkowej C (<i>ang. <u>e</u>psilon <u>p</u>rotein <u>k</u>inase <u>ε</u></i>)

1. WSTĘP

1.1. Historia taksanów jako leków przeciwnowotworowych oraz metody ich otrzymywania

Taksany, zwane również taksoidami, należą do diterpenów, pochodzących z roślin z rodzaju *Taxus* (cis) i są szeroko stosowane w leczeniu różnego rodzaju chorób nowotworowych. Ich główne działanie cytotoksyczne polega na hamowaniu podziałów komórkowych poprzez stabilizację i ochronę polimeru mikrotubul przed depolimeryzacją. Mechanizm ten uniemożliwia uformowanie wrzeciona kariokinetycznego podczas podziału komórki i rozdzielenie chromatyd siostrzanych, blokując w ten sposób mitozę.

Obecnie, w leczeniu onkologicznym, stosowane są dwa taksany pierwszej generacji: paklitaksel (PTX), znany też jako Taxol® oraz docetaksel (DTX, znany też jako Taxotere®) (Wang i wsp., 2015). Pierwszy taksan (paklitaksel), został po raz pierwszy wyizolowany z kory cisu krótkolistnego (*Taxus brevifolia*) w 1966 w ramach badań organizowanych przez Narodowy Instytut Raka w USA (*National Cancer Institute – NCI*) (Wall i Wani, 1996). W drugiej połowie lat 50. XX wieku amerykański *NCI* zainicjował przesiewowy program, który miał na celu przetestowanie aktywności przeciwnowotworowej próbek pobranych od roślin. Losowo zebrane próbki dostarczano przez Departament Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (*U.S. Department of Agriculture – USDA*) do współpracujących ze sobą laboratoriów. Podczas trwania tego programu w latach 1960-1981 (strona internetowa 1), naukowcy zgromadzili i przetestowali ponad 30 000 próbek. Jedna z nich okazała się kluczowa dla przyszłej terapii nowotworów. W 1962 roku zespół botaników pod kierownictwem Arthura S. Barclay'a pobrał ok. 650 próbek kory, liści, owoców i gałązek z cisa krótkolistnego. Gatunek ten, zwany również cistem pacyficznym lub zachodnim, jest rzadkim i wolno rosnącym, zielonym drzewem zlokalizowanym w obszarach przybrzeżnych północno-zachodnich Stanów Zjednoczonych. Pobrany materiał trafił do zespołu badawczego w *Research Triangle Institute (RTI)* w Północnej Karolinie. Dr Monroe Wall i dr Mansukh Wani wykazali szczególne zainteresowanie ekstraktem pozyskanym z kory, który wykazywał cytotoksyczność wobec hodowli komórek linii 9KB pozyskanych z ludzkiego raka jamy nosowo-gardłowej (Wani i Horwitz, 2014). Opracowanie procedury wyizolowania czystej substancji aktywnej zajęło naukowcom ok. 2 lat. Sam proces był bardzo złożony i obejmował kilka etapów, m.in. ekstrakcję etanolem, rozdział pomiędzy

fazą wodną a mieszaniną chloroform:metanol (4:1) oraz rozdział przeciwprądowy metodą Craiga. Z 12 kg wysuszonej kory cisu krótkolistnego otrzymano 0,5 g substancji, która wykazywała przeciwnowotworową aktywność wobec mysich komórek białaczkowych trzech linii – L1210, P388 i P1534 oraz komórek linii Walker 256 szczurzego mięsakoraka. Związek ten nazwano Taksolem od nazwy rodzajowej cisu (*Taxus*) i obecności grup hydroksylowych (-ol) w strukturze związku (Wall i Wani, 1995; Oberlies i Kroll, 2004; Lee i wsp., 2012). Następnie przystąpiono do określenia struktury otrzymanej substancji za pomocą krystalografii rentgenowskiej. Próby otrzymania paklitakselu w postaci krystalicznej, która jest niezbędna do analizy rentgenowskiej, zakończyły się niepowodzeniem. W związku z tym taksol poddano transestryfikacji metanolem, katalizowanej przez zasadę. Otrzymano ester metylowy N-benzoilofeniloizoseryny, złożony rdzeń taksanu oraz octan metylu. Rdzeń taksanu przekształcono do 7,10-bis-jodoctanu. Otrzymane pochodne poddano analizie rentgenowskiej i w 1971 roku opublikowano strukturę paklitakselu (Oberlies i Kroll, 2004).

Początkowo paklitaksel nie został zakwalifikowany do dalszych badań przedklinicznych, głównie ze względu na to, że jego aktywność przeciwnowotworowa nie różniła się szczególnie od aktywności innych związków, wyselekcjonowanych w tym samym czasie, a uzyskane wyniki testów nie były powtarzalne. Na tę decyzję dodatkowo wpłynęła słaba rozpuszczalność związku oraz problemy z jego pozyskaniem. W latach 1974-1975 NCI przeprowadził dodatkowe badania *in vivo*, które wykazały wysoką aktywność przeciwnowotworową taksolu wobec komórek B16 mysiego czerniaka oraz komórek MX-1 ludzkiego nowotworu sutka przeszczepionych nagim myszom. Wyniki te zdecydowały o dopuszczeniu taksolu do dalszych etapów badań (Teicher, 1996).

Kolejny przełom w historii taksanów stanowiły badania nad mechanizmem działania taksolu wykonane przez Susan Band Horwitz z *Albert Einstein College of Medicine* (Nowy Jork, USA) w 1979 roku. Horwitz wykazała, że taksol zatrzymuje podział komórek w fazie G2/M cyklu podziałowego na skutek stabilizacji mikrotubul i hamowania procesu ich depolimeryzacji (Schiff i wsp., 1979; Davis, 2006; Yang i Horwitz, 2017). Mechanizm ten był zupełnie inny od mechanizmów działania innych znanych cytostatyków takich jak kolchicina czy alkaloidy *Vinca*, które wiążąc się z tubuliną hamują proces polimeryzacji

mikrotubul. W odpowiedzi na te nowe odkrycia NCI rozpoczął gromadzenie dużej ilości kory cisów, aby uzyskać wystarczającą ilość substancji do zainicjowania I fazy badań klinicznych. Badania te przeprowadzono w 1984 roku. Były one utrudnione ze względu na niewystarczające ilości taksolu, którego jedynym źródłem w tamtych czasach była kora powoli rosnącego zachodniego cisa krótkolistnego. Wysokie zapotrzebowanie na taksol spowodowało poważne zmniejszenie populacji cisu pacyficznego, ponieważ usunięcie kory uśmiercało drzewa. Ponadto ekstrakcja taksolu z cisu wymagała złożonego systemu i specyficznych technik oczyszczania, przy użyciu zaawansowanej i kosztownej technologii (Weaver, 2014). Otrzymanie 1 kg taksolu, który wystarczał dla ok 50 pacjentów, wymagało użycia 10 ton kory cisa. Produkcja ta wiązała się z wycięciem 3 000 drzew. Leczenie jednego pacjenta wymagało więc poświęcenia ośmiu 600-letnich cisów krótkolistnych. Na północnym zachodzie USA całkowitą liczbę drzew tego gatunku cisa oszacowano na ok. 1 milion (Malik i wsp., 2011; Żwawiak i Zaprutko, 2014). Ze względu na ryzyko wycięcia wszystkich cisów poproszono Departament Spraw Wewnętrznych USA (*US Department of the Interior*) o włączenie zachodniego cisa krótkolistnego na listę gatunków zagrożonych oraz powołano specjalny program (*Pacific Yew Act*), który miał na celu ochronę tego gatunku. Ograniczona dostępność taksolu, a także jego unikalna struktura i potencjał cytostatyczny, skłoniły badaczy do rozpoczęcia poszukiwań innych źródeł pozyskiwania tego związku oraz do opracowania jego syntezy chemicznej (Weaver, 2014).

II faza badań klinicznych rozpoczęła się w 1985 roku i wykazała znaczącą aktywność przeciwnowotworową paklitakselu wobec zaawansowanego i opornego na leczenie zaawansowanego raka jajnika z 30% odsetkiem odpowiedzi (McGuire i wsp., 1989). Paklitaksel wykazywał również wysoką aktywność wobec przerzutowego raka sutka (odsetek odpowiedzi wynosił 62%), a także wobec niedrobnokomórkowego raka płuc oraz nowotworów głowy i szyi (Holmes i wsp., 1991; Rowinsky i wsp., 1992; Murphy i wsp., 1993). W związku z wysokimi kosztami produkcji oraz problemami związanymi z pozyskaniem paklitakselu ze środowiska, w 1989 roku NCI zawarł umowę badawczo-rozwojową z koncernem farmaceutycznym *Bristol-Myers Squibb (BMS)* w celu komercjalizacji leku. W 1992 roku FDA (*US Food and Drug Administration*) zatwierdziła stosowanie paklitakselu w leczeniu raka jajnika, a dwa lata później w leczeniu przerzutowego raka piersi. Ze względu na złożoną strukturę cząsteczki paklitakselu jego

całkowitą syntezę udało się opracować dopiero w 1994 roku przez dwa niezależne zespoły kierowane przez Kariacosa Nicolaou oraz przez Roberta Holtona. Pomimo dokładnego opisanego w literaturze, syntezy tej nie udało się zastosować na skalę przemysłową ze względu na złożoność procesu i jego niewielką wydajność (Malik i wsp., 2011; Weaver, 2014).

Najbardziej skuteczną metodą, która ostatecznie rozwiązała kryzys w pozyskiwaniu PTX, okazała się półsyntetyczna synteza z 10-deacetylobakatyiny III (10-DAB). Prekursor ten jest łatwo dostępny i można go pozyskać ze źródeł odnawialnych jakimi są igły różnych odmian cisów, również tych z szybszymi wskaźnikami wzrostu (np. cis pospolity – *Taxus baccata*) (Kingston, 2007). Ponadto wydajność tego procesu jest znacznie większa. Z 10-DAB pozyskanej z 1 kg świeżych igieł cisu europejskiego można uzyskać 0,5–1 g taksolu, podczas gdy z 1 kg suszonej kory cisu krótkolistnego można otrzymać tylko 100–150 mg taksolu. Synteza leku z prekursora rozwiązała nie tylko problem pozyskiwania paklitakselu, ale również zapewniła ochronę drastycznie zmniejszonej populacji pacyficznego cisu krótkolistnego. Szacuje się, że do opracowania taksolu użyto 1800 ton suchej kory tego gatunku cisów, co odpowiada 400 tys. drzew (Hartzell, 1995; Goodman i Walsh, 2001).

Intensywny rozwój i doskonalenie metod półsyntezy przez francuskiego naukowca Pierre'a Potiera z Instytutu Chemii Substancji Naturalnych (*Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, Francja*) doprowadziło pod koniec lat 80. XX wieku do odkrycia docetakselu. Docetaksel jest analogiem paklitakselu, ale jego aktywność przeciwnowotworowa jest zdecydowanie większa. Posiada podobną strukturę chemiczną i wykazuje szeroką aktywność *in vitro* i *in vivo* wobec różnego rodzaju nowotworów (Fumoleau i wsp., 1997; Zhang i wsp., 2019). Ze względu na łatwość pozyskania prekursora docetakselu z igieł szeroko występującego cisu pospolitego i wystarczającą podaż materiału, nastąpił szybki progres w badaniach laboratoryjnych i klinicznych nad lekiem, które doprowadziły do uzyskania zgody FDA w 1996 roku na jego zastosowanie w leczeniu raka piersi, po niepowodzeniu uprzednio stosowanej chemioterapii antracyklinowej (Dagher i wsp., 2004).

Innym sposobem wytwarzania taksolu jest produkcja leku lub jego prekursorów przez niektóre gatunki bakterii i grzybów endofitycznych. W 1994 roku metoda ta została opatentowana przez *Cytoclonal Pharmaceuticals Inc. (Dallas, USA)*, ale wydajność procesu była bardzo niska (Exposito i wsp., 2008; Kusari i wsp., 2014). Obecnie paklitaksel

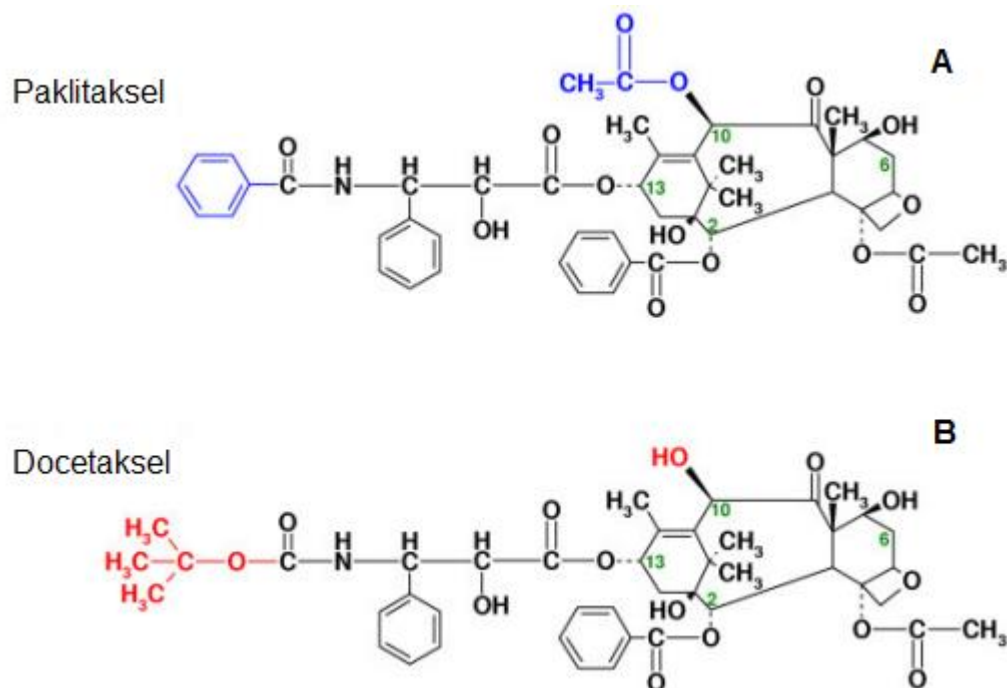
i docetaksel wytwarzane są głównie na drodze półsyntetycznej z prekursora 10-DAB, pozyskanego z cisów lub z hodowli komórek roślinnych. *Bristol-Myers Squibb*, wiodący dostawca taksolu, posiada plantację z 30 miliardami cisów, z których pozyskuje korę i igły niezbędne do ekstrakcji półproduktów (Ji i wsp., 2006).

Alternatywnym i przyjaznym dla środowiska źródłem taksanów są hodowle kultur komórek roślinnych. Metoda ta nie jest narażona na warunki pogodowe, pory roku czy zanieczyszczenia środowiska, a materiał może być uprawiany niezależnie od pierwotnej, potencjalnie odległej lokalizacji. *Python Biotech Inc.* z Nowego Yorku, współpracujący z *BMS* jest największym producentem paklitakselu pozyskanego z hodowli tkanek roślinnych (Cusido i wsp., 2014). Produkcja oparta jest na technologii *Plant Cell Fermentation (PCF)* przy użyciu specyficznej linii komórek *Taxus* hodowanych w dużych zbiornikach fermentacyjnych wraz z endofitycznymi grzybami *Penicillium raistrickii*. Paklitaksel, ekstrahowany bezpośrednio z komórek, jest oczyszczany metodami chromatografii kolumnowej i izolowany w wyniku krystalizacji. W celu zwiększenia produktywności w hodowlach komórek roślinnych stosowane są różne strategie, takie jak wybór wysoko produktywnych linii komórkowych, optymalizacja warunków hodowli, dodanie czynników pobudzających (np. jasmonian metylu) lub prekursorów. Technologia PCF w porównaniu z innymi metodami jest również bardziej energooszczędna i ekologiczna, ponieważ nie wymaga stosowania niebezpiecznych substancji chemicznych (Malik i wsp., 2011; Gond i wsp., 2014; Stierle i Stierle, 2015). Oprócz produkcji paklitakselu za pomocą PCF możliwe jest również otrzymanie innych taksanów jako produktów ubocznych. Duże ilości wyprodukowanej 10-DAB i bakatyny III są wykorzystywane także jako półsyntetyczne prekursory do produkcji docetakselu (Dubois, 2006).

1.2. Budowa chemiczna taksanów

Taksany należą do trójpierścieniowych pseudoalkaloidów diterpenowych, których rdzeń stanowi rozbudowany pierścień taksanowy. Trójcykliczny pierścień taksanowy zawiera dwa pierścienie 6-członowe i jeden 8-członowy oraz pierścień oksetanowy, przyłączony w pozycji C-4 i C-5 (Zejc i wsp., 2009; Surapaneni i wsp., 2012) (Rycina 1.1). W pozycji C-13 pierścienia taksanowego dołączony jest rozbudowany łańcuch boczny, który ma istotne znaczenie w aktywności przeciwnowotworowej taksanów.

Paklitaksel i docetaksel w swojej strukturze chemicznej różnią się w dwóch miejscach. W łańcuchu bocznym paklitakselu znajduje się grupa fenylova, podczas gdy docetaksel w tym samym miejscu posiada ugrupowanie tert-butylova. Druga różnica występuje w pozycji C-10. Paklitaksel w tym miejscu posiada grupę acetylową, a docetaksel grupę hydroksylową.



Rycina 1.1. Struktura chemiczna paklitakselu i docetakselu. Różnice w budowie pomiędzy taksanami zaznaczono na zielono (A) i czerwono (B) (Andersen i wsp., 2006).

Strukturalne modyfikacje docetakselu zwiększyły zarówno jego rozpuszczalność w wodzie (ze względu na brak grupy acetylowej w pozycji C-10), jak i powinowactwo do tubuliny (z powodu obecności ugrupowania tert-butylova na łańcuchu bocznym) (Clarke i Rivory, 1999; Miller i Ojima, 2001; Zhang i wsp., 2019).

1.3. Zastosowanie kliniczne taksanów

Obecnie paklitaksel stosowany jest w leczeniu raka jajnika, piersi, pęcherza moczowego, płuc, czerniaka, prostaty, krtani oraz niedrobnokomórkowego raka płuc. W 2001 roku Narodowy Instytut Zdrowia i Doskonałości Klinicznej Wielkiej Brytanii (*The National Institute for Health and Clinical Excellence, NICE*) zalecił stosowanie paklitakselu w leczeniu zaawansowanego raka piersi opornego na terapię antracyklinową (Missailidis,

2008). Wcześniej, w roku 1996, FDA zatwierdziła stosowanie tego leku w leczeniu raka piersi, po niepowodzeniu uprzednio stosowanej chemioterapii antracyklinowej (Rozdział 1.1.).

1.3.1. Farmakokinetyka paklitakselu i docetakselu

Taksany ze względu na hydrofobową strukturę charakteryzują się bardzo niską rozpuszczalnością w wodzie (np. rozpuszczalność PTX w wodzie wynosi poniżej 0,7 µg/ml). 1 ml złożonego koncentratu Taxolu, opracowanego przez firmę BMS, zawiera 6 mg/ml leku oraz mieszaninę składającą się z bezwodnego alkoholu etylowego i polioksyetylenowanego oleju rącznikowego – Cremophor EL w stosunku 50:50. W chemioterapii paklitaksel stosowany jest w dawkach od 135 do 175 mg/m² powierzchni ciała (p.c.) w postaci 3- lub 24-godzinnej infuzji dożylniej, powtarzanej co 3 tygodnie. Preparat jest najczęściej rozcieńczany do roztworu izosmotycznego 5% dekstrozą (Park i wsp., 2009). Po podaniu dożylnym, paklitaksel w ponad 90% wiąże się z białkami osocza. Lek metabolizowany jest w wątrobie przez izoenzymy CYP3A4i CYP2C8 cytochromu P450, a następnie wydalany jest z żółcią. Wydalanie leku z moczem jest niewielkie i wynosi ok 10% (Rowinsky i Donehower, 1995; Wang Y i wsp., 2014). Preparat paklitakselu nie powinien być przechowywany w opakowaniach wykonanych z plastyfikowanego polichlorku winylu (PCV), ponieważ Cremophor EL wymywa z niego szkodliwe dla organizmu ftalany (DEHP), które są toksyczne dla komórek wątroby (Kim i wsp., 2005; Zhang i wsp., 2015). Aby zminimalizować narażenie pacjentów na mutagenne ftalany rozcieńczone roztwory paklitakselu należy przechowywać w szklanych lub polipropylenowych butelkach oraz w workach wykonanych z polipropylenu lub poliolefiny (Park i wsp., 2009).

Docetaksel stosowany jest w leczeniu raka piersi, prostaty i niedrobnokomórkowego raka płuc. W 2006 roku NICE zatwierdził stosowanie docetakselu w leczeniu raka prostaty opornego na leczenie hormonalne oraz w połączeniu z doksorubicyną i cyklofosfamidem w leczeniu kobiet z początkowym stadium nowotworem piersi z występującymi ogniskami w węzłach chłonnych. Docetaksel został zatwierdzony w USA przez FDA w leczeniu zaawansowanego raka żołądka oraz nieoperacyjnego, zaawansowanego raka głowy i szyi (Missailidis, 2008).

Docetaksel w porównaniu z paklitakselem jest bardziej hydrofilowy, ale również wykazuje bardzo ograniczoną rozpuszczalność w wodzie. Z tego powodu Taxotere®,

pierwszy preparat docetakselu wprowadzony przez firmę *Sanofi (Paryż, Francja)*, zawiera emulgator polisorbat 80 oraz bezwodny etanol w stosunku 50:50. Maksymalna stosowana dawka leku wynosi 100 mg/m^2 p.c. i podawana jest co 3 tygodnie w ciągu 1-godzinnego wlewu dożylnego (Baker i wsp., 2009).

1.3.2. Efekty uboczne chemioterapii z zastosowaniem taksanów

Najczęściej obserwowanym działaniem niepożądanym taksanów jest neutropenia, siniaczenie lub krwawienie, niedokrwistość, nudności, wymioty, biegunka, utrata włosów, ból w jamie ustnej, wrzody, drętwienie dłoni lub stóp oraz ból mięśni. Ponadto w czasie leczenia paklitakselem specyficzne działania niepożądane obejmują spadek ciśnienia krwi, zmiany częstości skurczów serca, ból brzucha. Działania niepożądane związane ze stosowaniem docetakselu powodują głównie zmiany w kolorze paznokci i zatrzymanie płynów, przejawiające się obrzękami obwodowymi (Brown i wsp., 2008).

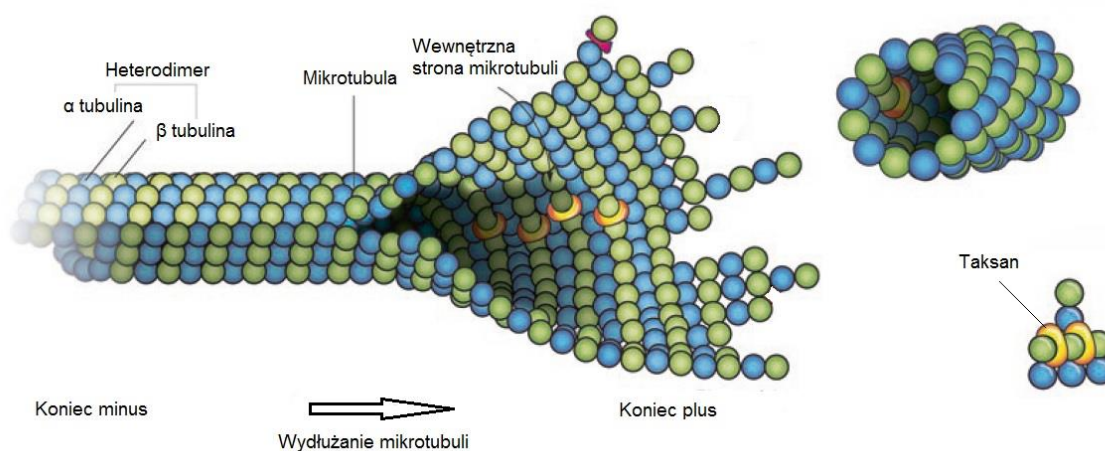
Zastosowanie solubilizatorów taksanów (Cremophor EL i Polisorbat 80) znacząco zwiększa występowanie działań nieporządných, powodując poważne reakcje nadwrażliwości u pacjentów, często w ciągu pierwszych kilku minut po rozpoczęciu podawania leków. W związku z tym pacjenci poddawani chemioterapii taksanami wymagają premedykacji lekami przeciwhistaminowymi (antagoniści receptorów H_1 i H_2) lub glikokortykosteroidami np. deksametazon. Zastosowanie polisorbatu 80 indukuje zatrzymywanie płynów i wymaga dodatkowego leczenia lekami moczopędnymi (Ten Tije i wsp., 2003; Weiszhar i wsp., 2012; Maggio, 2017).

1.4. Molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej taksanów

Taksany uważane są za jedne z najbardziej aktywnych leków chemioterapeutycznych o szerokim spektrum działania przeciwnowotworowego. Ich główna aktywność cytostatyczna związana jest z oddziaływaniem na podjednostkę beta tubuliny, co powoduje zaburzenie funkcji mikrotubul. Mikrotubule są cylindrycznymi strukturami zbudowanymi z tubuliny. Częsteczka tubuliny występuje jako heterodimer złożony z dwóch białek – tubuliny α i tubuliny β , z których każda ma masę cząsteczkową ok. 50 kDa (Kawiak i Zabel, 2014). Mikrotubule są bardzo ważnym składnikiem komórek eukariotycznych i są niezbędne do wykonywania wielu funkcji komórkowych. Uczestniczą

w utrzymaniu kształtu komórki, transporcie wewnątrzkomórkowym oraz przekaźnictwie nerwowym. Są również jednym ze składników wrzeciona kariokinetycznego, struktury niezbędnej w podziale komórkowym. Mikrotubule są niezwykle dynamicznymi polimerami białkowymi, które ulegają ciągłym procesom modyfikacji (wydłużaniu i skracaniu). Jeden koniec mikrotubuli, na którym występuje tubulina β , nazywany jest końcem plus i charakteryzuje się szybszym wzrostem niż koniec przeciwległy, tzw. koniec minus, zawierający tubulinę α (Kelling i wsp., 2003; Alberts, 2007). Taksany uzyskują dostęp do swoich specyficznych miejsc wiązania, znajdujących się na wewnętrznej powierzchni mikrotubuli, poprzez dyfuzję przez pory obecne pomiędzy protofilamentami mikrotubul. Paklitaksel wiąże się na końcu N aminokwasu znajdującego się w pozycji 31 podjednostki β -tubuliny (Rycina 1.2). Przyłączenie taksanu stabilizuje strukturę tubulin w stanie polimeryzacji, uniemożliwiając im tym samym depolimeryzację. Dynamiczna niestabilność mikrotubul związana jest z ich zdolnością do hydrolizowania GTP. Taksany po przyłączeniu się do β -tubuliny, podtrzymują proces polimeryzacji mikrotubul (wydłużania) i ich rozpad nawet w obecności GTP. Paklitaksel powoduje także zmiany w strukturze mikrotubul. Mikrotubule powstające w jego obecności składają się z 12 zamiast z 13 protofilamentów, co ma miejsce w prawidłowych mikrotubulach. Zmiany te stwierdzono tylko dla paklitakselu. Średnia ilość protofilamentów w komórkach traktowanych docetakselem natomiast nie różni się od tej w prawidłowych mikrotubulach i wynosi 13 (Matesanz i wsp., 2011; Gornstein i Schwarz, 2014). Zablokowanie depolimeryzacji mikrotubul stabilizuje wrzeciono kariokinetyczne, co uniemożliwia prawidłowe rozdzielenie chromatyd siostrzanych oraz prawidłowy podział chromosomów podczas mitozy (Tabaczar i wsp., 2010). Prowadzi to do uaktywnienia punktu kontrolnego, odpowiedzialnego za poprawne formowanie wrzeciona kariokinetycznego (SAC), wydłużenia bloku mitotycznego na granicy metafazy i anafazy, a w konsekwencji do zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G₂/M i skierowania komórki na drogę apoptozy (Mohr i wsp., 2017). Obecnie trwa dyskusja czy zatrzymanie mitotyczne jest główną przyczyną śmierci komórek traktowanych taksanami. Ostatnie badania laboratoryjne i kliniczne dotyczące raka sutka sugerują, że paklitaksel generuje powstawanie wielu wrzecion kariokinetycznych, co prowadzi do niewłaściwej segregacji chromosomów (często w trzech, czterech lub pięciu różnych

kierunkach). W wyniku tego procesu powstają komórki aneuploidalne, które ulegają apoptozie w interfazie kolejnego cyklu komórkowego (Zasadil i wsp., 2014).



Rycina 1.2. Schemat przedstawiający strukturę mikrotubuli oraz miejsce wiązania taksanów z podjednostką β-tubuliny (Olziński i Labidi-Galy, 2017)

Blokowanie wewnątrzkomórkowego transportu zależnego od mikrotubul jest kolejnym mechanizmem, za pomocą którego taksany mogą indukować śmierć komórek. Jako przykład naukowcy wskazują na transport receptora androgenowego w raku prostaty opornym na kastrację. Progresja raka prostaty związana jest z aktywacją receptora androgenowego przez androgeny, która powoduje jego translokację do jądra komórkowego i aktywację określonych genów (Wysocki, 2013). Aktywny receptor łączy się z mikrotubulą i za pośrednictwem białka motorycznego – dyneiny - przemieszcza się do jądra komórkowego. Zapobieganie aktywacji receptora androgenowego za pomocą analogów lub chirurgicznej kastracji jest jedną z najczęstszych terapii raka prostaty. Niestety, pomimo wysokiej skuteczności tych metod, u pacjentów po 12–24 miesiącach dochodzi do wtórnej oporności na hormonoterapię. Obecnie docetaksel jest jednym z najskuteczniejszych chemioterapeutyków stosowanych w przypadku raka prostaty opornego na kastrację. Ostatnie badania wskazują, że w przypadku wolno dzielących się komórek raka gruczołu krokowego decydujący cytotoksyczny mechanizm aktywności taksanów nie jest związany z zatrzymaniem mitozy, ale z hamowaniem aktywności receptora androgenowego. Naukowcy sugerują, że taksany poprzez stabilizowanie mikrotubul, zapobiegają przedostawaniu się receptora androgenowego do jądra komórkowego, a tym samym

uniemożliwiają aktywację docelowych genów, np. genu swoistego antygenu sterczowego PSA (*ang. prostate-specific antigen*). Hipoteza związana z zaburzeniem wewnątrzkomórkowego transportu receptora androgenowego wymaga więcej badań, aby udowodnić jego bezpośredni związek ze śmiercią komórek wywołaną przez taksany (Darshan i wsp., 2011; Thadani-Mulero i wsp., 2012; Mistry i Oh, 2013).

Dodatkowym mechanizmem przyczyniającym się do aktywności przeciwnowotworowej taksanów jest ich działanie antyangiogenne. W latach 90. XX wieku naukowcy szerzej zainteresowali się tym tematem. Wykazano, że w warunkach *in vitro* komórki śródbłonna są dużo bardziej wrażliwe na paklitaksel niż komórki nowotworowe. Lek hamuje proliferację, migrację i różnicowanie się ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej. W modelu wykorzystującym myszy z przerzutowym rakiem sutka wykazano, że mała dawka paklitakselu wykazuje silniejszą aktywność przeciwnowotworową z mniejszymi efektami ubocznymi i silniejszą antyangiogenną aktywność niż maksymalnie tolerowana dawka. Sugeruje się również, że jednym z możliwych mechanizmów nadwrażliwości ludzkich komórek śródbłonna na taksany jest ich zdolność do ponad 5-krotnie większej akumulacji leku w porównaniu z liniami ludzkich komórek nowotworowych (Merchan i wsp., 2005; Bocci i wsp., 2013)

1.4.1. Różnice w aktywności przeciwnowotworowej docetakselu i paklitakselu

Pomimo podobnego mechanizmu działania odnotowano różnice w farmakokinytyce, profilu farmakodynamicznym i oddziaływaniach molekularnych między paklitakselem i docetakselem (Gligorov i Lotz, 2004). Oba leki wiążą się z podjednostką β -tubuliny, ale w różnych miejscach. Paklitaksel wieże się na końcu N aminokwasu znajdującego się w pozycji 31, podczas gdy docetaksel wiąże się z miejscem specyficznym dla białka *tau* (Jordan i Wilson, 2004).

Docetaksel wykazuje większe powinowactwo do β -tubuliny niż paklitaksel. Dzięki temu silniej hamuje depolimeryzację mikrotubul i dodatkowo oddziałuje na komórki podczas trzech faz cyklu komórkowego (S/G2/M). Docetaksel działa głównie w fazie S cyklu podziałowego, ukierunkowując organizację centrosomu, podczas gdy paklitaksel zaburza formowanie wrzeciona kariokinetycznego jedynie w fazach G2 i M. W fazie S natomiast często obserwowana jest oporność na PTX (Gligorov i Lotz, 2004; Huang i wsp., 2017).

W porównaniu z paklitakselem, docetaksel silniej indukuje fosforylację genu *Bcl-2* oraz czterokrotny wzrost właściwości antyangiogennych. Inne różnice między taksanami to większy wychwyty komórkowy docetakselu przez komórki nowotworowe oraz jego wolniejsze działanie, co powoduje dłuższą retencję leku w porównaniu z paklitakselem (Herbst i Khuri, 2003).

1.5. Peptydy penetrujące błony komórkowe

Błona komórkowa komórek eukariotycznych stanowi barierę ograniczającą nieregulowany napływ do wnętrza komórki wielu cząsteczek egzogennych. Pomimo pozytywnej funkcji ochronnej, stanowi ona również przeszkodę w wewnątrzkomórkowym dostarczaniu związków stosowanych w diagnostyce i leczeniu chorób u ludzi. Cząsteczki o małych rozmiarach przenikają do komórek przez określone receptory i kanały znajdujące się w błonie. Natomiast makrocząsteczki nie są w stanie wniknąć do wnętrza komórek wykorzystując tę drogę. W związku z tym ważne jest opracowanie narzędzi ułatwiających pobieranie dużych cząsteczek przez komórki i późniejsze zastosowanie ich w medycynie (Walrant i wsp., 2017).

Odkrycie krótkich sekwencji peptydowych, które skutecznie przemieszczają się przez błonę plazmatyczną, stanowi przełom w badaniach nad usprawnieniem transportu substancji do wnętrza komórek. Peptydy te określane są jako peptydy penetrujące komórkę (*ang. cell-penetrating peptides – CPP*) lub peptydy białkowej domeny transdukcji (*ang. protein transduction domain – PTD*) (Bechara i Sagan, 2013).

Peptydy penetrujące błony komórkowe to krótkie polipeptydy o charakterze kationowym lub amfipatycznym, składające się najczęściej z 3-40 reszt aminokwasów i wykazujące silne zdolności przenikania przez błony biologiczne (Kumar i wsp., 2018). CPP zbudowane są najczęściej z podstawowych aminokwasów takich jak arginina i lizyna. Peptydy po połączeniu z makrocząsteczkami (oligopeptydy, polinukleotydy, białka, leki) mogą ułatwiać ich transport do komórki.

Po raz pierwszy koncepcja białek przechodzących przez błonę komórkową została opisana przez dwie niezależne grupy badawcze w 1988 roku. Oba zespoły wykazały zdolność penetracji błony komórkowej przez białko TAT (*ang. Trans-Activator of*

Transcription – TAT), które pełni rolę czynnika transkrypcyjnego ludzkiego wirusa niedoboru odporności 1 (*ang. HIV-1*) (Frankel i Pabo, 1988; Green i Loewenstein, 1988). Kilka lat później Derossi i wsp. (1994) wykazali, że polipeptyd o długości 16 aminokwasów, nazwany penetratyną i pozyskany z homeodomeny Antennapedia występującej u muszki owocowej, skutecznie wnika do komórek, a następnie kieruje się do jądra komórkowego (Derossi i wsp., 1994; Watson i wsp., 2017). Odkrycie zdolności penetrujących tych peptydów skłoniło naukowców do zbadania mechanizmów ich działania i określenia minimalnych sekwencji, które mogą przeniknąć do komórki. W 1997 r. Vivès i wsp. wykazali, że minimalna sekwencja TAT, która wnika do komórek, składa się z 13 reszt aminokwasów. Dalsze badania dowiodły, że główny motyw sekwencji można zmniejszyć do 9 aminokwasów (Park i wsp., 2009). Peptyd TAT zawiera dwie lizyny i sześć arginin, dzięki czemu posiada silne właściwości kationowe i może przemieszczać się w dużych ilościach przez błonę komórkową żywych komórek w ciągu 3-5 minut. Badania dowiodły, że szybkość transportu i wychwytywanie komórkowe zależy głównie od ilości argininy. Peptyd TAT jest w stanie dostarczyć do komórki białka o masie przekraczającej 100 kDA, 40 nm nanocząstki, a nawet 200 nm liposomy (Ciobanasu i wsp., 2010). Przystąpiono również do poszukiwania innych peptydów o podobnych właściwościach, które pozyskiwano z różnych źródeł. Liczne badania wykazały, że CPP są nieimmunogennymi i stabilnymi w warunkach fizjologicznych cząsteczkami, które zazwyczaj nie wykazują właściwości cytotoksycznych.

W związku z możliwością transportu różnego rodzaju ładunków do wnętrza komórek za pośrednictwem peptydów, stosowane one są w licznych badaniach przedklinicznych w leczeniu wielu chorób, takich jak infekcje, stany zapalne, choroby neurodegeneracyjne i nowotwory (Borrelli i wsp., 2018). Pierwsza baza danych, która zawiera informacje dotyczące peptydów penetrujących błonę, powstała w 2012 roku. Obecnie publiczna baza danych CPPsite 2.0 została zaktualizowana w 2016 roku i dostarcza informacje dotyczące około 1850 zweryfikowanych eksperymentalnie CPP. W większości peptydy penetrujące posiadają strukturę liniową (94,5%), składają się z L-aminokwasów (84,3%) i są wytwarzane na drodze syntezy chemicznej (54,8%). Najczęściej CPP stosowane są do transportu barwników fluorescencyjnych (58,4%). Inne transportowane substancje o znaczenie biomedycznym to kwasy nukleinowe (16%), białka (9%) i nanocząstki (7,8%) (Agrawal i wsp., 2016).

1.5.1. Klasyfikacja peptydów penetrujących

W zależności od pochodzenia peptydów klasyfikuje się je w trzech głównych grupach:

- peptydy pochodzące z białek występujących naturalnie np. TAT, penetratyna, X-pep (zlokalizowany na N-terminalnym końcu białka X wirusa zapalenia wątroby typu B) lub VP22 (uzyskany z białka kapsydu wirusa opryszczki typu 1 – HSV-1);
- peptydy chimeryczne
- peptydy syntetyczne

Peptydy chimeryczne składają się z dwóch lub kilku motywów uzyskanych z różnych białek. Przykładem tego rodzaju peptydu jest transportan, składający się z neuropeptydu galaniny i peptydu uzyskanego z jadu osy – mastoparanu. Syntetyczne peptydy są sztucznie zaprojektowanymi sekwencjami np. R8 (oktarginina, peptyd polikationowy), modelowy peptyd amfipatyczny (MAP) i TP2 (Tanaka i wsp., 2012; Adachi i wsp., 2017; Van Nguyen i wsp., 2018).

CPP można również podzielić na dwie grupy w oparciu o mechanizm penetracji błon biologicznych:

- wymagające udziału energii (różnego rodzaju endocytozy)
- niezależne od energii (bezpośredni transport przez błonę komórkową)

Inny sposób klasyfikacji związany jest z właściwościami fizykochemicznymi CPP. W tym podziale wyróżnia się trzy grupy:

- kationowe CPP, które są krótkimi sekwencjami reszt peptydowych składających się głównie z argininy, lizyny lub histydyny. Większość kationowych peptydów to naturalnie występujące sekwencje peptydowe (np. TAT)
- amfipatyczne CPP, które posiadają lipofilową (niepolarną) i hydrofilową (polarną) domenę. Przykładem jest chimeryczny peptyd MPG, który powstał w wyniku połączenia sekwencji lokalizacji jądrowej dużego antygeny T wirusa SV40 i glikoproteiny 41 wirusa HIV, która stanowi domenę hydrofobową.

- hydrofobowe CPP pochodzące z sekwencji peptydów sygnałowych, zbudowane są wyłącznie z reszt niepolarnych. Jest to najmniej liczna grupa. Peptydy należące do tej klasy to m.in. fragment sekwencji domeny sygnałowej czynnika wzrostu fibroblastów oraz gH625 pochodzący z wirusa opryszczki typu 1. W porównaniu do pozostałych grup, potencjalne zastosowanie peptydów hydrofobowych i mechanizm ich transportu jest najmniej zbadany (Guo i wsp., 2016; Pescina i wsp., 2018)

1.5.2. Mechanizmy przenikania peptydów penetrujących przez błony komórkowe

Dokładny mechanizm wnikania peptydów penetrujących do komórek nie został jeszcze w pełni poznany. Uważa się, że na wychwyty komórkowy duży wpływ mają właściwości fizykochemiczne peptydu, takie jak ładunek elektryczny, długość i miejscowe stężenie peptydu. Ponadto CPP mogą wiązać się z lipidami i białkami powierzchniowymi błony za pomocą oddziaływań elektrostatycznych (Jobin i Alves, 2014).

Trudności w zrozumieniu mechanizmów penetracji błon komórkowych, nawet przez pojedynczy peptyd, wynikają głównie z faktu, że ich właściwości biologiczne determinowane są przez wiele zmiennych czynników. Czynniki te obejmują miejscowe stężenie peptydu, jego strukturę drugorzędową, cukry powierzchniowe komórek, skład lipidowy błony komórkowej, stosunek ilości peptydów do lipidów, odpowiedź komórki na peptyd, a przede wszystkim rodzaj i wielkość transportowanej substancji. Badania nad określeniem mechanizmów penetracji przez CPP prowadzone są głównie przy użyciu barwników fluorescencyjnych (Kauffman i wsp., 2015).

Pierwsze wyniki badań sugerowały, że CPP mogą przechodzić przez błonę komórkową na drodze bezpośredniego transportu, uwarunkowanego korzystnymi oddziaływaniami elektrostatycznymi i występującymi wiązaniami wodorowymi. Obecnie sugeruje się, że ten rodzaj transportu zachodzi jedynie gdy peptyd posiada właściwości, które są kompatybilne z dwuwarstwą lipidową lub kiedy peptyd zakłóca strukturalną integralność błony (Richard i wsp., 2003; Ter-Avetisyan i wsp., 2009).

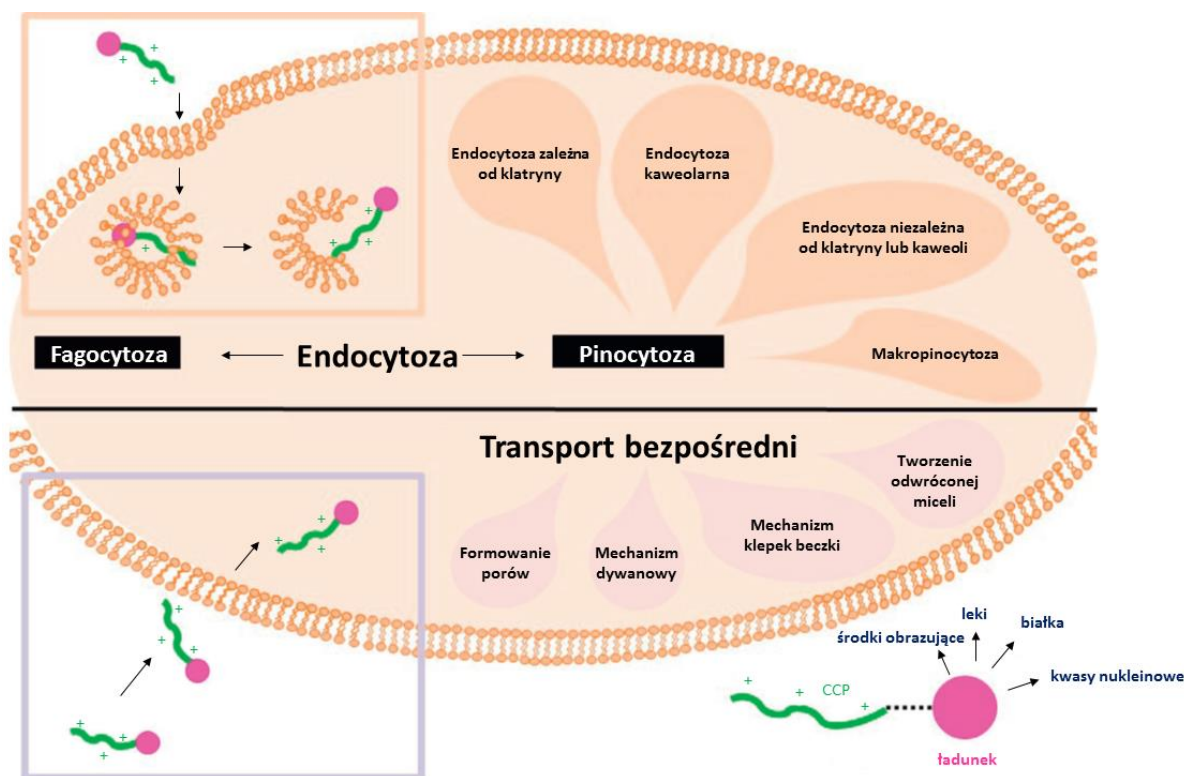
Pierwszy kontakt z błoną związany jest z gęstością ładunku elektrycznego i zależy od oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych. Ta zależność jest szczególnie dominująca dla kationowych CPP, które łączą się z anionowymi fragmentami błony komórkowej

glikozoaminoglikanami (heparyna, siarczan heparanu, siarczan chondroityny) i proteoglikanami, znajdującymi się w dużych ilościach na powierzchni komórki (Gestin i wsp., 2017). Po związaniu peptydu z glikozoaminoglikanem następuje aktywacja małych GTP-az Rho (RhoA i Rac 1), która prowadzi do polimeryzacji aktyny zwiększającej płynność błony oraz powstawanie lamellipodiów (Borrelli i wsp., 2018).

Jak pokazano na Rycinie 1.3, pojedynczy CPP wykorzystuje różne mechanizmy penetracji błon biologicznych. Ten sam peptyd może wykorzystywać więcej niż jeden rodzaj transportu (Nakase i wsp., 2008; Räägel i wsp., 2009). Mechanizm internalizacji CPP zmienia się w zależności od właściwości każdego peptydu, transportowanej cząsteczki, stężenia i rodzaju komórki docelowej (Koren i Torchilin, 2012). Wyróżnia się dwa główne mechanizmy penetracji CPP przez błony komórkowe: niezależny od energii transport bezpośredni oraz różnego rodzaju endocytozy (zależne od energii) (Rádis-Baptista i wsp., 2017).

W transporcie bezpośrednim CPP wiążą się z błoną komórkową poprzez oddziaływania elektrostatyczne lub hydrofobowe i indukują krótką lub przedłużoną destabilizację błony komórkowej, która ułatwia penetrację peptydu do wnętrza komórki (Guo i wsp., 2016). Następnie dany peptyd może wykorzystywać różne rodzaje penetracji na zasadzie transportu bezpośredniego: mechanizm odwróconej miceli, formowanie porów (mechanizm klepek beczki lub pierścieniowy), mechanizm dywanowy. Ostatnie badania wskazują, że transport bezpośredni odgrywa mniej ważną rolę, szczególnie w przypadku transportu substancji o dużych rozmiarach. Powszechnie uważa się, że dominującym mechanizmem penetracji są różnego rodzaju ścieżki endocytarne (Wang i wsp., 2014). Endocytoza dzieli się na dwie główne grupy: fagocytozę i pinocytozę. Fagocytozę obserwuje się najczęściej w wyspecjalizowanych komórkach, które są odpowiedzialne za usuwanie patogenów i resztek komórkowych (makrofagi, monocyty, neutrofile). Pinocytoza obejmuje makropinocytozę, endocytozę zależną od klatryny, endocytozę kaweolarną lub endocytozę niezależną od klatryny lub kaweoli. Transport dużych ładunków skoniugowanych z CPP ($> 1 \mu\text{m}$) odbywa się głównie na drodze makropinocytozy, która odpowiada za fałdowanie zewnętrznej powierzchni błony komórkowej w celu utworzenia wokół koniugatów pęcherzyków transportujących zwanych

makropinosomami. Następnie makropinosomy przemieszczają się w cytoplazmie i łączą się z endosomami i lizosomami. Endocytoza związana z udziałem receptorów obejmuje mechanizmy wychwyty zależne od kaweoli lub klatryny. Po związaniu CPP z receptorem błonowym kaweolina i klatryna są odpowiedzialne za tworzenie pęcherzyków, które później transportowane są poprzez cytoplazmę do miejsc docelowych (Layek i wsp., 2015).



Rycina 1.3. Mechanizmy przenikania peptydów penetrujących komórki przez błonę komórkową (na podstawie (Rizzuti i wsp., 2015)).

1.5.3. Zastosowanie peptydów penetrujących w badaniach klinicznych

W związku z możliwością bezpiecznego dostarczania różnych substancji przez peptydy penetrujące do komórek wykorzystuje się je m.in. jako środki obrazujące oraz nośniki dostarczające leki, nukleotydy, białka lub siRNA (Rizzuti i wsp., 2015). Duża liczba badań przedklinicznych wskazuje na skuteczną rolę CPP w dostarczaniu różnego rodzaju związków stosowanych w leczeniu wielu chorób, takich jak: infekcje wirusowe i bakteryjne, kardiologia, dystrofia mięśniowa i nowotwory (Munyendo i wsp., 2012; Copolovici i wsp., 2014; Ruczynski i wsp., 2014).

Potencjalna rola CPP jako nośników leków przeciwnowotworowych jest tematem szczególnego zainteresowania. Zastosowanie CPP może poprawić strategię terapii, poprzez zwiększenie zdolności rozpoznawania komórek nowotworowych, zapobieganie oporności wielolekowej oraz wzrost odpowiedzi terapeutycznej na transportowany związek. Peptydy penetrujące mogą zostać wykorzystane do transportu leków przeciwnowotworowych o niskiej masie cząsteczkowej, w tym doksorubicyny, paklitakselu, metotreksatu i cisplatyny (Stewart i wsp., 2008; Farkhani i wsp., 2014; Szabó i wsp., 2016; Hou i wsp., 2017). Pomimo uzyskania pozytywnych wyników w badaniach *in vitro*, tylko kilka badań potwierdziło skuteczność leczenia w modelach zwierzęcych. Dodatkowo żaden koniugat CPP nie został zatwierdzony przez FDA i nie został wprowadzony na rynek. Pierwsze badanie kliniczne z zastosowaniem CPP przeprowadzono w miejscowym leczeniu łuszczycy przy użyciu oligoargininy transportującej cyklosporynę do komórek ludzkiego naskórka (nazwa handlowa PsorBan®, *CellGate Inc., USA*). Badanie zostało przerwane w 2003 roku w II fazie badań klinicznych ale zaobserwowano, że koniugat zwiększał transport cyklosporyny do komórek naskórka i skóry właściwej u ludzi (Vivès i wsp., 2008; Koren i Torchilin, 2012).

Firma *Revance Therapeutics (USA)* opracowała związek o nazwie RT001, który umożliwia miejscowe stosowanie toksyny botulinowej typu A do zmniejszenia głównie zmarszczek mimicznych pod i wokół oczu, ale również innych zmarszczek na twarzy. Związek ten składa się z dodatnio naładowanej, bogatej w lizynę, domeny peptydowej znajdującej się pomiędzy dwiema identycznymi domenami TAT49-57, połączonymi niekowalencyjnie z toksyną botulinową typu A o masie 150 kDa. II faza badań klinicznych potwierdziła bezpieczeństwo i skuteczność RT001 w dostarczaniu botuliny, z tymczasowym zakłóceniem przewodnictwa nerwowo-mięśniowego i porażeniem mięśni twarzy (Vasconcelos i wsp., 2013; Glogau i Axibal, 2017). Obecnie lek znajduje się w III fazie badań klinicznych. Równocześnie trwają badania potwierdzające jego skuteczność w leczeniu nadmiernej potliwości dołów pachowych (Gold, 2017). Firma *Capstone Therapeutics (Arizona, USA)* do roku 2012 prowadziła badania nad oceną właściwości związku AZX100, który zawiera fosforylowany peptydowy analog białka szoku cieplnego HSP20 i pochodnej peptydu TAT (określanego jako PTD4). Badania przedkliniczne wykazały, że związek istotnie zmniejszał produkcję czynnika wzrostu tkanki łącznej (CTGF) oraz kolagenu, co przyczyniało

się do zmniejszania blizn i zwłóknienia skóry. Z powodów finansowych *Capstone Therapeutics* zaprzestała dalszych badań nad potencjalnym wykorzystaniem preparatu (Flynn i wsp., 2010; Snell, 2014).

