



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Genetyki Molekularnej,
Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej

Gabriela Katarzyna Gajek

**Modulowanie biologicznej aktywności
irinotekanu i jego metabolitu (SN38)
przez ester fenyloetylowy kwasu
kawowego (CAPE) w badaniach *in vitro***

Modulation of biological activity of irinotekan and its
metabolite (SN38) by coffee acid phenylethyl ester
(CAPE) *in vitro* studies

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biotechnologii
Molekularnej i Genetyki

pod kierunkiem
dr hab. Renaty Kontek, prof. UŁ

Podziękowania

Pani dr hab. Renacie Kontek, prof. UŁ,

*za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowania rozprawy, cierpliwość,
wrozumiałość, inspirację do zgłębiania zagadnień naukowych oraz merytoryczne
wsparcie w rozwiązywaniu problemów naukowych.*

Pani dr Beacie Marciniak,

za wspólnie spędzony czas, miłą atmosferę oraz owocne dyskusje naukowe.

Rodzinie,

za wiarę we mnie, wrozumiałość i motywację.

Spis treści

I. WSTĘP.....	12
I. 1. Propolis.....	13
I. 2. Ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE).....	16
I. 3. Przeciwnowotworowe właściwości CAPE	17
I. 3.2. Aktywność proapoptotyczna	20
I. 3.3. Aktywność antyoksydacyjna.....	22
I. 3.4. Aktywność przeciwzapalna	24
I. 4. Wpływ CAPE na transformację nowotworową.....	25
I. 5. Zastosowanie irinotekanu (CPT-11) w terapii przeciwnowotworowej	26
I. 5.1. Oddziaływanie CPT-11 z suplementami diety.....	29
II. CEL PRACY	32
III. MATERIAŁ I METODY	34
III.1. Badane związki chemiczne.....	34
III.1.1. CAPE.....	34
III.1.2. Irinotekan (CPT-11)	34
III. 1.3. SN38 – aktywny metabolit irinotekanu	35
III .2. Odczynniki chemiczne	35
III .2.1. Prowadzenie hodowli komórkowych oraz oznaczanie żywotności komórek	35
III. 2.2. Test MTT	36
III. 2.3. Test kometowy	36
III. 2.4. Oznaczenia poziomu stresu oksydacyjnego.....	36
III. 2.5. Oznaczenia aktywności proapoptotycznej.....	36
III. 2.6. Badania cyklu komórkowego.....	36
III. 3. Aparatura i sprzęt.....	37
III. 3.1. Jałowy sprzęt jednorazowego użytku.....	37
III. 3.2. Aparatura	37

III. 2. Materiał badawczy	37
<i>Linia komórkowa AGS</i>	<i>38</i>
<i>Linia komórkowa HT29.....</i>	<i>39</i>
<i>Linia komórkowa HCT116</i>	<i>40</i>
III. 3. Metody	43
III. 3.1. Pasaż komórek	43
III. 3.1.1. Ocena żywotności komórek roztworem błękitu trypanu.....	44
III. 3.2. Analiza cytotoksyczności.....	45
III. 3.2.1. Oznaczenie aktywności metabolicznej komórek testem MTT	45
III. 3.2.2. Wyznaczenie stopnia synergizmu/antagonizmu pomiędzy badanymi związkami.....	47
III. 3.2. Analiza genotoksyczności.....	48
III. 3.2.1. Test kometowy	48
III. 3.3. Badanie poziomu stresu oksydacyjnego.....	51
III. 3.4. Analiza przebiegu cyklu komórkowego i jego poszczególnych faz.....	52
III. 3.5. Ocena zdolności do indukcji apoptozy	53
III. 3.5.1. Ocena zdolności do indukcji apoptozy z wykorzystaniem cytometru przepływowego	53
III. 3.5.2. Ocena właściwości proapoptotycznych przy użyciu zestawu analitycznego ApoTox-Glo[™] Triplex Assay	55
IV. WYNIKI.....	58
IV. 1. Analiza cytotoksyczności	58
IV. 1.1. Test MTT.....	58
IV. 1.2. Oznaczenie synergizmu/antagonizmu pomiędzy badanymi związkami testem MTT	62
IV. 2. Analiza genotoksyczności.....	66
IV. 2.1. Ocena uszkodzeń DNA testem kometowym	66
IV. 3. Badanie poziomu stresu oksydacyjnego	72
IV. 4. Ocena zdolności do indukcji apoptozy	75

IV. 4.1. Ocena zdolności do indukcji apoptozy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej	75
IV. 4.2. Ocena aktywności kaspaz 3/7 przy użyciu zestawu analitycznego ApoTox-Glo™ Triplex Assay	88
IV. 5. Analiza przebiegu cyklu komórkowego i jego poszczególnych faz	95
V. DYSKUSJA	101
VI. WNIOSKI	114
VII. STRESZCZENIE	115
VIII. SUMMARY	118
IX. DOROBIEK NAUKOWY	121
IX.1. Wykaz publikacji	121
IX.2. Doniesienia konferencyjne	125
IX.3. Staże naukowe	127
IX.4. Projekty naukowe	127
X. LITERATURA	128

Wykaz skrótów

5-LO – (*ang. 5-Lipoxygenase*) 5-lipooksygenaza

AGS – (*ang. Gastric adenocarcinoma*) ludzka linia komórek nabłonkowych gruczołakoraka żołądka

Akt – (*ang. Serine/threonine protein kinase B*) kinaza serynowo-treoninowa B

ALP – (*ang. Alkaline phosphatase*) fosfataza alkaliczna

ALS – (*ang. Alkali labile sites*) miejsca zasadowo labilne

ALT – (*ang. Alanine transaminase*) aminotransferaza alaninowa

APAF-1 – (*ang. Apoptotic peptidase activating factor 1*) czynnik 1 aktywujący proteazy apoptotyczne

APC – (*ang. Adenomatous polyposis coli*) onkogen

AST – (*ang. Aspartate transaminase*) aminotransferaza asparaginianowa

Bak – (*ang. Bcl-2 homologous antagonist/killer*) białko proapoptotyczne

Bax – (*ang. BCL2 Associated X*) białko proapoptotyczne

Bcl-2 – (*ang. B-cell CLL/lymphoma 2*) białko B-komórkowej białaczki limfoblastycznej, białko antyapoptotyczne

bis-AAF-R110 – (*ang. Bis-alanyl- alanyl-phenylalanyl- rhodamine 110*) bis-alanylalanyl-fenylalanylorodamina 110

BLM – (*ang. Bleomycin*) bleomycyna

BSA – (*ang. Bovine serum albumin*) albumina surowicy bydlęcej

CA – (*ang. Caffeic acid*) kwas kawowy

Caco-2 – (*ang. Colorectal adenocarcinoma*) linia komórek nabłonkowych gruczołakoraka jelita grubego

CAPE – (*ang. Caffeic acid phenethyl ester*) ester fenyletylowy kwasu kawowego

CAT – (*ang. Catalase*) katalaza

CASP – (*ang. Comet Assay Software Project*) program komputerowy do analizy testu kometowego

CDH1 – (*ang. Cadherin 1*) kadheryna 1

cIAP-1 – (*ang. Cellular inhibitor of apoptosis protein 1*) komórkowy inhibitor białka apoptozy 1

cIAP-2 – (*ang. Cellular inhibitor of apoptosis protein 1*) komórkowy inhibitor białka apoptozy 2

COX 1 i 2 – (*ang. Cyclooxygenase 1 and 2*) cyklooksygenaza 1 i 2

CP – (*ang. Cyclophosphamide*) cyklofosfamid

CPT-11 – (*ang. Irinotecan*) irinotekan

CTNNB1 – (*ang. Catenin beta 1*) katenina beta1

CYP450 – (*ang. Cytochrome P450*) cytochrom P450

DAPI – (*ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole*) 4'6-diamidyno-2-fenylindol

- DCF** – (*ang. 2',7'-dichlorofluorescein*) 2',7'-dichlorofluoresceina
- DMEM** – (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*) nazwa medium hodowlanego
- DMSO** – (*ang. Dimethyl sulfoxide*) dimetylosulfotlenek
- DNA** – (*ang. Deoxyribonucleic acid*) kwas deoksyrybonukleinowy
- DSB** – (*ang. Double strand break*) podwójne pęknięcia nici DNA
- E2F-1** – (*ang. Transcription factor E2F1*) czynnik transkrypcyjny E2F1
- ECM** – (*ang. Extracellular matrix*) macierz pozakomórkowa
- EDTA** – (*ang. Ethylenediaminetetraacetic acid*) kwas (etylenodiamino)tetraoctowy
- EEP** – ekstrakt etanolowy z propolisu
- EGF** – (*ang. Epidermal growth factor*) naskórkowy czynnik wzrostu
- EGFR** – (*ang. Epidermal growth factor receptor*) receptor naskórkowego czynnika wzrostu
- EMT** – (*ang. Epithelial mesenchymal transition*) przejście nabłonkowo-mezenchymalne
- ERK** – (*ang. Extracellular signal-regulated kinases*) kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym
- FasL** – białko transbłonowe typu II
- FDA** – (*ang. Food and Drug Administration*) Amerykańska Agencja Żywności i Leków
- FOXO1** – białka należące do rodziny forkhead box O, czynnik transkrypcyjny
- GF-AFC** – (*ang. Glycylphenylalanyl-aminofluoroumarin*) glicylo-feniloalanina-aminofluorokumaryny
- GSH** – (*ang. Glutathione*) glutation
- GSH-Px** – (*ang. Glutathione Peroxidase*) peroksydaza glutationowa
- GSH-Red** – (*ang. Glutathione reductase*) reduktaza glutationowa
- Gsk-3 β** – (*ang. Glycogen synthase kinase 3*) kinaza syntazy glikogenu 3
- GSSG** – (*ang. Glutathione disulfide*) disulfid glutationu
- H₂DCFDA** – (*ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*) diocetan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina
- HC** – (*ang. Hemorrhagic cystitis*) krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego
- HCT116** – (*ang. Colorectal carcinoma*) linia komórek nabłonkowych gruczolaka jelita grubego,
- HIV** – (*ang. Human immunodeficiency virus*) ludzki wirus niedoboru odporności
- HO 1** – (*ang. Heme oxygenase 1*) oksigenaza hemowa
- H-ras** – (*ang. Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) onkogen
- HT29** – (*ang. colorectal adenocarcinoma*) linia komórek gruczolaka jelita grubego
- HUVEC** – (*ang. Human umbilical vein endothelial cells*) ludzkie komórki śródbłona żyły pępowinowej

- IFN γ** – (*ang. Interferon gamma*) interferon gamma
- IL** – (*ang. Interleukin*) interleukina
- IL-1 β** – (*ang. Interleukina 1 β*) interteukina 1 β
- IL-2** – (*ang. Interleukina 2*) interteukina 2
- IL-6** – (*ang. Interleukina 6*) interteukina 6
- iNOS** – (*ang. Inducible nitric oxide synthase*) syntaza tlenku azotu
- I κ B- α** – (*ang. inhibitor of nuclear factor kappa B*) inhibitor czynnika jądrowego κ B
- JNK** – (*ang. c-Jun N-terminal kinases*) N-końcowe kinazy C-Jun, onkogen
- KRAS** – (*ang. V-KI-RAS2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) onkogen
- LAV** – (*ang. Lymphadenopathy associated virus*) wirus związany z limfadenopatią
- LDH** – (*ang. Lactate dehydrogenase*) dehydrogenaza mleczanowa
- LMP** – (*ang. Low melting point*) niski punkt topnienia
- MCP-1** – (*ang. Monocyte chemoattractant protein-1*) białko chemotaktyczne monocytów
- MET** – (*ang. Mesenchymal–epithelial transition*) przejście mezenchymalno-nabłonkowe
- MMP** – (*ang. Matrix metalloproteinases*) metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej
- mTOR** – (*ang. mammalian target of rapamycin*) kinaza tzw. ssaczy cel rapamycyny
- MTT** – (*ang. 3-(4,5-dimethyl-2 thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium*) bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy
- Myb** – (*ang. V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*) onkogen
- ne** – (*ang. Expected number*) liczba oczekiwana
- NF κ B** – (*ang. Nuclear factor κ B*) czynnik jądrowy κ B
- NMP** – (*ang. Normal melting point*) normalny punkt topnienia
- no** – (*ang. Observed number*) liczba obserwowana
- Noxa** – (*ang. Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) białko indukowane forbolem 12-mirystynianu 13-octanu, białko proapoptotyczne
- N-ras** – (*ang. Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) onkogen
- ODC** – (*ang. Ornithine decarboxylase*) dekarboksylaza ornityny
- p38MAPK** – (*ang. p38 mitogen-activated protein kinases*) kinazy białkowe aktywowane mitogenem p38
- PBS** – (*ang. Phosphate Buffered Saline*) buforowana forforanem sól fizjologiczna
- PKD1** – (*ang. phosphoinositide-dependent kinase 1*) kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu
- PI** – (*ang. Propidium iodide*) jodek propidyny
- PIK3CA** – (*ang. Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic alfa*) kinaza PIC3A
- PIV5** – (*ang. Parainfluenza virus 5*) wirus paragrypy 5
- PS** – (*ang. Phosphatidyl serine*) fosfatydyloseryna

- RAS** – (*ang. Rat sarcoma virus*) onkogen
- RFT** – reaktywne formy tlenu
- RFU** – (*ang. Relative fluorescence units*) względne jednostki fluorescencji
- RLU** – (*ang. Relative luminescence units*) względne jednostki luminescencji
- RNazy** – (*ang. Ribonucleases*) rybonukleazy
- ROS** – (*ang. Reactive oxygen species*) reaktywne formy tlenu
- RPMI** – (*ang. Roswell Park Memorial Institute medium*) nazwa medium hodowlanego
- rRNA** – (*ang. Ribosomal ribonucleic acid*) rybosomalny kwas rybonukleinowy
- RTK** – (*ang. Receptor tyrosine kinase*) receptor kinazy terozynowej
- siRNA** – (*ang. small interfering RNA*) mały interferujący RNA
- SN38** – (*ang. 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin*) 7-etylo-10-hydroksykamptotecyna
- SOD** – (*ang. Superoxide dismutase*) dysmutaza ponadtlenkowa
- SSB** – (*ang. Single strand break*) pojedyncze pęknięcia nici DNA
- TAM** – (*ang. Tamoxifen*) tamoksyfen
- T-cf** – (*ang. T-cell factor*) czynnik transkrypcyjny komórek T
- TCI** – (*ang. Tokyo Chemical Industry*) firma z odczynnikami chemicznymi
- TGF** – (*ang. Transforming growth factor β*) transformujący czynnik wzrostu β
- TGF α i β** – (*ang. Transforming growth factor α and β*) transformujący czynnik wzrostu α i β
- TNF** – (*ang. Tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworów
- TopoI** – (*ang. Topoisomerase I*) topoizomeraza I
- TP53** – (*ang. Transformation-related protein 53*) białko 53 związane z transformacją nowotworową
- TPA** – (*ang. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) forbol 12-mirystynian 13-octanu, aktywator kinazy
- TRAIL** – (*ang. Tumor necrosis factor related- related apoptosis-inducing ligand*) ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę
- Twist 2** – (*ang. Protein 2 in humans is encoded by the TWIST2 gene*) białko 2 kodowane u ludzi przez gen *TWIST2*
- VEGF** – (*ang. Vascular endothelial growth factor*) czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
- $W_{S/A}$** – współczynnik synergizmu/antagonizmu
- XIAP** – (*ang. X-linked inhibitor of apoptosis protein*) inhibitor białka apoptozy sprzężony z chromosomem X
- XO** – (*ang. Xanthine oxidase*) oksydaza ksantynowa

Rozdział I

Wstęp

I. WSTĘP

Obszerna wiedza na temat etiologii nowotworów na poziomie epigenetycznym, genetycznym i molekularnym otwiera ogromne możliwości zróżnicowanej diagnostyki procesu inicjacji i progresji nowotworowej. Odkrycie biomarkerów nowotworowych takich jak: receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), cyklooksygenaza-2 (indukowana postać syntazy cyklicznego nadtlenku prostaglandynowego; COX-2), RAS (biomarker przerzutowego raka jelita grubego), oraz ich inhibitorów, stało się skuteczną strategią w leczeniu onkologicznym (Gullett i wsp., 2010). Z kolei, występowanie efektów ubocznych i ograniczenia terapeutyczne konwencjonalnych chemioterapeutyków przyczyniają się do poszukiwania produktów o charakterze protekcyjnym, które mogą stanowić wsparcie terapii przeciwnowotworowej. Coraz większą uwagę badaczy zwracają produkty naturalne ze względu na bezpieczeństwo ich stosowania i zdolność zmniejszania ryzyka zachorowania na raka (Lappe i wsp., 2007; Peterlik i wsp., 2009; Kim i wsp., 2010). Produkty ziołowe i tzw. suplementy diety należą do produktów ogólnodostępnych i można je kupić bez recepty w aptekach, ale także sklepach spożywczych i drogeriach. Ich bezpieczeństwo i skuteczność na ogół nie jest potwierdzana na podstawie rygorystycznych badań naukowych, w przeciwieństwie do leków. Należy również podkreślić, że suplementy diety nie muszą być monitorowane pod kątem występowania działań niepożądanych czy też ewentualnych interakcji z innymi lekami (Bojarowicz i Dźwigulska, 2012).

Coraz większa liczba osób zdrowych stosuje alternatywne środki lecznicze, w tym suplementy diety, które mogłyby zmniejszyć ryzyko pojawienia się niektórych chorób (Barnes i wsp., 2004; Barnes i wsp., 2008). Rośnie także liczba pacjentów cierpiących na schorzenia onkologiczne, którzy zażywają suplementy diety, aby zminimalizować efekty uboczne stosowanych podczas terapii przeciwnowotworowej, chemioterapeutyków. Wiedza, na temat interakcji przyjmowanych preparatów, będących m.in. suplementami diety ze standardowymi chemioterapeutykami, nie jest rozpowszechniona wśród pacjentów. Ponadto, występują przypuszczenia, że stosowanie niektórych suplementów diety w większych dawkach może wywierać efekt odwrotny od zamierzonego, tzn. może przyspieszać rozwój wielu nowotworów (Norman i wsp., 2003; Bojarowicz i Dźwigulska, 2012). Istnieją dwie przeciwstawne teorie dotyczące obecności suplementów w diecie pacjentów będących w trakcie chemioterapii. Udokumentowano, że zastosowanie suplementów może znacząco poprawić efekty terapii, a jednocześnie ochronić prawidłowe tkanki przed cytotoksycznym działaniem leków oraz niwelować uboczne skutki ich działania (Prasad i wsp., 1999; Lamson i Brignall, 1999; Conklin, 2000). Z drugiej strony ww. produkty, obecne w diecie pacjentów onkologicznych, mogą wpływać na zmniejszenie pożądanego efektu cytotoksycznego stosowanych leków w stosunku

do komórek nowotworowych, a w konsekwencji zmniejszyć ich skuteczność terapeutyczną (Labriola i Livingston, 1999; Kong i Lillehei, 1998).

Kluczowym wyzwaniem dla naukowców jest jak najlepsze wykorzystanie tych informacji w opracowywaniu skutecznej terapii przeciwnowotworowej (Gullett i wsp., 2010). Produkty naturalne wydają się być obiecującym źródłem nowych aktywnych związków o charakterze terapeutycznym, jednak droga do otrzymania wystandaryzowanego produktu o określonej skuteczności terapeutycznej wymaga wielu szczegółowych badań, zarówno na poziomie *in vitro*, jak i *in vivo*.

I. 1. Propolis

Propolis jest suplementem diety powszechnie stosowanym, zarówno przez ludzi zdrowych, jak i chorych. Słowo propolis pochodzi od dwóch greckich słów „pro” i „polis”, które oznaczają odpowiednio „obronę” i „miasto” lub też „społeczność” (Castaldo i Capasso, 2002). Propolis już w starożytności znalazł zastosowanie w medycynie naturalnej. Egipcjanie używali go do balsamowania zwłok, a greccy i rzymscy lekarze stosowali propolis jako środek antyseptyczny i leczniczy przy zasklepianiu ran, szczególnie w terapii ran skórnych i śluzówkowych. Antybakteryjne stosowanie propolisu stało się bardzo popularne w Europie między XVII a XIX wiekiem, a pod koniec XIX w. propolis był powszechnie stosowany ze względu na swoje właściwości lecznicze. Został również użyty w sowieckich klinikach do leczenia gruźlicy podczas II wojny światowej (Havsteen i wsp., 1983; Burdock, 1998). Obecnie propolis jest powszechnie stosowany w kosmetykach i medycynie alternatywnej podczas terapii różnych chorób, w tym infekcji dróg oddechowych, przeziębienia i grypy, ale także gojenia się ran, oparzeń, trądziku i opryszczki narządów płciowych. Dzięki możliwościom zapobiegania próchnicy oraz leczenia zapalenia dziąseł i jamy ustnej propolis jest stosowany jako składnik komercyjnych preparatów do płukania jamy ustnej i past do zębów (Hongal i wsp., 2014).

Propolis, nazywany także kitem pszczelim, jest substancją pochodzenia naturalnego, zbieraną przez pszczoły z niektórych części kwiatów, głównie pąków, a także żywicy drzew i krzewów (Pietta i wsp., 2002). Surowy propolis składa się zazwyczaj z około 50% żywicy, 30% wosków, 10% olejków eterycznych, 5% pyłków i 5% różnych związków organicznych (Burdock, 1998; Gómez-Caravaca i wsp., 2006; Bonamigo i wsp., 2017) (Tab. 1.). Owady modyfikują propolis, wzbogacając go woskiem pszczelim oraz wydzieliną gruczołów ślinowych. Kit pszczeli, tworząc swoistą barierę między środowiskiem zewnętrznym a wewnętrznym, jest używany przez pszczoły do ochrony ula przed mikroorganizmami (Wagh, 2013).

Tabela 1. Skład surowego propolisu

Żywice	50%
Woski	30%
Olejki eteryczny	10%
Pyłki	5%
Związki pochodzenia organicznego (kwasy fenolowe, flawonoidy, terpeny) mikroelementy (Cu, Si, Mg, Mn, Zn); witaminy z grupy E, H, P i B	5%

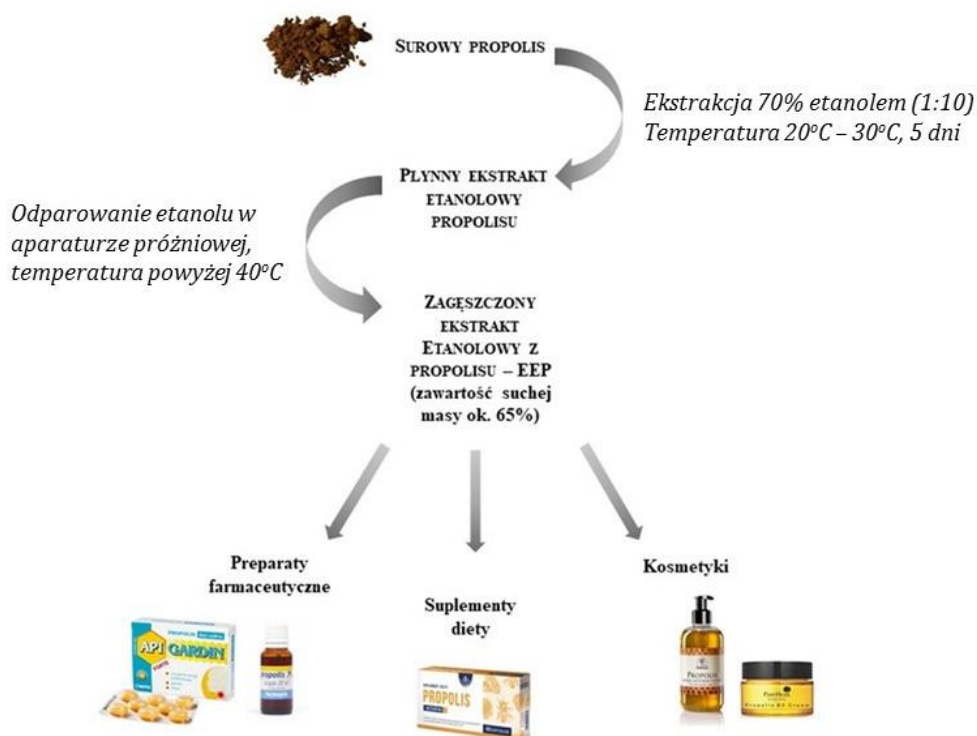
Na konsystencję propolisu w znacznym stopniu wpływa temperatura: poniżej 15°C jest twardy, w temperaturze około 21°C powoli zaczyna robić się miękki, natomiast w temperaturze pomiędzy 30°C a 35°C (jest to temperatura jaka panuje w ulu) jest całkowicie plastyczny (Kędzia, 2009). Kolor propolisu, w zależności od rodzaju roślin, z których zbierana jest żywica, może być żółty, brązowy lub prawie czarny (Rycina 1). Zapach propolisu jest intensywny i aromatyczny (Sawicka i wsp., 2012).



Rycina 1. Kolor propolisu zależny od gatunku roślin, z których zbierany jest pyłek i żywica (strona internetowa 1).

Wykorzystanie propolisu w preparatach farmaceutycznych, weterynaryjnych, suplementach diety czy kosmetykach wymaga przeprowadzenia ekstrakcji, w wyniku której, za pomocą 70%, etanolu otrzymuje się jego zagęszczony ekstrakt (EEP). W optymalnych

warunkach ekstrakcji, zawartość substancji aktywnych biologicznie w EEP sięga aż 64,3-68,5% (Woźniak i wsp., 2016) (Rycina 2).



Rycina 2. Schemat otrzymywania oraz wykorzystania zagęszczonego ekstraktu etanolowego z propolisu (Woźniak i wsp., 2016).

Komponentami propolisu są tłuszcze, kwasy alifatyczne i aromatyczne, flawonoidy, terpeny, alkohole, cukry i estry (Marcucci, 1995). Wśród ww. szerokiej gamy związków chemicznych, flawonoidy odpowiedzialne są za właściwości farmakologiczne propolisu. Wśród nich można znaleźć flawony, flawonole, flawanony, flawanonole, chalkony i dihydrochalkony, izoflawony, flawany, izoflawany i neoflawonoidy (Bankova, 2005). Terpenoidy będące związkami lotnymi, obecne są w 10% w propolisie, nadają mu zapach i podobnie jak flawonoidy, wpływają na jego właściwości biologiczne. Obejmują one monoterpeny, diterpeny, triterpeny i seskwiterpeny. Z kolei, do związków fenolowych obecnych w propolisie zaliczamy m.in. różne kwasy, takie jak: cynamonowy, pumarynowy i kawowy (Bankova, 2005). Propolis zawiera także ważne witaminy: B1, B2, B6, C i E oraz pierwiastki: wapń, potas, sód, miedź, cynk, mangan i żelazo, a także enzymy: dehydrogenazę bursztynianową, glukozo-6-fosfatazę, trifosfatazę adenozykową i kwaśną fosfatazę (Boisard i wsp., 2014).

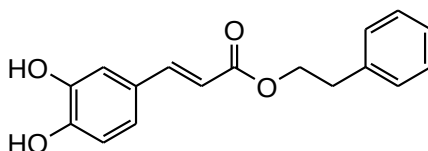
Liczne badania potwierdziły różnice w procentowej zawartości poszczególnych składników propolisu, w zależności od pochodzenia i rodzaju roślin, z których zbierana jest żywica, a także gatunku pszczoł. Propolis ze strefy umiarkowanej (Europy, Ameryki Północnej, Azji) jest klasyfikowany jako propolis typu topolowego, a jego głównymi składnikami są flawonoidy, kwasy fenolowe i ich estry (Bankova, 2005; Boisard i wsp., 2014; Graikou i wsp., 2016). Propolis brzoźowy, występujący w Rosji zawiera także flawonoidy, jednak inne niż w propolisie typu topolowego (Bankova, 2005). Propolis śródziemnomorski jest charakterystyczny dla regionów subtropikalnych, takich jak Grecja, Sycylia, Malta, Cypr, Chorwacja czy Algieria i charakteryzuje się stosunkowo dużymi ilościami diterpenów (Bankova, 2005, Graikou i wsp., 2016). Z kolei, w strefach tropikalnych zidentyfikowano kilka rodzajów propolisu pochodzących z wielu różnych źródeł np. w Brazylii istnieje trzynaście różnych typów propolisu, w tym zielony, czerwony i brązowy. Najpopularniejszy jest zielony, który zawdzięcza swój kolor chlorofilowi występującemu w młodych tkankach. Ten typ propolisu jest bogaty w pochodne fenylopropanoidów (np. artepilina C) i diterpeny, natomiast flawonoidy występują w nim w niewielkich ilościach (Bankova, 2005). Czerwony propolis charakteryzuje się obecnością licznych flawonoidów (formononetyny, luteoliny, likirygeniny, rutyny, kwercetyny), zaś brązowy propolis, bogaty w fenole, triterpenoidy i izoflawonoidy, jest produkowany głównie w północno-wschodniej Brazylii (Bankova, 2005, Ueda i wsp., 2017).

Ze względu na swoje cenne właściwości m.in. przeciwgrzybicze (Kujumgiev i wsp., 1999), przeciwbakteryjne (Trusheva i wsp., 2010; Silici i wsp., 2007), przeciwzapalne (Cunha i wsp., 2004) i antyoksydacyjne (Russo i wsp., 2002) propolis jest wykorzystywany w medycynie naturalnej na całym świecie, a obecnie sprzedawany jest jako suplement diety, składnik kosmetyków i jako komponent żywności funkcjonalnej. Propolis posiada również potencjał przeciwnowotworowy, jednak ze względu na zmienny skład kitu pszczelego trudno jest określić molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej propolisu (Kuo i wsp., 2015). Spośród ponad dwunastu estrów aromatycznych najczęściej badanym i wykazującym szczególne działanie farmakologiczne jest ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE). Charakteryzuje się on silną aktywnością przeciwbakteryjną, przeciwwirusową i przeciwnowotworową. Został on także zidentyfikowany jako jeden z głównych, biologicznie czynnych, składników propolisu o właściwościach chemoprotekcyjnych (Akyol i wsp., 2012, Sawicka i wsp., 2012).

I. 2. Ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE)

CAPE pierwszy raz został zsyntetyzowany w 1988 roku na Uniwersytecie Columbia w Nowym Jorku (Grunberger i wsp., 1988). Związek ten, należy do grupy polifenoli i posiada

grupy hydroksylowe w obrębie pierścienia katecholowego (He i wsp., 2006). Jego wzór sumaryczny to $C_{17}H_{16}O_4$, a masa molowa wynosi 284,4 g/mol (Rycina 3) (Akyol i wsp., 2012). Struktura chemiczna CAPE składająca się z dwóch grup hydroksylowych fenolu odgrywa kluczową rolę w aktywności biologicznej tego związku. Aktywność CAPE można zwiększyć poprzez podstawienie jednej grupy hydroksylowej i wydłużenie łańcucha alkilowego części alkoholowej (Akyol i wsp., 2012).

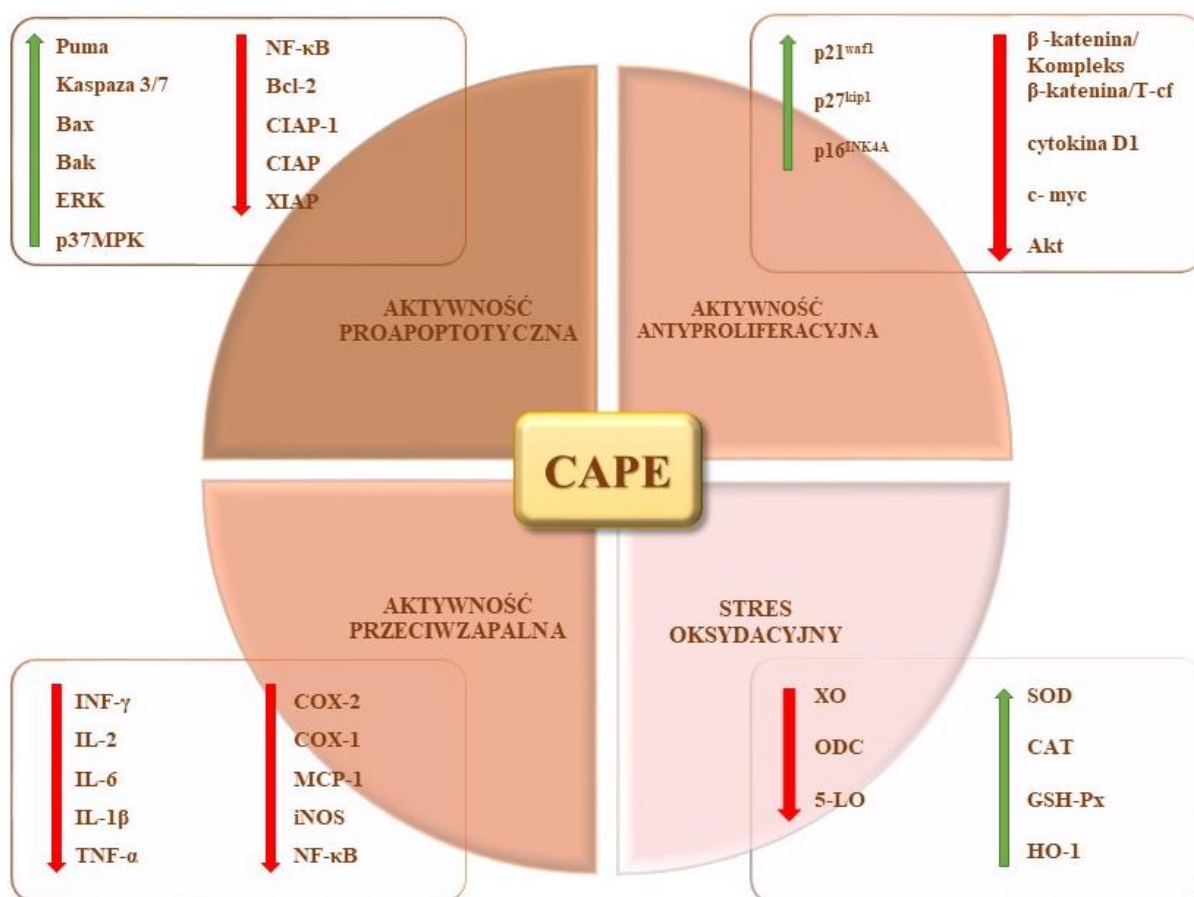


Rycina 3. Wzór strukturalny estru fenyloetylowego kwasu kawowego (CAPE).

Komercyjnie dostępny CAPE występuje jako biały proszek, który jest rozpuszczalny w etanolu, dimetylosulfotlenku lub octanie etylu. Może być albo ekstrahowany z propolisu za pomocą różnych metod ekstrakcji, albo syntetyzowany z kwasu kawowego i alkoholi fenyloetylowych (Akyol i wsp., 2015). Dane literaturowe wskazują, że CAPE nie wykazuje znaczących efektów cytotoksycznych w stosunku do komórek prawidłowych (Grunberger i wsp., 1988). Natomiast, wykazano, że aktywność CAPE odpowiada za przeciwnowotworowe właściwości propolisu, jednak mechanizm działania estru nie został jeszcze dokładnie poznany.

I. 3. Przeciwnowotworowe właściwości CAPE

CAPE jest jednym z najcenniejszych bioaktywnych komponentów pozyskiwanych w wysokim stężeniu z propolisu. Dotychczasowe badania wykazały jego przeciwnowotworową aktywność o szerokim spektrum działania w stosunku do wielu modeli nowotworów *in vitro* i *in vivo*. Działanie biologiczne CAPE jest ukierunkowane na czynnik transkrypcyjny NF- κ B, promujący apoptozę w szerokim zakresie linii komórkowych (Rycina 4). Ponadto, CAPE redukuje stres oksydacyjny, który odgrywa kluczową rolę w patogenezie wielu typów nowotworów (Tolba i wsp., 2013).



Rycina 4. Białka biorące udział w proapoptotycznej, antyproliferacyjnej, oksydacyjnej i przeciwzapalnej aktywności CAPE. Stymulacja aktywności białek w wyniku działania CAPE są oznaczone zielonymi strzałkami skierowanymi w górę. Inhibicyjne działanie CAPE, oznaczone są czerwonymi strzałkami skierowanymi w dół.

I. 3.1. Aktywność antyproliferacyjna

Komórki nowotworowe charakteryzują się niekontrolowanym tempem proliferacji spowodowanym nieprawidłowym funkcjonowaniem genów odpowiedzialnych za syntezę białek/enzymów biorących udział w regulacji cyklu komórkowego (Wu i wsp., 2011). Istnieje wiele doniesień literaturowych potwierdzających antyproliferacyjny charakter CAPE. Dotychczas wykazano, iż CAPE hamuje proliferację komórek wielu linii nowotworowych, w tym raka piersi (Watabe i wsp., 2004), jelita grubego (Xiang i wsp., 2006), raka płuc (Chen i wsp., 2004), czerniaka (Kudugunti i wsp., 2011), glejaka (Kuo i wsp., 2006), trzustki (Chen i wsp., 2008), jamy ustanej (Kuo i wsp., 2015) oraz szpiczaka mnogiego (Koru i wsp., 2009).

Badania wskazują, iż aktywność antyproliferacyjna może wynikać z oddziaływania CAPE z kompleksem β -katenina/T-cf. β -katenina to białko wielofunkcyjne, odpowiedzialne za

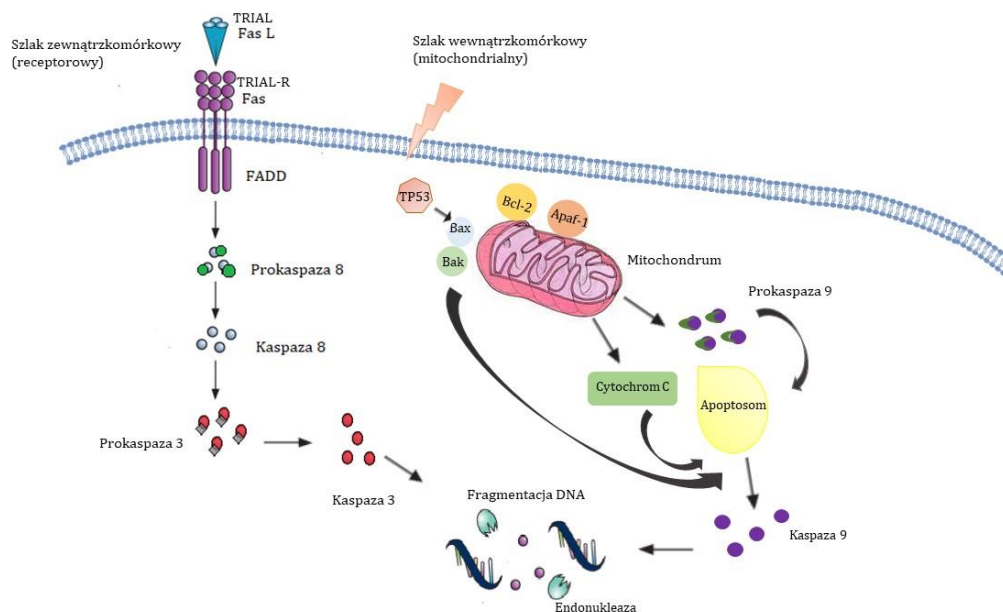
adhezję komórek, jak również transdukcję sygnałów za pośrednictwem szlaku sygnalizacyjnego WNT (szlak sygnalizacyjny WNT tworzy szereg białek odgrywających rolę w embriogenezie i karcynogenezie, a także fizjologicznych procesach zachodzących w prawidłowych komórkach dorosłych organizmów) (Gottardi i wsp., 2001, Moon i wsp., 2002). Funkcja sygnalizacyjna β -kateniny jest szczególnie ważna w przypadku raka jelita grubego, w którym powszechna jest jej aktywacja w wyniku mutacji w genie *APC* lub mutacji w N-końcowym regionie β -kateniny (Bright-Thomas i Hargest, 2003). Sygnalizacja β -kateniny wspomaga przejście komórek z fazy G1 do S cyklu komórkowego (Orford i wsp., 1999). CAPE hamuje aktywność transkrypcyjną kompleksu β katenina/T-cf w komórkach raka okrężnicy (HCT116) i gruczolaka jelita grubego (SW480) oraz zmniejsza ekspresję cykliny D1 i genu *C-myc* (Wu i wsp., 2011, He i wsp., 2006) w sposób zależny od dawki. Zwiększenie liczby komórek linii HCT116 w fazie G0/G1 cyklu komórkowego, a następnie spadek ich liczby w fazie S pod wpływem CAPE, w zależności od dawki i czasu ekspozycji, było również związane ze zmniejszeniem się poziomu β kateniny w cytoplazmie i jądrze komórkowym (Wang i wsp., 2005). Ponadto, wykazano, że CAPE powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach glejaka C6 poprzez indukcję inhibitorów kinaz cyklinozależnych: p21^{waf1/cip1}, p27^{Kip1} i p16^{INK4A} (Kuo i wsp., 2006; Lin i wsp., 2012).

Kolejnym sugerowanym mechanizmem antyproliferacyjnej aktywności CAPE jest jego wpływ na działanie kinazy Akt, która odpowiada za fosforylację wielu białek związanych z regulacją podstawowych procesów komórkowych, w tym także proliferacją komórek (Krześlak, 2010). Istnieją trzy izoformy tego enzymu, Akt1, Akt2 i Akt3 (Gonzalez i McGraw, 2009). Regulacja aktywności kinazy Akt odbywa się poprzez fosforylację treoniny 308 i seryny 473. Fosforylacja Thr308 jest aktywowana przez kinazę PDK1 (Murugan i wsp., 2013), podczas gdy fosforylacja Ser473 jest aktywowana przez kinazę mTOR (Sarbasov i wsp., 2005, Jacinto i wsp., 2006). Kinaza Akt reguluje fosforylację kinazy Gsk-3 β (Ser9), która ma wpływ na syntezę i aktywność β -kateniny, cykliny D1 i cykliny E (Li i wsp., 2005; Rössig i wsp., 2002). CAPE zmniejsza fosforylację kinazy Akt w komórkach gruczolaka prostaty (PC-3) oraz komórek ludzkiego płaskonabłonkowego raka jamy ustnej (TW2.6), co uniemożliwia jej prawidłowe działanie (Kuo i wsp., 2013; Tolba i wsp., 2013). Dodatkowo, zahamowanie fosforylacji Akt spowodowane działaniem CAPE, powoduje hamowanie inwazyjności komórek nowotworowych PC-3 oraz TW2.6. Białka FOXO1 i FOXO3a są supresorami nowotworów, a ich fosforylacja przez kinazę Akt hamuje ich aktywność i powoduje translokację tych białek z jądra do cytozolu (Zhang i wsp., 2011). Spadek fosforylacji FOXO1 i FOXO3a, spowodowany działaniem CAPE podnosi ich aktywność supresorową, co przyczynia się do zahamowania proliferacji komórek TW2.6 (Kuo i wsp., 2013). CAPE hamuje proliferację komórek i tworzenie kolonii komórek ludzkiego płaskonabłonkowego raka jamy ustnej (TW2.6) co przejawia się

zmniejszeniem populacji komórek w fazie G1, przy jednoczesnym wzroście liczby komórek w fazie G2/M cyklu komórkowego (Kuo i wsp., 2013).