Preparat XG-102, zawierający peptyd TAT oraz inhibitor kinazy białkowej fosforylującej N-koniec białka c-Jun (*JNK – c-Jun N-terminal protein kinase*), wykazuje potencjalne zastosowanie w leczeniu zapalenia błony naczyniowej oka. III faza badań klinicznych prowadzonych przez firmę *Xigen (Epalinges, Szwajcaria)* została zakończona w 2016. Obecnie oczekuje się na wyniki tych badań, które miały ocenić właściwości XG-102 w zmniejszeniu zapalenia błony naczyniowej oka i bólu pojawiającego się u pacjentów poddawanych zabiegowi usunięcia zaćmy. W tej samej fazie badań znajduje się preparat AM-111 zawierający XG-102 w postaci biokompatybilnego i w pełni biodegradowalnego żelu, który wykazuje potencjalne właściwości w leczeniu nagłego niedosłuchu czuciowo-nerwowego spowodowanego uszkodzeniem ślimaka (Guidotti i wsp., 2017).

Obiecujące wyniki na modelach zwierzęcych wykazywał KAI-9803 badany przez *Kai Pharmaceuticals (San Francisco, Kalifornia, USA)*. Związek ten składa się z peptydowego inhibitora izoformy δ kinazy białkowej C (δ PKC) pozyskanego z jej regionu δ V1-1 i związanego przez wiązania dwusiarczkowe peptydu nośnikowego TAT47-57. Stwierdzono, że KAI-9803 selektywnie hamował translokację δ PKC i zmniejszał uszkodzenie kardiomiocytów serca związane z reperfuzją niedokrwienną. Kolejne badanie kliniczne, w którym oceniano bezpieczeństwo i skuteczność związku u ludzi wykazały, że lek pomimo dobrego profilu bezpieczeństwa oraz braku poważnych zdarzeń niepożądanych nie zmniejszał istotnie uszkodzeń niedokrwiennie-reperfuzyjnych (Miyaji i wsp., 2011; Fu i wsp., 2014; Lincoff i wsp., 2014; Dinca i wsp., 2016). *Kai Pharmaceuticals* zainicjowała również badania kliniczne oceniające bezpieczeństwo i właściwości przeciwbólowe związku KAI-1678, inhibitora izoformy ϵ PKC z dołączonym peptydem TAT47-57, w leczeniu bólu pojawiającego się w neuralgii popółpaścowej. KAI-1678 podobnie jak KAI-9803 nie wykazywał istotnej poprawy stanu pacjentów (Cousins i wsp., 2013).

Po obiecujących wynikach przedklinicznych do I fazy badań klinicznych wszedł peptyd p28 składający się z 28 aminokwasów, pochodzący z bakteryjnego białka azyryny, który wykazuje potencjalne właściwości przeciwnowotworowe. Peptyd po przekroczeniu

błony komórkowej kieruje się do jądra, gdzie wiąże się z regionem znajdującym się w obrębie domeny wiążącej DNA białka supresorowego p53, hamując jego degradację. W wyniku tej interakcji następuje wzrost ilości p53, który prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego i zatrzymania proliferacji komórek nowotworowych (Guidotti i wsp., 2017).

Najbardziej obiecującym kandydatem do zatwierdzenia przez FDA może być NA-1 (inna nazwa Tat-NR2B9c). Peptyd ten składa się z 20 reszt aminokwasowych, w tym z dziewięciu ostatnich reszt C-końca podjednostki GluN2B receptora N-metylo-D-asparaginianowego (NMDAR – N-methyl- -D-aspartate receptor), połączonych z domeną transdukcijną TAT. NA-1 skutecznie przenika przez błony komórkowe, zakłóca wewnątrzkomórkowe oddziaływanie receptora NMDAR z białkiem zagęszczenia postsynaptycznego PSD-95 (*ang. postsynaptic density protein 95 kDa*) i w efekcie zapobiega wytwarzaniu tlenku azotu oraz dalszej sygnalizacji neurotoksycznej (Chen i wsp., 2015; Krautwald i wsp., 2016). Dotychczasowe wyniki badań klinicznych potwierdziły bezpieczeństwo i skuteczność neuroprotekcijną NA-1 u pacjentów po wewnątrznaczyniowym leczeniu tętniaka mózgu. Obecnie preparat znajduje się w III fazie klinicznych (Ballarin i Tymianski, 2018).

1.5.4. Charakterystyka i właściwości peptydu gH625

Nanopreparaty, w tym liposomy, dendrymery i nanostrukturalne nośniki lipidowe wykorzystywane są w celu zwiększenia stabilności leków, wzrostu ich farmakokinetyki i biodystrybucji, przy jednoczesnym zmniejszeniu skutków ubocznych. Wewnątrzkomórkowe dostarczanie związków z powodu ich dużego rozmiaru, hydrofobowego/hydrofilowego charakteru i trójwymiarowej struktury pozostaje nadal dużym wyzwaniem (Munyendo i wsp., 2012). Zamknięcie leków przeciwnowotworowych w przenośnikach, pomimo zwiększenia ich rozmiaru, ma jednak pozytywny aspekt. Większa cząsteczka jest słabiej przepuszczalna przez komórki znajdujące się w tkankach prawidłowych, w przeciwieństwie do naczyń guzów nowotworowych, które charakteryzują się dużą anomalią i większą przepuszczalnością. Liposomy są w stanie transportować większe ilości środka chemioterapeutycznego niż inne nanostruktury, przy jednoczesnym zminimalizowaniu ryzyka szybkiego wycieku leku. Dodatkowo w liposomach można umieścić zarówno hydrofilowe (wewnątrz liposomu) jak i hydrofobowe (w dwuwarstwie

lipidowej) związki. W porównaniu z konwencjonalnymi lekami zastosowanie liposomów zmniejsza niektóre z najczęściej występujących efektów ubocznych chemioterapii, takie jak nudności i wymioty (Sercombe i wsp., 2015). Obecnie prowadzone badania mają na celu aktywne ukierunkowanie liposomów na komórki nowotworowe. Szczególnie ważne jest opracowanie bioaktywnych ligandów na zewnętrznej powierzchni liposomu, np. peptydów penetrujących błonę komórkową. Ich wykorzystanie może znacznie przyczynić się do ulepszenia funkcji przenośnikowych liposomu. Przykładem takiego peptydu jest gH625, pozyskany z glikoproteiny H wirusa Herpes simplex typu 1, który został po raz pierwszy syntetyzowany i charakteryzowany przez zespół włoskich naukowców z Uniwersytetu Neapolitańskiego im. Fryderyka II w 2005 roku (Galdiero i wsp., 2005).

Zakażenie wirusem opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1) jest powszechne u ludzi i powoduje nawracające zmiany śluzówkowo-skinne w obrębie jamy ustnej, twarzy lub narządów płciowych. W rzadkich przypadkach infekcja może prowadzić do zapalenia opon mózgowych lub zapalenia mózgu. Fuzja otoczki wirusowej z błoną komórkową wymaga interakcji pomiędzy czterema glikoproteinami (gD, gH, gL i gB) i receptorami komórkowymi. Pierwszy etap zostaje zainicjowany jest kiedy gD wiąże się z jednym z jego receptorów komórkowych: siarczanem heparanu, nektyną-1 lub mediatorem wejścia wirusa opryszczki (HVEM). Ta interakcja aktywuje heterodimer gH/gL, a następnie gB (Galdiero i wsp., 2008; Cooper i Heldwein, 2015). Glikoproteina gH wirusa HSV-1 ma długość 838 reszt aminokwasowych oraz składa się z pojedynczej domeny transbłonowej i krótkiego cytoplazmatycznego ogona zawierającego 14 aminokwasów. Aby mogła nastąpić fuzja wirusa HSV-1 bezwzględnie wymagana jest obecność heterodimeru gH/gL, jednak jego właściwa rola nie jest jeszcze dobrze znana (Weed i Nicola, 2017).

Domena glikoproteiny H obejmująca reszty 625-644 jest odcinkiem, który wykazuje najwyższą zdolność do fuzji z błoną komórkową. Amfifilowy peptyd gH jest bogaty w reszty hydrofobowe: glicyna, leucyna, alanina oraz reszty aromatyczne takie jak tryptofan i tyrozyna. Dotychczasowe badania ustaliły, że dodatnio naładowany C-koniec jest niezbędny do wiązania z błoną, a tryptofan do penetracji błony, a obecność histydyny i glicyny na N-końcu silnie zwiększa aktywność fuzyjną. Fuzja peptydu gH625 z hydrofilowym regionem grup lipidowych zachodzi przy udziale aminokwasów zasadowych

i aromatycznych. Przenikanie peptydu jest zatem skorelowane z hydrofobowością i amfifilowością sekwencji. Reszty aromatyczne są odpowiedzialne za wnikanie peptydu do wnętrza dwuwarstwy lipidowej, natomiast reszty zasadowe stabilizują to oddziaływanie. gH625 silnie oddziałuje na błonę komórkową, spontanicznie wnika do dwuwarstwy lipidowej jako α -helisa i następnie powodując tworzenie porów oraz pęknięcia przemieszcza się do cytoplazmy. Molekularny mechanizm penetracji nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony. Dotychczasowe ustalenia sugerują, że transport nie jest związany z klasycznymi mechanizmami endocytozy (Galdiero i wsp., 2012 i 2015).

Peptyd gH625 wykazuje wyjątkowe właściwości wektorowe i jest w stanie efektywnie dostarczać szereg różnych klas związków, które wywołują pożądany efekt w oczekiwanych lokalizacjach organizmu. Ze względu na wysoką stabilność, szybkość penetracji i skuteczność poprawy biodostępności związków może być obiecującym kandydatem do zaprojektowania docelowego systemu dostarczania. Badania wskazują, że peptyd może być stosowany do pośredniczenia w dostarczaniu związków (z nienaruszoną ich bioaktywnością) do każdej dowolnej tkanki lub narządu, również do pokonania bariery krew-mózg. Zdolność do penetracji komórek mózgowych przez gH625 została potwierdzona w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórek ludzkiej neuroblastomy (SH-SY5Y) i glioblastomy (U-87 MG) oraz *in vivo* u szczurów. Badania *in vitro* wykazały, że obie linie komórkowe były w stanie pochłoniąć 90% podanego peptydu. Podczas badań przeprowadzonych na szczurach stwierdzono obecność gH625 w śródbłonku naczyniowym mózgu oraz w neuronach. Uzyskane wyniki potwierdzają, że peptyd gH625 dociera do kory mózgowej i może zostać wykorzystany do dostarczania leków do ośrodkowego układu nerwowego (Valiante i wsp., 2015; Falanga i wsp., 2018).

Dotychczas peptyd gH625 jako wektor ułatwiający transport leków przeciwnowotworowych został wykorzystany w połączeniu z liposomalną formą metotreksatu i doksorubicyny. Leki zostały zamknięte w przenośniku liposomalnym, a peptyd gH625 został dołączony do powierzchni liposomu. W obu przypadkach obecność peptydu zwiększała transport leku do wnętrza komórki oraz jego zdolność przeciwnowotworową. Liposomalna doksorubicyna z peptydem gH625 była w stanie dotrzeć do jądra komórkowego i indukowała apoptozę w opornych komórkach linii niedrobnokomórkowego raka płuca A549, przeciwnie do

liposomalnej doksorubicyny, która nie zawierała peptydu (Perillo i wsp., 2016). Podobne wyniki otrzymano w przypadku liposomalnego metotreksatu z gH625, którego większa ilość była transportowana do wnętrza komórek HeLa. Obecność peptydu przyspieszała również efekty cytotoksyczne liposomalnego leku. Uzyskane wyniki zachęcają do projektowania liposomów z dołączonym peptydem gH625, zawierających różnego rodzaju leki przeciwnowotworowe (Perillo i wsp., 2015).

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Uzasadnienie tematu badań

Taksany paklitaksel i docetaksel są jednymi z najskuteczniejszych leków chemioterapeutycznych stosowanych w monoterapii lub w skojarzeniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi w leczeniu systemowym licznych typów nowotworów złośliwych (Mutschler i wsp., 2010; DeVita i wsp., 2015). Leki te należą do cytostatyków fazowospecyficznych, stabilizujących mikrotubule wrzeciona kariokinetycznego. Taksany wiążą się z podjednostką β -tubuliny mikrotubul, co wywołuje zmiany konformacyjne i polimeryzację mikrotubul oraz prowadzi do reorganizacji sieci mikrotubularnej. Przyłączenie taksanu do β -tubuliny zakłóca dynamikę mikrotubul wrzeciona kariokinetycznego i hamuje ich depolimeryzację. W rezultacie następuje zatrzymanie cyklu komórkowego i indukcja apoptozy.

Kliniczne zastosowanie taksanów wiąże się z poważnymi efektami toksycznymi, w tym neutropenią, siniaczeniem, niedokrwistością, nudnościami, neuropatią obwodową, biegunką i silnymi reakcjami nadwrażliwości, spowodowanymi zastosowaniem solubilizatorów (Cremophor EL i Polisorbat 80) do rozpuszczenia leków. W celu zredukowania toksyczności taksanów wobec komórek prawidłowych oraz podwyższenia ich indeksu terapeutycznego w ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem odpowiedniego nośnika, który będzie dostarczał te leki bezpośrednio do guza nowotworowego. Jednym z rozwiązań, jest enkapsulacja taksanów w nanonośnikach, np. w liposomach, co może ulepszyć farmakokinetykę i biodystrybucję leków, a tym samym zwiększyć ich skuteczność terapeutyczną oraz zminimalizować toksyczność ogólnoustrojową. Liposomy o wielkości 100 – 300 nm mogą także poprawić lokowanie taksanów w guzie nowotworowym poprzez efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (efekt EPR), który związany jest z większą przepuszczalnością naczyń otaczających guz nowotworowy. Dołączenie peptydu penetrującego błony komórkowe do liposomu, może znacząco polepszyć dystrybucję leków przeciwnowotworowych dostarczając ich bezpośrednio do komórek nowotworowych, jak również zwiększyć ich retencję w guzach nowotworowych.

Uzasadnienie wyboru komórek endotelialnych jako modelu komórek prawidłowych in vitro

Jako model komórek prawidłowych do badań *in vitro* wybrano ludzkie komórki śródbłonna mikrowaskularnego linii HMEC-1. W praktyce klinicznej taksany podawane są pacjentom onkologicznym we wlewach dożylnych i komórki śródbłonna naczyń krwionośnych są jednymi z pierwszych komórek narażonych na bezpośrednie działanie tych leków.

Badania na ludzkich komórkach śródbłonna mikrowaskularnego (*ang. human microvascular endothelial cells*) napotykać wiele trudności z uwagi na to, że są one trudne do wyizolowania i założenia czystej hodowli oraz bardzo wymagające w stosunku do składników odżywczych i warunków zapewniających im optymalny wzrost. Komórki śródbłonna charakteryzują się ponadto ograniczonym cyklem życiowym, przechodząc po 8-10 pasażach w stadium starzenia. Odpowiednią alternatywą stanowią rosnące w monowarstwie nieśmiertelne komórki endotelialne, np. linia HMEC-1 (ATCC® CRL-3243™).

Komórki linii HMEC-1 są dobrze scharakteryzowane. Jest to pierwsza nieśmiertelna ludzka linia komórkowa śródbłonna mikrowaskularnego, która zachowuje wiele cech morfologicznych, fenotypowych i funkcjonalnych, typowych dla prawidłowych ludzkich komórek endotelialnych. Komórki HMEC-1 wytwarzają i wydzielają czynnik von Willebranda, ekspresyjną antygeny powierzchniowe związane z komórkami śródbłonna, w tym CD31 i CD36, epitopy rozpoznawane przez przeciwciała monoklonalne EN4 i PAL-E, cząsteczki adhezji komórkowej ICAM-1 i CD44, a po stymulacji interferonem-gamma także antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II. Wykazano ponadto, że komórki HMEC-1, nawet na bardzo wysokich pasażach (> 90), nie wykazują oznak starzenia. **Stanowią więc stałe, odnawialne źródło ludzkich endotelialnych komórek mikrowaskularnych i zgodnie z rekomendacją *American Type Culture Collection (ATCC)* mogą być stosowane jako zamiennik i model pierwotnych ludzkich komórek śródbłonna naczyniowego w badaniach *in vitro*** (Ades i wsp., 1992).

Główny cel pracy

Głównym celem pracy była ocena właściwości cytotoksycznych stosowanych klinicznie taksanów (paklitaksel i docetaksel), enkapsulowanych w pegylovanym nanonośniku liposomalnym skoniugowanym z penetrującym peptydem gH625 wobec ludzkich komórek linii HMEC-1, wywodzących się ze śródbłonna mikrowaskularnego.

Wymienione nanoformy taksanów nie były dotychczas badane, co stanowi element nowości pracy.

Hipoteza badawcza

Podstawą hipotezy badawczej i oczekiwanych wyników było założenie, że enkapsulacja taksanów w pegylowanym nanonośniku liposomalnym skoniugowanym z peptydem gH625 penetrującym błony komórkowe, będzie obniżać toksyczność leków w układzie modelowym *in vitro* (komórki śródbłonka mikrowaskularnego, linia HMEC-1), poprzez modyfikację molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za ich efekty cytotoksyczne w komórkach prawidłowych.

Zweryfikowanie hipotezy badawczej

Szczegółowe badania wykonane w celu zweryfikowania hipotezy badawczej miały na celu:

- 1) określenie wpływu wolnych i liposomalnych taksanów (paklitaksel i docetaksel) na proliferację i przeżywalność komórek śródbłonka mikrowaskularnego – testy cytotoksyczności, krzywe przeżywalności oraz analiza cyklu podziałowego komórek traktowanych różnymi stężeniami tych leków,
- 2) porównanie cytotoksyczności wolnych i liposomalnych taksanów wobec komórek śródrodbłonka mikrowaskularnego na podstawie analizy głównych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za efekty cytotoksyczne tych leków: uszkodzenia DNA, zmiany potencjału błony mitochondrialnej, indukcja stresu oksydacyjnego, apoptozy i autofagii,
- 3) określenie roli nanonośnika liposomalnego i peptydu gH625 w toksyczności liposomalnych form taksanów.

3. MATERIAŁY

3.1. Odczynniki i media do hodowli komórek

- a) Odczynniki firmy *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*
 - Czynn timer wzrostu naskórka EGF (*ang. Epidermal Growth Factor*)
 - Hydrokoryzon (*ang. Hydrocortisone*)
 - L-Glutamina (*ang. L-Glutamine*)
- b) Odczynniki firmy *Lonza, Verbiers, Belgia*
 - Mieszana a aminokwasów – 10 mM
 - Mieszana antybiotyków – penicylina/streptomycyna (10 000 jednostek/ml penicyliny i 10 000 µg/ml streptomycyny)
 - Roztwór trypsyny – 0,25% trypsyna, 1 mM EDTA
- c) Odczynniki innych firm
 - Bydlęca surowica płodowa (*PAA Laboratories GmbH, Niemcy*)
 - Medium hodowlane MCDB 131 (*PAN Biotech, Aidenbach, Niemcy*)

3.2. Odczynniki chemiczne

W pracy stosowano odczynniki o najwyższym dostępnym stopniu czystości. Do przygotowania roztworów i buforów używano dejonizowaną wodę, oczyszczoną w układzie odwróconej osmozy, o przewodności około 0,06 µS/cm (Elix3/Mili-Q firmy Millipore).

3.2.1. Sondy fluorescencyjne i barwniki

firmy *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*

- DAPI (4',6-diamidinodihydrochloran-2-fenylindonu (*ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole*))
- JC-1 (jodek 5, 5',6, 6'-tetrachloro-1,1',3, 3'-tetraetylobenzimidazo-karbocyjaniny, *ang. 5, 5',6, 6'-tetrachloro-1,1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazole-carbocyanine iodide*), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
- Jodek propidyny (*ang. propidium iodide*)
- Monochlorobiman (MCB, *ang. monochlorobimane*)
- Monodansylokadaweryna (MDC, *ang. monodansylcadaverine*)
- REMA (resazuryna), 7-hydroksy-3H-fenoksyazyno-3-on-10-tlenku, sól sodowa, (*ang. sodium salt, 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide*)

- SRB (sulforodamina B, *ang. sulforhodamine B*)
- XTT (sól sodowa 2,3-bis [2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo]-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu, *ang. sodium salt (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)*)

3.2.2. Pozostałe odczynniki

a) firmy *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*

- Agarozą LMP typ I-A (*ang. Low Melting Point*)
- Agarozą NMP typ VII (*ang. Normal Melting Point*)
- Błękit trypanu
- CCCP (karbonylo-cyjano-m-chlorofenylohydrazon (*ang. carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone*))
- DMSO (dimetylsulfotlenek, *ang. dimethyl sulfoxide*)
- HBSS (*ang. Hanks' Balanced Salt solution*)
- Kwas askorbinowy (*ang. Ascorbic acid*)
- NAC (N-acetyl-L-cysteina, *ang. N-Acetyl-L-cysteine*)
- Roztwór RNazy, 50 U/mg
- Triton® X-100
- Trizma® (hydrochloride Tris-HCl)

b) firmy *POCH S.A, Gliwice, Polska*

- wszystkie odczynniki stosowane do sporządzenia roztworów, zawierających kwasy, zasady i sole (NaOH, HCl, NaCl, KCl, MgCl₂, Na₂-EDTA, CaCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, etanol 96%)

3.3. Leki przeciwnowotworowe

- Docetaksel (*ang. Docetaxel, Taxotere®*)
- Paklitaksel (Taksol®, *ang. Paclitaxel, Taxol®*)

Oba leki zostały zakupione w firmie Sequoia Research Products Ltd., Pingbourne, Wielka Brytania

3.4. Nanonośniki leków przeciwnowotworowych

Syntetyzę i charakterystykę nanonośników wykonano przez zespół prof. Stefanii Galdiero (*Department of Pharmacy and DFM Scarl, University of Naples "Federico II", Naples, Italy*):

- Pegylowane liposomy
- Peptyd gH625 penetrujący błony komórkowe
- Pegylowany liposom skoniugowany z peptydem gH625

3.5. Drobny sprzęt

Do hodowli komórek wykorzystano jałowy plastikowy sprzęt jednorazowego użytku firmy *PAA Laboratories GmbH, Niemcy*:

- płaskie butelki o powierzchni 25 cm² i 75 cm²
- szalki o średnicy 35 i 60 mm
- przezroczyste i czarne mikroplatytki 96-dołkowe
- probówki o pojemności 15 ml i 50 ml
- końcówki do pipet automatycznych
- pipety Pasteura (plastikowe i szklane)

3.6. Aparatura

- cytometr przepływowy *BDUS LSR II (Beckton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)* – analiza cyklu komórkowego
- czytnik mikroplatelyk 96-dołkowych *Biotek PowerWave HT (Biotek Instruments, Winooski, USA)* – pomiary spektrofotometryczne (testy XTT, REMA, SRB)
- czytnik mikroplatelyk *Fluorocan Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finlandia)* – pomiary spektrofluorymetryczne: potencjał mitochondrialny (sonda fluorescencyjna JC-1), zawartość glutationu (monochlorobiman) oraz indukcja autofagii (monodansylokadaweryna)
- mikroskop fluorescencyjny z odwróconym obiektywem *Olympus IX70 (Olympus Ltd, Tokyo, Japonia)* – obserwacja i analiza komet DNA (barwnik fluorescencyjny DAPI)
- transmisyjny mikroskop elektronowy *JEOL-1010 (JEOL Ltd., Tokio, Japonia)* – rozmiary i morfologia liposomów

3.7. Materiał biologiczny

Badania wykonano na ludzkich endotelialnych komórkach mikrowaskularnych linii HMEC-1 (*ang. human microvascular endothelial cells*), ze względu na szczególne właściwości śródbłonna mikronaczyń krwionośnych i jego rolę w procesie angiogenezy.

3.7.1. Charakterystyka komórek linii HMEC-1

Linia HMEC-1 została wyprowadzona z komórek śródbłonna mikronaczyniowego skóry napletków neonatalnych, które poddano transfekcji wektorem plazmidowym pSVT, opartym na plazmidzie pBR-322, zawierającym region kodujący duży antygen T (produkt genu wirusa SV40A).

4. METODY

4.1. Ocena kształtu i morfologii nanonośnika liposomalnego przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego

Kształt i morfologię liposomów oceniano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).

Analizowano:

- puste liposomy
- puste liposomy skoniugowane z penetrującym błony komórkowe peptydem gH625
- liposomy z enkapsulowanym lekiem (docetaksel lub paklitaksel)
- liposomy z enkapsulowanym lekiem (docetaksel lub paklitaksel), skoniugowane z peptydem gH625

Z każdego preparatu liposomów pobierano próby o objętości 10 μ l i nanoszono na 200-oczkową miedzianą siatkę powlekaną węglem (na jedno oczko nanoszono jedną próbę). Próby barwiono przez 20 minut nasyconym roztworem octanu uracylu, przemywano wodą destylowaną i po wysuszeniu w temperaturze pokojowej. analizowano pod mikroskopem elektronowym *JEOL-1010 (JEOL Ltd., Tokio, Japonia)*.

4.2. Hodowla i pasażowanie komórek

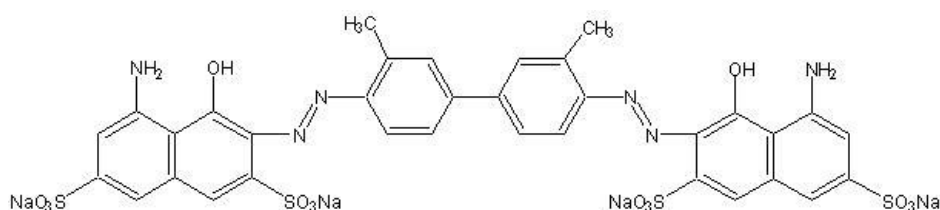
Komórki HMEC-1 hodowano w medium hodowlanym MCDB 131, z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej i antybiotyków (10 U/ml penicylina i 0,5 mg/ml streptomycyna) w inkubatorze CO₂ do hodowli komórek, w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂ oraz wilgotności względnej 100%. Medium hodowlane wzbogacano L-glutaminą (10 mM), hydrokortyzonem (1 μ g/ml) oraz czynnikiem wzrostu naskórka EGF (10 ng/ml).

Komórki utrzymywano w fazie wzrostu logarytmicznego poprzez regularne pasażowanie 2-3 razy w tygodniu przy użyciu 0,25 % trypsyny z EDTA. Monowarstwę komórek, po usunięciu medium hodowlanego, przemywano 0,9% NaCl. Następnie dodawano 300-500 μ l 0,25% roztworu trypsyny z EDTA (ilość trypsyny była zależna od powierzchni naczynia hodowlanego) i naczynie/szalkę umieszczano w inkubatorze CO₂ na okres 3-5 min. Przebieg procesu trypsynizacji kontrolowano pod mikroskopem. Po jego

zakończeniu delikatnie usuwano trypsynę i dodawano medium hodowlane o odpowiedniej dla danego naczynia hodowlanego objętości. Po dokładnym wymieszaniu, przenoszono zawiesinę komórek do nowych, jałowych naczyń hodowlanych.

4.3. Ocena żywotności komórek w hodowli metodą barwienia błękitem trypanu

Komórki przed pasażowaniem barwiono błękitem trypanu i oceniano ich żywotność w hemocytometrze *Bürkera* przy użyciu mikroskopu świetlnego (**Rycina 4.1**).



Rycina 4.1. Wzór chemiczny błękitu trypanu.

Zasada metody

Błękit trypanu przenika swobodnie przez błonę komórek martwych, w której na skutek trwałego uszkodzenia dochodzi do utraty potencjału pomiędzy stroną zewnętrzną i wewnętrzną. Barwnik nie wnika do cytoplazmy żywych komórek ze względu na ujemny ładunek ich błony plazmatycznej. Pozostają one bezbarwne, lekko opalizujące, podczas gdy cytoplazma komórek martwych, ulega zabarwieniu na kolor niebieski (Louis i Siegel, 2011).

Wykonanie oznaczenia

Z zawiesiny komórek, uzyskanej w wyniku trypsynizacji monowarstwy, pobierano 3 próby o objętości 100 μ l każda i barwiono 4% roztworem błękitu trypanu w NaCl w stosunku objętości 1:1. Niewielką objętość próby nanoszono na hemocytometr *Bürkera* oraz zliczano pod mikroskopem wszystkie komórki i komórki zabarwione na niebiesko (martwe). Żywotność komórek wyliczano z ilorazu liczby komórek żywych i liczby wszystkich komórek w próbce oraz przeliczano na procenty, przyjmując liczbę wszystkich zliczonych komórek za 100%.

4.4. Inkubacja komórek HMEC-1 z badanymi związkami

We wszystkich eksperymentach stosowano ten sam model inkubacji komórek z lekami, nanonośnikami i antyoksydantami. Określoną liczbę komórek w dostosowanej do

wielkości naczynia hodowlanego objętości medium hodowlanego wysiewano na szalki Petriego lub mikroplastyki 96-dołkowe – przezroczyste (pomiar spektrofotometryczny) lub czarne (pomiar spektrofluorymetryczny) i hodowano przez 24 godziny w celu osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu. Następnie do szalek lub odpowiednich dołków mikroplastyk dodawano po 100 µl medium zawierającego różne stężenia leków, nanonośnik liposomalny, peptyd gH625, lub nanonośnik liposomalny z przyłączonym peptydem gH625 (próby badane), tylko medium hodowlane, (próby kontrolne) i inkubowano w inkubatorze CO₂ (37°C) do hodowli komórek przez 3 godziny (eksperymenty, w których oznaczano zmian mitochondrialnego potencjału błonowego) lub 24 godziny (wszystkie pozostałe analizy). Zastosowane stężenia związków podano w **Tabeli 4.1**. Po zakończeniu inkubacji wykonywano od razu odpowiednią analizę (czas 0 godzin) lub wymieniano medium i kontynuowano hodowlę komórek przez 24 lub 48 godzin (hodowla poinkubacyjna). Na wykresach czasy, po których wykonywano analizę oznaczono jako 0 h, 24 h i 48 h. W eksperymentach z użyciem antyoksydantów (NAC, Trolox, Tiron) komórki przed inkubacją z lekiem, preinkubowano przez 1 godzinę z antyoksydantem, a następnie do medium z antyoksydantem dodawano lek.

4.5. Metody oznaczenia cytotoksyczności

Cytotoksyczność wolnych i liposomalnych taksanów (PTX i DTX) wobec ludzkich komórek endotelialnych oceniano na podstawie wpływu leków na żywotność, proliferację i przeżywalność komórek. Zastosowano trzy mikroplastykowe testy cytotoksyczności: *i*) test XTT, *ii*) test SRB oraz *iii*) test REMA. Zakres stężeń związków podano w **Tabeli 4.2**.

4.5.1. Mikroplastykowy test spektrofotometryczny z XTT

Zasada metody

Testy kolorymetryczne oparte na redukcji XTT (lub MTT) są najczęściej wykonywanymi testami cytotoksyczności w praktyce laboratoryjnej. Stosowane są m.in. do określania wrażliwości komórek i drobnoustrojów na czynniki chemiczne i leki oraz oceny żywotności i intensywności proliferacji komórek eukariotycznych w odpowiedzi na czynniki toksyczne (Buttke i wsp., 1993; De Logu i wsp., 2001; Berridge i wsp., 2005; Wolter i wsp., 2005). Testy te umożliwiają ocenę zmian aktywności metabolicznej żywych komórek (aktywności oksydacyjnej mitochondriów) pod wpływem czynników toksycznych.

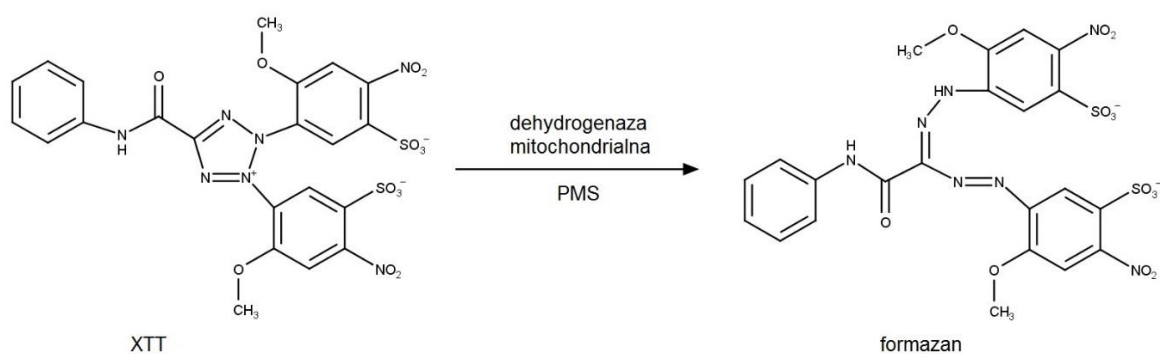
Tabela 4.1. Stężenia związków stosowanych w eksperymentach.

PTX enkapsulowany w nanonośniku liposomalnym (LipoPTX)	IC ₁₀	5,21 nmol/l
	0,5 IC ₅₀	5,96 nmol/l
PTX enkapsulowany w nanonośniku liposomalnym skoniugowanym z peptydem gH625 (LipoPTX-gH625)	IC ₅₀	11,92 nmol/l
	2 IC ₅₀	23,84 nmol/l
	IC ₉₀	27,28 nmol/l
DTX enkapsulowany w nanonośniku liposomalnym (LipoDTX)	IC ₁₀	1,99 nmol/l
	0,5 IC ₅₀	3,79 nmol/l
DTX enkapsulowany w nanonośniku liposomalnym skoniugowanym z peptydem gH625 (LipoDTX-gH625)	IC ₅₀	7,58 nmol/l
	2 IC ₅₀	15,15 nmol/l
	IC ₉₀	28,77 nmol/l
Nanonośnik liposomalny (Lipo)	MIN (maksymalne stężenie liposomu w próbach)	29,7 nmol/l
	MAX (minimalne stężenie liposomu w próbach)	9028,65 nmol/l
Nanonośnik liposomalny skoniugowany z penetrującym peptydem gH625	LipoMIN	29,7 nmol/l
	LipoMAX	9028,65 nmol/l
	gH625min	0,5 nmol/l
	gH625max	292,5 nmol/l
Peptyd penetrujący gH625	min (minimalne stężenie peptydu w próbach)	0,5 nmol/l
	max (maksymalne stężenie peptydu w próbach)	292,5 nmol/l
NAC		3 mmol/l
TROLOKS		50 μmol/l
TIRON		200 μmol/l

Tabela 4.2. Zakres stężeń związków stosowanych w badaniach cytotoxyczości.

Peptyd gH625	0-350 nmol/l
Nanonośnik liposomalny (Lipo)	0-10 000 nmol/l
PTX	0-100 nmol/l
PTX enkapsulowany w nanonośniku liposomalnym (LipoPTX)	0-100 nmol/l
PTX enkapsulowany w nanonośniku liposomalnym skoniugowanym z peptydem gH625 (LipoPTX-gH625)	0-100 nmol/l
DTX	0-60 nmol/l
DTX enkapsulowany w nanonośniku liposomalnym (LipoDTX)	0-60 nmol/l
DTX enkapsulowany w nanonośniku liposomalnym (LipoDTX-gH625) skoniugowanym peptydem gH625	0-60 nmol/l

XTT należy do soli tetrazolowych drugiej generacji, które posiadają ładunek ujemny i słabo penetrują do wnętrza komórek. Proces ich redukcji zachodzi głównie na powierzchni komórki lub w błonie plazmatycznej z udziałem przezbłonowego łańcucha transportu elektronów. Metoda XTT oparta jest na redukcji jasnożółtej soli tetrazolowej XTT do jaskrawo-pomarańczowej pochodnej formazanu przez aktywną mitochondrialną dehydrogenazę bursztynianową łańcucha oddechowego (**Rycina 4.2**). Zmiana koloru barwnika spowodowana jest pęknięciem dodatnio naładowanego pierścienia tetrazolowego. Otrzymany produkt jest łatwo rozpuszczalny w wodzie, co umożliwia odczyt absorbancji roztworu. Redukcja XTT zachodzi tylko w aktywnych metabolicznie komórkach, które posiadają nienaruszoną błonę komórkową i aktywną mitochondrialną dehydrogenazę. Czynniki uszkadzające komórkę, które niszczą te błony i łańcuch oddechowy, inaktywują enzym, a tym samym uniemożliwiają redukcję XTT do formazanu. Ilość wytworzonego formazanu w określonych warunkach odzwierciedla aktywność enzymów mitochondrialnych i jest proporcjonalna do absorbancji jego wodnego roztworu, a pośrednio do liczby żywych komórek w badanej próbce (Berridge i wsp., 2005; Stockert i wsp., 2018). Reakcja wymaga obecności odczynnika sprzęgającego elektrony, np. metosiarczan fenazy (*PMS-Phenazine methosulfate*), który jest pośrednim akceptorem elektronów oraz wspomaga redukcję XTT i powstanie pochodnej formazanu. W pracy zastosowano metodę opisaną przez Scudiero i wsp. (1988), w modyfikacji Szwed i wsp. (2016).



Rycina 4.2. Redukcja soli tetrazolowej XTT do barwnego formazanu.

Wykonanie oznaczenia

Po zakończeniu 48-godzinnej hodowli poinkubacyjnej komórek inkubowanych przez 24 godziny z badanymi związkami, do dołków mikropłytki dodawano po 75 μ l roztworu XTT

(stężenie końcowe 0,3 mg/ml), zawierającego metosiarczan fenazyny (*PMS*) o stężeniu końcowym 1% i mikroplastyki wstawiano do inkubatora CO₂ (37°C) na 4 godziny. Absorbancję roztworu mierzono przy długości fali $\lambda = 450$ nm i długości fali odniesienia $\lambda = 690$ nm za pomocą czytnika mikroplastyk *PowerWave HT* firmy *Biotek Instruments* (Winooski, USA). Odsetek komórek żywych wyrażano jako procent komórek kontrolnych, których żywotność przyjęto za 100%.

4.5.2. Mikroplastykowy test spektrofotometryczny z resazuryną (REMA)

Zasada metody

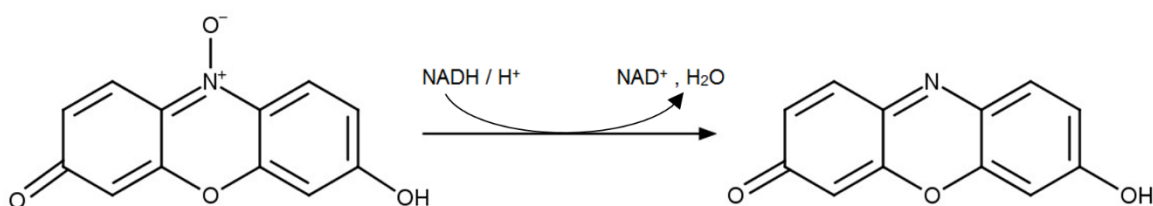
Resazuryna jest związkami, który łatwo ulega redukcji i wykazuje dużą wrażliwość na zmiany pH środowiska zmieniając barwę z żółtej (pH<3,8) na fioletową (pH>6,5). Związek stosowany jest od wielu lat jako wskaźnik redoks i pH.

Roztwór resazuryny po rozpuszczeniu w buforze fizjologicznym ma ciemnoniebieskie zabarwienie i nie wykazuje właściwości fluorescencyjnych. Po wnikięciu do cytoplazmy żywych komórek resazuryna, przy udziale dehydrogenaz komórkowych, traci atom tlenu i ulega redukcji do rezorufiny, która ma zabarwienie różowe i posiada właściwości fluorescencyjne (**Rycina 4.3**). W określonych warunkach ilość powstałego produktu (rezorufiny) jest proporcjonalna do frakcji aktywnych metabolicznie komórek. Fluorescencję rezorufiny lub absorbancję resazuryny można zmierzyć fluorymetrycznie lub spektrofotometrycznie (Elshikh i wsp., 2016; Riss i wsp., 2016). Resazuryna nie ulega redukcji w uszkodzonych lub martwych komórkach.

Test cytotoksyczności wykorzystujący resazurynę jest znacznie mniej toksyczny dla komórek niż standardowo wykonywane testy MTT/XTT, co umożliwia tandemowe wykonanie obu testów na tych samych komórkach i mikroplastyce. Należy jednak unikać długich czasów inkubacji, po których dochodzi do całkowitej redukcji rezorufiny i powstania bezbarwnej i niefluoryzującej hydroresorufiny, która może zakłócać zarówno pomiary kolorymetryczne, jak i fluorescencyjne (Czekanska, 2011; Elshikh i wsp., 2016). W trakcie reakcji pomiędzy zabarwieniem niebieskim roztworu resazuryny, a zabarwieniem różowym roztworu rezorufiny, pojawia się cały szereg pośrednich barw niebieskofioletowych i czerwono-fioletowych. W pracy wykorzystano zmodyfikowaną wersję metody opisaną przez Silva i wsp. (2016).

Wykonanie oznaczenia

Po 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej usuwano medium hodowlane z dołków mikroplątek, przemywano monowarstwę komórek roztworem PBS, a następnie dodawano po 100 μ l roztworu resazuryny o stężeniu 1 mg/ml w PBS (stężenie końcowe w medium dołków 0,0125 mg/ml). Po 2-godzinnej inkubacji komórek w inkubatorze CO₂ (37°C) mierzono fluorescencję produktu redukcji resazuryny (resorufiny) przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 540$ nm i długości fali emisji $\lambda = 590$ nm na czytniku mikroplątek *Fluoroscanner Ascent FL* firmy LabSystem (Helsinki, Finlandia).



Rycina 4.3. Redukcja resazuryny do resorufiny.

4.5.3. Mikroplątkowy test spektrofluorymetryczny z sulforodaminą B (SRB)

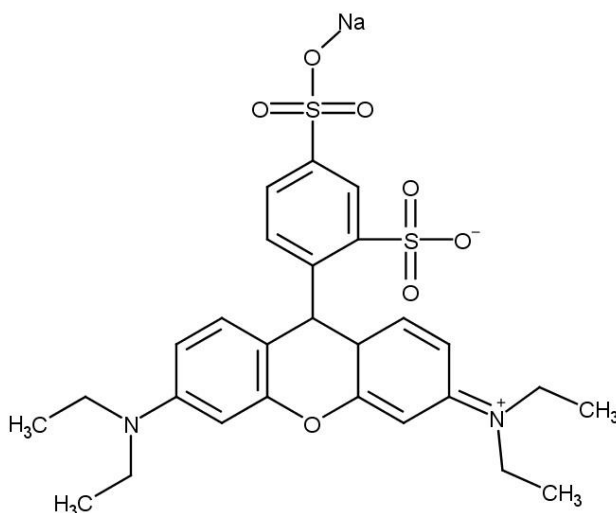
Metoda oznaczenia cytotoksyczności z użyciem sulforodaminy B (SRB) została opracowana po raz pierwszy przez Skehan i wsp. w 1990 roku (Skehan i wsp., 1990). W pracy zastosowano zmodyfikowaną wersję opracowaną przez Silva i wsp. (2016).

Zasada metody

Test z SRB, podobnie jak testy z MTT/XTT, jest często stosowaną metodą do badań cytotoksyczności związków w modelach komórkowych *in vitro*. Wzór strukturalny sulforodaminy B przedstawiono na **Rycinie 4.4**. Jest ona ujemnie naładowanym, jaskrawo-różowym barwnikiem aminoksantynowym, zawierającym dwie grupy sulfonowe. W łagodnych warunkach kwasowych i odpowiednim pH, SRB wiąże się elektrostatycznie i w sposób stechiometryczny z zasadowymi resztami aminokwasów białek komórkowych, natomiast w warunkach zasadowych oddysocjowuje od nich. Ilość barwnika uwolnionego z komórek, jest wprost proporcjonalna do ich liczby i do ilości zawartego w nich białka (Vichai i Kirtikara, 2006; Orellana i Kasinski, 2016). Oznaczenie wykonywano na komórkach utrwalonych 1% roztworem kwasu trichlorooctowego (TCA) w metanolu. W pracy zastosowano zmodyfikowaną wersję metody opracowaną przez Silva i wsp. (2016).

Wykonanie oznaczenia

Pierwszy etap oznaczenia stanowił utrwalenie komórek. W tym celu do dołków mikro płytki dodawano po 100 μ l schłodzonego 1% roztworu kwasu octowego w metanolu. Płytki owijano parafilmem i umieszczano w zamrażarce (-20°C) na minimum 3 godziny, a po wyjęciu monowarstwę komórek przemywano dokładnie wodą destylowaną i pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Następnie do dołków z utrwalonymi komórkami dodawano po 50 μ l 0,05% roztworu SRB i inkubowano przez 1 godzinę w inkubatorze CO₂ (37°C). Po zakończeniu inkubacji usuwano nadmiar niezwiązanej przez białka komórkowe sulforodaminy, przemywając kilkakrotnie monowarstwę komórek 1% kwasem octowym oraz pozostawiano do wyschnięcia. Bezpośrednio przed pomiarem do dołków mikro płytki dodawano po 100 μ l buforu Tris o stężeniu 10 mM (pH=10), a następnie wytrząsano w czytniku mikro płytek przez 30 sekund. Absorbancję prób mierzono za pomocą czytnika *PowerWave HT firmy Biotek Instruments (Winooski, USA)* przy długości fali $\lambda=540$ nm. Średnie wartości absorbancji przedstawione na wykresach standaryzowano w odniesieniu do absorbancji kontroli (komórki nietraktowane związkami), której wartość przyjęto za 100%.



Rycina 4.4. Wzór strukturalny soli sodowej sulforodaminy B (SRB).

4.6. Ocena właściwości antyproliferacyjnych

4.6.1. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometryczną

Zasada metody

Cykl komórkowy jest ściśle kontrolowanym procesem, który zapewnia wzrost i namnażanie komórek i w wyniku, którego z jednej komórki macierzystej powstają dwie komórki potomne, stanowiące jej wierne kopie. Analiza cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej (*ang. flow cytometry – FCM*) jest jedną z najczęściej stosowanych metod w badaniach nad nowymi związkami o potencjalnych właściwościach nowotworowych. Metoda umożliwia szybką, ilościową analizę dużej liczby prób poprzez pomiar ploidi wyznakowanego fluorochromem DNA, emitującego fluorescencję w odpowiednio naświetlonych komórkach. Metoda FCM stosowana jest najczęściej w badaniach mających na celu określenie, w jaki sposób badany związek wpływa na proliferację (przebieg replikacji) komórek oraz do ilościowego oznaczenia odsetka komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu podziałowego. Taka analiza pozwala określić m.in. czy potencjalny lek przeciwnowotworowy jest fazowo specyficzny, tzn. czy działa tylko na komórki znajdujące się w określonej fazie cyklu mitotycznego. Metoda oparta jest na dokładnej analizie histogramu DNA, który odzwierciedla zmiany ilości DNA w trakcie trwania cyklu ($2n \rightarrow 4n$).

Najczęściej wykorzystywanymi barwnikami fluorescencyjnymi do analizy cyklu komórkowego są fluorochromy wnikające przez błonę komórkową do wnętrza permeabilizowanych komórek i wiążące się stechiometrycznie z DNA na zasadzie interkalacji, np. DAPI, jodek propidyny (PI). Analizę wykonuje się na komórkach utrwalonych w etanolu. Pomiar fluorescencji DAPI wymaga odpowiedniego wyposażenia cytometru do pomiarów fluorescencji w zakresie UV. Wadą PI natomiast jest brak specyficzności jego reakcji z DNA. Fluorochrom wiąże się zarówno z DNA, jak i z dwuniciowym RNA, co wymaga dodatkowego trawienia próbek RNazą. W pracy do analizy cyklu komórkowego wykorzystano metodę opisaną przez Darzynkiewicz i Juan (2001).

Wykonanie oznaczenia

Komórki wysiewano na szalki o średnicy 60 mm ($0,5 \times 10^6$ komórek w 3 ml medium/szalkę) i hodowano przez 24 godziny, aby mogły osiągnąć logarytmiczną fazę wzrostu. Następnie dodawano badane związki w stężeniu końcowym IC_{10} , $0,5 IC_{50}$, IC_{50} , $2 IC_{50}$ oraz IC_{90} i inkubowano przez kolejne 24 godziny. W części doświadczeń komórki przed inkubacją z lekami preinkubowano przez godzinę z antyoksydantami (3 mM NAC, 50 μ M Troloks lub 200 μ M Tiron). Po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji z lekami wymieniano medium i komórki hodowano przez kolejne 24 i 48 godzin (hodowla poinkubacyjna 24 h i 48 h). Z części szalek uwalniano komórki bezpośrednio po zakończeniu inkubacji z badanymi związkami (czas 0 h).

Komórki uwalniano z monowarstwy za pomocą trypsynizacji, odwirowywano przez 10 minut przy szybkości $400 \times g$ w temperaturze pokojowej, a następnie przemywano dwukrotnie PBS. Zawiesinę komórek w 100 μ l PBS utrwalano w 1 ml 70% etanolu ($-20^\circ C$) i przechowywano w tej temperaturze do czasu analizy. Bezpośrednio przed analizą utrwaloną w etanolu zawiesinę komórek odwirowywano przy prędkości 10 000 obr/min przez 10 minut w temperaturze $4^\circ C$. Osad przemywano zimnym ($4^\circ C$) PBS w celu usunięcia reszty etanolu i zawiesinę komórek ponownie wirowano w tych samych warunkach. Do osadu komórek dodawano 300 μ l roztworu PBS zawierającego 4 mg/ml jodku propidyny (stężenie końcowe 75 μ M) oraz 1 mg/ml RNAzy A (stężenie końcowe 20 μ g/ml) i inkubowano przez co najmniej 30 minut w $37^\circ C$, w ciemności. Zabarwione komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*) zliczając 10 000 komórek w każdej z prób. Dane analizowano za pomocą oprogramowania *FlowJo 7.6.1 (Ashland, OR, USA)* z zastosowaniem *algorytmu Watsona* (Wieczorek i wsp., 2016).

4.7. Analiza uszkodzeń DNA metodą kometową w wersji alkalicznej (elektroforeza pojedynczej komórki)

Zasada metody

Elektroforeza żelowa pojedynczych komórek, zwana również testem kometowym, jest szybką i czułą metodą służącą do oceny uszkodzeń DNA na poziomej pojedynczej komórki. Metodę tę wykorzystuje się do wykrywania czynników genotoksycznych i rakotwórczych. Komórki inkubowane z testowanym związkiem osadza się na cienką

warstwę żelu agarozy, rozprowadzonej na szkiełku mikroskopowym, a następnie poddaje się lizie i elektroforezie. W celu wykrycia dwuniciowych pęknięć DNA przeprowadza się elektroforezę w warunkach neutralnych. Natomiast w warunkach alkalicznych wykrywane są zarówno pęknięcia jednoniciowe jak i dwuniciowe. Uwolnione DNA ulega denaturacji i podczas elektroforezy przemieszcza się w żelu agarozowym w kierunku anody. Obraz, uzyskany po zabarwieniu barwnikiem fluorescencyjnym DAPI, przypomina „kometę” z wyraźną „głową” (nienaruszone DNA) i „ogonem” (uszkodzone fragmenty DNA). Długość ogona zależy od wielości i liczby pękniętych nici DNA (Collins, 2004; Dhawan i wsp., 2009).

Wykonanie

Komórki (1×10^5) wysiewano na szalki o średnicy 35 mm i hodowano w medium przez 24 godziny aby umożliwić im osiągnięcie logarytmicznej fazy wzrostu. Po tym czasie do odpowiednich szalek dodawano wolne i litaksany, liposomalną formę taksanów oraz liposomalną formę taksanów zawierająca ligand peptydowy gH625. Końcowe stężenia leków wynosiły: IC₁₀, 0,5 IC₅₀, IC₅₀, 2 IC₅₀ oraz IC₉₀. Komórki inkubowano z lekami przez 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji wymieniano medium i kontynuowano hodowlę przez 24 i 48 godzin (hodowla poinkubacyjna 24 h i 48 h) lub przystępowano od razu do analizy – czas 0 godz. (hodowla poinkubacyjna 0 h). Komórki uwalniano z monowarstwy za pomocą trypsyny, po czym odwirowywano przez 10 min przy 100×g w temperaturze 4°C. Osad komórek przemywano PBS i ponownie wirowano. Do otrzymanego osadu komórek dodawano niewielkiej ilości PBS oraz roztwór 0,5% agarozy o niskiej temperaturze topnienia (agarozą LMP) i наносono na szkiełko podstawowe pokryte dwiema warstwami agarozy o normalnej temperaturze topnienia (agarozą NMP). Szkiełka lizowano w zimnym buforze (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100, pH=10) przez 1 godzinę. Po zlizowaniu komórek szkiełka przemywano wodą i umieszczano w buforze rozwijającym (300 mM NaOH i 1 mM EDTA) na 20 min. Następnie wykonywano rozdział elektroforetyczny przez 20 minut (29 V, 300 mA). Ilościową analizę obrazu komety DNA preparatów wybarwionych roztworem DAPI (2 µg/l) wykonano przy użyciu kamery podłączonej do mikroskopu fluorescencyjnego (*Olympus IX70; Tokyo, Japan*). Procentową zawartość DNA w ogonie komety wyliczano za pomocą programu komputerowego *CaspLap* (Wrocław, Polska).

4.8. Metody oceny stresu oksydacyjnego

4.8.1. Oznaczenie zawartości glutationu za pomocą monochlorobimanu

Tripeptyd γ -glutamylcysteinylglycyna (glutation, GSH) odgrywa kluczową rolę w ochronie komórek przed uszkodzeniami powstającymi w wyniku stresu oksydacyjnego. Glutation zbudowany jest z trzech aminokwasów (L-glutamina, cysteina, glicyna) i występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych w dość dużych stężeniach (rzędu 1-10 mM) oraz w dwóch formach: zredukowanej (GHS) i utlenionej (GSSG). Większość komórkowego GSH jest obecna w cytozolu (85–90%), a pozostała część w organellach komórkowych, m. in. w mitochondriach, macierzy jądrowej, peroksysomach i siateczce endoplazmatycznej. Glutation odgrywa bardzo ważną rolę w obronie antyoksydacyjnej, metabolizmie składników odżywczych oraz w wielu procesach i reakcjach komórkowych (ekspresji genów, syntezie DNA i białek, proliferacji, apoptozie oraz przekazywaniu sygnałów w komórce). Jego głównym zadaniem jest utrzymanie grup tiolowych białek w stanie zredukowanym. Sam glutation jest ważnym przeciwutleniaczem, bezpośrednio reagującym z reaktywnymi formami tlenu i azotu, oraz z wolnymi rodnikami. Neutralizuje także endogenne i egzogenne toksyny o charakterze elektrofilowym. W wyniku reakcji glutationu z wolnymi rodnikami powstaje rodnik glutationylowy (GS^{\bullet}), który jest mniej szkodliwy dla komórek. Rodniki tiylowe glutationu mogą łączyć się z różnymi cząsteczkami, jak również z innymi rodnikami tiylowymi, co prowadzi do utworzenia utlenionej formy glutationu – disiarczku glutationu (GSSG). Powstaje on również w reakcjach katalizowanych przez peroksydazę glutationową. GSSG może zostać usunięty z komórki lub ponownie zredukowany do GSH przez reduktazę glutationową przy udziale NADPH, który ulega utlenieniu do $NADP^+$ (Lv i wsp., 2019).

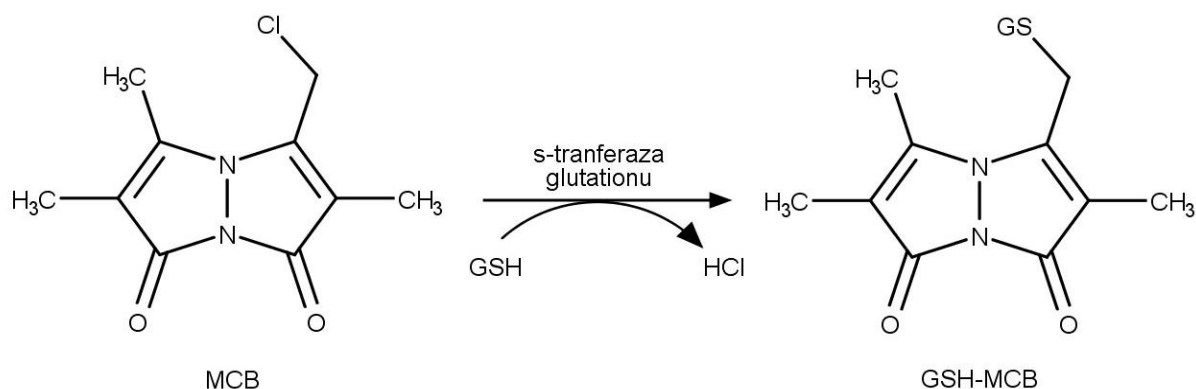
Utrzymanie optymalnego stosunku GSH/GSSG w komórce ma kluczowe znaczenie dla jej przeżycia. Niedobór GSH naraża komórkę na uszkodzenia oksydacyjne. Niski poziom GSH obserwowany jest w patogenezie wielu chorób, w tym nowotworów, zaburzeń neurodegeneracyjnych, mukowiscydozy, cukrzycy, u osób zakażonych wirusem HIV oraz w zaburzeniach pracy wątroby (Sung i in, 2001; Wu i wsp., 2004). Zmiany w stężeniu zredukowanego glutationu mogą wskazywać na zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej.

Zasada metody

Do oznaczenia GSH zastosowano metodę spektrofluorymetryczną z monochlorobimanem (MCB). Monochlorobiman reaguje z glutationem w reakcji katalizowanej przez komórkową S-transferazę glutationu (**Rycina 4.5**). W wyniku reakcji powstaje fluorescencyjny koniugat biman-glutation (GSH-MCB). Dużą zaletą MCB jest jego zdolność do przenikania przez błonę komórkową, dzięki czemu wykorzystywany jest jako sonda do oznaczenia ilości GSH w żywych komórkach (Millis i wsp., 1997; Waak i Dringen, 2006).

Wykonanie oznaczenia

Komórki HMEC-1 wysiewano na czarną, 96-dołkową mikroplótkę (5×10^3 komórek/dołek) i hodowano przez 24 godziny, aby mogły osiągnąć logarytmiczną fazę wzrostu. Następnie dodawano analizowane związki i inkubowano przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie wymieniano medium i kontynuowano hodowlę przez 24 i 48 godzin lub dokonywano pomiaru bezpośrednio po zakończeniu inkubacji ze związkami (czas 0 godz.). Do każdego dołka dodawano roztwór monochlorobimanu w stężeniu końcowym 40 $\mu\text{mol/l}$ i inkubowano w inkubatorze CO_2 do hodowli komórek w temp. 37°C przez 20 minut. Roztwór podstawowy MCB o stężeniu 40 mmol przygotowano rozpuszczając 9 mg odczynnika w 1 ml absolutnego etanolu. Pomiaru fluorescencji dokonywano przy użyciu czytnika mikroplótek *Fluoroscanner Ascent FL* (Labsystem, Finlandia) przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ i fali emisji $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$. Po dokładnym odmyciu barwnika komórki lizowano za pomocą 50 μl buforu lizującego (10 mmol/l TRIS-HCl (pH 8), zawierającego 0,1% Triton X-100. W celu znormalizowania liczby komórek w poszczególnych próbach oznaczano ilość DNA dodając do każdego dołka po pomiarze fluorescencji MCB po 50 μl bromku etydyny (EB, końcowe stężenie 0,2 mmol/l) i mierząc fluorescencję EB przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ i fali emisji $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem krzywej wzorcowej (równanie krzywej: $y = 4,0626x$ (x – nmol/l GSH, y – stosunek fluorescencji GSH-MCB i fluorescencji EB) przeliczano na nmol/l GSH.



Rycina 4.5. Schemat przedstawiający powstanie fluorescencyjnego produktu w wyniku reakcji monochlorobimanu (MCB) z glutationem (GSH). Reakcja jest katalizowana przez S-transferazę glutationu.

4.9. Pomiar kinetyki zmian potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) przy użyciu mikroplatkowej metody spektrofluorymetrycznej z sondą fluoroscencyjną JC-1

Mitochondrialny potencjał transbłonowy (MMP, $\Delta\Psi_m$) generowany jest przez potencjał elektryczny utworzony w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Pomiar MMP jest przydatny do oceny funkcji mitochondriów oraz zaburzeń w funkcjonowaniu błony mitochondrialnej, takich jak np. jej depolaryzacja i hyperpolaryzacja. Depolaryzacja błony mitochondrialnej może być indukowana przez ksenobiotyki, które zakłócają procesy komórkowe oraz zaburzają funkcje mitochondrialne: oddychanie, cykl kwasów trkarboksylowych (TCA), beta-oksydację kwasów tłuszczowych. Spadek MMP może być również związany z generowaniem wolnych rodników oraz indukcją wewnętrznego (mitochondrialnego) szlaku apoptozy. Depolaryzacja błony mitochondrialnej zwiększa przepuszczalność błony mitochondrialnej, co może prowadzić do uwolnienia czynników inicjujących apoptozę, takich jak cytochrom C oraz uruchomienia kaskady apoptozy (Sakamuru i wsp., 2012).

Zasada metody

JC-1 to jedna z najbardziej niezawodnych sond fluorescencyjnych, która wykorzystywana jest do oceny zmian mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi$). W komórkach żywych o nienaruszonej błonie mitochondrialnej lipofilny, kationowy barwnik JC-1 wnika do ujemnie naładowanej macierzy mitochondrialnej jako monomer, gdzie tworzy fluoryzujące agregaty o czerwono-pomarańczowej fluorescencji ($\lambda_{em}=590$ nm). Podczas

depolaryzacji błony mitochondrialnej lub w komórkach apoptotycznych JC-1 pozostaje w postaci monomerów, które wykazują zieloną fluorescencję ($\lambda_{em} = 525$) (Sung i wsp., 2010).

Wykonanie oznaczenia

Komórki (10×10^3 /dołek) wysiewano na czarne, 96-dołkowe płytki i hodowano przez 24 godziny, aby umożliwić im osiągnięcie fazy wzrostu logarytmicznego. Po 24-godzinnej hodowli dodawano badane związki i inkubowano przez 3 godziny w inkubatorze CO_2 , w temp. $37^\circ C$. Po usunięciu medium, monowarstwę komórek przemywano dwukrotnie PBS i do dołków mikropłytki dodawano po 50 μl sondy JC-1 w stężeniu końcowym 5 $\mu mol/l$. Komórki inkubowano z barwnikiem przez 30 minut w inkubatorze CO_2 . Następnie monitorowano zmiany fluorescencji monomerów ($\lambda_{ex} = 485$ nm i $\lambda_{em} = 538$ nm) i agregatów ($\lambda_{ex} = 530$ nm i $\lambda_{em} = 590$ nm) JC-1, wykonując pomiary co 15 min w czasie 0-60 minut po zakończeniu inkubacji z badanymi związkami. Wyniki badanych prób przedstawiono jako stosunek fluorescencji agregatów i monomerów JC-1 w procentach w odniesieniu do stosunku fluorescencji agregatów i monomerów JC-1 kontroli, który przyjęto za 100%. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki inkubowane z 5 μmol CCCP (*m-chlorofenylowodroazyn cyjanku karbonylu*), organiczny związek chemiczny i jonofor, który przenosi jony przez błonę wewnętrzną mitochondrium (Heytler, 1979). CCCP hamuje fosforylację oksydacyjną poprzez rozprzęganie gradientów protonowych, powodując tym samym obniżenie potencjału elektrochemicznego wewnętrznej błony mitochondrialnej.

4.10. Ocena indukcji autofagii metodą spektrofluorymetryczną

Autofagia występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych, które wykorzystują ten proces do usuwania uszkodzonych organelli i białek. Proces ten pozwala utrzymać wewnątrzkomórkową homeostazę, reguluje odporność, zapobiega neurodegeneracji, hamuje rozwój nowotworów, a w warunkach niedoboru substancji odżywczych zaopatruje komórki w aminokwasy odzyskane ze zdegradowanych białek. Wyróżnia się trzy główne typy autofagii, które różnią się mechanizmem dostarczania substratu do lizosomów: mikroautofagię, makroautofagię oraz autofagię zależną od chaperonów. Najczęściej obserwowanym procesem w komórkach jest makroautofagia, która jest ogólnie określana jako autofagia.

Proces autofagii zostaje aktywowany w odpowiedzi na brak substancji odżywczych, stres oksydacyjny, stymulację hormonalną, infekcje bakteryjne, wirusowe oraz leki (Kocaturk i wsp., 2019). Po zainicjowaniu procesu rozpoczyna się nukleacja fagoforu. Fagofor to błona izolująca, pochodząca z retikulum endoplazmatycznego lub mitochondriów, która otacza białka lub organelle komórkowe mające ulec degradacji, aż do całkowitego ich zamknięcia i utworzenia struktury zwanej autofagosomem. Następnie w procesie zwanym fuzją, autofagosom łączy się z lizosomem, którego enzymy rozkładają zawartość autofagosomu (Towers i Thorburn, 2016; Wu i Adamopoulos, 2017). Autofagia jest regulowana przez geny ATG, które kodują białka zaangażowane w każdy etap procesu. W sytuacji, kiedy autofagia nie występuje lub jej przebieg jest zakłócony przez czynniki zewnętrzne dochodzi do akumulacji uszkodzonych organeli, białek onkogennych i nadmiaru reaktywnych form tlenu. Czynniki te mogą prowadzić do zwiększonego ryzyka powstawania nowotworów (Bohl i wsp., 2019).

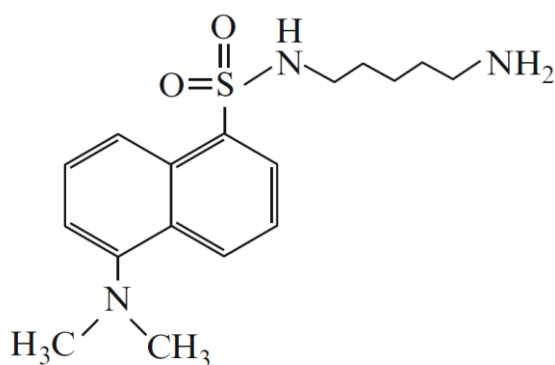
Zasada metody

Indukcję autofagii w komórkach traktowanych badanymi lekami oznaczano na podstawie pomiaru fluorescencji MDC według zmodyfikowanej metody opisanej przez Vazquez (2009). Monodansylokadaweryna (MDC) wykazuje właściwości autofluorescencyjne przy długości fali wzbudzenia 365 nm ze względu na obecność grupy dansylowej sprzężonej z kadaweryną (**Rycina 4.6**). W komórce MDC gromadzi się w bogatych w lipidy błonach komórkowych. Wykazano, że MDC może zostać użyta jako barwnik do wykrywania autofagii, ponieważ gromadzi się w autofagolizosomach w wyniku oddziaływania z lipidami błonowymi (Contento i wsp., 2005; Biederbick i wsp., 1995).

Wykonanie oznaczenia

Komórki linii HMEC-1 (5×10^3 komórek/dołek) wysiewano na czarne 96-dołkowe mikroplątki i hodowano przez 24 godziny, aby umożliwić im osiągnięcie logarytmicznej fazy wzrostu. Następnie dodawano badane związki w odpowiednich stężeniach i inkubowano z komórkami przez kolejne 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji wymieniano medium i kontynuowano hodowlę przez 24 i 48 godzin (czas 24 h i 48 h) lub dokonywano pomiaru bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (czas 0 h). Następnie komórki inkubowano z monodansylokadaweryną w stężeniu końcowym $50 \mu\text{mol/l}$ przez 15 minut w 37°C . Po tym

czasie usuwano sondę i lizowano komórki dodając 50 μ l buforu lizującego (10 mmol/l TRIS-HCl, pH 8, zawierający 0,1% Triton X-100). Natężenie fluorescencji wewnątrzkomórkowej MDC mierzono przy użyciu czytnika do mikroplacytek firmy *Fluorocan Ascent FL (Labsystem, Finlandia)* przy długości fali wzbudzenia 335 nm oraz fali emisji 512 nm. W celu znormalizowania liczby komórek w poszczególnych próbach oznaczano ilość DNA dodając do każdego dołka po zakończeniu pomiaru fluorescencji MDC po 50 μ l bromku etydyny (EB) (końcowe stężenie 0,2 mmol/l). Fluorescencję EB mierzono przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 530$ nm i fali emisji $\lambda_{em} = 590$ nm. Wynik końcowy wyliczano jako stosunek fluorescencji MCD do fluorescencji EB.



Rycina 4.6. Wzór strukturalny monodansylokadaweryny (MDC).

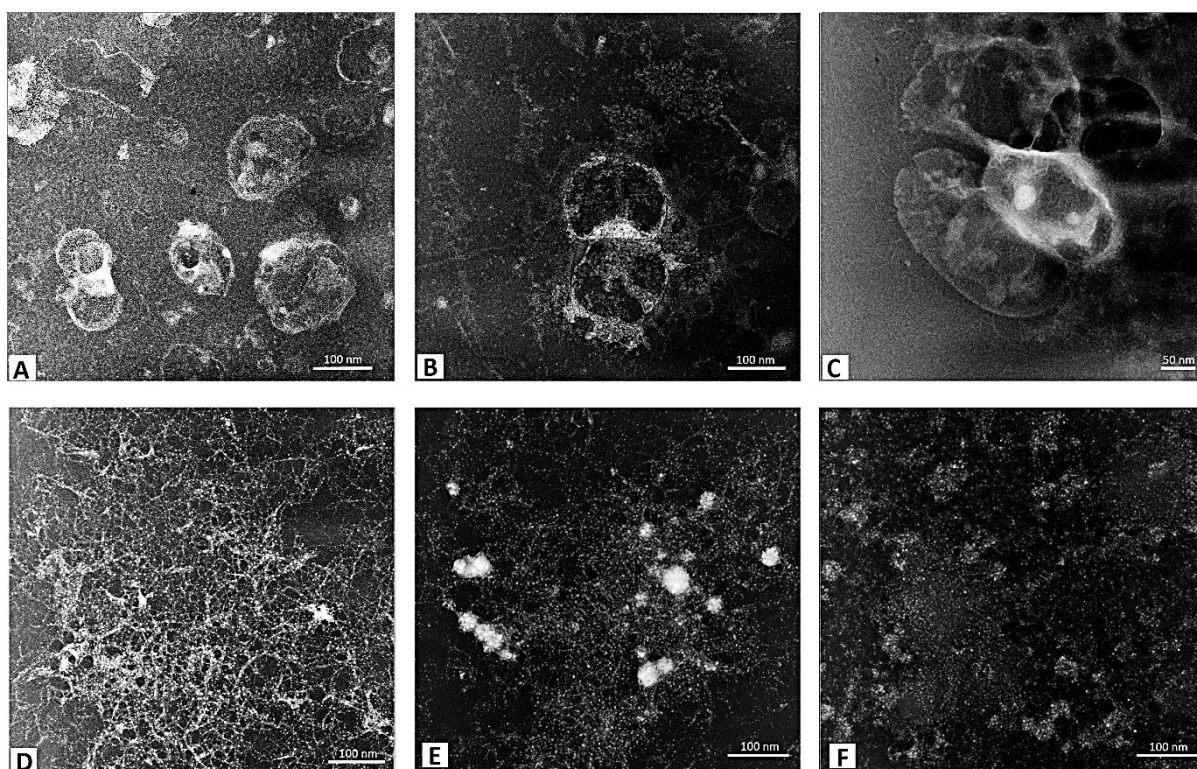
4.11. Analiza statystyczna

Ocenę istotności statystycznej wyników wykonano przy użyciu programu *STATISTICA* firmy *StatSoft, USA*. Zastosowano analizę wariancji jednoczynnikowej ANOVA oraz *test post-hoc Tukeya dla porównań wielokrotnych*. Poziom istotności wyników wynosił $p < 0,05$. Średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe obliczano przy użyciu programu *Microsoft Excel (program pakietu Microsoft Office 2019, Microsoft Corporation, USA)*. Wyniki badań przedstawiono w formie średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego (SD).

5. WYNIKI

5.1. Kształt i morfologia nanonośnika liposomalnego

Morfologię liposomów oceniano za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Obrazy mikroskopowe pokazują podobieństwa i różnice pomiędzy analizowanymi strukturami (**Rycina 5.1**). W preparatach zawierających puste liposomy (A) widoczne są pęcherzyki o kulistym kształcie. Enkapsulacja taksanów (B-C) nie wpływała znacząco na kształt i rozmiar liposomów, który nie przekraczał 200 nm. Na powierzchni liposomów można zaobserwować kryształki leków. W preparatach, w których analizowano liposomy skoniugowane z peptydem gH625 (D-F) widoczne są włókniste struktury świadczące o obecności peptydu.



Rycina 5.1. Obrazy mikroskopowe liposomów analizowanych przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).

A – pusty liposom,

B – liposom z enkapsulowanym paklitakselem,

C – liposom z enkapsulowanym docetakselem,

D – liposom skoniugowany z peptydem gH625,

E – liposom z enkapsulowanym paklitakselem oraz skoniugowanym peptydem gH625 oraz

F – liposom z enkapsulowanym docetakselem oraz skoniugowanym peptydem gH625.

5.2. Cytotoksyczność wolnych i liposomalnych taksanów wobec komórek endotelialnych linii HMEC-1

Oznaczenie cytotoksyczności jest nieodzownym procesem w określeniu aktywności przeciwnowotworowej nowych związków oraz w wyznaczeniu dawek terapeutycznych nowych leków. Metody oceny żywotności komórek oparte są głównie na pomiarze wskaźnika aktywności metabolicznej (Riss i wsp., 2011). Istotnym parametrem w ocenie potencjału terapeutycznego nowego związku jest jego stężenie hamujące IC_{50} (*ang. inhibitory concentration*), które powoduje zahamowanie proliferacji komórek o 50% w stosunku do komórek kontrolnych. Określenie tej wartości jest jednym z najważniejszych etapów w procesie wstępnego oszacowania skuteczności działania oraz potencjału leku (Nevozhay, 2014; Aykul i Martinez-Hackert, 2016). Stężenie IC_{50} nie jest jednak cechą charakterystyczną dla danej substancji i może różnić się w zależności od warunków termodynamicznych, w których jest wyznaczone oraz zastosowanej metody oznaczenia.

Cytotoksyczność wolnych i liposomalnych taksanów wobec komórek linii HMEC-1 oznaczono trzema metodami: testem redukcji XTT, testem z sulforodaminą (SRB) oraz testem z resazuryną (REMA). Komórki inkubowano z lekiem/nanonośnikami/peptydem gH625 przez 24 godziny, a następnie hodowano w medium bez związków przez 48 godzin. Po tym czasie oznaczano żywotność komórek ww. testami. Przeżywalność komórek określano na podstawie odsetka żywych komórek w badanej próbie w stosunku do komórek kontrolnych (komórki traktowane PBS), których żywotność przyjmowano za 100%.

Cytotoksyczność wolnych taksanów

Wartości stężeń IC_{10} , IC_{50} i IC_{90} wolnych taksanów wyznaczono z krzywych, określających zależność przeżywalności komórek od logarytmu stężenia leków. Obliczenia wykonano korzystając z analizy regresji nieliniowej w programie *GraphPad Prism 7.00* (*GraphPad Software Inc., San Diego, USA*). Na podstawie uzyskanych wyników wyliczono wartości stężeń $0,5 IC_{50}$ oraz $2 IC_{50}$. Wyznaczone stężenia zamieszczono w **Tabeli 5.1**.

Tabela 5.1. Wartości stężeń IC_{10} , $0,5 IC_{50}$, IC_{50} , $2 IC_{50}$ i IC_{90} (nmol/l) PTX i DTX dla komórek linii HMEC-1, inkubowanych z taksanami przez 24 godziny, a następnie hodowane w medium bez leku przez 48 godzin. Żywotność komórek oceniano dwoma mikroplótkowymi metodami spektrofotometrycznymi (XTT i SRB) oraz mikroplótkową metodą spektrofluorymetryczną z resazuryną (REMA). W nawiasach podano 95% przedziały ufności dla wartości stężenia IC_{50} .

		IC_{10}	$0,5 IC_{50}$	IC_{50}	$2 IC_{50}$	IC_{90}
PTX	XTT	5,21	5,96	11,92 (10,11 – 14,38)	23,84	27,28
	REMA	4,18	9,72	19,43 (14,96 – 25,05)	38,86	90,36
	SRB	11,28	12,97	25,93 (20,57 – 31,79)	51,86	59,60
DTX	XTT	1,99	3,79	7,58 (5,76 – 10,03)	15,15	28,77
	REMA	10,56	7,08	14,15 (13,12 – 15,45)	28,3	18,96
	SRB	4,32	5,9	11,8 (9,24 – 14,7)	23,6	32,24

Zastosowane testy cytotoksyczności wykazały zależność dawka-efekt. Wraz ze wzrostem stężenia leku obserwowano progresywne hamowanie proliferacji komórek (**Ryciny 5.2 i 5.3**). Wyniki, uzyskane w poszczególnych testach wykazywały znaczne różnice, np. wartości stężenia IC_{50} dla PTX oznaczone testem SRB i testem z resazuryną (REMA) były odpowiednio 2-krotnie i 1,5-krotnie wyższe od wartości stężenia IC_{50} wyznaczonej testem XTT. Podobne rozbieżności występowały także w przypadku DTX. Testem SRB i testem REMA uzyskano podobne wartości stężeń IC_{50} dla tego leku, ale tak jak w przypadku PTX były one ok. 2-krotnie (SRB) i 1,5-krotnie (REMA) wyższe od wartości wyznaczonych testem XTT.

Porównanie wartości IC_{50} obu taksanów wskazuje jednoznacznie, że docetaksel jest bardziej toksycznym lekiem dla komórek endotelialnych HMEC-1 niż paklitaksel. Największą różnicę odnotowano w teście z sulforodaminą (SRB). Wartość stężenia IC_{50} dla docetakselu wynosiła 11,8 nmol/l i była dwukrotnie niższa niż wartość stężenia IC_{50} dla paklitakselu 25,93 (nmol). Uzyskane testem XTT wartości stężeń IC_{90} dla obu taksanów były zbliżone, podczas gdy w pozostałych testach wartość stężenia IC_{90} uzyskana dla DTX była znacznie niższa od tej dla PTX.

Cytotoksyczność liposomalnych taksanów

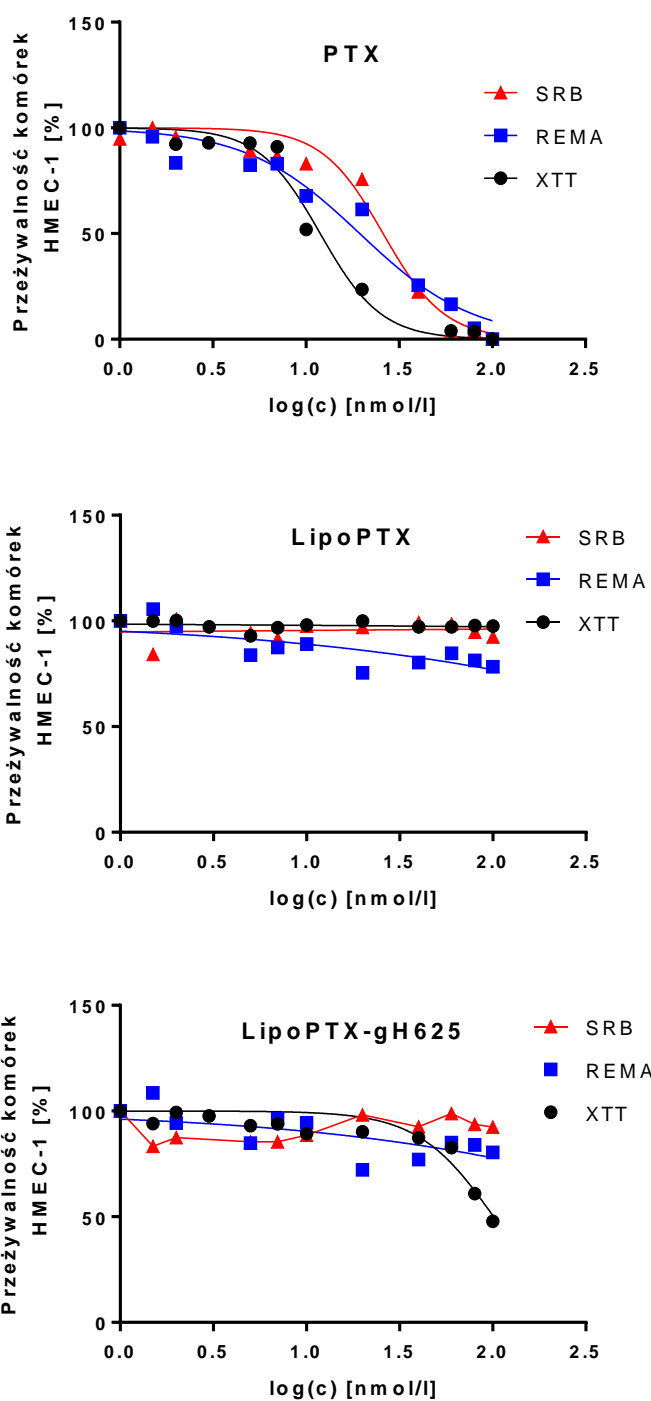
Taksany w formie liposomalnej nie wpływały istotnie na przeżywalność komórek endotelialnych linii HMEC-1. Wartość stężenia IC_{50} (104,2 nmol/l) udało się określić jedynie testem XTT dla liposomalnego paklitakselu z dołączonym peptydem gH625. Była ona zbliżona do wartości najwyższego stężenia (IC_{90}) wolnego leku. W pozostałych próbach spadek przeżywalności komórek po potraktowaniu lekami w zakresie stężeń IC_{10} - IC_{90} , wyznaczonych dla wolnych leków, nie przekraczał 30%. Test z resazuryną wykazał obniżoną przeżywalności komórek inkubowanych z liposomalnym paklitakselem dla stężenia leku powyżej 20 nmol/l. Przeżywalność komórek mieściła się w zakresie 70-80% (**Rycina 5.2**).

W testach z liposomalnym docetakselem natomiast wykazano mniejsze zmiany i w każdej z metod odnotowano podobny poziom przeżywalności komórek – powyżej 85% (**Ryciny 5.3**).

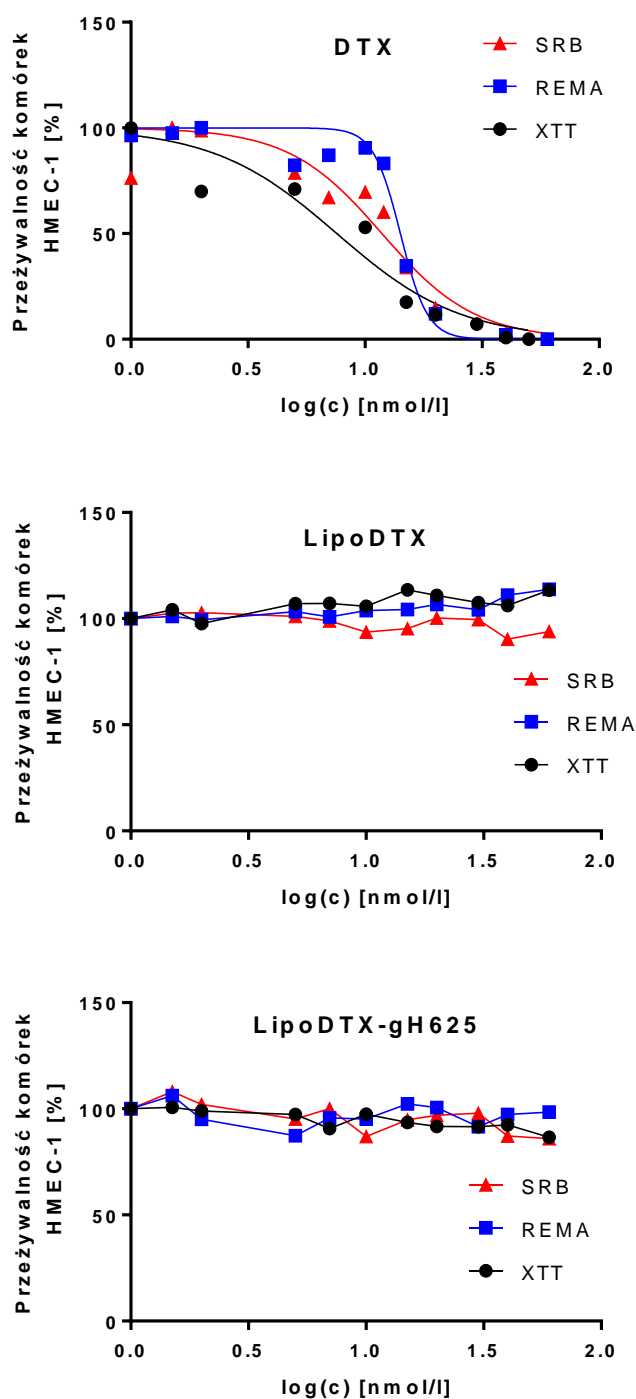
Ocena cytotoksyczności nanonośników liposomalnych i peptydu gH625

Inkubacja z nanonośnikami (pusty liposom/pusty liposom skoniugowany z peptydem gH625) lub z samym peptydem gH625 nie wpływała istotnie na przeżywalność komórek, która utrzymywała się na podobnym poziomie, niezależnie od zastosowanego testu cytotoksyczności, a średnie wyniki przeżywalności nie były niższe niż 95% (**Rycina 5.4**).

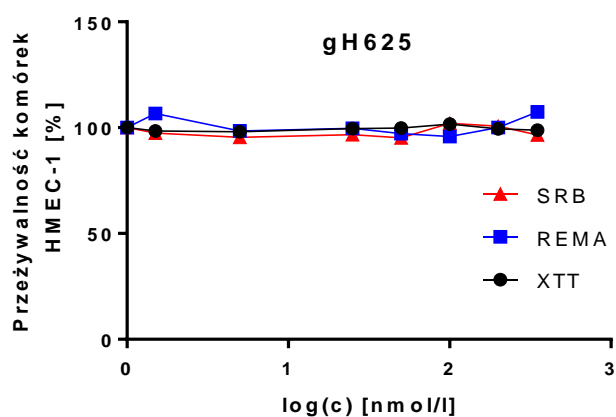
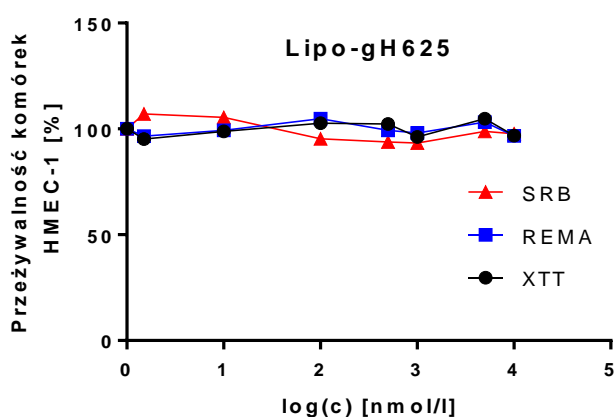
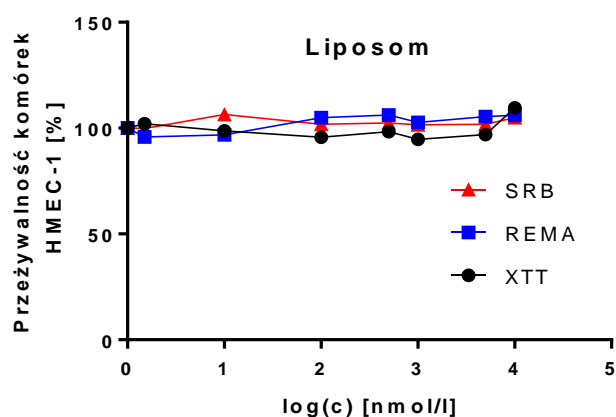
Na podstawie analizy uzyskanych w badaniach cytotoksyczności podjęto decyzję o zastosowaniu w dalszych eksperymentach stężeń IC_{10} ; 0,5 IC_{50} ; IC_{50} ; 2 IC_{50} oraz IC_{90} , wyliczonych z krzywych przeżywalności opracowanych na podstawie wyników otrzymanych metodą z XTT. Wartości IC_{50} uzyskane tą metodą charakteryzują się węższymi przedziałami ufności. Ponadto testy wykorzystujące barwniki tetrazolowe są najczęściej stosowanymi testami w analizie cytotoksyczności nowych związków i leków w piśmiennictwie naukowym (Aykul i Martinez-Hackert, 2016), co ułatwia porównanie własnych wyników z wynikami innych autorów.



Rycina 5.2. Krzywe przeżywalności komórek HMEC-1 inkubowanych z wolnym i liposomalnym paklitakselem przez 24 godziny. Do oznaczenia żywotności komórek wykorzystano trzy testy cytotoksyczności (z XTT, REMA i SRB). Wartości stężeń IC_{10} , IC_{50} i IC_{90} leku wyznaczono z krzywych określających zależność przeżywalności komórek od logarytmu stężenia leków. Obliczenia wykonano korzystając z analizy regresji nieliniowej w programie *GraphPad Prism 7.00* (*GraphPad Software Inc., San Diego, USA*). Na podstawie uzyskanych wyników wyliczono wartości stężeń $0,5 IC_{50}$ i $2 IC_{50}$ leku. Dla lepszej czytelności wykresów pominięto słupki błędów.



Rycina 5.3. Krzywe przeżywalności komórek HMEC-1 inkubowanych z wolnym i liposomalnym docetakselem przez 24 godziny. Do oznaczenia żywotności komórek wykorzystano trzy testy cytotoksyczności (z XTT, REMA i SRB). Wartości stężeń IC_{10} , IC_{50} i IC_{90} leku wyznaczono z krzywych określających zależność przeżywalności komórek od logarytmu stężenia leków. Obliczenia wykonano korzystając z analizy regresji nieliniowej w programie *GraphPad Prism 7.00* (*GraphPad Software Inc., San Diego, USA*). Na podstawie uzyskanych wyników wyliczono wartości stężeń $0,5 IC_{50}$ i $2 IC_{50}$ leku. Dla lepszej czytelności wykresów pominięto słupki błędów.



Rycina 5.4. Wpływ nanoosników paklitakselu i docetakselu oraz peptydu gH625 na przeżywalność komórek linii HMEC-1. Komórki inkubowano przez 24 godziny z rosnącymi stężeniami liposomów, liposomów skoniugowanych z peptydem gH625 lub samym peptydem gH625. Do określenia żywotności komórek (%) wykorzystano trzy testy cytotoksyczności (z XTT, REMA i SRB). Krzywe przeżywalności wykreślono za pomocą oprogramowania *GraphPad Prism 7.00* (*GraphPad Software Inc., San Diego, USA*). Dla lepszej czytelności wykresów pominięto słupki błędów.

5.3. Właściwości antyproliferacyjne wolnych i liposomalnych taksanów

5.3.1. Zaburzenia cyklu komórkowego

Właściwości antyproliferacyjne i cytostatyczne paklitakselu i docetakselu, podobnie jak innych cytostatyków, wynikają przede wszystkim z ich zdolności do hamowania cyklu mitotycznego komórek nowotworowych. Taksany należą do leków antymitotycznych, a ich głównym mechanizmem działania jest stabilizacja mikrotubul, która prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego komórek nowotworowych w punkcie kontrolnym G2/M. W podobny sposób taksany mogą przejawiać swój efekt toksyczny wobec komórek prawidłowych.

Analizę cyklu podziałowego komórek linii HMEC-1 po ich potraktowaniu taksanami wykonano metodą cytometrii przepływowej, po uprzednim zabarwieniu komórek jodkiem propidyny. Komórki inkubowano przez 24 godziny z różnymi stężeniami wolnych lub liposomalnych taksanów. Rozkład cyklu komórkowego analizowano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji z lekami – 0 godzin (na wykresach 0 h) oraz po 24- i 48-godzinnej hodowli komórek w medium pozbawionym leków (hodowla poinkubacyjna 24 i 48 godzin, na wykresach oznaczonych jako 24 h i 48 h). Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu podziałowego wyliczano za pomocą algorytmu *Watsona*, który jest modelem obliczeniowym zawartym w programie *FlowJo 7.6.1 (Ashland, OR, USA)*. Wyniki przedstawiono na **Rycinach 5.5 – 5.7** oraz w **Tabelach 5.2 – 5.8**.

Wpływ wolnych taksanów

24-godzinna inkubacja komórek z wolnymi lekami powodowała zatrzymanie komórek w punkcie kontrolnym G2/M, co świadczy o cytostatycznym działaniu PTX i DTX. Akumulacja komórek w punkcie kontrolnym G2/M powodowała zmniejszenie frakcji komórek w fazie G1. Zmiany były zależne zarówno od stężenia leków, jak i czasu hodowli poinkubacyjnej komórek. Największy spadek frakcji komórek w fazie G1 zaobserwowano bezpośrednio po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji z lekami (czas 0 h). W komórkach traktowanych PTX spadek ten był istotny statystycznie jedynie dla wysokich stężeń cytostatyku ($>IC_{50}$), podczas gdy zmiany spowodowane przez DTX były istotne statystycznie dla wszystkich stężeń leku. Dla tych samych stężeń taksanów odnotowano także istotny statystycznie i zależny od stężenia leku wzrost frakcji komórek w punkcie kontrolnym G2/M. Jedynie najniższe stężenie DTX (IC_{10}) nie powodowało istotnego wzrostu tej frakcji.

Największe nagromadzenie komórek w punkcie kontrolnym G2/M (70%) stwierdzono dla najwyższych stężeń taksanów. Niskie stężenia PTX (IC_{10} i $0,5 IC_{50}$) powodowały zmniejszenie frakcji komórek w fazie G1 dopiero po ich 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej w medium bez leków (czas 24 h). Zmiany te nie były jednak tak duże jak te obserwowane bezpośrednio po zakończeniu inkubacji komórek z lekiem (czas 0 h). Po 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej istotny statystycznie wzrost frakcji G2/M obserwowano jedynie dla niskich stężeń leków (PTX= $0,5 IC_{50}$ i DTX= IC_{10}). Po 48-godzinnej hodowli poinkubacyjnej (czas 48 h) nie odnotowano istotnego wzrostu frakcji komórek znajdujących się w punkcie kontrolnym G2/M.

Wpływ liposomalnych taksanów

Liposomalne taksany nie powodowały tak dużych zmian w przebiegu cyklu komórkowego, jak wolne leki. Istotny statystycznie wzrost frakcji komórek G2/M obserwowano jedynie dla najwyższych stężeń ($2 IC_{50}$ oraz IC_{90}) liposomalnego paklitakselu z przyłączonym peptydem gH625 po 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej (48 h). Wysokie stężenia liposomalnego docetakselu powodowały natomiast istotny spadek odsetka komórek znajdujących się w fazie G1. Liposomalny lek w stężeniu IC_{90} bez przyłączonego peptydu gH625 powodował spadek frakcji G1 w czasie 0 h oraz 24 h. Natomiast podobne zmiany w komórkach traktowanych takim samym stężeniem liposomalnego DTX z przyłączonym peptydem gH625 obserwowano znacznie później – po 24 h i 48 h.

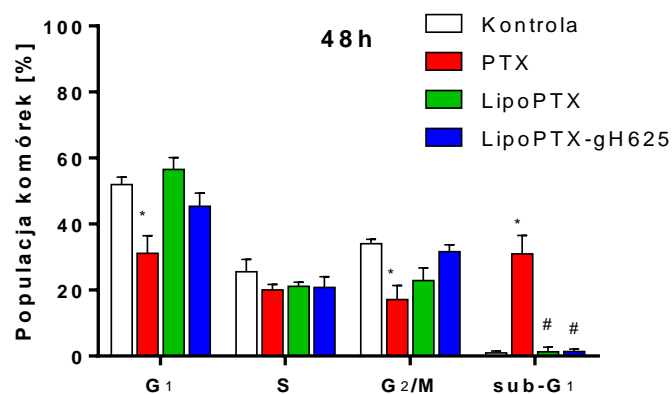
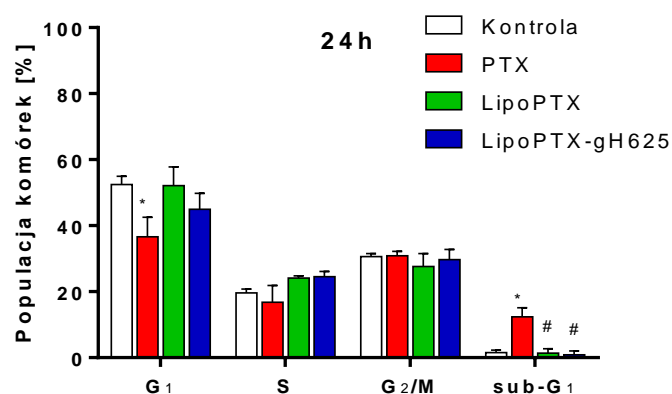
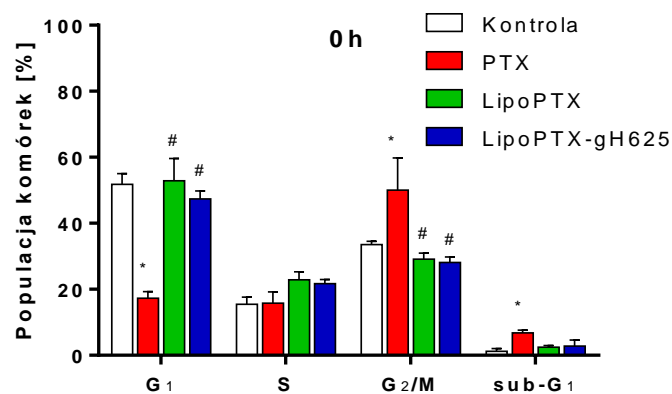
Liposomalny paklitaksel powodował mniejsze zmiany we frakcji komórek znajdujących się w punkcie kontrolnym G2/M niż wolny paklitaksel. Frakcja komórek apoptotycznych sub-G1 po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej również była istotnie mniejsza w komórkach inkubowanych z liposomalnym paklitakselem w stężeniach wyższych od IC_{50} w czasie 0 h oraz 24 h. Procentowy udział w fazie G1 komórek inkubowanych z liposomalnym docetakselem, bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (0 h) oraz po 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej niezależnie od stężenia leku, był znacznie większy niż w przypadku komórek inkubowanych z wolnym docetakselem. Podobnie jak w przypadku liposomalnego paklitakselu frakcja sub-G1 również była istotnie mniejsza w czasie 24 h i 48 h dla stężeń powyżej IC_{50} .

Wpływ nanonosników liposomalnych i peptydu gH625

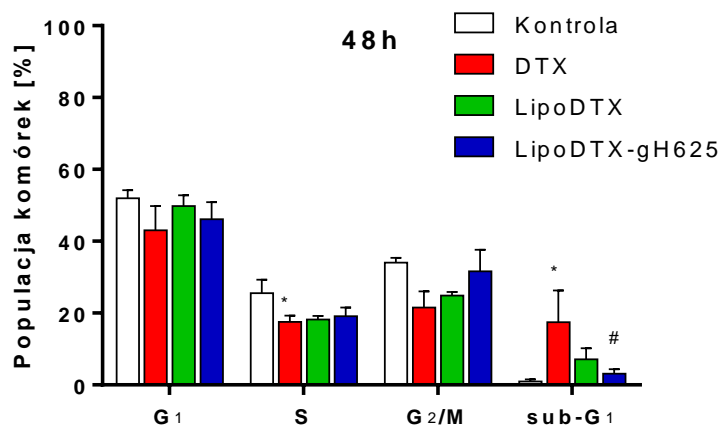
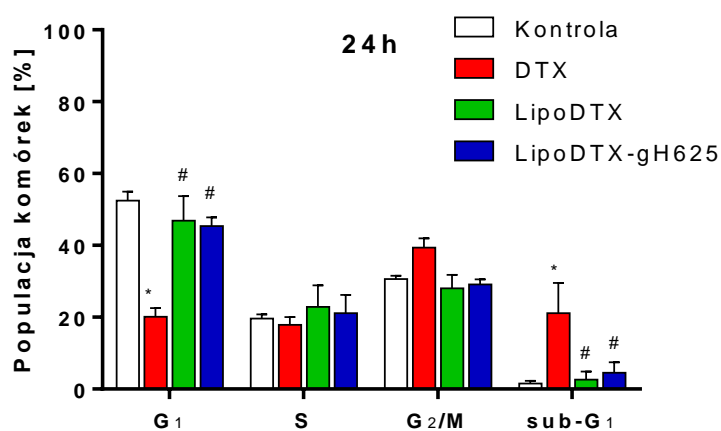
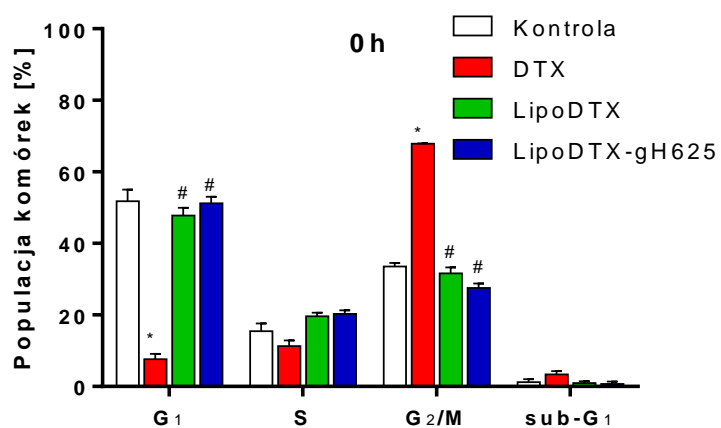
Inkubacja komórek z samymi przenośnikami lub samym peptydem (bez taksanów) nie powodowała znaczących zmian ilości komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w porównaniu do komórek kontrolnych (**Rycina 5.4, Tabela 5.8**). Jedynie kombinacje LipoMIN-gH625 i Lipo-gH625max powodowały ok. 13% istotny spadek odsetka komórek w fazie G2/M w czasie 0 h. Kombinacja LipoMIN-gH625 powodowała również ok. 16% spadek frakcji komórek w fazie S po 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej (czas 48 h).

Wpływ antyoksydantów

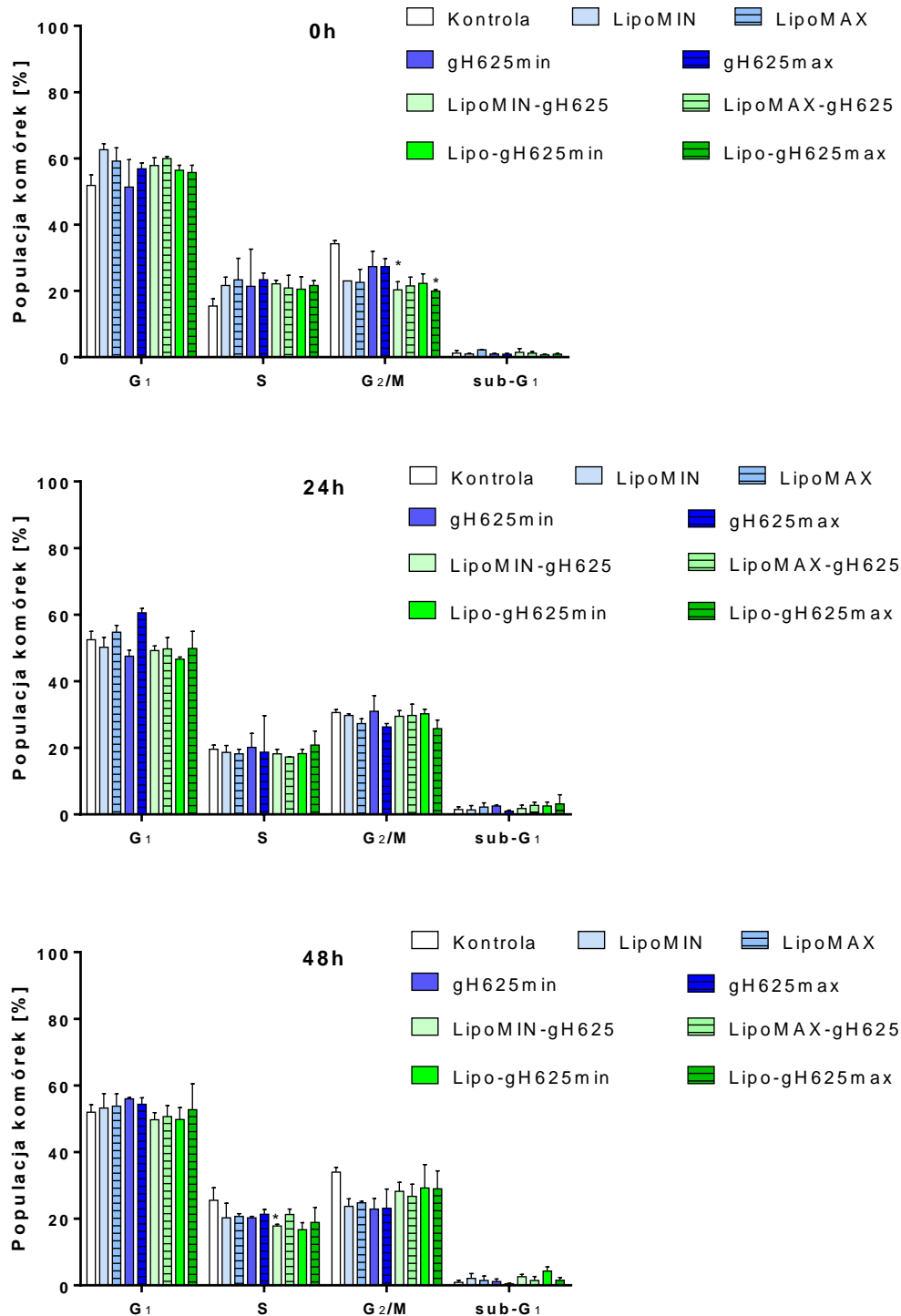
Preinkubacja komórek z antyoksydantami (NAC, Troloks, Tiron) nie powodowała istotnych zmian w przebiegu cyklu komórkowego z wyjątkiem komórek traktowanych liposomalnym DTX w stężeniach 0,5 IC₅₀ i IC₅₀ i preinkubowanych z Troloksem i Tironem, w których odnotowano wzrost frakcji komórek w punkcie kontrolnym G2/M po 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej w medium bez leku.