I. 3.2. Aktywność proapoptotyczna

Charakterystyczną cechą komórek nowotworowych jest ich oporność na indukcję apoptozy. Dlatego też, przy opracowywaniu nowych strategii w terapiach przeciwnowotworowych istotną rolę odgrywa zdolność leku do inicjowania regulowanej śmierci komórki. Apoptoza jest procesem kontrolowanym genetycznie, którego celem jest eliminacja uszkodzonych komórek, niezdolnych do naprawy różnego rodzaju defektów DNA. Istnieją dwa główne szlaki apoptozy: zewnątrz- i wewnątrzpochodny. Pierwszy inicjowany jest przez tzw. ligandy śmierci, które łączą się ze swoistymi receptorami obecnymi na powierzchni komórki, indukując kaskadę kaspaz prowadząc do apoptozy (Rycina 5). Jednym z zewnątrzkomórkowych czynników indukujących programowaną śmierć komórki jest TNF – czynnik martwicy nowotworu. Do grupy ligandów wykazujących podobne działanie jak TNF zaliczamy FasL czy TRAIL (Beyer i wsp., 2019). Druga droga indukcji apoptozy (wewnątrzpochodna) jest inicjowana przez mitochondria i białka proapoptotyczne. Szlak ten jest zależny od białka TP53, którego aktywacja powoduje zmienioną transkrypcję wielu genów, biorących udział w reakcjach metabolicznych w metabolizmie komórki, regulacji cyklu komórkowego i apoptozy (Rycina 5). Geny, których transkrypcja podlega nasileniu przez TP53 są zaangażowane w promowanie apoptozy i obejmują białka rodziny Bcl-2: Bax, Bak i Noxa. Badania sugerują, że aktywność białek Bax i Bak jest niezbędna do uwolnienia cytochromu C z mitochondriów do cytozolu podczas apoptozy (Balaji i wsp., 2021). Proces ten jest kontrolowany przez białko TP53 i TNF- α i odgrywa kluczową rolę w regulacji apoptozy, ponieważ kompleksy cytochromu C i apoptotycznego czynnika aktywującego proteazę 1 (APAF-1) w cytozolu promują aktywację kaspazy 9 i kaspazy 3. Sygnały komórkowe są przekazywane przez kilka grup kolejno aktywowanych kinaz białkowych, takich jak ERK, JNK i p38MAPK, które są elementami nadrodziny kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAPK). Białka te odgrywają kluczową rolę w regulacji wzrostu i przeżycia komórek (D'Arcy, 2019).



Rycina 5. Schemat zewnątrzkomórkowego i wewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy.

Wiele danych literaturowych potwierdza pozytywny wpływ CAPE na indukcję apoptozy. W komórkach linii nowotworowych: mysich naskórka (Cl-41), glejaka (C6), szyjki macicy (ME180) odnotowano wzrost aktywności kaspazy-3 i kaspazy-7, będących kaspazami efektorowymi (Nomura i wsp., 2001; Lee i wsp., 2003; Hung i wsp., 2003). CAPE, wpływa na aktywację białek proapoptotycznych (Bax i Bak) jednocześnie zmniejszając aktywność białek: Bcl-2, cIAP-1, cIAP-2, XIAP, będących inhibitorami apoptozy (Lee i wsp., 2003; McEleny i wsp., 2004; Kuo i wsp., 2006; Chen i wsp., 2008). W komórkach glejaka, CAPE aktywuje kinazę białkową indukowaną mitogenem (ERK) i kinazę białkową aktywowaną mitogenem p38 (p38MAPK) (Rycina 4), która pośredniczy w indukowanej przez CAPE apoptozie zależnej od białka TP53 (Lee i wsp., 2003). Fosforylacja białka TP53 odgrywa kluczową rolę w jego stabilizacji i regulacji aktywności (Liao i wsp., 2003). Ekspozycja komórek glejaka na działanie CAPE zwiększa fosforylację białka TP53, a tym samym jego syntezę i białka Bax, które mogą tworzyć heterodimery z białkiem Bcl-2 w błonie mitochondriów, blokując jego antyapoptotyczną aktywność i tym samym przyspieszać apoptozę (Lee i wsp., 2003). Wykazano także, że CAPE znacząco zwiększa aktywację białka Puma, biorącego udział w procesie apoptozy (Yu i wsp., 2017; Chatwichien i wsp., 2016; Liao i wsp., 2003; Zhang i wsp., 2017). Wykazano, że CAPE indukuje dysfunkcję mitochondriów w ludzkich komórkach raka trzustki, o czym świadczy utrata ich potencjału transbłonowego (Chen i wsp., 2008). Ponadto, działaniu proapoptotycznemu CAPE w ludzkich komórkach białaczki HL-60 towarzyszy aktywacja kaspazy-3, w wyniku rozszczepienia prokaspazy-3, a także zmniejszenie aktywności białka Bcl-2, przy jednoczesnym wzroście syntezy białka Bax. Odnotowano, że 7 μ M CAPE

powoduje charakterystyczną dla komórek apoptotycznych fragmentację DNA po 6 godzinach od podania CAPE do komórek białaczki HL-60 (Chen i wsp., 2008). Z kolei, w komórkach białaczki szpikowej U937 inkubowanych z CAPE zaobserwowano fragmentację DNA i kondensację chromatyny charakterystyczną dla komórek apoptotycznych oraz uwolnienie cytochromu C z mitochondriów do cytozolu, redukcję syntezy białka Bcl-2, wzrost aktywności białka Bax oraz aktywację kaspazy-3, co świadczyło o indukcji przez CAPE apoptozy poprzez szlak mitochondrialny (wewnątrzpochodny) (Jin i wsp., 2008).

Z kolei, czynnik NF- κ B odgrywa istotną rolę w regulacji wielu genów, kontrolujących apoptozę, proliferację, różnicowanie komórek oraz odpowiedź immunologiczną i stany zapalne. Hamowanie aktywności czynnika NF- κ B koreluje ze wzrostem liczby komórek apoptotycznych (Akyol i wsp., 2012). Czynnik ten wykazuje dualistyczny charakter działania: z jednej strony pobudza ekspresję genów antyapoptotycznych, a z drugiej, hamuje aktywność genów proapoptotycznych (Piotrkowska i wsp., 2008). CAPE jest specyficznym inhibitorem NF- κ B, poprzez zapobieganie translokacji jednostki p65 NF- κ B i blokowanie wiązania między NF- κ B a DNA (Natarajan i wsp., 1996). CAPE wywiera inaktywujący wpływ na NF- κ B, także poprzez zapobieganie powstawaniu reaktywnych form tlenu, dzięki swoim antyoksydacyjnym właściwościom (Bhimani i wsp., 1993; Natarajan i wsp., 1996). CAPE hamuje aktywność czynnika NF- κ B w ludzkich komórkach raka piersi MCF-7 i wzmacnia zewnątrzpochodną ścieżkę apoptozy w komórkach nowotworowych indukowaną przez stymulację receptora TRAIL i Fas (Watabe i wsp., 2004). Wszystkie ww. efekty wydają się być niezależne od rodzaju komórek nowotworowych i stężenia CAPE.

I. 3.3. Aktywność antyoksydacyjna

Cząsteczka tlenu posiada właściwości utleniające co oznacza, że oddziałując ze związkami organicznymi pobiera od nich elektrony, ulegając redukcji. Całkowita redukcja cząsteczki tlenu oznacza przyłączenie czterech protonów i czterech elektronów, w wyniku czego powstają dwie cząsteczki wody. Jednak cząsteczka tlenu nie zawsze ulega czteroelektronowej redukcji. Produktami kolejnych stopni redukcji cząsteczki tlenu tj. jedno-, dwu- i trójelektronowej, a także tlenu singletowego są reaktywne formy tlenu (Bartosz, 2013).

RFT powstają w komórkach w sposób ciągły, w wyniku reakcji biochemicznych i pod wpływem czynników zewnętrznych (Russo i wsp., 2002). Komórkowe mechanizmy antyoksydacyjne opierają się na aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: katalaza, peroksydaza glutationowa, reduktaza GSH i dysmutaza ponadtlenkowa, oraz związków o właściwościach przeciwutleniających, takich jak: glutation, witamina C czy witamina E (Sawaya i wsp., 2011). RFT stają się szkodliwe dla komórki wtedy, kiedy są produkowane w nadmiarze, w sytuacjach takich jak: stany zapalne, niedokrwienie, choroby nowotworowe

czy obecność jonów żelaza (reakcja Fentona). W tych warunkach endogenne przeciwutleniacze mogą nie być w stanie zapobiec generowaniu RFT, które indukują peroksydację lipidów błonowych, uszkodzenia białek czy DNA (Russo i wsp., 2002). CAPE wykazuje działanie hamujące peroksydację lipidów błony komórkowej erytrocytów i fragmentację DNA spowodowaną reaktywnymi formami tlenu. Dzięki swojej aktywności inhibicyjnej oksydazy ksantynowej, CAPE może zatrzymać szlak odzyskiwania nukleotydów, wykazując działanie przeciwnowotworowe we wszystkich typach komórek (Ilhan i wsp., 1999; Koltuksuz i wsp., 1999).

Metabolity kwasu arachidonowego są ważnymi mediatorami w procesach nowotworowych i zapalnych. CAPE wykazuje zdolność do hamowania katalizowanej przez 5-lipooksygenazę reakcji utleniania kwasu linolowego i kwasu arachidonowego. Badania wykazały również, że CAPE i inne estry kwasu kawowego hamują indukowane azoksymetanem zmiany przedrakowe okrężnicy, poprzez hamowanie lipooksygenazy oraz inhibicję aktywności enzymatycznej dekarboksylazy ornityny i kinazy tyrozynowej (Akyol i wsp., 2012).

CAPE indukuje ekspresję wrażliwej na stres oksydacyjny oksydazy hemowej 1 (Scapagnini i wsp., 2002; Wang i wsp., 2008). Podwyższona ekspresja enzymu HO-1 łagodzi dysfunkcje narządów spowodowaną zachwianiem równowagi redoks, jednocześnie przeciwdziałając zaburzeniom metabolicznym. Substratem dla HO-1 jest hem, natomiast produktami jej działania są dwuwartościowe jony żelaza, tlenek węgla oraz biliwerdyna. Ta ostatnia jest przekształcana przez reduktazę biliwerdyny w bilirubinę, mogącą hamować agregację płytek krwi, zapobiegać śmierci komórek i uszkodzeniom tkanek (Kozakowska i wsp., 2012).

Russo i wsp., badali propolis (zarówno wzbogacony w CAPE, jak i bez jego obecności), CAPE oraz galanginę, będącą również składnikiem kitu pszczelego, pod kątem ich właściwości antyoksydacyjnych. Autorzy, wykorzystali aktywność oksydazy ksantynowej, jako wskaźnika antyoksydacyjnego działania badanych związków. Wykazano, dawko-zależny, hamujący wpływ wszystkich badanych związków na funkcjonowanie oksydazy ksantynowej. Dowiedziono, że ekstrakt propolisu, zawierający CAPE, wykazuje silniejsze działanie antyoksydacyjne niż propolis pozbawiony CAPE, co dowodzi, że odpowiada on za właściwości antyoksydacyjne propolisu (Russo i wsp., 2002).

Z kolei, badania Şahin i wsp. wykazały, że CAPE łagodzi stres oksydacyjny w komórkach siatkówki oka oraz nerwu wzrokowego szczurów wywołany ostrym zatruciem metanolem (Şahin i wsp., 2013). Zhang i wsp., wykazali, że zastosowany ogólnoustrojowo CAPE chronił komórki zwojowe siatkówki przed niedokrwinnym uszkodzeniem wywołanym zwiększonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym. CAPE zapewnił ochronę komórek nabłonka barwnikowego

siatkówki ARPE19 przed nadtlenkiem tert-butyłu i ograniczył wytwarzanie RFT (Zhang i wsp., 2021). Natomiast, Eşrefoğlu i wsp. odnotowali, że CAPE chroni komórki nerek szczurów przed zmianami oksydacyjnymi wywołanymi procesem starzenia komórkowego (Eşrefoğlu i wsp., 2012). Antyoksydacyjne właściwości CAPE zostały także odnotowane przez Yilmaz i wsp. (2004), którzy dowiedli, że ester fenyloetylowy kwasu kawowego chroni przed peroksydacją lipidów i wspomaga antyoksydacyjne działanie enzymów w komórkach wątroby szczurów w modelu cukrzycy indukowanej (Yilmaz i wsp., 2004).

I. 3.4. Aktywność przeciwzapalna

Istnieje wiele dowodów potwierdzających hipotezę, że stan zapalny zapewnia odpowiednie warunki do rozwoju nowotworu, powodując defekty w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Może on także zaburzać mikrośrodowisko komórek, prowadząc do zmian w genach związanych z transformacją nowotworową i modyfikacją potranslacyjną kluczowych dla komórek białek, zaangażowanych w przebieg i regulację cyklu komórkowego, naprawę DNA czy apoptozę. Ponadto, dowiedziono, że komórki zapalne obecne w mikrośrodowisku guza wpływają na jego progresję i metastazę. Mogą one wpływać na promocję guza poprzez wydzielanie cytokin, czynników wzrostu, chemokin i proteaz, które stymulują proliferację i inwazję komórek nowotworowych. Częsteczki biorące udział w interakcjach pomiędzy komórką zapalną a nowotworową są atrakcyjnymi celami w terapii przeciwnowotworowej (Eiró i Vizoso, 2012). Wiele przeprowadzonych dotychczas badań dowiodło, że propolis wykazuje silne działanie przeciwzapalne, dzięki obecności w jego składzie estru fenyloetylowego kwasu kawowego (Armutcu i wsp., 2015; Cunha i wsp., 2004; Jo i wsp., 2013).

Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że CAPE hamuje aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B podczas stanu zapalnego. Przypuszcza się, że ester fenyloetylowy kwasu kawowego nie tylko zapobiega degradacji I κ B- α , ale także hamuje aktywację czynnika NF- κ B poprzez zaburzanie interakcji pomiędzy NF- κ B i DNA (Song i wsp., 2008). Toyoda i wsp. zaobserwowali, że leczenie CAPE w zapaleniu indukowanym *Helicobacter pylori* u myszokoczków mongolskich hamuje aktywację NF- κ B poprzez zapobieganie degradacji I κ B- α oraz fosforylację białka p65. Ponadto, badania wykazały, że poziom ekspresji czynników zapalnych, takich jak TNF- α , IFN- γ , IL-2 czy IL-6 został znacząco zmniejszony w wyniku podawania CAPE (Toyoda i wsp., 2009).

Ponadto, CAPE wykazuje działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie syntezy prostaglandyn. Przypuszcza się, że jest ono wynikiem hamowania wydzielania kwasu arachidonowego z membrany komórkowej, co z kolei wiąże się z hamowaniem aktywności COX-1 i COX-2 (Michaluart i wsp., 1999). Shen i wsp., odnotowali ochronne działanie CAPE w stanach zapalnych mięśni szkieletowych szczurów poprzez zmniejszenie produkcji IL-1 β

i MCP-1 oraz ekspresji COX-2 i iNOS (Shen i wsp., 2013). Ilhan i wsp. wykazali, że przeciwzapalne działanie CAPE jest spowodowane hamowaniem generowania ROS oraz inhibicją aktywności katalitycznej iNOS (Ilhan i wsp., 2004). Z kolei, dos Santos i wsp. zaobserwowali, iż podanie szczurom CAPE wspomaga gojenie się ran, zwłaszcza tych pooparzeniowych, w których zwiększona jest produkcja tlenu azotu, powodując zmniejszenie wskaźników zapalnych, uszkodzeń oksydacyjnych oraz hamując aktywność cyklooksygenazy i lipooksygenazy (dos Santos i wsp., 2013).

I. 4. Wpływ CAPE na transformację nowotworową

Promocja nowotworu to etap karcynogenezy, w którym pod wpływem wielu czynników zainicjowana komórka, w której zaszła, i przetrwała, mutacja w obrębie genów krytycznych odpowiadających za kontrolę cyklu życiowego, np. genów regulatorowych, supresorowych czy protoonkogenów, staje się odporna na sygnały apoptotyczne i proliferuje w sposób niekontrolowany. Jednym z wielu związków wpływających na indukcję promocji guza jest TPA. Wykazano, że miejscowe podawanie CAPE myszom CD-1 (zwierzęcy model doświadczalny stosowany w badaniach starzenia, ciąży urojonej czy też w zabiegach chirurgicznych) hamuje promocję nowotworu indukowaną TPA w komórkach brodawczaka skóry (Huang i wsp., 1996).

Główną przyczyną niepowodzeń w leczeniu pacjentów onkologicznych jest przerzutowanie nowotworu. Proces ten obejmuje oddzielenie się komórek od nowotworu, przedostanie się ich do krwiobiegu i ostatecznie kolonizację w innych, odległych tkankach. Stres oksydacyjny jest ważnym elementem metastazy komórek nowotworowych, ponieważ wpływa na utratę adhezji komórek, która jest jednym z czynników warunkujących ww. proces (Chinnapaka i wsp., 2019). Badania wpływu CAPE na tranzycję nabłonkowo-mezenchymalną komórek PANC-1 wykazały, że nadekspresja wimentyny (marker transdiferencjacji) została osłabiona przez CAPE, a zmiana morfologii z kształtu epitelialnego (EMT) na mezenchymalny (MET) została częściowo odwrócona. CAPE zmniejszył potencjał migracyjny stymulowany przez czynnik wzrostu β (TGF- β) i zahamował ekspresję czynnika transkrypcyjnego Twist 2 (o którym wiadomo, że sprzyja progresji guza) (Chen i wsp., 2013). Ponadto, CAPE powodując zmniejszenie poziomu reaktywnych form tlenu, może wpływać hamująco na proces przerzutowania.

Angiogeneza to proces polegający na tworzeniu się nowych sieci naczyń krwionośnych z już istniejących. Wykazano, że wzrost guza zależy od dostępu substancji odżywczych i dostarczanych do komórek nowotworowych poprzez angiogenezę. Odnotowano, że składniki propolisu, w tym CAPE, wykazują silne działanie hamujące tworzenie się nowych naczyń krwionośnych w raku piersi (Wu i wsp., 2011). Podobne wyniki otrzymali Ahn i wsp., którzy

badali angiostatyczne i antyoksydacyjne właściwości wielu składników propolisu, w tym CAPE. Dwa spośród testowanych związków, tj. CAPE i kwercetyna, wykazały silne działanie przeciwutleniające oraz hamujące tworzenie się nowych naczyń krwionośnych w ludzkich komórkach śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) (Ahn i wsp., 2009). Podobne badania prowadzili Izuta i wsp., badając produkty pszczele z wykorzystaniem tych samych komórek (HUVEC), którzy zaobserwowali wysoki potencjał angiostatyczny i przeciwutleniający CAPE (Izuta i wsp., 2009). Ponadto, CAPE w sposób zależny od dawki hamował aktywność naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w komórkach ludzkiego raka piersi MDA-231, dzięki czemu zapobiegał rozwojowi naczyń włosowatych, tym samym blokując proces angiogenezy (Wu i wsp., 2011).

Liao i wsp. zbadali wpływ CAPE na angiogenezę i przerzutowanie komórek gruczolakoraka okrężnicy CT26. Wykazano zależne od dawki zmniejszenie żywotności ww. komórek. Ekspozycja komórek CT26 na działanie CAPE spowodowała również zahamowanie inwazji komórek nowotworowych o 47,8% oraz zmniejszenie ekspresji metaloproteinazy macierzy (MMP) -2 i metaloproteinazy 9. CAPE hamował także wytwarzanie czynnika VEGF w komórkach CT26. Dootrzewnowe podawanie CAPE myszom zmniejszyło zdolność przerzutowania komórek CT26 do płuc wraz ze zmniejszeniem poziomu VEGF w osoczu. Leczenie CAPE przedłużyło również przeżywalność myszy z wszczepionymi komórkami CT26 (Liao i wsp., 2003). Działanie CAPE na komórki nowotworowe zmniejszyło poziom białka CD44 (wykazuje aktywność promowania przerzutów) o 95% (Omene i wsp., 2012.) Opisane wyniki wskazują, że CAPE wykazuje właściwości hamujące proces metastazy.

Odnotowano, że CAPE tłumi aktywność i fosforylację EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu) w komórkach raka sutka (Wu i wsp., 2011). Zaobserwowano, że CAPE hamuje aktywność COX-2 w makrofagach J774 oraz w ludzkich komórkach raka płaskonabłonkowego 1483 (Rossi i wsp., 2002; Michaluart i wsp., 1999).

I. 5. Zastosowanie irinotekanu (CPT-11) w terapii przeciwnowotworowej

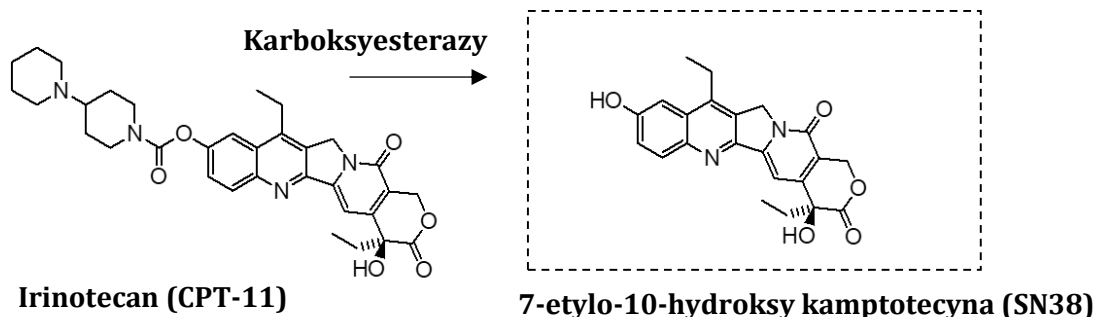
W 1996 roku FDA zarejestrowała irinotekan jako lek przeciwnowotworowy (Sears i wsp., 1999). Od tego czasu CPT-11 przyczynił się do skutecznej terapii pacjentów z zaawansowanymi rakami okrężnicy oraz guzami litymi, w tym niedrobnokomórkowym rakiem płuc, rakiem trzustki i dróg żółciowych, zaawansowanym rakiem żołądka i szyjki macicy (Rothenberg, 1996; Gerrits i wsp., 1997). Stosuje się go zarówno w monoterapii, ale najczęściej, jest łączony z innymi lekami cytotoksycznymi np. 5-fluorouracylem (Mehta i wsp., 2003; Guichard i wsp., 1998) czy oksalipaltyną (Goldwasser i wsp., 2000; Souglakos i wsp., 2004), oraz z lekami wykorzystującymi przeciwciała monoklonalne jak cetuksymab i bewacizumab (Ettlinger i wsp., 2006; Garufi i wsp., 2010; Chinnaiyan i wsp., 2012).

Historia irinotekanu sięga 1966 roku, kiedy to Wall i wsp. po raz pierwszy wyizolowali z orientalnego drzewa *Camptotheca acuminata* naturalny alkaloid – kamptotecynę (Wall i wsp., 1966). Związek ten, działając jako inhibitor topoizomerazy I, charakteryzuje się znaczącą aktywnością przeciwnowotworową w stosunku do wielu modeli nowotworów. Jednak z powodu istotnej toksyczności względem komórek prawidłowych (w szczególności jelit, pęcherza moczowego i szpiku kostnego) badania kliniczne nad tym związkiem szybko zostały zakończone (Schaeppi i wsp., 1974). Pod koniec lat 80. analogi kamptotecyny, o mniejszym potencjale toksycznym w stosunku do komórek prawidłowych, a jednocześnie nadal silnej aktywności przeciwnowotworowej, wzbudziły ponowne zainteresowanie naukowców, ze względu na zaobserwowaną nadekspresję topoizomerazy I w gruczolakoraku ludzkiego jelita grubego (Kehrer i wsp., 2001)

Irinotekan jest półsyntetyczną pochodną kamptotecyny (Rivory, 1996). Lek ten charakteryzuje się wieloetapową i złożoną farmakologią. Głównym celem jego działania jest hamowanie aktywności topoizomerazy I (TopoI), która odgrywa istotną rolę w zmniejszaniu napięcia torsyjnego DNA (Mathijssen i wsp., 2002). Topoizomerazy ściśle kontrolują stan topologiczny DNA w komórce, w związku z tym zahamowanie ich funkcjonowania prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy. Mechanizm działania irinotekanu, polega na jego przyłączeniu do kompleksów rozszczepialnych (DNA - topoizomeraza I) przez co tworzą się kompleksy trójskładnikowe: irinotekan-DNA-topoizomeraza I. Dochodzi wówczas do powstania dużej ilości pęknięć w niciach DNA, *in vitro*. Ich liczba koreluje z działaniem cytostatycznym chemioterapeutyku. Do pęknięć najczęściej dochodzi w regionach kodujących rRNA, ponieważ prawdopodobnie są one wolne od nukleosomów. Cięcia zachodzą w miejscu występowania sekwencji: 5'-d(APACTT↓AGAPAAAA/TA/T)-3' (gdzie P to dowolna puryna) (Martino i wsp., 2017). Proces ten może przebiegać zarówno podczas replikacji, kiedy to odnotowywane jest najwyższe stężenie TopoI w komórce (najwyższa wydajność procesu), ale i w czasie transkrypcji. W obu procesach dochodzi do kolizji odpowiednio: widełek replikacyjnych i polimerazy RNA, co powoduje szereg procesów prowadzących do zapoczątkowania apoptozy w fazie S (preferencyjnie) oraz w fazie G1, przy wyższym stężeniu irinotekanu. W obu procesach dochodzi do aktywacji genu *TP53* i akumulacji w jądrze białka TP53, co prowadzi do zahamowania proliferacji komórek, a także do syntezy białka Bax związanego z inicjacją apoptozy. Dodatkowo, podczas transkrypcji dochodzi do indukcji białka p21^{waf1/cip1} i zatrzymania proliferacji w fazie G1, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia częstych mutacji w genie *TP53* komórek nowotworowych. Badania potwierdzają wrażliwość takich komórek na inhibitory TopoI (Martino i wsp., 2017; Deptała i Omyła-Staszewska, 2003). Im wyższe stężenie topoizomeraz w komórce, tym większa wrażliwość komórek na działanie ich inhibitorów (Yue i wsp., 2021). Podwyższony poziom topoizomeraz obserwuje się

w komórkach proliferujących, zwłaszcza nowotworowych, w których poziom TopoI jest 14–16 razy wyższy niż w przylegających, prawidłowych komórkach śluzówki (Giovannella i wsp., 1989). Powstające podczas replikacji i transkrypcji DNA superskręcenia, w wyniku nacięcia ulegają relaksacji i ponownej ligacji pod wpływem działania TopoI. Mechanizm działania TopoI obejmuje przejściowe przerwanie jednej z dwóch nici DNA i utworzenie kowalencyjnego kompleksu topoizomerazy I-DNA, w którym TopoI jest połączona z końcem 3' struktury DNA. Irinotekan zapobiega ligacji DNA i uniemożliwia dysocjację TopoI od DNA, skutkiem czego jest powstawanie jednoniciowych pęknięć DNA. Działanie cytotoksyczne irinotekanu w komórkach ssaków *in vitro* jest swoiste dla fazy S cyklu komórkowego, gdyż charakteryzuje się ona wysokim stężeniem topoizomerazy (Charara i wsp., 2004; Martino i wsp., 2017; Yue i wsp., 2021; Bailly, 2019).

Spośród pochodnych kamptotecyny, CPT-11 wyróżnia się wyjątkową strukturą chemiczną, ze względu na obecność łańcucha bocznego przyłączonego do rdzenia. Boczny łańcuch 1,4'-piperydyny karboksylanu zlokalizowany w pozycji C-6, z grupą etylową w pozycji C-7 jest enzymatycznie odcinany przez karboksyesterazy, dając aktywny metabolit SN38 (Rycina 6). Ze względu na fakt, iż aktywność cytotoksyczna SN38 może osiągać wartości od 100 do nawet 1000 razy wyższe niż irinotekan, uważa się, że CPT-11 działa jako prolek SN38 (Martino i wsp., 2017; Yue i wsp., 2021; Paulík i wsp., 2020).



Rycina 6. Powstawanie SN38 w wyniku enzymatycznego cięcia CPT-11.

Zarówno CPT-11, jak i SN38 występują w organizmie w postaci dwóch izoform: laktonowej i karboksylanowej. Pomędzy tymi formami istnieje równowaga zależna od pH, jednak tylko forma laktonowa ma działanie przeciwnowotworowe, dlatego nawet niewielka zmiana pH (z kwaśnego na zasadowe) może zmienić farmakokinetkę i skuteczność irinotekanu. CPT-11 występuje w osoczu głównie w postaci karboksylanowej, natomiast SN38 w formie laktonowej (Paulík i wsp., 2020). Kliniczne działania CPT-11 są limitowane przez występowanie dotkliwych efektów ubocznych, głównie biegunki, neutropenii i astenii (Anthony, 2007).

I. 5.1. Oddziaływanie CPT-11 z suplementami diety

Problem interakcji między suplementami diety i konkretnymi lekami stosowanymi w onkologii nie należy do szeroko opisywanych w literaturze, zarówno w układzie *in vitro*, jak i *in vivo*.

Wyniki dotychczasowych badań wykazały, że stosowanie CPT-11 hamuje proliferację komórek, ale nie powoduje znaczącej regresji ludzkiego raka piersi (MCF-7) u myszy karmionych pokarmem zawierającym 7% oleju kukurydzianego. Jednakże, gdy dieta myszy z MCF-7 została uzupełniona 3% lub 6% olejem rybnym, podawanym podczas leczenia CPT-11, zaobserwowano istotną regresję komórek nowotworowych. Ponadto, ocena histomorfometryczna błony śluzowej jelit myszy, które były leczone CPT-11 i karmione pokarmami zawierającymi olej rybny, była w dużej mierze niezmienną w porównaniu do błony śluzowej myszy, które nie otrzymywały CPT-11 (Hardman i wsp., 1999).

Stwierdzono także, że kwasy omega-3 zawarte w diecie myszy leczonych CPT-11 wpływają na zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych w dwunastnicy oraz znaczne zmniejszenie liczby prozapalnych eikozanoidów (grupa związków organicznych będących produktami przemian nienasyconych kwasów tłuszczowych; zawierają 20 atomów węgla) w szczególności prostaglandyny E2 w wątrobie. Tym samym, zastosowanie kwasów omega-3 w diecie zmniejszyło efekty uboczne leczenia CPT-11 u myszy oraz chroniło śluzówkę jelita przed uszkodzeniami wywołanymi działaniem irinotekanu (Hardman i wsp., 2002).

Kolejnym przykładem oddziaływania suplementów diety z CPT-11 jest zastosowanie dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum L.*) w diecie szczurów leczonych irinotekaniem. Wykazano, że szczury leczone wyłącznie CPT-11 doświadczyły szybkiego spadku masy ciała, natomiast współdziałanie dziurawca zwyczajnego z CPT-11 powodowało mniejszy spadek masy ciała u zwierząt laboratoryjnych. Zarówno toksyczność żołądkowo-jelitowa, jak i hematologiczna po podaniu CPT-11 zostały złagodzone w obecności dziurawca zwyczajnego. Co więcej, dziurawiec istotnie poprawił toksyczność wywołaną przez CPT-11 (Hu i wsp., 2005).

Wykazano także, że niektóre suplementy diety o właściwościach przeciwutleniających mogą nasilać proapoptotyczne właściwości CPT-11 w ludzkich komórkach nowotworowych *in vitro*. Kontek i wsp., odnotowali wzrost poziomu uszkodzeń DNA po ekspozycji limfocytów krwi obwodowej pacjentów z nowotworem jelita grubego na działanie irinotekanu w obecności witaminy A (Kontek i wsp., 2010). Ponadto, zaobserwowano, że stałe stężenie melatoniny (50 μM) podawane jednocześnie z różnymi stężeniami irinotekanu (od 7,5 μM do 60 μM) powoduje wzrost poziomu migracji DNA w ogonach komet w komórkach HT29 (gruczolakorak jelita grubego) oraz A549 (niedrobnokomórkowy rak płuca) (Kontek

i Nowicka, 2013). Skojarzenie antyoksydantów tj. witamin A, C, E z irinotekanem wpłynęło również na znaczne zwiększenie procentu komórek apoptotycznych linii HT29 i A549 w porównaniu z serią bez antyoksydantów przy zachowaniu tych samych stężeń chemioterapeutyku (Kontek i wsp., 2014).

Przeprowadzone w prezentowanej pracy badania *in vitro* mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia roli związków o charakterze antyoksydacyjnym w czasie trwania chemioterapii, gdyż efekty ich suplementacji pozostają cały czas niejasne. Związki antyoksydacyjne, do których zaliczamy CAPE, nie tylko bezpośrednio uczestniczą w reakcjach wolnorodnikowych, ale również wpływają na przekazywanie sygnałów komórkowych, aktywność enzymów oraz ekspresję genów uczestniczących np. w procesach apoptozy i naprawy DNA. Mogą one wykazywać działanie synergistyczne, dzięki czemu możliwe stałoby się zmniejszenie dawki przyjmowanego leku, przy utrzymaniu efektu terapeutycznego na tym samym poziomie. Z drugiej strony, istnieje możliwość działania antagonistycznego, a w związku z tym, obniżenia działania chemioterapeutyków i skuteczności chemioterapii. Wiedza o wzajemnych oddziaływaniach antyoksydantów i innych składników odżywczych, także ksenobiotyków, w układach modelowych, a zwłaszcza w organizmie ludzkim jest bardzo potrzebna i służy bardziej racjonalnemu ich wykorzystaniu w diagnostyce i życiu codziennym człowieka.

Rozdział II

Cel pracy

II. CEL PRACY

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania zostały podzielone na dwa główne etapy badawcze:

- (I) ocena w warunkach *in vitro* wpływu aktywnego komponentu propolisu - CAPE na aktywność biologiczną komórek linii nowotworowych przewodu pokarmowego oraz
- (II) określenie w jakim stopniu CAPE może modulować toksyczność indukowaną przez irinotekan i jego metabolit SN38 w komórkach linii nowotworowych przewodu pokarmowego: raka żołądka (AGS), raka okrężnicy (HCT116) oraz gruczolakoraka jelita grubego (HT29 i Caco-2).

W niniejszej pracy, podstawą hipotezy badawczej i oczekiwanych rezultatów było założenie, czy CAPE charakteryzujący się aktywnością przeciwnowotworową, może modulować efekt cyto- i genotoksyczny wywoływany przez irinotekan oraz SN38.

Szczegółowe badania, wykonane w warunkach *in vitro*, miały na celu:

- ocenę stopnia cytotoksyczności CAPE w stosunku do badanych komórek, oraz ocenę wpływu CAPE na cytotoksyczność indukowaną CPT-11 i SN38
- ocenę stopnia genotoksyczności CAPE w stosunku do badanych komórek, oraz ocenę wpływu CAPE na genotoksyczność indukowaną CPT-11 i SN38
- analizę przebiegu cyklu komórkowego pod wpływem CAPE w komórkach badanych linii nowotworowych poddanych działaniu CPT-11 oraz SN38.
- ustaleniu rodzaju śmierci komórkowej indukowanej przez CAPE oraz analiza wpływu CAPE na rodzaj śmierci komórkowej indukowanej CPT-11 i SN38

Wszystkie przedstawione powyżej analizy zostały przeprowadzone w seriach doświadczalnych umożliwiających analizę porównawczą pomiędzy działaniem irinotekanu, SN38 i CAPE a układem CPT-11 lub SN38 w obecności CAPE w stosunku do komórek AGS, HCT116, HT29 i Caco-2. Zakładano, że uzyskane w badaniach wyniki będą stanowić fundament dla badań *in vivo*, mających na celu poznanie interakcji lek/suplement diety. Uzyskane wyniki pomogą w lepszym poznaniu aktywności biologicznej składnika propolisu jakim jest CAPE, zwłaszcza, że produkty oparte na propolisie, cieszą się dużą popularnością wśród pacjentów i są ogólnie dostępne.

Opisane w niniejszej pracy doświadczenia przeprowadzone zostały w układzie *in vitro* dlatego też mogą istnieć różnice w biodostępności i aktywności testowanych związków stosowanych w hodowli komórkowej a preparatami przyjmowanymi doustnie (*per os*). Jednakże tego typu badania, z całą pewnością przyczyniają się do lepszego poznania mechanizmów działania onkoterapeutyków w obecności antyoksydantów u pacjentów z chorobą nowotworową. .

Rozdział III

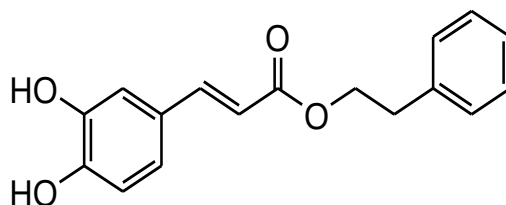
Materiał i metody

III. MATERIAŁ I METODY

III.1. Badane związki chemiczne

III.1.1. Ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE)

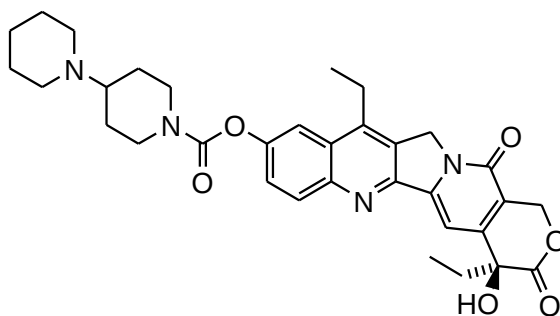
CAPE (Tokyo Chemical Industry; TCI, CAS no. 104594-70-9) jest związkiem należącym do grupy polifenoli, który posiada grupy hydroksylowe w obrębie pierścienia katecholowego. Wzór sumaryczny CAPE to $C_{17}H_{16}O_4$, a jego masa molowa wynosi 284,4 g/mol (Rycina 7). Wykorzystany w niniejszej pracy wzorzec CAPE został rozpuszczony w PBS, do końcowego stężenia 100 mM. Stock przechowywano w temperaturze 0 – 4°C, bez dostępu światła.



Rycina 7. Wzór strukturalny estru fenyloetylowego kwasu kawowego (CAPE).

III.1.2. Irinotekan (CPT-11)

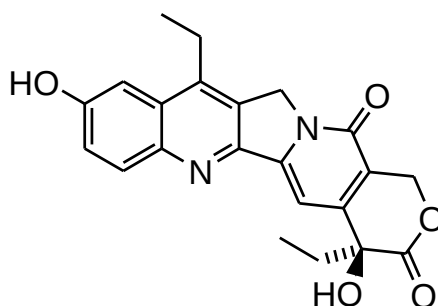
Irinotekan (synonimy: CPT-11, Camptosar®, Campto, Irinotesin) jest lekiem przeciwnowotworowym z grupy inhibitorów topoizomerazy I. Masa molowa CPT-11 wynosi 623,14 g/mol, natomiast jego wzór empiryczny to $C_{33}H_{38}N_4O_6 \cdot HCl$ (CAS no. 100286-90-6; Sigma-Aldrich) (Rycina 8). W przeprowadzonych seriach doświadczalnych irinotekan, został rozpuszczony w DMSO osiągając stężenie końcowe 100 mM (roztwór wyjściowy). Stężenie DMSO w badanych próbach nie przekraczało 0,5% i nie miało istotnego wpływu na żywotność badanych komórek (Da Violante i wsp., 2002). Roztwór wyjściowy przechowywano w temperaturze -20°C.



Rycina 8. Wzór strukturalny irinotekanu (CPT-11).

III. 1.3. SN38 – aktywny metabolit irinotekanu

Wzór sumaryczny SN38 to $C_{22}H_{20}N_2O_5$, a jego masa molekularna wynosi 392,4 g/mol (Tokyo Chemical Industry TCI, CAS no. 86639-52-3) (Rycina 9). Do przeprowadzonych badań, SN38 rozpuszczono w DMSO, którego końcowe stężenie w próbach badawczych nie przekraczało 0,5% i nie wpływało w istotny sposób na żywotność badanych komórek. Roztwór wyjściowy SN38 o stężeniu 1 mM przechowywano w temperaturze -20°C .



Rycina 9. Wzór strukturalny SN38.

III .2. Odczynniki chemiczne

III .2.1. Prowadzenie hodowli komórkowych oraz oznaczanie żywotności komórek

- Podłoże hodowlane DMEM (Biowest, CytoGen),
- Podłoże hodowlane DMEM z 4,5g/l glukozy (Biological Industries)
- Podłoże hodowlane RPMI (Biowest, CytoGen),
- Albumina surowicy wołowej (BSA, Biowest, CytoGen)

- 0,25% Trypsyna-EDTA (Biowest, CytoGen),
- Zestaw antybiotyków: penicylina/streptomycyna (Biowest, CytoGen),
- Aminokwasy (Sigma-Aldrich)
- PBS - roztwór buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (Biowest, CytoGen)
- Błękit trypanu (Sigma-Aldrich)

III. 2.2. Test MTT

- MTT (Sigma-Aldrich)
- DMSO (BioShop)
- Roztwór soli fizjologicznej (Biowest, CytoGen)

III. 2.3. Test kometowy

- NaOH (CHEMPUR)
- EDTA(CHEMPUR)
- NaCl (Polskie Odczynniki Chemiczne)
- Sól sodowa N-laurosarkozyłu (Sigma-Aldrich)
- Tris-HCl (Sigma-Aldrich)
- Triton® X-100 (Sigma-Aldrich)
- DAPI (Sigma-Aldrich)
- Agaroza LMP (Sigma-Aldrich),
- Agaroza NMP (Sigma-Aldrich)

III. 2.4. Oznaczenia poziomu stresu oksydacyjnego

- Dioctan dichlorofluorescyny H₂DCFDA
- H₂O₂ (Polskie Odczynniki Chemiczne)
- PBS (Biowest, CytoGen)

III. 2.5. Oznaczenia aktywności proapoptotycznej

- ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega Corporation)
- Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa® Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry (Invitrogen; ThermoFisher Scientific)

III. 2.6. Badania cyklu komórkowego

- Jodek propidyny (Sigma-Aldrich)
- Roztwór RNazy, 50 U/mg (Sigma-Aldrich)
- Etanol 96% (Polskie Odczynniki Chemiczne).

III. 3. Aparatura i sprzęt

III. 3.1. Jałowy sprzęt jednorazowego użytku

- naczynia hodowlane o powierzchni 25 cm² z filtrem
- płytki 96-dołkowe (Thermo Fisher Scientific; Greiner Bio-One)
- płytki 6-dołkowe (Thermo Fisher Scientific)
- probówki typu Eppendorf
- falkony o pojemności 15 ml i 50 ml
- końcówki do pipet automatycznych

III. 3.2. Aparatura

- wielofunkcyjny czytnik mikropłytek Spectra Max i3 Platform® (Molecular Devices®) – ocena poziomu stresu oksydacyjnego, analiza właściwości proapoptotycznych
- cytometr przepływowy BDUS LSR II (Becton Dickinson) – analiza cyklu komórkowego, analiza właściwości proapoptotycznych
- czytnik mikropłytek 96-dołkowych Biotek PowerWave HT (Biotek Instruments) – test MTT,
- mikroskop z odwróconym obiektywem MW 50 (OPTA-TECH) – obserwacje mikroskopowe, ocena żywotności komórek
- mikroskop fluorescencyjny BX60 (Olympus) z kamerą cyfrową (Olympus) – analiza testu kometowego, dokumentacja fotograficzna

III. 2. Materiał badawczy

Komórki linii nowotworowych przewodu pokarmowego:

- AGS (ludzka linia komórek nabłonkowych, gruczołakoraka żołądka),
- HT29 (ludzka linia komórek gruczołakoraka jelita grubego),
- HCT116 (ludzka linia komórek nabłonkowych, gruczołakoraka jelita grubego),
- Caco-2 (ludzka linia komórek nabłonkowych, gruczołakoraka jelita grubego).

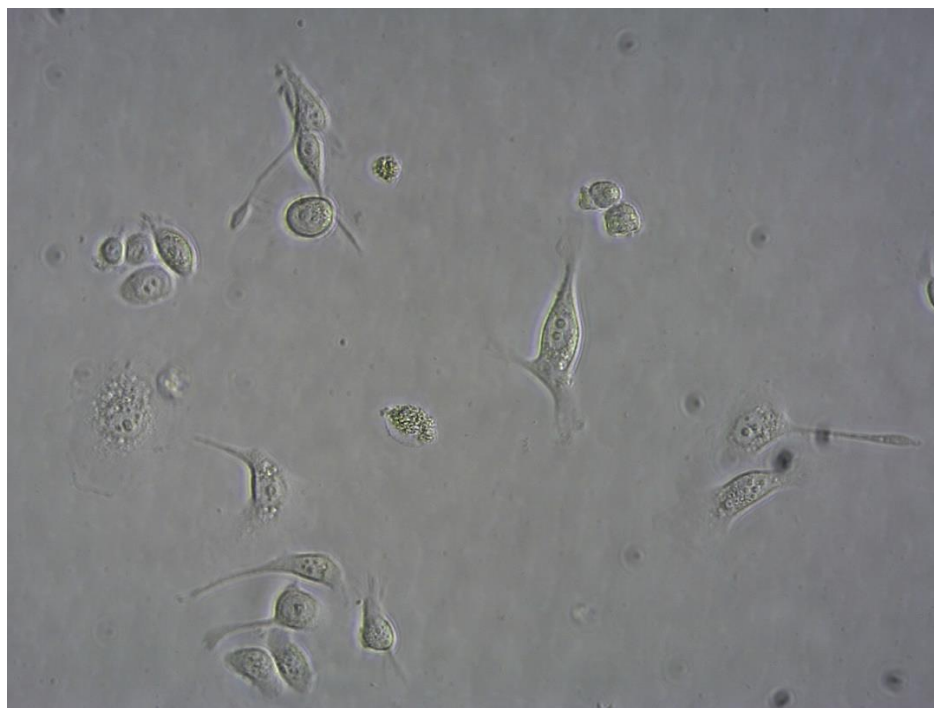
Linie komórkowe: AGS, HT29, HCT116 wykazują odmienne profile genetyczne, co pozwoliło uzyskać zróżnicowane odpowiedzi biologiczne na zastosowane układy doświadczalne. Z kolei, linia komórkowa Caco-2, wykazuje wysoki stopień podobieństwa do prawidłowych komórek nabłonka jelit, przez co jest zalecanym modelem referencyjnym w badaniach bioaktywności związków chemicznych mogących znaleźć zastosowanie w farmacji i w medycynie (Grajek i wsp., 2006).