Rycina 5.5. Wpływ stężenia IC₅₀ wolnego paklitakselu (PTX), liposomalnego paklitakselu (LipoPTX) oraz liposomalnego paklitakselu z przyłączonym peptydem gH625 (LipoPTX-gH625) na rozkład cyklu podziałowego komórek linii HMEC-1 inkubowanych przez 24 godziny z lekiem. Komórki analizowano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji z lekiem oraz po upływie 24 i 48 godzin hodowli poinkubacyjnej w medium bez leku.
*p < 0,05 względem kontroli; #p < 0,05 względem wolnego PTX.



Rycina 5.6. Wpływ stężenia IC_{50} wolnego docetakselu (DTX), liposomalnego docetakselu (LipoDTX) oraz liposomalnego docetakselu z przyłączonym peptydem penetrującym gH625 (LipoDTX-gH625) na rozkład cyklu komórkowego komórek linii HMEC-1 inkubowanych przez 24 godziny z lekiem. Komórki analizowano po upływie 0, 24 oraz 48 godzin hodowli poinkubacyjnej w medium bez leku. * $p < 0,05$ względem kontroli; # $p < 0,05$ względem DTX.



Rycina 5.7. Wpływ minimalnego i maksymalnego stężenia nanoosnika liposomalnego, peptydu gH625 oraz ich koniugatu na cykl komórkowy komórek linii HMEC-1. Komórki inkubowano przez 24 godziny z nanoosnikiem/peptydem i analizowano bezpośrednio po jej zakończeniu (0 godzin) lub po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej w medium bez nanoosnika/peptydu. * $p < 0,05$ względem kontroli

Tabela 5.2. Procentowy udział komórek linii HMEC-1 (średnia ± SD) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego– wpływ wolnego paclitakselu (PTX) i antyoksydantów. Komórki inkubowano z lekiem przez 24 godziny bez antyoksydantu lub po 1-godzinnej preinkubacji z antyoksydantem: NAC (3 mM), Troloks (50 μM), Tiron (50 μM). Analizy cyklu komórkowego dokonano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (0 godz.) lub po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez związków. *p<0,05 względem kontroli; #p<0,05 względem wolnego PTX.

	0 h				24 h				48 h			
	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1
Kontrola	51,83±3,21	15,46±2,18	34,23±0,97	1,23±0,81	52,45±2,50	19,59±1,22	30,62±0,88	1,50±0,80	51,96±2,25	25,55±3,75	34,02±1,39	0,93±0,59
Kontrola + NAC	57,48±2,87	19,83±0,21	28,93±0,11	0,50±0,28	48,35±4,03	20,05±1,20	27,80±2,12	3,80±0,71	54,65±5,16	19,75±0,78	25,70±1,98	2,00±1,56
Kontrola + Troloks	59,25±1,34	18,20±1,41	25,80±2,12	1,35±0,64	50,70±3,54	18,40±1,27	26,75±0,64	3,10±1,41	51,35±2,90	18,25±2,76	29,10±1,13	2,35±0,49
Kontrola + Tiron	53,60±0,99	20,55±1,63	26,30±1,41	1,00±0,14	48,65±3,32	18,50±2,55	32,55±1,91	0,80±0,42	54,30±2,83	17,20±1,41	22,65±1,91	2,95±1,20
PTX IC10	47,05±4,17	20,70±2,12	23,55±0,21	5,10±1,84	37,55±1,20*	21,10±2,83	38,10±1,41	2,75±0,49	42,70±1,56	21,80±3,54	32,20±2,97	2,30±0,57
PTX 0,5 IC50	39,00±2,69	20,30±2,55	24,60±1,56	10,35±5,87*	29,25±1,63*	19,10±1,41	51,55±1,20*	2,95±1,63	35,80±3,39*	19,95±3,89	29,70±7,64	12,60±4,38
PTX IC50	17,30±1,98*	15,75±3,46	50,00±9,76*	6,80±0,85*	36,65±5,87*	16,75±5,16	30,90±1,27	12,40±2,69*	31,16±5,32*	20,05±1,63	17,10±4,24*	31,00±5,51*
PTX 2 IC50	11,00±2,55*	13,55±2,19	63,20±4,53*	5,25±0,35	29,00±0,42*	18,85±1,20	35,70±0,85	12,85±0,64*	32,31±1,85*	22,75±1,77	18,25±1,20*	23,25±0,64*
PTX IC90	10,40±0,28*	9,25±0,35	70,90±0,42*	4,25±0,49	24,00±1,13*	20,80±1,41	35,15±0,35	16,25±0,92*	27,80±2,12*	18,70±1,98	25,65±5,16	31,20±2,69*
PTX IC10 + NAC	50,86±3,32	21,75±3,61	30,89±1,15	1,75±0,21	37,90±2,12*	20,75±3,32	36,55±3,61	2,65±0,78	43,15±2,19	22,80±2,12	32,65±3,61	2,65±1,06
PTX 0,5 IC50 + NAC	45,25±3,75	23,45±2,62	31,60±1,98	1,75±0,49#	30,25±3,04*	21,90±1,13	47,80±0,57*	2,70±1,98	36,25±4,03*	19,50±4,53	27,75±4,88	13,95±2,47*
PTX IC50 + NAC	35,30±3,97*#	24,75±0,21	38,00±1,10#	3,55±2,33	32,20±2,55*	20,75±1,91	40,75±7,57	7,55±2,05	33,06±2,63*	19,20±2,83	25,00±0,99	21,25±4,31*
PTX 2 IC50 + NAC	30,26±0,49*#	26,45±2,62	39,46±2,43#	4,00±0,85	33,60±2,55*	21,60±2,12	33,35±4,31	11,35±1,77*	33,10±2,97*	22,30±1,13	20,85±4,88	19,35±2,76*
PTX IC90 + NAC	28,06±1,06*	25,95±1,20	51,43±1,32*#	3,15±0,35	31,80±1,98*	22,70±3,68	31,95±3,18	11,40±2,83*	26,80±3,54*	18,70±1,98	25,65±5,16	31,45±3,04*
PTX IC10 + Troloks	45,35±4,03	20,55±1,91	36,05±0,78	2,15±0,35	41,50±2,97	22,20±1,27	32,35±3,61	3,20±0,42	38,30±1,56	19,75±3,61	31,55±1,20	6,80±0,57
PTX 0,5 IC50 + Troloks	43,10±1,13	16,05±0,64	34,30±0,57	4,00±1,56#	34,45±3,04	21,40±1,84	43,60±0,57	2,15±2,05	38,10±2,97	21,25±2,62	28,85±2,19	9,30±4,24
PTX IC50 + Troloks	32,40±1,41*	23,25±3,75	37,50±2,40	6,95±1,20*	36,40±2,55	21,25±2,62	36,55±7,57	4,90±1,13	33,55±3,04	23,70±0,85	28,85±2,19	15,40±3,82*
PTX 2 IC50 + Troloks	21,75±3,04*	22,35±2,47	56,13±4,14*	6,40±2,55*	38,15±2,05	21,10±1,41	29,15±4,31	9,85±1,06	37,05±4,31	17,75±0,78	25,60±2,12	19,60±5,66*
PTX IC90 + Troloks	21,26±1,90*	26,60±4,24	53,79±4,80*#	5,85±0,64	36,00±1,98	23,70±2,26	29,30±0,99	8,75±3,61	30,45±2,76	21,15±4,17	31,75±3,46	16,65±2,05*
PTX IC10 + Tiron	44,52±2,86	23,10±2,69	29,73±3,51	2,45±1,77	44,25±4,17	22,60±2,26	32,85±2,33#	1,00±0,42	35,10±7,07	23,50±2,26	32,40±3,25	5,85±3,61
PTX 0,5 IC50 + Tiron	37,54±3,05*	28,70±0,85	32,90±0,19	3,20±2,83#	47,15±0,49	20,70±3,39	31,95±3,89	1,95±0,92	48,15±5,44*	19,05±2,47	23,30±4,24	8,90±1,98
PTX IC50 + Tiron	34,93±6,12*#	21,68±2,57	37,62±8,96	3,15±1,20	38,70±2,12*	20,25±1,34	34,00±2,26	5,35±2,76	32,95±2,47	18,80±2,12	26,80±3,54	20,50±6,79*
PTX 2 IC50 + Tiron	21,69±4,24*	32,98±3,39*	46,84±0,23*	6,05±2,47	35,15±3,75*	22,40±2,97	32,95±2,05	7,70±4,95	39,75±3,61	18,30±1,41	25,20±6,93	16,75±11,95*
PTX IC90 + Tiron	23,11±1,99*	25,49±4,12	54,65±2,47*#	5,55±0,92	35,60±1,13*	21,45±2,33	33,40±1,84	7,75±3,61#	37,55±3,61	22,75±2,19	22,30±1,56	17,60±3,96*#

Tabela 5.3. Procentowy udział komórek linii HMEC-1 (średnia ± SD) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego– wpływ liposomalnego paclitakselu (PTX) i antyoksydantów. Komórki inkubowano z lekiem przez 24 godziny bez antyoksydantu lub po 1-godzinnej preinkubacji z antyoksydantem: NAC (3 mM), Troloks (50 μM), Tiron (50 μM). Analizy cyklu komórkowego dokonano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (0 godz.) lub po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez związków. *p<0,05 względem kontroli; #p<0,05 względem wolnego PTX.

	0 h				24 h				48 h			
	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1
Kontrola	51,83±3,21	15,46±2,18	34,23±0,97	1,23±0,81	52,45±2,50	19,59±1,22	30,62±0,88	1,50±0,80	51,96±2,25	25,55±3,75	34,02±1,39	0,93±0,59
Kontrola + NAC	57,48±2,87	19,83±0,21	28,93±0,11	0,50±0,28	48,35±4,03	20,05±1,20	27,80±2,12	3,80±0,71	54,65±5,16	19,75±0,78	25,70±1,98	2,00±1,56
Kontrola + Troloks	59,25±1,34	18,20±1,41	25,80±2,12	1,35±0,64	50,70±3,54	18,40±1,27	26,75±0,64	3,10±1,41	51,35±2,90	18,25±2,76	29,10±1,13	2,35±0,49
Kontrola + Tiron	53,60±0,99	20,55±1,63	26,30±1,41	1,00±0,14	48,65±3,32	18,50±2,55	32,55±1,91	0,80±0,42	54,30±2,83	17,20±1,41	22,65±1,91	2,95±1,20
PTX IC10	47,05±4,17	20,70±2,12	23,55±0,21	5,10±1,84	37,55±1,20*	21,10±2,83	38,10±1,41	2,75±0,49	42,70±1,56	21,80±3,54	32,20±2,97	2,30±0,57
PTX 0,5 IC50	39,00±2,69	20,30±2,55	24,60±1,56	10,35±5,87*	29,25±1,63*	19,10±1,41	51,55±1,20*	2,95±1,63	35,80±3,39*	19,95±3,89	29,70±7,64	12,60±4,38
PTX IC50	17,30±1,98*	15,75±3,46	50,00±9,76*	6,80±0,85*	36,65±5,87*	16,75±5,16	30,90±1,27	12,40±2,69*	31,16±5,32*	20,05±1,63	17,10±4,24*	31,00±5,51*
PTX 2 IC50	11,00±2,55*	13,55±2,19	63,20±4,53*	5,25±0,35	29,00±0,42*	18,85±1,20	35,70±0,85	12,85±0,64*	32,31±1,85*	22,75±1,77	18,25±1,20*	23,25±0,64*
PTX IC10	47,05±4,17	20,70±2,12	23,55±0,21	5,10±1,84	37,55±1,20*	21,10±2,83	38,10±1,41	2,75±0,49	42,70±1,56	21,80±3,54	32,20±2,97	2,30±0,57
LipoPTX IC10	54,47±3,27	18,00±2,26	32,33±4,13	1,80±0,42	54,68±3,56#	18,25±2,62	34,10±1,41	1,75±0,92	56,30±2,83	19,10±1,13	22,80±2,12	0,65±0,35
LipoPTX 0,5 IC50	48,03±3,03	20,65±1,63	31,16±2,18	2,10±0,28#	49,80±2,26	20,60±1,70	31,55±1,63#	1,15±1,34	57,75±2,19#	17,75±0,64	25,30±4,24	0,65±0,64
LipoPTX IC50	52,86±6,77#	22,86±2,46	29,15±1,77#	2,45±0,49	52,09±5,68	24,15±0,64	27,65±3,89	1,35±1,34#	56,55±3,61	21,15±1,20	22,85±3,89	1,30±1,41#
LipoPTX 2 IC50	47,87±2,20#	18,15±2,05	33,13±2,50#	3,35±0,49	49,01±0,58	22,15±3,61	31,03±0,47	1,05±0,21#	62,75±2,19	18,66±6,71	16,90±2,40	2,90±1,84#
LipoPTX IC90	38,37±5,51	21,60±1,13	34,74±2,43	5,65±2,05	45,53±4,62	21,30±0,71	32,41±0,86	3,95±1,77#	59,95±3,32	17,75±0,78	18,27±2,88	5,30±4,81#
LipoPTX IC10 + NAC	52,45±1,91	22,28±1,94	30,66±0,40	1,00±0,42	51,25±1,48#	21,60±2,12	26,55±0,78#	0,60±0,14	52,10±0,57	17,20±2,83	28,65±4,74	2,05±1,34
LipoPTX 0,5 IC50 + NAC	52,10±4,95	19,77±2,55	31,05±2,97	0,60±0,49#	51,15±3,54	22,20±1,06	26,65±3,11	0,95±0,85	54,30±4,53#	22,35±1,63	20,80±5,44	2,55±0,49
LipoPTX IC50 + NAC	52,22±7,18#	18,37±0,73	32,02±2,18#	4,50±2,55	53,95±0,07	18,80±2,12	29,25±1,63	0,95±0,49#	49,55±2,90#	21,45±5,44	25,75±1,48	3,25±4,03#
LipoPTX 2 IC50 + NAC	51,10±2,83#	22,22±0,72	31,74±0,54	3,05±2,62	60,19±3,37	20,85±2,05	22,80±2,12	2,75±0,49#	47,15±2,33	20,30±2,26	26,65±4,03	5,90±3,96#
LipoPTX IC90 + NAC	49,30±2,12#	21,83±1,25	31,84±1,85#	4,95±3,75	51,32±4,41	20,80±2,12	29,10±1,41	1,65±0,64#	44,50±3,25#	19,75±3,61	28,70±4,10	7,05±2,76#
LipoPTX IC10 + Troloks	45,65±4,45	22,05±4,03	26,05±0,78	3,60±0,71	54,70±0,57#	17,60±0,42	30,75±4,03#	0,60±0,42	52,20±2,97	19,30±2,83	26,40±2,40	1,70±1,98
LipoPTX 0,5 IC50 + Troloks	45,40±4,95	18,30±2,55	32,60±2,97	3,75±0,49#	56,90±3,54	20,85±1,06	23,40±3,11	1,80±0,85	49,20±4,53	25,85±1,63	24,45±5,44	1,35±0,49
LipoPTX IC50 + Troloks	39,90±4,10#	21,35±1,06	36,00±4,38#	2,60±0,42	52,15±2,90	20,25±1,48	28,35±1,48	1,85±0,78#	48,60±2,12#	20,05±0,92	29,15±3,46	2,20±2,26#
LipoPTX 2 IC50 + Troloks	45,80±2,69	17,30±3,25	34,55±0,92	8,30±2,69*	49,75±2,33	19,80±0,71	29,25±4,03	4,20±1,56#	52,30±5,66#	18,55±1,91	25,20±1,70	3,95±2,05#
LipoPTX IC90 + Troloks	44,20±0,42	21,20±4,10	33,60±3,11#	4,35±0,78	47,10±3,25	20,80±2,12	31,30±4,10	4,00±0,28#	41,30±1,41	21,85±3,46	32,25±0,21	4,60±1,84#
LipoPTX IC10 + Tiron	50,95±2,33	19,25±1,91	30,75±2,62	1,50±0,14	57,30±0,14	18,40±1,70	25,35±2,76	0,55±0,21	49,90±3,96	17,80±0,85	26,95±3,04	5,10±0,42
LipoPTX 0,5 IC50 + Tiron	52,30±2,40	20,00±0,57	29,10±0,28	1,95±0,21	56,40±0,14	19,75±0,64	25,60±4,95	1,90±1,13	50,70±4,95	20,20±0,14	30,05±8,56	1,40±0,42
LipoPTX IC50 + Tiron	50,11±2,81#	24,85±0,35	25,62±0,73#	2,00±0,14	51,99±0,30	20,40±3,11	23,20±1,56	3,75±0,49#	46,55±0,64	21,45±3,18	26,85±3,61	5,40±5,80#
LipoPTX 2 IC50 + Tiron	54,40±2,83#	20,76±1,62	27,38±2,34#	2,35±0,78	52,35±1,63	19,75±2,19	25,10±1,41	3,00±2,12#	50,20±4,10#	21,30±2,97	25,95±2,33	6,00±3,68#
LipoPTX IC90 + Tiron	46,00±2,97#	21,15±5,16	30,07±3,30#	3,45±2,33	44,40±1,13	19,85±2,05	30,30±1,27	5,20±1,56#	46,35±4,03#	21,25±5,73	26,30±2,83	5,75±2,05#

Tabela 5.4. Procentowy udział komórek HMEC-1 (średnia \pm SD) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego – wpływ liposomalnego paklitakselu z przyłączonym peptydem gH625 (LipoPTX-gH625) oraz antyoksydantów. Komórki inkubowano przez 24 godziny z lekiem bez antyoksydantu lub po 1-godzinnej preinkubacji z antyoksydantem: NAC (3 mM), Trolox (50 μ M), Tiron (50 μ M). Analizy cyklu komórkowego dokonano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (0 godz.) lub po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez związków. * $p < 0,05$ względem kontroli; # $p < 0,05$ względem wolnego PTX.

	0 h				24 h				48 h			
	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1
Kontrola	51,83 \pm 3,21	15,46 \pm 2,18	34,23 \pm 0,97	1,23 \pm 0,81	52,45 \pm 2,50	19,59 \pm 1,22	30,62 \pm 0,88	1,50 \pm 0,80	51,96 \pm 2,25	25,55 \pm 3,75	34,02 \pm 1,39	0,93 \pm 0,59
Kontrola + NAC	57,48 \pm 2,87	19,83 \pm 0,21	28,93 \pm 0,11	0,50 \pm 0,28	48,35 \pm 4,03	20,05 \pm 1,20	27,80 \pm 2,12	3,80 \pm 0,71	54,65 \pm 5,16	19,75 \pm 0,78	25,70 \pm 1,98	2,00 \pm 1,56
Kontrola + Troloks	59,25 \pm 1,34	18,20 \pm 1,41	25,80 \pm 2,12	1,35 \pm 0,64	50,70 \pm 3,54	18,40 \pm 1,27	26,75 \pm 0,64	3,10 \pm 1,41	51,35 \pm 2,90	18,25 \pm 2,76	29,10 \pm 1,13	2,35 \pm 0,49
Kontrola + Tiron	53,60 \pm 0,99	20,55 \pm 1,63	26,30 \pm 1,41	1,00 \pm 0,14	48,65 \pm 3,32	18,50 \pm 2,55	32,55 \pm 1,91	0,80 \pm 0,42	54,30 \pm 2,83	17,20 \pm 1,41	22,65 \pm 1,91	2,95 \pm 1,20
PTX IC10	47,05 \pm 4,17	20,70 \pm 2,12	23,55 \pm 0,21	5,10 \pm 1,84	37,55\pm1,20*	21,10 \pm 2,83	38,10 \pm 1,41	2,75 \pm 0,49	42,70 \pm 1,56	21,80 \pm 3,54	32,20 \pm 2,97	2,30 \pm 0,57
PTX 0,5 IC50	39,00 \pm 2,69	20,30 \pm 2,55	24,60 \pm 1,56	10,35\pm5,87*	29,25\pm1,63*	19,10 \pm 1,41	51,55\pm1,20*	2,95 \pm 1,63	35,80\pm3,39*	19,95 \pm 3,89	29,70 \pm 7,64	12,60 \pm 4,38
PTX IC50	17,30\pm1,98*	15,75 \pm 3,46	50,00\pm9,76*	6,80\pm0,85*	36,65\pm5,87*	16,75 \pm 5,16	30,90 \pm 1,27	12,40\pm2,69*	31,16\pm5,32*	20,05 \pm 1,63	17,10\pm4,24*	31,00\pm5,51*
PTX 2 IC50	11,00\pm2,55*	13,55 \pm 2,19	63,20\pm4,53*	5,25 \pm 0,35	29,00\pm0,42*	18,85 \pm 1,20	35,70 \pm 0,85	12,85\pm0,64*	32,31\pm1,85*	22,75 \pm 1,77	18,25\pm1,20*	23,25\pm0,64*
PTX IC10	47,05 \pm 4,17	20,70 \pm 2,12	23,55 \pm 0,21	5,10 \pm 1,84	37,55\pm1,20*	21,10 \pm 2,83	38,10 \pm 1,41	2,75 \pm 0,49	42,70 \pm 1,56	21,80 \pm 3,54	32,20 \pm 2,97	2,30 \pm 0,57
LipoPTX-gH625 IC10	49,50 \pm 2,26	18,90 \pm 0,57	30,10 \pm 0,71	2,50 \pm 0,85	51,65\pm2,05#	20,65 \pm 2,05	29,75 \pm 2,05	1,05 \pm 0,21	56,45 \pm 3,18	19,20 \pm 1,27	24,05 \pm 2,76	0,40 \pm 0,28
LipoPTX-gH625 0,5 IC50	49,60 \pm 3,82	17,83 \pm 2,16	31,00 \pm 3,39	2,95 \pm 1,20#	46,10 \pm 2,97	19,95 \pm 4,45	34,70\pm7,50#	1,85 \pm 0,64	54,75\pm3,46#	20,80 \pm 2,12	24,40 \pm 1,41	0,55 \pm 0,21
LipoPTX-gH625 IC50	47,35 \pm 2,47#	21,70 \pm 1,27	28,10 \pm 1,70#	2,75 \pm 1,91	45,75 \pm 4,88	21,25 \pm 1,63	32,90 \pm 3,11	2,25 \pm 1,20#	45,40 \pm 3,96	20,75 \pm 3,32	31,65 \pm 2,05	1,40\pm0,71#
LipoPTX-gH625 2 IC50	46,40 \pm 1,56#	20,35 \pm 0,78	33,25 \pm 3,61#	3,40 \pm 0,42	44,95 \pm 5,30	24,50 \pm 2,55	29,70 \pm 3,39	0,85 \pm 0,35#	47,80 \pm 1,13	19,94 \pm 1,92	29,35\pm0,07*	2,65\pm0,35#
LipoPTX-gH625 IC90	43,50 \pm 8,21	19,35 \pm 2,05	32,34 \pm 0,66#	4,95 \pm 2,90	44,70 \pm 6,36	20,20 \pm 0,71	33,55 \pm 4,45	4,95 \pm 0,92#	48,80\pm3,96#	18,10 \pm 0,28	24,80\pm4,95*	5,25\pm4,31#
LipoPTX-gH625 IC10 + NAC	53,00 \pm 1,27	20,00 \pm 0,14	23,70 \pm 1,13	1,90 \pm 0,57	54,85\pm3,89#	19,25 \pm 1,48	26,45\pm5,30#	1,00 \pm 0,85	50,20 \pm 4,10	19,35 \pm 2,90	28,70 \pm 1,98	1,75 \pm 0,78
LipoPTX-gH625 0,5 IC50 + NAC	47,10 \pm 5,94	21,60 \pm 4,10	29,30 \pm 5,23	4,50\pm0,85#	48,95 \pm 3,32	20,25 \pm 1,48	28,85 \pm 1,77	1,45 \pm 0,78	46,75 \pm 1,91	18,50 \pm 2,55	29,20 \pm 1,27	5,55 \pm 1,91
LipoPTX-gH625 IC50 + NAC	49,80\pm1,27#	19,00 \pm 1,56	25,55\pm1,06#	3,90 \pm 0,42	51,65 \pm 1,34	19,75 \pm 3,61	27,45 \pm 3,89	1,65\pm0,92#	48,70\pm3,54#	20,20 \pm 4,10	25,20 \pm 1,27	6,80\pm0,57#
LipoPTX-gH625 2 IC50 + NAC	47,50\pm2,55#	18,60 \pm 0,28	27,35\pm1,91#	4,40 \pm 1,70	46,95 \pm 1,77	21,40 \pm 2,83	26,80 \pm 1,98	4,85 \pm 0,92	44,75 \pm 3,46	17,85 \pm 0,92	26,80 \pm 0,71	10,60 \pm 1,84
LipoPTX-gH625 IC90 + NAC	48,05\pm0,35#	18,85 \pm 0,64	29,75\pm1,20#	3,35 \pm 0,21	49,90 \pm 2,97	21,70 \pm 3,54	26,90 \pm 4,95	3,45\pm1,20#	50,25\pm2,90#	22,25 \pm 4,31	22,80 \pm 3,54	6,45\pm1,20#
LipoPTX-gH625 IC10 + Trolox	47,96 \pm 2,76	19,70 \pm 0,57	28,10 \pm 2,97	2,45 \pm 0,07	52,30\pm1,56#	18,20 \pm 1,41	28,80\pm0,71#	0,70 \pm 0,57	50,25 \pm 2,90	18,45 \pm 1,63	24,80 \pm 0,71	7,65 \pm 3,61
LipoPTX-gH625 0,5 IC50 + Trolox	46,06 \pm 0,20	19,60 \pm 3,82	35,85 \pm 1,48	1,65\pm0,07#	50,25 \pm 2,90	16,00 \pm 3,25	28,30 \pm 1,41	4,95 \pm 4,03	47,80 \pm 2,12	18,35 \pm 1,48	23,35 \pm 1,34	10,50 \pm 2,26
LipoPTX-gH625 IC50 + Trolox	48,33\pm2,08#	23,15 \pm 2,47	26,90\pm8,95#	4,30 \pm 1,27	47,70 \pm 1,98	16,35 \pm 4,31	28,30 \pm 2,69	5,85 \pm 2,19	40,80 \pm 2,12	20,50 \pm 4,53	25,00 \pm 0,99	13,70\pm5,66*#
LipoPTX-gH625 2 IC50 + Trolox	45,25\pm5,30#	22,70 \pm 3,11	24,45\pm1,48#	3,60 \pm 0,71	52,25 \pm 1,48	15,80 \pm 0,42	27,90 \pm 2,12	4,05\pm1,06#	44,05 \pm 2,47	17,95 \pm 3,32	26,20 \pm 4,38	11,80 \pm 10,18
LipoPTX-gH625 IC90 + Trolox	44,34\pm0,91#	22,50 \pm 3,39	28,51\pm1,68#	3,65 \pm 1,20	51,65 \pm 0,07	15,50 \pm 0,71	28,65 \pm 2,19	5,75\pm0,78#	43,80 \pm 3,54	18,25 \pm 1,48	26,75 \pm 3,61	11,20\pm5,66#
LipoPTX-gH625 IC10 + Tiron	52,55 \pm 1,20	19,40 \pm 1,84	30,15 \pm 1,20	1,65 \pm 0,35	50,15 \pm 2,76	19,75 \pm 0,49	29,85 \pm 3,75	1,90 \pm 1,70	49,25 \pm 4,31	19,60 \pm 3,39	27,30 \pm 1,41	3,75 \pm 2,05
LipoPTX-gH625 0,5 IC50 + Tiron	51,00 \pm 2,69	18,25 \pm 1,34	31,10 \pm 2,55	3,70\pm1,13#	45,85 \pm 5,02	18,75 \pm 1,91	33,70 \pm 0,85	3,50 \pm 1,41	45,25 \pm 5,73	19,25 \pm 2,90	28,75 \pm 2,05	6,50 \pm 5,09
LipoPTX-gH625 IC50 + Tiron	50,15\pm1,48#	18,40 \pm 0,99	27,55\pm1,20#	3,80 \pm 0,99	46,50 \pm 1,27	15,60 \pm 1,98	27,55 \pm 3,75	7,59 \pm 4,37	42,65 \pm 5,16	25,00 \pm 4,67	26,80 \pm 3,54	5,45\pm2,47#
LipoPTX-gH625 2 IC50 + Tiron	52,25\pm1,48#	15,80 \pm 0,42	30,90\pm2,55#	3,25 \pm 0,49	47,25 \pm 5,59	17,00 \pm 1,98	26,15 \pm 1,63	9,12\pm6,53*	49,15\pm2,76#	18,95 \pm 3,75	23,20 \pm 1,56	7,75\pm3,61#
LipoPTX-gH625 IC90 + Tiron	49,95\pm2,47#	15,50 \pm 0,71	28,45\pm2,05#	2,75 \pm 0,49	42,60 \pm 3,68	18,65 \pm 2,05	32,20 \pm 2,97	6,55 \pm 4,60	41,50 \pm 1,98	22,00 \pm 4,67	25,30 \pm 1,41	11,50\pm1,70#

Tabela 5.5. Procentowy udział komórek linii HMEC-1 (średnia ± SD) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego – wpływ docetakselu (DTX) oraz antyoksydantów. Komórki inkubowano z lekiem przez 24 godziny bez antyoksydantu lub po 1-godzinnej preinkubacji z antyoksydantem: NAC (3 mM), Trolox (50 μM), Tiron (50 μM). Analizy cyklu komórkowego dokonano po zakończeniu inkubacji (0 godz.) lub po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez związków. *p<0,05 względem kontroli; #p<0,05 względem wolnego DTX

	0 h				24 h				48 h			
	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1
Kontrola	51,83±3,21	15,46±2,18	34,23±0,97	1,23±0,81	52,45±2,50	19,59±1,22	30,62±0,88	1,50±0,80	51,96±2,25	25,55±3,75	34,02±1,39	0,93±0,59
Kontrola + NAC	57,48±2,87	19,83±0,21	28,93±0,11	0,50±0,28	48,35±4,03	20,05±1,20	27,80±2,12	3,80±0,71	54,65±5,16	19,75±0,78	25,70±1,98	2,00±1,56
Kontrola + Trolox	59,25±1,34	18,20±1,41	25,80±2,12	1,35±0,64	50,70±3,54	18,40±1,27	26,75±0,64	3,10±1,41	51,35±2,90	18,25±2,76	29,10±1,13	2,35±0,49
Kontrola + Tiron	53,60±0,99	20,55±1,63	26,30±1,41	1,00±0,14	48,65±3,32	18,50±2,55	32,55±1,91	0,80±0,42	54,30±2,83	17,20±1,41	22,65±1,91	2,95±1,20
DTX IC10	21,85±3,32*	16,15±1,48	46,70±2,12	7,00±0,57*	20,90±3,54*	18,25±2,90	57,20±4,53*	3,65±1,91	47,00±0,14	13,40±0,99*	20,50±1,56	19,20±0,85*
DTX 0,5 IC50	9,70±1,27*	11,85±1,34	63,05±5,44*	3,85±0,64	22,40±2,97*	19,85±1,91	45,55±1,77	11,45±2,05	45,55±4,17	16,10±0,71*	25,40±0,71	11,55±0,64
DTX IC50	7,65±1,48*	11,25±1,63	67,85±0,07*	3,35±0,92	20,10±2,40*	17,90±2,12	39,35±2,62	21,15±8,41*	43,05±6,72	17,55±1,77*	21,50±4,53	17,45±8,84*
DTX 2 IC50	18,60±2,26*	10,10±0,14	59,55±1,91*	4,75±1,06	21,60±0,42*	20,90±1,70	42,10±1,98	17,15±2,90*	43,60±2,40	16,70±2,55*	21,35±2,90	18,20±2,83*
DTX IC90	11,75±5,44*	13,05±7,42	70,05±9,40*	3,75±0,35	20,20±2,12*	20,50±0,92	37,15±2,76	23,25±4,88*	37,70±6,79	19,35±2,62*	21,35±6,86	19,90±0,28*
DTX IC10 + NAC	27,90±3,82*	20,00±0,85	49,35±4,17*	2,75±1,20	22,00±0,57*	18,95±1,91	54,70±3,68*	4,30±1,13	47,80±3,54	19,45±1,20	24,30±2,83	8,45±7,57
DTX 0,5 IC50 +NAC	21,95±2,33*	20,70±1,84	54,60±3,54*	2,75±0,64	23,20±4,10*	20,95±3,46	45,10±2,40	10,50±3,39	46,80±1,41	19,85±0,64	22,95±2,33	10,40±1,56
DTX IC50 +NAC	16,85±3,61*	18,20±0,57	63,35±4,31*	1,60±1,27	20,90±3,54*	18,35±2,76	40,05±3,61	19,75±10,39*	48,25±2,05	18,60±1,13	22,55±3,04	10,60±2,12
DTX 2 IC50 +NAC	18,00±2,97*	20,60±1,70	59,90±1,13*	1,50±0,14	22,95±2,33*	21,55±0,78	41,65±1,34	17,15±2,90*	44,15±2,19	18,25±1,63	22,90±1,70	14,70±2,26*
DTX IC90 +NAC	13,20±3,54*	21,20±2,69	61,10±2,40*	4,95±0,92	22,40±0,99*	18,30±1,56	36,25±4,03	23,25±4,88*	40,05±2,33	18,75±1,34	22,00±0,57	19,40±2,83*
DTX IC10 +Trolox	26,30±3,25*	18,50±1,56	52,20±5,80*	3,00±0,99	22,65±1,48*	17,65±0,78	55,00±0,42*	4,70±2,69	49,95±2,05	18,50±1,27	27,50±0,14	4,05±0,92
DTX 0,5 IC50 +Trolox	28,75±2,76*	21,40±2,83	47,30±1,41#	2,55±1,34	24,50±2,69*	21,90±2,12	50,35±1,48*	3,25±0,92	49,00±1,98	19,15±0,35	21,55±1,20	10,30±2,83
DTX IC50 +Trolox	18,15±5,44*	18,25±1,63	59,65±3,32*	3,95±0,49	22,00±3,68*	18,55±1,91	46,55±8,70*	13,30±3,68*	46,35±3,61	19,35±1,34	19,85±0,64*	14,45±5,59*
DTX 2 IC50 +Trolox	16,45±3,04*	19,55±3,18	59,60±2,40*	4,40±3,82	22,50±4,38*	18,05±0,78	44,90±9,19	14,55±4,03*	42,05±3,75	18,65±1,48	23,85±1,77	15,45±7,00*
DTX IC90 +Trolox	17,55±2,90*	19,55±2,47	59,85±2,47*	3,05±2,90	20,45±1,20*	17,90±0,57	40,75±1,91	20,90±0,14*	40,25±2,33	18,35±1,48	24,50±1,56	17,40±2,97*
DTX IC10 + Tiron	25,10±3,96*	21,35±2,47	52,75±6,72*	2,00±1,13#	23,20±1,98*	18,40±1,41	54,00±5,09*	4,40±1,70	50,50±3,11	19,00±0,57	25,55±0,92	4,95±1,63#
DTX 0,5 IC50 + Tiron	22,65±4,17*	18,30±0,99	57,10±1,84*	1,95±1,34	20,75±1,91*	18,90±2,12	56,25±1,20*	4,10±2,83	49,45±2,62	19,35±1,77	22,45±3,04	8,75±1,34
DTX IC50 + Tiron	19,00±3,68*	17,80±0,85	61,80±2,69*	1,55±1,63	22,00±1,98*	19,25±1,20	46,20±8,34*	12,55±5,16*	46,00±1,27	18,85±1,06	21,55±1,48	14,30±1,27*
DTX 2 IC50 + Tiron	17,05±2,19*	18,75±1,20	60,90±0,85*	3,30±1,84	20,50±1,70*	20,00±0,57	45,30±4,24	14,20±3,11*	41,00±2,26	18,50±1,56	24,30±2,83	16,20±3,54*
DTX IC90 + Tiron	14,85±3,46*	17,85±2,19	65,45±1,34*	1,50±0,57	20,50±2,97*	18,70±1,27	41,95±2,33	19,45±1,77*	39,35±1,48	19,15±1,06	21,50±1,56	20,00±4,10*

Tabela 5.6. Procentowy udział komórek linii HMEC-1 (średnia ± SD) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego – wpływ liposomalnego docetakselu (LipoDTX) oraz antyoksydantów. Komórki inkubowano z lekiem przez 24 godziny bez antyoksydantu lub po 1-godzinnej preinkubacji z antyoksydantem: NAC (3 mM), Troloks (50 μM), Tiron (50 μM). Analizy cyklu komórkowego dokonano po zakończeniu inkubacji (0 godz.) lub po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez związków. *p<0,05 względem kontroli; #p<0,05 względem wolnego DTX.

	0 h				24 h				48 h			
	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1
Kontrola	51,83±3,21	15,46±2,18	34,23±0,97	1,23±0,81	52,45±2,50	19,59±1,22	30,62±0,88	1,50±0,80	51,96±2,25	25,55±3,75	34,02±1,39	0,93±0,59
Kontrola + NAC	57,48±2,87	19,83±0,21	28,93±0,11	0,50±0,28	48,35±4,03	20,05±1,20	27,80±2,12	3,80±0,71	54,65±5,16	19,75±0,78	25,70±1,98	2,00±1,56
Kontrola + Troloks	59,25±1,34	18,20±1,41	25,80±2,12	1,35±0,64	50,70±3,54	18,40±1,27	26,75±0,64	3,10±1,41	51,35±2,90	18,25±2,76	29,10±1,13	2,35±0,49
Kontrola + Tiron	53,60±0,99	20,55±1,63	26,30±1,41	1,00±0,14	48,65±3,32	18,50±2,55	32,55±1,91	0,80±0,42	54,30±2,83	17,20±1,41	22,65±1,91	2,95±1,20
DTX IC10	21,85±3,32*	16,15±1,48	46,70±2,12	7,00±0,57*	20,90±3,54*	18,25±2,90	57,20±4,53*	3,65±1,91	47,00±0,14	13,40±0,99*	20,50±1,56	19,20±0,85*
DTX 0,5 IC50	9,70±1,27*	11,85±1,34	63,05±5,44*	3,85±0,64	22,40±2,97*	19,85±1,91	45,55±1,77	11,45±2,05	45,55±4,17	16,10±0,71*	25,40±0,71	11,55±0,64
DTX IC50	7,65±1,48*	11,25±1,63	67,85±0,07*	3,35±0,92	20,10±2,40*	17,90±2,12	39,35±2,62	21,15±8,41*	43,05±6,72	17,55±1,77*	21,50±4,53	17,45±8,84*
DTX 2 IC50	18,60±2,26*	10,10±0,14	59,55±1,91*	4,75±1,06	21,60±0,42*	20,90±1,70	42,10±1,98	17,15±2,90*	43,60±2,40	16,70±2,55*	21,35±2,90	18,20±2,83*
DTX IC90	11,75±5,44*	13,05±7,42	70,05±9,40*	3,75±0,35	20,20±2,12*	20,50±0,92	37,15±2,76	23,25±4,88*	37,70±6,79	19,35±2,62*	21,35±6,86	19,90±0,28*
LipoDTX IC10 + NAC	51,55±1,63#	19,25±2,05	27,95±1,91#	1,30±0,57#	52,70±1,41#	18,40±1,84	28,90±1,70#	1,40±0,71	50,45±3,18	18,90±2,12	30,50±4,81	1,60±1,56#
LipoDTX 0,5 IC50 + NAC	49,90±2,12#	20,90±2,05	28,35±1,06#	0,85±1,13	52,55±3,54#	21,70±1,84	27,90±3,04#	1,80±0,85	51,40±1,41	19,90±1,34	28,10±1,34	1,65±1,41
LipoDTX IC50 + NAC	51,35±2,47#	18,60±1,13	29,15±2,90#	0,90±0,71	54,20±0,71#	21,55±2,62	25,05±1,91	2,15±2,76#	49,80±2,97	18,20±0,99	24,85±1,06	7,15±3,04
LipoDTX 2 IC50 + NAC	45,60±4,24#	21,90±1,41	30,50±2,97#	2,00±0,14	45,35±4,74#	21,00±0,99	33,55±4,03	2,35±1,48#	48,15±2,33	20,50±1,13	29,80±2,26	1,55±1,06#
LipoDTX IC90 + NAC	41,70±4,10#	18,45±1,20	38,80±2,97#	2,10±1,41	37,30±2,97*#	18,40±1,41	40,20±4,95	4,10±0,57#	43,00±2,69	20,15±1,34	31,40±1,84	5,45±5,87#
LipoDTX IC10 + Troloks	51,90±2,83#	19,35±1,48	27,50±0,85#	1,25±0,49#	49,80±2,69#	18,65±2,05	31,90±3,11#	1,15±0,49	49,80±3,54	18,90±2,40	28,30±1,41	2,65±0,78#
LipoDTX 0,5 IC50 + Troloks	50,90±2,12#	20,85±2,05	26,85±1,06#	1,40±1,13	48,20±3,54#	16,00±1,84	38,55±3,04	1,20±0,85	48,30±1,41	20,75±1,34	27,25±1,34	3,70±1,41
LipoDTX IC50 + Troloks	49,25±2,33#	21,00±1,98	27,65±1,91#	2,10±1,56	42,50±0,85#	19,30±1,56	40,05±0,78	1,85±1,48#	49,85±1,91	19,20±0,99	28,25±1,63	2,70±2,55#
LipoDTX 2 IC50 + Troloks	44,70±1,56#	20,15±1,06	32,90±0,71#	2,25±1,20	41,50±2,97#	17,95±2,05	37,00±7,92	3,45±2,76	47,55±1,20	19,15±2,33	29,75±0,49	3,55±1,63#
LipoDTX IC90 + Troloks	36,20±3,11*#	19,75±1,77	42,65±6,58#	1,40±1,70	38,95±1,91#	20,85±1,77	36,40±0,42	3,50±3,68#	48,25±1,91	19,90±1,41	26,75±1,91	5,10±1,41#
LipoDTX IC10 + Tiron	50,65±3,18#	19,35±1,48#	29,05±4,74#	1,65±0,92#	50,75±3,32#	18,85±0,78	28,40±2,40#	2,00±1,70	49,55±3,04	18,35±1,77	27,85±2,05	4,25±2,76#
LipoDTX 0,5 IC50 + Tiron	52,35±1,48#	21,00±2,40#	26,05±1,34#	0,60±0,42	48,80±2,12#	19,75±3,61	28,70±3,68#	2,75±2,05	49,35±1,20	18,90±0,71	27,35±0,07	4,40±0,57
LipoDTX IC50 + Tiron	49,30±2,55#	21,30±1,27	27,90±3,54#	1,50±0,28	45,10±1,41#	27,00±1,84	26,60±2,12	4,55±1,63#	48,05±1,91	20,35±1,34	29,10±1,84	2,50±1,41#
LipoDTX 2 IC50 + Tiron	43,30±2,83#	17,95±0,92	36,55±3,46#	2,20±1,56	40,85±2,05#	19,80±0,71	35,20±2,97	4,45±0,64#	47,40±1,41	20,75±1,48	28,25±0,21	3,60±3,11#
LipoDTX IC90 + Tiron	35,50±3,96#	18,45±1,63	44,05±3,89#	2,00±1,70	35,85±2,05#	20,00±0,99	41,30±1,41	2,80±2,55#	46,55±1,34	19,25±2,90	30,55±3,04	5,20±0,99#

Tabela 5.7. Procentowy udział komórek linii HMEC-1 (średnia \pm SD) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego – wpływ liposomalnego docetakselu z przyłączonym peptydem penetrującym gH625 (LipoDTX-gH625) oraz antyoksydantów. Komórki inkubowano przez 24 godziny z lekiem bez antyoksydantu lub po 1-godzinnej preinkubacji z antyoksydantem: NAC (3 mM), Troloks (50 μ M), Tiron (50 μ M). Analizy cyklu komórkowego dokonano po zakończeniu inkubacji (0 godz.) lub po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez związków. * $p < 0,05$ względem kontroli; # $p < 0,05$ względem wolnego DTX.

	0 h				24 h				48 h			
	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1
Kontrola	51,83 \pm 3,21	15,46 \pm 2,18	34,23 \pm 0,97	1,23 \pm 0,81	52,45 \pm 2,50	19,59 \pm 1,22	30,62 \pm 0,88	1,50 \pm 0,80	51,96 \pm 2,25	25,55 \pm 3,75	34,02 \pm 1,39	0,93 \pm 0,59
Kontrola + NAC	57,48 \pm 2,87	19,83 \pm 0,21	28,93 \pm 0,11	0,50 \pm 0,28	48,35 \pm 4,03	20,05 \pm 1,20	27,80 \pm 2,12	3,80 \pm 0,71	54,65 \pm 5,16	19,75 \pm 0,78	25,70 \pm 1,98	2,00 \pm 1,56
Kontrola + Troloks	59,25 \pm 1,34	18,20 \pm 1,41	25,80 \pm 2,12	1,35 \pm 0,64	50,70 \pm 3,54	18,40 \pm 1,27	26,75 \pm 0,64	3,10 \pm 1,41	51,35 \pm 2,90	18,25 \pm 2,76	29,10 \pm 1,13	2,35 \pm 0,49
Kontrola + Tiron	53,60 \pm 0,99	20,55 \pm 1,63	26,30 \pm 1,41	1,00 \pm 0,14	48,65 \pm 3,32	18,50 \pm 2,55	32,55 \pm 1,91	0,80 \pm 0,42	54,30 \pm 2,83	17,20 \pm 1,41	22,65 \pm 1,91	2,95 \pm 1,20
DTX IC10	21,85 \pm 3,32*	16,15 \pm 1,48	46,70 \pm 2,12	7,00 \pm 0,57*	20,90 \pm 3,54*	18,25 \pm 2,90	57,20 \pm 4,53*	3,65 \pm 1,91	47,00 \pm 0,14	13,40 \pm 0,99*	20,50 \pm 1,56	19,20\pm0,85*
DTX 0,5 IC50	9,70 \pm 1,27*	11,85 \pm 1,34	63,05 \pm 5,44*	3,85 \pm 0,64	22,40 \pm 2,97*	19,85 \pm 1,91	45,55 \pm 1,77	11,45 \pm 2,05	45,55 \pm 4,17	16,10 \pm 0,71*	25,40 \pm 0,71	11,55\pm0,64
DTX IC50	7,65 \pm 1,48*	11,25 \pm 1,63	67,85 \pm 0,07*	3,35 \pm 0,92	20,10 \pm 2,40*	17,90 \pm 2,12	39,35 \pm 2,62	21,15 \pm 8,41*	43,05 \pm 6,72	17,55 \pm 1,77*	21,50 \pm 4,53	17,45\pm8,84*
DTX 2 IC50	18,60 \pm 2,26*	10,10 \pm 0,14	59,55 \pm 1,91*	4,75 \pm 1,06	21,60 \pm 0,42*	20,90 \pm 1,70	42,10 \pm 1,98	17,15 \pm 2,90*	43,60 \pm 2,40	16,70 \pm 2,55*	21,35 \pm 2,90	18,20\pm2,83*
DTX IC90	11,75 \pm 5,44*	13,05 \pm 7,42	70,05 \pm 9,40*	3,75 \pm 0,35	20,20 \pm 2,12*	20,50 \pm 0,92	37,15 \pm 2,76	23,25 \pm 4,88*	37,70 \pm 6,79	19,35 \pm 2,62*	21,35 \pm 6,86	19,90\pm0,28*
LipoDTX-gH625 IC10 + NAC	53,10 \pm 2,40#	18,95 \pm 2,47	26,75 \pm 0,64#	1,30 \pm 0,71#	51,35 \pm 2,90#	19,85 \pm 1,06	26,30 \pm 2,83#	2,50 \pm 1,13	50,80 \pm 2,12	19,95 \pm 2,47	28,20 \pm 1,13	1,70 \pm 0,85#
LipoDTX-gH625 0,5 IC50 + NAC	50,00 \pm 3,82#	21,85 \pm 3,18	25,55 \pm 0,35#	2,60 \pm 0,99	49,80 \pm 2,26#	20,90 \pm 2,12	27,90 \pm 2,83#	1,40 \pm 1,56	49,60 \pm 1,56	18,05 \pm 1,20	28,75 \pm 0,92	3,60 \pm 1,27
LipoDTX-gH625 IC50 + NAC	48,25 \pm 2,05#	19,50 \pm 1,56	30,40 \pm 2,83#	1,85 \pm 0,78	51,40 \pm 4,53#	18,90 \pm 1,41	26,90 \pm 2,12	2,80 \pm 0,99#	48,25 \pm 1,91	18,05 \pm 1,20	31,05 \pm 1,91	2,65 \pm 1,20#
LipoDTX-gH625 2 IC50 + NAC	45,60 \pm 4,10#	19,55 \pm 1,91	33,30 \pm 6,08#	1,90 \pm 0,42	45,70 \pm 4,10#	19,45 \pm 0,92	31,65 \pm 6,29	3,20 \pm 1,27#	46,50 \pm 1,13	19,50 \pm 2,69	29,40 \pm 4,67	4,60 \pm 0,85#
LipoDTX-gH625 IC90 + NAC	39,90 \pm 6,51#	20,50 \pm 1,27	37,30 \pm 7,07#	2,55 \pm 1,06	38,40 \pm 4,81#	21,00 \pm 2,55	38,15 \pm 7,14	2,45 \pm 0,21#	45,45 \pm 1,06	18,95 \pm 0,92	31,75 \pm 2,33	3,85 \pm 2,19#
LipoDTX-gH625 IC10 + Troloks	53,45 \pm 3,04#	19,85 \pm 0,64	25,65 \pm 2,33#	1,35 \pm 0,92#	53,05 \pm 1,77#	20,10 \pm 0,85	24,70 \pm 0,57#	2,15 \pm 0,35	49,95 \pm 3,32	18,30 \pm 1,56	29,95 \pm 2,33	1,80 \pm 0,57#
LipoDTX-gH625 0,5 IC50 + Troloks	50,55 \pm 3,04#	19,70 \pm 1,84	28,05 \pm 2,33#	1,70 \pm 1,13	50,60 \pm 3,25#	18,45 \pm 1,20	26,35 \pm 2,90#	4,60 \pm 0,85	49,15 \pm 3,18	19,45 \pm 1,34	30,10 \pm 3,25	1,40 \pm 1,41
LipoDTX-gH625 IC50 + Troloks	46,15 \pm 1,63#	20,60 \pm 1,13	31,30 \pm 3,82#	1,95 \pm 1,06	49,55 \pm 4,74#	20,85 \pm 2,05	26,20 \pm 1,27	3,40 \pm 1,41#	48,50 \pm 1,41	20,55 \pm 1,06	28,65 \pm 1,06	2,30 \pm 1,41#
LipoDTX 2 IC50 + Troloks	40,55 \pm 3,18#	20,00 \pm 0,99	37,55 \pm 3,61#	1,90 \pm 0,57	50,25 \pm 3,61#	20,90 \pm 3,54	25,60 \pm 4,95	3,95 \pm 1,20#	45,95 \pm 1,77	17,75 \pm 1,20*	33,05 \pm 1,77	3,25 \pm 1,20#
LipoDTX-gH625 IC90 + Troloks	36,05 \pm 4,74#	21,20 \pm 2,69	40,35 \pm 6,01#	2,40 \pm 1,41	41,00 \pm 3,68#	21,00 \pm 2,26	36,05 \pm 2,47	3,15 \pm 2,19#	44,30 \pm 1,98	20,55 \pm 1,63	28,35 \pm 3,18	6,65 \pm 0,64#
LipoDTX-gH625 IC10 + Tiron	52,95 \pm 2,62#	19,25 \pm 1,48	25,25 \pm 2,62#	2,55 \pm 1,48	50,35 \pm 2,90#	21,00 \pm 1,98	27,00 \pm 0,85#	1,50 \pm 0,57	50,55 \pm 3,32	18,05 \pm 0,21	28,65 \pm 2,47	2,45 \pm 0,64#
LipoDTX-gH625 0,5 IC50 + Tiron	50,00 \pm 3,39#	18,85 \pm 2,33	29,80 \pm 4,67#	1,35 \pm 1,06	50,00 \pm 1,84#	19,35 \pm 1,34	27,75 \pm 0,92#	2,90 \pm 2,26	50,20 \pm 2,26	20,80 \pm 1,70	27,40 \pm 2,83	1,60 \pm 1,13
LipoDTX-gH625 IC50 + Tiron	48,80 \pm 3,54#	19,40 \pm 1,41	30,35 \pm 4,31#	1,45 \pm 0,64	43,40 \pm 3,96#	20,55 \pm 2,90	32,75 \pm 11,53	4,85 \pm 2,47#	49,70 \pm 1,56	18,70 \pm 0,57	27,45 \pm 0,07	4,15 \pm 0,92#
LipoDTX-gH625 2 IC50 + Tiron	48,80 \pm 0,71#	18,75 \pm 2,19	29,30 \pm 0,99#	3,15 \pm 2,47	41,50 \pm 2,97#	21,20 \pm 2,12	35,15 \pm 0,35	2,15 \pm 0,49#	47,55 \pm 1,34	20,00 \pm 2,26	28,60 \pm 1,41	3,85 \pm 2,19#
LipoDTX-gH625 IC90 + Tiron	44,15 \pm 2,76#	19,05 \pm 2,47	34,85 \pm 1,06#	2,15 \pm 1,06	38,05 \pm 2,33#	21,00 \pm 1,98	37,75 \pm 0,92	3,20 \pm 1,27#	45,35 \pm 4,17	20,85 \pm 2,05	29,20 \pm 4,10	5,30 \pm 1,13#

Tabela 5.8. Procentowy udział komórek linii HMEC-1 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (średnia ± SD) – wpływ najwyższego i najniższego stężenia nanonośnika liposomalnego (LipoMAX, LipoMIN), peptydu penetrującego (gH625max, gH625min), nanonośnika liposomalnego skoniugowanego z penetrującym peptydem gH625 (LipoMAX-gH625, LipoMIN-gH625) oraz antyoksydantów. Komórki inkubowano przez 24 godziny z nanonośnikiem/wolnym peptydem gH625 bez antyoksydantów lub po 1-godzinnej preinkubacji komórek z antyoksydantem: NAC (3 mM), Troloks (50 μM), Tyron (50 μM). Analizy cyklu komórkowego dokonano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (0 godz.) lub po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez związków/nanonośników.