Linia komórkowa AGS

Linia komórek nabłonkowych, gruczolakoraka żołądka (linia komórkowa AGS) pochodzi z fragmentów guza wyciętego w 1979 roku od 54-letniej kobiety rasy kaukaskiej (Rycina 10). Komórki linii AGS rosną w monowarstwie, a ich kariotyp określany jest jako hiperdiploidalny, którego średnia liczba chromosomów wynosi 49 w 60% komórek. Linia ta posiada mutacje w genach: *CDH1*, *CTNNB1*, *KRAS*, *PIK3CA*. Komórki tej linii są trwale zakażone wirusem paragrypy typu 5 (PIV5) (strona internetowa 2).

Hodowlę komórek AGS prowadzono w płynie hodowlanym RPMI 1640 z dodatkiem 10% inaktywowanej (56°C, 30 min) bydlęcej surowicy płodowej oraz 1% roztworem antybiotyków (penicyliny i streptomycyny).

Naczynia hodowlane o pojemności 25 cm², z komórkami linii AGS w podłożu hodowlanym zostały umieszczone w inkubatorze w temperaturze 37°C, z regulowaną atmosferą gazów wynoszącą 5% CO₂, co imituje stężenie tego gazu we krwi. W inkubatorze utrzymywano wilgotność na poziomie >95%, co zabezpieczało hodowlę komórkową przed wysychaniem.



Rycina 10. Komórki linii AGS (mikroskop odwrócony, powiększenie obiektywu 20x).

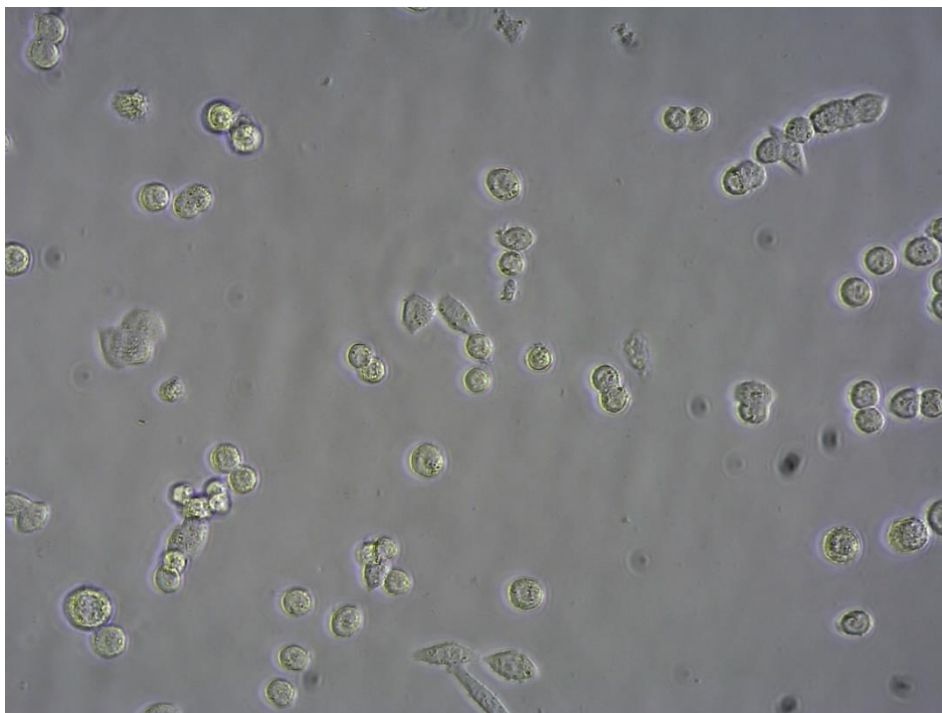
Linia komórkowa HT29

Linia HT29 została wyprowadzona, metodą hodowli eksplantacyjnej, z guza pierwotnego 44-letniej kobiety rasy kaukaskiej w 1964 r. Średnia liczba chromosomów jest hipertriploidalna, o zakresie od 68 do 72 chromosomów. Chromosom 13 jest nullisomiczny, natomiast chromosomy 8 i 14 są zasadniczo monosomiczne. Analiza prążków metodą Q wykazała brak obecności chromosomu Y. Linia ta wykazuje ekspresję onkogenów *C-myc*, *K-ras*, *H-ras*, *N-ras*, *Myb*, *sis* i *fos*. W komórkach linii HT29 dochodzi do mutacji punktowej, w której guanina zostaje zastąpiona adeniną w kodonie 273 genu *TP53*, co powoduje zmianę argininy na histydynę, w konsekwencji prowadząc do nadprodukcji antygenu TP53. Linia HT29 posiada także mutacje w genach: *APC*, *BRAF*, *PIK3CA*, *SMAD4* (strona internetowa 3).

Morfologia komórek linii HT29 jest charakterystyczna dla komórek nabłonkowych, jednak nie różnicują się do form tworzących rąbek szczoteczkowy. Znaczną frakcję komórek HT29 stanowią komórki kubkowe, wydzielające duże ilości śluzu jelitowego. Do cech ultrastrukturalnych charakterystycznych dla komórek HT29 należą: mikrokosmki, mikrofilamenty i duże mitochondria, siateczka śródplazmatyczna z wolnymi rybosomami, krople tłuszczu i duża liczba lizosomów (Rycina 11). Komórki HT29 wytwarzają receptor dla witaminy D i urokinazy oraz wykazują wrażliwość na wirusy HIV i LAV (strona internetowa 3).

Do hodowli komórek HT29 wykorzystano pożywkę RPMI 1640 suplementowaną 10% inaktywowaną surowicą bydlęcą, 1% antybiotyków (penicylina, streptomycyna) oraz zestawem aminokwasów (1%).

Komórki linii HT29 hodowano w butelkach hodowlanych o pojemności 25 cm² w inkubatorze w temperaturze 37°C, w 5% CO₂. W inkubatorze utrzymywano wilgotność na poziomie >95%.



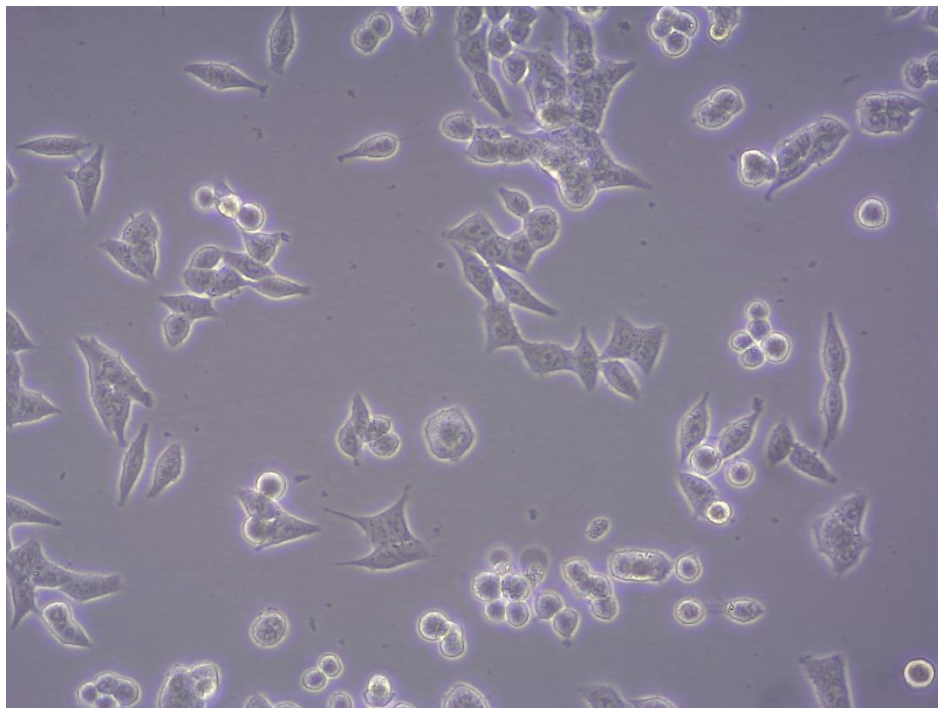
Rycina 11. Komórki linii HT29 (mikroskop odwrócony, powiększenie obiektywu 20x).

Linia komórkowa HCT116

Komórki linii HCT116 zostały pozyskane z guza 48-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej (Rycina 12). Średnia liczba chromosomów w komórkach tej linii wynosi 45 i dotyczy 62% komórek. Obserwacje, przy użyciu barwienia na prążki G, ujawniły obecność chromosomu Y w 50% komórek. W komórkach linii HCT116 zaobserwowano mutacje w genach *KRAS* i *PIK3CA* (strona internetowa 4).

Hodowlę komórek HCT116 prowadzono w medium hodowlanym DMEM wzbogaconym 10% inaktywowaną surowicą płodową oraz 1% roztworem antybiotyków (streptomycyny/penicyliny). Gęstość komórek HCT116 wykorzystana we wszystkich przeprowadzonych seriach doświadczalnych oraz kolejnych pasażach została przedstawiona w Tabeli 2.

Hodowle komórek HCT116 prowadzono w inkubatorze przy 5% stężeniu CO₂, temperaturze 37°C oraz wilgotność na poziomie >95%.



Rycina 12. Komórki linii HCT116 (mikroskop odwrócony, powiększenie obiektywu 20x).

Linia komórkowa Caco-2

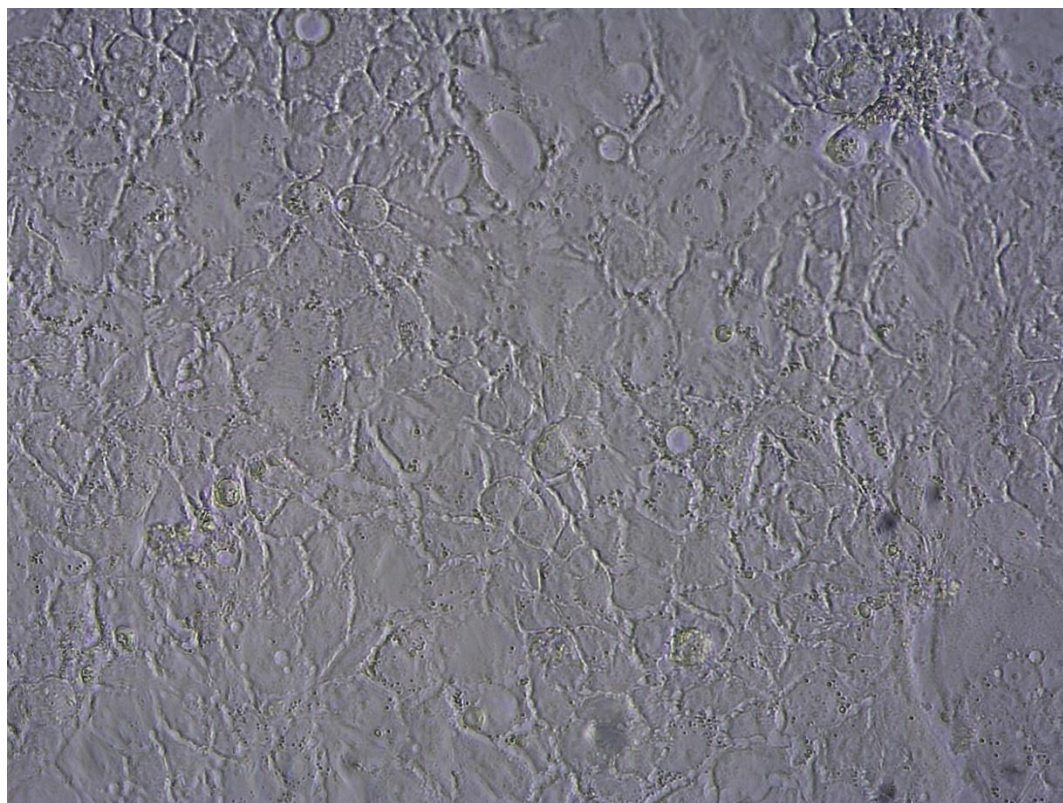
Linia komórkowa Caco-2 została wyprowadzona z guza 72-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej. Średnia liczba chromosomów w komórkach tej linii wynosi 96 i występuje w 16% komórek (strona internetowa 5).

Linia komórek Caco-2 odzwierciedla morfologię i fizjologię prawidłowych enterocytów jelitowych, dzięki czemu jest wykorzystywana w badaniach jako referencyjna linia komórek nabłonka jelitowego. W czasie prowadzenia hodowli linia Caco-2 przechodzi proces spontanicznego różnicowania, w wyniku którego, po trzech tygodniach hodowli, przy pełnej konfluencji, utworzy monowarstwę wysoko spolaryzowanych komórek, o budowie typowej dla enterocytów, z jądrem w części podstawnej, gęstymi mitochondriami i rąbkem szczoteczkowym w części szczytowej. Komórki Caco-2 wytwarzają enzymy (disacharydazy i peptydazy, transferazę-S-glutationową, izoenzymy CYP450, glukuronidazę i sulfotransferazę) oraz białka transportowe, syntetyzowane przez komórki absorbujące nabłonka, biorące udział w transporcie cukrów, aminokwasów, peptydów i witamin. Dzięki temu, komórki Caco-2 wykazują funkcjonalne podobieństwo do nabłonka jelita cienkiego, imitując naturalne warunki *in vivo* przewodu pokarmowego. Specyficzne właściwości komórek Caco-2 wynikają ze zdolności ich różnicowania się w komórki zbliżone morfologicznie i fizjologicznie do prawidłowych komórek jelita

(enterocytów) pod wpływem czynników indukujących. Dlatego też, model komórek Caco-2 znalazł zastosowanie do badania wchłaniania białek, lipidów, cukrów, jonów metali, witamin, przeciwutleniaczy, mykotoksyn i innych składników żywności (Grajek i wsp., 2006).

Hodowlę komórek linii Caco-2 (Rycina 13) prowadzono w płynie hodowlanym DMEM z wysoką zawartością glukozy, suplementowanym 10% inaktywowaną płodową surowicą bydlęcą oraz 1% roztworem streptomycyny i penicyliny.

Naczynia hodowlane o pojemności 25 cm², z komórkami linii Caco-2 przechowywano w inkubatorze w temperaturze 37°C, z regulowaną atmosferą gazów tak, aby znajdowały się one w 5% CO₂. W inkubatorze utrzymywano wilgotność na poziomie >95%.



Rycina 13. Komórki linii Caco-2 (mikroskop odwrócony, powiększenie obiektywu 20x).

III. 3. Metody

III. 3.1. Pasaż komórek

Komórki linii HT29, AGS, HCT116 i Caco-2 utrzymywano w fazie logarytmicznego wzrostu poprzez ich regularne pasażowanie do nowych butelek hodowlanych przed osiągnięciem stanu konfluencji.

Pasaż komórek przeprowadzano w sterylnych warunkach komory laminarnej, z zachowaniem zasad dobrej praktyki laboratoryjnej i przy użyciu najwyższej jakości sprzętu jednorazowego użytku.

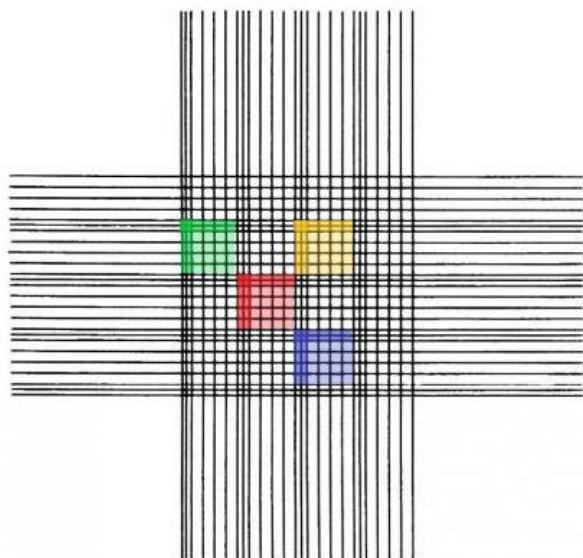
Monowarstwę komórek delikatnie przemywano jałowym PBS, po uprzednim usunięciu zużytego medium z butelki hodowlanej. Następnie, komórki traktowano roztworem 0,25% trypsyny w 0,025% roztworze kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA), przez 3 – 5 minut w temperaturze 37°C. Działanie proteazy powoduje rozpuszczenie kolagenu i oddzielenie się pojedynczych komórek, zarówno od siebie, jak i od dna naczynia hodowlanego. Po ww. czasie, aktywność trypsyny blokowano dodając pełne podłoże hodowlane odpowiednie dla danej linii komórkowej. Proces trypsynizacji komórek kontrolowano przy użyciu mikroskopu odwróconego. Każdorazowo, po trypsynizacji obliczano gęstość komórek w 1 ml zawiesiny przy użyciu komory Thoma. Pod mikroskopem zliczano komórki z 4 dowolnych kwadratów ograniczonych potrójnymi liniami (Rycina 14). Następnie gęstość komórek obliczano według wzoru:

$$c = \frac{n}{l} \times 10^4 \times r \text{ [liczba komórek/ml]}$$

gdzie:

n – suma zliczonych komórek

l – liczba pól, z których zliczano komórki



Rycina 14. Obraz prostokątnych linii komory hemocytometru, które dzielą obszar na komórki pomiarowe/zliczeniowe. Kolorem żółtym, zielonym, czerwonym i niebieskim przedstawiono obszar, z którego zliczano komórki (obszar środkowy oraz obszar 2 potrójnych linii). Komórki zliczano zawsze z tych samych pól, aby uzyskać jak najwyższą powtarzalność wyników.

Tabela 2. Gęstość komórek AGS, HT29, HCT116 i Caco-2 zastosowana w pasażach oraz poszczególnych seriach doświadczalnych

Metoda	Gęstość komórek linii AGS, HT29, HCT116 i Caco-2 [liczba komórek w 1 ml medium hodowlanego]
Pasaż	6×10^4 - 8×10^4
Analiza cytotoksyczności – test MTT	6×10^5
Ocena genotoksyczności – test kometowy	$1,2 \times 10^5$
Badanie poziomu stresu oksydacyjnego	6×10^5
Badanie apoptozy – cytometr przepływowy	$3,5 \times 10^5$
Badanie apoptozy i aktywności kaspazy 3/7 – Apo-Tox Glo Assay	2×10^5 - 4×10^5
Analiza cyklu komórkowego – cytometr przepływowy	2×10^5 - 3×10^5

III. 3.1.1. Ocena żywotności komórek roztworem błękitu trypanu

- Zasada testu**

Żywotność komórek w hodowli poddawano ocenie, rozcieńczając zawiesinę komórek w roztworze wodnym błękitu trypanu (4% w/v). Roztwór ten w fizjologicznych warunkach wykazuje anionowy charakter, dzięki czemu nie wnika do żywych komórek ze względu na ujemny ładunek nieuszkodzonej błony. Błękit trypanu przenika jedynie do cytoplazmy komórek martwych, których ciągłość błony komórkowej została naruszona, barwiąc je na kolor ciemnoniebieski.

- **Przebieg doświadczenia**

Zawiesinę komórkową (20 μ l) mieszano z roztworem barwnika w stosunku 1:1 i inkubowano przez 3 – 4 minuty. Następnie, mieszaninę nanoszono na szkiełko mikroskopowe i przykrywano ją szkiełkiem nakrywkowym. Komórki zliczano w mikroskopie świetlnym (Nikon) pod powiększeniem obiektywu 10x, przy użyciu sumatora hematologicznego. Z jednej próby doświadczalnej zliczano min. 500 komórek (martwe-niebieskie, żywe-niezabarwione), a następnie obliczono procent (%) martwych komórek w hodowli.

III. 3.2. Analiza cytotoksyczności

III. 3.2.1. Oznaczenie aktywności metabolicznej komórek testem MTT

- **Zasada testu**

Test MTT to kolorymetryczna metoda stosowana do ilościowego oznaczania aktywności metabolicznej komórek (Kumar i wsp., 2018). Jest szeroko rozpowszechniona do oszacowania efektu cytotoksycznego substancji chemicznych względem różnych typów komórek. Dla większości żywych komórek aktywność mitochondrialna jest stała, tym samym wzrost lub spadek liczby komórek aktywnych metabolicznie może być markerem służącym ocenie stopnia cytotoksyczności testowanego związku w badanym modelu biologicznym. Zasada testu MTT polega na redukcji żółtej, rozpuszczalnej w wodzie, soli tetrazolowej MTT (3-(4,5-dimetylotiazolil-2)-2,5-bromek difenylotetrazoliowy) przez dehydrogenazę bursztynianową aktywnych metabolicznie komórek, co prowadzi do powstania fioletowego, nierozpuszczalnego w wodzie formazanu. Ilość formazanu mierzona spektrofotometrycznie, w ściśle określonych warunkach, jest wprost proporcjonalna do liczby aktywnych metabolicznie komórek. Poziom cytotoksyczności badanych związków oceniano przez określenie stężenia, które indukuje standardową odpowiedź biologiczną, przejawiającą się w zahamowaniu stopnia aktywności metabolicznej badanych komórek. Ocenę stopnia cytotoksyczności testowanych związków wykonano zgodnie z wytycznymi zawartymi w protokole PN-EN ISO10993-5:2009 (ISO, 2009) służącym do oceny cytotoksyczności preparatów medycznych. Na podstawie wartości absorbancji obliczano wartość IC_{50} czyli stężenie związku, które powoduje spadek żywotności komórek (aktywnych metabolicznie) o 50% procent w hodowlach z badanymi związkami w porównaniu z komórkami kontrolnymi hodowanymi w podłożu wolnym od testowanych związków, arbitralnie przyjętymi jako 100%.

- **Przebieg doświadczenia**

Komórki w objętości 100 μ l/dołek hodowano w jałowych, bezbarwnych 96-dołkowych mikropłytkach przez 24 godziny w odpowiednim podłożu hodowlanym, a następnie inkubowano z różnymi stężeniami badanych związków (Tabela 3). Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane w tych samych warunkach, lecz bez testowanych związków w podłożu hodowlanym. Komórki linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2 inkubowano z testowanymi związkami przez 72 h w inkubatorze w 37°C, 5% CO₂ i przy 95% wilgotności. Po tym czasie, 20 μ l roztworu MTT o stężeniu 5 mg/ml (rozpuszczonego w jałowym PBS) rozporcjowano do każdego dołka i inkubowano przez kolejne 4 h w tych samych warunkach. Następnie, usuwano roztwór MTT z płytek, a wytworzone kryształy formazanu rozpuszczono w DMSO (100 μ l/dołek). Absorbancję mierzono przy użyciu spektrofotometru PowerWave XS (Biotek) przy długości fali λ = 595 nm. Eksperyment przeprowadzano w trzech, niezależnych powtórzeniach dla każdej badanej linii komórkowej.

Tabela 3. Zastosowane stężenia związków w teście MTT

Komórki: HCT116, HT29, AGS, Caco-2		
CAPE	CPT-11	SN38
0,5 μ M	5 μ M	0,25 μ M
5 μ M	10 μ M	0,5 μ M
10 μ M	15 μ M	1 μ M
50 μ M	30 μ M	5 μ M
100 μ M	60 μ M	10 μ M
200 μ M	100 μ M	15 μ M
300 μ M		
400 μ M		
500 μ M		

III. 3.2.2. Oznaczenie synergizmu/antagonizmu pomiędzy badanymi związkami

- **Zasada oznaczeń**

Działanie dwóch związków/leków uważa się za synergistyczne jeśli końcowy efekt ich aktywności jest większy, niż suma dwóch oddzielnych efektów (efekt addycyjny). Przeciwnieństwem synergizmu jest działanie antagonistyczne, które oznacza, że współdziałanie dwóch związków jest mniejsze od sumy działania dwóch leków podawanych osobno. Aby określić efekt działania CPT-11 lub SN38 w obecności CAPE, obliczano stosunek oczekiwanej liczby komórek (n_e) do liczby komórek obserwowanych (n_o) (Lin i wsp., 2012). Wynik > 1 oznaczał efekt synergistyczny między lekiem czy jego metabolitem a CAPE, podczas gdy wynik < 1 świadczył o efekcie antagonistycznym.

- **Przebieg doświadczenia**

Do oceny efektu synergistycznego/antagonistycznego testowanych związków wykorzystano test MTT, analogicznie jak w przypadku oceny cytotoksyczności, jednak badane związki podawano razem do medium hodowlanego. W doświadczeniu wykorzystano stężenia CAPE odpowiadające wartościom IC_{50} wyznaczonym dla poszczególnych linii komórkowych. Z kolei, stężenia irinotekanu wynosiły od $5 \mu M$ – $100 \mu M$ dla każdej linii komórkowej, a SN38 od $0,25 \mu M$ – $15 \mu M$ (Tabela 4). Komórki inkubowano ze związkami przez 72 godziny, w temperaturze $37^\circ C$, 95% wilgotności i 5% CO_2 . Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane w medium wolnym od testowanych związków. Doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach dla każdej linii komórkowej.

Tabela 4. Układy doświadczalne zastosowane do oceny efektu synergistycznego lub antagonistycznego: CPT-11 w obecności CAPE oraz SN38 w obecności CAPE.

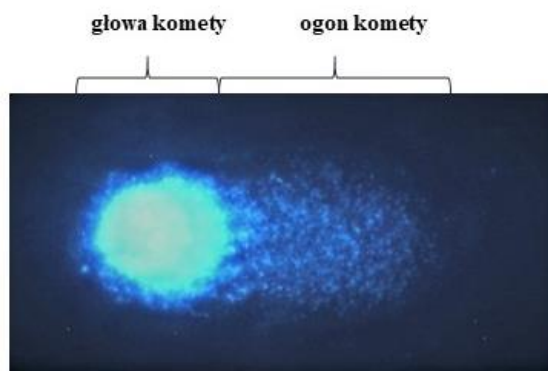
Stężenie CPT-11	Stężenie CAPE [IC ₅₀ wyznaczone dla danej linii]			
	HCT116	HT29	AGS	Caco-2
5 μM	+8 μM	+24 μM	+8 μM	+55 μM
10 μM				
15 μM				
30 μM				
60 μM				
100 μM				
Stężenie SN38				
0,25 μM	+8 μM	+24 μM	+8 μM	+55 μM
0,5 μM				
1 μM				
5 μM				
10 μM				
15 μM				

III. 3.2. Analiza genotoksyczności

III. 3.2.1. Test kometowy

- **Zasada testu**

Test kometowy (ang. *Comet Assay*) służy do oceny stopnia uszkodzeń DNA powstałych pod wpływem czynnika uszkadzającego oraz monitorowania kinetyki naprawy DNA. Zasada testu kometowego opiera się na unieruchomieniu komórek w żelu agarozowym na szkiełku mikroskopowym, a następnie ich lizie. Powoduje to uwolnienie DNA w formie superskręconych pętli, połączonych z macierzą jądrową. W wyniku przyłożonego napięcia, pofragmentowane, ujemnie naładowane nici DNA o niskiej masie cząsteczkowej, wędrują w kierunku anody (+), powodując powstanie tzw. „ogona” komety. „Głowa” komety składa się z DNA o wysokiej masie cząsteczkowej, nieuszkodzonego, związanego z macierzą jądrową. Im dłuższy „ogon”, tym większy stopień uszkodzeń DNA (Rycina 15) (Jałoszyński, 2008).



Rycina. 15. *Obraz komety uzyskany po 24 h inkubacji komórek HT29 z irinotekanem (DAPI, pow. 40x)*

W niniejszej pracy została wykorzystana wersja alkaliczna testu kometowego (pH 13), która pozwala na detekcję pęknięć jednoniciowych DNA (SSB), pęknięć dwuniciowych DNA (DSB), miejsc zasadowo-labilnych (ALS) oraz miejsc AP (A-purynowe lub A-pirymidynowe) (Liao i wsp., 2009).

- **Przebieg doświadczenia**

Test kometowy przeprowadzono, zgodnie z procedurą opisaną przez Singha i wsp. (1988) z modyfikacjami (Kontek i wsp., 2010). Komórki linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2 (2 ml/dołek) hodowano w 6-dołkowych płytkach przez 24 godziny w odpowiednim podłożu hodowlanym (37°C, 95% wilgotności, 5% CO₂). Następnie, inkubowano je z testowanymi związkami, w tych samych warunkach, przez kolejne 24 h. Zastosowane w teście kometowym stężenia CAPE, CPT-11, SN38, CPT-11+CAPE i SN38+CAPE dla poszczególnych linii komórkowych przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Serie doświadczalne zastosowane w teście kometowym

	HCT116	HT29	AGS	Caco-2
CAPE	8 μ M (IC ₅₀)	24 μ M (IC ₅₀)	8 μ M (IC ₅₀)	55 μ M (IC ₅₀)
CPT-11	4,5 μ M (IC ₅₀)	8,5 μ M (IC ₅₀)	8 μ M (IC ₅₀)	30 μ M (IC ₅₀)
CPT 11+CAPE	4,5 μ M + 8 μ M	8,5 μ M + 24 μ M	8 μ M + 8 μ M	30 μ M + 55 μ M
SN38	0,5 μ M (IC ₅₀)	0,3 μ M (IC ₅₀)	0,8 μ M (IC ₅₀)	5 μ M (IC ₅₀)
SN38+CAPE	0,5 μ M + 8 μ M	0,3 μ M + 24 μ M	0,8 μ M + 8 μ M	5 μ M + 55 μ M

Po inkubacji, komórki trypsynizowano, a otrzymaną zawiesinę wirowano przy 1400 obrotach/min w temperaturze 4°C – 6°C, przez 10 minut. Następnie, 25 μ l zawiesiny komórkowej zmieszano z 50 μ l 0,8% agarozы o niskiej temperaturze topnienia (LMP) rozpuszczonej w PBS (pH 7,4). Z tak przygotowanej mieszaniny pobrano 50 μ l i nakładano na szkiełka podstawowe, które wcześniej opłaszczono 0,5% agarozą o normalnej temperaturze topnienia (NMP). W celu umożliwienia całkowitej polimeryzacji agarozы, szkiełka z naniesionymi komórkami przykryto szkiełkami nakrywkowymi i umieszczono na lodzie, przez ok. 10 min, przy ograniczonym dostępie światła. Wszystkie kolejne etapy testu kometowego przeprowadzone zostały w ciemni. Szkiełka nakrywkowe delikatnie usunięto, po czym preparaty inkubowano w 4°C przez 1 godzinę w buforze lizującym (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% N-laurylosiarczan sodowy, 10 mM Tris, pH 10), który degraduje RNA oraz denaturuje białka macierzy jądrowej. Po lizie komórek, szkiełka przepłukano dwukrotnie w buforze rozwijającym (10 M NaOH, 0,2 M EDTA, pH > 13), dzięki czemu DNA zostało zdenaturowane, a RNA, które pozostało po etapie lizy, uległo całkowitej degradacji. Preparaty pozostawiono w buforze rozwijającym na 40 minut, w temperaturze 4°C, z ograniczonym dostępem światła (ciemnia). Następnie, przeprowadzono elektroforezę w temperaturze 4°C, przez 25 minut przy natężeniu pola elektrycznego wynoszącym 300 mA i napięciu 25 V. W kolejnym etapie testu, szkiełka umieszczono na 10 minut w buforze neutralizującym zawierającym 0,4 M Tris-HCl (pH 7,5). Następnie szkiełka przepłukano wodą destylowaną i pozostawiono do wyschnięcia. Przed przystąpieniem do analizy mikroskopowej, preparaty wybarwiono barwnikiem DAPI o stężeniu 1 μ g/ml przez 1 godzinę w 4°C. Analizę prób przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus BX60F5), przy długości fali λ =360 nm. Obrazy zapisano w programie komputerowym Analysis Soft Imaging. Z każdej próby zliczono minimum 50 komórek, które następnie analizowano za pomocą programu CASP (Końca i wsp., 2003). Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane w podłożu hodowlanym wolnym od testowanych związków. Dla każdej badanej linii komórkowej przeprowadzano trzy niezależne powtórzenia eksperymentu.

III. 3.3. Badanie poziomu stresu oksydacyjnego

- **Zasada testu**

Sondy fluorescencyjne są wykorzystywane do monitorowania, w czasie rzeczywistym, powstających w komórce reaktywnych form tlenu (RFT). W niniejszej pracy zastosowano sondę H₂DCFDA (diocetan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny), która szybko i skutecznie wykrywa oksydanty wewnątrz komórek, których błona komórkowa została nieuszkodzona. H₂DCFDA swobodnie przechodzi przez błonę plazmatyczną do cytozolu, gdzie ulega hydrolizie do anionu karboksylowego H₂DCF (2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny), którego utlenienie powoduje powstanie fluorescencyjnego produktu 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF). Utlenianie H₂DCF do DCF jest reakcją dwuetapową, w której najpierw powstaje rodnik DCF, utleniany w kolejnym etapie przez cząsteczkowy tlen do fluorescencyjnego produktu (DCF). Tworzenie DCF jest indukowane również przez rodniki hydroksylowe, węglanowe, a także dwutlenek azotu. Co ważne, H₂O₂ nie reaguje bezpośrednio z H₂DCF, gdyż wymaga obecności peroksydaz (np. peroksydazy chrzanowej) (Oparka i wsp., 2016).

- **Przebieg doświadczenia**

Komórki linii nowotworowych hodowano w odpowiednim podłożu (100 µl), w czarnych 96-dołkowych mikropłytkach hodowlanych. Gdy komórki osiągnęły 90% stanu konfluencji usunięto podłoże hodowlane, które zastąpiono 20 mM H₂DCFDA (rozpuszczonym w jałowym PBS). Całość inkubowano przez 20 min. Następnie, przeprowadzono **2 serie eksperymentalne**:

I) obejmowała 30-minutową inkubację z CAPE, a następnie, w chwili rozpoczęcia pomiaru, dodano 2 mM H₂O₂ – zastosowany w niniejszej pracy skrót: preinkubacja CAPE + inkubacja 2 mM H₂O₂ (Tab. 6).

II) obejmowała 30-minutową preinkubację z 2 mM H₂O₂, po której w momencie rozpoczęcia pomiaru dodano CAPE w stężeniach opisanych w Tabeli 6 – zastosowany w niniejszej pracy skrót: preinkubacja 2 mM H₂O₂ + inkubacja CAPE

W przypadku każdej serii eksperymentalnej zastosowano następujące kontrole:

1. kontrolę negatywną – komórki zawieszone w PBS-ie

2. kontrole pozytywne (dodane w zależności od serii doświadczalnej): CAPE (stężenie równe wartości IC₅₀ wyznaczone dla danej linii nowotworowej) oraz 2 mM H₂O₂.

Eksperyment wykonano w trzech, niezależnych powtórzeniach dla każdego rodzaju linii komórkowej. Fluorescencję mierzono w odstępach 15 minutowych przez 120 min przy długości fali wzbudzenia 485 nm i emisji 535 nm.

Tabela 6. Zastosowane serie doświadczalne w ocenie poziomu stresu oksydacyjnego.**Seria I – preinkubacja z CAPE + inkubacja z 2mM H₂O₂**

Preinkubacja 30 min	Rozpoczęcie pomiaru
-	Kontrola negatywna (PBS)
-	Kontrola pozytywna 2 mM H ₂ O ₂
Kontrola pozytywna IC ₅₀ CAPE	-
½ IC ₅₀ CAPE	2 mM H ₂ O ₂
IC ₅₀ CAPE	2 mM H ₂ O ₂
2 x IC ₅₀ CAPE	2mM H ₂ O ₂

Seria II – preinkubacja z 2 mM H₂O₂ + inkubacja z CAPE

Preinkubacja 30 min	Rozpoczęcie pomiaru
-	Kontrola negatywna (PBS)
-	Kontrola pozytywna IC ₅₀ CAPE
Kontrola pozytywna 2 mM H ₂ O ₂	-
2 mM H ₂ O ₂	½ IC ₅₀ CAPE
2 mM H ₂ O ₂	IC ₅₀ CAPE
2 mM H ₂ O ₂	2 x IC ₅₀ CAPE

III. 3.4. Analiza przebiegu cyklu komórkowego i jego poszczególnych faz

- Zasada testu**

Analizę cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometru przepływowego przeprowadzono przy użyciu jodku propidyny (PI), który interkaluje do dwuniciowego DNA, tworząc silnie fluorescencyjny addukt. Wiązanie DNA-PI jest stechiometryczne, a zatem intensywność fluorescencji odpowiada ilości DNA, różnej dla poszczególnych faz cyklu komórkowego. Najmniej DNA zawierają komórki nie dzielące się, będące w fazie G₀ lub G₁ cyklu komórkowego. Natomiast, najwyższą zawartością DNA charakteryzują się komórki w fazie G₂ i M (mitozy), o podwojonej ilości DNA. W fazie S cyklu komórkowego ilość DNA jest zawsze większa niż w komórkach diploidalnych, jednak nie przekracza wartości charakterystycznej dla komórek będących w fazie G₂ i mitozy.

- Przebieg doświadczenia**

Komórki linii AGS, HCT116, HT29 i Caco-2 hodowano przez 24 h przed rozpoczęciem eksperymentu w 6-dołkowych płytkach, w objętości 2 ml zawiesiny/dołek. Następnie, do każdego

dołka dodano testowane związki na kolejne 24 h (37°C, przy 95% wilgotności i 5% CO₂). Zastosowane stężenia CAPE, CPT-11, SN38, CPT-11+CAPE i SN38+CAPE dla poszczególnych linii komórkowych (Tabela 7), odpowiadały wyznaczonym wartościom IC₅₀ dla badanych związków. Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane bez testowanych związków w odpowiednim podłożu hodowlanym. Po inkubacji z testowanymi związkami, komórki trypsynizowano, zwirowano (1400 rpm, 10 min, 4°C), przepłukano schłodzonym PBS-em (pozbawionym jonów Ca²⁺ i Mg²⁺) oraz ponownie zwirowano w tych samych warunkach. Następnie, zlano supernatant, a osad komórkowy zawieszono w 200 µl schłodzonego PBS-u, po czym komórki utrwalono w 70% lodowatym (-20°C) etanolu. Komórki zwirowano przy 4500 rpm przez 10 minut, w 4°C, a osad komórkowy zawieszono w roztworze jodku propidyny (5 mg/ml) w obecności RNazy A (50 jedn. Kunitza/ml) rozcieńczonej w PBS-ie. Tak przygotowane próby były inkubowane w ciemności przez 30 minut w temperaturze 37°C. Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji próby doświadczalne zostały przeniesione na лёd. Pomiar wykonywano na cytometrze przepływowym Becton Dickinson LSR II znajdującym się w Pracowni Cytometrii Przepływowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej badanej linii komórkowej. Do analizy wyników wykorzystano oprogramowanie Flow Jo 7.5.5.

Tabela 7. Stężenia oraz układy doświadczalne wykorzystane w analizie cyklu komórkowego

	HCT116	HT29	AGS	Caco-2
CAPE	4 µM($\frac{1}{2}$ IC ₅₀)	12 µM($\frac{1}{2}$ IC ₅₀)	4 µM($\frac{1}{2}$ IC ₅₀)	27,5 µM($\frac{1}{2}$ IC ₅₀)
	8 µM (IC ₅₀)	24 µM (IC ₅₀)	8 µM (IC ₅₀)	55 µM (IC ₅₀)
	16 µM(2 x IC ₅₀)	48 µM(2 x IC ₅₀)	16 µM(2 x IC ₅₀)	110 µM(2 x IC ₅₀)
CPT-11	4,5 µM (IC ₅₀)	8,5 µM (IC ₅₀)	8 µM (IC ₅₀)	30 µM (IC ₅₀)
CPT 11+CAPE	4,5 µM + 8 µM	8,5 µM + 24 µM	8 µM + 8 µM	30 µM + 55 µM
SN38	0,5 µM (IC ₅₀)	0,3 µM (IC ₅₀)	0,8 µM (IC ₅₀)	5 µM (IC ₅₀)
SN38+CAPE	0,5 µM +8 µM	0,3 µM + 24 µM	0,8 µM + 8 µM	5 µM + 55 µM

III. 3.5. Ocena zdolności do indukcji apoptozy

III. 3.5.1. Ocena zdolności do indukcji apoptozy z wykorzystaniem cytometru przepływowego

- **Zasada testu**

Badanie właściwości proapoptotycznych badanych związków przeprowadzono przy zastosowaniu cytometru przepływowego i użyciu jodku propidyny oraz barwnika Alexa fluor 488

sprzężonego z aneksyną V (Aneksyna-V-Alexa488). W żywych komórkach, których ciągłość błony jest zachowana, występowanie fosfatydyloseryny (PS) jest ograniczone tylko do wewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej. Jednakże, podczas wczesnych etapów apoptozy, zanim dojdzie do utraty integralności błony, fosfatydyloseryna ulega eksternalizacji na zewnętrzną powierzchnię błony plazmatycznej, gdzie eksponowana jest do przestrzeni międzykomórkowej. Białkiem wiążącym fosfolipidy, wykazującym wysoki stopień powinowactwa do PS jest aneksyna V, będąca ludzkim antykoagulantem o masie cząsteczkowej 35–36 kDa. Dzięki zastosowaniu Alexa fluor 488 skoniugowanego z aneksyną V możliwa jest fluorescencyjna detekcja komórek wczesnoapoptotycznych. W celu odróżnienia komórek będących we wczesnej fazie apoptozy od komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych zastosowano PI, dla którego błona komórkowa o nienaruszonej ciągłości jest nieprzepuszczalna. Test ten, pozwala zatem zidentyfikować 4 frakcje komórek:

1. komórki żywe (komórki niewybarwione; *An-/PI-*),
2. komórki wczesnoapoptotyczne (komórki wybarwione tylko Aneksyną-V-Alexa 488; *An+/PI-*),
3. komórki późnoapoptotyczne (komórki wybarwione Aneksyną-V-Alexa 488 oraz PI; *An+/PI+*),
4. komórki nekrotyczne (komórki wybarwione tylko PI; *An-/PI+*).

• Przebieg doświadczenia

Komórki hodowano w bezbarwnych, jałowych 6-dołkowych płytkach przez 24 godziny, a następnie poddano je 24 h inkubacji z badanymi związkami w temperaturze 37°C, przy 95% wilgotności i 5% CO₂. Użyte w doświadczeniu stężenia CAPE, CPT-11, SN38, CPT-11+CAPE i SN38+CAPE przedstawiono w Tabeli 8. Do eksperymentu włączono odpowiednie kontrole tj. **1)** komórki niebarwione żadnym fluorochromem i nietraktowane badanymi związkami lub kombinacją związków, **2)** barwione jedynie PI (komórki utrwalone w 70% alkoholu etylowym), **3)** komórki barwione wyłącznie Aneksyną-V-Alexa 488 (komórki traktowane 4 µM SN38) oraz **4)** komórki barwione zarówno PI jak i Aneksyną-V-Alexa 488 (komórki nieinkubowane ze związkami). Po inkubacji, komórki trypsynizowano, przepłukiwano dwukrotnie schłodzonym PBS-em i wirowano przy 1400 rpm w 4°C przez 10 min. Sporządzano 1 x stężony bufor wiążący aneksynę (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12,5 mM CaCl₂, pH 7,4) oraz roztwór PI o stężeniu 100 µg/ml rozcieńczonego w buforze wiążącym aneksynę. Osad komórek zawieszano w buforze wiążącym aneksynę, tak, aby gęstość komórek wynosiła 1 x 10⁶/ml buforu. Komórki inkubowano z 1 µl PI oraz 5 µl Alexa Fluor® 488 aneksyna V (w roztworze 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% surowicy bydlęcej, pH 7,4) na każde 100 µl roztworu wiążącego, przez 15 minut

w temperaturze pokojowej, w ciemności. Następnie, próbki przenoszono na lód i analizowano w cytometrze przepływowym Becton Dickinson LSR II. Ocenie poddawano co najmniej 1×10^4 komórek na próbę. Eksperyment przeprowadzano w trzech, niezależnych powtórzeniach dla każdej badanej linii komórkowej.

Tabela 8. Układy doświadczalne zastosowane do oceny właściwości proapoptotycznych

		HCT116	HT29	AGS	Caco-2
CAPE	$\frac{1}{2}IC_{50}$	4 μM	12 μM	4 μM	27,5 μM
	IC_{50}	8 μM	24 μM	8 μM	55 μM
	$2 \times IC_{50}$	16 μM	48 μM	16 μM	110 μM
CPT-11	IC_{50}	4,5 μM	8,5 μM	8 μM	30 μM
CPT 11+CAPE		4,5 μM + 8 μM	8,5 μM + 24 μM	8 μM + 8 μM	30 μM + 55 μM
SN38	IC_{50}	0,5 μM	0,3 μM	0,8 μM	5 μM
SN38+CAPE		0,5 μM + 8 μM	0,3 μM + 24 μM	0,8 μM + 8 μM	5 μM + 55 μM

III. 3.5.2. Ocena właściwości proapoptotycznych przy użyciu zestawu analitycznego

ApoTox-Glo™ Triplex Assay

- Zasada testu**

Zdolność CAPE, CPT-11 i SN38 do indukcji apoptozy w badanych komórkach linii nowotworowych została dodatkowo zbadana przy użyciu multipleksowego systemu analitycznego ApoTox-Glo™ Triplex Assay. Test ten składa się z dwóch etapów, w pierwszej części testu mierzona jest aktywność proteaz komórkowych, będących wskaźnikiem żywotności lub cytotoksyczności. Żywotność komórek jest oceniana przy użyciu fluorogennego substratu peptydowego tj. glicylo-feniloalanina-aminofluorokumaryny (GF-AFC), który swobodnie przenika przez nienaruszone błony komórkowe. We wnętrzu komórki substrat zostaje poddany działaniu proteaz komórkowych, czego efektem jest hydroliza wiązań peptydowych i emisja fluorescencji, która jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek. W wyniku cytotoksycznego działania związku, dochodzi do utraty integralności błony komórkowej, a proteazy są uwalniane do pożywki otaczającej komórki. Zastosowanie drugiego fluorogennego peptydu (bis-alanylalaninyl-feniloalaninylorodamina 110; bis-AAF-R110) nie posiadającego zdolności do przenikania przez błony komórkowe i będącego substratem dla proteaz uwolnionych z komórek, pozwala na fluorometryczne oznaczenie aktywności cytotoksycznej związku. Natężenie fluorescencji jest wprost proporcjonalne do liczby martwych komórek. W drugim etapie, zastosowano trzeci substrat zawierający sekwencję DEVD, która jest

rozpoznawana przez kaspazy. Substrat ten jest sprzężony z aminolucyferyną, będącą substratem dla lucyferazy. Po lizie komórek, kaspaza 3/7 przecina sekwencję DEVD i uwalnia substrat dla lucyferazy, co skutkuje emisją luminescencji, a jej natężenie jest wprost proporcjonalne do aktywności kaspazy w komórkach traktowanych badanym związkiem czy kombinacją związków (protokół Promega, strona internetowa 6). Aktywność efektorowej kaspazy 3/7, jest markerem wskazującym na przebiegający proces apoptozy.

- **Przebieg doświadczenia**

Test wykonywano zgodnie z protokołem dostarczonym wraz z kitem przez firmę Promega. 100 μ l zawiesiny komórkowej linii AGS, HT29, HCT116 i Caco-2 rozporcjowano na 96-dółkową, czarną płytkę z przezroczystym dnem i prowadzono hodowlę przez 24 h, po czym dodano badane związki na kolejne 24 h, 48 h i 72 h w temperaturze 37°C i 5% CO₂. Zastosowane w doświadczeniu stężenia CAPE, CPT-11, SN38, CPT-11+CAPE i SN38+CAPE przedstawiono w Tabeli 8 (rozdział III.3.5.1. niniejszej pracy). Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane w podłożu wolnym od testowanych związków. Po inkubacji komórek w badanych układach doświadczalnych, do każdego dołka dodano 20 μ l odczynnika do oznaczania żywotności/cytotoksyczności, zawierającego oba substraty: GF-AFC oraz bis-AAF-R110. Płytkę intensywnie mieszano (300–500 rpm) przez około 30 sekund, a następnie inkubowano przez 1 h w ciemności, w temperaturze 37°C i 5% CO₂. Po inkubacji mierzono fluorescencję przy długości fali: 400Ex/505Em (żywotność) oraz 485Ex/520Em (cytotoksyczność), wykorzystując wielofunkcyjny czytnik płytek SpectraMax i3. W kolejnym etapie, do wszystkich dołków dodawano 100 μ l odczynnika Caspase-Glo® 3/7. Płytkę intensywnie mieszano (300–500 rpm) przez około 30 sekund, a następnie inkubowano przez 1 h w temperaturze 37°C, w ciemności i 5% CO₂. Po inkubacji mierzono luminescencję za pomocą wielofunkcyjnego czytnika płytek SpectraMax i3.

Rozdział IV

Wyniki

IV. WYNIKI

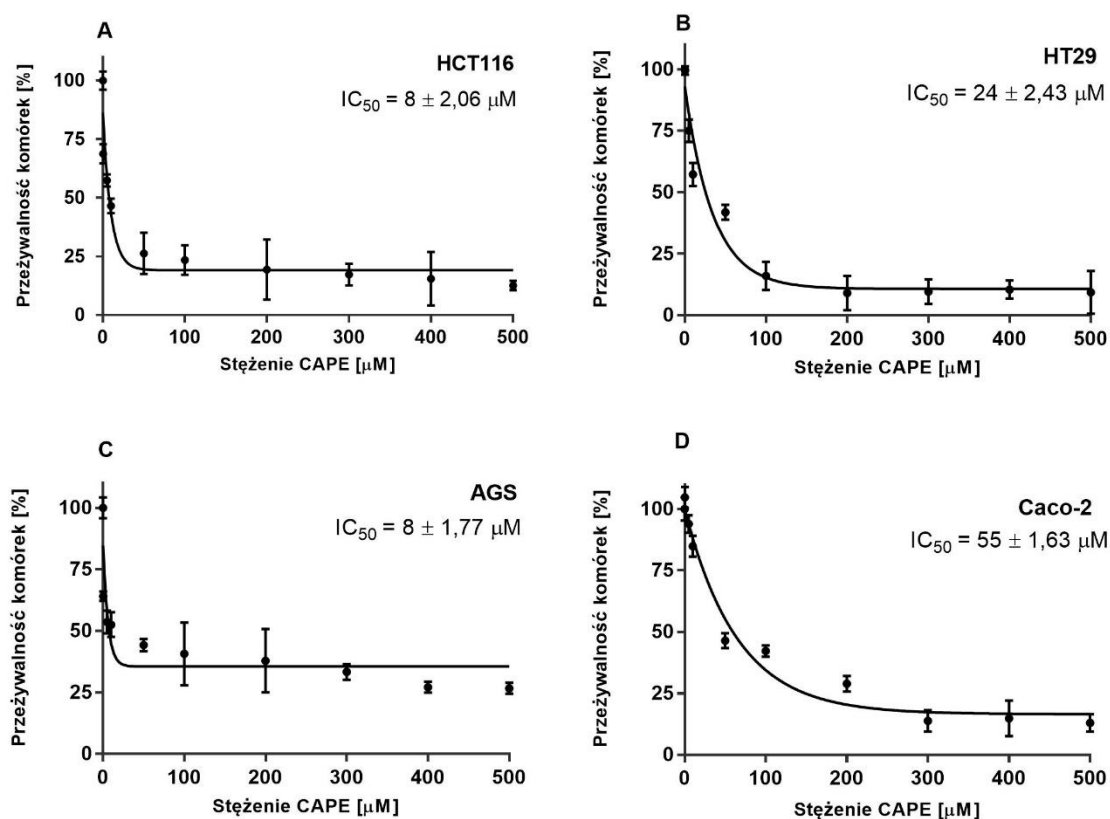
IV. 1. Analiza cytotoksyczności

IV. 1.1. Test MTT

CAPE

W celu określenia aktywności metabolicznej komórek linii nowotworowych przewodu pokarmowego: HT29, HCT116, AGS i Caco-2 poddanych działaniu CAPE wykonano test MTT. Badane komórki były inkubowane ze związkiem w przedziale stężeń od 0,5 do 500 μM przez 72 godziny. Wartości IC_{50} zostały wyznaczone z wykorzystaniem programu komputerowego GraphPad Prism. Wyniki otrzymane w teście MTT zostały przedstawione na Rycinie 16.

Po 72-godzinnej inkubacji badanych komórek z CAPE najbardziej wrażliwe na jego działanie okazały się być komórki linii HCT116 i AGS, dla których wyznaczone wartości IC_{50} wyniosły odpowiednio $8 \pm 2,06 \mu\text{M}$ i $8 \pm 1,77 \mu\text{M}$ (Ryc. 16A i C). Natomiast najmniej wrażliwe na działanie CAPE były komórki Caco-2, gdzie IC_{50} osiągnęło wartość $55 \pm 1,63 \mu\text{M}$ (Ryc. 16D).

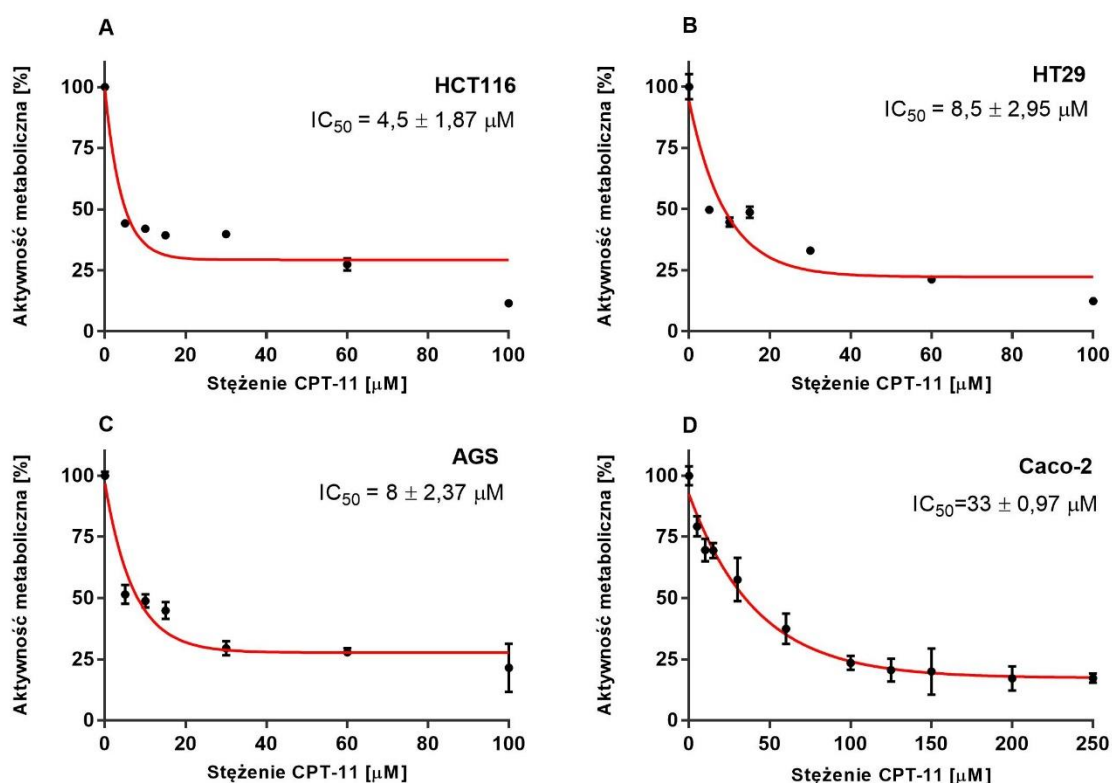


Rycina 16. Aktywność metaboliczna komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) poddanych 72-godzinnej inkubacji z CAPE.

Irinotekan (CPT-11)

Irinotekan inkubowano z komórkami linii HT29, HCT116, AGS i Caco-2 przez 72 godziny w zakresie stężeń od 5 do 100 μM , wyjątek stanowiły komórki linii Caco-2, które eksponowano na CPT-11 w zakresie stężeń od 5 do 250 μM . Efekt działania cytotoksycznego CPT-11 na aktywność metaboliczną badanych komórek określono wyznaczając wartości IC_{50} dla poszczególnych linii nowotworowych (Rycina 17).

Najniższą wartość IC_{50} , a tym samym najwyższą wrażliwość na działanie irinotekanu, odnotowano dla komórek linii HCT116 dla których wartość ta wyniosła $4,5 \pm 1,87 \mu\text{M}$ (Rycina 17A.). Prawie dwukrotnie wyższe wartości IC_{50} tj. $8 \pm 2,37 \mu\text{M}$ i $8 \pm 2,37 \mu\text{M}$ wyznaczono odpowiednio dla komórek HT29 i AGS (Ryc. 17B i C). Komórki linii Caco-2 okazały się być najmniej wrażliwe na działanie CPT-11, a otrzymana dla tej linii wartość IC_{50} wynosiła $33 \pm 0,97 \mu\text{M}$ (Ryc. 17D).

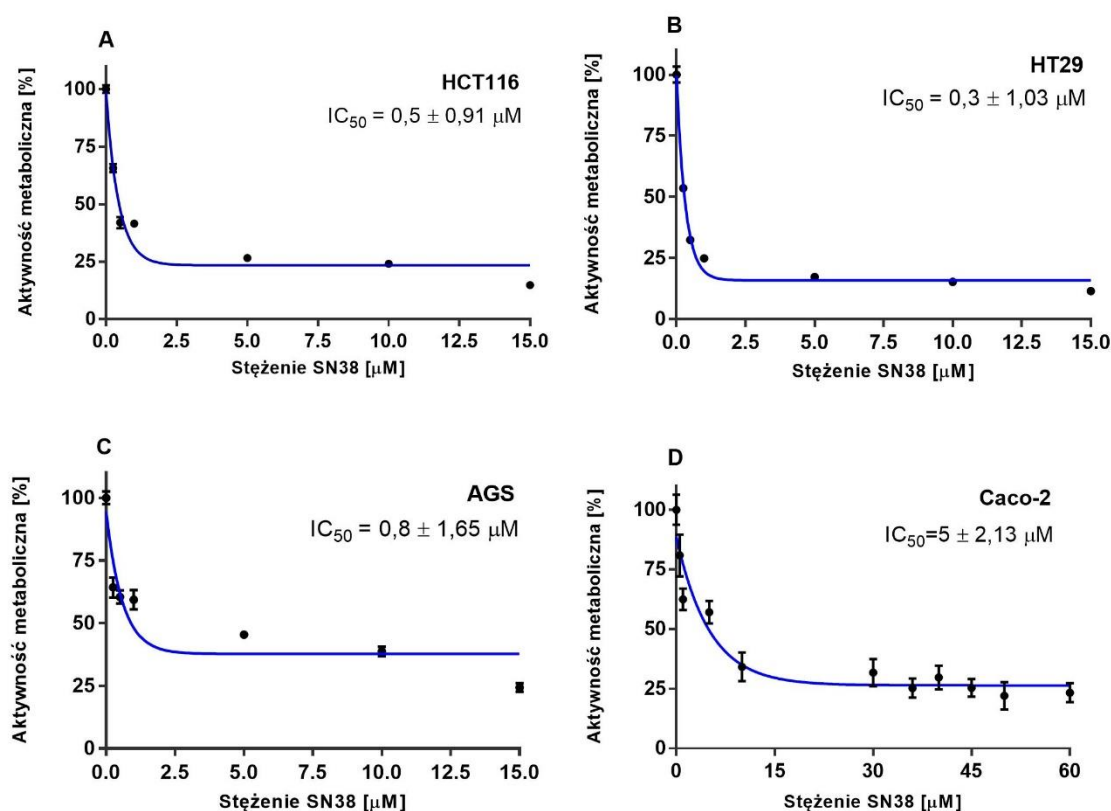


Rycina 17. Aktywność metaboliczna komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) poddanych 72-godzinnej inkubacji z CPT-11.

SN38

Aktywność metaboliczna komórek linii HT29, HCT116, AGS i Caco-2 eksponowanych przez 72 godziny na działanie SN38 oceniano wykorzystując wzrastające stężenia badanego związku (zakres od 0,25 μM do 15 μM dla komórek HT29, HCT116, AGS oraz 0,5 μM – 50 μM dla komórek linii Caco-2). Uzyskane wyniki pozwoliły wyznaczyć wartości IC_{50} dla każdej z badanych linii nowotworowych.

Podobnie jak w przypadku działania CAPE i CPT-11, również SN38 wpływał na zmniejszenie aktywności metabolicznej testowanych komórek (Rycina 18). Najbardziej wrażliwe na działanie SN38 okazały się być komórki linii HT29, dla których wyznaczona wartość IC_{50} wynosiła $0,3 \pm 1,03 \mu\text{M}$ (Ryc. 18B). Z kolei, najmniej efektywne działanie SN38 odnotowano w komórkach linii Caco-2, gdzie wartość IC_{50} była równa $5 \pm 2,13 \mu\text{M}$ (Ryc. 18D).



Rycina 18. Aktywność metaboliczna komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) poddanych 72-godzinnej inkubacji z SN38.

Podsumowanie wyników testu MTT

Wykonanie testu MTT pozwoliło wyznaczyć wartości IC_{50} dla CAPE, CPT-11 i SN38, które zastosowano w kolejnych testach, zaplanowanych w ramach realizacji etapów niniejszej pracy doktorskiej. Wyniki przeprowadzonego testu MTT wykazały, że najwyższą aktywnością cytotoksyczną spośród badanych związków charakteryzował się metabolit SN38 względem wszystkich badanych linii nowotworowych, przy czym najbardziej efektywne działanie SN38 odnotowano dla komórek linii HT29 ($IC_{50} = 0,3 \mu M$). Nieznacznie słabsze działanie SN38 zaobserwowano w komórkach HCT116 ($IC_{50} = 0,5 \mu M$) oraz AGS ($IC_{50} = 0,8 \mu M$).

W przypadku ekspozycji badanych komórek na działanie CPT-11 najwyższy poziom cytotoksyczności odnotowano dla komórek linii HCT116 ($IC_{50} = 4,5 \mu M$). Słabsze działanie irinotekanu zaobserwowano w komórkach linii AGS ($IC_{50} = 8 \mu M$) i HT29 ($IC_{50} = 8,5 \mu M$), gdzie wartości IC_{50} kształtowały się na porównywalnym poziomie.

Z kolei, CAPE wykazał najwyższą aktywność cytotoksyczną w komórkach linii AGS i HCT116 ($IC_{50} = 8 \mu M$ dla obu linii komórkowych). Trzykrotnie słabsze działanie CAPE odnotowano w komórkach linii HT29, gdzie wartość IC_{50} była równa $24 \mu M$.

Komórki Caco-2 (będące referencyjną linią komórek nabłonka jelitowego z uwagi na morfologiczne i fizjologiczne podobieństwo do prawidłowych enterocytów) w przeprowadzonym teście MTT okazały się być najmniej wrażliwe na działanie wszystkich testowanych związków. Najwyższą efektywność działania cytotoksycznego odnotowano po ekspozycji komórek Caco-2 na SN38 ($IC_{50} = 5 \mu M$). Najniższą cytotoksyczność zaobserwowano po działaniu CAPE w ww. komórkach ($IC_{50} = 55 \mu M$) (Tabela 9).

Tabela 9. Wartości IC_{50} wyznaczone dla badanych linii nowotworowych po 72 h inkubacji z szeregiem stężeń CAPE, CPT-11 i SN38.

	$IC_{50} [\mu M]$		
	CAPE	CPT-11	SN38
AGS	$8 \pm 1,77$	$8 \pm 2,37$	$0,8 \pm 1,65$
HCT116	$8 \pm 2,06$	$4,5 \pm 1,87$	$0,5 \pm 0,91$
HT29	$24 \pm 2,43$	$8,5 \pm 2,95$	$0,3 \pm 1,03$
Caco-2	$55 \pm 1,63$	$33 \pm 0,97$	$5 \pm 2,13$

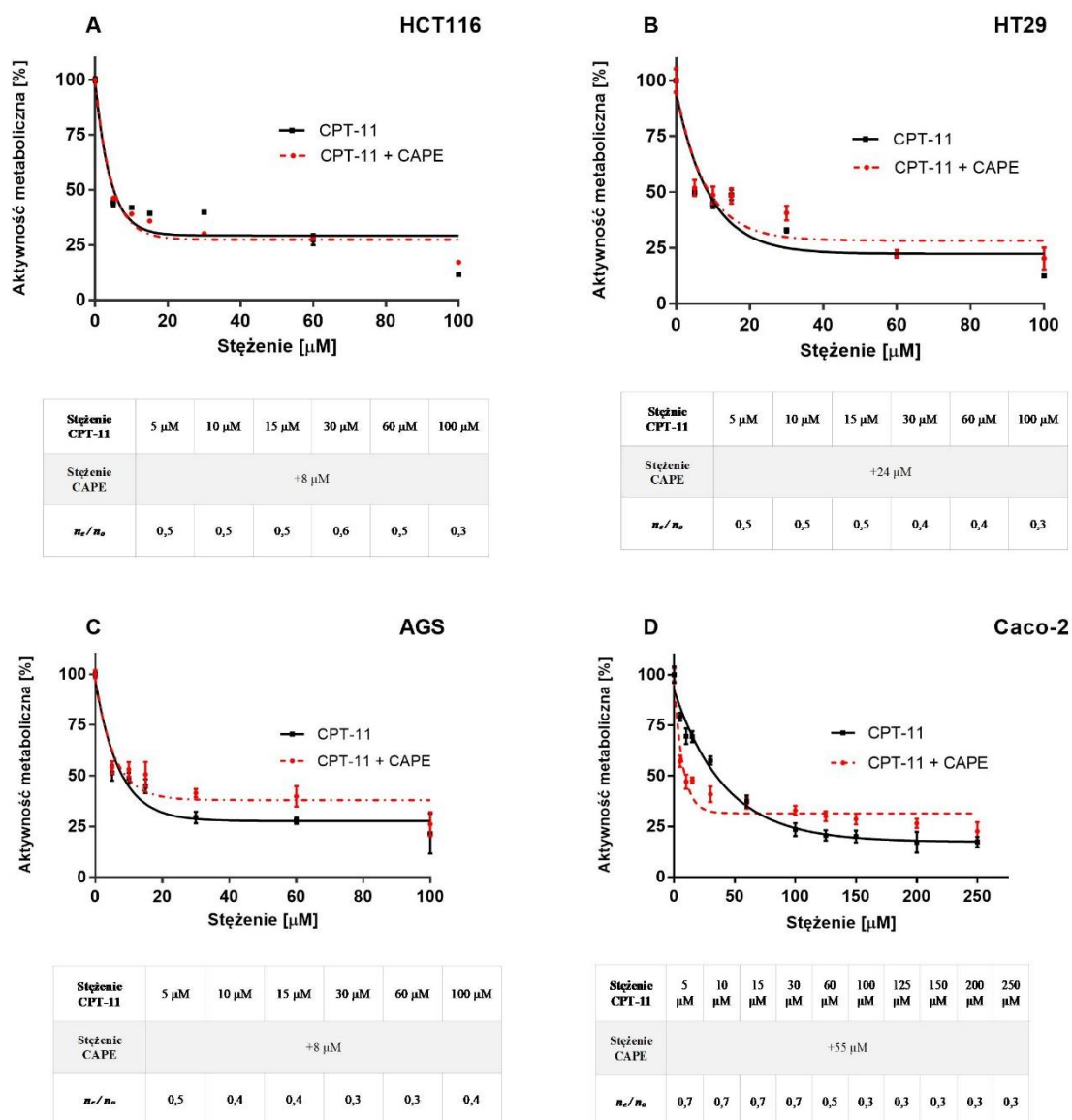
IV. 1.2. Wyznaczenie stopnia synergizmu/antagonizmu pomiędzy badanymi związkami testem MTT

Do oceny efektu synergistycznego/antagonistycznego badanych związków przeprowadzono test MTT, w którym związki zostały jednocześnie podane do medium hodowlanego. Użyte w doświadczeniu stężenia CAPE odpowiadały wartościom IC_{50} wyznaczonym dla poszczególnych linii komórkowych. Z kolei, zastosowany zakres stężeń dla CPT-11 wynosił 5–100 μM , a dla SN38: 0,25–15 μM (Rycina 19 i 20). Komórki poddane działaniu CPT-11 lub SN38 inkubowano przez 72 godziny, przy 95% wilgotności i 5% CO_2 i temperaturze 37°C. Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane bez testowanych związków w podłożu hodowlanym. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej badanej linii komórkowej.

CPT-11+CAPE

Po inkubacji komórek linii HT29, AGS i Caco-2 z CPT-11 w obecności CAPE zaobserwowano wzrost aktywności metabolicznej komórek w porównaniu z działaniem samego CPT-11. Jedynie, dla linii komórkowej HCT116 nie zaobserwowano takiego efektu. Uzyskane wyniki wykazały, że jednoczesna inkubacja badanych komórek z CPT-11 w obecności CAPE w podłożu hodowlanym wpłynęła na zmniejszenie stopnia cytotoksyczności irinotekanu, a tym samym zwiększyła liczbę komórek aktywnych metabolicznie. Na tej podstawie określony został charakter działania CAPE, synergistyczny/antagonistyczny, z zastosowanym chemioterapeutyką poprzez obliczenie współczynnika oczekiwanej liczby komórek do obserwowanej liczby komórek dla danego stężenia ($W_{S/A}$).

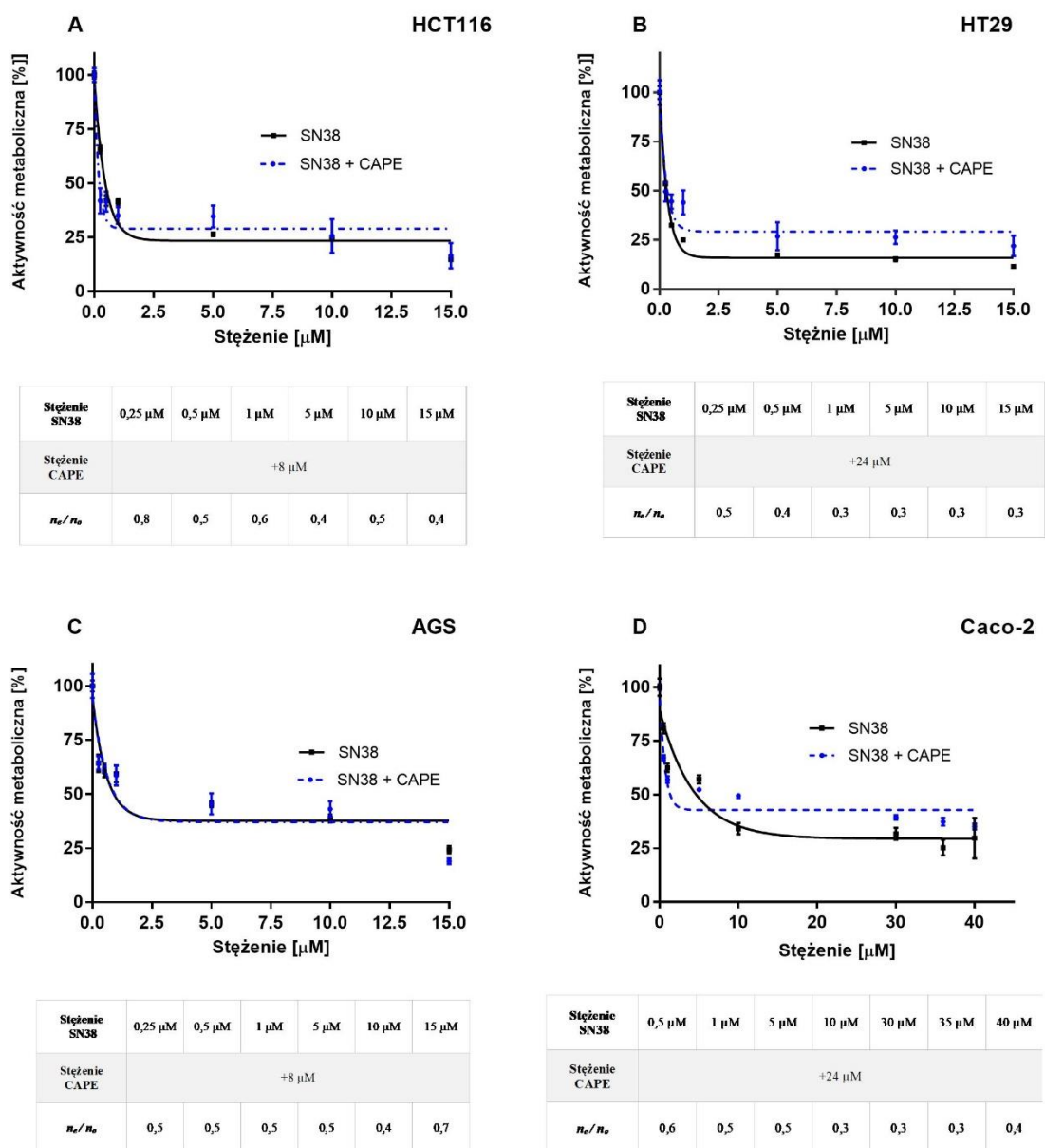
Dla wszystkich linii komórkowych wartość ww. współczynnika była mniejsza od 1, co oznacza, że ekspozycja badanych komórek na działanie CPT-11 w obecności CAPE wywołuje efekt antagonistyczny względem irinotekanu we wszystkich badanych liniach komórkowych (Rycina 19).



Rycina 19. Wpływ 72- godzinnej inkubacji komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) z CPT-11 oraz CPT-11 w obecności CAPE (CPT-11 + CAPE). Zestawienie tabelaryczne pod wykresem pokazuje stosunek oczekiwanej liczby komórek (n_e) do obserwowanej liczby komórek (n_o). Współczynnik synergizmu/antagonizmu ($W_{S/A}$) <1 reprezentuje działanie antagonistyczne CAPE względem CPT-11; średnia $\pm$ SEM.

SN38+ CAPE

Po 72 h inkubacji komórek linii HT29 i HCT116 z SN38 w obecności CAPE zaobserwowano antagonistyczne działanie SN38+CAPE w ww. komórkach, powodując wzrost ich aktywności metabolicznej, w porównaniu z serią z samym SN38. W przypadku komórek linii AGS, dodanie do podłoża hodowlanego CAPE nie miało wpływu na aktywność cytotoksyczną SN38. Z kolei, w komórkach linii Caco-2, CAPE zastosowany jednocześnie z SN38 wpływał na zwiększenie efektu cytotoksycznego niskich stężeń SN38, jednak działanie to nie było wystarczające, aby efekt ten okazał się synergistyczny. Przy wyższych stężeniach SN38 (powyżej 10 μM), CAPE wykazywał działanie antagonistyczne, zmniejszając cytotoksyczność metabolitu (Rycina 20).



Rycina 20. Wpływ 72 godzinnej inkubacji komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) z SN38 oraz SN38 w obecności CAPE (SN38+CAPE) oceniany testem MTT (średnia $\pm$ SEM). Tabela pod wykresem pokazuje stosunek oczekiwanej liczby komórek (n_e) do obserwowanej liczby komórek (n_o). Współczynnik synergizmu/antagonizmu ($W_{S/A}$) <1 reprezentuje działanie antagonistyczne CAPE względem SN38.

IV. 2. Analiza genotoksyczności

IV. 2.1. Ocena uszkodzeń DNA testem kometowym

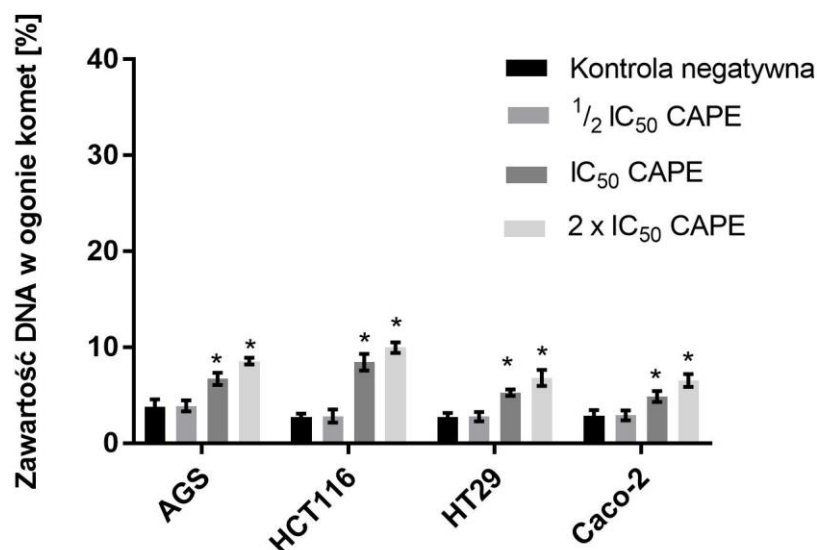
CAPE

Analizę genotoksyczności CAPE w stosunku do komórek linii HT29, HCT116, AGS i Caco-2 przeprowadzono testem kometowym w wersji alkalicznej. Badane komórki były inkubowane ze związkiem przez 24 h. W doświadczeniu wykorzystano stężenia CAPE, które odpowiadały wartościom $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} oraz $2 \times IC_{50}$ wyznaczonym w teście MTT dla poszczególnych linii nowotworowych (Tabela 10). Kontrolę negatywną stanowiły komórki poszczególnych linii hodowane w podłożu wolnym od testowanych związków. Wyniki uzyskane w teście kometowym zostały przedstawione na Rycinie 21 oraz Tabeli 11.

Tabela 10. Stężenia CAPE zastosowane w teście kometowym.

Linia komórkowa	$\frac{1}{2} IC_{50}$	IC_{50}	$2 \times IC_{50}$
AGS, HCT116	4 μM	8 μM	16 μM
HT29	12 μM	24 μM	48 μM
Caco-2	27,5 μM	55 μM	110 μM

Po inkubacji badanych komórek nowotworowych z CAPE w stężeniach odpowiadających wartościom IC_{50} oraz $2 \times IC_{50}$, zaobserwowano istotny statystycznie, wzrost migracji DNA w ogonach komet w porównaniu z kontrolą negatywną. Najwyższą średnią zawartość DNA w ogonach komet zaobserwowano w komórkach linii HCT116 poddanych działaniu CAPE w stężeniu 16 μM ($2 \times IC_{50}$), która wynosiła $9,97\% \pm 0,54$. Nieznacznie mniejszy stopień migracji DNA w ogonach komet zaobserwowano w komórkach AGS w porównaniu z komórkami linii HCT116. Natomiast, najniższe procentowe wartości DNA ($2,90\% \pm 0,52$) w ogonach komet odnotowano dla komórek linii Caco-2 przy zastosowanym stężeniu 27,5 μM ($\frac{1}{2} IC_{50}$) (Rycina 21 i Tabela 11).



Rycina 21. Procentowa zawartość DNA w ogonie komet w komórkach linii AGS, HCT116, HT29 i Caco-2 poddanych działaniu CAPE przez 24 h (średnia $\pm$ S.E.M).

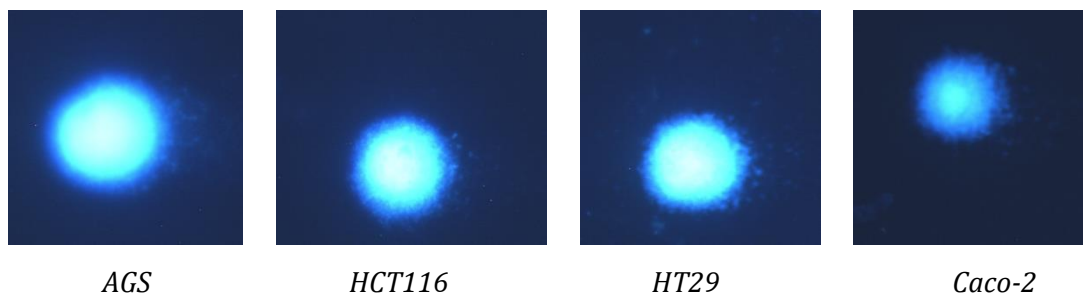
* $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną

Tabela 11. Wartości procentowej zawartości DNA w ogonach komet (średnia $\pm$ S.E.M).

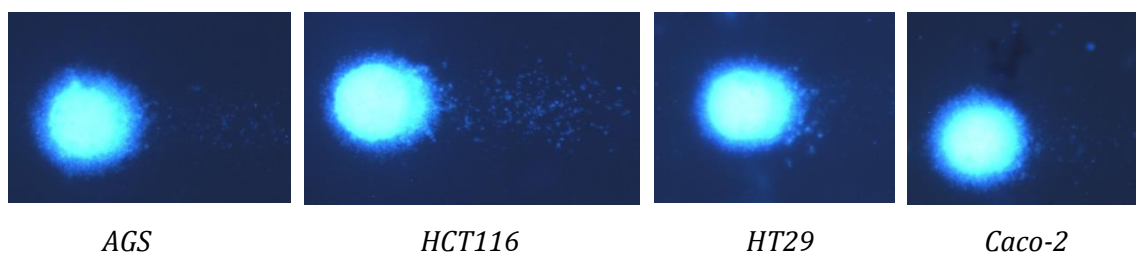
Linia komórkowa	Kontrola negatywna	$\frac{1}{2}$ IC ₅₀	IC ₅₀	2 x IC ₅₀
AGS	3,81% $\pm$ 0,76	3,89% $\pm$ 0,58	6,71% $\pm$ 0,63	8,56% $\pm$ 0,36
HCT116	2,73% $\pm$ 0,34	2,89% $\pm$ 0,69	8,44% $\pm$ 0,87	9,97% $\pm$ 0,54
HT29	2,76% $\pm$ 0,40	2,77% $\pm$ 0,48	5,28% $\pm$ 0,32	6,81% $\pm$ 0,84
Caco-2	2,89% $\pm$ 0,56	2,90% $\pm$ 0,52	4,87% $\pm$ 0,57	6,56% $\pm$ 0,66

Rycina 22 przedstawia fotografie komórek badanych linii nowotworowych obserwowanych po inkubacji z CAPE podczas analizy testu kometowego.

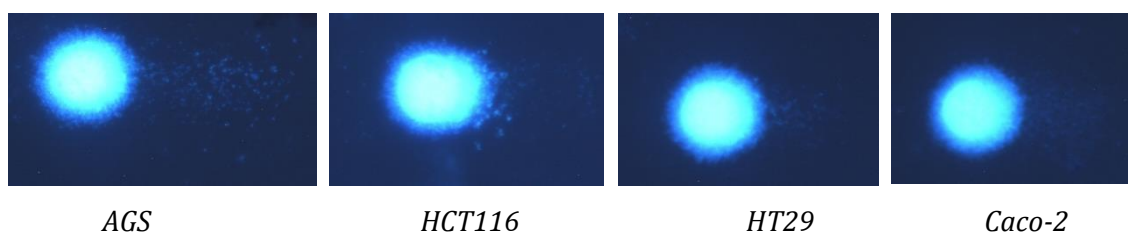
Kontrola negatywna



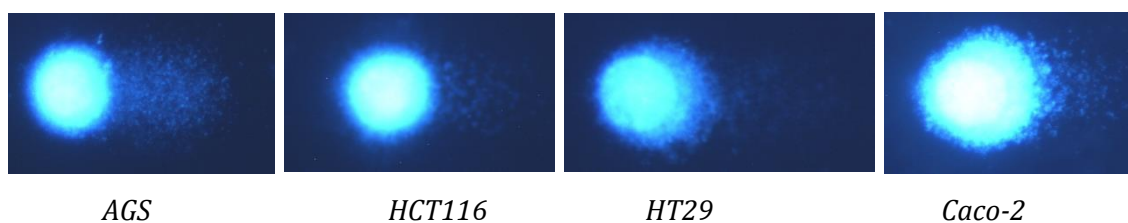
CAPE stężenie $\frac{1}{2}IC_{50}$



CAPE stężenie IC_{50}



CAPE stężenie $2 \times IC_{50}$



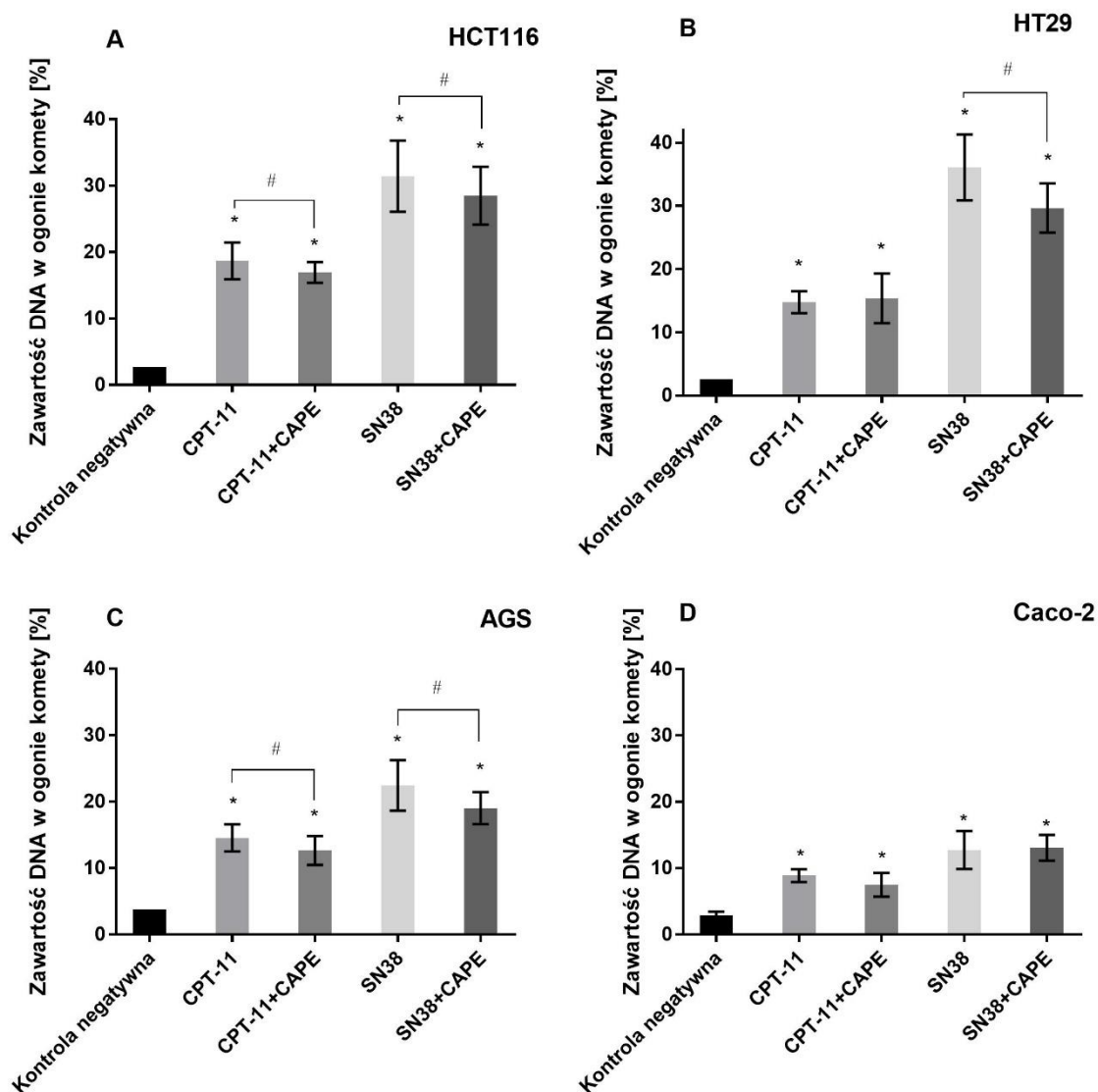
Rycina 22. Zdjęcia komet obserwowane podczas analizy testu kometowego (24 h inkubacja z CAPE, powiększenie 40x).

CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE

Wpływ CAPE na genotoksyczność indukowaną przez CPT-11 lub SN38 w komórkach linii HT29, HCT116, AGS i Caco-2 oceniano dodając jednocześnie testowane związki do medium hodowlanego w danym układzie doświadczalnym. Zastosowane stężenia CPT-11, SN38 i CAPE to stężenia odpowiadające wartościom IC_{50} wyznaczonym dla poszczególnych linii komórkowych w teście MTT.

Komórki wybranych linii nowotworowych traktowano przez 24 godziny badanymi związkami w układach doświadczalnych przedstawionych w Tabeli 5 w rozdziale III.3.2.1 niniejszej pracy. Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane bez testowanych związków w podłożu hodowlanym. Wyniki opisanej serii doświadczalnej zostały przedstawione na Rycinie 23.

Jednoczesna inkubacja CPT-11+CAPE i SN38+CAPE wykazała, że aktywność genotoksyczna irinotekanu i jego metabolitu SN38 w komórkach HCT116 i AGS uległa obniżeniu w obecności CAPE w porównaniu do komórek inkubowanych wyłącznie z samym lekiem lub jego metabolitem (Rycina 23A, C, D i Tabela 12). W przypadku komórek linii HT29, CAPE indukował nieznaczny wzrost genotoksyczności CPT-11, jednak różnica w procentowej zawartości DNA w ogonach komet pomiędzy seriami CPT-11 a CPT-11+CAPE nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej (Rycina 23B). W komórkach linii HT29 zaobserwowano również najwyższy spośród badanych linii komórkowych, spadek genotoksyczności SN38 w obecności CAPE (SN38+CAPE) w porównaniu do serii z samym SN38 (Rycina 23B).



Rycina 23. Procentowa zawartość DNA w ogonach komet w komórkach linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) inkubowanych 24 h z CPT-11 lub SN38 w obecności CAPE (średnia $\pm$ S.E.M.).

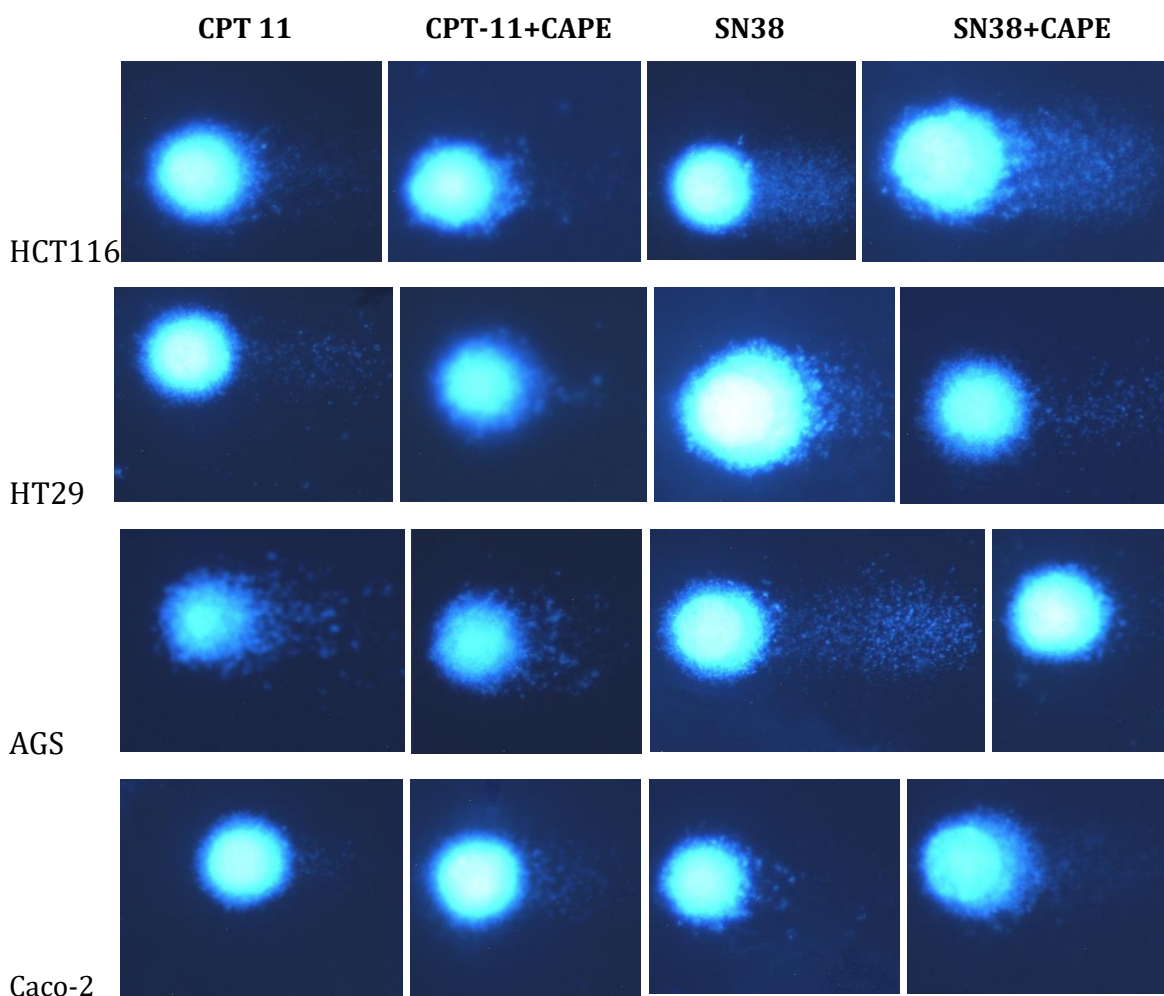
* $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną;

$p < 0,05$ w porównaniu z samym CPT-11 lub SN38

Tabela 12. Wartości procentowej zawartości DNA w ogonach komet (średnia $\pm$ S.E.M).

Linia komórkowa	Kontrola negatywna	CPT-11	CPT-11+CAPE	SN38	SN38+CAPE
HCT116	2,73% $\pm$ 0,34	18,69% $\pm$ 2,77	16,93% $\pm$ 1,56	31,43% $\pm$ 5,34	28,50% $\pm$ 4,36
HT29	2,76% $\pm$ 0,40	14,78% $\pm$ 1,74	15,39% $\pm$ 3,92	36,07% $\pm$ 5,23	26,67% $\pm$ 3,89
AGS	3,81% $\pm$ 0,76	14,56% $\pm$ 2,03	12,66% $\pm$ 2,17	22,45% $\pm$ 3,80	19,03% $\pm$ 2,41
Caco-2	2,89% $\pm$ 0,56	8,89% $\pm$ 0,97	7,49% $\pm$ 1,78	12,75% $\pm$ 2,86	13,08% $\pm$ 1,94

Rycina 24 przedstawia fotografie komórek badanych linii nowotworowych obserwowanych po inkubacji z CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE podczas analizy testu kometowego.



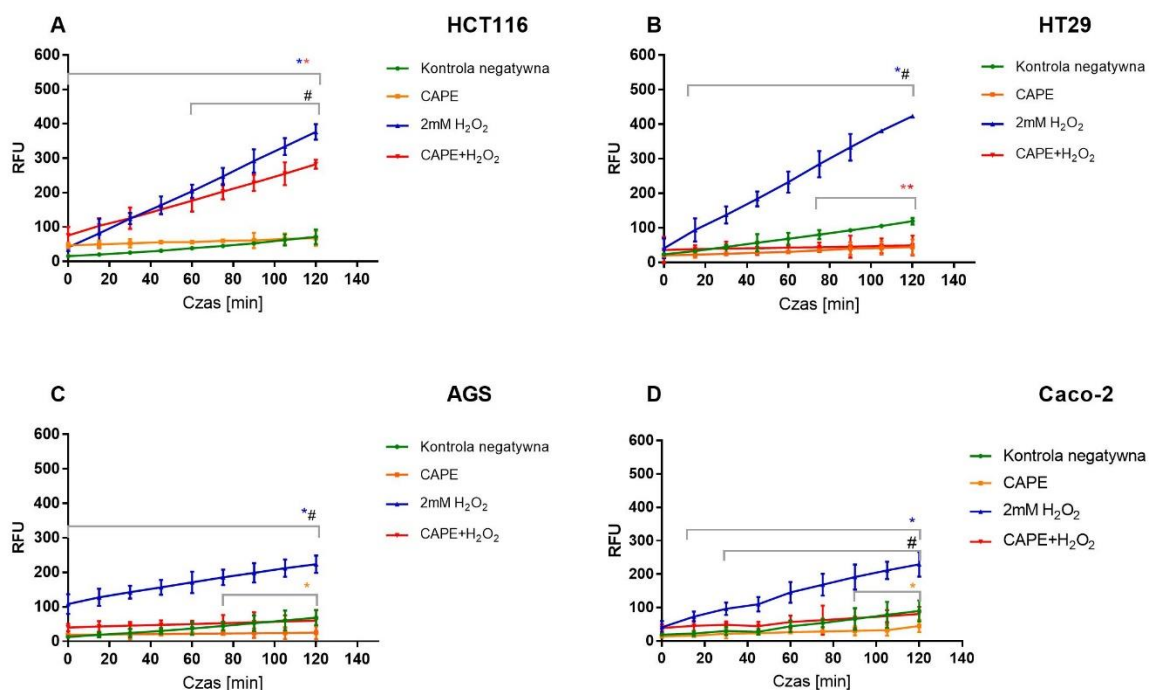
Rycina 24. Zdjęcia komet obserwowane podczas analizy testu kometowego (24 h inkubacja z CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38, SN38+CAPE, powiększenie 40x).

IV. 3. Badanie poziomu stresu oksydacyjnego

Do oceny poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2 pod wpływem CAPE oraz aktywności CAPE w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego przez 2 mM H_2O_2 zastosowano sondę fluorescencyjną H_2DCFDA . Stężenie CAPE zastosowane w doświadczeniach odpowiadało wartościom IC_{50} wyznaczonym w teście MTT dla każdej badanej linii komórkowej. Komórki inkubowano ze związkami w układach doświadczalnych przedstawionych w Tabeli 6 w rozdziale III. 3.3 niniejszej pracy. Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane bez testowanych związków w podłożu hodowlanym. Fluorescencję mierzono w odstępach 15 minutowych przez 120 min przy długości fali wzbudzenia 485 nm i emisji 535 nm. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 25 i 26.

Preinkubacja z CAPE (przed podaniem stresora tj. 2 mM H₂O₂): preinkubacja CAPE+inkubacja 2 mM H₂O₂

Zastosowanie CAPE przed inkubacją komórek z 2 mM H₂O₂ spowodowało zmniejszenie poziomu reaktywnych form tlenu w porównaniu do serii z samym nadtlenkiem wodoru we wszystkich badanych liniach komórkowych. W przypadku komórek linii nowotworowych HT29 i AGS zastosowanie 30 min preinkubacji z CAPE praktycznie zablokowało generowanie reaktywnych form tlenu przez nadtlenek. Ponadto, w komórkach linii AGS, HT29 i Caco-2 poddanych działaniu CAPE po 120 min zaobserwowano niższy poziom reaktywnych form tlenu niż w przypadku kontroli negatywnej (Rycina 25).



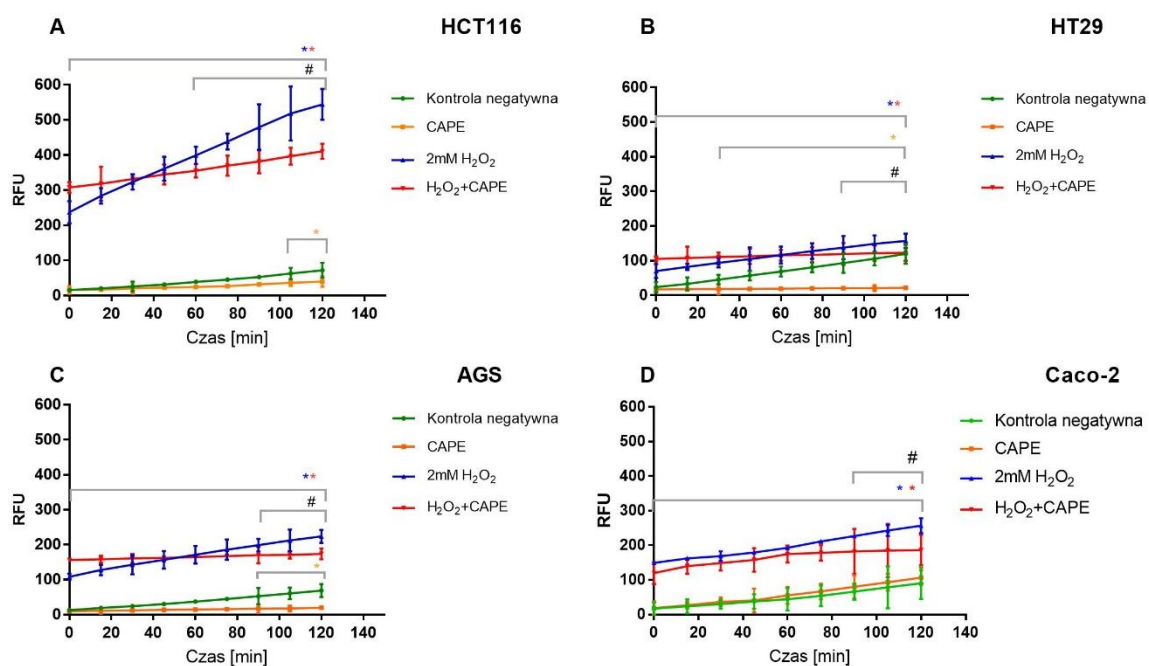
Rycina 25. Poziom RFT w komórkach linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) generowanych po 30 min preinkubacji z CAPE, a następnie inkubacji z 2 mM H₂O₂

* $p < 0,05$ w porównaniu z komórkami kontroli negatywnej

$p < 0,05$ w porównaniu z komórkami kontroli pozytywnej tj. 2 mM H₂O₂

Preinkubacja z 2 mM H₂O₂ (zastosowanie stresora przed inkubacją z CAPE): preinkubacja z 2 mM H₂O₂+inkubacja z CAPE

30 min preinkubacja komórek linii HCT116, AGS i Caco-2 z 2 mM H₂O₂ spowodowała istotny statystycznie wzrost reaktywnych form tlenu w porównaniu z kontrolą negatywną. Zastosowanie CAPE po preinkubacji z 2 mM H₂O₂ zmniejszyło liczbę RFT po 120 min we wszystkich badanych liniach komórkowych (Rycina 26). Najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne CAPE po preinkubacji ze stresorem (2 mM H₂O₂) zaobserwowano w komórkach HCT116 (Rycina 26A). Nieco niższy poziom reaktywnych form tlenu odnotowano w komórkach linii HT29 i AGS w porównaniu z kontrolą pozytywną (Rycina 26B i C).



Rycina 26. Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D). Seria z 30 min preinkubacją z 2 mM H₂O₂, a następnie inkubacją z CAPE

* $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną

$p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą pozytywną (2 mM H₂O₂)

IV. 4. Ocena zdolności do indukcji apoptozy

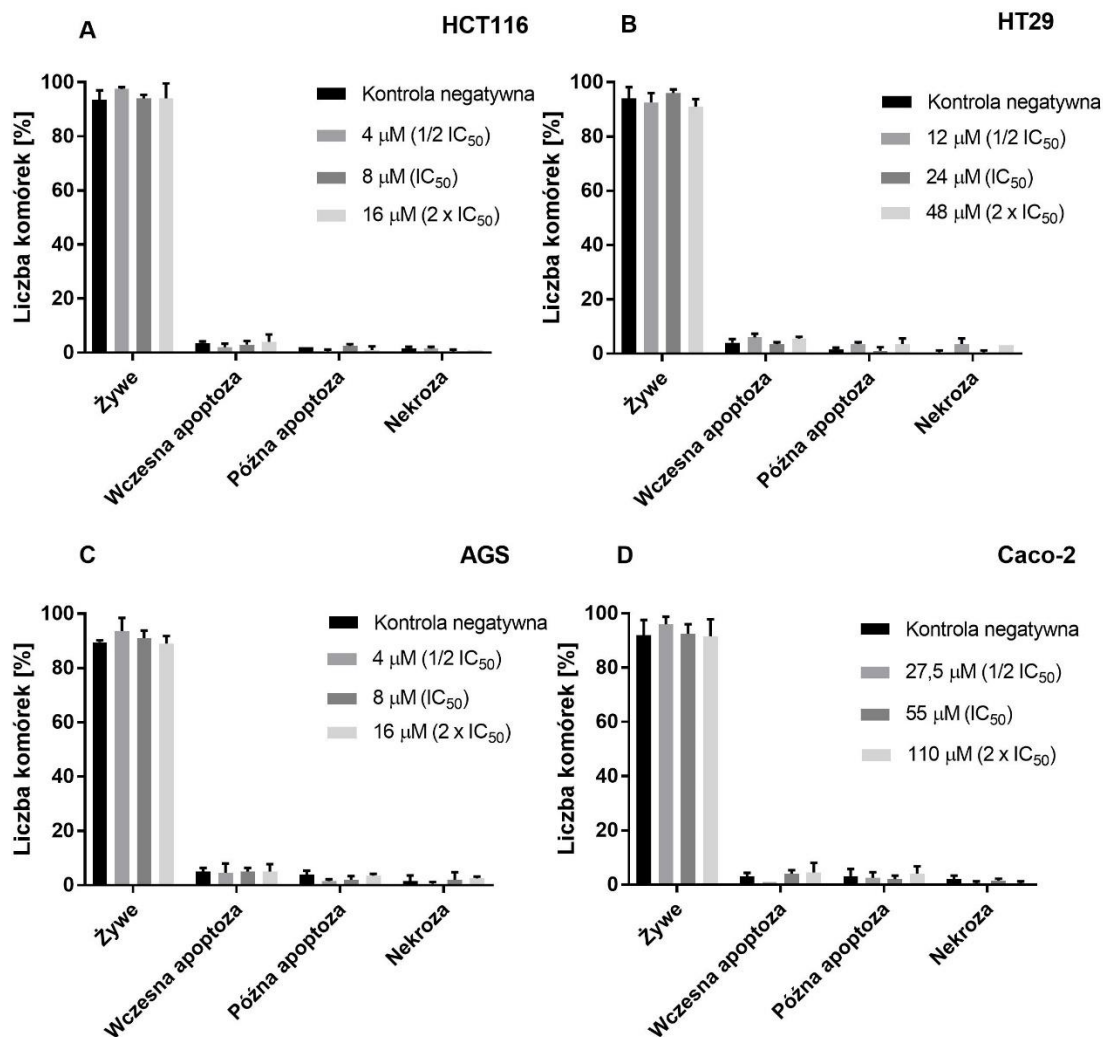
IV. 4.1. Ocena zdolności do indukcji apoptozy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej

Zdolność badanych związków do indukowania apoptozy w komórkach linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2 w zaplanowanych układach doświadczalnych przeprowadzono z wykorzystaniem cytometru przepływowego z zastosowaniem jodku propidyny oraz Alexa fluoru 488 sprzężonego z aneksyną V (Aneksyna-V-Alexa488). Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 24 h, 48 h i 72 h w seriach doświadczalnych przedstawionych w Tabeli 8 w podrozdziale III. 3.5.1 niniejszej pracy. Pomiarów dokonano na cytometrze przepływowym firmy Becton Dickinson z zastosowaniem odpowiednich kontroli opisanych w podrozdziale III. 3.5.1 niniejszej pracy doktorskiej. Otrzymane wyniki przedstawione zostały na Rycinach 27-32.

CAPE – 24 h inkubacji

Zastosowanie 24 h inkubacji komórek linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2 z CAPE w stężeniach odpowiadającym $\frac{1}{2}IC_{50}$, IC_{50} i $2 \times IC_{50}$ nie spowodowało istotnego statystycznie wzrostu liczby komórek apoptotycznych w przeprowadzonych seriach doświadczalnych (Rycina 28A-D).

W Tabeli 13 zostały przedstawione udziały procentowe komórek podlegających apoptozie i nekrozie po 24 h inkubacji badanych komórek z CAPE.



Rycina 28. Udział poszczególnych frakcji komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne i nekrotyczne) poddanych 24 godzinnej inkubacji z CAPE.

* $p < 0,05$ vs. kontrola negatywna

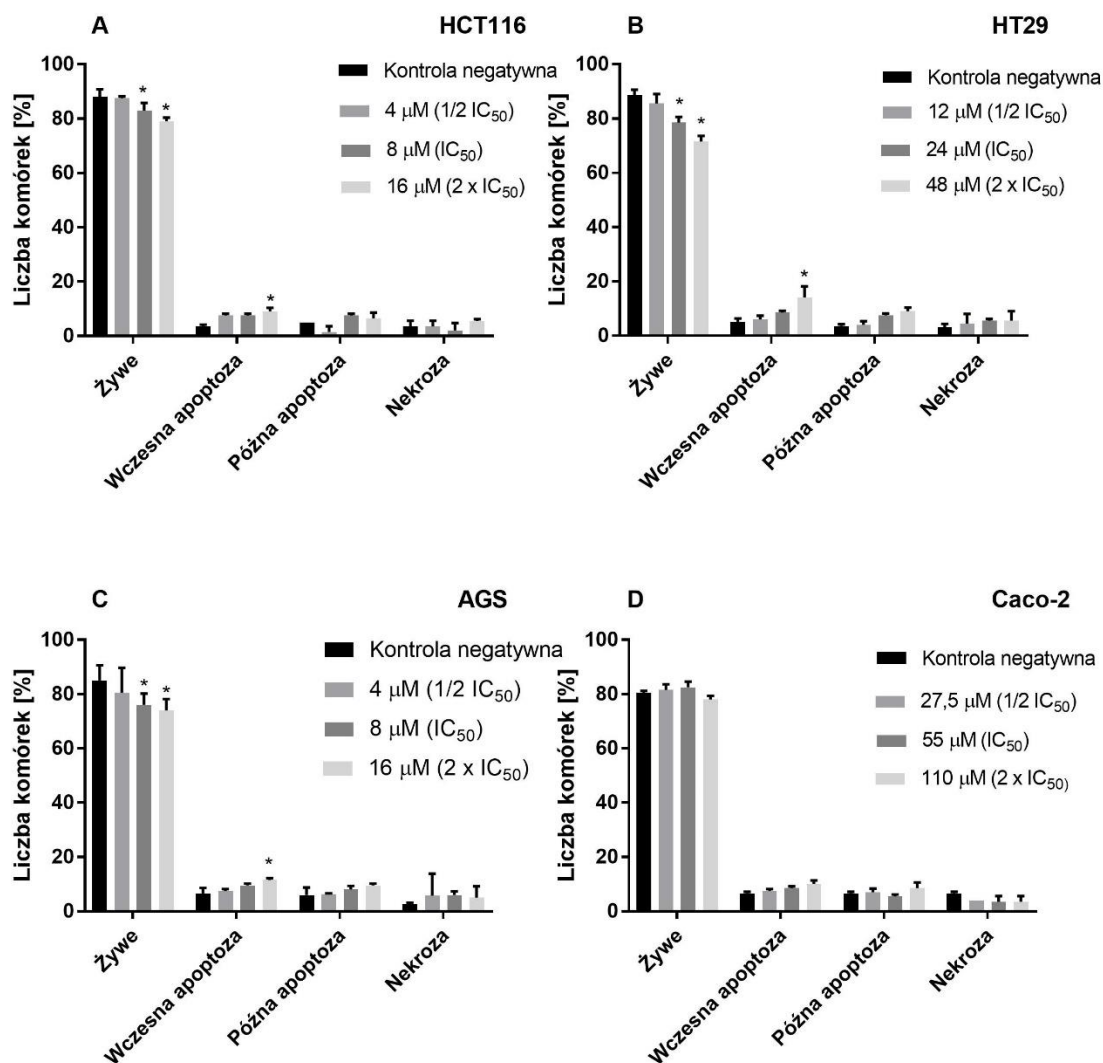
Tabela 13. Stopień indukcji (%) apoptozy i nekrozy po 24 h inkubacji komórek HCT116, HT29, AGS i Caco-2 z CAPE (wartość $\pm$ SEM)

Linia komórkowa	Seria doświadczalna	Apoptoza	Nekroza
HCT116	Kontrola	5,51% $\pm$ 0,39	1,12% $\pm$ 0,10
	4 μ M	3,20% $\pm$ 0,45	1,54% $\pm$ 0,29
	8 μ M	4,55% $\pm$ 0,27	1,23% $\pm$ 0,27
	16 μ M	6,14% $\pm$ 1,05	1,16% $\pm$ 0,13
HT29	Kontrola	5,54% $\pm$ 0,55	1,08% $\pm$ 0,26
	12 μ M	9,52% $\pm$ 0,69	3,55% $\pm$ 0,14
	24 μ M	5,55% $\pm$ 0,52	1,13% $\pm$ 0,35
	48 μ M	9,19% $\pm$ 1,02	3,11% $\pm$ 0,03
AGS	Kontrola	9,17% $\pm$ 0,96	3,20% $\pm$ 0,91
	4 μ M	6,09% $\pm$ 1,29	0,54% $\pm$ 0,43
	8 μ M	7,11% $\pm$ 0,89	2,11% $\pm$ 1,32
	16 μ M	6,13% $\pm$ 1,38	2,57% $\pm$ 0,65
Caco-2	Kontrola	6,11% $\pm$ 0,92	2,14% $\pm$ 0,38
	27,5 μ M	3,56% $\pm$ 0,60	0,51% $\pm$ 0,23
	55 μ M	6,18% $\pm$ 0,76	1,54% $\pm$ 0,26
	110 μ M	8,59% $\pm$ 2,08	0,56% $\pm$ 0,57

CAPE – 48 h inkubacja

Inkubacja komórek linii HCT116, HT29 i AGS z CAPE w stężeniu równym wyznaczonej wartości $2 \times IC_{50}$ spowodowała istotny statystycznie wzrost liczby komórek będących we wczesnej fazie apoptozy (Rycina 29A-C). Z kolei, 48 h inkubacja komórek linii Caco-2 z CAPE we wszystkich zastosowanych stężeniach nie wpłynęła w istotny sposób na indukcję apoptozy, a tym samym żywotność komórek (Rycina 29D).

W Tabeli 14 zostały przedstawione udziały procentowe komórek podlegających apoptozie i nekrozie po 48 h inkubacji badanych komórek z CAPE.



Rycina 29. Procentowy udział poszczególnych populacji komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne i nekrotyczne) poddanych 48 godzinnej inkubacji z CAPE.

* $p < 0,05$ vs. kontrola negatywna

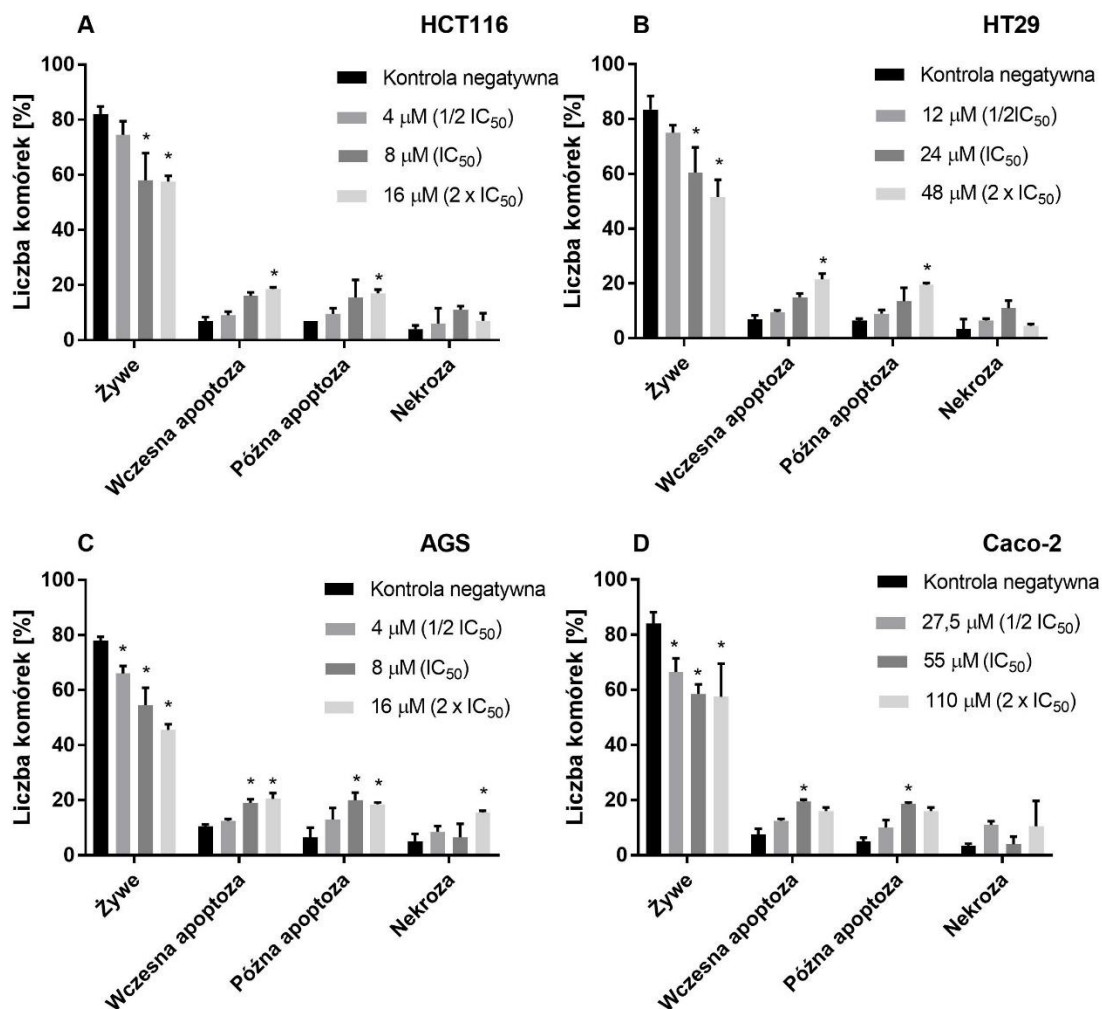
Tabela 14. Stopień indukcji (%) apoptozy i nekrozy po 48 h inkubacji komórek HCT116, HT29, AGS i Caco-2 z CAPE (wartość $\pm$ SEM)

Linia komórkowa	Seria doświadczalna	Apoptoza	Nekroza
HCT116	Kontrola	8,55% $\pm$ 0,2	3,55% $\pm$ 0,64
	4 μ M	9,24% $\pm$ 0,46	3,51% $\pm$ 0,67
	8 μ M	15,17% $\pm$ 0,29	2,08% $\pm$ 0,71
	16 μ M	15,50% $\pm$ 0,58	5,55% $\pm$ 0,17
HT29	Kontrola	8,52% $\pm$ 0,23	3,18% $\pm$ 0,36
	12 μ M	10,19% $\pm$ 0,36	4,58% $\pm$ 0,89
	24 μ M	16,11% $\pm$ 0,30	5,54% $\pm$ 0,33
	48 μ M	23,08% $\pm$ 0,85	5,52% $\pm$ 0,91
AGS	Kontrola	12,56% $\pm$ 0,28	2,54% $\pm$ 0,15
	4 μ M	13,75% $\pm$ 0,15	5,75% $\pm$ 2,08
	8 μ M	17,56% $\pm$ 0,22	6,15% $\pm$ 0,24
	16 μ M	21,22% $\pm$ 0,16	5,11% $\pm$ 0,85
Caco-2	Kontrola	13,10% $\pm$ 0,16	6,53% $\pm$ 0,17
	27,5 μ M	14,59% $\pm$ 0,19	4,19% $\pm$ 0,07
	55 μ M	14,11% $\pm$ 0,14	3,51% $\pm$ 0,25
	110 μ M	18,57% $\pm$ 0,25	3,59% $\pm$ 0,29

CAPE – 72 h inkubacja

72 h inkubacja komórek linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2 z CAPE spowodowała dawko-zależny spadek żywotności komórek wszystkich badanych linii (Rycina 30A-D). Istotny wzrost populacji komórek nekrotycznych odnotowano jedynie dla komórek linii AGS po ich inkubacji z CAPE w najwyższym z zastosowanych stężeń ($2 \times IC_{50}$) (Rycina 30C). Po 72 h inkubacji komórek linii HCT116, HT29 oraz AGS z CAPE w najwyższym stężeniu równym wartości $2 \times IC_{50}$ zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczby komórek będących we wczesnej i później fazie apoptozy (Rycina 30A i B). Podobny efekt odnotowano w przypadku ekspozycji komórek linii AGS na działanie CAPE w stężeniu równym wartości IC_{50} (Rycina 30C).

W Tabeli 15 zostały przedstawione udziały procentowe komórek podlegających apoptozie i nekrozie po 72 h inkubacji badanych komórek z CAPE.



Rycina 30. Procentowy udział poszczególnych populacji komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne i nekrotyczne) poddanych 72 godzinnej inkubacji z CAPE.

* $p < 0,05$ vs. kontrola negatywna

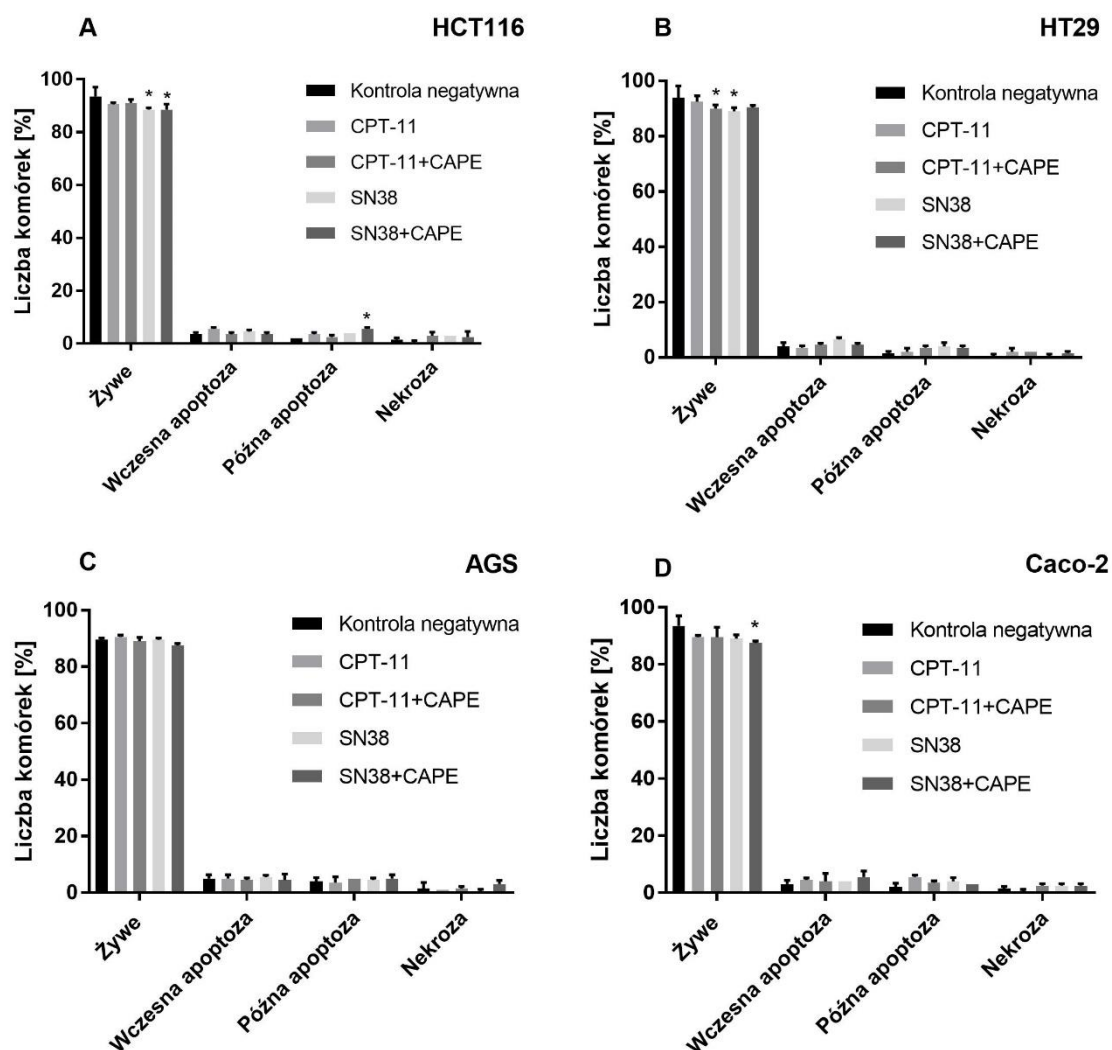
Tabela 15. Stopień indukcji (%) apoptozy i nekrozy po 72 h inkubacji komórek HCT116, HT29, AGS i Caco-2 z CAPE (wartość $\pm$ SEM).

Linia komórkowa	Seria doświadczalna	Apoptoza	Nekroza
HCT116	Kontrola	14,16% $\pm$ 0,27	3,77% $\pm$ 0,28
	4 μ M	18,51% $\pm$ 0,29	5,83% $\pm$ 0,68
	8 μ M	31,57% $\pm$ 0,46	11,22% $\pm$ 0,26
	16 μ M	35,56% $\pm$ 0,22	6,86% $\pm$ 0,41
HT29	Kontrola	13,59% $\pm$ 0,17	3,57% $\pm$ 0,64
	12 μ M	12,53% $\pm$ 0,20	60,53% $\pm$ 0,18
	24 μ M	28,52% $\pm$	11,15% $\pm$ 0,44
	48 μ M	40,87% $\pm$ 0,23	4,54% $\pm$ 0,11
AGS	Kontrola	16,79% $\pm$ 0,27	4,92% $\pm$ 0,37
	4 μ M	25,56% $\pm$ 0,27	8,52% $\pm$ 0,29
	8 μ M	39,14% $\pm$ 0,24	6,54% $\pm$ 0,54
	16 μ M	38,97% $\pm$ 0,20	15,57% $\pm$ 0,12
Caco-2	Kontrola	12,59% $\pm$ 0,24	3,53% $\pm$ 0,14
	27,5 μ M	22,56% $\pm$ 0,26	11,13% $\pm$ 0,24
	55 μ M	37,84% $\pm$ 0,15	3,87% $\pm$ 0,15
	110 μ M	32,16% $\pm$ 0,21	10,53% $\pm$ 1,84

CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE – 24 h inkubacja

Po 24 h inkubacji komórek linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2 z samym CPT-11 oraz CPT-11+CAPE i samym SN38 oraz SN38+CAPE nie odnotowano istotnego wzrostu liczby komórek apoptotycznych (Rycina 31A-D). Nieznaczny spadek liczby żywych komórek HCT116, HT29 oraz Caco-2 zaobserwowano w serii doświadczalnej, w której zastosowano sam SN38 (Rycina 31A i B) oraz SN38 w obecności CAPE (SN38+CAPE) (Rycina 31D). Dodatkowo, podobny spadek żywotności komórek HT29 odnotowano dla serii z CPT-11+CAPE (Rycina 31B).

W Tabeli 16 zostały przedstawione udziały procentowe komórek podlegających apoptozie i nekrozie po 24 h inkubacji badanych komórek z CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38, SN38+CAPE.



Rycina 31. Procentowy udział poszczególnych populacji komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne i nekrotyczne) poddanych 24 godzinnej inkubacji z CPT-11, CAPE+CPT-11, SN38 i CAPE+SN38 w stężeniach równych wartościom IC_{50} wyznaczonych dla poszczególnych linii komórkowych. * $p < 0,05$ vs. kontrola negatywna

Tabela 16. Stopień indukcji (%) apoptozy i nekrozy po 24 h inkubacji komórek HCT116, HT29, AGS i Caco-2 z CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE (wartość $\pm$ SEM).

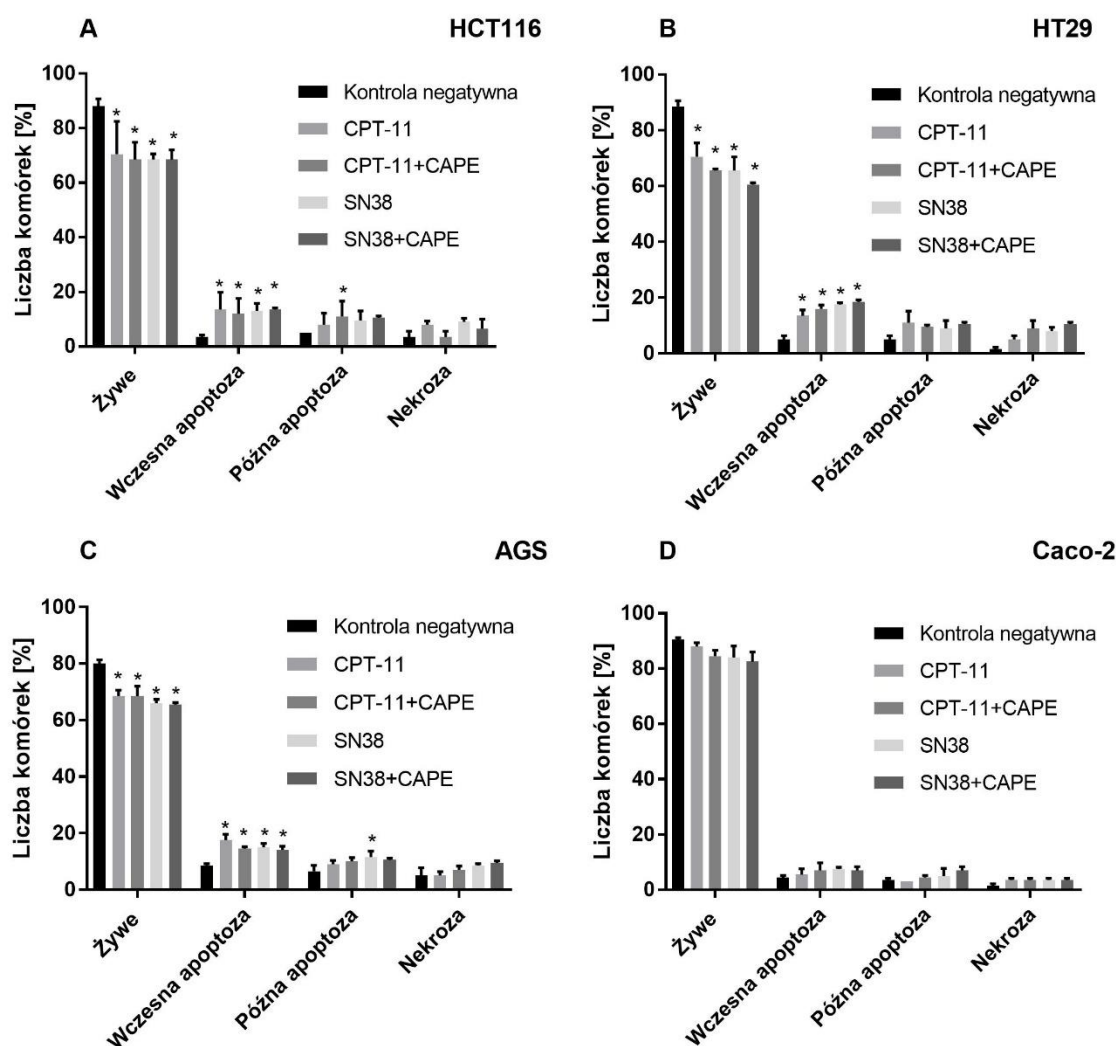
Linia komórkowa	Seria doświadczalna	Apoptoza	Nekroza
HCT116	Kontrola negatywna	5,51% $\pm$ 0,09	1,54% $\pm$ 0,12
	CPT-11	8,85% $\pm$ 0,13	0,57% $\pm$ 0,14
	CPT-11+CAPE	6,15% $\pm$ 0,16	2,77% $\pm$ 0,20
	SN38	8,54% $\pm$ 0,10	3,20% $\pm$ 0,02
	SN38+CAPE	9,20% $\pm$ 0,15	2,52% $\pm$ 0,22
HT29	Kontrola negatywna	5,52% $\pm$ 0,16	0,51% $\pm$ 0,12
	CPT-11	5,50% $\pm$ 0,15	1,97% $\pm$ 0,19
	CPT-11+CAPE	7,87% $\pm$ 0,13	2,18% $\pm$ 0,03
	SN38	10,51% $\pm$ 0,11	0,55% $\pm$ 0,13
	SN38+CAPE	7,89% $\pm$ 0,16	1,54% $\pm$ 0,14
AGS	Kontrola negatywna	9,18% $\pm$ 0,18	1,59% $\pm$ 0,21
	CPT-11	8,55% $\pm$ 0,20	0,96% $\pm$ 0,04
	CPT-11+CAPE	9,52% $\pm$ 0,06	1,54% $\pm$ 0,11
	SN38	10,17% $\pm$ 0,12	0,58% $\pm$ 0,10
	SN38+CAPE	9,51% $\pm$ 0,19	3,14% $\pm$ 0,17
Caco-2	Kontrola negatywna	4,79% $\pm$ 0,20	1,59% $\pm$ 0,13
	CPT-11	10,16% $\pm$ 0,12	0,53% $\pm$ 0,11
	CPT-11+CAPE	7,50% $\pm$ 0,20	2,56% $\pm$ 0,12
	SN38	7,84% $\pm$ 0,11	2,52% $\pm$ 0,11
	SN38+CAPE	5,51% $\pm$ 0,16	2,53% $\pm$ 0,13

CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE – 48 h inkubacja

Pod wpływem 48 h inkubacji badanych linii komórkowych z CPT-11, CPT-11+CAPE oraz SN38 i SN38+CAPE zaobserwowano istotny statystycznie spadek żywotności komórek w porównaniu z kontrolą negatywną (Rycina 32A-C). Wyjątek stanowiły komórki linii Caco-2, dla których nie odnotowano spadku żywotności komórek, jak również wzrostu liczby komórek będących we wczesnej lub późnej fazie apoptozy (Rycina 32D). Po 48 h inkubacji komórek linii HCT116, HT29 i AGS z badanymi związkami i ich kombinacją zaobserwowano istotny statystycznie procentowy wzrost frakcji komórek wczesno-apoptotycznych w porównaniu z kontrolą negatywną (Rycina 32A-C). Nie odnotowano różnic pomiędzy seriami, w których komórki inkubowane były jednocześnie z CPT-11+CAPE lub SN38+CAPE, a seriami, w których

badane komórki eksponowane były wyłącznie na działanie CPT-11 lub jego metabolitu SN38 (Rycina 32A-C).