*p<0,05 względem kontroli

	0 h				24 h				48 h			
	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1	G1	S	G2/M	Sub G1
Kontrola	51,83±3,21	15,46±2,18	34,23±0,97	1,23±0,81	52,45±2,50	19,59±1,22	30,62±0,88	1,50±0,80	51,96±2,25	25,55±3,75	34,02±1,39	0,93±0,59
Kontrola + NAC	57,48±2,87	19,83±0,21	28,93±0,11	0,50±0,28	48,35±4,03	20,05±1,20	27,80±2,12	3,80±0,71	54,65±5,16	19,75±0,78	25,70±1,98	2,00±1,56
Kontrola + Troloks	59,25±1,34	18,20±1,41	25,80±2,12	1,35±0,64	50,70±3,54	18,40±1,27	26,75±0,64	3,10±1,41	51,35±2,90	18,25±2,76	29,10±1,13	2,35±0,49
Kontrola + Tiron	53,60±0,99	20,55±1,63	26,30±1,41	1,00±0,14	48,65±3,32	18,50±2,55	32,55±1,91	0,80±0,42	54,30±2,83	17,20±1,41	22,65±1,91	2,95±1,20
LipoMIN	62,64±1,79	21,68±2,51	23,05±0,01	1,00±0,14	50,25±2,90	18,65±2,05	29,75±0,49	1,35±1,34	53,25±4,31	20,30±4,38	23,70±2,26	2,10±1,41
LipoMAX	59,18±3,99	23,36±6,51	22,59±3,95	2,20±0,14	54,70±2,12	18,20±1,41	27,30±1,41	2,20±1,27	53,80±3,68	20,70±0,85	24,80±0,42	1,45±1,34
LipoMIN + NAC	51,22±1,07	21,40±2,83	28,62±2,10	0,90±0,71	48,92±1,67	21,70±2,83	29,10±5,23	1,65±1,20	50,25±2,90	19,80±2,69	28,10±1,84	1,85±1,63
LipoMAX + NAC	50,40±5,00	21,01±6,21	26,55±0,88	1,40±0,71	53,15±4,31	19,40±1,27	26,40±2,97	1,05±0,07	50,45±4,17	23,60±1,41	26,10±2,83	1,85±2,47
LipoMIN + Troloks	46,90±2,83	23,30±3,39	31,23±0,11	1,05±0,21	49,05±2,05	21,60±2,12	24,70±3,25	2,85±1,06	50,30±5,52	20,80±3,68	26,10±8,49	2,70±0,85
LipoMAX + Troloks	48,47±1,03	19,30±0,57	31,60±1,70	0,95±0,35	54,70±6,51	16,90±3,11	23,20±3,39	3,50±0,28	48,60±3,39	19,35±1,06	29,65±2,47	1,80±1,13
LipoMIN + Tiron	47,90±1,41	22,60±2,40	31,85±0,78	1,10±0,28	47,90±2,40	19,70±0,57	27,95±2,05	3,70±1,98	49,45±3,04	19,10±2,69	28,85±0,78	2,55±0,35
LipoMAX + Tiron	48,65±0,78	19,30±0,57	31,60±1,70	2,00±0,14	49,25±4,31	19,35±2,76	28,35±0,07	2,25±1,48	52,25±5,44	18,65±2,05	27,30±5,52	1,80±1,98
gH625min	51,36±8,24	21,43±11,17	27,37±4,53	1,00±0,14	47,52±1,82	20,15±4,17	31,00±4,67	2,55±0,21	55,99±0,35	20,28±0,42	22,92±3,17	1,15±0,78
gH625max	56,86±1,76	23,39±1,99	27,38±2,37	0,90±0,28	60,54±1,36	18,73±10,95	26,30±1,01	0,95±0,35	54,38±1,90	21,33±1,46	23,15±5,76	0,50±0,14
gH625min + NAC	54,79±2,67	18,30±0,86	26,90±1,41	0,75±0,07	50,80±3,68	18,20±1,41	26,65±0,64	1,75±2,05	50,14±9,24	21,00±4,67	25,33±1,03	1,25±1,06
gH625max + NAC	53,60±2,83	24,95±0,92	23,60±3,25	1,25±0,21	50,20±2,69	22,45±2,62	25,80±3,39	2,55±2,05	47,71±2,57	25,51±5,95	25,79±7,09	1,55±2,05
gH625min + Troloks	52,49±5,92	18,30±0,86	27,81±2,70	0,75±0,21	50,15±4,17	20,80±4,95	25,60±3,54	1,50±0,85	49,25±2,76	19,10±2,26	29,05±3,32	2,45±1,48
gH625max + Troloks	52,56±4,30	24,95±0,92	21,04±0,37*	1,05±0,21	49,20±2,83	21,20±2,69	26,60±2,40	2,20±1,41	51,75±4,88	20,80±3,68	26,20±7,07	1,25±1,48
gH625min + Tiron	50,14±9,24	23,71±8,51	21,05±7,09*	0,85±0,49	50,57±3,30	18,20±1,41	29,55±3,18	1,65±1,34	54,30±2,83	19,30±1,41	21,80±0,28	3,50±2,40
gH625max + Tiron	47,71±2,57	27,28±4,21	20,81±0,04*	0,80±0,28	49,15±4,17	20,65±2,05	29,10±1,41	2,50±1,56	47,30±1,41	21,30±1,41	28,75±3,46	2,20±2,83
LipoMIN-gH625	57,88±2,28	22,16±1,07	20,35±2,44*	1,50±1,13	49,20±1,41	18,20±1,41	29,50±1,70	1,80±0,99	49,70±2,12	17,85±0,49*	28,20±2,69	2,60±0,71
LipoMAX-gH625	59,95±0,63	20,91±3,80	21,50±2,69	1,25±0,49	49,70±3,39	17,25±0,07	29,70±3,39	2,75±0,92	50,65±3,32	21,25±1,63	26,70±3,68	1,45±1,20
Lipo-gH625min	56,44±1,47	20,53±3,72	22,26±2,89	0,75±0,21	46,65±0,64	18,25±1,34	30,25±1,34	3,55±1,20	49,75±3,61	16,70±2,12	29,25±7,00	4,30±1,27
Lipo-gH625max	55,76±2,18	21,62±1,50	19,98±0,39*	0,90±0,28	49,85±5,16	20,85±4,17	25,80±2,55	3,15±2,76	52,70±7,78	18,90±4,53	28,95±5,44	1,55±0,78
LipoMIN-gH625 + NAC	48,50±2,55	20,00±0,99	31,30±0,57	0,55±0,07	50,25±2,90	18,15±0,35	28,50±1,27	2,65±0,64	54,30±2,69	17,85±0,92*	24,30±0,42	3,55±4,03
Lipo-gH625min + NAC	48,06±3,17	27,39±9,45	26,23±9,15	0,45±0,21	51,20±3,82	17,10±1,27	29,10±1,13	2,45±1,34	51,35±2,90	21,85±0,64	25,30±1,41	1,50±0,85
LipoMAX-gH625 + NAC	49,30±1,41	24,60±5,23	28,10±0,28	1,10±0,28	48,95±0,92	20,50±1,70	28,35±1,34	2,20±2,12	48,20±2,69	18,90±1,98	30,70±1,98	2,20±1,27
Lipo-gH625max + NAC	53,80±2,12	18,30±1,41	27,80±2,12	1,00±0,28	49,45±2,62	20,00±0,42	29,55±2,33	1,00±0,71	46,70±4,95	19,80±5,09	28,80±0,71	4,65±0,64
LipoMIN-gH625 + Troloks	47,30±3,96	23,13±3,57	33,40±2,12	0,90±0,42	53,10±2,55	17,70±2,12	28,40±4,95	0,80±0,28	50,70±3,54	20,65±4,88	25,60±2,12	3,05±3,32
LipoMAX-gH625 + Troloks	47,31±3,95	24,41±2,90	33,52±3,85	1,35±0,92	50,35±2,47±	21,30±2,97	27,95±0,49	0,70±0,57	44,75±2,19	22,65±4,88	30,20±2,69	2,25±0,21
LipoMIN-gH625 + Tiron	49,05±1,48	22,25±2,33	32,10±3,96	0,65±0,35	50,05±1,77	17,90±0,57	28,35±5,30	2,85±1,77	48,70±3,54	22,85±1,63	25,70±3,68	2,75±1,48
LipoMIN-gH625 + Tiron	48,80±3,54	23,48±1,58	32,50±2,40	0,55±0,21	49,25±1,48	19,70±0,57	28,25±1,48	2,80±2,40	51,70±4,95	18,25±3,75	27,85±9,26	2,20±0,57

5.4. Właściwości genotoksyczne wolnych i liposomalnych taksanów

Poziom uszkodzeń DNA w komórkach linii HMEC-1 oceniano za pomocą standardowego testu kometowego, który określany jest również jako elektroforeza pojedynczej komórki w żelu agarozowym (*ang. single cell gel electrophoresis, SCGE*). Metoda ta pozwala m.in. na pomiar jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć DNA. Mikroskopowy obraz komórki uzyskany tą techniką wygląda jak kometa z wyraźną „głową” składającą się z nienaruszonego DNA oraz „ogona”, zawierającego uszkodzone pętle lub pęknięte fragmenty DNA. DNA uwolnione w wyniku jedno- lub dwuniciowych pęknięć denaturuje w warunkach alkalicznych i migruje w kierunku anody. Ilość uwolnionego DNA zależy od ilości powstałych uszkodzeń, a prędkość jego migracji w żelu agarozowym zależy od wielkości cząsteczki.

Ocena genotoksyczności wolnych taksanów

Zawartość DNA w ogonie komety komórek inkubowanych z taksanami wzrastała wraz ze wzrostem stężenia taksanu i czasu hodowli poinkubacyjnej. Istotne statystycznie zmiany obserwowano po 24 i 48 godzinach (**Ryciny 5.8 i 5.9** oraz **Tabela 5.9**). powodował istotne zmiany w niższym stężeniu – IC_{50} . Wraz z wydłużeniem czasu hodowli poinkubacyjnej obserwowano progresywny wzrost frakcji uszkodzonego DNA. Najwyższą zawartość DNA w ogonie komety zaobserwowano po 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej w komórkach potraktowanych najwyższym stężeniem taksanów (IC_{90}). Oba leki generowały podobną ilość uszkodzeń – 38,52% (docetaksel) i 35,09 % (paklitaksel) DNA znajdowało się w ogonie komety.

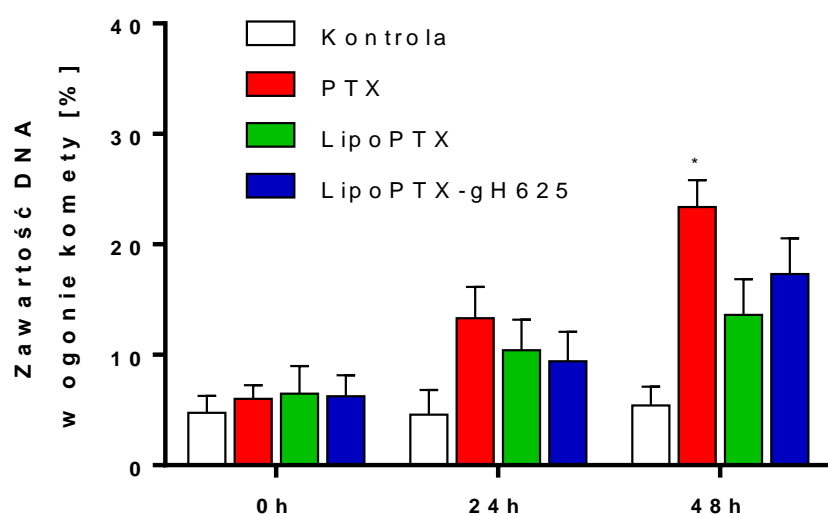
Genotoksyczność liposomalnych taksanów

Liposomalne formy taksanów nie powodowały wzrostu uszkodzeń DNA bezpośrednio po zakończeniu inkubacji ze związkami oraz po 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej. Statystycznie istotny wzrost uszkodzeń obserwowano jedynie w komórkach inkubowanych z najwyższym stężeniem liposomalnego docetakselu (IC_{90}). W komórkach inkubowanych z wysokimi stężeniami liposomalnego paklitakselu (2 IC_{50} oraz IC_{90}), niezależnie od obecności gH625, uszkodzenia DNA obserwowano dopiero po 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez leku. Po tym samym czasie w komórkach inkubowanych z wysokimi stężeniami liposomalnego docetakselu (2 IC_{50} i IC_{90}) jedynie dla stężenia IC_{90} odnotowano znaczący wzrost uszkodzeń DNA.

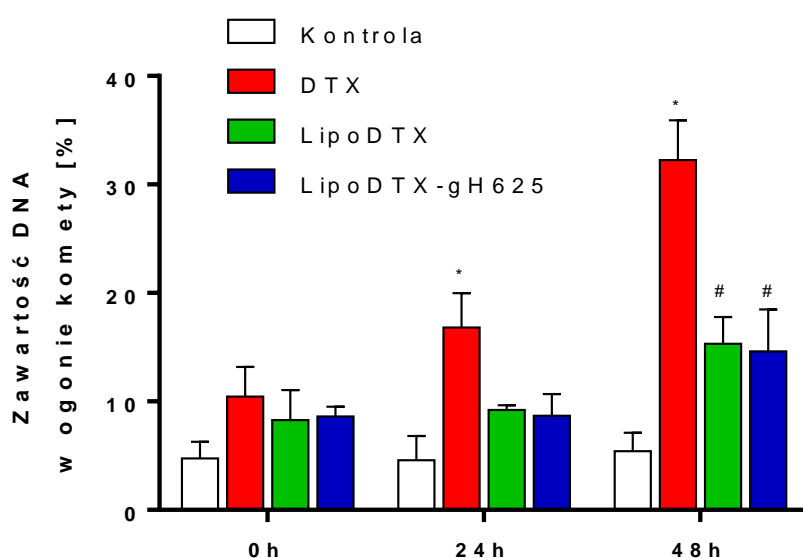
Ogólnie, średni poziom uszkodzeń DNA w komórkach inkubowanych z liposomalnymi taksanami był niższy niż w komórkach inkubowanych z wolnymi lekami. Liposomalne formy DTX w stężeniu IC_{90} w czasie 24 h powodowały mniej uszkodzeń niż wolny DTX. Zawartość DNA w ogonie komety komórek inkubowanych z liposomalnym DTX bez przyłączonego peptydu gH625 była niższa o 12,7%, a w przypadku liposomalnego DTX z peptydem gH625 – o 13,8%. Stężenie IC_{50} liposomalnych form DTX w czasie 48 h powodowało mniejsze uszkodzenia DNA niż czysty lek (ok. 17%). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w procentowej zawartości DNA pomiędzy liposomalną formą DTX, a wolnym DTX. Puste liposomy oraz sam peptyd nie powodowały istotnych zmian w procentowej zawartości DNA w ogonie komety (**Tabela 5.10**).

Wpływ antyoksydantów i nanonosników

Preinkubacja komórek z antyoksydantami nie powodowała istotnych statystycznie zmian w procentowej zawartości DNA w ogonie komety (**Tabela 5.9**). Antyoksydanty również nie wpływały istotnie na cytotoksyczne właściwości związków. Podobnie nie stwierdzono istotnych zmian w komórkach inkubowanych tylko z liposomem lub tylko z peptydem gH625.



Rycina 5.8. Uszkodzenia DNA generowane w komórkach linii HMEC-1 po 24-godzinnej inkubacji z wolnym paklitakselem (PTX), liposomalnym paklitakselem (LipoPTX) oraz liposomalnym paklitakselem z przyłączonym peptydem pemetrującym gH625 (LipoPTX-gH625). Lek stosowano w stężeniu IC_{50} . Komórki analizowano po zakończeniu inkubacji (0 godzin) oraz po upływie 24 i 48 godzin hodowli poinkubacyjnej. * $p < 0,05$ względem kontroli; # $p < 0,05$ względem PTX.



Rycina 5.9. Uszkodzenia DNA generowane w komórkach linii HMEC-1 po 24-godzinnej inkubacji z wolnym docetakselem (DTX), liposomalnym docetakselem (LipoDTX) oraz liposomalnym docetakselem z przyłączonym peptydem penetrującym gH625 (LipoDTX-gH625). Lek stosowano w stężeniu IC_{50} . Komórki analizowano po zakończeniu inkubacji (0 godzin) oraz po upływie 0, 24 i 48 godzin hodowli poinkubacyjnej. * $p < 0,05$ względem kontroli; # $p < 0,05$ względem DTX.

Tabela 5.9. Procentowa zawartość DNA w ogonie komety komórek linii HMEC-1 inkubowanych z wolnymi i liposomalnymi taksanami (PTX i DTX) przez 24 godziny (średnia ± SD). Lek stosowano w stężeniu IC₅₀. Komórki analizowano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (0 godz.) oraz po 24 i 48 godzin hodowli poinkubacyjnej.

*p < 0,05 względem kontroli; #p < 0,05 względem wolnego taksanu.

	0 h			24 h			48 h					
	NAC	Troloks	Tiron	NAC	Troloks	Tiron	NAC	Troloks	Tiron			
Kontrola (K)	4,75±1,54	4,47±0,54	6,23±1,22	4,57±2,25	7,94±1,70	6,23±2,89	5,43±3,25	5,42±1,71	8,55±1,52	7,77±2,47	5,48±2,27	
PTX IC10	5,68±1,26	5,19±2,34	3,81±1,80	7,09±1,95	10,09±3,20	12,06±2,20	9,67±5,15	9,54±2,20	10,54±1,80	7,22±2,43	11,10±4,02	12,77±2,93
PTX 0,5 IC50	5,33±3,13	6,99±1,75	6,70±1,26	6,45±1,29	12,62±1,51	14,44±2,70	12,05±5,66	11,92±2,70	13,83±1,75	10,44±2,27	11,04±0,48	15,15±0,74
PTX IC50	6,00±1,26	7,40±2,96	5,67±0,78	6,92±1,65	13,32±2,84	15,00±1,44	12,61±1,51	12,48±1,44	23,38±2,43*	18,80±3,59*	17,15±2,85	17,22±0,55
PTX 2 IC50	6,20±3,04	6,36±1,03	7,50±4,65	7,63±3,63	18,48±2,05*	19,99±0,40*	17,03±4,16*	17,47±0,40*	27,74±4,14*	23,12±2,92*	22,72±2,34*	23,35±2,39*
PTX IC90	7,66±1,20	7,30±1,17	7,41±0,93	10,32±2,20	18,01±5,16*	18,71±2,38*	16,32±0,58	16,19±2,38	35,09±4,26*	29,89±2,47*	29,00±3,77*	30,48±2,04*
LipoPTX IC10	6,14±2,02	6,68±1,15	6,98±1,95	9,27±2,68	6,83±2,11	9,95±3,42	7,27±1,78	8,46±1,52	12,38±0,87	9,75±0,69	11,89±4,16	9,74±3,10
LipoPTX 0,5 IC50	6,41±1,39	6,93±2,06	9,29±1,83	8,32±3,59	8,95±2,00	10,52±1,62	8,92±5,10	9,88±3,95	14,86±1,74	11,85±1,44	12,10±2,17	11,77±3,02
LipoPTX IC50	6,47±2,50	9,45±3,03	9,20±4,05	7,24±1,60	10,41±2,76	8,96±2,02	12,06±2,27	9,03±1,92	13,62±3,24	13,65±1,22	15,32±1,33	14,65±3,69
LipoPTX 2 IC50	5,81±1,03	9,29±1,97	9,01±4,16	8,24±3,72	10,28±3,80	11,55±1,86	8,59±1,45	10,90±1,14	20,34±3,12*	19,48±1,22*	12,97±3,36#	15,77±1,93
LipoPTX IC90	5,58±2,47	10,75±3,05	8,94±2,51	10,48±2,98	11,11±2,21	12,37±3,87	13,60±5,61	12,88±3,53	24,66±4,03*	19,57±2,88*#	17,08±1,07#	20,97±5,09*#
LipoPTX-gH625 IC10	5,41±0,93	6,35±0,98	8,80±2,45	4,93±3,49	8,33±2,68	7,92±1,20	9,10±2,49	8,42±2,14	9,10±2,22	8,01±3,66	11,22±2,39	8,37±1,56
LipoPTX-gH625 0,5 IC50	6,10±1,51	8,25±2,96	8,92±2,58	8,95±2,71	10,91±3,94	10,90±1,04	10,86±2,60	9,70±3,06	15,24±1,24	14,58±4,62	13,22±2,63	11,92±1,77
LipoPTX-gH625 IC50	6,24±1,91	7,35±1,99	10,34±2,91	7,68±1,81	9,42±2,67	12,11±2,01	14,71±4,18	11,33±2,40	17,32±3,22	16,09±2,12	13,28±1,16	15,02±4,17
LipoPTX-gH625 2 IC50	6,47±1,01	9,45±3,41	8,20±3,56	10,50±3,10	13,09±0,59	10,95±2,57	13,20±1,19	12,75±1,54	23,11±5,76	13,72±1,12	15,30±3,20	21,57±3,00
LipoPTX-gH625 IC90	6,28±1,80	8,11±3,10	8,51±4,43	7,89±2,46	12,11±2,52	13,71±2,95	14,78±1,24	14,35±0,97	25,35±2,38	22,98±8,39	22,76±1,92	26,67±3,71
DTX IC10	9,94±2,68	6,79±2,06	6,90±3,34	8,76±2,31	8,18±1,92	12,48±2,20	12,58±2,20	10,70±1,65	12,46±2,59	13,32±1,90	12,23±3,39	13,56±1,70
DTX 0,5 IC50	7,88±2,60	8,33±1,84	9,26±2,98	8,70±3,02	11,75±1,29	14,86±2,70*	14,96±2,70*	10,46±4,48	20,73±1,79*	18,50±2,03*	12,86±2,54	17,86±2,87*
DTX IC50	10,46±2,73	8,91±2,76	8,59±1,92	8,42±1,21	16,83±3,16*	15,42±1,44*	15,52±1,44*	11,01±1,92	32,24±3,66*	24,00±0,93*	15,49±2,55	18,94±3,39*
DTX 2 IC50	11,10±1,79	8,58±1,75	12,15±2,04	12,61±2,82	18,58±1,40*	20,41±0,40*	20,51±0,40*	15,46±0,89*	34,92±4,67*	28,35±1,85*	22,15±3,50*	25,90±1,73*
DTX IC90	10,09±4,24	9,60±0,93	11,82±3,89	5,30±1,36	23,11±1,79*	19,13±2,38*	19,23±2,38*	19,37±1,05*	38,52±2,74*	35,71±2,04*	30,91±2,52*	32,07±3,48*
LipoDTX IC10	8,13±3,79	6,17±2,70	6,49±1,19	6,97±1,90	8,32±1,01	7,98±0,92	8,80±2,08	7,63±2,40	10,36±1,51	8,85±3,41	10,13±3,15	9,67±3,36
LipoDTX 0,5 IC50	9,27±3,17	7,69±2,10	7,82±0,44	8,72±1,70	8,59±1,75	7,25±1,45	9,18±2,10	8,97±1,87	11,88±1,72	9,50±1,65	10,39±3,21	9,65±1,39
LipoDTX IC50	8,28±2,78	6,63±0,94	8,32±1,49	8,45±3,08	9,21±0,45	8,75±2,30	8,00±1,26	13,24±1,94	15,32±2,45#	12,21±2,37#	11,77±5,81#	15,83±1,75#
LipoDTX 2 IC50	9,11±2,43	8,01±1,86	8,93±1,29	9,58±1,34	9,49±2,75	10,04±0,83	9,48±3,04	13,99±1,75	22,97±2,43*	12,31±3,74#	17,78±1,68*	20,75±1,15*#
LipoDTX IC90	9,29±3,64	9,58±1,93	8,94±2,42	6,10±2,08	10,40±0,79#	9,81±3,60#	12,79±3,05#	15,59±1,738	23,50±1,18*#	14,86±2,47#	18,05±4,73*#	22,64±2,86*#
LipoDTX-gH625 IC10	6,94±1,57	6,50±1,48	6,60±1,72	8,03±1,29	6,41±1,61	7,61±1,91	8,50±1,89	7,22±1,33	10,57±1,02	8,61±1,48	9,37±2,51	7,88±5,06
LipoDTX-gH625 0,5 IC50	9,59±1,76	7,25±1,63	7,74±1,70	9,30±0,95	9,33±0,85	8,04±3,67	8,25±2,66	8,45±1,15	13,62±1,73	10,49±3,35	14,37±2,83	13,96±4,41
LipoDTX-gH625 IC50	8,60±0,93	7,08±0,23	7,77±2,68	7,42±1,24	8,68±2,00	10,36±3,32	12,34±1,34	12,30±2,45	14,61±3,87#	13,26±1,16#	12,08±1,85#	12,08±3,86#
LipoDTX-gH625 2 IC50	9,38±1,77	8,72±1,26	8,70±1,60	9,36±1,80	9,10±1,20	11,89±0,60	17,63±2,83*	17,99±2,32*	15,70±3,02#	16,85±1,56#	15,03±2,86#	14,51±3,43#
LipoDTX-gH625 IC90	8,08±2,62	9,82±1,63	9,67±0,85	8,76±2,31	9,33±0,33#	14,46±1,65	22,65±2,86*	21,87±2,01*	22,36±2,40*#	20,32±1,85*#	21,59±2,32*	15,95±1,58#

Tabela 5.10. Procentowa zawartość DNA w ogonie komety komórek linii HMEC-1 inkubowanych z nanonośnikami/peptydem gH625 przez 24 godziny (średnia \pm SD). Komórki analizowano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (0 godz.) oraz po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez związków.
*p < 0,05 względem kontroli

	0 h			24 h			48 h					
	NAC	Troloks	Tiron	NAC	Troloks	Tiron	NAC	Troloks	Tiron			
LipoMIN	5,77 \pm 1,60	8,00 \pm 1,37	12,63 \pm 2,99	8,67 \pm 0,83	7,81 \pm 2,66	9,06 \pm 3,49	11,01 \pm 0,99	9,60 \pm 0,83	8,74 \pm 2,57	10,31 \pm 1,69	11,91 \pm 2,83	9,47 \pm 1,33
LipoMAX	6,84 \pm 3,10	9,08 \pm 2,28	12,74 \pm 0,40	10,15 \pm 2,14	11,77 \pm 3,03	11,61 \pm 2,24	12,78 \pm 3,10	13,27 \pm 2,21	11,64 \pm 3,22	10,91 \pm 2,83	12,41 \pm 3,54	11,10 \pm 2,58
gH625min	7,44 \pm 0,83	8,45 \pm 1,68	7,84 \pm 0,28	10,16 \pm 1,14	10,00 \pm 0,83	11,73 \pm 1,25	10,37 \pm 0,71	10,35 \pm 4,96	9,32 \pm 1,33	9,20 \pm 3,20	10,14 \pm 0,71	11,13 \pm 2,14
gH625max	6,75 \pm 0,87	9,71 \pm 2,33	6,09 \pm 1,17	9,48 \pm 1,22	10,43 \pm 2,46	11,95 \pm 3,27	11,95 \pm 1,43	11,02 \pm 1,92	5,98 \pm 0,00	9,08 \pm 2,47	9,85 \pm 2,17	8,13 \pm 3,05
LipoMIN-gH625	10,33 \pm 3,27	11,52 \pm 0,76	14,96 \pm 3,61	9,45 \pm 1,01	11,43 \pm 5,36	14,38 \pm 0,62	9,05 \pm 1,96	10,48 \pm 3,06	10,37 \pm 2,59	13,42 \pm 4,92	10,05 \pm 4,95	9,10 \pm 2,45
LipoMAX-gH625	11,57 \pm 4,30	13,35 \pm 1,00	11,28 \pm 2,33	9,35 \pm 2,91	12,79 \pm 2,61	13,76 \pm 1,63	10,60 \pm 1,77	8,42 \pm 2,65	11,85 \pm 2,72	10,25 \pm 0,59	9,97 \pm 3,72	11,31 \pm 1,81
Lipo-gH625min	8,59 \pm 2,93	12,27 \pm 2,02	10,72 \pm 2,04	9,93 \pm 2,87	11,31 \pm 1,10	14,49 \pm 1,59	11,91 \pm 2,57	10,84 \pm 2,41	11,33 \pm 0,58	10,82 \pm 5,42	12,44 \pm 1,14	11,07 \pm 1,98
Lipo-gH625max	9,69 \pm 3,49	14,28 \pm 0,86	12,95 \pm 3,51	11,55 \pm 3,14	11,08 \pm 2,18	14,11 \pm 2,12	12,82 \pm 3,34	12,62 \pm 2,01	12,05 \pm 1,09	13,01 \pm 3,36	13,17 \pm 1,98	12,74 \pm 2,01

5.5. Właściwości prooksydacyjne wolnych i liposomalnych taksanów – zmiany zawartości zredukowanego glutationu (GSH)

Do określenia zmian stężeń zredukowanego glutationu wykorzystano specyficzne właściwości sondy monochlorobimanu (MCB), która swobodnie przemieszcza się przez błony komórkowe. MCB reaguje z grupami tiolowymi oraz jest niefizjologicznym substratem dla komórkowych S-transferaz glutationowych (GST). Produktem reakcji MCB ze zredukowanym glutationem jest fluorescencyjny koniugat GS-MCB.

Komórki linii HMEC-1 inkubowano z badanymi związkami przez 24 godziny. Pomiary dokonywano bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (czas 0 h) lub po 24 - i 48 - godzinnej hodowli poinkubacyjnej w medium bez leków (czas 24 h i 48 h).

Wpływ wolnego i liposomalnego paklitakselu na zawartość zredukowanego glutationu

Pomiar stężenia glutationu wykazał istotne różnice między komórkami kontrolnymi, a komórkami inkubowanymi z wolnym paklitakselem (**Rycina 5.10**). Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji każde z zastosowanych stężeń PTX (IC_{10} – IC_{90}) powodowało istotny spadek zawartości wewnątrzkomórkowego GSH. Po 24 godzinach hodowli poinkubacyjnej istotne zmiany występowały tylko w komórkach potraktowanych najwyższymi stężeniami PTX ($2 IC_{50}$ i IC_{90}), podczas gdy po 48 godzinach istotny spadek stężenia GSH odnotowano dla wszystkich stężeń PTX z wyjątkiem $0,5 IC_{50}$. Największy spadek (ok. 25% w stosunku do kontroli) stwierdzono bezpośrednio po zakończeniu inkubacji komórek z wolnym PTX w stężeniach IC_{50} , $2 IC_{50}$ oraz IC_{90} (**Tabela 5.11**).

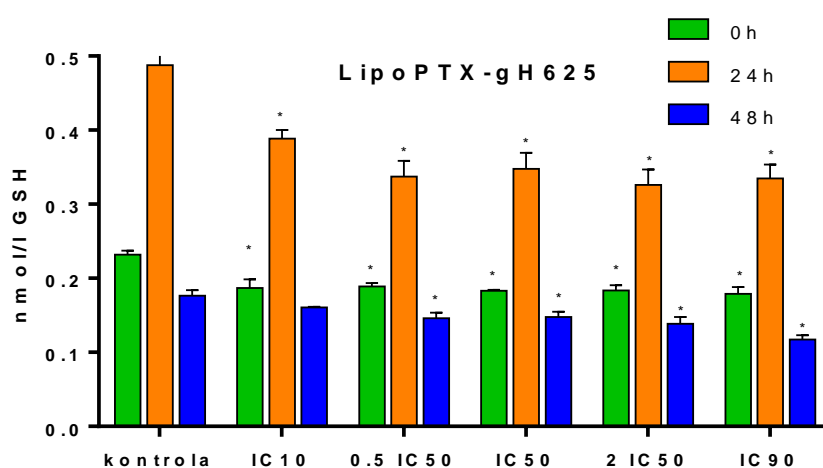
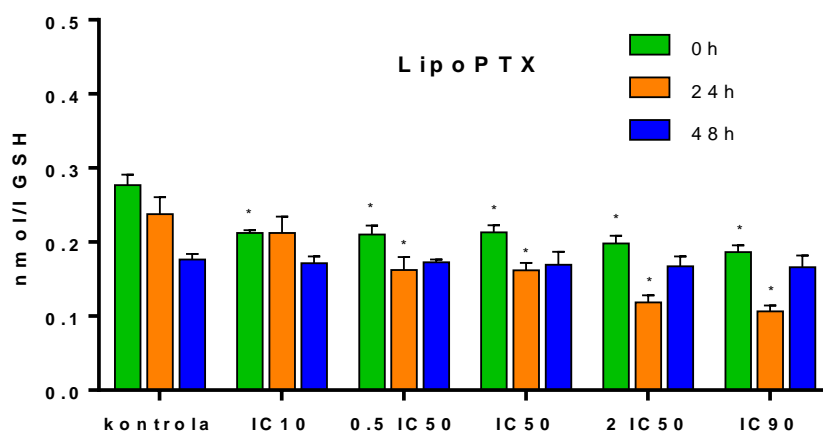
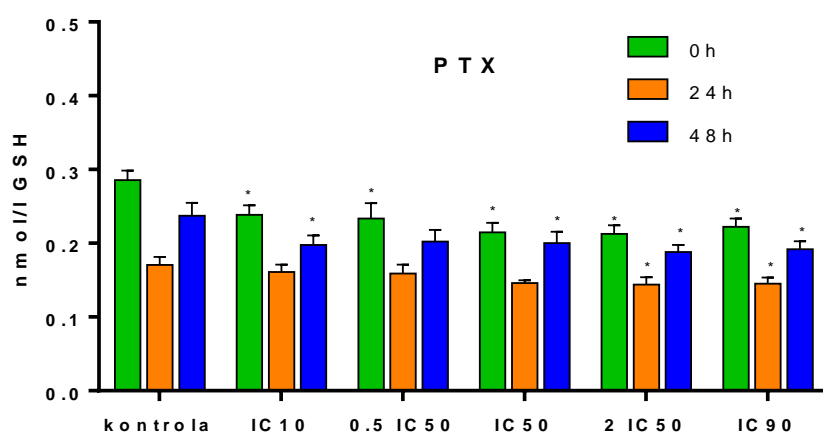
Liposomalny paklitaksel bez peptydu gH625 również powodowały spadek stężenia GSH mierzonego w komórkach bezpośrednio po zakończeniu inkubacji z lekiem oraz po 24 godzinach hodowli poinkubacyjnej. Nie odnotowano natomiast istotnych zmian po 48 godzinach dla żadnego z zastosowanych stężeń PTX. Największy spadek (ok. 50-55%) w stosunku do kontroli występował po 24 godzinach w komórkach inkubowanych z wysokimi stężeniami leku ($2 IC_{50}$ i IC_{90}). Podobne wyniki otrzymano dla liposomalnego paklitakselu z przyłączonym peptydem gH625, który powodował największy spadek stężenia GSH po 24 godzinach (ok.30%).

Wpływ wolnego i liposomalnego docetakselu na zawartość zredukowanego glutationu

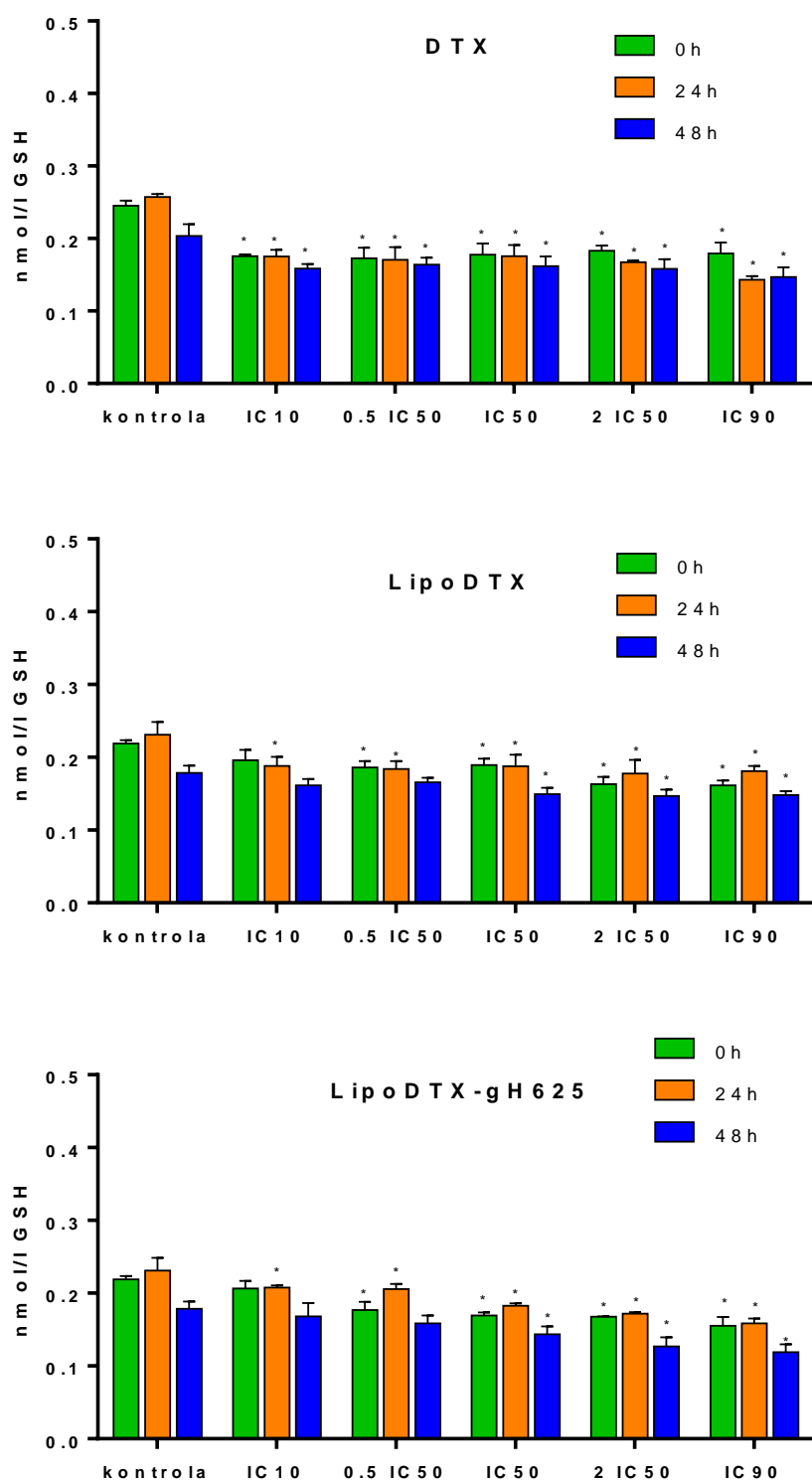
Inkubacja komórek z wolnym docetakselem powodowała istotny spadek stężenia glutationu niezależnie od stężenia leku i czasu pomiaru (**Rycina 5.11, Tabela 5.11**). Stężenie GSH malało progresywnie wraz ze wzrostem stężenia leku. Największy spadek (ok. 56%) odnotowano po 24 godzinach w komórkach potraktowanych najwyższym stężeniem leku (IC₉₀). Dla najniższego stężenia DTX (IC₁₀) obserwowano istotny spadek tylko po 24 godzinach hodowli poinkubacyjnej, natomiast dla stężenia 0,5 IC₅₀ bezpośrednio po inkubacji (0 godz.) oraz po 24 godzinach. Zmiany spowodowane przez liposomalny DTX nie były tak duże jak w komórkach inkubowanych z wolnym DTX. Największy spadek zawartości glutationu (ok. 26%) w komórkach potraktowanych liposomalnym docetakselem bez peptydu gH625 odnotowano dla najwyższego stężenia leku (IC₉₀) bezpośrednio po zakończeniu inkubacji. Dla liposomalnego docetakselu z przyłączonym peptydem gH625 największy spadek zawartości GSH obserwowano również i dla najwyższego stężenia leku (IC₉₀) ale znacznie później – po 48 godzinach.

Wpływ nanonośnika i peptydu gH625 na zawartość zredukowanego glutationu

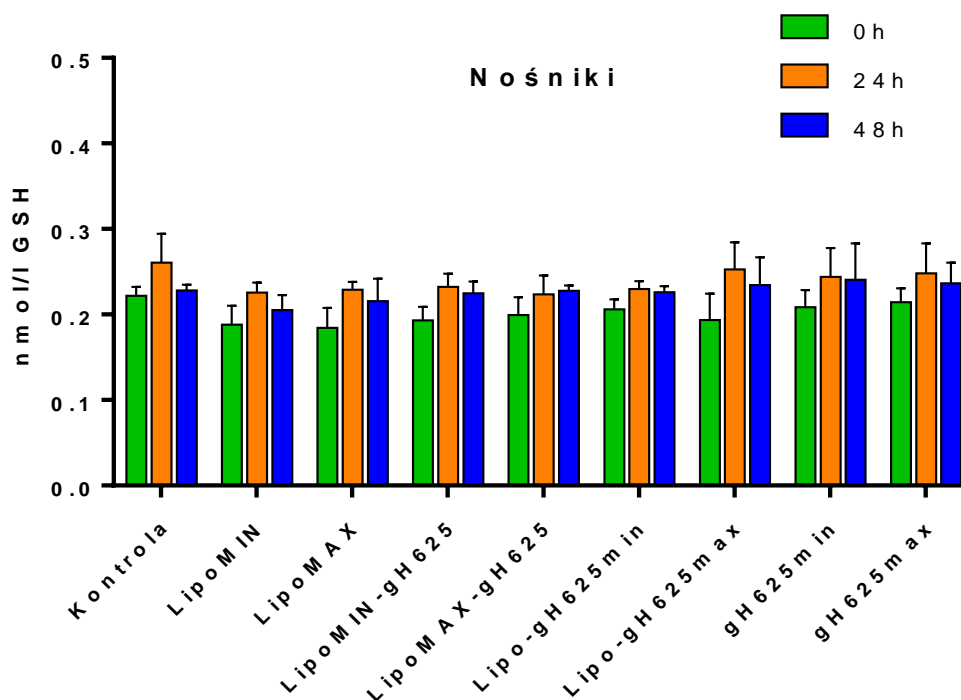
Inkubacja komórek z samym liposomem, peptydem gH625 lub liposomem skoniugowanym z peptydem gH625 nie powodowała istotnych zmian w stężeniu GSH w komórkach linii HMEC-1 (**Rycina 5.12**).



Rycina 5.10. Zmiany stężenia GSH w komórkach linii HMEC-1 inkubowanych przez 24 godziny z paklitakselem, liposomalnym paklitakselem oraz liposomalnym paklitakselem z przyłączonym peptydem gH625. Pomiar stężenia GSH dokonano po zakończeniu inkubacji (0 godzin) oraz po 24 i 48 godzinach hodowli po inkubacyjnej. * $p < 0,05$ względem kontroli



Rycina 5.11. Zmiany zawartości GSH w komórkach linii HMEC-1 inkubowanych przez 24 godziny z docetakselem, liposomalnym docetakselem oraz liposomalnym docetakselem z przyłączonym peptydem penetrującym gH625. Pomiar stężenia GSH dokonano po zakończeniu inkubacji (0 godzin) oraz po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej. * $p < 0,05$ względem kontroli



Rycina 5.12. Zmiany stężenia GSH w komórkach linii HMEC-1 inkubowanych przez 24 godziny z minimalnym (MIN, min) i maksymalnym (MAX, max) stężeniem nanonosników (liposom, peptyd gH625 oraz liposom skoniugowany z peptydem gH625. Pomiar stężenia GSH dokonano po zakończeniu inkubacji (0 godzin) oraz po 24 lub 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej. * $p < 0,05$ względem kontroli

Tabela 5.11. Średnie wartości stężenia zredukowanego glutationu w komórkach linii HMEC-1 inkubowanych z badanymi związkami przez 24 godziny (średnia ± SD). Komórki analizowano po upływie 0, 24 oraz 48 godzin hodowli poinkubacyjnej.

* - p < 0,05 względem kontroli

	0 h				24 h				48 h			
		NAC	Trolox	Tiron		NAC	Trolox	Tiron		NAC	Trolox	Tiron
Kontrola (K)	0,29±0,01	0,38±0,02*	0,28±0,01	0,28±0,01	0,17±0,01	0,22±0,01*	0,17±0,00	0,18±0,01	0,24±0,02	0,24±0,02	0,23±0,01	0,23±0,01
PTX IC10	0,24±0,01*	0,25±0,02	0,23±0,01*	0,23±0,01*	0,16±0,01	0,11±0,01*	0,11±0,01*	0,15±0,01	0,20±0,01*	0,20±0,01*	0,17±0,01*	0,23±0,01
PTX 0,5×IC50	0,23±0,02*	0,22±0,01*	0,22±0,02*	0,23±0,01*	0,16±0,01	0,11±0,01*	0,11±0,01*	0,15±0,02	0,20±0,02	0,20±0,01*	0,17±0,01*	0,23±0,02
PTX IC50	0,21±0,01*	0,22±0,02*	0,22±0,01*	0,23±0,01*	0,15±0,00	0,11±0,01*	0,11±0,01*	0,15±0,01	0,20±0,02*	0,20±0,01*	0,16±0,01*	0,22±0,01
PTX 2×IC50	0,21±0,01*	0,21±0,01*	0,23±0,01*	0,23±0,01*	0,14±0,01*	0,10±0,01*	0,10±0,01*	0,15±0,01	0,19±0,01*	0,20±0,01*	0,17±0,01*	0,23±0,01
PTX IC90	0,22±0,01*	0,20±0,01*	0,22±0,01*	0,23±0,01*	0,15±0,01*	0,09±0,01*	0,09±0,01*	0,15±0,01	0,19±0,01*	0,20±0,01*	0,17±0,01*	0,22±0,02
Kontrola (K)	0,28±0,01	0,38±0,03*	0,28±0,01	0,27±0,01	0,24±0,02	0,30±0,00*	0,25±0,01	0,23±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,17±0,00	0,17±0,00
LipoPTX IC10	0,21±0,00*	0,27±0,01	0,26±0,00	0,26±0,01	0,21±0,02	0,21±0,01	0,22±0,01	0,21±0,00	0,17±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01
LipoPTX 0,5 IC50	0,21±0,01*	0,27±0,01	0,26±0,01	0,25±0,00*	0,16±0,02*	0,20±0,01	0,21±0,02	0,20±0,01	0,17±0,00	0,17±0,00	0,16±0,01	0,17±0,00
LipoPTX IC50	0,21±0,01*	0,27±0,01	0,24±0,01*	0,25±0,00*	0,16±0,01*	0,17±0,01*	0,20±0,02	0,21±0,02	0,17±0,02	0,16±0,01	0,16±0,01	0,16±0,01
LipoPTX 2 IC50	0,20±0,01*	0,20±0,01*	0,24±0,01*	0,24±0,01*	0,12±0,01*	0,16±0,01*	0,18±0,01*	0,20±0,01	0,17±0,01	0,15±0,01*	0,16±0,01	0,15±0,01*
LipoPTX IC90	0,19±0,01*	0,21±0,02*	0,23±0,00*	0,23±0,01*	0,11±0,01*	0,15±0,03*	0,18±0,02*	0,20±0,02	0,17±0,02	0,15±0,01*	0,15±0,01	0,14±0,01*
Kontrola (K)	0,23±0,01	0,31±0,01*	0,23±0,10	0,23±0,01	0,49±0,02	0,60±0,01*	0,46±0,01	0,48±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,17±0,00	0,17±0,00
LipoPTX-gH625 IC10	0,19±0,01*	0,23±0,00	0,23±0,00	0,19±0,01*	0,39±0,01*	0,45±0,02*	0,44±0,01*	0,41±0,02*	0,16±0,00	0,18±0,00	0,17±0,02	0,17±0,00
LipoPTX-gH625 0,5 IC50	0,19±0,00*	0,24±0,00*	0,22±0,00	0,18±0,01*	0,34±0,02*	0,42±0,01*	0,41±0,01*	0,41±0,01*	0,15±0,01*	0,17±0,00	0,16±0,02	0,15±0,02
LipoPTX-gH625 IC50	0,18±0,00*	0,20±0,01*	0,22±0,010	0,18±0,01*	0,35±0,02*	0,42±0,01*	0,38±0,01*	0,37±0,01*	0,15±0,01*	0,14±0,00*	0,16±0,01	0,15±0,02
LipoPTX-gH625 2 IC50	0,18±0,01*	0,19±0,01*	0,21±0,01*	0,19±0,01*	0,33±0,02*	0,38±0,02*	0,38±0,01*	0,40±0,03*	0,14±0,01*	0,14±0,00*	0,15±0,01	0,14±0,00*
LipoPTX-gH625 IC90	0,18±0,01*	0,18±0,02*	0,19±0,01*	0,18±0,01*	0,33±0,02*	0,39±0,02*	0,37±0,00*	0,38±0,02*	0,12±0,01*	0,14±0,00*	0,15±0,02	0,14±0,00*
Kontrola (K)	0,25±0,01	0,33±0,02*	0,24±0,01	0,24±0,01	0,26±0,00	0,33±0,00*	0,24±0,01	0,26±0,00	0,20±0,02	0,19±0,02	0,19±0,01	0,19±0,01
DTX IC10	0,18±0,00*	0,15±0,01*	0,24±0,01	0,20±0,01*	0,18±0,01*	0,11±0,01*	0,19±0,00*	0,19±0,01*	0,16±0,01*	0,20±0,01	0,18±0,01	0,17±0,01
DTX 0,5 IC50	0,17±0,01*	0,16±0,01*	0,24±0,01	0,19±0,01*	0,17±0,02*	0,10±0,01*	0,20±0,01*	0,19±0,02*	0,16±0,01*	0,19±0,01	0,19±0,01	0,18±0,01
DTX IC50	0,18±0,02*	0,16±0,02*	0,24±0,01	0,18±0,01*	0,18±0,02*	0,09±0,00*	0,20±0,01*	0,19±0,00*	0,16±0,01*	0,18±0,01	0,18±0,00	0,18±0,01
DTX 2 IC50	0,18±0,01*	0,16±0,01*	0,22±0,01	0,19±0,02*	0,17±0,00*	0,08±0,00*	0,19±0,01*	0,18±0,02*	0,16±0,01*	0,17±0,01*	0,18±0,01	0,18±0,02
DTX IC90	0,18±0,02*	0,15±0,00*	0,22±0,02	0,19±0,01*	0,14±0,01*	0,07±0,01*	0,17±0,01*	0,17±0,02*	0,15±0,01*	0,14±0,01*	0,18±0,02	0,18±0,01
Kontrola (K)	0,22±0,00	0,30±0,01*	0,21±0,01	0,22±0,01	0,23±0,02	0,29±0,00*	0,23±0,01	0,23±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01
LipoDTX IC10	0,20±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01	0,19±0,01*	0,20±0,01*	0,21±0,01	0,21±0,01	0,16±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01
LipoDTX 0,5 IC50	0,19±0,01*	0,16±0,01*	0,20±0,01	0,20±0,01	0,18±0,01*	0,20±0,02*	0,20±0,00*	0,21±0,01	0,17±0,01	0,16±0,00	0,17±0,01	0,17±0,00
LipoDTX IC50	0,19±0,01*	0,16±0,01*	0,20±0,01	0,20±0,01	0,19±0,02*	0,18±0,01*	0,20±0,01*	0,19±0,01*	0,15±0,01*	0,16±0,01	0,14±0,00*	0,17±0,00
LipoDTX 2 IC50	0,16±0,01*	0,15±0,01*	0,18±0,01*	0,18±0,01*	0,18±0,02*	0,18±0,01*	0,20±0,01*	0,18±0,00*	0,15±0,01*	0,14±0,01*	0,14±0,00*	0,14±0,00*
LipoDTX IC90	0,16±0,01*	0,13±0,01*	0,17±0,02*	0,17±0,01*	0,18±0,01*	0,17±0,00*	0,18±0,01*	0,17±0,01*	0,15±0,01*	0,14±0,01*	0,14±0,00*	0,14±0,00*
Kontrola (K)	0,22±0,00	0,30±0,00*	0,21±0,01	0,22±0,00	0,230,02	0,29±0,00	0,23±0,01	0,23±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01	0,18±0,01
LipoDTX-gH625 IC10	0,21±0,01	0,19±0,00*	0,21±0,00	0,20±0,02	0,21±0,00*	0,22±0,02	0,22±0,00	0,22±0,0	0,17±0,02	0,17±0,01	0,18±0,02	0,17±0,01
LipoDTX-gH625 0,5 IC50	0,18±0,01*	0,19±0,01*	0,17±0,01*	0,19±0,01	0,21±0,01*	0,22±0,01	0,22±0,01	0,21±0,01	0,16±0,01	0,16±0,01	0,17±0,00	0,17±0,01
LipoDTX-gH625 IC50	0,17±0,00*	0,17±0,01*	0,17±0,01*	0,19±0,01	0,18±0,00*	0,21±0,00*	0,21±0,01	0,20±0,01*	0,14±0,01*	0,15±0,01*	0,15±0,01	0,16±0,01
LipoDTX-gH625 2 IC50	0,17±0,00*	0,17±0,00*	0,16±0,01*	0,19±0,02	0,17±0,00*	0,18±0,01*	0,19±0,01*	0,18±0,01*	0,13±0,01*	0,13±0,01*	0,15±0,01*	0,15±0,02
LipoDTX-gH625 IC90	0,16±0,01*	0,17±0,00*	0,16±0,01*	0,18±0,02*	0,16±0,01*	0,17±0,01*	0,19±0,01*	0,18±0,01*	0,12±0,01*	0,12±0,01*	0,15±0,01	0,14±0,01*

	0 h	24 h	48 h
Kontrola (K)	0,22±0,01	0,26±0,03	0,23±0,01
LipoMIN	0,19±0,02	0,23±0,01	0,21±0,02
LipoMAX	0,18±0,02	0,23±0,01	0,22±0,03
gH625min	0,21±0,02	0,24±0,03	0,24±0,04
gH625max	0,21±0,02	0,25±0,03	0,24±0,02
LipoMIN-gH625	0,19±0,02	0,23±0,02	0,22±0,01
LipoMAX-gH625	0,20±0,02	0,22±0,02	0,23±0,01
Lipo-gH625min	0,21±0,01	0,23±0,01	0,23±0,01
Lipo-gH625max	0,19±0,21	0,25±0,03	0,230,03

5.6. Zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$)

Zakłócenie mitochondrialnego potencjału błonowego (MMP) jest jednym z pierwszych zdarzeń występujących w komórce po jej uszkodzeniu i indukcji apoptozy. Zmiany MMP badano przy użyciu kationowego, karbocyjaninowego barwnika JC-1, który jest najczęściej stosowaną sondą fluorescencyjną w badaniach zmian potencjału błony mitochondrialnej i wykrywania jej depolaryzacji/hiperpolaryzacji w komórkach in vitro.