W Tabeli 17 zostały przedstawione udziały procentowe komórek podlegających apoptozie i nekrozie po 48 h inkubacji badanych komórek z CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38, SN38+CAPE.



Rycina 32. Procentowy udział poszczególnych populacji komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne i nekrotyczne) poddanych 48 godzinnej inkubacji z CPT-11, CAPE+CPT-11, SN38 i CAPE+SN38 w stężeniach równych wartościom IC_{50} wyznaczonych dla poszczególnych linii komórkowych. * $p < 0,05$ vs. kontrola negatywna

Tabela 17. Stopień indukcji (%) apoptozy i nekrozy po 48 h inkubacji komórek HCT116, HT29, AGS i Caco-2 z CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE (wartość $\pm$ SEM).

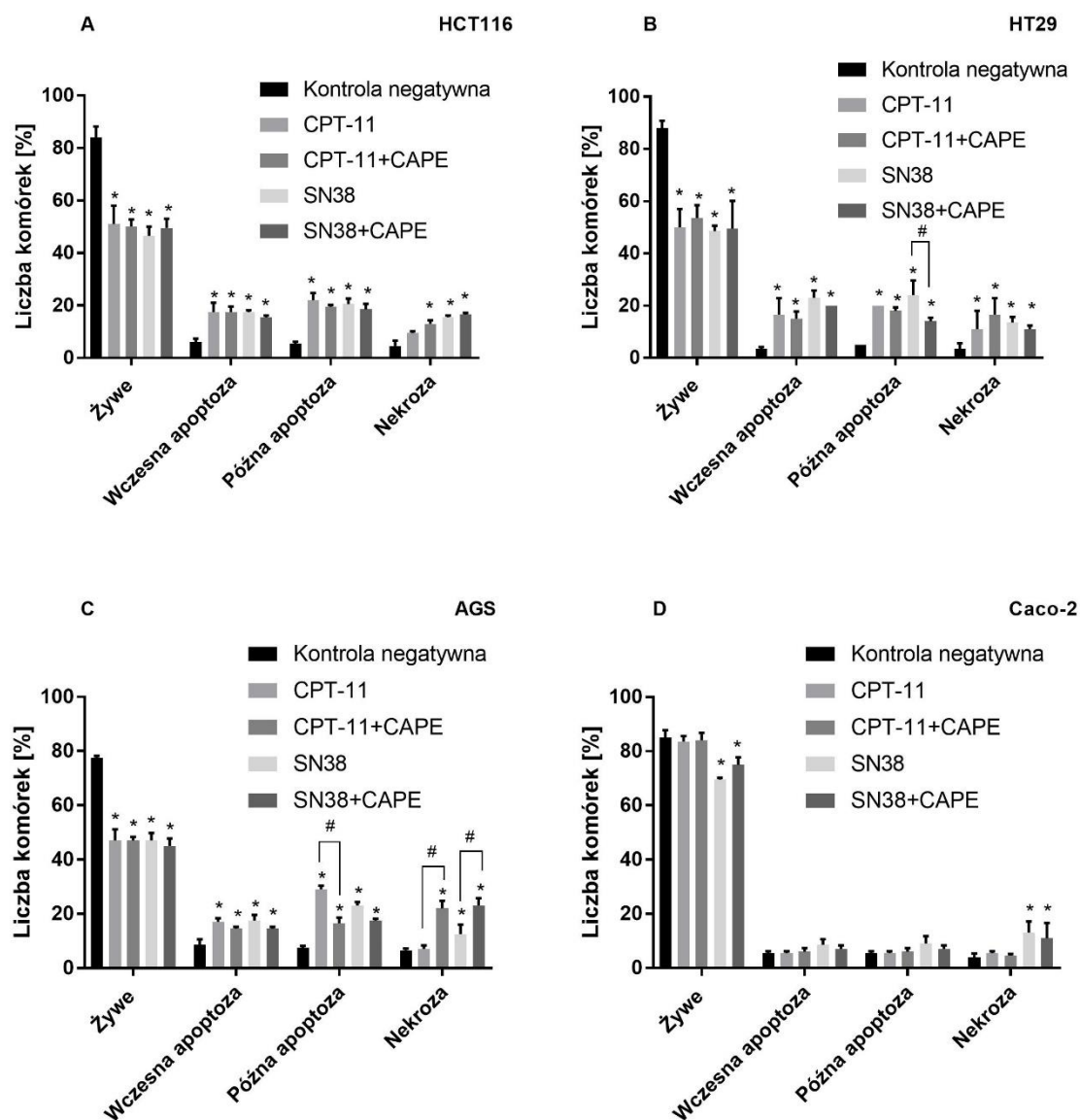
Linia komórkowa	Seria doświadczalna	Apoptoza	Nekroza
HCT116	Kontrola negatywna	8,58% $\pm$ 0,09	3,55% $\pm$ 0,34
	CPT-11	21,56% $\pm$ 0,24	7,82% $\pm$ 0,27
	CPT-11+CAPE	22,87% $\pm$ 0,86	3,54% $\pm$ 0,33
	SN38	22,54% $\pm$ 0,37	9,13% $\pm$ 0,26
	SN38+CAPE	24,05% $\pm$ 0,16	6,74% $\pm$ 0,36
HT29	Kontrola negatywna	10,19% $\pm$ 0,18	1,53% $\pm$ 0,16
	CPT-11	24,53% $\pm$ 0,34	5,15% $\pm$ 0,20
	CPT-11+CAPE	25,52% $\pm$ 0,17	9,19% $\pm$ 0,36
	SN38	26,59% $\pm$ 0,19	7,73% $\pm$ 0,19
	SN38+CAPE	28,79% $\pm$ 0,14	10,53% $\pm$ 0,11
AGS	Kontrola negatywna	15,14% $\pm$ 0,20	5,20% $\pm$ 0,23
	CPT-11	26,51% $\pm$ 0,19	5,11% $\pm$ 0,18
	CPT-11+CAPE	24,54% $\pm$ 0,17	6,89% $\pm$ 0,17
	SN38	26,58% $\pm$ 0,18	8,53% $\pm$ 0,16
	SN38+CAPE	24,55% $\pm$ 0,16	9,54% $\pm$ 0,15
Caco-2	Kontrola negatywna	7,82% $\pm$ 0,14	1,59% $\pm$ 0,13
	CPT-11	8,52% $\pm$ 0,15	3,53% $\pm$ 0,11
	CPT-11+CAPE	11,54% $\pm$ 0,20	3,51% $\pm$ 0,14
	SN38	12,57% $\pm$ 0,21	3,57% $\pm$ 0,12
	SN38+CAPE	16,92% $\pm$ 0,21	3,55% $\pm$ 0,14

CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE – 72 h inkubacja

72 h inkubacja komórek linii HCT116, HT29 i AGS z CPT-11, CPT-11+CAPE oraz z SN38 i SN38+CAPE spowodowała spadek ich żywotności (Rycina 33A-C). Jednocześnie odnotowano procentowy wzrost populacji komórek będących we wczesnej i późnej fazie apoptozy oraz frakcji komórek nekrotycznych w porównaniu z kontrolą negatywną (Rycina 33A-C). Ponadto zaobserwowano istotny spadek liczby komórek HT29 będącej w fazie późnej apoptozy po ich jednoczesnej inkubacji z SN38+CAPE w porównaniu z serią z samym SN38 (Rycina 33B). Podobne wyniki otrzymano dla komórek AGS, w odniesieniu do serii z jednoczesną inkubacją

CPT-11+CAPE w porównaniu z samym CPT-11. W komórkach linii AGS zaobserwowano także procentowy wzrost frakcji komórek nekrotycznych w wyniku ich inkubacji z CPT-11+CAPE lub SN38+CAPE w porównaniu do serii z samym lekiem/metabolitem (Rycina 33C). W przypadku komórek Caco-2 nie zaobserwowano indukcji apoptozy pod wpływem testowanych związków/układów doświadczalnych. Jednakże, zaobserwowano spadek żywotności komórek Caco-2 spowodowany działaniem SN38 i SN38+CAPE, co przełożyło się na wzrost populacji komórek nekrotycznych w porównaniu do kontroli negatywnej (Rycina 33D).

W Tabeli 18 zostały przedstawione udziały procentowe komórek podlegających apoptozie i nekrozie po 72 h inkubacji badanych komórek z CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38, SN38+CAPE.



Rycina 33. Procentowy udział poszczególnych populacji komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) (komórki żywe, wczesnoapoptotyczne, późnoapoptotyczne i nekrotyczne) poddanych 72 godzinnej inkubacji z CPT-11, CAPE+CPT-11, SN38 i CAPE+SN38 w stężeniach równych wartościom IC_{50} wyznaczonych dla poszczególnych linii komórkowych. * $p < 0,05$ vs. kontrola negatywna; # $p < 0,05$ vs. CPT-11 lub SN38

Tabela 18. Stopień indukcji (%) apoptozy i nekrozy po 72 h inkubacji komórek HCT116, HT29, AGS i Caco-2 z CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE (wartość $\pm$ SEM).

Linia komórkowa	Seria doświadczalna	Apoptoza	Nekroza
HCT116	Kontrola negatywna	11,18% $\pm$ 0,17	4,50% $\pm$ 0,23
	CPT-11	39,54% $\pm$ 0,31	9,54% $\pm$ 0,13
	CPT-11+CAPE	36,78% $\pm$ 0,22	13,07% $\pm$ 0,19
	SN38	37,79% $\pm$ 0,16	15,54% $\pm$ 0,15
	SN38+CAPE	34,18% $\pm$ 0,20	16,52% $\pm$ 0,14
HT29	Kontrola negatywna	8,53% $\pm$ 0,07	3,56% $\pm$ 0,26
	CPT-11	36,57% $\pm$ 0,19	11,13% $\pm$ 0,41
	CPT-11+CAPE	33,15% $\pm$ 0,23	16,54% $\pm$ 0,37
	SN38	47,13% $\pm$ 0,31	13,57% $\pm$ 0,17
	SN38+CAPE	34,19% $\pm$ 0,10	1,88% $\pm$ 0,23
AGS	Kontrola negatywna	17,81% $\pm$ 0,22	6,54% $\pm$ 0,13
	CPT-11	46,21% $\pm$ 0,25	7,07% $\pm$ 0,19
	CPT-11+CAPE	31,18% $\pm$ 0,20	22,11% $\pm$ 0,28
	SN38	40,59% $\pm$ 0,22	12,53% $\pm$ 0,29
	SN38+CAPE	32,17% $\pm$ 0,16	23,03% $\pm$ 0,30
Caco-2	Kontrola negatywna	11,19% $\pm$ 0,16	4,16% $\pm$ 0,23
	CPT-11	11,22% $\pm$ 0,15	5,55% $\pm$ 0,11
	CPT-11+CAPE	11,79% $\pm$ 0,21	4,58% $\pm$ 0,13
	SN38	17,54% $\pm$ 0,24	13,20% $\pm$ 0,26
	SN38+CAPE	14,07% $\pm$ 0,22	11,09% $\pm$ 0,34

IV. 4.2. Ocena aktywności kaspaz 3/7 przy użyciu zestawu analitycznego ApoTox-Glo™ Triplex Assay

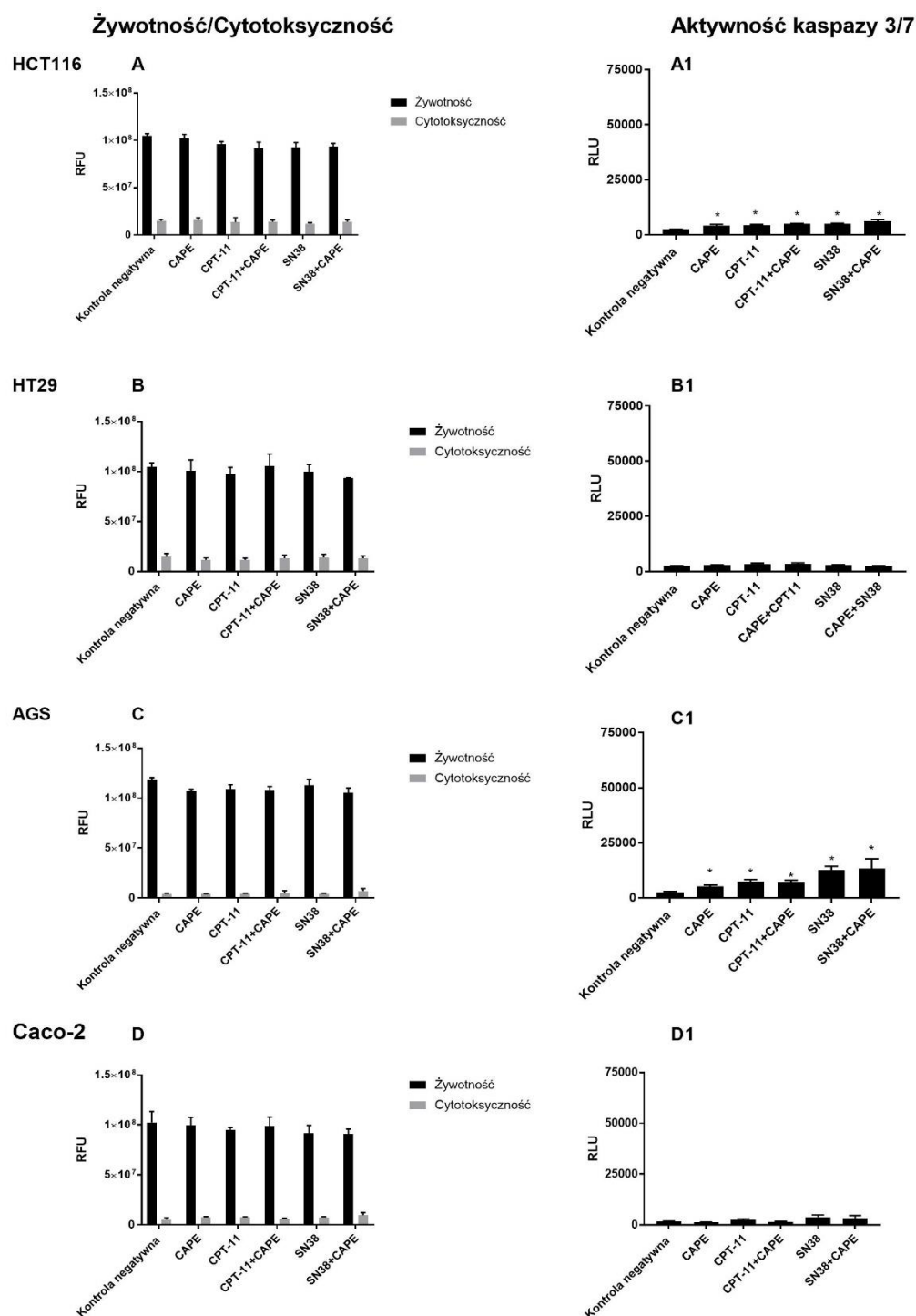
Właściwości proapoptotyczne CAPE, w zastosowanych układach doświadczalnych, zostały ocenione przy użyciu multipleksowego systemu analitycznego ApoTox-Glo™ Triplex Assay poprzez pomiar aktywności kaspaz 3/7 w komórkach linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2. Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 24 h, 48 h i 72 h w układach badawczych przedstawionych w Tabeli 8 w rozdziale III. 3.5.1. Pomiarów dokonano przy użyciu

wielofunkcyjnego czytnika mikropłytek SpectraMax i3 Multit-Mode Microplate Detection Platform (Molecular Devices). Otrzymane wyniki zostały przedstawione na Rycinach 34-35.

CPT-11+ CAPE oraz SN38+CAPE

24 h inkubacja

24 h inkubacja z: CAPE, CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE nie wpłynęła na aktywność proteolityczną w komórkach HCT116, HT29, AGS i Caco-2 względem komórek kontroli negatywnej. Jednocześnie w komórkach linii AGS i HCT116 zaobserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności kaspaz 3/7 we wszystkich badanych seriach doświadczalnych w porównaniu z kontrolą negatywną. Jedynie w przypadku linii HT29 nie zaobserwowano ww. efektu. Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy serią komórek traktowanych wyłącznie lekiem/metabolitem, a serią w której jednocześnie z CPT-11 i SN38 zastosowano CAPE (Rycina 34).



Rycina 34. Poziom żywotności, cytotoksyczności (panel lewy A-D) i aktywności kaspaz 3/7 (panel prawy A1-D1) po 24 h inkubacji komórek linii HCT116 (A-A1), HT29 (B-B1), AGS (C-C1) i Caco-2 (D-D1) z CAPE, CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE (średnia $\pm$ S.E.M).

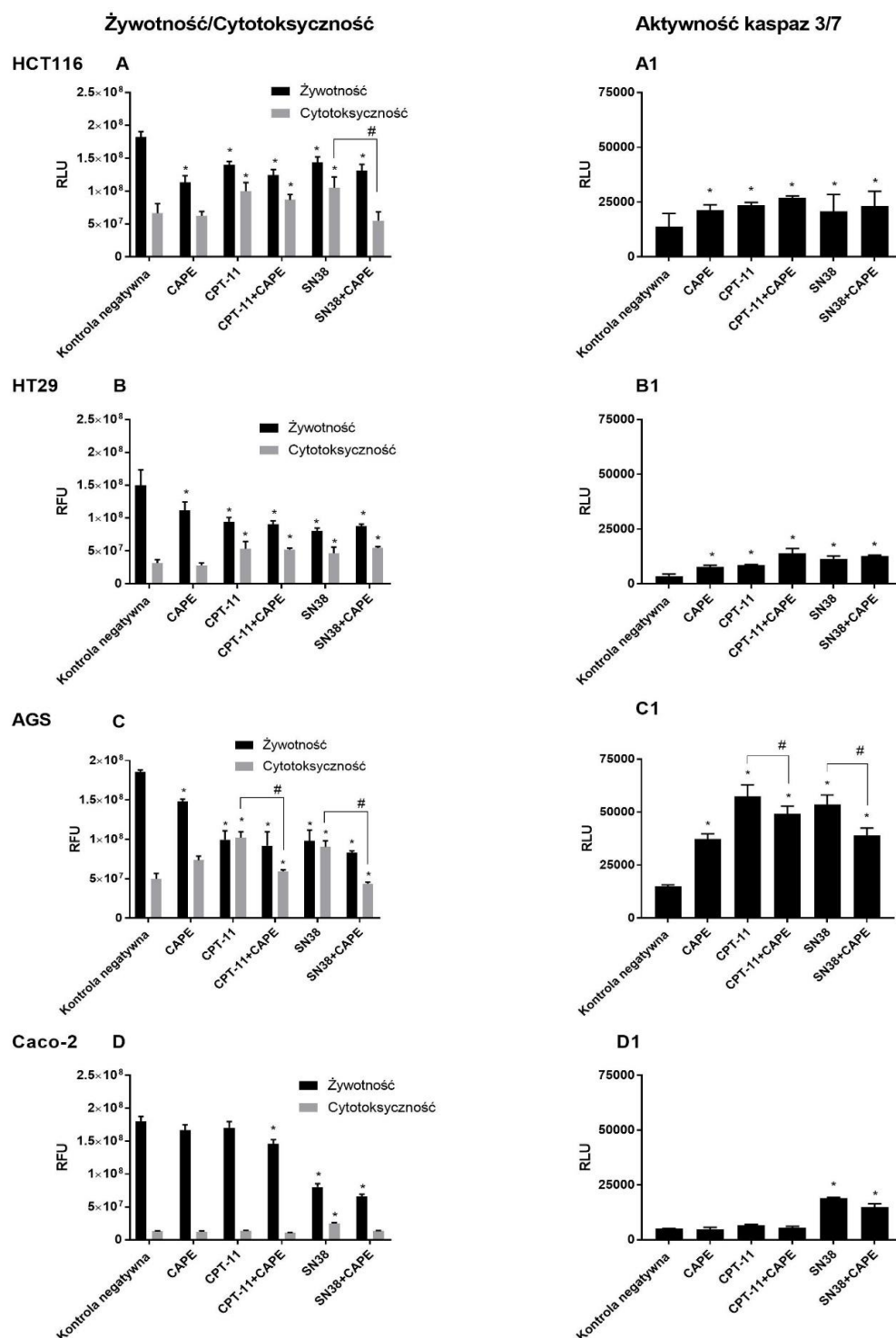
* $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną;

$p < 0,05$ w porównaniu komórkami inkubowanymi z samym CPT-11 lub SN38

RFU – względne jednostki fluorescencji; RLU – względne jednostki luminescencji

CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE**48 h inkubacja**

Po 48 h inkubacji z CAPE, CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE w komórkach linii HCT116, HT29 i AGS zaobserwowano wzrost aktywności kaspaz 3/7 przy jednoczesnym spadku żywotności komórek i wzrostem aktywności cytotoksycznej badanych związków w porównaniu z kontrolą negatywną (Rycina 35A-D). W komórkach linii HCT116 zaobserwowano wpływ CAPE (seria doświadczalna SN38+CAPE) na zmniejszenie efektu cytotoksycznego SN38 w porównaniu do serii z samym SN38 (Rycina 35A). Najbardziej wrażliwe na działanie testowanych związków okazały się być komórki linii AGS, w których odnotowano najwyższy wzrost aktywności kaspaz 3/7. Jednocześnie w komórkach tej linii zaobserwowano, że zastosowanie CAPE razem z lekiem/metabolitem istotnie wpływa na zmniejszenie aktywności kaspaz 3/7 oraz na aktywność cytotoksyczną w porównaniu do serii z samym CPT-11 lub SN38 (Rycina 35C i C1). Najmniej wrażliwe na działanie testowanych związków okazały się być komórki Caco-2, gdzie nie odnotowano wzrostu aktywności cytotoksycznej w porównaniu do komórek kontroli negatywnej (Rycina 35D). Po zastosowaniu SN38 i SN38+CAPE zaobserwowano wzrost aktywności kaspaz 3/7 w stosunku do kontroli negatywnej (Rycina 35D1).



Rycina 35. Poziom żywotności, cytotoksyczności (panel lewy A–D) i aktywności kaspaz 3/7 (panel prawy A1–D1) po 48 h inkubacji komórek linii HCT116 (A–A1), HT29 (B–B1), AGS (C–C1) i Caco-2 (D–D1) z CAPE, CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE (średnia $\pm$ S.E.M).

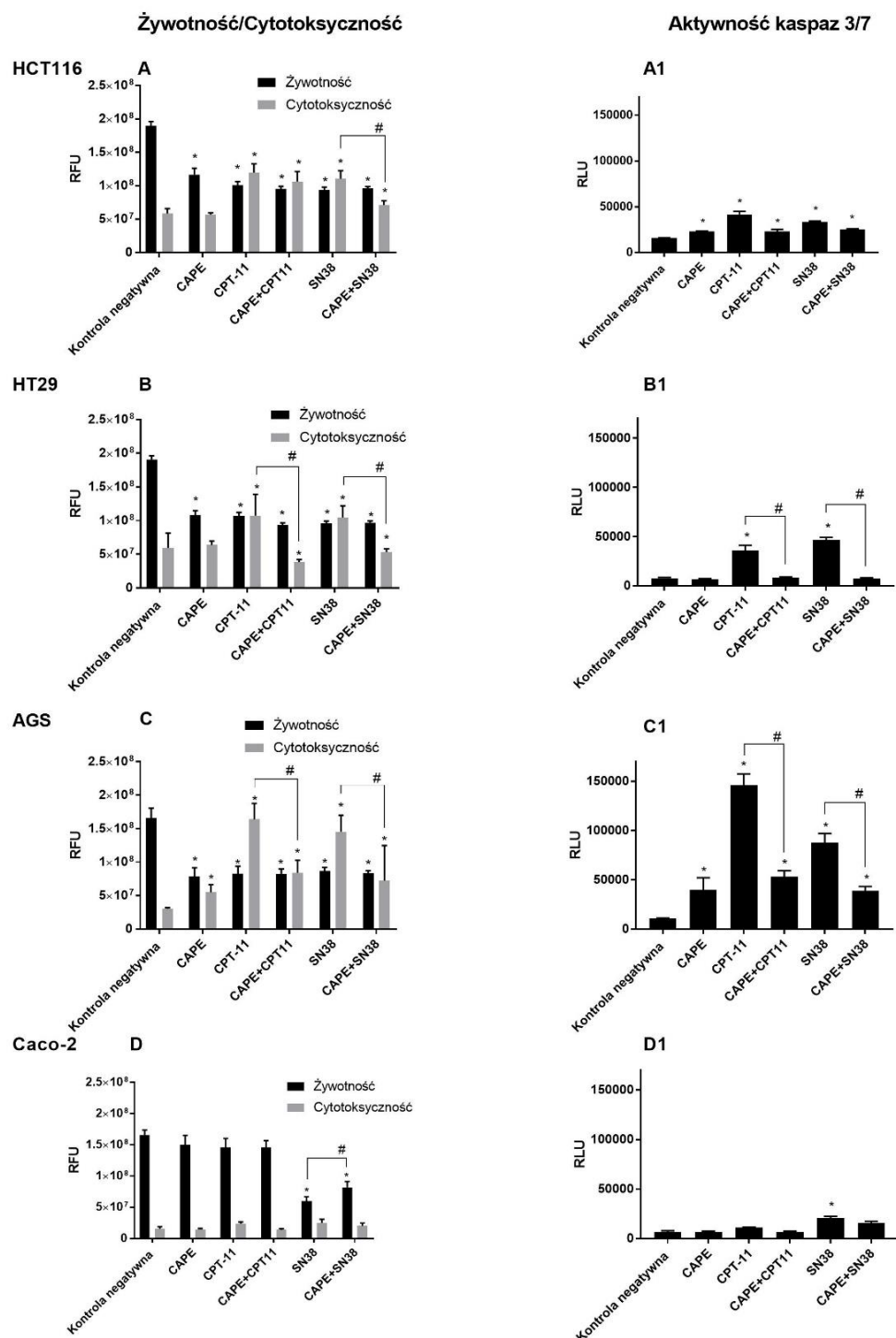
* $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną;

$p < 0,05$ w porównaniu z komórkami inkubowanymi z samym CPT-11 lub SN38

RFU – względne jednostki fluorescencji; RLU – względne jednostki luminescencji

CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE**72 h inkubacja**

Najmniej wrażliwe na 72 godzinne działanie testowanych związków okazały się być komórki Caco-2, gdzie zaobserwowano wzrost żywotności komórek po jednoczesnej inkubacji SN38+CAPE w stosunku do samego SN38 (Rycina 36C). Po 72 h inkubacji komórek z CAPE, CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE odnotowano istotny statystycznie spadek żywotności komórek HCT116, HT29 i AGS oraz wzrost aktywności cytotoksycznej badanych związków i układów doświadczalnych w porównaniu z kontrolą negatywną (Rycina 36A-C). Z kolei, po 72 h inkubacji komórek linii HCT116 i AGS zaobserwowano zmniejszenie aktywności kaspaz 3/7 w seriach doświadczalnych CPT-11+CAPE i SN38+CAPE w porównaniu do serii z samym lekiem/metabolitem (Rycina 36A1 i C1).



Rycina 36. Poziom żywotności, cytotoksyczności (panel lewy A-D) i aktywności kaspaz 3/7 (panel prawy A1-D1) po 72h inkubacji komórek linii HCT116 (A-A1), HT29 (B-B1), AGS (C-C1) i Caco-2 (D-D1)) z CAPE, CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE (średnia $\pm$ S.E.M).

* $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną;

$p < 0,05$ w porównaniu z komórkami inkubowanymi z samym CPT-11 lub SN38

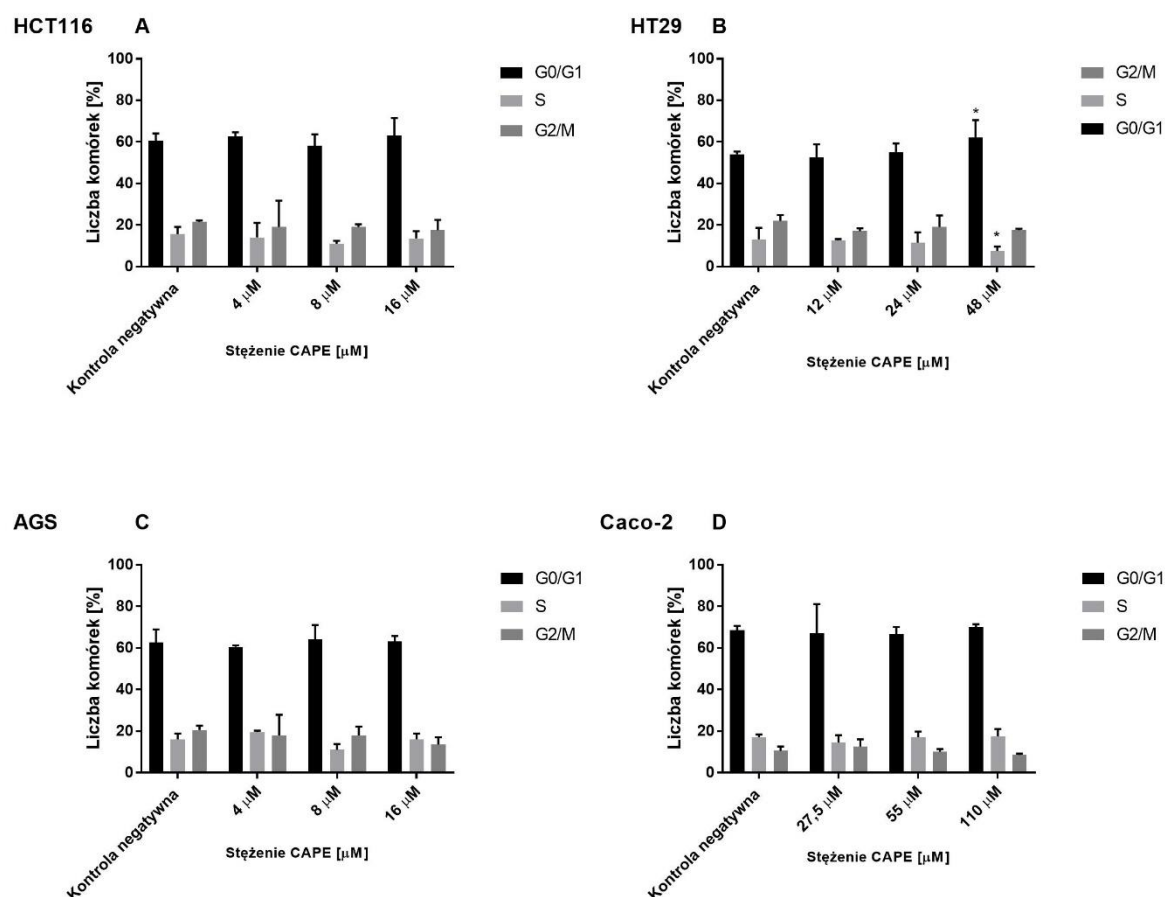
RFU – względne jednostki fluorescencji; RLU – względne jednostki luminescencji

IV. 5. Analiza przebiegu cyklu komórkowego i jego poszczególnych faz

Analizę cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometru przepływowego przeprowadzono przy użyciu jodku propidyny (PI). Komórki linii AGS, HCT116, HT29 i Caco-2 inkubowano z testowanymi związkami przez 24 h, 48 h i 72 h. Pomiary wykonywano na cytometrze przepływowym Becton Dickinson LSR II. Do analizy wyników wykorzystano oprogramowanie Flow Jo 7.5.5.

CAPE – 24 h inkubacja

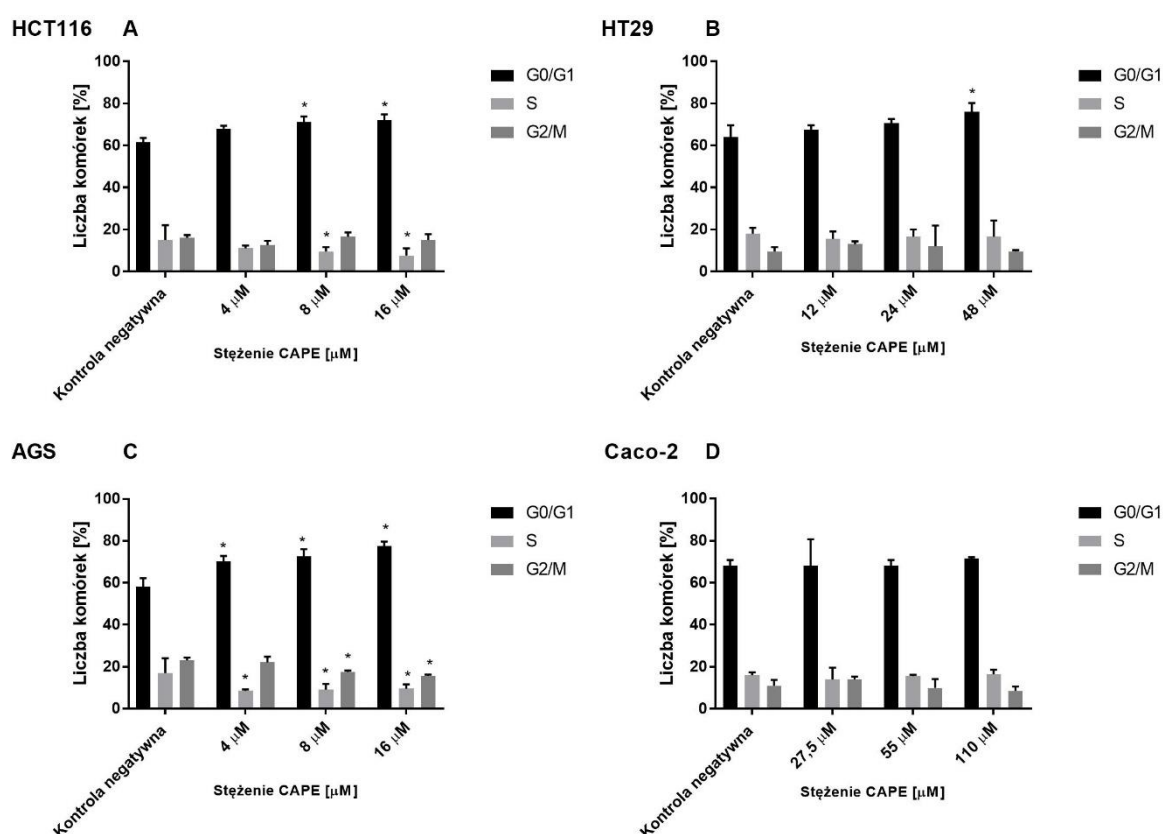
24 h inkubacja z CAPE nie wykazała, żadnych istotnych statystycznie zmian w przebiegu cyklu komórkowego i jego poszczególnych faz w komórkach linii HCT116, AGS i Caco-2 w porównaniu do komórek kontroli negatywnej (Rycina 37A, C i D).



Rycina 37. Procentowy rozkład komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego inkubowanych przez 24 h z CAPE w stężeniu równym wartościom $\frac{1}{2}IC_{50}$, IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ (średnia $\pm$ S.E.M). * $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną

CAPE – 48 h inkubacja

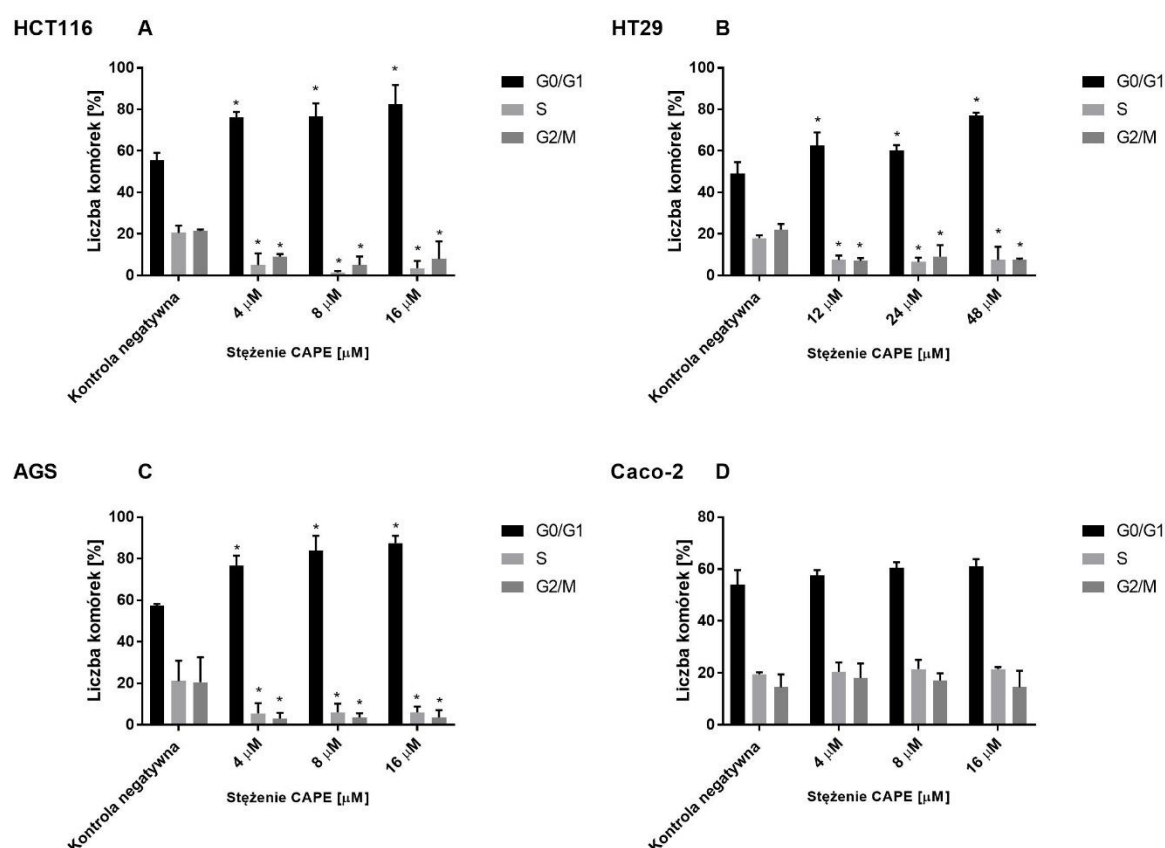
Wyniki 48 h inkubacji komórek linii HCT116 z 8 μM i 16 μM CAPE wykazały istotny statystycznie wzrost liczby komórek znajdujących się w fazie G0/G1, oraz zmniejszenie się liczby komórek w fazie S w stosunku do kontroli negatywnej (Rycina 38A). Podobną zależność zaobserwowano w komórkach linii AGS inkubowanych z 4 μM CAPE. Z kolei, wyższe stężenia CAPE (8 μM i 16 μM) spowodowały, dodatkowo, zmniejszenie się liczby komórek będących w fazie G2/M (Rycina 38C). W przypadku komórek linii HT29 dopiero najwyższe z zastosowanych stężeń CAPE (48 μM) spowodowało istotny wzrost liczby komórek w fazie G0/G1 (Rycina 38B). Natomiast, w komórkach linii Caco-2, nie zaobserwowano żadnych zmian w przebiegu cyklu komórkowego oraz jego poszczególnych faz w porównaniu do komórek kontroli negatywnej (Rycina 38D).



Rycina 38. Procentowy rozkład komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego inkubowanych przez 48 h z CAPE w stężeniu równym wartościom $\frac{1}{2}IC_{50}$, IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ (średnia $\pm$ S.E.M). * $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną

CAPE – 72 h inkubacja

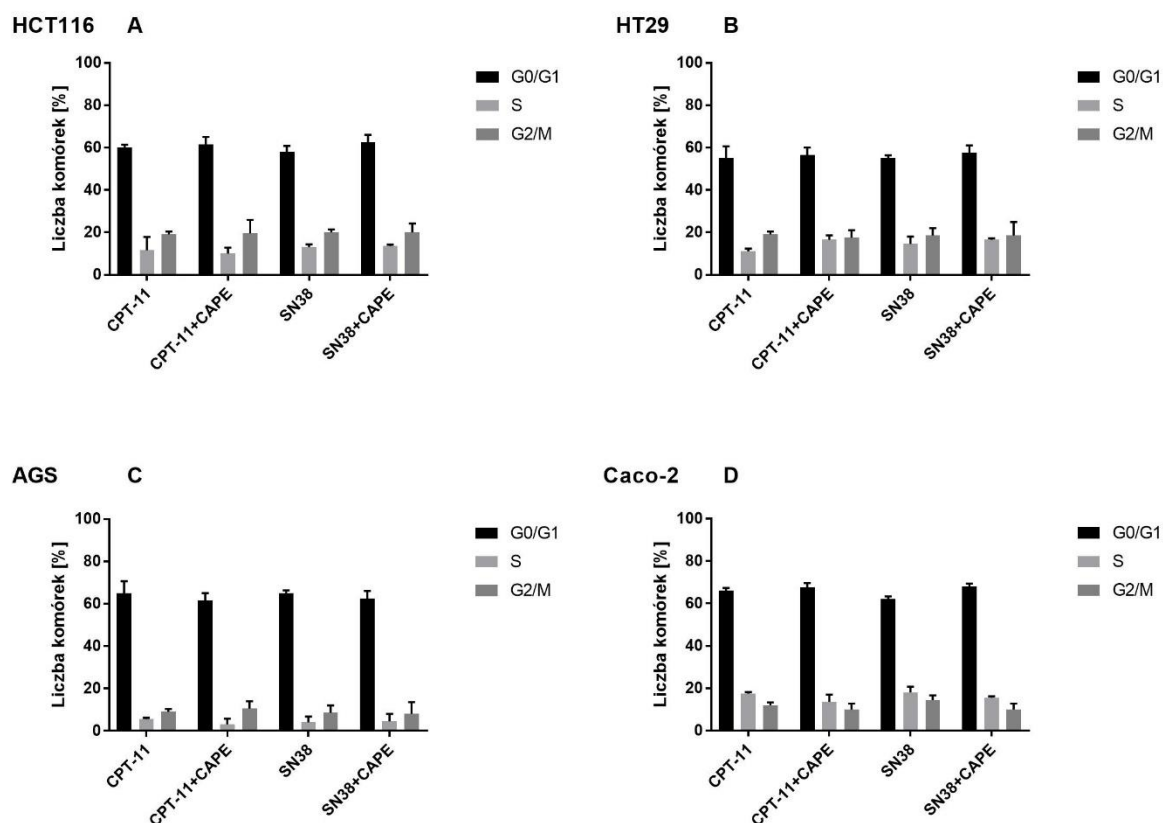
72 h inkubacja komórek linii HCT116, HT29 i AGS z CAPE spowodowała, istotny statystycznie, wzrost liczby komórek będących w fazie G0/G1. Jednocześnie, odnotowano zmniejszenie liczby komórek będących w fazie S i G2/M (Rycina 39A-C). W komórkach linii Caco-2 nie zaobserwowano zmian w przebiegu cyklu komórkowego w porównaniu do kontroli negatywnej (Rycina 39D).