JC-1 może występować w komórce w formie agregatów (w macierzy mitochondrialnej) lub monomerów (w cytoplazmie). Barwnik, ze względu na swój lipofilowy charakter przechodzi łatwo przez ujemnie naładowaną błonę mitochondrialną, gromadząc się w największych ilościach w formie agregatów w błonie hiperspolaryzowanej (MMP – 140 mV). Selektywne nagromadzenie JC-1 w mitochondriach jest wysoce zależne od transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) (Reers et al., 1991, Cossarizza et al., 1993).

Podczas depolaryzacji błony mitochondrialnej następuje spadek jej potencjału (– 100 mV) i rozpad agregatów JC-1. Uprzepuszczenie błony powoduje wyciek sondy do cytoplazmy, w której występuje ona w postaci monomerów. Zagregowana forma JC-1 wykazuje czerwono-pomarańczową fluorescencję (485/538 nm), a forma monomeryczna – zieloną (530/590 nm). Stosunek fluorescencji dimerów JC-1 do jego monomerów odzwierciedla więc zmiany potencjału błony mitochondrialnej, a przejście agregat → monomer powoduje przesunięcie w widmie fluorescencyjnym sondy i zmianę fluorescencji z czerwono-pomarańczowej na zieloną.

Pomiary wykonano po 3-godzinnej inkubacji komórek linii HMEC-1 z lekami. Fluorescencję JC-1 mierzono przez 1 godzinę w interwałach 15-minutowych. W części eksperymentów komórki przed potraktowaniem lekami preinkubowano przez 1 godzinę z antyoksydantem (3 mM NAC).

Wpływ wolnych taksanów

Inkubacja komórek z wolnymi taksanami powodowała silną depolaryzację błony mitochondrialnej (**Ryciny 5.13 i 5.15, Tabela 5.12**). W komórkach inkubowanych z paklitakselem wszystkie zastosowane stężenia leku w zakresie IC₁₀-IC₉₀ powodowały

depolaryzację błony mitochondrialnej już po 15 minutach od zakończenia inkubacji z lekiem. Interesujące, że po tym czasie największy spadek $\Delta\Psi_m$ (ok. 45%) odnotowano w komórkach inkubowanych z najniższym stężeniem leku (IC_{10}). Stężenie 0,5 IC_{50} po tym czasie powodowało ok. 35% spadek $\Delta\Psi_m$. Największy spadek $\Delta\Psi_m$ obserwowano po dłuższym czasie – 60 minut w komórkach inkubowanych z wysokimi stężeniami PTX (IC_{50} ok. 50%, 2 IC_{50} ok. 55% i IC_{90} ok. 45%). Depolaryzacja błony mitochondrialnej utrzymywała się do końca pomiarów (60 min), a potencjał błony mitochondrialnej nie powrócił do poziomu komórek kontrolnych.

W próbach z wolnym docetaksem depolaryzację błony i spadek $\Delta\Psi_m$ odnotowano jedynie w czasie 30 minut dla stężenia 0,5 IC_{50} leku (spadek ok. 47%) i IC_{50} (ok. 36%). W przypadku pozostałych stężeń DTX nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian. Po dłuższym czasie obserwowano repolaryzację błony i powrót $\Delta\Psi_m$ do stanu wyjściowego.

Wpływ liposomalnych taksanów

Depolaryzację potencjału mitochondrialnego w komórkach potraktowanych liposomalnym paklitakselem bez peptydu gH625 (**Rycina 5.13 i Tabela 5.12**) zaobserwowano jedynie bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (czas 0 min) dla niskich stężeń leku (IC_{10} , spadek ok. 60% i IC_{50} , spadek ok. 32%). Po 30 minutach wszystkie stężenia taksanu z wyjątkiem najniższego (IC_{10}) powodowały silną hiperpolaryzację błony mitochondrialnej i ok. 50-60% wzrost $\Delta\Psi_m$. W kolejnym okresie (30 – 60 minut) odnotowano spadek potencjału i jego powrót do poziomu $\Delta\Psi_m$ komórek kontrolnych.

W przypadku liposomalnego docetakselu (**Rycina 5.15**), bezpośrednio po rozpoczęciu pomiaru zaobserwowano hiperpolaryzację błony i wzrost $\Delta\Psi_m$ dla stężenia IC_{50} i 2 IC_{50} leku (w obu przypadkach wzrost ok. 38%). Istotny spadek potencjału odnotowano natomiast dla stężenia IC_{50} po czasie 30 minut (spadek o 33%), po czym następowała repolaryzacja błony i powrót do stanu wyjściowego oraz ponowna depolaryzacja po czasie 60 minut i spadek $\Delta\Psi_m$ ok. 25%.

Wpływ liposomalnych taksanów funkcjonalizowanych peptydem gH625

Liposomalny paklitaksel funkcjonalizowany peptydem gH625 również oddziaływał na błonę mitochondrialną komórek endotelialnych (**Rycina 5.13 i Tabela 5.12**). Największe

zmiany odnotowano dla najwyższego stężenia leku (IC_{90}), które powodowało hiperpolaryzację błony, utrzymującą się na podobnym poziomie aż do 45 minuty pomiaru. Istotną depolaryzację błony odnotowano jedynie dla stężenia $0,5 IC_{50}$ bezpośrednio po zakończeniu inkubacji komórek z lekiem (spadek ok. 45%). W komórkach inkubowanych zarówno z najniższym (IC_{10}) jak i wysokim ($2 IC_{50}$) stężeniem PTX zaobserwowano przejściową hiperpolaryzację błony w 45. minucie pomiaru, po której w 60. minucie potencjał błony mitochondrialny powracał do wartości kontroli.

W komórkach inkubowanych z liposomalnym docetakselem funkcjonalizowanym peptydem gH625, bezpośrednio po zakończeniu inkubacji obserwowano hiperpolaryzację błony mitochondrialnej dla najwyższego stężenia leku (IC_{90}), po czym $\Delta\Psi_m$ ulegał obniżeniu osiągając poziom kontroli. Pozostałe stężenia DTX nie powodowały istotnych zmian (**Rycina 5.15 i Tabela 5.12**).

Wpływ nanonosników oraz peptydu gH625

W komórkach potraktowanych tylko nanonosnikiem liposomalnym bez peptydu gH625, nanonosnikiem liposomalnym skoniugowanym z peptydem gH625 lub samym peptydem gH625 także zaobserwowano zmiany potencjału błony mitochondrialnej komórek HMEC-1 (**Rycina 5.17, Tabela 5.13**). Inkubacja z pustymi liposomami nie powodowała większych zmian potencjału błony mitochondrialnej. Przez cały okres pomiaru kinetyki zmian $\Delta\Psi_m$ (0-60 min) w komórkach inkubowanych z nośnikiem liposomalnym skoniugowanym z najwyższym (maksymalnym) stężeniem peptydu gH625 utrzymywała się hiperpolaryzacja błony mitochondrialnej. Największy wzrost $\Delta\Psi_m$ (ok. 85%) odnotowano w 15. minucie pomiaru po zakończeniu inkubacji, po czym następowała powolna repolaryzacja błony.

Wpływ antyoksydantów

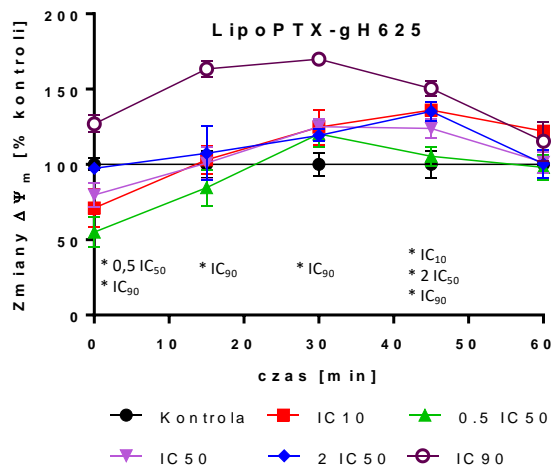
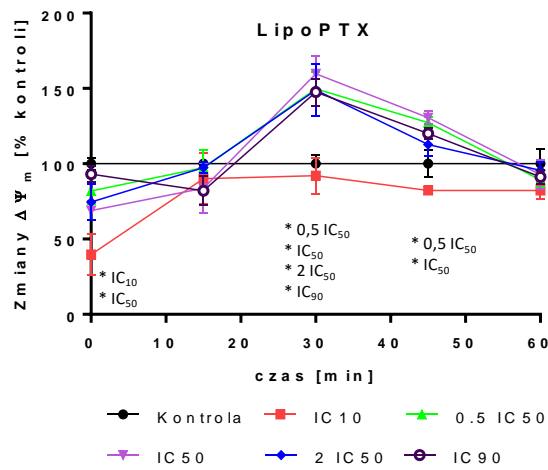
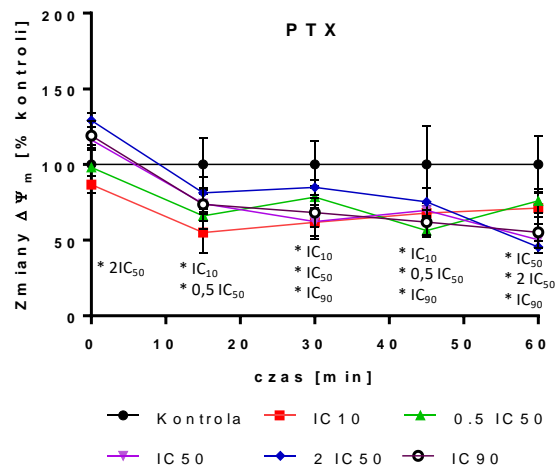
Preinkubacja komórek z NAC w przypadku wolnego PTX działała ochronnie i po upływie jednej godziny od zakończenia inkubacji i repolaryzacji błony poziom $\Delta\Psi_m$ powracał do poziomu zbliżonego do $\Delta\Psi_m$ komórek kontrolnych. W próbach z wolnym docetakselem nie odnotowano istotnych odchyień od poziomu potencjału

komórek kontrolnych. Preinkubacja z NAC nie wpływała również na działanie liposomalnego docetakselu bez peptydu gH625 i nie powodowała żadnych zmian $\Delta\Psi_m$.

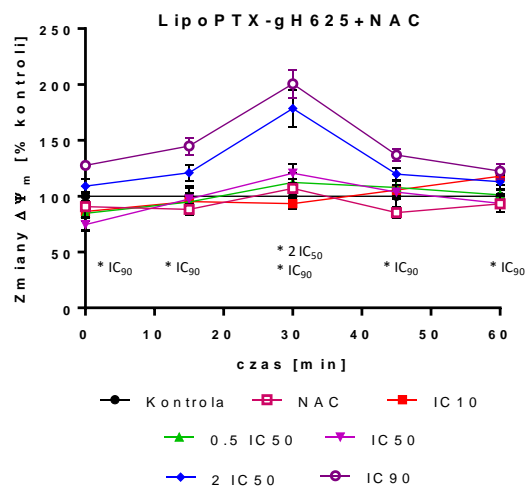
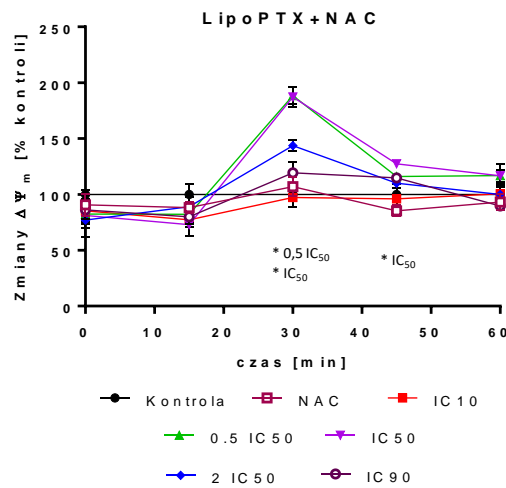
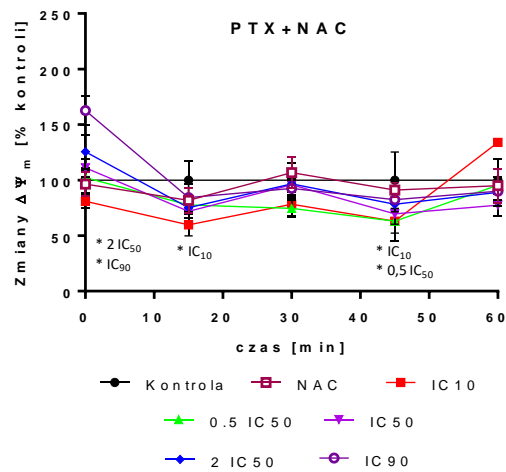
W próbach preinkubowanych z NAC i przed potraktowaniem liposomalnym paklitakselem bez peptydu gH625 nie zaobserwowano depolaryzacji błony mitochondrialnej. Po 30 minutach natomiast odnotowano znaczną hiperpolaryzację błony dla stężeń 0,5 IC₅₀ (wzrost o ok. 88%) i IC₅₀ (wzrost o ok. 87%). Liposomalny paklitaksel z peptydem gH625 w najwyższym stężeniu IC₉₀ po preinkubacji z NAC powodował hiperpolaryzację błony, która utrzymywała się przez cały czas wykonywania pomiarów (60 min) (**Rycina 5.14, Tabela 5.12**).

Preinkubacja komórek z NAC nie wpływała na zmiany potencjału komórek traktowanych najniższym stężeniem liposomalnego docetakselu (IC₁₀). Bezpośrednio po rozpoczęciu pomiaru odnotowano hiperpolaryzację błony mitochondrialnej dla stężeń 2 IC₅₀ (wzrost o ok. 20%) i IC₉₀ (wzrost o ok. 21%), a po 30 min również dla stężeń 0,5 IC₅₀ (wzrost o ok. 21%) i IC₅₀ (wzrost o ok. 29%). W późniejszym okresie następowała repolaryzacja błony i powrót $\Delta\Psi_m$ do poziomu w komórkach kontrolnych.

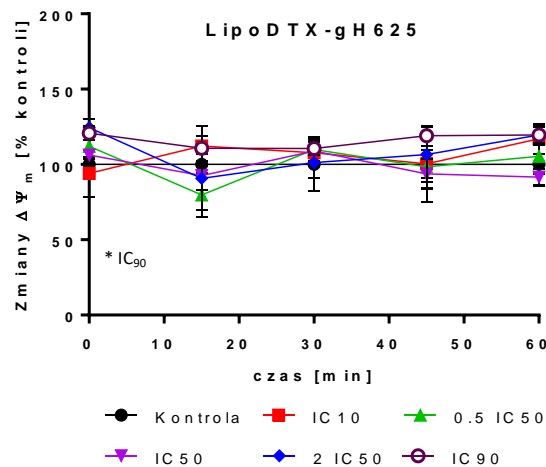
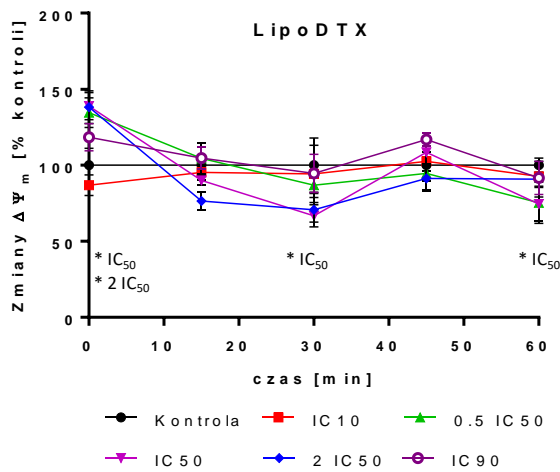
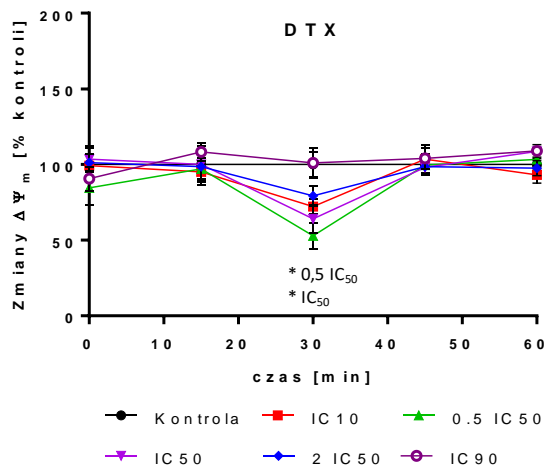
W próbach z nanonosnikami preinkubacja z NAC powodowała istotny wzrost $\Delta\Psi_m$ (ok. 13%) w 60. minucie pomiaru jedynie w komórkach inkubowanych z najwyższym stężeniem liposomu (**Rycina 5.17 i Tabela 5.13**).



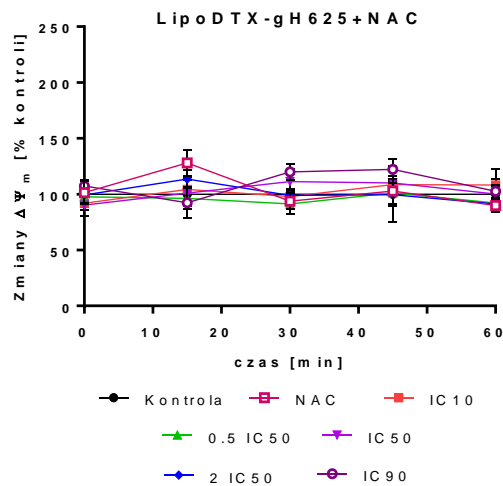
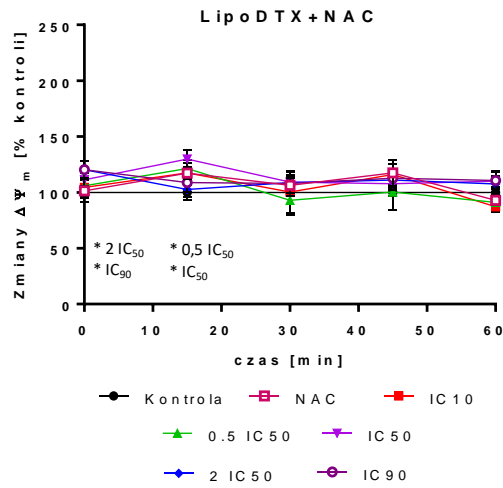
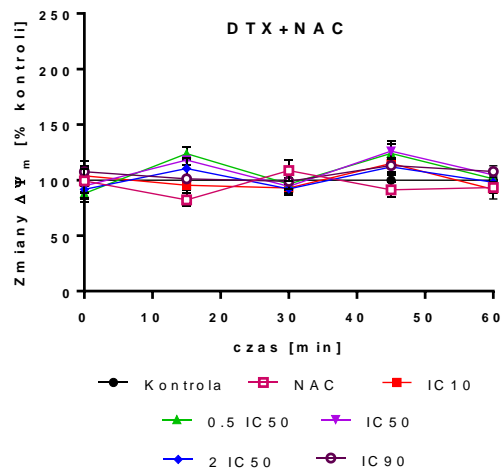
Rycina 5.13. Zmiany potencjału mitochondrialnego w komórkach HMEC-1 inkubowanych z wolnym i liposomalnym paklitakselem przez 3 godziny.
*p < 0,05 względem kontroli



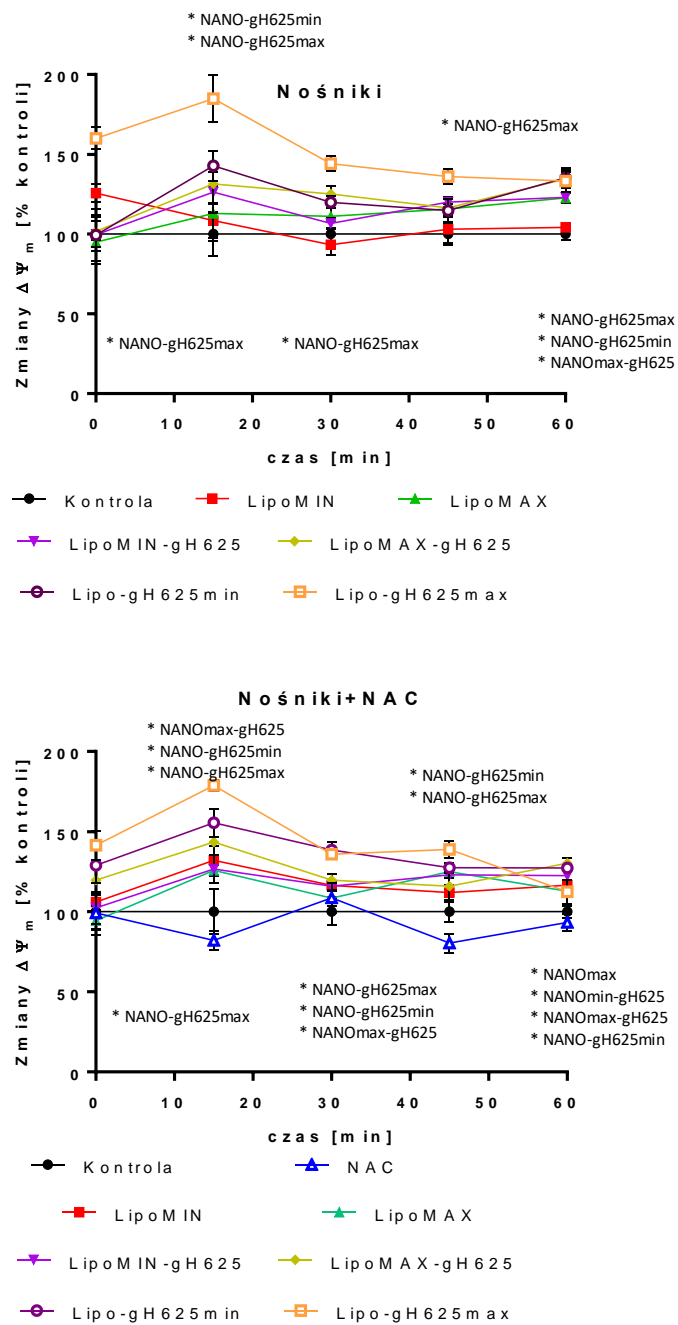
Rycina 5.14. Wpływ NAC na zmiany potencjału mitochondrialnego obserwowane w komórkach HMEC-1 inkubowanych z wolnym i liposomalnym paklitakselem przez 3 godziny. * $p < 0,05$ względem kontroli



Rycina 5.15. Zmiany potencjału mitochondrialnego obserwowane w komórkach HMEC-1 inkubowanych z wolnym i liposomalnym docetaksem przez 3 godziny.
* $p < 0,05$ względem kontroli



Rycina 5.16. Wpływ NAC na zmiany potencjału mitochondrialnego obserwowane w komórkach HMEC-1 inkubowanych z wolnym i liposomalnym docetakselem przez 3 godziny. * $p < 0,05$ względem kontroli



Rycina 5.17. Wpływ nanonosników i NAC na potencjał mitochondrialny komórek HMEC-1 inkubowanych ze związkami przez 3 godziny. * $p < 0,05$ względem kontroli

Tabela 5.12. Procentowe zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) komórek linii HMRC-1 (średnia \pm SD) inkubowanych przez 3 godz. z wolnymi i liposomalnymi taksanami (PTX i DTX) bez lub z penetrującym peptydem gH625 skoniugowanym z lizosomem. Kinetykę zmian $\Delta\Psi_m$ śledzono w czasie 60 min po zakończeniu inkubacji wykonując pomiary fluorescencji sondy JC-1 co 15 min. *p < 0,05 względem kontroli

						+ NAC				
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Kontrola (K)	100 \pm 11,14	100 \pm 17,18	100 \pm 15,79	100 \pm 25,47	100 \pm 18,90	100 \pm 11,14	100 \pm 17,18	100 \pm 15,79	100 \pm 25,47	100 \pm 18,90
NAC						96,47 \pm 11,27	81,78 \pm 11,16	106,75 \pm 13,74	91,00 \pm 6,75	94,95 \pm 15,27
PTX IC10	86,78 \pm 5,69	55,11\pm13,72*	61,81\pm8,68*	67,89\pm4,61*	71,19 \pm 10,49	81,04 \pm 6,25	59,77\pm9,97*	78,29 \pm 10,89	63,04\pm10,71*	134,00 \pm 3,03
PTX 0,5 IC50	98,13 \pm 1,49	66,03\pm8,53*	78,50 \pm 7,38	56,43\pm4,48*	76,01 \pm 7,73	102,26 \pm 6,46	77,60 \pm 5,55	74,47 \pm 7,72	63,00\pm17,77*	95,38 \pm 3,02
PTX IC50	116,26 \pm 3,69	74,15 \pm 6,66	62,30\pm11,16*	69,74 \pm 5,15	50,28\pm5,39*	111,00 \pm 7,91	71,81 \pm 0,23	95,86 \pm 9,52	69,71 \pm 9,42	77,36 \pm 9,75
PTX 2 IC50	129,12\pm4,64*	81,23 \pm 10,76	84,82 \pm 5,24	75,28 \pm 9,49	45,54\pm3,97*	125,54\pm15,53*	75,11 \pm 9,39	96,71 \pm 4,61	78,21 \pm 6,90	89,07 \pm 7,03
PTX IC90	118,99 \pm 9,58	73,63 \pm 10,73	68,19\pm9,59*	62,04\pm8,36*	55,16\pm10,07*	162,66\pm13,22*	84,36 \pm 12,68	92,52 \pm 7,19	82,35 \pm 3,57	90,02 \pm 13,08
Kontrola (K)	100,00 \pm 4,13	100,00 \pm 9,20	100,00 \pm 5,88	100,00 \pm 9,28	100,00 \pm 9,82	100,00 \pm 4,13	100,00 \pm 9,20	100,00 \pm 5,88	100,00 \pm 9,28	100,00 \pm 9,82
NAC						90,65 \pm 9,73	88,21 \pm 5,02	106,86 \pm 8,44	85,20 \pm 5,07	93,08 \pm 7,39
LipoPTX IC10	39,83\pm13,99*	90,16 \pm 17,14	92,06 \pm 11,84	82,33 \pm 1,78	82,24 \pm 5,55	85,29 \pm 9,61	77,26 \pm 5,96	97,26 \pm 8,49	100,60 \pm 7,42	100,60 \pm 7,42
LipoPTX 0,5 IC50	81,99 \pm 8,87	97,35 \pm 11,50	149,67\pm11,32*	127,21\pm3,80*	89,29 \pm 5,09	82,40 \pm 8,76	82,18 \pm 7,83	188,46\pm7,39*	115,94 \pm 1,82	116,84 \pm 10,27
LipoPTX IC50	68,88\pm6,31*	83,76 \pm 16,51	159,76\pm11,77*	130,66\pm4,61*	92,68 \pm 9,82	81,13 \pm 10,88	72,98 \pm 10,24	187,19\pm9,35*	127,40 \pm 2,95	116,58 \pm 5,71
LipoPTX 2 IC50	74,64 \pm 12,25	97,35 \pm 3,82	148,92\pm17,03*	112,79 \pm 7,95	95,66 \pm 5,52	77,02 \pm 14,88	88,95 \pm 8,44	143,70 \pm 4,78	110,00 \pm 4,23	99,90 \pm 3,18
LipoPTX IC90	93,01 \pm 5,39	82,01 \pm 9,78	147,53\pm8,97*	120,02 \pm 3,39	91,19 \pm 4,88	86,09 \pm 8,31	79,85 \pm 6,80	119,33 \pm 9,54	114,75 \pm 2,73	89,53 \pm 3,47
Kontrola (K)	100,00 \pm 4,13	100,00 \pm 9,20	100,00 \pm 5,88	100,00 \pm 9,28	100,00 \pm 9,82	100,00 \pm 4,13	100,00 \pm 9,20	100,00 \pm 5,88	100,00 \pm 9,28	100,00 \pm 9,82
NAC						90,65 \pm 9,73	88,21 \pm 5,02	106,86 \pm 8,44	85,20 \pm 5,07	93,08 \pm 7,39
LipoPTX-gH625 IC10	71,12 \pm 12,92	103,02 \pm 9,20	124,69 \pm 11,55	136,16\pm3,31*	122,02 \pm 2,02	86,40 \pm 9,05	95,14 \pm 12,51	93,42 \pm 5,08	105,43 \pm 8,48	117,90 \pm 2,68
LipoPTX-gH625 0,5 IC50	55,10\pm10,19*	84,56 \pm 11,86	120,21 \pm 8,80	105,44 \pm 6,36	98,12 \pm 8,13	84,67 \pm 14,99	94,77 \pm 5,37	112,34 \pm 8,75	107,72 \pm 3,17	101,26 \pm 4,28
LipoPTX-gH625 IC50	79,80 \pm 7,90	100,99 \pm 10,55	125,13 \pm 4,96	123,87 \pm 6,27	101,48 \pm 7,05	74,61 \pm 5,76	97,41 \pm 5,47	120,61 \pm 8,58	103,72 \pm 6,07	93,48 \pm 8,14
LipoPTX-gH625 2 IC50	97,49 \pm 3,07	107,46 \pm 17,83	119,29 \pm 4,04	135,18 \pm 6,34*	100,40 \pm 9,43	109,06 \pm 6,23	120,89 \pm 7,40	178,55\pm16,71*	119,76 \pm 5,57	112,83 \pm 6,38
LipoPTX-gH625 IC90	126,83\pm5,69*	163,35\pm5,51*	169,89\pm3,63*	150,46\pm5,07*	115,45 \pm 13,04	127,55\pm3,77*	144,93\pm7,68*	200,55\pm12,88*	136,87\pm5,72*	122,47\pm6,78*
Kontrola (K)	100,00 \pm 10,79	100,00 \pm 13,88	100,00 \pm 8,49	100,00 \pm 6,65	100,00 \pm 3,88	100,00 \pm 10,79	100,00 \pm 13,88	100,00 \pm 8,49	100,00 \pm 6,65	100,00 \pm 3,88
NAC						99,28 \pm 10,92	82,17 \pm 5,83	108,68 \pm 9,58	91,21 \pm 6,82	93,25 \pm 5,28
DTX IC10	99,31 \pm 7,85	95,12 \pm 4,91	72,28 \pm 5,17	103,57 \pm 9,31	93,14 \pm 5,52	103,92 \pm 9,43	95,43 \pm 4,61	93,03 \pm 3,23	115,08 \pm 2,81	91,67 \pm 8,74
DTX 0,5 IC50	84,52 \pm 11,11	97,16 \pm 7,45	52,87\pm8,71*	99,61 \pm 5,76	103,35 \pm 1,50	87,97 \pm 7,75	123,77 \pm 5,93	96,40 \pm 5,31	124,14 \pm 11,37	101,08 \pm 7,56
DTX IC50	103,61 \pm 8,51	100,09 \pm 11,95	64,03\pm9,50*	98,13 \pm 4,99	108,69 \pm 2,71	94,84 \pm 11,71	118,06 \pm 1,80	94,47 \pm 7,98	126,06 \pm 6,25	104,73 \pm 5,70
DTX 2 IC50	101,16 \pm 6,03	98,56 \pm 8,68	79,32 \pm 6,51	98,55 \pm 1,79	97,69 \pm 5,11	91,77 \pm 7,74	110,44 \pm 9,67	92,16 \pm 4,18	111,85 \pm 7,20	98,03 \pm 2,99
DTX IC90	90,63 \pm 8,05	108,28 \pm 5,79	101,10 \pm 9,88	104,10 \pm 7,19	109,06 \pm 4,14	107,61 \pm 10,12	101,10 \pm 3,16	98,90 \pm 6,95	113,21 \pm 6,28	107,82 \pm 5,15
Kontrola (K)	100,00 \pm 11,21	100,00 \pm 6,70	100,00 \pm 17,93	100,00 \pm 16,22	100,00 \pm 4,72	100,00 \pm 5,06	100,00 \pm 6,70	100,00 \pm 17,93	100,00 \pm 16,22	100,00 \pm 4,72
NAC						101,44 \pm 10,46	117,18 \pm 5,50	106,30 \pm 6,93	117,57 \pm 11,48	92,91 \pm 4,58
LipoDTX IC10	86,88 \pm 6,76	95,32 \pm 4,96	94,38 \pm 18,88	102,64 \pm 6,21	92,63 \pm 6,38	104,57 \pm 9,02	117,46 \pm 8,62	100,25 \pm 1,32	116,09 \pm 9,49	87,09 \pm 4,65
LipoDTX 0,5 IC50	134,63 \pm 9,82	104,51 \pm 10,10	86,93 \pm 5,43	94,57 \pm 4,81	75,34 \pm 13,54	105,95 \pm 5,03	121,39\pm7,82*	92,25 \pm 13,17	100,36 \pm 3,95	91,15 \pm 3,29
LipoDTX IC50	138,93\pm8,97*	90,00 \pm 3,20	66,73\pm7,34*	108,50 \pm 4,81	74,53\pm10,88*	111,23 \pm 5,80	129,84\pm8,07*	109,25 \pm 6,30	107,74 \pm 6,07	110,13 \pm 9,64
LipoDTX 2 IC50	138,24\pm10,75*	76,44 \pm 5,66	70,72 \pm 8,17	91,33 \pm 8,56	90,80 \pm 11,80	120,32\pm7,95*	102,69 \pm 7,19	108,76 \pm 6,24	111,14 \pm 6,56	107,53 \pm 7,56
LipoDTX IC90	118,46 \pm 9,00	104,70 \pm 7,32	94,62 \pm 12,51	116,86 \pm 4,45	91,65 \pm 10,88	121,33\pm7,94*	108,79 \pm 8,12	107,92 \pm 11,00	112,71 \pm 6,51	110,63 \pm 7,66
Kontrola (K)	100,00 \pm 5,06	100,00 \pm 6,70	100,00 \pm 17,93	100,00 \pm 25,28	100,00 \pm 14,06	100,00 \pm 5,06	100,00 \pm 6,70	100,00 \pm 17,93	100,00 \pm 25,28	100,00 \pm 14,06
NAC						101,44 \pm 10,46	128,09 \pm 11,41	93,75 \pm 7,37	102,90 \pm 13,55	89,89 \pm 5,54
NANO DTX + gH625 IC10	94,02 \pm 15,90	112,21 \pm 13,58	107,79 \pm 8,87	100,41 \pm 9,27	117,02 \pm 9,98	91,98 \pm 5,84	104,25 \pm 10,70	97,80 \pm 5,38	108,56 \pm 5,22	108,24 \pm 14,02
NANO DTX + gH625 0,5 IC50	112,04 \pm 8,36	79,81 \pm 14,59	109,92 \pm 8,12	98,46 \pm 14,03	105,39 \pm 11,93	97,76 \pm 5,74	96,33 \pm 9,47	91,34 \pm 9,29	101,27 \pm 10,46	92,15 \pm 4,07
NANO DTX + gH625 IC50	106,27 \pm 2,28	92,63 \pm 9,92	108,98 \pm 6,66	93,79 \pm 9,97	91,61 \pm 5,63	90,20 \pm 9,53	100,96 \pm 11,86	111,20 \pm 11,41	110,03 \pm 3,70	100,13 \pm 6,77
NANO DTX + gH625 2 IC50	124,36 \pm 5,48	90,73 \pm 21,06	101,25 \pm 10,09	106,60 \pm 18,46	119,51 \pm 6,53	99,31 \pm 7,17	113,64 \pm 8,20	98,90 \pm 6,27	99,55 \pm 10,57	91,34 \pm 4,62
NANO DTX + gH625 IC90	120,77\pm4,83*	110,68 \pm 8,46	110,55 \pm 4,42	119,14 \pm 3,74	119,66 \pm 5,19	107,39 \pm 5,12	92,37 \pm 13,92	119,86 \pm 7,15	122,31 \pm 8,86	102,58 \pm 6,00

Tabela 5.13. Procentowe zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) komórek linii HMRC-1 (średnia \pm SD) inkubowanych przez 3 godz. z nanonośnikiem liposomalnym, penetrującym peptydem gH625 lub nanonośnikiem liposomalnym skoniugowanym z peptydem gH625. Kinetykę zmian $\Delta\Psi_m$ śledzono w czasie 60 min po zakończeniu inkubacji wykonując pomiary fluorescencji sondy JC-1 co 15 min. * $p < 0,05$ względem kontroli

						+ NAC				
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Kontrola (K)	100,00 \pm 10,79	100,00 \pm 13,88	100,00 \pm 8,49	100,00 \pm 6,65	100,00 \pm 3,88	100,00 \pm 10,79	100,00 \pm 13,88	100,00 \pm 8,49	100,00 \pm 6,65	100,00 \pm 3,88
NAC						125,59 \pm 5,86	108,49 \pm 10,85	93,26 \pm 6,11	103,13 \pm 8,49	104,15 \pm 2,05
LipoMIN	125,59 \pm 5,86	108,49 \pm 10,85	93,26 \pm 6,11	103,13 \pm 8,49	104,15 \pm 2,05	106,10 \pm 5,21	132,11 \pm 8,96	116,50 \pm 7,05	111,94 \pm 4,55	116,66 \pm 3,35
LipoMAX	94,97 \pm 13,46	113,03 \pm 17,65	111,13 \pm 7,89	115,83 \pm 3,11	122,75 \pm 3,00	94,42 \pm 8,88	125,75 \pm 3,69	108,44 \pm 5,14	124,94 \pm 3,85	112,75\pm2,45*
LipoMIN-gH625	99,54 \pm 2,98	126,24 \pm 12,92	106,62 \pm 3,13	119,98 \pm 3,07	123,07 \pm 1,63	102,32 \pm 10,35	126,62 \pm 8,85	115,96 \pm 2,98	123,00 \pm 1,99	122,45\pm2,52*
LipoMAX-gH625	101,69 \pm 10,05	131,37 \pm 12,79	125,16 \pm 4,80	116,47 \pm 5,87	134,57\pm4,62*	119,71 \pm 8,22	143,46\pm2,64*	119,74\pm2,77*	115,94 \pm 9,70	130,24\pm3,27*
Lipo-gH625min	99,50 \pm 16,37	142,86\pm9,34*	119,84 \pm 3,81	114,69 \pm 6,96	135,20\pm6,07*	128,98 \pm 11,31	155,49\pm8,81*	138,48\pm5,36*	127,55\pm3,21*	127,23\pm2,54*
Lipo-gH625max	159,97\pm6,99*	184,88\pm14,62*	144,17\pm4,86*	136,00\pm4,80*	133,18\pm6,85*	141,52\pm8,89*	178,84\pm3,50*	135,92\pm1,20*	138,85\pm5,10*	112,49 \pm 7,39

5.7. Indukcja autofagii przez wolne i liposomalne taksany

Autofagia jest prawidłowym procesem komórkowym, który jest odpowiedzialny za usuwanie uszkodzonych organelli lub białek w cytoplazmie. Podczas makroautofagii (najczęściej występująca forma autofagii) składniki komórkowe w pęcherzyku, zwanym autofagosomem, ulegają degradacji po jego fuzji z lizosomem. Do identyfikacji autofagii zastosowano fluorescencyjną sondę monodansylokadawerynę (MDC), która gromadzi się w autofagolizosomach. Komórki inkubowano z lekami przez 24 godziny. Następnie dokonywano pomiaru fluorescencji sondy bezpośrednio po zakończeniu inkubacji z lekami (czas 0 h) oraz po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek w medium bez leków (czas 24 h i 48 h). W niektórych eksperymentach komórki przed potraktowaniem lekami preinkubowano przez 1 godz. z antyoksydantem – NAC, Trolox lub Triton. Pomiaru fluorescencji MDC normalizowano do liczby komórek w próbce, którą oznaczano pośrednio na podstawie pomiaru zawartości DNA przy użyciu bromku etydyny (EB). Po dokonaniu pomiarów fluorescencji MDC do dołków mikropłytki dodawano roztworu bromku etydyny (EB) i mierzono jego fluorescencję.

Wynik końcowy przeliczano na procent stosunku fluorescencji MDC/EB w próbce badanej w odniesieniu do stosunku fluorescencji MDC/EB w komórkach kontrolnych (100%).

Wpływ paklitakselu

W komórkach potraktowanych wolnym paklitakselem obserwowano progresywny wzrost fluorescencji MDC wraz z czasem upływającym od zakończenia 24-godzinnej inkubacji z lekiem. Zmiany te nie były skorelowane ze stężeniem PTX. Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (czas 0 godz.) istotny niewielki wzrost fluorescencji MDC (11% w stosunku do kontroli) obserwowano jedynie dla najwyższego stężenia PTX (IC₉₀). Po 24 godzinach hodowli poinkubacyjnej wzrost natężenia fluorescencji MDC w komórkach inkubowanych z najwyższym stężeniem PTX (IC₉₀) był taki sam (ok. 40%) jak ten w komórkach inkubowanych z najniższym stężeniem leku (IC₁₀). Największy wzrost fluorescencji MDC (80%) powodowało stężenie IC₅₀ leku, a najbardziej nasiloną autofagię obserwowano po 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej – wzrost fluorescencji MDC o 89% (IC₁₀), 91% (0,5 IC₅₀) i 85 % (IC₅₀). Podobnie jak zmiany występujące po 24-godzinnej

hodowli poinkubacyjnej, wysokie stężenia PTX indukowały mniejsze zmiany niż stężenia niższe (62% wzrost fluorescencji MDC dla stężenia 2 IC₅₀ i 27% wzrost dla stężenia IC₉₀).

Liposomalny PTX indukował mniejsze zmiany niż wolny lek, a największy wzrost fluorescencji MDC w stosunku do kontroli nie przekraczał 50%. Podobnie jak w przypadku wolnego PTX najbardziej nasiloną autofagię obserwowano po 48-godzinnej hodowli poinkubacyjnej (54% wzrost w komórkach inkubowanych ze stężeniem 0,5 IC₅₀ leku). Istotnie statystycznie zmiany fluorescencji MDC obserwowano również po 24-godzinnej hodowli poinkubacyjnej dla wszystkich stężeń leku. Zmiany te były jednak mniejsze niż te po czasie 48 godzin. Największy wzrost fluorescencji MDC (30%) występował w komórkach inkubowanych ze stężeniem IC₅₀ LipoPTX.

Skoniugowanie lizosomu z peptydem gH625 znacznie redukowało indukcję autofagii przez LipoPTX-gH625 w komórkach endotelialnych. Wzrost fluorescencji MDC odnotowano tylko po najdłuższym czasie hodowli poinkubacyjnej (48 godz.), a największe zmiany (23% wzrost), podobnie jak w przypadku liposomalnego PTX bez peptydu gH625, występowały przy stężeniu IC₅₀ leku (**Rycina 5.18, Tabela 5.13**).

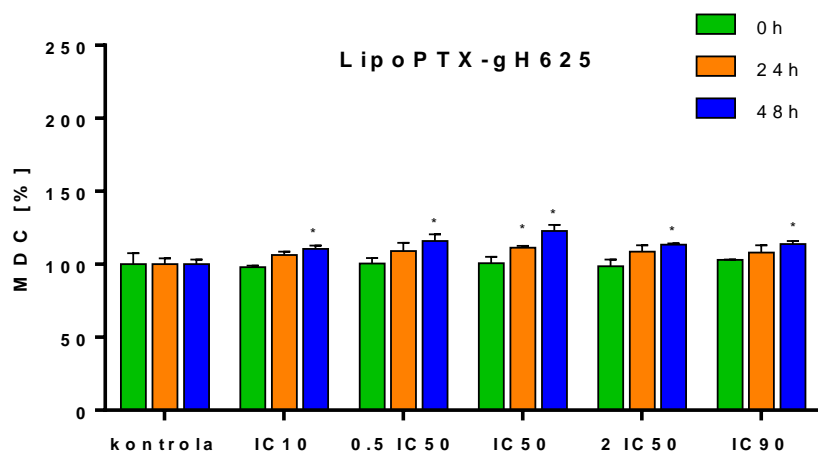
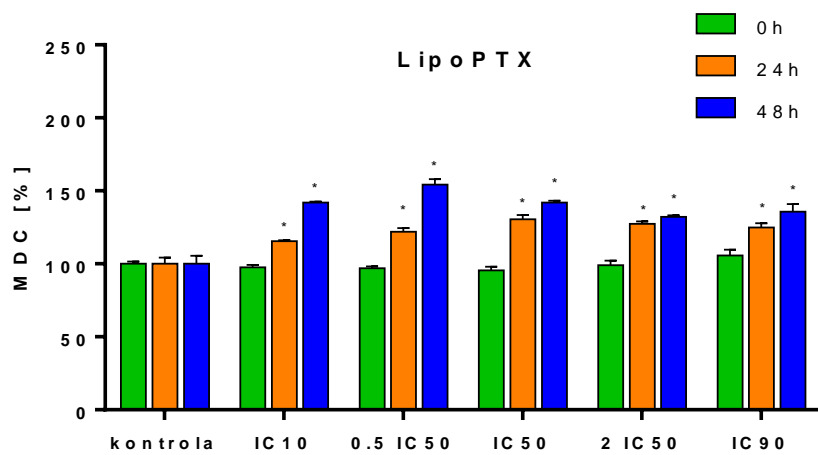
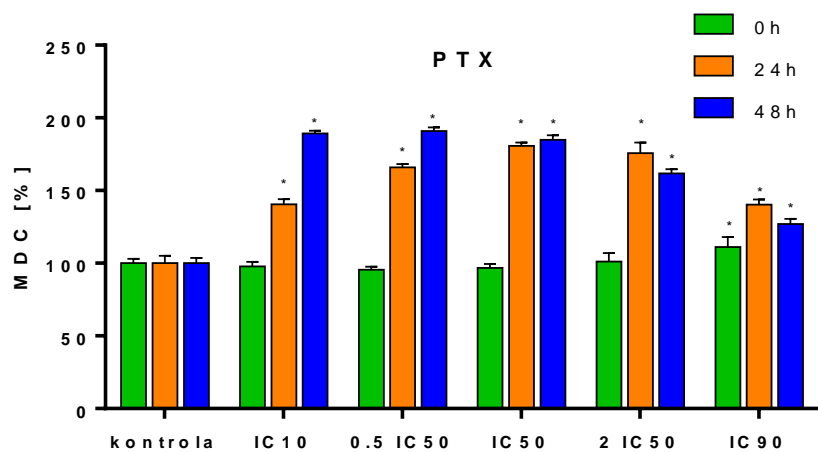
Wpływ docetakselu

W komórkach inkubowanych z wolnym docetakselem obserwowano podobny poziom autofagii jak w komórkach potraktowanych wolnym paklitakselem (**Rycina 5.19, Tabela 5.14**). Istotny wzrost fluorescencji MDC występował po dłuższym czasie od zakończenia inkubacji komórek z lekiem (po 24- i 48-godzinnej hodowli poinkubacyjnej). Podczas gdy w komórkach potraktowanych najwyższym stężeniem PTX odnotowano istotny statystycznie wzrost fluorescencji MDC bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (czas 0 godz.), w komórkach potraktowanych DTX dla żadnego z zastosowanych stężeń leku nie stwierdzono istotnych zmian po tym czasie. Wszystkie stężenia wolnego DTX powodowały natomiast istotny wzrost fluorescencji MDC po 24 i 48 godzinach hodowli komórek w medium bez leku. Największy wzrost fluorescencji MDC (prawie dwukrotny) obserwowano w komórkach potraktowanych wysokim stężeniem DTX (2 IC₅₀).

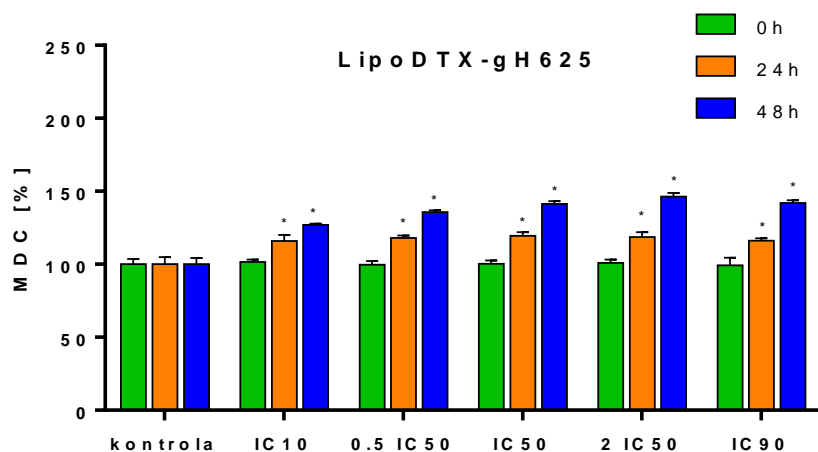
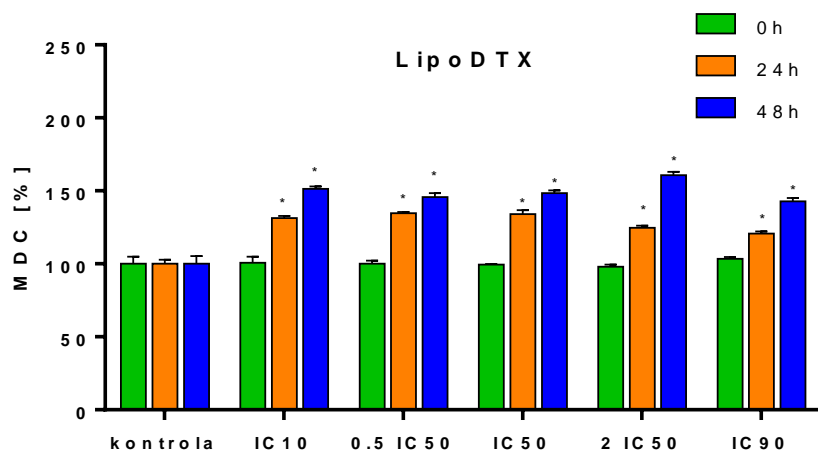
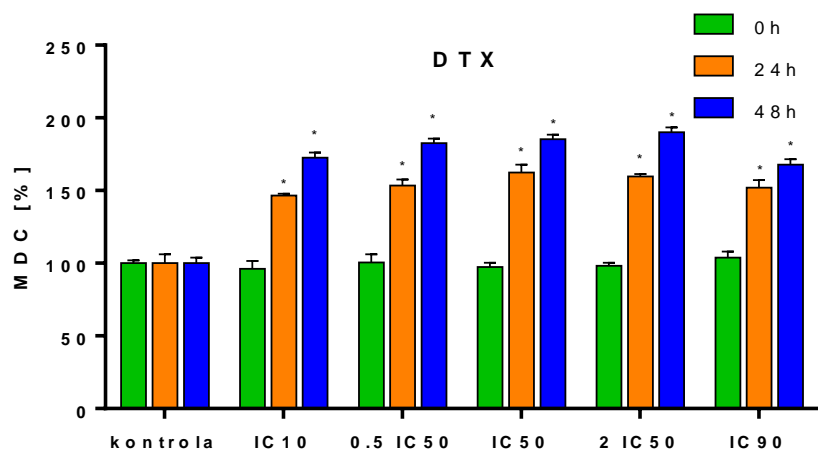
Kinetyka zmian fluorescencji MDC w komórkach potraktowanych liposomalnymi formami docetakselu była podobna do zmian indukowanych przez wolny DTX,

występowały one jednak w mniejszym natężeniu. Istotny wzrost autofagii dla wszystkich stężeń leku obserwowano jedynie po dłuższym czasie – 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej – 32-35% wzrost fluorescencji MDC dla zakresu stężeń IC_{10} – IC_{50} LipoDTX i 21-25% wzrost dla wysokich stężeń leku ($2 IC_{50}$ i IC_{90}) po 24 godzinach. Największe zmiany odnotowano po 48 godzinach: 51-48% (IC_{10} – IC_{50} LipoDTX) i 61-43% ($2 IC_{50}$ i IC_{90} LipoDTX). Zarówno wolny jak i liposomalny docetaksel, podobnie jak PTX, indukowały większe zmiany w niskich stężeniach (IC_{10} – IC_{50}).