Rycina 39. Procentowy rozkład komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego inkubowanych przez 72 h z CAPE w stężeniu równym wartościom $\frac{1}{2}IC_{50}$, IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ (średnia $\pm$ S.E.M). * $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną

CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE – 24 h inkubacja

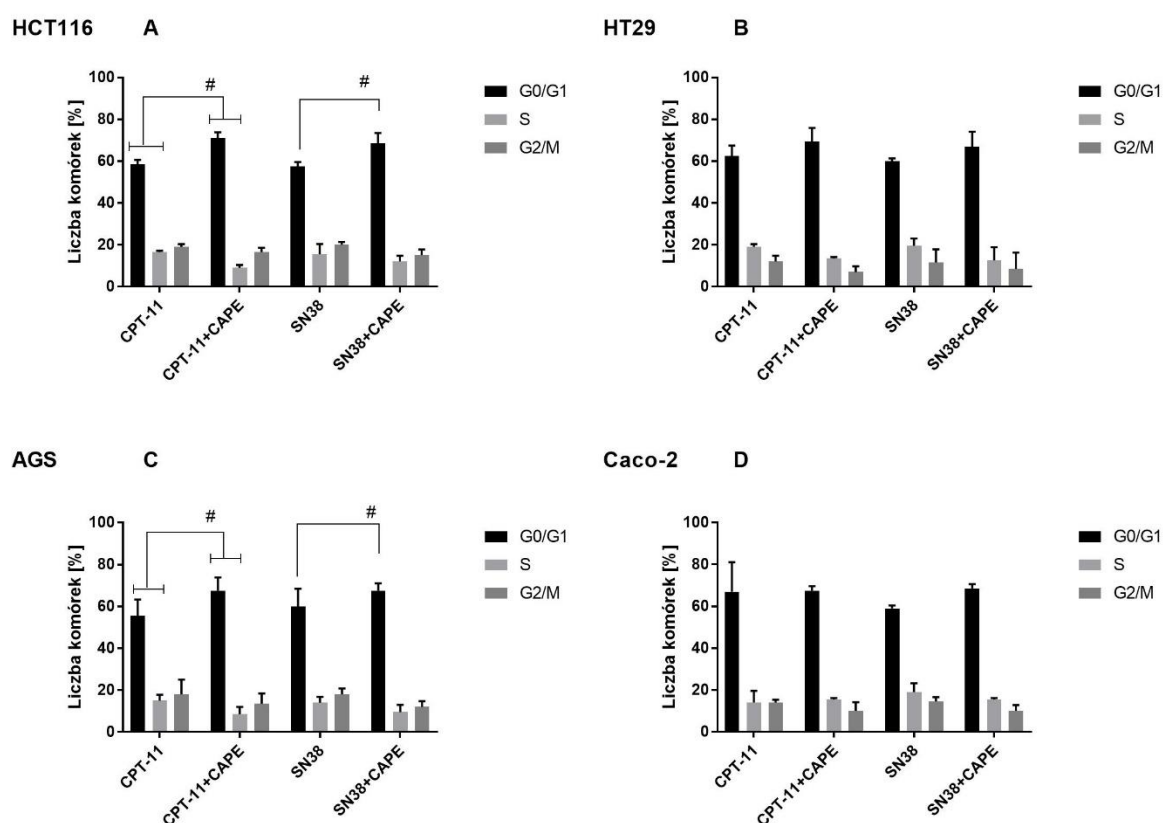
24 h inkubacja z: CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38 i SN38+CAPE nie wpłynęła na zmiany w cyklu komórkowym komórek linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2 względem kontroli negatywnej (Rycina 40A-D)



Rycina 40. Procentowy rozkład komórek linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) w poszczególnych fazach cyklu komórkowego inkubowanych przez 24 h z CPT-11, CPT-11+CAPE, SN38, SN38+CAPE (średnia $\pm$ S.E.M). * $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą negatywną

CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE – 48 h inkubacja

48 h inkubacja komórek linii HCT116 oraz AGS z CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE spowodowała istotny statystycznie wzrost liczby komórek będących w fazie G0/G1 w porównaniu do serii odpowiednio z samym CPT-11 oraz SN38. W przypadku komórek linii HT29 i Caco-2 nie zaobserwowano takiego efektu (Rycina 41A-D).

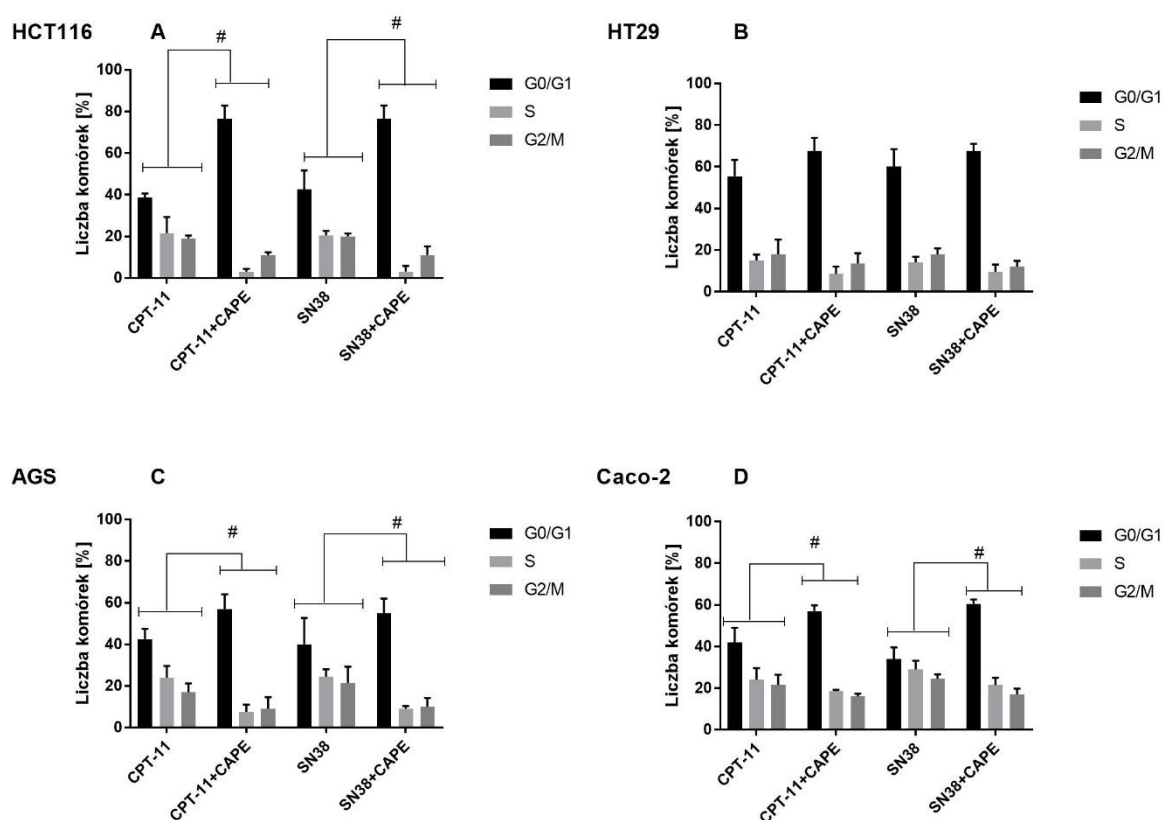


Rycina 41. Procentowy rozkład poszczególnych faz cyklu komórkowego w komórkach linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) inkubowanych przez 48 h z CPT-11, CPT11+CAPE, SN38, SN38+CAPE (średnia $\pm$ S.E.M).

$p < 0,05$ w porównaniu z komórkami inkubowanymi z samym CPT-11 lub SN38 (kontrola pozytywna)

CPT-11+CAPE oraz SN38+CAPE – 72 h inkubacja

Analiza faz cyklu komórkowego po 72 h inkubacji z CPT-11+CAPE i SN38+CAPE komórek linii HCT116, AGS oraz Caco-2 wykazała istotny statystycznie wzrost liczby komórek w fazie G0/G1 w porównaniu do serii z odpowiednio samym CPT-11 oraz SN38. Jednocześnie w komórkach tych zaobserwowano zmniejszenie się liczby komórek będących w fazach S oraz G2/M (Rycina 42A, C, D). W przypadku komórek HT29 nie zaobserwowano podobnych zmian w analizie cyklu komórkowego (Rycina 42B).



Rycina 42. Procentowy rozkład poszczególnych faz cyklu komórkowego w komórkach linii HCT116 (A), HT29 (B), AGS (C) i Caco-2 (D) inkubowanych przez 72 h z CPT-11, CPT11+CAPE, SN38, SN38+CAPE (średnia $\pm$ S.E.M).

$p < 0,05$ w porównaniu z komórkami inkubowanymi z samym CPT-11 lub SN38 (kontrola pozytywna)

Rozdział V

Dyskusja

V. DYSKUSJA

Nowotwory złośliwe stanowią poważny problem zdrowia publicznego na świecie. Według raportów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) choroby nowotworowe stanowią drugą przyczynę śmierci wśród ludzi (Siegel i wsp., 2019). Do najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych na świecie należą: rak płuca, rak piersi oraz rak jelita grubego. Natomiast, najczęstszą przyczyną zgonów stanowią rak płuca, rak wątroby i rak żołądka (Lewandowska i wsp., 2019). Rozwój nowotworu złośliwego związany jest zarówno z czynnikami środowiskowymi i stylem życia, jak również z czynnikami genetycznymi i epigenetycznymi. Transformacja nowotworowa to wieloetapowy proces, polegający na przekształceniu się komórki prawidłowej w komórkę nowotworową. Poprzez proces metastazy komórki nowotworowe mogą przemieszczać się z ich pierwotnego miejsca i osadzać się w otaczających lub odległych tkankach, odpowiednio, przez macierz pozakomórkową (ECM) lub strumień krwi/chłonnki. Jest to złożone, wieloetapowe zjawisko, polegające na wzajemnym oddziaływaniu kilku czynników, które umożliwiają komórkom nowotworowym nabycie inwazyjności i wprowadzenie ich do układu krążenia, przetrwanie w krwiobieg lub limfie, utworzenie mikrowaskulatury i ekstrawazy celem zaindukowania masy nowotworowej w odległych organach. Wymienione etapy obejmują aktywację kilku procesów na poziomie komórkowym, w tym przejście fenotypu epitelialnego w mezenchymalny (tranzycja EMT), ruchliwość, adhezję i inwazyjność, które są regulowane przez aktywację onkogenów, proteaz i innych składników środowiska nowotworowego oraz inaktywację białek będących inhibitorami nowotworów i czynników pośredniczących w apoptozie (Lamouille i wsp., 2014). Leki onkoterapeutyczne są najczęściej ukierunkowane na pronowotworowe szlaki sygnalizacyjne. Większość dostępnych chemioterapeutyków oddziałuje także na prawidłowe komórki organizmu, powodując niepożądane skutki uboczne, w tym niską odpowiedź immunologiczną, wypadanie włosów, zmęczenie, mdłości, biegunki i zaburzenia równowagi hormonalnej. Ponadto, większość leków przeciwnowotworowych wykazuje niską skuteczność w przypadku przerzutowych komórek nowotworowych, co prowadzi do niepowodzenia leczenia lub nawrotu choroby. Chemo- i radiooporność komórek nowotworowych oraz niespecyficzna toksyczność leków chemicznych wobec prawidłowych komórek są głównymi przeszkodami w skutecznym leczeniu nowotworów. Z kolei, naturalne substancje chemiczne ze względu na swoje bezpieczeństwo, dostępność i aspekty ekonomiczne, stają się coraz bardziej popularne w badaniach mających na celu zrozumienie ich działań profilaktycznych i wspomagających leczenie.

Testy żywotności komórek i cytotoksyczności służą do analizy morfologicznych lub metabolicznych zmian komórek żywych lub martwych. Badania żywotności opierają się głównie na pomiarze fizjologicznych lub biochemicznych markerów wskazujących na zachowanie

integralności błony, np. mogą wykrywać białka cytozolowe, które nie powinny być uwalniane przez komórkę, chyba, że komórka utraciła integralność błony. W niniejszej pracy do oceny żywotności komórek pod wpływem testowanych układów związków wykorzystano test MTT. Metoda ta opiera się na pomiarze aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach aktywnych metabolicznie, których ciągłość błony jest zachowana. W ściśle określonych warunkach aktywność metaboliczna komórek, jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek. Uzyskane wyniki badań wskazują, że dodanie CAPE do medium hodowlanego skutkuje zahamowaniem aktywności metabolicznej komórek nowotworowych. CAPE charakteryzował się wysoką aktywnością cytotoksyczną w stosunku do linii AGS oraz HCT116, dla których wartość IC_{50} wynosiła 8 μM . Nieco niższą aktywność cytotoksyczną CAPE zaobserwowano w przypadku linii HT29, dla której wyznaczona wartość IC_{50} to 24 μM . Podobny zakres dawek cytotoksycznych CAPE potwierdzają badania uzyskane w licznych eksperymentach dotyczących działania estru fenyloetylowego kwasu kawowego na komórki różnych linii nowotworowych m. in.: płuc, jelita, trzustki oraz glejaka (Chen i wsp., 2004; Kuo i wsp., 2006; Xiang i wsp., 2006; Chen i wsp., 2008; Choi i wsp., 2010; Chiang i wsp., 2014). Powyższe informacje wskazują, że działanie cytotoksyczne CAPE ma charakter uniwersalny, a nie jest specyficzny tylko dla niektórych typów komórek linii nowotworowych. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki dotyczące cytotoksyczności CPT-11 oraz SN38, również znajdują potwierdzenie w doniesieniach publikacyjnych innych autorów (Dell'Erba i wsp., 2005, Chen i wsp., 2018).

Nowoczesna onkologia dysponuje szerokim wachlarzem chemioterapeutyków stosowanych klinicznie. Nadrzędnym celem w poszukiwaniach efektywnych związków o potencjale przeciwnowotworowym jest opracowanie takich związków chemicznych, które będą eliminować nieprawidłowe komórki, nie wywierając niszczącego działania na komórki prawidłowe. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że komórki Caco-2 stanowiące linię referencyjną komórek prawidłowych były najmniej wrażliwe na cytotoksyczną aktywność CAPE. Komórki Caco-2, oprócz wielu podobieństw morfologicznych i biochemicznych do prawidłowych enterocytów, wykazują podobnie jak one, aktywność glikoproteiny P-gp, co może prowadzić do zmniejszenia stężenia substancji leczniczej w komórkach na skutek działania ww. białka transportowego. Uzyskane w pracy wyniki dotyczące cytotoksyczności CAPE wydają się potwierdzać ww. zależność. Z kolei, preferencyjny, cytotoksyczny charakter CAPE, tylko w stosunku do komórek nowotworowych wykazali Grunberger i wsp., którzy zaobserwowali, że linie komórek nowotworowych (raka piersi oraz czerniaka) wykazywały znacznie wyższą wrażliwość na działanie CAPE niż linie komórek prawidłowych (Grunberger i wsp., 1988). Podobne wyniki otrzymali Saarem i wsp., którzy badali antynowotworowy potencjał CAPE w stosunku do komórek nowotworowych jamy ustnej. Wykazali, że zarówno, żywotność, jak i zdolność do proliferacji komórek nowotworowych jamy ustnej, zostały istotnie zmniejszone

i zahamowane pod wpływem działania CAPE. Natomiast, w prawidłowych komórkach HGF-1 nie zaobserwowano ww. efektów spowodowanych działaniem CAPE (Saarem i wsp., 2019). Cytotoksyczność CAPE oceniano także w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) oraz prawidłowych fibroblastach płuc (WI-38). Komórki A549 ekspozowane na działanie CAPE wykazywały wyraźne zahamowanie tempa proliferacji (60%) po 48 h inkubacji. W tym samym czasie liczba żywych komórek zmniejszyła się do 46% wartości kontrolnej. Natomiast, komórki WI-38, w tych samych warunkach doświadczalnych, wykazywały 20% zahamowanie tempa proliferacji, bez zmiany liczby komórek żywych (Chen i wsp., 2004). Komórki nowotworowe charakteryzuje wysokie, nieograniczone tempo proliferacji, przez co są bardziej podatne na działanie leków niż komórki prawidłowe. Wymaganą do przemian metabolicznych energię pozyskują w wyniku rozpadu wysokoenergetycznych wiązań ATP, którego źródłem jest glikoliza i w mniejszym stopniu cykl Krebsa. Wysoka aktywność procesu glikolizy w komórkach nowotworowych związana jest z faktem bardzo wydajnego pobierania przez nie glukozy (Chen i wsp., 2016). Wykazano, że CAPE znacząco obniża stężenie glukozy poprzez indukowanie ekspresji mRNA glukokinazy i kinazy pirogronianowej, hamując jednocześnie ekspresję karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (Lee i wsp., 2008; Celik i wsp., 2009).

Koinkubacja CAPE z irinotekaniem (CPT-11) lub jego metabolitem (SN38) nie wpływała na zmiany wartości IC_{50} wyznaczone dla linii komórek nowotworowych przewodu pokarmowego poddanych działaniu samego CPT-11 lub SN38. Wyniki otrzymane po zastosowaniu stężeń powyżej wartości IC_{50} dla CPT-11 i serii doświadczalnych CPT-11+CAPE, wskazują na zmniejszenie potencjału cytotoksycznego leku (CPT-11) względem komórek linii HCT116, AGS oraz Caco-2. Natomiast, w przypadku komórek linii HT29 symultaniczna inkubacja komórek z CPT-11 i CAPE spowodowała zwiększenie efektu cytotoksycznego irinotekanu. Porównywalne wyniki zostały otrzymane dla serii doświadczalnej SN38+CAPE, w której badany ester nieznacznie zmniejszył cytotoksyczny efekt działania SN38 w komórkach linii HT29 oraz HCT116. Natomiast, w komórkach linii AGS zastosowanie CAPE razem z SN38 nie spowodowało zmian aktywności cytotoksycznej metabolitu. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wykazały, że CAPE działa antagonistycznie względem potencjału cytotoksycznego irinotekanu i SN38. Podobne badania zostały przeprowadzone przez Lin i wsp., którzy testowali modulatorowy efekt CAPE względem chemioterapeutycznej aktywności etopozydu, paklitakselu, winblastyny, mitoksantronu i estramustyny (Lin i wsp., 2012). W komórkach nowotworu prostaty (PC-3), CAPE wykazywał antagonistyczny efekt w stosunku do antyproliferacyjnego działania etopozydu i mitoksantronu, natomiast jego wpływ na aktywność pozostałych leków był synergistyczny. Z kolei, Tolba i wsp., wykazali synergistyczne działanie CAPE względem chemioterapeutycznej aktywności paklitakselu oraz docetakselu w komórkach nowotworu prostaty (PC-3) (Tolba i wsp., 2013). Opisane wyżej różnice mogą być spowodowane odmiennymi mechanizmami aktywności

przeciwnowotworowej badanych leków oraz ich interakcji z CAPE. Cechą wspólną leków w stosunku do których CAPE wykazuje aktywność antagonistyczną, czyli etopozydu, mitoksantronu, CPT-11 i SN38, jest oddziaływanie na topoizomerazę, I lub II. Jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych szczegółowych badań.

Badania przeprowadzone w prezentowanej pracy wykazały, że w seriach doświadczalnych, w których zastosowano równoczesną inkubację CPT-11+CAPE lub SN38+CAPE w komórkach Caco-2, nastąpiło zmniejszenie cytotoksyczności indukowanej przez irinotekan oraz jego metabolit. Podobną zależność odnotowali także Fadillioglu i wsp., którzy zastosowali CAPE celem zmniejszenia kardiotoksyczności wywołanej doksorubicyną u szczurów (Fadillioglu i wsp., 2004). Również Zhang i wsp., zaobserwowali ochronny wpływ CAPE na kardiotoksyczność wywołaną przez doksorubicynę i jej działanie przeciwnowotworowe, wykazując, że CAPE znacznie złagodził toksyczność indukowaną przez doksorubicynę w komórkach H9c2 i w modelu mysim (Zhang i wsp., 2022). Z kolei, Ozen i wsp. wykazali, że zastosowanie CAPE pozwala chronić nerki przed toksycznością wywołaną cisplatyną (Ozen i wsp., 2004). Również, Kizilay i wsp. wykazali, że podawanie CAPE podczas leczenia cisplatyną zapobiega pogorszeniu się słuchu u szczurów (Kizilay i wsp., 2004).

Wyniki przeprowadzonego testu kometowego wykazały, że CAPE charakteryzuje się istotną statystycznie aktywnością genotoksyczną w stosunku do komórek nowotworowych przewodu pokarmowego wykorzystanych w poszczególnych seriach eksperymentalnych (AGS, HCT116, HT29 oraz Caco-2). Uzyskane w pracy wyniki znajdują potwierdzenie w doświadczeniach Watabe i wsp., którzy wykazali, że CAPE indukuje fragmentację DNA w komórkach PC-3 po 24 godzinnej inkubacji z wyżej wymienionym związkiem (Watabe i wsp., 2004). Najniższy efekt genotoksyczny CAPE został zaobserwowany w stosunku do komórek Caco-2. Natomiast, wyniki koinkubacji z irinotekaniem lub jego metabolitem z CAPE wskazują, że ester fenyloetylowy kwasu kawowego efektywnie wpływa na zmniejszenie ich aktywności genotoksycznej w badanych komórkach. Jedyny wyjątek stanowiły serie doświadczalne, w których zostały wykorzystane komórki linii HT29, gdzie, równoczesna aplikacja CPT-11 z CAPE do medium hodowlanego, skutkowała wyższą aktywnością genotoksyczną irinotekanu w porównaniu do serii bez udziału CAPE w próbach. Podobne badania, z wykorzystaniem komórek szpiku kostnego szczurów, przeprowadzili Yilmaz i wsp., którzy analizowali wpływ CAPE na aberracje chromosomowe indukowane cisplatyną. Dowiedli oni, że CAPE indukuje istotny statystycznie spadek liczby nieprawidłowych metafaz oraz aberracji chromosomowych w porównaniu do serii bez zastosowania estru fenyloetylowego kwasu kawowego (Yilmaz i wsp., 2010).

Antyoksydanty poprzez indukcję proapoptotycznych kaspaz (3, 7, 8, 9) skojarzone z lekiem mogą zwiększać aktywność cytotoksyczną leku poprzez ograniczenie peroksydacji

lipidów występującej w trakcie chemioterapii, na skutek stresu oksydacyjnego. Ponadto, wzrost wskaźnika apoptotycznego może wynikać z ich wpływu na hamowanie ekspresji białka Bcl-2. Badania wykazują, że antyoksydanty odgrywają ważną rolę w zwiększaniu wrażliwości komórek nowotworowych na działanie cytotoksyczne chemioterapeutyków, zwłaszcza że istnieje niewiele badań, w których oceniano wrażliwość nowotworów na zastosowanie antyoksydantów w skojarzeniu z konkretnym chemioterapeutykiem (Kontek i wsp., 2010; Kontek i wsp., 2013; Kontek i wsp., 2014).

Większość stosowanych obecnie w terapii przeciwnowotworowej chemioterapeutyków zaburza prawidłową homeostazę wielu narządów. Skuteczne leczenie antracyklinami i cytostatykami jest ograniczone ze względu na ich znaczną toksyczność. Dzięki swoim właściwościom ester fenyloetylowy kwasu kawowego może minimalizować niepożądane skutki niektórych leków przeciwnowotworowych. Dotychczas wykazano, że aktywność CAPE zapobiega peroksydacji lipidów i utlenianiu białek w nerkach, zmniejszając nefrotoksyczne działanie dokсорubicyny oraz przyczyniając się do zwiększenia skuteczności terapii (Yagmurca i wsp., 2004). Z kolei, Armagan i wsp. dowiedli, ochronny wpływ CAPE podczas stresu oksydacyjnego wywołanego metotreksatem (MTX) w komórkach jąder szczurów *in vivo* (Armagan i wsp., 2008). Wykazali także, że inkubacja komórek nerek szczurów z CAPE i MTX spowodowała znaczący wzrost aktywności SOD, CAT i GSH-Px w porównaniu z serią, w której zastosowano sam metotreksat. Podobny wynik otrzymał Uzar i wsp., którzy wykazali, że metotreksat indukujący stres oksydacyjny w mózgu szczurów, może być redukowany dzięki działaniu CAPE (Uzar i wsp., 2006). Kolejne badania dowiodły, że podawany dootrzewnowo CAPE skutecznie hamował rozwój zwłóknienia płuc, indukowanego bleomycyną (BLM) w komórkach płuc szczurów linii Sprague-Dawley. Ponadto, CAPE okazał się bardziej skuteczny niż witamina E w przeciwdziałaniu zwłóknieniu płuc indukowanemu przez BLM, wpływając zarówno na układ przeciwutleniający, jak i sekwestrację neutrofili (Ozyurt i wsp., 2004). Natomiast, Albukhari i wsp. oceniali protekcyjne działanie CAPE przeciw toksyczności indukowanej przez tamoksyfen (TAM), stosowany w leczeniu i profilaktyce raka piersi, którego ubocznym skutkiem leczenia jest hepatotoksyczność (Albukhari i wsp., 2009). Leczenie tamoksyfenem samic szczurów, powodowało zwiększenie aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT), aminotransferazy asparaginianowej (AST) i fosfatazy alkalicznej (ALP) w surowicy, zmniejszenie poziomu zredukowanego GSH w wątrobie i kumulację utlenionego glutationu (GSSG) oraz peroksydację lipidów. Ponadto, zastosowanie TAM generowało zahamowanie aktywności GSH-Red, GSH-Px, SOD i CAT. Zaobserwowano także wzrost poziomu czynnika TNF- α w wątrobie i zmiany histopatologiczne. Podanie CAPE znacząco zmniejszyło aktywność ww. enzymów w surowicy samic szczurów oraz zmniejszyło niedobór GSH, a także hamowało akumulację GSSG i peroksydację lipidów. Suplementacja CAPE znormalizowała aktywność GSH-Red, GSH-Px,

SOD i CAT, zahamowała wzrost aktywności TNF- α oraz złagodziła zmiany histopatologiczne (Albukhari i wsp., 2009). Uysal i wsp. przeprowadzili badania z udziałem zwierząt, mające na celu określenie roli ochronnej CAPE w wywołanym przez cyklofosfamid krwotocznym zapaleniu pęcherza moczowego (HC). Cyklofosfamid prowadził do wzrostu aktywności SOD, CAT i dialdehydu malonowego (MDA) w komórkach. Zastosowany w badaniu CAPE znacznie zmniejszył ww. parametry oraz złagodził obrzęk, krwotok, zapalenie i owrzodzenie błony śluzowej wywołane przez cyklofosfamid (Uysal i wsp., 2015). W niniejszej pracy odnotowaliśmy także działanie antyoksydacyjne CAPE w komórkach wszystkich badanych linii przewodu pokarmowego: AGS, HCT116 i HT29 oraz Caco-2. Wykazaliśmy także, że lepsze efekty dało zastosowanie CAPE przed induktorem stresu oksydacyjnego niż aplikacja CAPE 30 minut po działaniu H₂O₂. Może to wynikać, ze zdolności badanego związku do inhibicji czynnika NF- κ B, który odgrywa istotną rolę w indukcji stresu oksydacyjnego. Podobne wyniki otrzymali Chen i wsp., którzy badali protekcyjne właściwości CAPE przeciwko śmierci indukowanej H₂O₂ stosując test LDH w mysich komórkach nowotworu siatkówki 661W (Chen i wsp., 2012). Wykazali oni, że CAPE hamuje śmierć komórkową w sposób dawko-zależny. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy, znajdują potwierdzenie, w badaniach przeprowadzonych przez Sun i wsp., dla których modelem badawczym były komórki kardiomiocytów szczurów poddane działaniu H₂O₂ (Sun i wsp., 2017). Włączony do serii doświadczalnych CAPE, wykazywał działanie ochronne, zwiększając przeżywalność komórek poddanych stresowi oksydacyjnemu. Antyoksydacyjne właściwości CAPE zostały również potwierdzone przez Chen i wsp., którzy wykorzystali w przeprowadzonych eksperymentach monojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC). Udowodniono, że CAPE hamuje oksydazę ksantynową (źródło anionów nadadtlenkowych) (Chen i wsp., 2009) oraz peroksydację lipidów (Russo i wsp., 2002). Armagan i wsp. dowiedli, ochronne działanie CAPE w sytuacji stresu oksydacyjnego wywołanego metotreksatem w komórkach jąder szczurów *in vivo* (Armagan i wsp., 2008)

Indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych to jeden z najczęściej obserwowanych celów terapeutycznych stosowanych klinicznie chemioterapeutyków. Analiza proapoptotycznych zdolności CAPE przy użyciu cytometru przepływowego wykazała, jego wpływ na zmniejszenie żywotności komórek linii HCT116, HT29 i AGS oraz indukcję w ww. komórkach apoptozy po 48 h inkubacji, która ulegała nasileniu wraz z wydłużeniem czasu inkubacji komórek z CAPE. W związku z tym, najbardziej efektywne działanie estru fenyloetylowego kwasu kawowego odnotowano po 72 h inkubacji, co jednocześnie świadczy o utrzymującym się w poziomie CAPE komórkach nowotworowych. Potwierdzenie otrzymanych wyników znajdujemy w badaniach Kleczki i wsp. którzy analizowali indukcję apoptozy w komórkach raka jajnika OV7 (Kleczka i wsp., 2020) oraz wynikach Dziedzic i wsp., którzy wykazali, że 48 h inkubacja z CAPE skutkowała wzrostem liczby komórek apoptotycznych Detroit 562 (linia kolczystokomórkowego nowotworu

przełyku) niż inkubacja 24 h (Dziedzic i wsp., 2017). W przeprowadzonych w pracy badaniach wykazano, że jednoczesna (48 h) inkubacja komórek linii HCT116, HT29 i AGS z CPT-11 lub SN38 w obecności CAPE indukowała wzrost liczby komórek wczesnoapoptotycznych w porównaniu z serią z samym lekiem/metabolitem. Z kolei, po 72 h inkubacji zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie się liczby komórek apoptotycznych linii HT29 pod wpływem jednoczesnej inkubacji SN38+CAPE w porównaniu do serii z samym SN38. W celu potwierdzenia otrzymanych wyników przeprowadzona została analiza zdolności badanych związków do indukcji apoptozy przy pomocy zestawu multipleksowego ApoTox-Glo™ Triplex Assay, który mierzy aktywność proteaz wewnątrz żywych komórek, proteaz uwolnionych z komórki w wyniku przerwania ciągłości błony komórkowej oraz aktywność kaspaz efektorowych 3/7. Test ten potwierdził wyniki żywotności komórek HCT116, HT29 i AGS otrzymane metodą MTT oraz z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Po 72 h inkubacji odnotowano spadek żywotności badanych komórek pod wpływem działania testowanych związków w odniesieniu do kontroli negatywnej, jednak bez istotnych różnic pomiędzy seriami doświadczalnymi CPT-11+CAPE, a samym CPT-11 oraz SN38+CAPE a samym SN38. Natomiast, w wyniku jednoczesnej inkubacji CAPE z lekiem/metabolitem zauważono istotne statystycznie zmiany aktywności cytotoksycznej CPT-11 i SN38. Wykazano, że w komórkach linii HT29 i AGS, CAPE wpływał na zmniejszenie aktywności cytotoksycznej leku i jego metabolitu w porównaniu do aktywności samego leku/metabolitu, natomiast w komórkach linii nowotworowej HCT116 ester fenyloetylowy kwasu kawowego istotnie statystycznie zmniejszał aktywność cytotoksyczną jedynie SN38. Jednocześnie zauważono, że zmniejszona aktywność cytotoksyczna spowodowana CPT-11 i SN38 w obecności CAPE korespondowała ze zmniejszoną aktywnością kaspaz 3/7. Brak różnic w żywotności badanych komórek pomiędzy serią z samym lekiem/metabolitem a serią, w której do CPT-11 lub SN38 dodawany był CAPE wynikać może z jego wpływu na działanie kaspaz wykonawczych. Przeprowadzone serie doświadczalne z użyciem testu ApoTox-Glo™ Triplex Assay wykazały, że CAPE wpływa na wzrost aktywności kaspaz 3/7 w komórkach linii AGS i HCT116 już po ich 24-godzinnej inkubacji. Wyniki te korelują z wynikami Yu i wsp., którzy wykazali zdolność CAPE do aktywowania kaspazy 3 i indukowania apoptozy w komórkach YD15 (linia komórek nowotworowych śluzowo-naskórkowych), HSC-4 i HN22 (płaskonabłonkowe nowotwory jamy ustnej) (Yu i wsp., 2017). Podobne wyniki uzyskali Kabała-Dzik i wsp. oraz Dziedzic i wsp. którzy wykazali, że CAPE indukuje apoptozę w komórkach linii MDA-MB-231 (linia komórkowa nowotworu sutka) (Kabała-Dzik i wsp., 2017) i NHSCC (linia komórkowa płaskonabłonkowego nowotworu głowy i szyi) po 24-godzinnej inkubacji (Dziedzic i wsp., 2017). Również Marin i wsp. zaobserwowali, wzrost formy aktywnej kaspazy 3 wraz ze wzrostem stężenia CAPE, z jednoczesnym zmniejszeniem proformy tego kluczowego dla apoptozy enzymu (Marin i wsp., 2019). Ponadto, badania wykonane w ramach prezentowanej pracy wykazały, że

aktywność kaspaz 3/7 pod wpływem CAPE w komórkach HCT116 i AGS wzrastała wraz z czasem trwania eksperymentu, co potwierdza wcześniej otrzymane wyniki, dotyczące długotrwałej aktywności biologicznej CAPE w środowisku komórek nowotworowych. Według Jin i wsp. (2008) proapoptotyczny mechanizm działania CAPE opiera się przede wszystkim na szlaku mitochondrialnym, nie zaś za pośrednictwem receptorów śmierci (brak aktywacji receptora Fas) lub sygnałów z retikulum endoplazmatycznego.

Przeprowadzone w niniejszej pracy doświadczenia wykazały, iż pomimo proapoptotycznych właściwości badanych związków, podane jednocześnie do podłoża hodowlanego komórek nowotworowych, działają na siebie antagonistycznie. Zależność ta może wynikać z odmiennego wpływu badanych związków na aktywność czynnika NF- κ B, który zwiększa aktywność genów antyapoptotycznych, ale również zmniejsza aktywność genów proapoptotycznych. CAPE hamuje aktywność NF- κ B zapobiegając translokacji podjednostki p65 tego czynnika (Natarajan i wsp., 1996). Zastosowanie CPT-11 prowadzi do aktywacji NF- κ B w komórkach różnych linii nowotworowych jelita grubego, co może stanowić potencjalny mechanizm indukowania lekooporności przez komórki nowotworowe narażone na działanie CPT-11 (Xu i wsp., 2002). Analiza przeprowadzona przez Guo i wsp. (2004) wykazała, że transfekcja komórek nowotworowych siRNA skierowanych przeciwko podjednostce p65 NF- κ B istotnie zmniejsza indukowaną aktywację NF- κ B w odpowiedzi na leczenie CPT-11. Badania te wykazały również, że zwiększona odpowiedź na chemioterapię była związana ze wzrostem stopnia apoptozy. Natomiast, Kalthoff i wsp. (2020) w swoich badaniach wykorzystali myszy model toksyczności lekowej i wykazali, że połączenie kwasu kawowego i estru fenyloetylowego kwasu kawowego znacząco zmniejsza leukopenię, stres oksydacyjny oraz reakcję zapalną wywołaną irinotekanem. Ponadto, wykazano, że kwas kawowy + CAPE powodują zmniejszenie ilości podjednostki p65 czynnika NF- κ B, znosząc efekt jego aktywacji przez CPT-11. Według Kalthoffa i wsp. (2020) istnieje konieczność przeprowadzenia dalszych badań mających na celu ocenę wpływu kwasu kawowego + CAPE na skuteczność przeciwnowotworową irinotekanu. Można zatem przypuszczać, że hamowanie działania NF- κ B przez CAPE skutkuje zmniejszeniem lekooporności i zwiększeniem aktywności proapoptotycznej CPT-11. Rola czynnika NF- κ B w regulacji apoptozy wydaje się szczególnie istotna, gdyż w większości komórek nowotworowych jest on konstytutywnie aktywny, przez co chroni je przed wejściem na drogę apoptozy, a jednocześnie nasila ich aktywność proliferacyjną. Inhibicja aktywności NF- κ B będzie skutkować skierowaniem komórek na drogę programowanej śmierci (Shamas-Din i wsp., 2013). Według Onori i wsp. (2009) CAPE w stężeniu 20-50 μ M blokuje połączenie czynnika NF- κ B z DNA i nasila aktywność inhibitora czynnika transkrypcyjnego. Ponadto, znacząco obniża ekspresję białka Bcl-2, zwiększając aktywność proapoptotycznego białka Bax (Onori i wsp., 2009). Yu i wsp., (2014), wykazali, że berberylna (inhibitor NF- κ B) zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na

działanie CPT-11, co pozwala na zwiększenie aktywności terapeutycznej leku przy niskich jego dawkach. Jednakże, w odniesieniu do przeprowadzonych w niniejszej pracy badań z wykorzystaniem komórek nowotworowych linii HCT116, HT29 i AGS nie zaobserwowano takiego efektu. Według Amodio i wsp. (2003) CAPE blokuje apoptozę wywołaną niską zawartością potasu w komórkach ziarnistych mózdzku. Brak jest doniesień literaturowych dotyczących wpływu CPT-11 lub SN38 na stężenie jonów potasu w komórkach nowotworowych przewodu pokarmowego. W prezentowanej pracy, wykazano, że spośród trzech wykorzystanych w badaniach linii HCT116, HT29 i AGS, jedynie komórki linii HT29 były najmniej wrażliwe na działanie CAPE. Może to być spowodowane posiadaną przez te komórki mutacją w genie *TP53*, która wpływa na ich oporność na apoptozę indukowaną drogą wewnątrzkomórkową. Białko supresorowe TP53 odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi komórki na czynniki stresogenne. Aktywacja genu *TP53* powoduje zmianę w transkrypcji innych genów, które są aktywne w licznych szlakach metabolizmu komórkowego, regulacji cyklu komórkowego i apoptozy. Jednakże, Beauregard i wsp. zasugerowali że CAPE pośredniczy w indukcji apoptozy drogą niezależną od białka TP53 w komórkach MB-231 (komórki linii nowotworowej ludzkiego gruczolakoraka piersi) (Beauregard i wsp., 2015). Z kolei, Lee i wsp., (2003) wykazali, że CAPE zwiększał fosforylację TP53 oraz ekspresję białek TP53 i Bax, które mogą tworzyć heterodimery z Bcl-2 w błonie mitochondrialnej i przyspieszać apoptozę.

Szczególną uwagę zwracają wyniki otrzymane dla linii komórkowej Caco-2, która stanowiła w badaniach linię referencyjną komórek prawidłowych. W komórkach tych nie zaobserwowano indukcji apoptozy pod wpływem testowanych związków metodą cytometrii przepływowej nawet po 72 h inkubacji. Serie doświadczalne wykonane przy pomocy zestawu ApoTox-Glo™ Triplex Assay, wykazały zmniejszenie żywotności komórek i wzrost aktywności kaspaz pod wpływem działania SN38 i SN38+CAPE w porównaniu do kontroli negatywnej po 48 h inkubacji. Podobne wyniki zaobserwowano po 72 h inkubacji z badanymi związkami, jednak tylko dla SN38 odnotowano istotną statystycznie aktywność kaspaz 3/7.

Związki zaliczane do chemoprotekcyjnych wykazują również działanie hamujące cykl komórkowy. Stres komórkowy poprzez aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego, może prowadzić do jego inhibicji. Kontrola fazy G1/S, zapobiega replikacji uszkodzonego DNA, natomiast kontrola fazy G2/M zapobiega segregacji uszkodzonych chromosomów do komórek macierzystych podczas mitozy. Wyniki przeprowadzonych w niniejszej pracy badań cyklu komórkowego wskazują, że CAPE skutecznie hamuje cykl podziałowy komórek linii HCT116, HT29 i AGS w fazie G0/G1. W badaniach przeprowadzonych przez Tang i wsp., (2017), wykazano zależny od dawki wzrost liczby komórek linii HT29 i HCT116, w fazie G0/G1 po 48 h inkubacji z CAPE w porównaniu z kontrolą negatywną. Analogiczne wyniki otrzymali także Lin i wsp., (2015), którzy zaobserwowali wykorzystując cytometrię przepływową, że CAPE spowodował

zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 w komórkach linii ludzkiego raka prostaty LNCaP 104-R1. Miało to związek ze zmniejszoną ekspresją cykliny D1 pod wpływem ekspozycji komórek na działanie CAPE. Kompleks cyklina D-Cdk4 lub D-Cdk6 jest kluczowym czynnikiem przejścia komórek z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego. Z kolei, w komórkach ludzkiej linii komórek raka prostaty DU145, LNCaP C4-2 i 22Rv1 zastosowanie CAPE spowodowało zmniejszenie populacji komórek będących w fazie G1 i zwiększenie liczby komórek w fazie G2/M (Lin i wsp., 2015). Również Hsu i wsp., (2013) zaobserwowali, zależne od zwiększonej ekspresji E2F-1, zatrzymanie komórek linii raka szyjki macicy ME180 w fazie S i G2/M spowodowane przez CAPE. Analizę porównawczą dwóch związków fenolowych pochodzących z propolisu: CAPE i kwasu kawowego (CA) przeprowadzili Kabała-Dzik i wsp., którzy odnotowali że ester fenyloetylowy kwasu kawowego powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S skutkując zmniejszeniem liczby komórek w fazie G2/M w porównaniu z kontrolą negatywną, natomiast CA wywierał słaby wpływ na cykl komórkowy komórek linii MDA-MB-231 (Kabała-Dzik i wsp., 2017) co dowiodło, że CAPE powoduje znacznie silniejsze i szybsze zatrzymanie cyklu komórkowego niż kwas kawowy. Wyniki przeprowadzonych w niniejszej pracy badań wskazują, że wpływ CAPE na przebieg cyklu komórkowego nie jest fazowo specyficzny i zależy od typu komórek docelowych. W przypadku CPT-11 i SN38, dopiero 72 h inkubacja skutkowała istotnymi statystycznie zmianami w cyklu komórkowym badanych linii nowotworowych. Związki te powodowały akumulację komórek w fazie S oraz zmniejszenie liczby komórek w fazie G0/G1. Natomiast, jednoczesna inkubacja CPT-11 lub SN38 z CAPE spowodowała odwrócenie efektów zaobserwowanych dla samego CPT-11 czy SN38. Nastąpił wzrost liczby komórek będących w fazie G0/G1 i zmniejszenie się liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego. Można zatem przypuszczać, że negatywny/antagonistyczny wpływ CAPE na toksyczność leków przeciwnowotworowych (CPT-11 i SN28) spowodowany jest przede wszystkim zahamowaniem syntezy DNA i zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1. Potwierdzenie tej hipotezy znajdujemy w badaniach Ricchi i wsp., którzy analizowali wpływ aspiryny na aktywność przeciwnowotworową CPT-11 (Ricchi i wsp., 2002). Wykazali oni, że aspiryna, determinuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, co wiązało się z tłumieniem aktywności proapoptotycznej CPT-11. Z kolei, interesujące wyniki uzyskano dla komórek linii Caco-2, w których CPT-11 i SN38 indukowały zatrzymanie komórek w fazie S, jednak nie przekładało się to na indukcję apoptozy w tych komórkach. Analogiczne wyniki otrzymali Kaku i wsp., którzy wykazali, że irinotekan powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego, ale nie wpływa na indukcję apoptozy czy nekrozy komórkach Caco-2 (Kaku i wsp., 2015).