Liposomalny DTX skoniugowany z peptydem gH625 indukował najmniej autofagii i powodował jedynie 16-18% wzrost fluorescencji MDC po 24 godzinach oraz 27-46% po 48 godzinach. Zmiany po 24 godzinach nie były zależne od stężenia leku natomiast po 48 godzinach odsetek komórek z autofagosomami zwiększał się wraz ze stężeniem leku **(Rycina 5.19, Tabela 5,14)**.



Rycina 5.18. Procentowa zawartość MDC w komórkach inkubowanych z paklitakselem, liposomalnym paklitakselem oraz liposomalnym paklitakselem z przyłączonym peptydem gH625. * $p < 0,05$ względem kontroli



Rycina 5.19. Procentowa zawartość MDC w komórkach inkubowanych z docetakselem, liposomalnym docetakselem oraz liposomalnym docetakselem z przyłączonym peptydem gH625. * $p < 0,05$ względem kontroli

Wpływ nanonośników i peptydu gH625

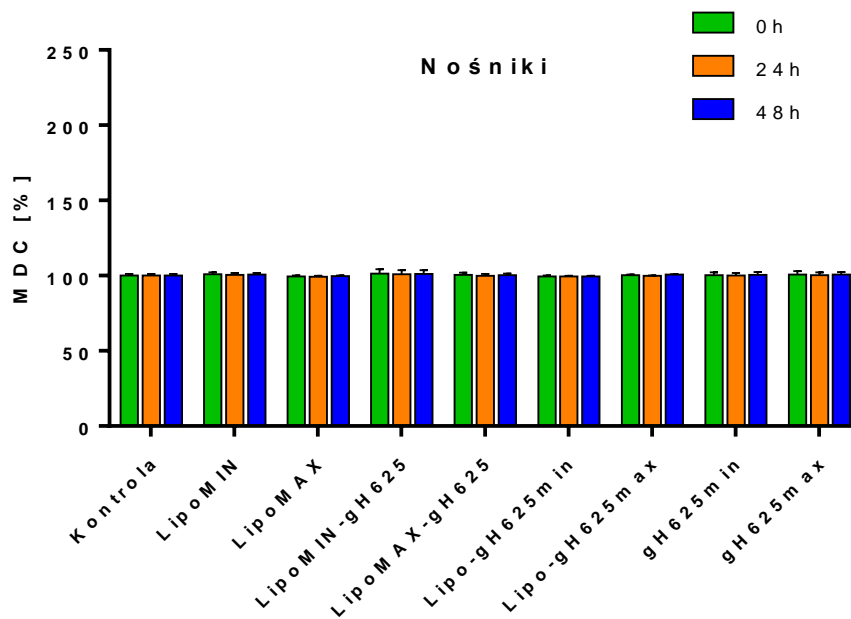
Inkubacja komórek z nanonosnikami lub z samym peptydem gH625 nie powodowała istotnych zmian w natężeniu fluorescencji MDC (**Rycina 5.20, Tabela 5.15**).

Wpływ antyoksydantów

Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji komórek z NAC (czas 0 godz.) nie stwierdzono istotnych zmian w natężeniu fluorescencji MDC, podczas gdy wartości fluorescencji MDC po inkubacji z Troloksiem lub Tironem były o 33% (Troloks) i 28% (Tiron) niższe niż te w komórkach kontrolnych (**Tabela 5.14**). Podobne wartości odnotowano również po 48-godzinnej hodowli poinkubacyjnej komórek inkubowanych z tymi antyoksydantami.

Preinkubacja komórek z antyoksydantami modyfikowała działanie zarówno wolnego PTX jak i jego form liposomalnych. O ile wolny PTX nie indukował autofagii w komórkach endotelialnych bezpośrednio po zakończeniu inkubacji (wyjątek najwyższe stężenie IC_{90} leku), preinkubacja z antyoksydantami (NAC lub Troloks) powodowała 12-23% (NAC, zakres stężeń PTX IC_{50} - IC_{90}) i 16-29% (Troloks, zakres stężeń PTX 0,5 IC_{50} - IC_{90}) wzrost fluorescencji MDC w stosunku do kontroli. Mniejsze zmiany (10-13% wzrost) odnotowano w komórkach traktowanych liposomalnymi formami PTX (LipoPTX i LipoPTX-gH625).

Wszystkie testowane antyoksydanty po dłuższym czasie redukowały znacząco poziom autofagii w komórkach traktowanych taksanami. NAC i Troloks powodowały podobne zmiany: po 24 godzinach hodowli poinkubacyjnej ok. 12-21 % (NAC) i 14-29% (Troloks) spadek fluorescencji MDC w zależności od stężenia PTX oraz ok. 49-69% (NAC) i 30-55% spadek po 48 godzinach. Najbardziej efektywnym antyoksydantem okazał się Tiron, który redukował średnio o 46% fluorescencji MDC.



Rycina 5.20. Procentowa zawartość MDC w komórkach inkubowanych z liposomem, peptydem gH625 oraz liposomem skoniugowanym z peptydem gH625.
 * $p < 0,05$ względem kontroli

Tabela 5.14. Wyniki (średnia ± SD) na podstawie których sporządzono wykresy prezentujące procentową zawartość MDC w komórkach inkubowanych ze związkami. *p < 0,05 względem kontroli

	0 h			24 h			48 h					
	NAC	Troloks	Tiron	NAC	Troloks	Tiron	NAC	Troloks	Tiron			
Kontrola (K)	100,00±3,09	99,50±1,97	67,44±4,42*	71,55±4,48*	100,00±5,06	95,61±5,17	98,80±5,59	99,62±7,43	100,00±3,62	97,95±5,41	66,69±4,02*	71,85±5,09*
PTX IC10	97,80±3,17	105,24±6,25	111,58±5,32	104,43±4,83	140,50±3,63*	128,17±6,57*	168,91±1,94*	117,68±4,85*	189,31±1,91*	120,16±1,94*	133,97±3,19*	96,82±3,26
PTX 0,5 IC50	95,50±2,00	107,32±5,16	115,83±3,92*	102,11±1,34	165,99±2,19*	145,15±5,77*	169,99±1,18*	123,15±7,06*	190,95±2,56*	133,00±3,20*	143,59±2,53*	92,81±2,45
PTX IC50	96,71±2,67	112,52±4,39*	128,89±5,89*	105,33±0,96	180,78±2,28*	160,33±4,03*	184,89±5,46*	130,89±2,72*	184,89±3,10*	136,84±3,58*	144,26±3,94*	88,25±4,26*
PTX 2 IC50	101,25±5,77	121,35±3,10*	123,09±2,74*	104,28±3,62	175,82±7,19*	158,99±6,64*	202,16±5,02*	130,80±3,51*	161,72±2,89*	167,47±3,64*	138,11±1,64*	79,93±4,33*
PTX IC90	111,24±6,74*	122,86±4,51*	118,92±6,99*	103,33±3,32	140,31±3,45*	153,33±6,81*	184,92±0,42*	133,93±1,41*	127,02±3,41*	198,91±4,30*	131,11±2,56*	75,93±2,80*
LipoPTX IC10	97,65±1,64	100,40±1,84	102,51±1,57	101,78±2,90	115,55±0,60*	107,24±0,99*	107,55±1,83*	110,65±1,49*	142,00±0,64*	106,40±2,89	104,97±3,92	125,57±0,76*
LipoPTX 0,5 IC50	96,96±1,25	102,71±1,87	105,97±1,79	104,83±1,37*	121,94±2,51*	109,68±2,74*	111,66±1,29*	116,76±1,40*	154,26±3,81*	108,76±2,51*	107,12±4,97	127,96±0,87*
LipoPTX IC50	95,50±2,57	106,98±1,12*	109,09±0,83*	102,25±1,83	130,62±2,84*	112,23±0,83*	123,19±2,59*	117,78±0,78*	141,98±1,35*	111,48±1,55*	115,30±6,28*	129,76±3,65*
LipoPTX 2 IC50	99,10±3,12	109,69±0,99*	110,93±4,51*	102,17±1,89	127,35±1,77*	117,60±1,31*	122,82±3,20*	121,40±2,15*	132,25±0,94*	115,81±2,67*	118,35±1,24*	125,73±6,04*
LipoPTX IC90	105,76±3,96	105,78±1,58*	112,36±3,96*	99,87±2,15	124,94±2,96*	116,85±0,68*	123,80±1,36*	122,02±1,71*	135,67±5,26*	114,09±0,58*	120,80±0,61*	119,84±1,81*
LipoPTX-gH625 IC10	98,00±1,08	101,49±2,46	101,92±1,81	102,21±0,20	106,37±2,35	112,63±3,39*	106,30±5,46	102,05±2,75	110,56±2,35*	109,65±4,99*	109,91±3,38*	102,75±1,53
LipoPTX-gH625 0,5 IC50	100,46±3,74	106,49±4,05	103,18±2,37	101,02±0,23	109,03±5,66	113,04±2,34*	106,40±1,44	100,65±3,43	116,01±4,43*	112,17±0,52*	112,93±0,93*	101,94±2,32
LipoPTX-gH625 IC50	100,83±4,36	110,56±2,88	108,03±0,20	102,19±0,34	111,26±1,32*	116,82±1,07*	106,84±1,51	101,16±1,21	122,73±4,34*	112,97±0,90*	116,03±4,44*	102,30±1,35
LipoPTX-gH625 2 IC50	98,68±4,50	107,76±6,42	110,31±2,55*	102,26±2,81	108,65±4,28	116,71±0,63*	107,95±3,32	106,76±2,07*	113,42±0,75*	116,61±3,29*	114,45±4,04*	100,56±1,89
LipoPTX-gH625 IC90	103,01±0,15	108,89±4,30	113,28±0,50*	104,66±3,25	108,02±5,08	117,52±3,23*	107,16±4,12	107,46±2,66*	113,92±2,00*	114,63±1,31*	112,68±0,73	102,02±2,43
DTX IC10	96,12±5,53	106,38±2,18*	108,03±4,53*	106,75±1,95*	146,65±1,16*	120,19±2,90*	131,30±2,14*	111,53±1,48*	172,62±3,43*	115,88±0,64*	124,52±2,26*	81,82±5,08*
DTX 0,5 IC50	100,55±5,51	108,62±2,44*	113,08±1,52*	107,15±1,88*	153,43±4,19*	128,82±2,13*	132,76±1,84*	117,69±2,87*	182,54±3,10*	120,16±1,58*	132,96±2,87*	81,91±2,94*
DTX IC50	97,34±2,91	110,62±2,21*	116,41±1,38*	113,42±3,00*	162,38±5,47*	136,75±1,75*	136,17±2,42*	120,17±0,57*	185,27±3,21*	132,44±2,73*	137,37±1,22*	80,09±5,33*
DTX 2 IC50	98,22±2,06	112,06±1,51*	118,80±3,19*	109,48±2,00*	159,63±1,67*	130,46±0,73*	139,31±0,82*	119,15±1,44*	190,12±3,28*	131,73±1,77*	136,51±1,82*	73,98±1,69*
DTX IC90	103,76±4,19	115,00±0,79*	115,19±4,90*	103,18±4,02	152,07±5,18*	118,40±4,56*	145,48±1,76*	123,66±3,86*	167,77±3,75*	108,98±3,88*	139,79±1,02*	68,57±2,33*
LipoDTX IC10	100,65±4,16	102,28±1,59	102,16±1,33	102,44±3,63	131,42±1,42*	111,05±1,86*	108,80±0,25*	109,66±1,86*	151,29±1,72*	112,48±1,58*	111,62±2,75*	89,95±3,49*
LipoDTX 0,5 IC50	100,05±2,12	103,33±0,98	106,73±1,54	102,96±1,28	134,67±0,85*	112,85±2,20*	108,06±2,83*	108,14±1,45*	145,77±2,61*	116,31±0,76*	113,16±1,86*	91,88±2,98*
LipoDTX IC50	99,41±0,47	103,78±2,11	102,80±1,72	102,33±1,30	134,11±2,65*	114,82±0,90*	110,36±1,73*	116,29±3,86*	148,43±1,84*	117,22±0,74*	112,77±1,51*	92,33±4,33*
LipoDTX 2 IC50	97,94±1,51	103,47±1,90	101,85±1,57	102,44±1,56	124,63±1,45*	117,79±2,86*	114,54±0,79*	115,16±0,96*	160,78±2,28*	124,56±1,47*	116,69±1,51*	92,03±2,91*
LipoDTX IC90	103,46±1,23	103,44±1,81	102,43±4,54	99,29±0,80	120,79±1,35*	114,32±1,43*	110,49±0,83*	120,78±1,32*	142,91±2,26*	117,49±1,47*	111,88±1,99*	88,62±2,36*
LipoDTX-gH625 IC10	101,51±1,63	102,56±3,13	101,41±4,03	100,35±1,41	115,84±4,26*	107,30±1,93*	111,90±3,43*	99,89±4,17	127,02±0,83*	107,19±0,88*	105,93±0,71*	87,01±2,12*
LipoDTX-gH625 0,5 IC50	99,65±2,63	101,57±1,59	104,51±1,15	104,26±1,39	117,94±1,75*	110,93±2,13*	111,77±2,27*	100,45±1,50	135,77±1,25*	107,97±3,05*	105,99±0,77*	93,23±1,48*
LipoDTX-gH625 IC50	100,31±2,34	105,84±2,66	104,41±2,73	103,61±3,50	119,52±2,49*	111,18±3,14*	113,92±1,55*	99,25±1,91	141,45±1,87*	107,39±2,57*	107,77±1,07*	97,28±1,22
LipoDTX-gH625 2 IC50	100,93±2,37	105,15±2,29	105,59±2,25	105,16±0,27	118,64±3,33*	116,61±2,23*	117,23±2,41*	95,64±3,81	146,31±2,49*	108,53±2,61*	109,56±2,34*	95,86±3,20
LipoDTX-gH625 IC90	99,19±5,28	101,05±3,68	105,42±0,44	106,18±0,79*	116,08±1,67*	115,68±1,90*	118,72±1,89*	92,66±0,65*	141,98±1,85*	107,85±0,67*	111,48±3,06*	94,30±3,59

Tabela 5.15. Wyniki (średnia \pm SD) na podstawie których sporządzono wykresy prezentujące procentową zawartość MDC w komórkach inkubowanych ze związkami * $p < 0,05$ względem kontroli

	0 h			24 h			48 h					
	NAC	Troloks	Tiron	NAC	Troloks	Tiron	NAC	Troloks	Tiron			
LipoMIN	100,91 \pm 1,20	102,78 \pm 5,16	104,12 \pm 3,52	97,53 \pm 1,89	100,59 \pm 1,18	103,00 \pm 5,08	103,25 \pm 2,89	97,92 \pm 0,57	100,73 \pm 1,08	103,13 \pm 4,62	103,15 \pm 3,28	97,52 \pm 1,78
LipoMAX	99,50 \pm 0,63	102,99 \pm 2,39	102,34 \pm 2,82	100,84 \pm 1,84	99,34 \pm 0,57	103,57 \pm 2,25	102,92 \pm 2,50	101,40 \pm 1,13	99,61 \pm 0,46	103,22 \pm 2,30	102,05 \pm 2,50	100,97 \pm 1,64
gH625min	100,37 \pm 1,89	99,88 \pm 0,62	99,81 \pm 0,48	100,00 \pm 4,09	100,10 \pm 1,69	99,60 \pm 0,30	98,62 \pm 4,18	98,98 \pm 1,80	100,57 \pm 1,74	100,36 \pm 0,53	98,01 \pm 3,53	97,97 \pm 2,55
gH625max	100,80 \pm 2,18	102,52 \pm 1,69	101,03 \pm 2,05	97,32 \pm 1,02	100,41 \pm 1,87	101,87 \pm 1,53	97,62 \pm 3,74	97,87 \pm 2,40	100,67 \pm 1,70	102,14 \pm 1,51	101,09 \pm 2,08	99,92 \pm 1,36
LipoMIN-gH625	101,40 \pm 2,77	103,00 \pm 2,52	98,46 \pm 3,06	97,72 \pm 2,47	100,98 \pm 2,72	101,80 \pm 5,16	98,94 \pm 2,79	97,88 \pm 2,33	101,09 \pm 2,62	102,18 \pm 1,94	98,56 \pm 2,84	97,93 \pm 2,30
LipoMAX-gH625	100,55 \pm 1,47	102,51 \pm 3,02	100,75 \pm 1,89	100,22 \pm 3,65	99,92 \pm 1,27	101,99 \pm 6,54	101,48 \pm 1,96	100,86 \pm 3,42	100,34 \pm 0,97	104,04 \pm 3,01	101,42 \pm 1,13	100,14 \pm 3,20
Lipo-gH625min	99,58 \pm 0,45	103,27 \pm 2,45	101,43 \pm 3,77	97,56 \pm 2,47	99,43 \pm 0,53	103,10 \pm 2,40	101,55 \pm 3,02	98,02 \pm 2,45	99,53 \pm 0,33	101,21 \pm 5,66	100,51 \pm 3,29	97,68 \pm 2,30
Lipo-gH625max	100,32 \pm 0,48	102,06 \pm 2,96	99,83 \pm 2,31	98,58 \pm 2,27	99,81 \pm 0,37	104,32 \pm 3,85	97,61 \pm 4,29	98,57 \pm 2,56	100,75 \pm 0,29	101,91 \pm 3,24	97,03 \pm 3,67	98,47 \pm 2,02

6. DYSKUSJA

Nowotwory są jednymi z najgroźniejszych chorób zagrażających życiu człowieka. Obecnie podstawowe leczenie raka obejmuje chirurgię, chemioterapię i radioterapię. Chirurgia, która jest częstym podejściem do usuwania złośliwych guzów litych u pacjentów, jest wysoce inwazyjna i nie zapewnia usunięcia wszystkich komórek nowotworowych, szczególnie w zaawansowanych stadiach raka, gdy wystąpiły już przerzuty. Radioterapia i chemioterapia również posiadają wiele ograniczeń, takich jak wysoka toksyczność ogólnoustrojowa, liczne efekty uboczne (często bardzo poważne i nieodwracalne), ograniczona skuteczność terapeutyczna, indukowanie lekooporności i nowotworów wtórnych oraz długotrwałe uszkodzenia układu odpornościowego. W przypadku niektórych nowotworów zarówno radioterapia, jak i chemioterapia nie są wystarczająco skuteczne. W celu przezwyciężenia tych ograniczeń, a szczególnie zredukowania toksyczności ogólnoustrojowej chemioterapeutyków oraz osiągnięcia lepszej efektywności terapeutycznej, konieczne stało się zaprojektowanie nowych efektywnych i bezpiecznych systemów dostarczania leków bezpośrednio do komórek nowotworowych. Rozwiązania tego problemu poszukuje się od lat w najnowszych osiągnięciach nanotechnologii. Nanocząstki ze względu na swoją budowę, rozmiar oraz możliwość modyfikacji ich powierzchni oferują duże możliwości w dziedzinie opracowania nowych terapeutyków, gdyż mogą pełnić rolę transportera leków do określonego obszaru ciała (Ranghar i wsp., 2014; Yingchoncharoen i wsp., 2016; Hartshorn i wsp., 2018; Zhao i wsp., 2018). Spośród wielu różnych nanostruktur liposomy, które charakteryzują się niską toksycznością, wydają się być jednymi z najbardziej atrakcyjnych nośników leków.

Liposomy są samoorganizującymi się, całkowicie zamkniętymi pęcherzykami, które ze względu na swoją budowę mogą transportować zarówno leki hydrofilowe, jak i hydrofobowe. Dodatkowo chronią enkapsulowane leki przed degradacją, znacznie poprawiając okres ich półtrwania, zwiększają rozpuszczalność leków hydrofobowych oraz zmniejszają toksyczność leków wobec komórek prawidłowych (Øverbye i wsp., 2017; Zangabad i wsp., 2018). Liposomalne preparaty doksorubicyny (*Doxil*, *Myocet*) i daunorubicyny (*DaunoXome*) zostały zatwierdzone przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*ang. FDA, U.S. Food and Drug Administration*) do leczenia przerzutowego raka piersi oraz mięsaka Kaposiego związanego z AIDS (Meng i wsp., 2016).

Obecne badania dotyczące modyfikacji liposomów dążą do ich zwiększonej kumulacji w wymaganym narządzie lub tkance, a następnie po wnikięciu do komórki, zwiększonym wewnątrzkomórkowym uwalnianiem leku. Dotychczasowe wyniki badań na modelach komórkowych i zwierzęcych wykazały, że skoniugowanie liposomu z peptydem penetrującymi komórkę może znacznie zwiększyć efektywność wewnątrzkomórkowego dostarczania leków przez liposomy (Zhang i wsp., 2013).

Peptydy penetrujące komórki składają się zazwyczaj z mniej niż 40 aminokwasów, są nietoksyczne i zdolne do przenikania przez błony komórkowe. W badaniach wykorzystywane do ułatwienia transportu różnego rodzaju środków o charakterze terapeutycznym, w tym plazmidowego DNA, siRNA, białek, wirusów, środków obrazujących i różnych nanocząstek (Pärnaste i wsp., 2017; Srimanee i wsp., 2018). Liposom z dołączonym na jego powierzchni peptydem penetrującym błonę znacznie poprawia efektywność przenikania leku do komórek. Torchilin i wsp. (2001) wykazali, że liposomy z dołączonym peptydem TAT są skuteczniej dostarczane do wnętrza komórek różnych linii komórkowych m.in. mysich komórek raka płuc Lewica (LLC), komórek ludzkiego raka piersi (BT20) oraz kardiomiocytów serca szczura (H9C2) w porównaniu z niezmodyfikowanym liposomem bez peptydu. W innym badaniu oceniono kinetykę wychwytu liposomów z dołączonym peptydem TAT. Stwierdzono, że wzrost transportu do wnętrza komórek był proporcjonalny do liczby cząsteczek peptydu przyłączonych do powierzchni liposomu, a do istotnego wzrostu transportu liposomów wystarczyło już 5 cząsteczek peptydu TAT. Obecność TAT zwiększała także 12-krotnie wychwyt dokсорubicyny przez komórki linii A431 ludzkiego raka skóry (Tseng i wsp., 2002). Badania przeprowadzone przez Marty i wsp. (2004) wykazały, że liposomy z dołączonym białkiem antennapedia (Antp) lub TAT gromadziły się w większych ilościach w komórkach nowotworowych i dendrytycznych niż niezmodyfikowane liposomy kontrolne. Wyniki te zachęciły inne zespoły badawcze do wykorzystania liposomów z dołączonymi peptydami penetrującymi do transportu dużych i małych cząsteczek. Pomimo licznych badań klinicznych, których część nadal jest w toku, do chwili obecnej żaden preparat leku cytostatycznego enkapsulowanego w liposomach z dołączonym peptydem penetrującym błonę nie uzyskał zgody FDA na zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej (Tripathi i wsp., 2018; Habault i Poyet, 2019).

Idealny nośnik dostarczający lek do komórek nowotworowych powinien być nietoksyczny, biodegradowalny i biokompatybilny. Jego rozmiar powinien być mniejszy niż 200 nm, powinien szybko i selektywnie gromadzić się w miejscach docelowych nie uszkadzając zdrowych komórek oraz nie powinien wywoływać reakcji immunologicznej. W terapiach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) poszukiwane są również takie nośniki leków, które mogłyby przekraczać barierę krew-mózg (Chen i wsp., 2014; Dhanasekaran i Chopra, 2016; Kalaydina i wsp., 2018). Sugeruje się, że takie właściwości mogą posiadać nanonośniki liposomalne z dołączonym peptydem gH625.

Głównym celem badań wykonanych w ramach niniejszej pracy było porównanie cytotoksyczności wolnych taksanów (docetaksel i paklitaksel) oraz taksanów enkapsulowanych w liposomach skoniugowanych z penetrującym błony komórkowe peptydem gH625 wobec prawidłowych komórek ludzkich. Związki zostały syntetyzowane, scharakteryzowane i udostępnione przez zespół prof. Stefanii Galdiero z Wydziału Farmacji Uniwersytetu Neapolitańskiego im. Fryderyka II w Neapolu. Badania przeprowadzono na ludzkich komórkach endotelialnych linii HMEC-1, jako model prawidłowych komórek *in vitro*, gdyż komórki śródbłonna są jednymi z pierwszych komórek w organizmie człowieka, które są narażone na cytotoksyczne działanie cytostatyków podawanych we wlewach dożylnych w chemioterapii. W związku z tym analiza odpowiedzi komórek śródbłonna naczyń krwionośnych jest istotna przy projektowaniu nowych leków przeciwnowotworowych i ich przENOŚNIKÓW (McAuliffe i wsp., 2002).

Kształt i morfologię liposomów oceniano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Puste niezmodyfikowane liposomy posiadały formę elipsoidalnych pęcherzyków, a enkapsulacja taksanów nie zmieniała w znaczący sposób ich kształtu i rozmiaru. Rozmiar w skali nanometrycznej ma kluczowe znaczenie dla nanocząstek przenoszących leki przeciwnowotworowe, gdyż determinuje pomyślne dostarczenie leku do komórek nowotworowych. Nośniki leków, których rozmiar jest większy niż 20 nm, mogą zapobiegać szybkiemu wyciekaniu leku do układu moczowego, podczas gdy nośniki mniejsze niż 200 nm mogą uniknąć wychwytywania przez makrofagi w układzie fagocytarnym. Analizowane liposomy charakteryzują się małym rozmiarem (poniżej 200 nm), co jest korzystne dla dożylnego dostarczania leku przeciwnowotworowego

i selektywnego gromadzenia się nanocząstek z enkapsulowanym lekiem w rejonie guza poprzez efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (Meng i wsp., 2016; Wang, 2017). Zespół prof. Stefania Galdiero zsyntetyzował wcześniej liposomalną doskorubicynę i liposomalny mitoksantron z przyłączonym peptydem gH625, których średnica wynosiła średnio ok. 150 nm (Perillo i wsp., 2015, 2016).

W pierwszym etapie badań w niniejszej pracy oceniano cytotoksyczne działanie związków na komórki linii HMEC-1. Oznaczono stężenie IC_{50} leków, które redukuje o połowę odsetek żywych komórek w porównaniu z komórkami kontrolnymi (100%), co stanowi punkt wyjścia dla określenia biologicznych właściwości związku cytostatycznego (He i wsp., 2016). Cytotoksyczność wolnych leków oraz ich form liposomalnych oceniano na podstawie średnich wyników otrzymanych po wykonaniu trzech mikropłytkowych testów cytotoksyczności opartych na różnych mechanizmach działania: test z XTT, test z sulforodaminą (SRB) oraz test z resazuryną (REMA). Komórki linii HMEC-1 inkubowano ze związkami przez 24 godziny. Testy cytotoksyczności wykonano po 48-godzinnej hodowli poinkubacyjnej w medium niezawierającym leków. Za pomocą programu GraphPad Prism, wykorzystując analizę regresji nieliniowej, wyznaczono wartości stężeń IC_{10} , IC_{50} oraz IC_{90} , a następnie obliczono stężenia $0,5 IC_{50}$ i IC_{50} leków. Stężenia te stosowano we wszystkich wykonanych analizach.

Zarówno paklitaksel jak i docetaksel hamowały wzrost komórek linii HMEC-1 w stężeniach nanomolowych. Wartości stężenia IC_{50} leków były różne dla każdej z metod i znajdowały się w przedziałach 11,92 -25,93 nmol/l (PTX) oraz 7,68-14,15 nmol/l (DTX). W każdym ze stosowanych testów cytotoksyczności otrzymano niższe wartości stężenia IC_{50} dla DTX, co jest zgodne z wynikami innych autorów i potwierdza jego większy efekt cytotoksyczny w porównaniu z paklitaksellem (Watanabe i wsp., 2017).

Enkapsulacja taksanów w liposomach znacznie obniżała toksyczność leków wobec komórek linii HMEC-1, a spadek przeżywalności komórek nie przekraczał 30%. Jedynie najwyższe stężenie liposomalnego paklitakselu z peptydem gH625 powodował spadek przeżywalności komórek o 50% w teście z XTT. W każdym z przeprowadzonych testów puste nanonośniki liposomalne w zakresie stężeń 0-10 000 nmol/l oraz wolny peptyd gH625 w zakresie stężeń 0-350 nmol/l nie wykazały cytotoksycznego efektu wobec komórek

HMEC-1. Zespół prof. Stefania Galdiero w badaniach *in vitro* również wykazał niską toksyczność peptydu gH625 w stężeniu do 400 $\mu\text{mol/l}$ (Falanga i wsp., 2012; Galdiero i wsp., 2015). Wartości stężeń IC_{50} leków oznaczone na podstawie krzywych przeżywalności komórek oraz analizy regresji nieliniowej w przypadku testów SRB i REMA charakteryzowały się szerokimi przedziałami ufności. W związku z tym, w dalszych eksperymentach stosowano stężenia leków wyliczonych na podstawie wyników uzyskanych w teście XTT, gdzie wartość stężenia IC_{50} dla PTX wynosiła 11,92 nmol/l a dla DTX 7,58 nmol/l . Pasquier i wsp. (2004) testem cytotoxyczności MTT określili wartość stężenia IC_{50} paklitakselu w komórkach linii HMEC-1 na 5 nmol/l po znacznie dłuższej inkubacji komórek z lekiem (72-godziny), a Galaup i wsp. (2003) stosując test MTT i 96-godziną inkubację z lekiem określili wartość stężenia IC_{50} docetakselu dla komórek tej samej linii komórkowej na 4,95 nmol/l . Pomimo różnych metod oceny cytotoxyczności i czasu inkubacji z lekami wyniki otrzymane przez różnych autorów wskazują na znaczną toksyczność taksanów wobec linii komórkowej HMEC-1. Wykazano, że komórki śródbłonna ze względu na ich działanie antyangiogenne są dużo bardziej wrażliwe na działanie taksanów niż komórki nowotworowe (Sweeney i wsp., 2001; Grant i wsp., 2003; Wang i wsp., 2003; Bocci i wsp., 2013). Różnice w wartościach stężeń IC_{50} taksanów otrzymanych różnymi metodami wynikają z właściwości poszczególnych testów cytotoxyczności, które analizują różne parametry komórki. Testy XTT i REMA oparte są na oznaczeniach aktywności enzymów komórkowych związanych z metabolizmem komórki, natomiast test SRB określa całkowitą zawartość białka komórkowego (van Tonder i wsp., 2015).

Główny mechanizm aktywności przeciwnowotworowej taksanów związany jest z ich oddziaływaniem na białka budujące mikrotubule cytoszkieletu komórkowego. Taksany, łącząc się z β -tubuliną, hamują proces depolimeryzacji i stabilizują mikrotubule. Zaburzenie równowagi pomiędzy procesem polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul prowadzi do zatrzymania proliferacji komórek na skutek zahamowania ich cyklu komórkowego i skierowania komórek na drogę apoptozy. Taksany należą do leków fazowo-specyficznych (G2/M), a ich działanie antymitotyczne polegające na zablokowaniu depolimeryzacji mikrotubul, uniemożliwia prawidłowe rozdzielenie chromatyd siostrzanych i prawidłowy podział chromosomów między komórki potomne podczas mitozy (Parker i wsp., 2014; Salas-Martínez i wsp., 2018; Eskra i wsp., 2019). Liczne badania prowadzone na liniach

komórek nowotworowych wskazują, że enkapsulacja taksanów w nanonośniku liposomalnym zwiększa ich efekty chemioterapeutyczne (Heney i wsp., 2010; Ruttala i Ko, 2015; Chowdhury i wsp., 2017).

W kolejnym etapie badań oceniano antyproliferacyjny efekt liposomalnych taksanów na podstawie ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego. Bezpośrednio po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji z taksanami obserwowano zatrzymanie komórek w punkcie kontrolnym G2/M przez PTX w stężeniach powyżej IC_{50} . DTX powodował blok cyklu w punkcie kontrolnym G2/M przy znacznie niższym stężeniu (0,5 IC_{50}). Taki sam zakres stężeń leków w formie liposomalnej nie powodował istotnych zmian w przebiegu cyklu komórkowego.

Po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek traktowanych wolnymi taksanami odnotowano również wzrost frakcji sub-G1 komórek apoptotycznych. Liczność frakcji komórek apoptotycznych wzrastała wraz z czasem hodowli poinkubacyjnej oraz stężeniem taksanów. Wyniki te wskazują, że komórki HMEC-1 traktowane taksanami nie są zdolne do podziału mitotycznego i ulegają apoptozie. Uzyskane wyniki są zgodne z mechanizmem działania PTX i DTX. Taksany zaburzają prawidłową dynamikę podziału komórki oraz poszczególne fazy cyklu komórkowego. Zmiany te powodują zablokowanie komórek w późnej fazie G2 cyklu komórkowego, co uniemożliwia im przejście przez mitozę i ostatecznie doprowadzają do śmierci reprodukcyjnej komórki (Fisi i wsp., 2016; Ren i wsp., 2018). Dane literaturowe (Giannakakou i wsp., 2001; Narayanan i wsp., 2015; Ma i wsp., 2019) wskazują, że niskie stężenia paklitakselu (6 nM) powodują przejściowe zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, aczkolwiek w obecnej pracy nie udało się potwierdzić tego efektu. W próbach z liposomalnymi taksanami nie zaobserwowano istotnego wzrostu frakcji komórek apoptotycznych. Sam liposom oraz peptyd gH625 również nie wpływały istotnie na cykl komórkowy linii HMEC-1. Wyniki te są zgodne z wynikami otrzymanymi w testach cytotoxycności i potwierdzają niski efekt cytotoxyczny liposomalnych form taksanów wobec komórek śródbłonna mikrowaskularnego.

Enkapsulacja taksanów w niezmodyfikowanym oraz funkcjonalizowanym nanonośniku liposomalnym również chroniło komórki HMEC-1 przed genotoksycznym działaniem leków. W komórkach inkubowanych z liposomalnymi taksanami uszkodzenia

DNA obserwowano znacznie później (po 72 godzinach hodowli poinkubacyjnej) niż w komórkach inkubowanych z wolnymi lekami (po 24 godzinach hodowli poinkubacyjnej) z najwyższymi stężeniami taksanów (2 IC₅₀ oraz IC₉₀), podczas gdy wolne leki wykazywały silne działanie genotoksyczne i uszkodzenia DNA obserwowano już po 24 godzinach hodowli poinkubacyjnej. W tym czasie obserwowano uszkodzenia DNA komórek endotelialnych inkubowanych z wolnym paklitakselem w stężeniach powyżej 2 IC₅₀ i wolnym docetakselem w stężeniach powyżej IC₅₀. Uszkodzenia DNA komórek inkubowanych z liposomalnymi taksanami obserwowano po 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej. W przypadku liposomalnego paklitakselu uszkodzenia DNA obserwowano tylko w komórkach traktowanych najwyższym stężeniem tego leku. Podobne rezultaty uzyskano dla liposomalnego docetakselu. Natomiast liposomalny docetaksel z peptydem gH625 również wykazywał właściwości genotoksyczne w najwyższym stężeniu (IC₉₀). Późniejsze występowanie uszkodzeń DNA po inkubacji komórek z liposomalnymi formami taksanów mogą wynikać z dłuższego czasu uwalniania leku z nanoprznośnika i opóźnionego osiągnięcia odpowiedniego genotoksycznego stężenia. Badania zespołu prof. Stefanii Galdiero wskazują na wysoką stabilność preparatów liposomalnych z przyłączonym peptydem gH625, np. w przypadku liposomalnej doksorubicyny ilość uwolnionego leku po 72 godzinach wynosiła średnio ok. 30% (Perillo i wsp., 2016).

Jednym z najwcześniejszych efektów działania taksanów na komórki jest generowanie reaktywnych form tlenu. RFT powstające w odpowiedzi na leczenie taksanami, zlokalizowane są głównie w błonie mitochondrialnej, co prowadzić może do obniżenia jej potencjału (McCormick i wsp., 2016; Kosaka i wsp., 2017; Mikuła-Pietrasik i wsp., 2019). Taksany powodują fosforylację i zahamowanie aktywności antyapoptotycznego białka Bcl-2, prowadząc w ten sposób do podwyższenia wewnątrzkomórkowego stężenia Bax, białka promującego otwarcie porów w błonie mitochondrium i uwolnienie cytochromu c. Otwarcie porów przejściowej przepuszczalności (*permeability transition pore complex – PTP*) wewnętrznej błony mitochondrialnej powoduje wyrównanie stężenia jonów w macierzy mitochondrialnej i cytoplazmie. Dalszą konsekwencją otwarcia PTP jest obrzęk macierzy, który prowadzi do rozerwania mitochondrialnej błony zewnętrznej, uwolnienia do cytozolu cytochromu c oraz innych

białek aktywujących kaspazy, co ostatecznie przyczynia się do indukcji apoptozy (Varbiro i wsp., 2001; Ren i wsp., 2018; Wang i wsp., 2018).

W celu oceny zmian w polaryzacji błony mitochondrialnej i jej potencjału przezbłonowego zastosowano sondę JC-1. Sonda specyficznie gromadzi się w mitochondriach, tworząc agregaty emitujące czerwoną fluorescencję. Monomery JC-1, które występują w cytoplazmie emitują zieloną fluorescencję. Podczas depolaryzacji błony mitochondrialnej następuje wyciek JC-1 z mitochondriów do cytoplazmy, a tym samym wzrost zielonej fluorescencji, co wskazuje na zmiany mitochondrialnego potencjału błonowego (Mo i wsp., 2013; Hou i wsp., 2015).

Zarówno paklitaksel, jak i docetaksel powodowały spadek przezbłonowego potencjału mitochondrialnego komórek linii HMEC-1. Największe zmiany obserwowano w komórkach traktowanych wolnym paklitakselem, w których potencjał mitochondrialny nie odzyskiwał swojej wartości wyjściowej i osiągał najniższą wartość już po upływie jednej godziny – 45-55% spadek dla zakresu stężeń PTX IC₅₀ – IC₉₀. Wynik ten potwierdza doniesienia innych autorów, którzy wykazali, że paklitaksel zaburza prawidłowe funkcje mitochondriów i poprzez szlak mitochondrialny może prowadzić do apoptozy (Griffiths i Flatters, 2015; Galley i wsp., 2017; Dai i wsp., 2019).

Preinkubacja komórek z N-acetylocysteiną chroniła je przed działaniem paklitakselu. Zmiany te nie były tak liczne, a po upływie jednej godziny poziom ulegał regeneracji do wartości $\Delta\Psi_m$ w komórkach kontrolnych.

W komórkach potraktowanych docetakselem spadek $\Delta\Psi_m$ obserwowano jedynie w pierwszych 30 min od zakończenia inkubacji komórek ze stężeniami 0,5 IC₅₀ i IC₅₀ leku (ok. 47% i 36%). Po tym czasie następowała repolaryzacja błony mitochondrialnej i powrót $\Delta\Psi_m$ do stanu wyjściowego. Stwierdzono, że docetaksel powoduje również znaczne zmiany w potencjale mitochondrialnym komórek śródbłonna linii HUVEC, ale przeprowadzony eksperyment nie potwierdza tej hipotezy (Hung i wsp., 2015).

W komórkach traktowanych liposomalnym paklitakselem zaobserwowano odwrotny efekt niż w przypadku wolnego leku – hiperpolaryzację błony i wzrost $\Delta\Psi_m$. Liposomalne formy paklitakselu (bez dołączonego peptydu gH625 oraz ze skoniugowanym peptydem gH625) powodowały hiperpolaryzację błony mitochondrialnej i wzrost $\Delta\Psi_m$. Po

upływie jednej godziny $\Delta\Psi_m$ ulegał zmniejszeniu do poziomu w komórkach kontrolnych. Wykazano, że taki efekt może być spowodowany m.in. wzrostem ilości reaktywnych form tlenu (Houston i wsp., 2011; Zorova i wsp., 2018).

W komórkach potraktowanych liposomalnym docetaksem bez peptydu gH625 hiperpolaryzację odnotowano jedynie bezpośrednio po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji komórek z lekiem (wzrost $\Delta\Psi_m$ o ok. 38% dla stężeń IC_{50} i $2 IC_{50}$ leku). Zmiany te były przejściowe, gdyż potencjał szybko ulegał regeneracji do poziomu w komórkach kontrolnych i nie zmieniał się do końca trwania analizy. Jedynie w komórkach traktowanych stężeniem IC_{50} LipoDTX odnotowano depolaryzację błony mitochondrialnej i istotny spadek potencjału po 30 i 60 min od rozpoczęcia analizy. Skoniugowanie liposomalnego nośnika docetakselu z peptydem gH625 nie powodowało istotnych zmian potencjału mitochondrialnego komórek linii HMEC-1 w porównaniu z DTX enkapsulowanym w niezmodyfikowanym liposomie.

Choć badania innych autorów wskazują, że liposomalny paklitaksel powoduje spadek mitochondrialnego potencjału komórek śródbłonna (Sun i wsp., 2017) w niniejszej pracy nie stwierdzono takich zmian. Efekt ten jest prawdopodobnie spowodowany prawidłowym przebiegiem cyklu komórkowego w komórkach traktowanych liposomalnymi formami taksanów. Fabbri i wsp. (2006) wykazali, że depolaryzacja błony mitochondrialnej jest efektem zatrzymania komórek w fazie G2/M.

Stres oksydacyjny powoduje duże uszkodzenia różnych struktur biologicznych, w tym błon komórkowych, lipidów, białek i kwasów nukleinowych co m.in. może prowadzić do rozwoju nowotworów. Zredukowany glutation (GSH) uważany jest za jeden z najważniejszych zmiataczy reaktywnych form tlenu (Zitka i wsp., 2012), a jego stężenie wewnątrzkomórkowe i wyczerpanie stanowi czuły wskaźnik stanu fizjologicznego komórki i stresu oksydacyjnego. Spadek stężenia GSH w komórce można wykorzystać również jako marker wczesnej toksyczności (Machado i Soares, 2012).

W pracy do oznaczenia stężenia zredukowanego glutationu jako wskaźnik stresu oksydacyjnego wykorzystano specyficzne właściwości niefluorescencyjnej sondy, monochlorobimanu (MCB). W wyniku reakcji z GSH powstaje wysoce fluorescencyjny koniugat GS-MCB. Wykazano, że zarówno wolny paklitaksel jak i jego formy liposomalne

powodują istotny spadek stężenia zredukowanego glutationu w komórkach endotelialnych HMEC-1. Największy spadek stężenia GSH w komórkach inkubowanych z wolnym paklitakselem następował bezpośrednio po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji z lekiem, podczas gdy podobny efekt jego form liposomalnych obserwowano znacznie później – po 24 godzinach hodowli poinkubacyjnej komórek.

Docetaksel i jego formy liposomalne również istotnie wpływały na pulę komórkowego GSH, powodując jej stopniowe wyczerpanie wraz ze wzrostem stężenia leku. Enkapsulacja DTX w nanonośniku liposomalnym redukowała jego efekt prooksydacyjny, gdyż w komórkach traktowanych liposomalnym DTX obserwowano mniejszy spadek stężenia GSH w porównaniu z komórkami inkubowanymi z takim samym stężeniem wolnego leku. Uzyskane wyniki wskazują, że enkapsulacja taksanów w liposomie opóźnia i redukuje ich prooksydacyjne i toksyczne działanie na komórki endotelialne linii HMEC-1.

Paklitaksel i docetaksel, jak większość leków przeciwnowotworowych, indukują proces autofagii w komórkach (Cristofani i wsp., 2018; Zou i wsp., 2018). Dokładna rola autofagii w rozwoju nowotworów i chemioterapii jest nadal niejasna. Niektóre badania wskazują, że autofagia może służyć jako mechanizm ochronny przed śmiercią komórek indukowanych lekami przeciwnowotworowymi. Z drugiej strony autofagia może być formą śmierci komórki, indukowaną aktywnością leków stosowanych w terapii (Liu i wsp., 2017; Walker i wsp., 2018). Chociaż autofagia nasila się w sytuacjach, w których komórka jest narażona na stres oksydacyjny lub toksyczny, działa również w normalnych warunkach na stabilnym niskim poziomie. W przypadku komórek prawidłowych autofagia jest najczęściej mechanizmem obronnym komórki, ale jest również wskaźnikiem stresu i jej uszkodzenia (Ryter i Choi, 2013).

Do oceny indukcji autofagii w komórkach linii HMEC-1 wykorzystano fluorescencyjną sondę monodansylokadawerynę (MDC), która gromadzi się w autofagolizosomach. Komórki inkubowano ze związkami przez 24 godziny, a istotny wzrost fluorescencji MDC obserwowano po 24 i 48 godzinach hodowli poinkubacyjnej. Jedynie najwyższe zastosowane stężenie PTX ($2 IC_{50}$) powodowało istotny wzrost fluorescencji MDC bezpośrednio po zakończeniu inkubacji. Wzrost fluorescencji MDC obserwowano wraz z wzrostem czasu hodowli poinkubacyjnej i zastosowanym stężeniem

leków. W komórkach inkubowanych z liposomalnymi formami taksanów obserwowano mniejszy wzrost fluorescencji MDC, w porównaniu z wolnymi taksanami. Dołączenie peptydu gH626 powodowało zmniejszenie średnich wartości fluorescencji MDC w porównaniu do liposomalnych taksanów bez dołączonego peptydu. Wyniki te świadczą o tym, że enkapsulacja taksanów hamuje indukcję autofagii w komórkach linii HMEC-1, a skoniugowanie liposomu z peptydem gH625 potęguje ten efekt. Badania prowadzone na prawidłowych komórkach przez innych autorów wskazują, że taksany mogą różnie wpływać na proces autofagii, w zależności od linii komórkowej. Eksperymenty przeprowadzone na ludzkich komórkach śródbłonna aorty (HAECs) wykazały, że paklitaksel upośledza proliferację komórek śródbłonna za pomocą mechanizmu zależnego od p21 i opóźnia odpowiedź tkankową na odrost śródbłonna. Efekty te były związane ze zwiększoną częstością autofagii, o czym świadczyła obecność autofagosomów obserwowanych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej i zwiększonej ekspresji LC3B. Jednoczesne hamowanie autofagii za pomocą inhibitorów nie poprawiło proliferacji i ponownego rozwoju śródbłonna. Wyniki te wskazują, że toksyczne właściwości paklitakselu nie są związane ze wzrostem intensywności procesu autofagii (Hayashi i wsp., 2009). Docetaksel natomiast, hamował proces autofagii w miocytach mięśni gładkich tętnicy płucnej (PASMCs). Wykazano również zdolność docetakselu do tłumienia autofagii w sposób zależny od proteasomu oraz korzystne działanie leku w regeneracji mięśnia sercowego u szczurów z tętniczym nadciśnieniem płucnym (Ibrahim i wsp., 2017).

Antyoksydanty NAC, Troloks i Tiron hamowały proces autofagii aczkolwiek w różnym stopniu. Największe efekty odnotowano w komórkach traktowanych wolnymi taksanami po preinkubacji z Tironem. Wyniki te sugerują udział stresu oksydacyjnego w indukcji autofagii przez taksany.

Posumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że stosowane klinicznie taksany paklitaksel i docetaksel są wysoce toksyczne dla komórek linii HMEC-1 śródbłonna mikrowaskularnego. Redukują one żywotność i przeżywalność komórek oraz hamują ich proliferację oddziałując niekorzystnie na cykl podziałowy i mitozę poprzez zablokowanie komórek w punkcie kontrolnym G2/M. Leki generują stres oksydacyjny, który prowadzi do wyczerpania puli

wewnątrzkomórkowego GSH oraz jak wykazały eksperymenty, w których zastosowano preinkubację komórek z antyoksydantami NAC, Troloks i Tiron, ma również udział w genotoksycznym i proapoptycznym działaniu leków oraz w indukowanych przez nie autofagii i zaburzeniach błony mitochondrialnej, powodujących jej depolaryzację i hiperpolaryzację. Występowanie i nasilenie ww. efektów były zależne zarówno od stężenia leków jak i od czasu upływającego od zakończenia inkubacji komórek z lekiem.

Enkapsulacja taksanów w pegylowanym nanonośniku lizosomalnym miała korzystny wpływ i znacząco obniżała toksyczność leków wobec komórek śródbłonka mikrowaskularnego poprzez znaczną redukcję lub opóźnienie ich cytotoksycznych efektów. Funkcjonalizacja nanośnika liposomalnego peptydem gH625, penetrującym błony komórkowe, potęgowała korzystne właściwości leków liposomalnych.

7. WNIOSKI

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki wykazały, że:

- ➔ Taksany paklitaksel i docetaksel są wysoce toksyczne dla ludzkich komórek HMEC-1 śródbłonna mikrowaskularnego.
- ➔ Enkapsulacja leków w nanonośniku liposomalnym skoniugowanym z penetrującym błonę peptydem gH625:
 - znacznie obniża toksyczność leków wobec komórek linii HMEC-1 śródbłonna mikrowaskularnego
 - opóźnia występowanie efektów toksycznych i zmniejsza ich natężenie
- ➔ Nanonośniki (pegylowany liposom oraz pegylowany liposom skoniugowany z penetrującym błony komórkowe peptydem gH625) jak również sam peptyd gH625 nie wykazują właściwości cytotoksycznych
- ➔ Przyłączenie peptydu do nanonośnika liposomalnego:
 - nie wpływa na cytotoksyczność liposomalnego paklitakselu i liposomalnego docetakselu
 - potęguje ich korzystne właściwości

8. STRESZCZENIE

Paklitaksel i docetaksel, leki z grupy taksanów, uznawane są za jedne z najbardziej cytotoksycznych leków przeciwnowotworowych stosowanych w leczeniu pacjentów z przerzutowym rakiem piersi oraz nowotworów głowy i szyi. Zastosowanie taksanów w praktyce klinicznej, pomimo ich wysokiego potencjału terapeutycznego, jest często ograniczone ze względu na znaczną toksyczność ogólnoustrojową i występowanie lekooporności. Pomimo znacznych postępów w dziedzinie chemioterapii, nadal często występują liczne działania niepożądane wobec prawidłowych tkanek, które związane są głównie z niską selektywnością chemioterapeutyków. W związku z tym, opracowanie nowych cytostatyków lub nośników transportujące celowo te leki do komórek nowotworowych jest bardzo pożądane. W ostatnich latach wykorzystanie osiągnięć nanotechnologii cieszy się dużym zainteresowaniem w badaniach nad leczeniem chorób nowotworowych. Wykorzystanie nanomateriałów może zwiększyć selektywność leków przy jednoczesnej ochronie komórek prawidłowych. Dodatkowo dołączenie do powierzchni nanonosnika różnego rodzaju grup funkcyjnych może zwiększyć ich biokompatybilność i ułatwić transport do wnętrza komórki.

W pracy dokonano analizy właściwości cytotoksycznych liposomalnych taksanów (paklitakselu i docetakselu), funkcjonalizowanych penetrującym błony komórkowe peptydem gH625, wobec komórek ludzkich śródbłona mikrowaskularnego HMEC-1. Głównym celem badań było porównanie wpływu wolnego paklitakselu i docetakselu oraz ich form liposomalnych na proliferację i przeżywalność komórek śródbłona. Oceniono główne molekularne mechanizmy działania taksanów, takie jak: uszkodzenia DNA, rozkład cyklu komórkowego, zmiany potencjału mitochondrialnego, generowanie stresu oksydacyjnego (stężenie GSH) oraz indukcja apoptozy i autofagii. Dodatkowo określono rolę nanonosnika liposomalnego i peptydu gH625 w toksyczności liposomalnych form taksanów.

Wykazano, że enkapsulacja paklitakselu i docetakselu w pegylowanym liposomie skoniugowanym z peptydem gH625 znacznie obniża toksyczność taksanów wobec mikrowaskularnych komórek linii HMEC-1 oraz opóźnia występowanie efektów toksycznych i zmniejsza ich natężenie. Nanonosnik liposomalny nie wykazywał właściwości cytotoksycznych, a jego funkcjonalizacja peptydem gH625 nie zwiększała cytotoksyczności nanonosnika liposomalnego oraz liposomalnych taksanów.

9. SUMMARY

Taxanes paclitaxel and docetaxel are recognized as one of the most cytotoxic anti-cancer drugs used to treat patients with metastatic breast cancer and head and neck cancers. The use of taxanes in clinical practice, despite their high therapeutic potential, is often limited due to the significant systemic toxicity and the occurrence of drug resistance. Despite significant advances in the field of chemotherapy, there are still many side effects to normal tissues that are mainly associated with low selectivity of chemotherapeutic agents. Therefore, the development of new cytostatics or drug carriers is highly desirable. In recent years, the use of the achievements of nanotechnology has raised great interest in research in the field of anticancer therapy cancer. The use of nanomaterials can increase the effectiveness of drug delivery to the tumor while protecting normal cells. Additionally, decoration of nanoparticle surface with various types of functional groups can increase their biocompatibility and facilitate drug transport inside the cell.

The study analyzes the cytotoxic properties of liposomal taxanes (paclitaxel and docetaxel) functionalized with penetrating peptide gH625 against human microvascular HMEC-1 endothelial cells. The main purpose of the study was to compare the effects of free paclitaxel and docetaxel and their liposomal forms on proliferation and survival of endothelial cells. The main molecular mechanisms of taxane activity were assessed, such as DNA damage, cell cycle distribution, changes in mitochondrial potential, generation of oxidative stress (GSH concentration) and induction of apoptosis and autophagy. In addition, the role of liposomal nanocarrier and gH625 peptide in the toxicity of liposomal taxane forms was determined.

Encapsulation of paclitaxel and docetaxel in a pegylated liposome conjugated to the gH625 peptide has been shown to significantly reduce taxane toxicity to HMEC-1 microscopic cells and delay the occurrence of toxic effects and reduce their severity. The liposomal nanocarrier did not exhibit cytotoxic properties, and its functionalization with the gH625 peptide did not increase the cytotoxicity of the liposomal nanocarrier and liposomal taxanes.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Adachi Y., Sakamoto K., Umemoto T., Fukuda Y., Tani A., Asami T. (2017) Investigation on Cellular Uptake and Pharmacodynamics of DOCK2-Inhibitory Peptides Conjugated with Cell-Penetrating Peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25: 2148–2155.
2. Ades E. W., Candal F. J., Swerlick R.A., George V. G., Summers S., Bosse D. C., Lawley T J. (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99: 683-690.
3. Agrawal P., Bhalla S., Usmani S. S., Singh S., Chaudhary K., Raghava G. P. S., Gautam A. (2016) CPPsite 2.0: A Repository of Experimentally Validated Cell-Penetrating Peptides. *Nucleic Acids Research* 44: D1098–1103.
4. Alberts B. (2007) *Podstawy biologii komórki cz. 2*, Wydawnictwo PWN, Warszawa, ss. 579-591, 648-650.
5. Andersen A., Warren D., Brunsvig P., Aamdal S., Kristensen G., Olsen H. (2006) High Sensitivity Assays for Docetaxel and Paclitaxel in Plasma Using Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection. *BMC Clinical Pharmacology* 6:2.
6. Aykul S., Martinez-Hackert E. (2016) Determination of Half-Maximal Inhibitory Concentration Using Biosensor-Based Protein Interaction Analysis. *Analytical Biochemistry* 508: 97–103.
7. Baker J., Ajani J., Scotté F., Winther D., Martin M., Aapro M. S., von Minckwitz G. (2009) Docetaxel-Related Side Effects and Their Management. *European Journal of Oncology Nursing* 13: 49–59.
8. Ballarin B., Tymianski M. (2018) Discovery and Development of NA-1 for the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Acta Pharmacologica Sinica* 39: 661–668.
9. Bechara C., Sagan S. (2013) „Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand?” *FEBS Letters* 587: 1693–1702.
10. Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 11: 127–152.
11. Bhol C.S., Panigrahi D.P., Praharaj P.P., Mahapatra K.K., Patra S., Mishra S.R., Behera B.P., Bhutia S.K. (2019) Epigenetic modifications of autophagy in cancer and cancer therapeutics. *Semin Cancer Biol* May 31.
12. Biederbick A., Kern H. F., Elsässer H. P. (1995) Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 66: 3-14.
13. Bocci G., Di Paolo A., Danesi R. (2013) The Pharmacological Bases of the Antiangiogenic Activity of Paclitaxel. *Angiogenesis* 16: 481–492.
14. Borrelli A., Tornesello A., Tornesello M., Buonaguro F. (2018) Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Molecules* 23: 295.

15. Brown I, Sangrithi-Wallace J. N., Schofield A. C. (2008) Antimicrotubule Agents [w:] Anticancer Therapeutics, Missailidis S. (red.). John Wiley & Sons, Chichester, Wielka Brytania, ss. 79–89.
16. Buttke T. M., McCubrey J. A., Owen T. C. (1993) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Methods* 4 :233-240.
17. Chen F., Ehlerding E., Cai W. (2014) Theranostic Nanoparticles. *Journal of Nuclear Medicine* 55: 1919–1922.
18. Chen Y., Brennan-Minnella A. M., Sheth S., El-Benna J., Swanson R. A. (2015) Tat-NR2B9c Prevents Excitotoxic Neuronal Superoxide Production. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 35: 739–742.
19. Chowdhury N., Vhora I., Patel K., Doddapaneni R., Mondal A., Singh M. (2017) Liposomes Co-Loaded with 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2, 6-Biphosphatase 3 (PFKFB3) ShRNA Plasmid and Docetaxel for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharm Res* 34: 2371-2384.
20. Ciobanasu C., Siebrasse J. P., Kubitscheck U. (2010) Cell-Penetrating HIV1 TAT Peptides Can Generate Pores in Model Membranes. *Biophysical Journal* 99: 153–162.
21. Clarke S. J., Rivory L. P. (1999) Clinical Pharmacokinetics of Docetaxel. *Clinical Pharmacokinetics* 36: 99–114.
22. Collins A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261.
23. Contento A. L., Xiong Y., Bassham D. C. (2005) Visualization of autophagy in Arabidopsis using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J* 42: 598-608.
24. Cooper R. S., Heldwein E. E. (2015) Herpesvirus gB: A Finely Tuned Fusion Machine". *Viruses* 7: 6552–6569.
25. Copolovici D. M., Langel K., Eriste E., Langel Ü. (2014) Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications. *ACS Nano* 8: 1972–1994.
26. Cousins M. J., Pickthorn K., Huang S., Critchley L., Bell G. (2013) The Safety and Efficacy of KAI-1678— An Inhibitor of Epsilon Protein Kinase C (EPKC)—Versus Lidocaine and Placebo for the Treatment of Postherpetic Neuralgia: A Crossover Study Design. *Pain Medicine* 14: 533–540.
27. Cristofani R., Montagnani Marelli M., Cicardi M. E., Fontana F., Marzagalli M., Limonta P., Poletti A., Moretti R.M. (2018) Dual Role of Autophagy on Docetaxel-Sensitivity in Prostate Cancer Cells. *Cell Death Dis* 9: 889.
28. Cusido R. M., Onrubia N., Sabater-Jara A. B, Moyano E., Bonfill M., Goossens A., Pedreño A. M., Palazon J. (2014) A Rational Approach to Improving the

- Biotechnological Production of Taxanes in Plant Cell Cultures of *Taxus* Spp. *Biotechnology Advances* 32: 1157–1167.
29. Czekanska E. M. (2011) Assessment of Cell Proliferation with Resazurin-Based Fluorescent Dye. *Methods in Molecular Biology* 740: 27–32.
 30. Dagher R., Johnson J., Williams G., Keegan P., Pazdur R. (2004) Accelerated Approval of Oncology Products: A Decade of Experience. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 96: 1500–1509.
 31. Dai Y., Cai X., Bi X., Liu C., Yue N., Zhu Y., Zhou J., Fu M., Huang W., Qian H. (2019) Synthesis and Anti-Cancer Evaluation of Folic Acid-Peptide- Paclitaxel Conjugates for Addressing Drug Resistance. *Eur J Med Chem* 171: 104-115.
 32. Darshann M. S., Loftus M. S., Thadani-Mulero M., Levy B. P., Escuin D., Zhou X. K, Gjyzezi A. (2011) Taxane-Induced Blockade to Nuclear Accumulation of the Androgen Receptor Predicts Clinical Responses in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Research* 71: 6019–6029.
 33. Darzynkiewicz Z., Juan G. (2001) Analysis of DNA content and BrdU incorporation. *Curr Protoc Cytom* 7.7.1-7.7.9.
 34. Davis T. H. (2006) Profile of Susan Band Horwitz. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10163–10165.
 35. De Logu A., Uda P., Pellerano M. L., Pusceddu M. C., Saddi B., Schivo M. L. (2001) Comparison of two rapid colorimetric methods for determining resistance of mycobacterium tuberculosis to rifampin, isoniazid, and streptomycin in liquid medium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 33-39.
 36. Derossi D. A. H. J., Chassaing G., Prochiantz A. (1994) The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 10444–10450.
 37. DeVita V. T., Lawrence T. S., Rosenberg S. A. (2015) DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology: Tenth Edition, Wolters Kluwer Health, ss. 228-232.
 38. Dhanasekaran S., Chopra S. (2016). Getting a Handle on Smart Drug Delivery Systems – A Comprehensive View of Therapeutic Targeting Strategies, Smart Drug Delivery System, Ali Demir Sezer, IntechOpen.
 39. Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. (2009) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol* 25: 5-32.
 40. Dinca A., Chien W. M., Chin M. (2016) Intracellular Delivery of Proteins with Cell-Penetrating Peptides for Therapeutic Uses in Human Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 263.
 41. Dubois J. (2006) Recent progress in the development of docetaxel and paclitaxel analogues. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 16: 1481-1496.

42. Elshikh M., Ahmed S., Funston S., Dunlop P., McGaw M., Marchant R., Banat I. M. (2016) Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters* 38: 1015–1019.
43. Eskra J. N., Schlicht M. J., Bosland M. C. (2019) Lack of Combination Effects of Soy Isoflavones and Taxane Chemotherapy of Castration-resistant Prostate Cancer. *Prostate* 79: 223-233.
44. Exposito O. Bonfill M., Moyano E., Onrubia M., Mirjalili M. H., Cusido R. M., Palazon J. (2008) Biotechnological Production of Taxol and Related Taxoids: Current State and Prospects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*.
45. Fabbri F., Carloni S., Briigliadori G., Zoli W., Lapalombella R., Marini M. (2006) Sequential Events of Apoptosis Involving Docetaxel, a Microtubule-Interfering Agent: A Cytometric Study. *BMC Cell Biology* 7: 6.
46. Falanga A., Iachetta G., Lombardi L., Perillo E, Lombardi A, Morelli G., Valiante S, Galdiero S. (2018) Enhanced Uptake of GH625 by Blood Brain Barrier Compared to Liver in Vivo: Characterization of the Mechanism by an in Vitro Model and Implications for Delivery. *Scientific Reports* 8: 13836.
47. Falanga A., Tarallo R., Cantisani M., Della Pepa M. E., Galdiero M., Galdiero S. (2012) A viral peptide for intracellular delivery. *SPIE NanoScience + Engineering* 8460.
48. Farkhani S. M., Valizadeh A., Karami H., Mohammadi S, Sohrabi N., Badrzadeh F. (2014) Cell Penetrating Peptides: Efficient Vectors for Delivery of Nanoparticles, Nanocarriers, Therapeutic and Diagnostic Molecules. *Peptides* 57: 78–94.
49. Fisi V., Káta E., Bogner P., Miseta A., Nagy T. (2016) Timed, Sequential Administration of Paclitaxel Improves Its Cytotoxic Effectiveness in a Cell Culture Model. *Cell Cycle* 15: 1227–1233.
50. Flynn C. R., Cheung-flynn J., Smoke C. C., Lowry D., Roberson R., Sheller M. R., Brophy C. M. (2010) Internalization and Intracellular Trafficking of a PTD-Conjugated Anti-Fibrotic Peptide, AZX100, in Human Dermal Keloid Fibroblasts. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99: 3100–3121.
51. Frankel A. D., Pabo C. O. (1988) Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* 55: 1189–1193.
52. Fu A., Tang R., Hardie J., Farkas M. E., Rotello V. M. (2014) Promises and Pitfalls of Intracellular Delivery of Proteins. *Bioconjugate Chemistry* 25: 1602–1608.
53. Fumoleau P., Seidman A. D., Trudeau M. E., Chevallier B., Ten Bokkel Huinink W. W. (1997) Docetaxel: A New Active Agent in the Therapy of Metastatic Breast Cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 6: 1853–1865.
54. Galaup A., Opolon P., Bouquet C., Li H., Opolon D., Bissery M. C., Tursz T., Perricaudet M., Griscelli F. (2003) Combined Effects of Docetaxel and Angiostatin Gene Therapy in Prostate Tumor Model. *Mol Ther* 7: 731-740.

55. Galdiero S., Falanga A, Vitiello M., Browne H, Pedone C., Galdiero M. (2005) Fusogenic Domains in Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein H. *Journal of Biological Chemistry* 280: 28632–28643.
56. Galdiero S., Falanga A., Morelli G., Galdiero M. (2015) GH625: A Milestone in Understanding the Many Roles of Membranotropic Peptides. *Biochim Biophys Acta* 1848: 16-25.
57. Galdiero S., Falanga A., Vitiello M., Raiola L., Fattorusso R, Browne H., Pedone C., Isernia C., Galdiero M. (2008) Analysis of a Membrane Interacting Region of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein H. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 29993–29999.
58. Galdiero S., Russo L., Falanga A., Cantisani M., Vitiello M., Fattorusso R., Malgieri G., Galdiero M., Isernia C. (2012) Structure and Orientation of the GH625–644 Membrane Interacting Region of Herpes Simplex Virus Type 1 in a Membrane Mimetic System. *Biochemistry* 51: 3121–3118.
59. Galley H. F., McCormick B., Wilson K. L., Lowes D. A., Colvin L., Torsney C. (2017) Melatonin Limits Paclitaxel-Induced Mitochondrial Dysfunction in Vitro and Protects against Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain in the Rat. *J Pineal Res* 63: e12444.
60. Gestin M., Dowaidar M, Langel Ü. (2017) Uptake Mechanism of Cell-Penetrating Peptides [w:] *Peptides and Peptide-Based Biomaterials and Their Biomedical Applications*, Sunna A., Care A., Bergquist P. L. (red.), Springer International Publishing, Cham, Szwajcaria, ss. 255–264.
61. Giannakakou P., Robey R., Fojo T., Blagosklonny M. V. (2001) Low Concentrations of Paclitaxel Induce Cell Type-Dependent P53, P21 and G1/G2 Arrest Instead of Mitotic Arrest: Molecular Determinants of Paclitaxel-Induced Cytotoxicity. *Oncogene* 20: 3806–3813.
62. Gligorov J., Lotz J. P. (2004) Preclinical Pharmacology of the Taxanes: Implications of the Differences. *The Oncologist* 9: 3–8.
63. Glogau R. G., Axibal E. (2017) Topical Botulinum Toxin [w:] *Botulinum Toxins: Cosmetic and Clinical Applications*, Cohen J. L., Ozog D. M. (red.). John Wiley & Sons, Ltd, ss. 317-328.
64. Gond S. K., Kharwar R. N., White J. F. (2014) Will fungi be the new source of the blockbuster drug taxol? *Fungal Biology Reviews* 28: 77–84.
65. Goodman, J., Walsh V. (2001) *The Story of Taxol: Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-cancer Drug*, Cambridge University Press, Nowy Jork, USA.
66. Gornstein E., Schwarz T. L. (2014) The Paradox of Paclitaxel Neurotoxicity: Mechanisms and Unanswered Questions. *Neuropharmacology* 76: 175–183.

67. Grant D. S., Williams T. L., Zahaczewsky M., Dicker A. P. (2003) Comparison of Antiangiogenic Activities Using Paclitaxel (Taxol) and Docetaxel (Taxotere). *Int J Cancer* 104: 121-129.
68. Green, M., Loewenstein P. M. (1988) Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein. *Cell* 55: 1179–1188.
69. Griffiths L. A., Flatters S. J. (2015) Pharmacological Modulation of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Paclitaxel-Induced Painful Peripheral Neuropathy. *J Pain* 16: 981-994.
70. Guidotti G., Brambilla L., Rossi D. (2017) Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends in Pharmacological Sciences* 38: 406–424.
71. Guo Z., Peng H., Kang J., Sun D. (2016) Cell-Penetrating Peptides: Possible Transduction Mechanisms and Therapeutic Applications. *Biomedical Reports* 4: 528–534.
72. Habault J., Poyet J. L. (2019) Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies. *Molecules* 24: 927.
73. Hartshorn C. M., Bradbury M. S., Lanza G. M., Nel A. E., Rao J., Wang A. Z., Wiesner U. B., Yang L., Grodzinski P. (2018) Nanotechnology Strategies To Advance Outcomes in Clinical Cancer Care. *ACS Nano* 12: 24–43.
74. Hartzell Jr. H. R. (1995) *Yew and Us: A Brief of the Yew Tree [w:] Taxol: Science and Applications*, Suffness, M. (red.). CRC Press, Boca Raton, USA.
75. Hayashi S., Yamamoto A., You F., Yamashita K., Ikegame Y., Tawada M., Yoshimori T., Shimizu S., Nakashima S. (2009) The stent-eluting drugs sirolimus and paclitaxel suppress healing of the endothelium by induction of autophagy. *Am J Pathol* 175: 2226-2234.
76. He Y., Zhu Q., Chen M., Huang Q., Wang W., Li Q., Huang Y., Di W. (2016) The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Oncotarget* 7: 70803–70821.
77. Heney M., Alipour M., Vergidis D., Omri A., Mugabe C., Th'ng J., Suntres Z. (2010) Effectiveness of Liposomal Paclitaxel against MCF-7 Breast Cancer Cells. *Can J Physiol Pharmacol* 88: 1172-1180.
78. Herbst R. S., Khuri F. R. (2003) Mode of Action of Docetaxel - a Basis for Combination with Novel Anticancer Agents. *Cancer Treatment Reviews* 29: 407–415.
79. Heytler P.G. (1979) Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Methods in Enzymology* 55: 462-472.
80. Holmes F. A., Walters R. S., Theriault R. L., Forman A. D., Newton L. K., Raber M. N., Buzdar A. U., Frye D. K., Hortobagyi G. N. (1991) Phase II Trial of Taxol, an Active Drug

in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 83: 1797–1805.

81. Hou X. F., Xu L. P., Song H. Y., Li S., Wu C., Wang J. F. (2017) ECRG2 enhances the anti-cancer effects of cisplatin in cisplatin-resistant esophageal cancer cells via upregulation of p53 and downregulation of PCNA. *World Journal of Gastroenterology* 23: 1796–1803.
82. Hou Z., Zhang Y., Deng K., Chen Y., Li X., Deng X., Cheng Z., Lian H., Li C., Lin J. (2015) UV-emitting upconversion-based TiO₂ photosensitizing nanoplatform: near-infrared light mediated in vivo photodynamic therapy via mitochondria-involved apoptosis pathway. *ACS Nano* 9: 2584-2599.
83. Houston M. A., Augenlicht L. H., Heerdt B. G. (2011) Stable Differences in Intrinsic Mitochondrial Membrane Potential of Tumor Cell Subpopulations Reflect Phenotypic Heterogeneity. *Int J Cell Biol* 2011: 978583.
84. Huang C. H., Ju D. T., Chang C. F., Reddy P. M., Velmurugan B. K. (2017) A Review on the Effects of Current Chemotherapy Drugs and Natural Agents in Treating Non–Small Cell Lung Cancer. *BioMedicine* 7: 12-23.
85. Hung C. H., Chan S. H., Chu P. M., Tsai K. L. (2015) Docetaxel Facilitates Endothelial Dysfunction through Oxidative Stress via Modulation of Protein Kinase C Beta: The Protective Effects of Sotrastaurin. *Toxicol Sci.* 145: 59-67.
86. Ibrahim Y. F., Shults N. V., Rybka V., Suzuki Y.J. (2017) Docetaxel reverses pulmonary vascular remodeling by decreasing autophagy and resolves right ventricular fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 363: 20-34.
87. Janiec W. (2009) *Farmakodynamika tom 2, Podręcznik dla studentów farmacji*, Wydawnictwo PZWL, Warszawa, ss. 1025-1027.
88. Ji Y., Bi J. N., Yan B., Zhu X. D. (2006) Taxol-producing Fungi: A New Approach to Industrial Production of Taxol. *Chinese Journal of Biotechnology* 22: 1–6.
89. Jobin M. L., Alves I. D. (2014) On the Importance of Electrostatic Interactions between Cell Penetrating Peptides and Membranes: A Pathway toward Tumor Cell Selectivity? *Biochimie* 107: 154–159.
90. Jordan M. A., Wilson L. (2004) Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nature Reviews. Cancer* 4: 253–265.
91. Kalaydina R. V., Bajwa K., Qorri B., Decarlo A., Szewczuk M. R. (2018) Recent Advances in «Smart» Delivery Systems for Extended Drug Release in Cancer Therapy. *Int J Nanomedicine* 13: 4727-4745.
92. Kauffman W. B., Fuselier T., He J., Wimley W. C. (2015) Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends in Biochemical Sciences* 40: 749–764.
93. Kawiak J., Zabel M. (2014) *Seminaria z cytofizjologii dla studentów medycyny, weterynarii i biologii. Wydanie II. Elsevier Urban & Partner, Wrocław.*

94. Kelling J., Sullivan K., Wilson L., Jordan M. A. (2003) Suppression of centromere dynamics by Taxol in living osteosarcoma cells. *Cancer Res* 63: 2794-2801.
95. Kim S. C., Yoon H. J., Lee J. W., Yu J., Park E. S., Chi S. H. (2005) Investigation of the Release Behavior of DEHP from Infusion Sets by Paclitaxel-Loaded Polymeric Micelles. *International Journal of Pharmaceutics* 293: 303–310.
96. Kingston D. G. I. (2007) The Shape of Things to Come: Structural and Synthetic Studies of Taxol and Related Compounds. *Phytochemistry* 68: 1844–1854.
97. Kocaturk N. M., Akkoc Y., Kig C., Bayraktar O., Gozuacik D., Kutlu O. (2019) Autophagy as a molecular target for cancer treatment. *Eur J Pharm Sci* 134: 116-137.
98. Koren E., Torchilin V. P. (2012) Cell-Penetrating Peptides: Breaking through to the Other Side. *Trends in Molecular Medicine* 18: 385–393.
99. Kosaka T., Hongo H., Miyazaki Y., Nishimoto K., Miyajima A., Oya M. (2017) Reactive Oxygen Species Induction by Cabazitaxel through Inhibiting Sestrin-3 in Castration Resistant Prostate Cancer. *Oncotarget* 8: 87675-87683.
100. Krautwald S., Dewitz C., Fändrich F., Kunzendorf U. (2016) Inhibition of Regulated Cell Death by Cell-Penetrating Peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 2269–2284.
101. Kumar V., Agrawal P., Kumar R., Bhalla S., Usmani S. S., Varshney G. C., Raghava G. P. S. (2018) Prediction of Cell-Penetrating Potential of Modified Peptides Containing Natural and Chemically Modified Residues. *Frontiers in Microbiology* 9: 725.
102. Kusari S., Singh S., Jayabaskaran C. (2014) Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends in Biotechnology* 32: 304–311.
103. Layek B., Lipp L., Singh J. (2015) Cell Penetrating Peptide Conjugated Chitosan for Enhanced Delivery of Nucleic Acid. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 28912–28930.
104. Lee W. L., Shiao J. Y., Shyur L. F. (2012) Taxol, Camptothecin and Beyond for Cancer Therapy. *Advances in Botanical Research* 62: 133–178.
105. Lincoff A. M., Roe M., Aylward P., Galla J., Rynkiewicz A., Guetta V., Zelizko M., Kleiman N., White H., McErlean E., Erlinge D., Laine M., Dos Santos Ferreira J. M., Goodman S., Mehta S., Atar D., Suryapranata H., Jensen S. E., Forster T., Fernandez-Ortiz A., Schoors D., Radke P., Belli G., Brennan D., Bell G., Krucoff M. (2014) Inhibition of Delta-Protein Kinase C by Delcasertib as an Adjunct to Primary Percutaneous Coronary Intervention for Acute Anterior ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: Results of the PROTECTION AMI Randomized Controlled Trial. *European Heart Journal* 35: 2516–2523.
106. Liu Z., Shi A., Song D., Han B., Zhang Z., Ma L., Liu D., Fan Z. (2017) Resistin confers resistance to doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells through autophagy induction. *Am J Cancer Res* 7: 574-583.

107. Louis K. S., Siegel A. C. (2011) Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 740: 7-12.
108. Lv H., Zhen C., Liu J., Yang P., Hu L., Shang P. (2019) Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 3150145.
109. Ma Y., Lai W., Zhao M., Yue C., Shi F., Li R., Hu Z. (2019) Plastin 3 Down-Regulation Augments the Sensitivity of MDA-MB-231 Cells to Paclitaxel via the P38 MAPK Signalling Pathway. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 47: 685-695.
110. Machado M. D, Soares E. V. (2012) Assessment of cellular reduced glutathione content in *Pseudokirchneriella subcapitata* using monochlorobimane. *Journal of Applied Phycology* 24: 1509-1516.
111. Maggio E. T. (2017) Reducing or Eliminating Polysorbate Induced Anaphylaxis and Unwanted Immunogenicity in Biotherapeutics. *J Excipients and Food Chem* 8: 52-61.
112. Malik S., Cusidó R. M., Mirjalili M. H., Moyano E., Palazón J., Bonfill M. (2011) Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochemistry* 46: 23-34.
113. Marty C., Meylan C., Schott H., Ballmer-Hofer K., Schwendener R. A. (2004) Enhanced Heparan Sulfate Proteoglycan-Mediated Uptake of Cell-Penetrating Peptide-Modified Liposomes. *Cell Mol Life Sci* 61: 1785-1794.
114. Matesanz R., Rodríguez-Salarichs J., Pera B., Canales Á., Andreu J. M., Jiménez-Barbero J., Bras W., Nogales A., Fang W. S., Díaz J. F. (2011) Modulation of Microtubule Interprotofilament Interactions by Modified Taxanes. *Biophysical Journal* 101: 2970-2980.
115. McAuliffe G., Roberts L., Roberts S. (2002) Paclitaxel Administration and Its Effects on Clinically Relevant Human Cancer and Non Cancer Cell Lines. *Biotechnology Letters* 24: 959-964.
116. McCormick B., Lowes D. A., Colvin L., Torsney C., Galley H. F. (2016) MitoVitE, a Mitochondria-Targeted Antioxidant, Limits Paclitaxel-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Vitro, and Paclitaxel-Induced Mechanical Hypersensitivity in a Rat Pain Model. *Br J Anaesth* 117: 659-666.
117. McGuire W. P., Rowinsky E. K., Rosenshein N. B., Grumbine F. C., Ettinger D. S., Armstrong D. K., Donehower R. C. (1989) Taxol: A Unique Antineoplastic Agent with Significant Activity in Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms. *Annals of Internal Medicine* 111: 273-79.

118. Meng J., Guo F., Xu H., Liang W., Wang C., Yang X. D. (2016) Combination Therapy Using Co-Encapsulated Resveratrol and Paclitaxel in Liposomes for Drug Resistance Reversal in Breast Cancer Cells in Vivo. *Sci Rep* 6:22390.
119. Merchan J. R., Jayaram D. R., Supko J. G., He X., Bubley G. J., Sukhatme V. P. (2005) Increased Endothelial Uptake of Paclitaxel as a Potential Mechanism for Its Antiangiogenic Effects: Potentiation by Cox-2 Inhibition. *International Journal of Cancer* 113: 490–498.
120. Miłucha-Pietrasik J., Witucka A., Pakuła M., Uruski P., Begier-Krasińska B., Niklas A., Tykarski A., Książek K. (2019) Comprehensive Review on How Platinum- and Taxane-Based Chemotherapy of Ovarian Cancer Affects Biology of Normal Cells. *Cell Mol Life Sci* 76: 681-697.
121. Miller M. L., Ojima I. (2001) Chemistry and Chemical Biology of Taxane Anticancer Agents. *Chemical Record* 1: 195–211.
122. Millis K. K., Lesko S. A., Gamcsik M. P. (1997) Formation, Intracellular distribution and efflux of glutathione–bimane conjugates in drug-sensitive and -resistant MCF-7 cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 40: 101–111.
123. Missailidis S. (2008) *Anticancer Therapeutics*. John Wiley & Sons, Chichester, Wielka Brytania.
124. Mistry S. J., Oh W. K. (2013) New Paradigms in Microtubule-Mediated Endocrine Signaling in Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 12: 555–566.
125. Miyaji Y., Walter S., Chen L., Kurihara A., Ishizuka T., Saito M., Kawai K., Okazaki O. (2011) Distribution of KAI-9803, a Novel -Protein Kinase C Inhibitor, after Intravenous Administration to Rats. *Drug Metabolism and Disposition* 39: 1946–1953.
126. Mo R., Sun Q., Li N., Zhang C. (2013) Intracellular Delivery and Antitumor Effects of PH-Sensitive Liposomes Based on Zwitterionic Oligopeptide Lipids. *Biomaterials* 34: 2773-2786.
127. Mohr L., Carceles-Cordon M., Woo J., Cordon-Cardo C., Domingo-Domenech J., Rodriguez-Bravo V. (2017) Generation of Prostate Cancer Cell Models of Resistance to the Anti-Mitotic Agent Docetaxel. *Journal of Visualized Experiments* 127: 1-8.
128. Munyendo W. L. L., Lv H., Benza-Ingoula H., Baraza L. D., Zhou J. (2012) Cell Penetrating Peptides in the Delivery of Biopharmaceuticals. *Biomolecules* 2: 187–202.
129. Murphy W. K., Fossella F. V., Winn R. J., Shin D. M., Hynes H. E., Gross H. M., Davilla E., Leimert J., Dhingra H., Raber M. N. (1993) Phase II Study of Taxol in Patients with

Untreated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 85: 384–388.

130. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Ruth P., Schaefer-Korting M. (2010) *Farmakologia i Toksykologia Mutschlera*, wydawnictwo MedPharm Polska, Wrocław.
131. Nakase I., Takeuchi T., Tanaka G., Futaki S. (2008) Methodological and Cellular Aspects That Govern the Internalization Mechanisms of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 598–607.
132. Narayanan S., Mony U., Vijaykumar D.K., Koyakutty M., Paul-Prasanth B., Menon D. (2015) Sequential Release of Epigallocatechin Gallate and Paclitaxel from PLGA-Casein Core/Shell Nanoparticles Sensitizes Drug-Resistant Breast Cancer Cells. *Nanomedicine* 11: 1399-1406.
133. Nevozhay D. (2014) Cheburator Software for Automatically Calculating Drug Inhibitory Concentrations from In Vitro Screening Assays. *PLoS ONE* 9: e106186.
134. Oberlies N. H., Kroll D. J. (2004) Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. *Journal of Natural Products* 67: 129–135.
135. Olziersky A. M., Labidi-Galy S. I. (2017) Clinical Development of Anti-Mitotic Drugs in Cancer [w:] *Cell Division Machinery and Disease*, Gotta M. Meraldi P. (red.). Springer International Publishing, Cham, Szwajcaria, tom 1002 ss. 125–152.
136. Orellana E., Kasinski A. (2016) Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *BIO-PROTOCOL* 6: e1984.
137. Øverbye A., Holsæter A. M., Markus F., Škalko-Basnet N., Iversen T. G., Torgersen M. L., Sønstevoold T., Engebraaten O., Flatmark K., Mælandsmo G. M., Skotland T., Sandvig K. (2017) Ceramide-Containing Liposomes with Doxorubicin: Time and Cell-Dependent Effect of C6 and C12 Ceramide. *Oncotarget* 8: 76921-76934.
138. Park J. H., Chi S. C., Lee W. S., Lee W. M., Koo Y. B., Yong C. S., Choi H. G., Woo J. S. (2009) Toxicity Studies of Cremophor-Free Paclitaxel Solid Dispersion Formulated by a Supercritical Antisolvent Process. *Archives of Pharmacal Research* 32: 139–148.
139. Parker A. L., Kavallaris M., McCarroll J. A. (2014) Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front Oncol* 4: 153.
140. Pärnaste L., Arukuusk P., Langel K., Tenson T., Langel Ü. (2017) The Formation of Nanoparticles between Small Interfering RNA and Amphipathic Cell-Penetrating Peptides. *Mol Ther Nucleic Acids*. 7: 1-10.
141. Pasquier E., Carré M., Pourroy B., Camoin L., Rebaï O., Briand C., Braguer D. (2004) Antiangiogenic Activity of Paclitaxel Is Associated with Its Cytostatic Effect, Mediated by the Initiation but Not Completion of a Mitochondrial Apoptotic Signaling Pathway. *Mol Cancer Ther* 3: 1301-1310.
142. Perillo E., Allard-Vannier E., Falanga A., Stiuso P., Vitiello M. T., Galdiero M., Galdiero S., Chourpa I. (2015) Quantitative and qualitative effect of gH625 on the

nanoliposome-mediated delivery of mitoxantrone anticancer drug to HeLa cells. *International Journal of Pharmaceutics* 488: 59–66.

143. Perillo E., Porto S., Falanga A., Zappavigna S., Stiuso P., Tirino V., Desiderio V., Papaccio G., Galdiero M., Giordano A., Galdiero S., Caraglia M. (2016) Liposome Armed with Herpes Virus-Derived GH625 Peptide to Overcome Doxorubicin Resistance in Lung Adenocarcinoma Cell Lines. *Oncotarget* 7: 4077-4092.
144. Pescina S., Ostacolo C., Gomez-Monterrey I. M., Sala M., Bertamino A., Sonvico F., Padula C., Santi P., Bianchera A., Nicoli S. (2018) Cell Penetrating Peptides in Ocular Drug Delivery: State of the Art. *Journal of Controlled Release* 284: 84–102.
145. Räägel H., Säälk P., Hansen M, Langel Ü., Pooga M. (2009) CPP–Protein Constructs Induce a Population of Non-Acidic Vesicles during Trafficking through Endo-Lysosomal Pathway. *Journal of Controlled Release* 139: 108–117.
146. Rádis-Baptista G., Campelo I. S., Morlighem J. É. R.L., Melo L. M., Freitas V. J. F. (2017) Cell-Penetrating Peptides (CPPs): From Delivery of Nucleic Acids and Antigens to Transduction of Engineered Nucleases for Application in Transgenesis. *Journal of Biotechnology* 252: 15–26.
147. Ranghar S., Sirohi P., Verma P., Agarwal V. (2014) Nanoparticle-based drug delivery systems: promising approaches against infections. *Braz. arch. biol. Technol.* 57: 209-222.
148. Ren X, Zhao B, Chang H, Xiao M, Wu Y, Liu Y. (2018) Paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis through regulation of ROS and the AKT/MAPK signaling pathway in canine mammary gland tumor cells. *Mol Med Rep* 17: 8289–8299.
149. Richard J. P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M. J., Chernomordik L. V., Lebleu B. (2003) Cell-Penetrating Peptides: A REEVALUATION OF THE MECHANISM OF CELLULAR UPTAKE. *Journal of Biological Chemistry* 278: 585–590.
150. Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L. (2011) Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death [w:] *Mammalian Cell Viability*, Stoddart M. J. (red.). Humana Press, Nowy Jork, USA, ss. 103–114.
151. Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L. (2016) Cell Viability Assays [w:] *Assay Guidance Manual*, Sittampalam G. S., Grossman A., Brimacombe K. (red.). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, ss. 1-25.
152. Rizzuti M., Nizzardo M., Zanetta C., Ramirez A., Corti S. (2015) Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discovery Today* 20: 76–85.
153. Rowinsky E. K., Donehower R. C. (1995) Paclitaxel (Taxol). *New England Journal of Medicine* 332: 1004–1014.

154. Rowinsky E. K., Onetto N., Canetta R. M., Arbuck S. G. (1992) Taxol: The First of the Taxanes, an Important New Class of Antitumor Agents. *Seminars in Oncology* 19: 646–662.
155. Ruczynski J., Wierzbicki P. M., Kogut-Wierzbicka M., Mucha P., Siedlecka-Kroplewska K., Rekowski P. (2014) Cell-Penetrating Peptides as a Promising Tool for Delivery of Various Molecules into the Cells. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 52: 257–269.
156. Ruttala H. B., Ko Y. T. (2015) Liposomal Co-Delivery of Curcumin and Albumin/Paclitaxel Nanoparticle for Enhanced Synergistic Antitumor Efficacy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 128: 419-426.
157. Ryter S.W., Choi A. M. (2013) Regulation of Autophagy in Oxygen-Dependent Cellular Stress. *Curr Pharm Des* 19: 2747-2756.
158. Sakamuru S., Li X., Attene-Ramos M. S., niski R., Lu J., Shou L., Shen M., Tice R. R., Austin C. P., Xia M. (2012) Application of a homogenous membrane potential assay to assess mitochondrial function. *Physiol Genomics* 44: 495-503.
159. Salas-Martínez A. M., Caballero C. I., González-Vela M. C., Mira M. C., Laso-Dosal F., Val-Bernal J.F. (2018) Paclitaxel-Induced Cutaneous Change Mimicking Malignancy in a Previous Cutaneous Eruption. *Rev Esp Patol* 51: 188-192.
160. Schiff P. B., Fant J., Horwitz S. B. (1979) Promotion of Microtubule Assembly in Vitro by Taxol. *Nature* 277: 665–667.
161. Scudiero, D. A., Shoemaker R. H., Paull K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D., Boyd M. R. (1988) Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 48: 4827–4833.
162. Sercombe L., Veerati T., Moheimani F., Wu S. Y., Sood A. K., Hua S. (2015) Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology* 6: 286
163. Silva F. S. G., Starostina I. G., Ivanova V. V., Rizvanov A. A., Oliveira P. J., Pereira S. P. (2016) Determination of Metabolic Viability and Cell Mass Using a Tandem Resazurin/Sulforhodamine B Assay. *Current Protocols in Toxicology* 68: 2.24.1-2.24.15.
164. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 4: 1107-1112.
165. Snell N. J C. (2014) Discontinued Drug Projects in the Respiratory Therapeutic Area during 2012. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 23: 411–415.
166. Srimanee A., Arvanitidou M., Kim K., Hällbrink M., Langel Ü. (2018) Cell-Penetrating Peptides for siRNA Delivery to Glioblastomas. *Peptides* 104: 62-69.
167. Stewart K. M., Horton K. L., Kelley S. O. (2008) Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vehicles for Biology and Medicine. *Organic & Biomolecular Chemistry* 6: 2242–2255.

168. Stierle A. A., Stierle D. B. (2015) Bioactive Secondary Metabolites Produced by the Fungal Endophytes of Conifers. *Natural product communications* 10: 1671–1682.
169. Stockert J. C., Horobin R. W., Colombo L. L., Blázquez-Castro A. (2018) Tetrazolium Salts and Formazan Products in Cell Biology: Viability Assessment, Fluorescence Imaging, and Labeling Perspectives. *Acta Histochemica* 120: 159–167.
170. Sun J., Jiang L., Lin Y., Gerhard E. M., Jiang X., Li L., Yang J., Gu Z. (2017) Enhanced Anticancer Efficacy of Paclitaxel through Multistage Tumor-Targeting Liposomes Modified with RGD and KLA Peptides. *Int J Nanomedicine* 12: 1517–1537.
171. Sung H. J., Ma W, Wang P. Y., Hynes J., O'Riordan T. C., Combs C. A., McCoy J. P. Jr., Bunz F., Kang J. G., Hwang P. M. (2010) Mitochondrial respiration protects against oxygen-associated DNA damage. *Nat Commun* 1: 5.
172. Sung J. H., Shin S. A., Park H. K., Montelaro R. C., Chong Y. H. (2001) Protective effect of glutathione in HIV-1 lytic peptide 1-induced cell death in human neuronal cells. *J Neurovirol* 7: 454–465.
173. Surapaneni M. S., Das S. K., Das N. G. (2012) Designing Paclitaxel Drug Delivery Systems Aimed at Improved Patient Outcomes: Current Status and Challenges. *ISRN Pharmacology* 2012: 1–15.
174. Sweeney C. J., Miller K. D., Sissons S. E., Nozaki S., Heilman D. K., Shen J., Sledge G. W. Jr. (2001) The Antiangiogenic Property of Docetaxel Is Synergistic with a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody against Vascular Endothelial Growth Factor or 2-Methoxyestradiol but Antagonized by Endothelial Growth Factors. *Cancer Res* 61: 3369–3372.
175. Szabó I., Orbán E., Schlosser G., Hudecz F., Bánóczy Z. (2016) Cell-Penetrating Conjugates of Pentaglutamylated Methotrexate as Potential Anticancer Drugs against Resistant Tumor Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* 115: 361–368.
176. Szwed M., Laroche-Clary A., Robert J., Jozwiak Z. (2016) Efficacy of Doxorubicin-Transferrin Conjugate in Apoptosis Induction in Human Leukemia Cells through Reactive Oxygen Species Generation. *Cellular Oncology* 39: 107–118.
177. Tabaczar S., Koceva-Chyła A., Matczak K., Gwoździński K. (2010) Molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej taksanów. I. Oddziaływanie docetakselu na mikrotubule. *Postepy Hig Med Dosw* 64: 568–581.
178. Tanaka M., Kato A., Satoh Y., Ide T., Sagou K., Kimura K., Hasegawa H., Kawaguchi Y. (2012) Herpes Simplex Virus 1 VP22 Regulates Translocation of Multiple Viral and Cellular Proteins and Promotes Neurovirulence. *Journal of Virology* 86: 5264–5277.
179. Teicher B. A. (1996) *Cancer Therapeutics: Experimental and Clinical Agents*. Springer Science & Business Media, Berlin, Niemcy.

180. ten Tije A. J., Verweij J., Loos W. J., Sparreboom A. (2003) Pharmacological Effects of Formulation Vehicles. *Clinical Pharmacokinetics* 42: 665–685.
181. Ter-Avetisyan G., Tünnemann G., Nowak D., Nitschke M., Herrmann A., Drab M., Cardoso M. C. (2009) Cell Entry of Arginine-Rich Peptides Is Independent of Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 284: 3370–3378.
182. Thadani-Mulero M., Nanus D. M., Giannakakou P. (2012) Androgen Receptor on the Move: Boarding the Microtubule Expressway to the Nucleus. *Cancer Research* 72: 4611–4615.
183. Torchilin V. P., Rammohan R., Weissig V., Levchenko T. S. (2001) TAT Peptide on the Surface of Liposomes Affords Their Efficient Intracellular Delivery Even at Low Temperature and in the Presence of Metabolic Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8786-8791.
184. Towers C. G., Thorburn A. (2016) Therapeutic targeting of autophagy. *EBioMedicine* 14: 15-23.
185. Tripathi P. P., Arami H., Banga I., Gupta J., Gandhi S. (2018) Cell Penetrating Peptides in Preclinical and Clinical Cancer Diagnosis and Therapy. *Oncotarget* 9: 37252-37267.
186. Tseng Y. L., Liu J. J., Hong R. L. (2002) Translocation of Liposomes into Cancer Cells by Cell-Penetrating Peptides Penetratin and Tat: A Kinetic and Efficacy Study. *Mol Pharmacol* 62: 864-872.
187. Valiante S., Falanga A., Cigliano L., Iachetta G., Busiello R. A., Marca V. L., Galdiero M., Lombardi A., Galdiero S. (2015) Peptide gH625 enters into neuron and astrocyte cell lines and crosses the blood–brain barrier in rats. *International Journal of Nanomedicine* 10: 1885–1898.
188. van Nguyen T., Shin M. C., Min K. A, Huang Y., Oh E., Moon C. (2018) Cell-Penetrating Peptide-Based Non-Invasive Topical Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 48: 77–87.
189. van Tonder A., Joubert A. M., Cromarty A. D. (2015) Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* 8: 47.
190. Varbiro G., Veres B., Gallyas F. Jr, Sumegi B. (2001) Direct Effect of Taxol on Free Radical Formation and Mitochondrial Permeability Transition. *Free Radic Biol Med* 31: 548-558.
191. Vasconcelos L., Pärn K., Langel Ü. (2013) Therapeutic Potential of Cell-Penetrating Peptides. *Therapeutic Delivery* 4: 573–591.
192. Vázquez C. L., Colombo M. I. (2009) Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods Enzymol* 452: 85-95.

193. Vichai V., i Kirtikara K. (2006) Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. *Nature Protocols* 1: 1112–1116.
194. Vivès E., Schmidt J., Pèlegri A. (2008) Cell-Penetrating and Cell-Targeting Peptides in Drug Delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1786: 126–138.
195. Waak J., Dringen R. (2006) Formation and rapid export of the monochlorobimane-glutathione conjugate in cultured rat astrocytes. *Neurochem Res* 31: 1409-1416.
196. Walker A., Singh A., Tully E., Woo J., Le A., Nguyen T., Biswal S., Sharma D., Gabrielson E. (2018) Nrf2 Signaling and Autophagy Are Complementary in Protecting Breast Cancer Cells during Glucose Deprivation. *Free Radic Biol Med* 120: 407-413.
197. Wall M. E., Wani M. C. (1995) Chapter One – Taxol [w:] *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Pelletier S. W. (red.). Pergamon, Nowy Jork, USA, tom 9 ss. 1–21.
198. Wall M. E., Wani M. C. (1996) Camptothecin and Taxol: From Discovery to Clinic. *Journal of Ethnopharmacology* 51: 239–254
199. Walrant A., Cardon S., Burlina F., Sagan S. (2017) Membrane Crossing and Membranotropic Activity of Cell-Penetrating Peptides: Dangerous Liaisons? *Accounts of Chemical Research* 50: 2968–2975.
200. Wang F., Wang Y., Zhang X., Zhang W., Guo S., Jin F. (2014) Recent Progress of Cell-Penetrating Peptides as New Carriers for Intracellular Cargo Delivery. *Journal of Controlled Release* 174: 126–136.
201. Wang J., Lou P., Lesniewski R., Henkin J. (2003) Paclitaxel at Ultra Low Concentrations Inhibits Angiogenesis without Affecting Cellular Microtubule Assembly. *Anticancer Drugs* 14: 13-19.
202. Wang L. (2017) Preparation and in vitro evaluation of an acidic environment-responsive liposome for paclitaxel tumor targeting. *Asian J. Pharm. Sci.* 12: 470–477.
203. Wang S., Qiu J., Shi Z., Wang Y., Chen M. (2015) Nanoscale drug delivery for taxanes based on the mechanism of multidrug resistance of cancer. *Biotechnology Advances* 33: 224–241.
204. Wang T., Yang Z., Zhang Y., Zhang X., Wang L., Zhang S., Jia L. (2018) Caspase Cleavage of Mcl-1 Impairs Its Anti-Apoptotic Activity and Proteasomal Degradation in Non-Small Lung Cancer Cells. *Apoptosis* 23: 54-64.
205. Wang Y., Wang M, Qi H., Pan P., Hou T., Li J., He G., Zhang H. (2014) Pathway-Dependent Inhibition of Paclitaxel Hydroxylation by Kinase Inhibitors and Assessment of Drug-Drug Interaction Potentials. *Drug Metabolism and Disposition* 42: 782–795.
206. Wani M. C., Horwitz S. B. (2014) Nature as a Remarkable Chemist: A Personal Story of the Discovery and Development of Taxol. *Anti-Cancer Drugs* 25: 482–487.

207. Watanabe T., Kuranami M., Inoue K., Masuda N., Aogi K., Ohno S., Iwata H., Mukai H., Uemura Y., Ohashi Y. (2017) Comparison of an AC-taxane versus AC-free regimen and paclitaxel versus docetaxel in patients with lymph node-positive breast cancer: Final results of the National Surgical Adjuvant Study of Breast Cancer 02 trial, a randomized comparative phase 3 study. *Cancer* 123: 759-768.
208. Watson G. M., Kulkarni K., Brandt R., Borgo M. P. D., Aguilar M. I., Wilce J. A. (2017) Shortened Penetratin Cell-Penetrating Peptide Is Insufficient for Cytosolic Delivery of a Grb7 Targeting Peptide. *ACS Omega* 2: 670–677.
209. Weaver B. A. (2014) How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell* 25: 2677–2681.
210. Weed D. J., Nicola A. V. (2017) Herpes simplex virus Membrane Fusion. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 223: 29–47.
211. Weiszhar Z., Czucz J., Révész C., Rosivall L., Szebeni J., Rozsnyay Z. (2012) Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 3rd ESF-UB Conference on Nanomedicine* 45: 492–498.
212. Wieczorek A., Błaż A., Zakrzewski J., Rychlik B., Plażuk D. (2016) Ferrocenyl 2,5-Piperazinediones as Tubulin-Binding Organometallic ABCB1 and ABCG2 Inhibitors Active against MDR Cells. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 7: 612–617.
213. Wolter T. P., von Heimburg D., Stoffels I., Groeger A., Pallua N. (2005) Cryopreservation of mature human adipocytes: in vitro measurement of viability. *Ann Plast Surg* 55: 408-413.
214. Wu D. J., Adamopoulos I. E. (2017) Autophagy and autoimmunity. *Clin Immunol* 176: 55-62.
215. Wu G., Fang Y. Z., Yang S., Lupton J. R., Turner N. D. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492.
216. Wysocki P. J. (2013) Enzalutamid – nowy lek w leczeniu raka gruczołu krokowego opornego na kastrację. *Onkol Prak Klin* 9: 186-190.
217. Yang C. P. H., Horwitz S. B. (2017) Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 1733.
218. Yingchoncharoen P., Kalinowski D. S., Richardson D. R. (2016) Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacol Rev* 68: 701-787.
219. Zangabad P. S., Mirkiani S., Shahsavari S., Masoudi B., Masroor M., Hamed H., Jafari Z., Taghipour Y.D., Hashemi H., Karimi M., Hamblin M.R. (2018) Stimulus-Responsive Liposomes as Smart Nanoplatfoms for Drug Delivery Applications. *Nanotechnol Rev* 7: 95-122.

220. Zasadil L. M., Andersen K. A., Yeum D., Rocque G. B., Wilke L. G., Tevaarwerk A. J., Raines R. T., Burkard M. E., Weaver B. A. (2014) Cytotoxicity of Paclitaxel in Breast Cancer Is Due to Chromosome Missegregation on Multipolar Spindles. *Science Translational Medicine* 6: 229ra43.
221. Zejc A., Gorczyca M. (2009) *Chemia leków, podręcznik dla studentów farmacji i farmaceutów*. PZWL, Warszawa.
222. Zhang E., Xing R., Liu S., Li P. (2019) Current advances in development of new docetaxel formulations. *Expert Opin Drug Deliv* 16: 301-312.
223. Zhang H. Yang F., Shen G., Yang Y., Tang Y. (2015) Comparison of the Release Behaviors of Di (2-Ethylhexyl) Phthalate and Tri(2-Ethylhexyl) Trimellitate from the Polyvinyl-Chloride Infusion Set into Pharmaceutical Solutions. *Chinese Journal of Chromatography* 33: 522–529.
224. Zhang Q., Tang J., Fu L., Ran R., Liu Y., Yuan M., He Q. (2013) A pH-responsive α -helical cell penetrating peptide-mediated liposomal delivery system. *Biomaterials* 34: 7980-7993.
225. Zhao C. Y., Cheng R., Yang Z., Tian Z. M. (2018) Nanotechnology for Cancer Therapy Based on Chemotherapy. *Molecules* 23: E826.
226. Zitka O., Skalickova S., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Kruseova J., Eckschlager T., Kizek R. (2012) Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett* 4: 1247-1253.
227. Zorova L. D., Popkov V. A., Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Pevzner I. B., Jankauskas S. S., Babenko V. A., Zorov S. D., Balakireva A. V., Juhaszova M., Sollott S. J., Zorov D. B. (2018) Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* 552: 50-59.
228. Zou S. H., Du X., Lin H., Wang P. C., Li M. (2018) Paclitaxel Inhibits the Progression of Cervical Cancer by Inhibiting Autophagy via LncRNARP11-381N20.2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22: 3010-3017.
229. Żwawiak J., Zaprutko L. (2014) A brief history of taxol. *Journal of Medical Science* 1: 47–52.

Strona internetowa 1: <https://www.cancer.gov/research/progress/discovery/taxol>