Wpływ stosowania suplementów diety podczas terapii przeciwnowotworowej jest wciąż niedokładnie poznany. Pacjenci przyjmują suplementy diety oczekując, że pomogą one złagodzić uboczne skutki leczenia, poprawiając ogólną kondycję organizmu. Niektóre badania wskazują, że

suplementy mogą zmniejszać uboczne efekty chemioterapii, bez wpływu na aktywność leków, jednak inne dane sugerują, że suplementy mogą negatywnie interferować z chemio- lub radioterapią zmniejszając ich skuteczność (Norman i wsp., 2003). Stosowanie przez pacjentów onkologicznych suplementów diety staje się coraz bardziej powszechne, gdyż ich dostępność jest nieograniczona, ponieważ można je kupić nie tylko w aptece, ale również w sklepach spożywczych, drogeriach czy stacjach benzynowych. Dlatego też badania zmierzające do określenia wpływu konkretnego suplementu diety na aktywność biologiczną wytypowanego chemioterapeutyku są szczególnie istotne. Nasze wyniki rzucają nowe światło na zastosowanie propolisu w diecie pacjentów będących w trakcie chemioterapii CPT-11 i wskazują na konieczność kolejnych badań dotyczących ich wpływu na skuteczność leczenia. Przeprowadzone w pracy badania *in vitro* wykazały, że CAPE wykazuje działanie modulujące na cytotoksyczność irinotekanu i jego metabolitu. Może to mieć potencjalne zastosowanie w opracowywaniu nowych, alternatywnych strategii terapeutycznych lub w uzupełnieniu konwencjonalnych schematów leczenia nowotworów przewodu pokarmowego. Ważne jest, aby pacjenci mieli dostęp do preparatów sprawdzonych, bezpiecznych i o potwierdzonej skuteczności czy też interakcji.

Przegląd badań klinicznych dowodzi, że niektóre z ziół czy suplementów mogą mieć pewien potencjał w profilaktyce, leczeniu czy postępowaniu paliatywnym u chorych z nowotworem. Inne jednak – nie mają go wcale. Większość roślin i suplementów wchodzi w interakcje ze sobą oraz z tradycyjnymi lekami, powodując istotne działania uboczne. Znaczenie użyteczności i roli suplementów w chorobie nowotworowej budzi wśród naukowców wiele kontrowersji i jest wciąż badane. Rolą suplementów diety – niezależnie od dawki i kombinacji – jest utrzymanie dobrego stanu zdrowia i zapewnienie dodatkowych korzyści zdrowotnych. Jednak należy pamiętać, iż stosowanie suplementów podczas choroby nowotworowej może wywoływać lub nasilać występowanie różnego rodzaju interakcji z przyjmowanymi lekami lub powodować działania niepożądane. Są one następstwem reakcji zachodzących pomiędzy składnikami zawartymi w suplementach a stosowanymi lekami. Najczęściej wpływają one na wchłanianie i metabolizm leków, ale również może dochodzić do synergistycznych czy też antagonistycznych interakcji. Dlatego też, suplementy diety powinny być rygorystycznie testowane pod względem czystości, bezpieczeństwa i skuteczności, a także ich oddziaływań z przyjmowanymi lekami, gdyż pacjenci potrzebują wiarygodnego źródła informacji oraz dialogu z onkologami na ten temat.

Rozdział VI

Wnioski

VI. WNIOSKI

Wyniki badań przeprowadzonych w celu realizacji postawionych w pracy zadań badawczych, pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Ester fenyloetylowy kwasu kawowego charakteryzuje się silną aktywnością cytotoksyczną i genotoksyczną w stosunku do komórek nowotworowych linii HCT116, HT29 i AGS.
2. CAPE wykazuje właściwości antyoksydacyjne w komórkach linii nowotworowych przewodu pokarmowego (HCT116, HT29, AGS, Caco-2).
3. CAPE działa proapoptotycznie, poprzez wzrost aktywności kaspaz 3/7 w komórkach linii HCT116, HT29 i AGS.
4. CAPE skutecznie hamuje cykl komórkowy w fazie G0/G1 w komórkach linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2.

Ponadto, CAPE moduluje efekty cytotoksyczne indukowane przez irinotekan (CPT-11) i jego metabolit (SN38) poprzez:

1. zmniejszenie aktywności cytotoksycznej i genotoksycznej CPT-11 i SN38 w komórkach linii HCT116, AGS i Caco-2,
2. redukcję aktywności kaspaz 3/7, a tym samym właściwości proapoptotycznych CPT-11 i SN38 w komórkach nowotworowych linii HCT116, HT29, AGS i Caco 2,
3. zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego, uniemożliwiające działanie leku i jego metabolitu w komórkach badanych linii nowotworowych przewodu pokarmowego.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy dowiodły, że modulacja przez CAPE cytotoksycznego działania irinotekanu i jego metabolitu ma charakter antagonistyczny.

W przypadku komórek Caco-2, które stanowiły w przeprowadzonych badaniach linię referencyjną do prawidłowych enterocytów, CAPE wykazywał zdecydowanie najslabszą aktywność cyto- i genotoksyczną. W komórkach tych, ester fenyloowy kwasu kawowego, hamował cykl komórkowy w fazie G0/G1, ale nie wykazywał aktywności proapoptotycznej. Jednocześnie, w komórkach Caco-2 ester fenyloetylowy kwasu kawowego działał ochronnie w stosunku do cytotoksyczności indukowanej przez CPT-11 i SN38. Propolis i preparaty oparte na nim, mogą z pewnością wspomagać walkę z chorobą nowotworową, ale jak dowiodły uzyskane w niniejszej pracy badania, ich przyjmowanie łącznie z irinotekanem wpływa na osłabianie efektu terapeutycznego CPT-11 i jego metabolitu w komórkach nowotworowych przewodu pokarmowego

Rozdział VI

Streszczenie

VII. STRESZCZENIE

Propolis to substancja pochodzenia naturalnego, która powstaje w wyniku połączenia żywic roślinnych, wosku pszczelego oraz wydzieliny z gruczołów ślinowych pszczół. Propolis chroni wnętrze ula przed bakteriami, grzybami i wirusami. Ze względu na swoje cenne właściwości propolis jest wykorzystywany w medycynie naturalnej na całym świecie, a obecnie sprzedawany jest jako suplement diety, składnik kosmetyków czy jako komponent żywności funkcjonalnej. Aktywnym składnikiem propolisu jest ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE). Oprócz aktywności antybakteryjnej, przeciwgrzybiczej i antywirusowej, CAPE charakteryzuje także działanie przeciwnowotworowe o szerokim spektrum działania w stosunku do wielu modeli nowotworów *in vitro* i *in vivo*. Mechanizm przeciwnowotworowej aktywności CAPE nie jest jeszcze dokładnie poznany ale może ona wynikać ze skomasowanego efektu proapoptotycznego, antyproliferacyjnego, przeciwzapalnego oraz wpływu na stres oksydacyjny.

Lekiem, powszechnie stosowanym w terapii przeciwnowotworowej przewodu pokarmowego jest irinotekan, pochodna naturalnego alkaloidu - kamptotecyny. Głównym celem działania irinotekanu jest hamowanie aktywności topoizomerazy I, która odgrywa kluczową rolę w zmniejszaniu napięcia torsyjnego DNA. Jego aktywnym metabolitem jest SN38, który w badaniach wykazuje od 100 do 1000 razy wyższą aktywność przeciwnowotworową niż sam irinotekan.

Celem prezentowanych badań była ocena wpływu aktywnego komponentu propolisu - CAPE na aktywność biologiczną komórek nowotworowych przewodu pokarmowego oraz określenie stopnia, w jakim CAPE może modulować efekty toksyczne indukowane przez irinotekan i jego metabolit SN38 w komórkach wybranych linii nowotworowych przewodu pokarmowego: raka żołądka (AGS), raka okrężnicy (HCT116) oraz gruczolakoraka jelita grubego (HT29 i Caco-2).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że ester fenyloetylowy kwasu kawowego charakteryzuje się silną aktywnością cytotoksyczną i genotoksyczną w stosunku do komórek nowotworowych linii HCT116, HT29 i AGS. Ponadto, CAPE wykazuje właściwości antyoksydacyjne w komórkach nowotworowych przewodu pokarmowego oraz działa proapoptotycznie, poprzez wzrost aktywności kaspaz 3/7 w komórkach linii HCT116, HT29 i AGS. Co więcej, CAPE skutecznie hamuje cykl komórkowy w fazie G0/G1 w komórkach linii HCT116, HT29, AGS i Caco-2. Dodatkowo, CAPE moduluje efekty cytotoksyczne indukowane przez irinotekan (CPT-11) i jego metabolit (SN38) poprzez zmniejszenie aktywności cytotoksycznej i genotoksycznej CPT-11 i SN38 w komórkach linii HCT116, AGS i Caco-2, redukcję aktywności kaspaz 3/7, a tym samym właściwości proapoptotycznych CPT-11 i SN38 w komórkach nowotworowych linii HCT116, HT29, AGS i Caco 2, a także zaburzenia przebiegu cyklu

komórkowego, uniemożliwiające działanie leku i jego metabolitu w komórkach nowotworowych przewodu pokarmowego.

Przeprowadzone w pracy badania *in vitro* wykazały modulujące działanie CAPE na cytotoksyczność irinotekanu i jego metabolitu. Może to mieć potencjalne zastosowanie w opracowywaniu nowych, alternatywnych strategii terapeutycznych lub w uzupełnieniu konwencjonalnych schematów leczenia nowotworów przewodu pokarmowego. Ważne jest, aby pacjenci mieli dostęp do preparatów sprawdzonych, bezpiecznych i o potwierdzonej skuteczności czy też interakcji.

Rozdział VIII

Summary

VIII. SUMMARY

Propolis is a substance of a natural origin that is formed by a combination of plant resins, beeswax and secretions from the bees' salivary glands. Propolis protects the inside of the hive against bacteria, fungi and viruses. Due to its valuable properties, propolis is used in natural medicine all over the world and is now sold as a dietary supplement, cosmetic ingredient or as a component of functional foods. The active ingredient in propolis is caffeic acid phenethyl ester (CAPE). In addition to antibacterial, antifungal and antiviral activity, CAPE also has a broad-spectrum of anti-cancer activity against a wide range of cancer models *in vitro* and *in vivo*. The mechanism of the anticancer activity of CAPE is not yet well understood but it may be due to a combined proapoptotic, antiproliferative, anti-inflammatory effect and impact on oxidative stress.

A drug commonly used in gastrointestinal cancer therapy is irinotecan, a derivative of the natural alkaloid camptothecin. The main target of irinotecan is the inhibition of topoisomerase I activity, which plays a key role in reducing the DNA torsional stress. Its active metabolite is SN38, which during tests has shown 100 to 1,000 times higher antitumour activity than irinotecan alone.

The research objective of this study was to evaluate the effect of the active component of propolis, CAPE, on the biological activity of gastrointestinal cancer cells and to determine the extent to which CAPE can modulate the toxic effects induced by irinotecan and its metabolite SN38 in cells of selected gastrointestinal cancer lines: gastric cancer (AGS), colon cancer (HCT116) and colorectal adenocarcinoma (HT29 and Caco-2).

The results of the study showed that the caffeic acid phenethyl ester has strong cytotoxic and genotoxic activity against cancer cells of the HCT116, HT29 and AGS lines. In addition, CAPE exhibits antioxidant properties in gastrointestinal cancer cells and has a proapoptotic effect by increasing caspase 3/7 activity in cells of the HCT116, HT29 and AGS lines. Moreover, CAPE effectively inhibits the cell cycle in the G0/G1 phase in HCT116, HT29, AGS and Caco-2 cells. CAPE also modulates the cytotoxic effects induced by irinotecan (CPT-11) and its metabolite (SN38) by reducing the cytotoxic and genotoxic activity of CPT-11 and SN38 in HCT116, AGS and Caco-2 cells, reducing the activity of caspases 3/7, and thus the proapoptotic properties of CPT-11 and SN38 in cancer cells of the HCT116, HT29, AGS and Caco 2 lines, and disruption of cell cycle progression, preventing the drug and its metabolite activity in gastrointestinal cancer cells.

The *in vitro* tests conducted in this study demonstrated a modulating effect of CAPE on the cytotoxicity of irinotecan and its metabolite. This may have potential applications in the development of new alternative therapeutic strategies or as addition to conventional treatment regimens for gastrointestinal cancers. It is important that patients have access to preparations that are proven, safe and have confirmed efficacy and interactions.

Rozdział IX

Dorobek naukowy

IX. DOROBEK NAUKOWY

Ogólne zestawienie wartości bibliograficznych osiągnięć naukowych uzyskanych w okresie realizowania badań:

IF =67,45 (w tym w trakcie realizacji pracy doktorskiej 25,75)

MNiSW/MEIN =1 510 (w tym w trakcie realizacji pracy doktorskiej 670)

h-index = 7

IX.1. Wykaz publikacji (w trakcie realizacji pracy doktorskiej)

1. Antagonistic Effects of CAPE (a Component of Propolis) on the Cytotoxicity and Genotoxicity of Irinotecan and SN38 in Human Gastrointestinal Cancer Cells In Vitro.

Gajek G, Marciniak B, Lewkowski J, Kontek R.

Molecules. 2020 Feb 4;25(3):658. doi: 10.3390/molecules25030658.

PMID: 32033066

IF₂₀₂₀=4,41; IF_{5-years}=3,74; MNiSW=100

2. Cytotoxic Cardenolides from the Leaves of *Acokanthera oblongifolia*.

Pecio Ł, Hassan EM, Omer EA, **Gajek G**, Kontek R, Sobieraj A, Stochmal A, Oleszek W.

Planta Med. 2019 Aug;85(11-12):965-972. doi: 10.1055/a-0958-2566. Epub 2019 Jun 27.

PMID: 31250411

IF₂₀₁₉=2,68; IF_{5-years}=3,74; MNiSW=100

3. Cytotoxic Action of N-aryl, Furan-derived Aminophosphonates against HT29 and HCT116 Cancer Cell Lines.

Lewkowski J, Rzeszotarska E, Matusiak A, Morawska M, **Gajek G**, Nowak K, Kontek R.

Anticancer Agents Med Chem. 2019;19(4):453-462

doi: 10.2174/1871520619666181122115649.

PMID: 30465513

IF₂₀₁₉=2,04; IF_{5-years}=2,85; MNiSW=70

4. Triterpenoid Components from Oak Heartwood (*Quercus robur*) and Their Potential Health Benefits.

Pérez AJ, Pecio Ł, Kowalczyk M, Kontek R, Gajek G, Stopinsek L, Mirt I, Oleszek W, Stochmal A.

J Agric Food Chem. 2017 Jun 14;65(23):4611-4623. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01396. Epub 2017 Jun 1.

PMID: 28535679

IF₂₀₁₇=3,41; IF_{5-years}=4,46; MNiSW=20

5. Cytotoxic triterpenoids isolated from sweet chestnut heartwood (*Castanea sativa*) and their health benefits implication.

Pérez AJ, Pecio Ł, Kowalczyk M, Kontek R, Gajek G, Stopinsek L, Mirt I, Stochmal A, Oleszek W.

Food Chem Toxicol. 2017 Nov;109(Pt 2):863-870. doi: 10.1016/j.fct.2017.03.049. Epub 2017 Mar 28.

PMID: 28363853

IF₂₀₁₇=3,97; IF_{5-years}=4,80; MNiSW=100

6. Synthesis, fluorescence properties and the promising cytotoxicity of pyrene-derived aminophosphonates.

Lewkowski J, Rodriguez Moya M, Wrona-Piotrowicz A, Zakrzewski J, Kontek R, Gajek G.

Beilstein J Org Chem. 2016 Jun 16;12:1229-35. doi: 10.3762/bjoc.12.117. eCollection 2016.

PMID: 27559373

IF₂₀₁₆=2,33; IF_{5-years}=2,59; MNiSW= 70

7. Studies on the cytotoxicity of diamond nanoparticles against human cancer cells and lymphocytes.

Adach K, Fijalkowski M, Gajek G, Skolimowski J, Kontek R, Błaszczyk A.

Chem Biol Interact. 2016 Jul 25;254:156-66. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.004. Epub 2016 Jun 4.

PMID: 27270448

IF₂₀₁₆=3,14; IF_{5-years}=4,15; MNiSW=100

8. Substituted benzoquinazolinones. Part 2: Synthesis of amino-, and sulfanyl-derivatives of benzo[ff]- and benzo[h]quinazolinones

Nowak M, Malinowski Z, Fornal E, Jozwiak A, Parfieniuk E, Gajek G, Kontek R.

Tetrahedron. 2015;71: 9463-9473. doi10.1016/j.tet.2015.10.049

IF₂₀₁₅=2,64; IF_{5-years}=2,36; MNiSW=70

9. Synthesis and biological evaluation of some amino- and sulfanyl-3H-quinazolin-4-one derivatives as potential anticancer agents

Malinowski Z, Fornal E, Nowak M, Kontek R, Gajek G, Borek B.

Monatsh Chem. 2015; 146:1723-1731. doi10.1007/s00706-015-1508-6

IF₂₀₁₅=1,13; IF_{5-years}=1,43; MNiSW=40

10. Aneuploidy of chromosome 21: The most important risk factors

Plak A, Gajek G, Blaszczyk A.

Post Biol Komórki. 2015;42:599-619

IX.1. Wykaz publikacji (pozostałe publikacje)

1. Association of low ficolin-2 concentration in cord serum with respiratory distress syndrome in preterm newborns

Gajek G, Świerzko AS, Jarych D, Mikulski D, Kobiela P, Chojnacka K, Kufelnicka-Babout M, Szala-Poździej A, Chrzanowski J, Sobczuk K, Fendler W, Matsushita M, Domżańska-Popadiuk I, Mazela J, Kalinka J, Sekine H, Cedzyński M.

Front Immunol. 2023 doi: 10.3389/fimmu.2023.1107063

IF₂₀₂₃=8,78; IF_{5-years}=6,32; MNiSW=140

2. Association of the FCN2 Gene Promoter Region Polymorphisms with Very Low Birthweight in Preterm Neonates.

Szala-Poździej A, Świerzko AS, **Gajek G**, Kufelnicka-Babout M, Chojnacka K, Kobiela P, Jarych D, Sobczuk K, Mazela J, Domżańska-Popadiuk I, Kalinka J, Sekine H, Matsushita M, Cedzyński M.

Int J Mol Sci. 2022 Dec 5;23:15336. <https://doi.org/10.3390/ijms232315336>

IF₂₀₂₂=6,28; IF_{5-years}=4,90; MNiSW=140

3. Polymorphisms of the FCN2 Gene 3'UTR Region and Their Clinical Associations in Preterm Newborns.

Świerzko AS, Jarych D, **Gajek G**, Chojnacka K, Kobiela P, Kufelnicka-Babout M, Michalski M, Sobczuk K, Szala-Poździej A, Matsushita M, Mazela J, Domżańska-Popadiuk I, Kilpatrick DC, Kalinka J, Sekine H, Cedzyński M.

Front Immunol. 2021 Oct 28;12:741140. doi: 10.3389/fimmu.2021.741140. eCollection 2021.PMID: 34777352

IF₂₀₂₁=8,78; IF_{5-years}=6,32; MNiSW=140

4. Associations of Ficolins With Hematological Malignancies in Patients Receiving High-Dose Chemotherapy and Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantations.

Świerzko AS, Michalski M, Sokołowska A, Nowicki M, Szala-Poździej A, Eppa Ł, Mitrus I, Szmigielska-Kapłon A, Sobczyk-Kruszelnicka M, Michalak K, Gołos A, Wierzbowska A, Giebel S, Jamroziak K, Kowalski ML, Brzezińska O, Thiel S, Matsushita M, Jensenius JC, **Gajek G**, Cedzyński M.

Front Immunol. 2020 Jan 28;10:3097. doi: 10.3389/fimmu.2019.03097. eCollection 2019.

PMID: 32047495

IF₂₀₂₀=7,56; IF_{5-years}=6,32; MNiSW= 140

5. Associations of ficolins and mannose-binding lectin with acute myeloid leukaemia in adults.

Sokołowska A, Świerzko AS, **Gajek G**, Gołos A, Michalski M, Nowicki M, Szala-Poździej A, Wolska-Washer A, Brzezińska O, Wierzbowska A, Jamroziak K, Kowalski ML, Thiel S, Matsushita M, Jensenius JC, Cedzyński M.

Sci Rep. 2020 Jun 29;10(1):10561. doi: 10.1038/s41598-020-67516-2.

PMID: 32601370

IF₂₀₂₀=4,38; IF_{5-years}=4,29; MNiSW= 140

6. Association of Polymorphisms of MASP1/3, COLEC10, and COLEC11 Genes with 3MC Syndrome.

Gajek G. Świerzek AS, Cedzyński M.

Int J Mol Sci. 2020 Jul 31;21(15):5483. doi: 10.3390/ijms21155483.

PMID: 32751929

IF₂₀₂₀=5,92; IF_{5-years}=4,90; MNiSW=140

IX.2. Doniesienia konferencyjne

- Konferencje ogólnokrajowe – prezentacja ustna:

1. Nanorurki węglowe –analiza stopnia genotoksyczności i indukcji apoptozy.

Gajek G. Kontek R, IV Konferencja Biologii Molekularnej, 26-28.03.2015, Łódź

- Konferencje ogólnokrajowe – prezentacja plakatu:

1. Wpływ metabolitu SN38 na indukcję uszkodzeń DNA w wybranych liniach komórkowych.

Gajek G. Machałowska H, Kontek R, I Toruńskie Sympozjum Doktorantów Nauk Przyrodniczych, 20-22.03.2015, Toruń

2. Ocena cytotoksycznego działania estru fenyloetylowego kwasu kawowego.

Gajek G. Kontek R, BioOpen – I Ogólnopolska Konferencja Nauk o Życiu, 20-22.04.2015, Łódź

3. Ester fenyloetylowy kwasu kawowego – aktywność przeciwnowotworowa.

Gajek G. Kontek R, III Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 24-26.04.2015, Łódź

4. Badanie aktywności antyoksydacyjnej CAPE – aktywnego składnika propolisu.

Gajek G. Kontek R, V Konferencja Biologii Molekularnej, 07-09.04.2016, Łódź

5. Ocena właściwości genotoksycznych CAPE – aktywnego składnika propolisu.

Gajek G. Kontek R, BioOpen - II Ogólnopolska Konferencja Nauk o Życiu 12-14.05.2016, Łódź

- Konferencje międzynarodowe – prezentacja plakatu:

1. *Ficolins in patients with haematological malignancies receiving high-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell transplantations (AUTO-HSCT).*

Świerzko A, Michalski M, Sokolowska A, Nowicki M, Szala-Poździej A, Eppa Ł, Mitrus I, Szmigielska-Kaplon A, Sobczyk-Kruszelnicka M, Michalak K, Golos A, Wierzbowska A, Giebel S., Jamroziak K., Kowalski M, Brzezinska O, Thiel S, Matsushita M, Jensenius J, **Gajek G.**, Cedzynski M, 17th European Meeting on Complement in Human Disease (EMCHD), 14-17.09.2019, Madryt

2. *E. Coli polysaccharide-base time-resolved immunofluorometric assay for determination of serum ficolin-2 concentration as an alternative for “sandwich-type” test.*

Gajek G. Cedzyński Mi, Chojnacka K, Kasperkiewicz K, Łukasiewicz J, Maciejewska A, Kobiela P, Domżańska-Popadiuk I, Matsushita M, Mazela J, Świerzko A, 17th European Meeting on Complement in Human Disease (EMCHD), 14-17.09.2019, Madryt

3. *Escherichia coli polysaccharide-based test for determination of ficolin-2 concentration in serum.*

Gajek G. Cedzyński M, Chojnacka K, Kasperkiewicz K, Łukasiewicz J, Kobiela P, Domżańska-Popadiuk I, Mazela J, Świerzko A, 8th International Weigl Conference, 26-28.06.2019, Łódź

4. *Antioxidant properties of hyaluronic acid in the human cancer cells in vitro.*

Gajek G. Kontek R, 6th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH, 11-14.09.2017, Kraków

5. *Effect of hyaluronan on cytotoxicity induced oxaliplatin in gastrointestinal cancer cells in vitro.*

Gajek G. Orzechowska J, Kmiecik S, Kontek R, XI Copernican International Young Scientists Conference, 28-30.06.2017 Toruń

6. *Analysis of proapoptotic properties of the active component of propolis by flow cytometry.*

Gajek G. Kontek R, V International Conference of Biophysics Students, 20-22.05.2016, Kraków

IX.3. Staże naukowe

- 2015 – dwutygodniowy staż na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi w Katedrze Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej Zakład Genetyki Klinicznej
- 2016 - dwutygodniowy staż w Polskiej Akademii Nauk w Instytucie Biologii Medycznej.

IX.4. Projekty naukowe

1. ***Kolektyna wątrobowa 1 (CL-L1) i kolektyna nerkowa 1 (CL-K1) w podatności wcześniaków na infekcje***

Preludium-19 (2020/37/N/NZ6/01887) - kierownik projektu, 2020-2023

Kwota: 209 904 PL

Rozdział X

Literatura

X. Literatura

1. Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Ohta T. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2009** May;53(5):643-51.
2. Akyol S, Ginis Z, Armutcu F, Ozturk G, Yigitoglu MR, Akyol O. The potential usage of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against chemotherapy-induced and radiotherapy-induced toxicity. *Cell Biochemistry & Function*, **2012** Jul;30(5):438-43.
3. Akyol S, Akbas A, Butun I, Toktas M, Ozyurt H, Sahin S, Akyol O. Caffeic acid phenethyl ester as a remedial agent for reproductive functions and oxidative stress-based pathologies of gonads. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, **2015** Apr-Jun;4(2):187-91.
4. Albukhari AA, Gashlan HM, El-Beshbishy HA, Nagy AA, Abdel-Naim AB. Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen-induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **2009** Jul;47(7):1689-95.
5. Amodio R, De Ruvo C, Sacchetti A, Di Santo A, Martelli N, Di Matteo V, Lorenzet R, Poggi A, Rotilio D, Cacchio M, Esposito E. Caffeic acid phenethyl ester blocks apoptosis induced by low potassium in cerebellar granule cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **2003** Nov;21(7):379-89.
6. Anthony L. Irinotecan toxicity. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, **2007** Apr;1(1):35-9.
7. Armagan A, Uzar E, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR, Soyupek S, Cam H, Serel TA. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Human & Experimental Toxicology*, **2008** Jul;27(7):547-52.
8. Armutcu F, Akyol S, Ustunsoy S, Turan FF. Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, **2015** May;9(5):1582-1588.
9. Bailly C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacological Research*, **2019** Oct;148:104398.
10. Balaji S, Terrero D, Tiwari AK, Ashby CR Jr, Raman D. Alternative approaches to overcome chemoresistance to apoptosis in cancer. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, **2021**;126:91-122.
11. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005** Aug 22;100(1-2):114-7.
12. Barnes PM, Powell-Griner E, McFann K, Nahin RL. Complementary and alternative medicine use among adults: United States, 2002. *Advance Data*, **2004** May 27;(343):1-19. PMID: 15188733

13. Barnes PM, Bloom B, Nahin RL. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007, *National Health Statistics Reports*. **2008** Dec 10;(12):1-23. PMID: 19361005
14. Bartosz G, Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, **2013** ISBN978-83-01-13847-9, PWN Warszawa
15. Beauregard AP, Harquail J, Lassalle-Claux G, Belbraouet M, Jean-Francois J, Touaibia M, Robichaud GA. CAPE Analogs Induce Growth Arrest and Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Molecules*, **2015** Jul 10;20(7):12576-89.
16. Beyer K, Baukloh A-K, Stoyanova A, Kamphues C, Sattler A, Kotsch K. Interactions of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) with the Immune System: Implications for Inflammation and Cancer. *Cancers*, **2019**; 11(8):1161.
17. Bhimani RS, Troll W, Grunberger D, Frenkel K. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Research*, **1993** Oct 1;53(19):4528-33.
18. Boisard S, Le Ray AM, Gatto J, Aumond MC, Blanchard P, Derbré S, Flurin C, Richomme P. Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2014** Feb 12;62(6):1344-51
19. Bojarowicz H, Dźwigulska P. Suplementy diety. Część II. Wybrane składniki suplementów diety oraz ich przeznaczenie. *Hygeia Public Health*, **2012**, 47(4): 433-441
20. Bonamigo T, Campos JF, Oliveira AS, Torquato HFV, Balestieri JBP, Cardoso CAL, Paredes-Gamero EJ, de Picoli Souza K, dos Santos EL. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. *PLoS One*, **2017** Sep 12;12(9):e0183983.
21. Bright-Thomas RM, Hargest R. APC, beta-Catenin and hTCF-4; an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, **2003** Mar;29(2):107-17.
22. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, **1998** Apr;36(4):347-63.
23. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, **2002** Nov;73 Suppl 1:S1-6.
24. Celik S, Erdogan S, Tuzcu M. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research*, **2009** Oct;60(4):270-6.
25. Charara M, Edmonston TB, Burkholder S, Walters R, Anne P, Mitchell E, Fry R, Boman B, Rose D, Fishel R, Curran W, Palazzo J. Microsatellite status and cell cycle associated markers in rectal cancer patients undergoing a combined regimen of 5-FU and CPT-11 chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Research*, **2004** Sep-Oct;24(5B):3161-7.

26. Chatwichien J, Basu S, Budina-Kolomets A, Murphy ME, Winkler JD. PUMA-dependent apoptosis in NSCLC cancer cells by a dimeric β -carboline. *Bioorg Med Chemistry Letters*, **2016** Oct 15;26(20):4884-4887.
27. Chen H, Tran JT, Anderson RE, Mandal MN. Caffeic acid phenethyl ester protects 661W cells from H₂O₂-mediated cell death and enhances electroretinography response in dim-reared albino rats. *Molecular Vision*, **2012**;18:1325-38.
28. Chen MF, Wu CT, Chen YJ, Keng PC, Chen WC. Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. *Journal of Radiation Research*, **2004** Jun;45(2):253-60.
29. Chen MJ, Chang WH, Lin CC, Liu CY, Wang TE, Chu CH, Shih SC, Chen YJ. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology*, **2008**;8(6):566-76.
30. Chen MJ, Shih SC, Wang HY, Lin CC, Liu CY, Wang TE, Chu CH, Chen YJ. Caffeic Acid phenethyl ester inhibits epithelial-mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**;2013:270906.
31. Chen XS, Li LY, Guan YD, Yang JM, Cheng Y. Anticancer strategies based on the metabolic profile of tumor cells: therapeutic targeting of the Warburg effect. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2016** Aug;37(8):1013-9.
32. Chen YJ, Huang AC, Chang HH, Liao HF, Jiang CM, Lai LY, Chan JT, Chen YY, Chiang J. Caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, protects peripheral blood mononuclear cells of competitive cyclists against hyperthermal stress. *Journal of Food Science*, **2009** Aug;74(6):H162-7.
33. Chen Z, Luo Y, Fang A, Fan C, Zeng, C. Synthesis of novel SN38-aspirin prodrugs for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Turkish Journal of Chemistry*, **2018**; 42(3):929-939.
34. Chiang EP, Tsai SY, Kuo YH, Pai MH, Chiu HL, Rodriguez RL, Tang FY. Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: involvement of the PI3-K/Akt and AMPK signaling pathways. *PLoS One*, **2014** Jun 24;9(6):e99631.
35. Chinnapaka S, Zheng G, Chen A, Munirathinam G. Nitro aspirin (NCX4040) induces apoptosis in PC3 metastatic prostate cancer cells via hydrogen peroxide (H₂O₂)-mediated oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, **2019** Nov 1;143:494-509.
36. Chinnaiyan P, Chowdhary S, Potthast L, Prabhu A, Tsai YY, Sarcar B, Kahali S, Brem S, Yu HM, Rojiani A, Murtagh R, Pan E. Phase I trial of vorinostat combined with bevacizumab and CPT-11 in recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology*, **2012** Jan;14(1):93-100.

37. Choi D, Han J, Lee Y, Choi J, Han S, Hong S, Jeon H, Kim YM, Jung Y. Caffeic acid phenethyl ester is a potent inhibitor of HIF prolyl hydroxylase: structural analysis and pharmacological implication. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2010** Sep;21(9):809-17.
38. Conklin KA. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutrition and Cancer*, **2000**;37(1):1-18.
39. Cunha FM, Duma D, Assreuy J, Buzzi FC, Niero R, Campos MM, Calixto JB. Caffeic acid derivatives: *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties. *Free Radical Research*, **2004** Nov;38(11):1241-53.
40. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, **2019** Jun;43(6):582-592.
41. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2002** Dec;25(12):1600-3.
42. Dell'Erba C, Chiavarina B, Fenoglio C, Petrillo G, Cordazzo C, Boncompagni E, Spinelli D, Ognio E, Aiello C, Mariggiò MA, Viale M. Inhibition of cell proliferation, cytotoxicity and induction of apoptosis of 1,4-bis(1-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene in gastrointestinal tumour cell lines and preliminary evaluation of its toxicity *in vivo*. *Pharmacological Research*, **2005** Sep;52(3):271-82.
43. Deptała A, Omyła-Staszewska J. Topoisomerase I inhibitors – a unique class of antineoplastic agents. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, **2003**;7(1):45-53.
44. dos Santos JS, Monte-Alto-Costa A. Caffeic acid phenethyl ester improves burn healing in rats through anti-inflammatory and antioxidant effects. *Journal of Burn Care & Research*, **2013** Nov-Dec;34(6):682-8.
45. Dziedzic A, Kubina R, Kabała-Dzik A, Tanasiewicz M. Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptotic Response of Head and Neck Squamous Carcinoma Cells (Detroit 562) by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester Derivative. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2017**;2017:6793456.
46. Eiró N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, **2012** Mar 27;4(3):62-72.
47. Eşrefoğlu M, Iraz M, Ates B, Gul M. Melatonin and CAPE are able to prevent the liver from oxidative damage in rats: an ultrastructural and biochemical study. *Ultrastructural Pathology*, **2012** May;36(3):171-8.
48. Ettlinger DE, Mitterhauser M, Wadsak W, Ostermann E, Farkouh A, Schueller J, Czejka M. *In vivo* disposition of irinotecan (CPT-11) and its metabolites in combination with the monoclonal antibody cetuximab. *Anticancer Research*, **2006** Mar-Apr;26(2B):1337-41.

49. Fadillioglu E, Oztas E, Erdogan H, Yagmurca M, Sogut S, Ucar M, Irmak MK. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Journal of Applied Toxicology*, **2004** Jan-Feb;24(1):47-52.
50. Garufi C, Torsello A, Tumolo S, Ettorre GM, Zeuli M, Campanella C, Vennarecci G, Mottolese M, Sperduti I, Cognetti F. Cetuximab plus chronomodulated irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin as neoadjuvant chemotherapy in colorectal liver metastases: POCHER trial. *British Journal of Cancer*, **2010** Nov 9;103(10):1542-7.
51. Gerrits CJ, de Jonge MJ, Schellens JH, Stoter G, Verweij J. Topoisomerase I inhibitors: the relevance of prolonged exposure for present clinical development. *British Journal of Cancer*, **1997**;76(7):952-62.
52. Giovanella BC, Stehlin JS, Wall ME, Wani MC, Nicholas AW, Liu LF, Silber R, Potmesil M. DNA topoisomerase I--targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. *Science*, **1989** Nov 24;246(4933):1046-8.
53. Goldwasser F, Gross-Goupil M, Tigaud JM, Di Palma M, Marceau-Suissa J, Wasserman E, Yovine A, Misset JL, Cvitkovic E. Dose escalation of CPT-11 in combination with oxaliplatin using an every two weeks schedule: a phase I study in advanced gastrointestinal cancer patients. *Annals of Oncology*, **2000** Nov;11(11):1463-70.
54. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *Journal of Cell Biology*, **2001** May 28;153(5):1049-60.
55. Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006** Jun 16;41(4):1220-34.
56. Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*, **2009** Aug 15;8(16):2502-8.
57. Graikou K, Popova M, Gortzi O, Bankova V, Chinou I, Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? *LWT - Food Science and Technology*, **2016**. 65, 261-267, ISSN 0023-6438,
58. Grajek W, Olejnik A, Stanaszek K. Kultury komórkowe nabłonka jelitowego jako model do badania transportu trans nabłonkowego. *Biotechnologia*, **2006** 2(73): 148-165.
59. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, **1988** Mar 15;44(3):230-2.

60. Guichard S, Hennebelle I, Bugat R, Canal P. Cellular interactions of 5-fluorouracil and the camptothecin analogue CPT-11 (irinotecan) in a human colorectal carcinoma cell line. *Biochemical Pharmacology*, **1998** Mar 1;55(5):667-76.
61. Gullett NP, Ruhul Amin AR, Bayraktar S, Pezzuto JM, Shin DM, Khuri FR, Aggarwal BB, Surh YJ, Kucuk O. Cancer prevention with natural compounds. *Seminars in Oncology*, **2010** Jun;37(3):258-81.
62. Guo J, Verma UN, Gaynor RB, Frenkel EP, Becerra CR. Enhanced chemosensitivity to irinotecan by RNA interference-mediated down-regulation of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Clinical Cancer Research*, **2004** May 15;10(10):3333-41.
63. Hardman WE, Moyer MP, Cameron IL. Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (irinotecan) efficacy against MCF-7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side-effects. *British Journal of Cancer*, **1999** Oct;81(3):440-8.
64. Hardman WE, Moyer MP, Cameron IL. Consumption of an omega-3 fatty acids product, INCELL AAFA, reduced side-effects of CPT-11 (irinotecan) in mice. *British Journal of Cancer*, **2002** Mar 18;86(6):983-8.
65. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, **1983** Apr 1;32(7):1141-8.
66. He YJ, Liu BH, Xiang DB, Qiao ZY, Fu T, He YH. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves beta-catenin associated signaling pathway down-regulation. *World Journal of Gastroenterology*, **2006** Aug 21;12(31):4981-5.
67. Hongal S, Torwane NA, Goel P, Chandrashekar B. The effect of 30% ethanolic extract of Indian propolis on replica of human dentin compared against commercially available desensitizing agent: A methodological SEM study *in vitro*. *Pharmacognosy Research*, **2014** Apr;6(2):113-9.
68. Hsu TH, Chu CC, Hung MW, Lee HJ, Hsu HJ, Chang TC. Caffeic acid phenethyl ester induces E2F-1-mediated growth inhibition and cell-cycle arrest in human cervical cancer cells. *The FEBS Journal*, **2013** Jun;280(11):2581-93.
69. Hu Z, Yang X, Ho PC, Chan E, Chan SY, Xu C, Li X, Zhu YZ, Duan W, Chen X, Huang M, Yang H, Zhou S. St. John's Wort modulates the toxicities and pharmacokinetics of CPT-11 (irinotecan) in rats. *Pharmaceutical Research*, **2005** Jun;22(6):902-14.
70. Huang MT, Ma W, Yen P, Xie JG, Han J, Frenkel K, Grunberger D, Conney AH. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. *Carcinogenesis*, **1996** Apr;17(4):761-5.

71. Hung MW, Shiao MS, Tsai LC, Chang GG, Chang TC. Apoptotic effect of caffeic acid phenethyl ester and its ester and amide analogues in human cervical cancer ME180 cells. *Anticancer Research*, **2003** Nov-Dec;23(6C):4773-80..
72. İlhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur Journal of Cardiothoracic Surgery*, **1999** Oct;16(4):458-63.
73. İlhan A, Akyol O, Gürel A, Armutcu F, Iraz M, Öztas E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, **2004** Aug 1;37(3):386-94.
74. Izuta H, Shimazawa M, Tsuruma K, Araki Y, Mishima S, Hara H. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2009** Nov 17;9:45.
75. ISO10993-5:2009 Biologiczna ocena wyrobów medycznych -- Część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro*, 30-11-2009
76. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*, **2006** Oct 6;127(1):125-37.
77. Jałoszyński P. Analiza pęknięć nici DNA metodą elektroforezy pojedynczych komórek (comet assay), w: Analiza DNA. Teoria i praktyka, red. Słomski R. **2008**. ISBN 978-83-7160-496-6. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, s. 549-554
78. Jin UH, Song KH, Motomura M, Suzuki I, Gu YH, Kang YJ, Moon TC, Kim CH. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2008** Mar;310(1-2):43-8.
79. Jo SY, Lee N, Hong SM, Jung HH, Chae SW. Caffeic acid phenethyl ester inhibits diesel exhaust particle-induced inflammation of human middle ear epithelial cells via NOX4 inhibition. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, **2013** Sep;122(9):595-600.
80. Kabała-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Jastrzębska-Stojko Ż, Stojko R, Wojtyczka RD, Stojko J. Comparison of Two Components of Propolis: Caffeic Acid (CA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Molecules*, **2017** Sep 15;22(9):1554.
81. Kaku Y, Tsuchiya A, Kanno T, Nishizaki T. Irinotecan induces cell cycle arrest, but not apoptosis or necrosis, in Caco-2 and CW2 colorectal cancer cell lines. *Pharmacology*, **2015**;95(3-4):154-9.
82. Kalthoff S, Paulusch S, Rupp A, Holdenrieder S, Hartmann G, Strassburg CP. The coffee ingredients caffeic acid and caffeic acid phenylethyl ester protect against irinotecan-

- induced leukopenia and oxidative stress response. *British Journal of Pharmacology*, **2020** Sep;177(18):4193-4208.
- 83.** Kędzia B. Skład chemiczny propolisu polskiego. Cz. I. Początkowy okres badań. *Postępy Fitoterapii*, **2009**, s. 39-44
- 84.** Kehrer DF, Soepenbergh O, Loos WJ, Verweij J, Sparreboom A. Modulation of camptothecin analogs in the treatment of cancer: a review. *Anticancer Drugs*, **2001** Feb;12(2):89-105.
- 85.** Kim HK, Wilson EG, Choi YH, Verpoorte R. Metabolomics: a tool for anticancer lead-finding from natural products. *Planta Medica*, **2010** Aug;76(11):1094-102.
- 86.** Kizilay A, Kalcioglu MT, Ozerol E, Iraz M, Gulec M, Akyol O, Ozturan O. Caffeic acid phenethyl ester ameliorated ototoxicity induced by cisplatin in rats. *Journal of Chemotherapy*, **2004** Aug;16(4):381-7.
- 87.** Kleczka A, Kubina R, Dzik R, Jasik K, Stojko J, Cholewa K, Kabała-Dzik A. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induced Apoptosis in Serous Ovarian Cancer OV7 Cells by Deregulation of BCL2/BAX Genes. *Molecules*, **2020** Jul 31;25(15):3514.
- 88.** Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydinç M, Karaman A, Gültek A, Akyol O, Gürsoy MH, Aydin E. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *Journal of Pediatric Surgery*, **1999** Oct;34(10):1458-62.
- 89.** Kong Q, Lillehei KO. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Medical Hypotheses*, **1998** Nov;51(5):405-9.
- 90.** Kontek R, Drozda R, Sliwiński M, Grzegorzczak K. Genotoxicity of irinotecan and its modulation by vitamins A, C and E in human lymphocytes from healthy individuals and cancer patients. *Toxicology in Vitro*, **2010** Mar;24(2):417-24.
- 91.** Kontek R, Nowicka H. The modulatory effect of melatonin on genotoxicity of irinotecan in healthy human lymphocytes and cancer cells. *Drug and Chemical Toxicology*, **2013** Jul;36(3):335-42.
- 92.** Kontek R, Jakubczak M, Matlawska-Wasowska K. The antioxidants, vitamin A and E but not vitamin C and melatonin enhance the proapoptotic effects of irinotecan in cancer cells *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, **2014** Mar 1;28(2):282-91.
- 93.** Końca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdź S, Koza Z, Wojcik A.: A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research*, **2003**; 534: 15-20
- 94.** Koru Ö, Avcu F, Tanyüksel M, Ural AU, Araz RE, Şener K. Cytotoxic effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the human multiple myeloma cell line. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **2009**. 39(6); 863-870.
- 95.** Kozakowska M, Ciesla M, Stefanska A, Skrzypek K, Was H, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Kotlinowski J, Szymula A, Bartelik A, Mazan M, Yagensky O, Florczyk U, Lemke K, Zebzda

- A, Dyduch G, Nowak W, Szade K, Stepniewski J, Majka M, Derlacz R, Loboda A, Dulak J, Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs. *Antioxidants & Redox Signaling*, **2012** Jan 15;16(2):113-27.
- 96.** Krześlak A. Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **2010** Oct 19;64:490-503.
- 97.** Kudugunti SK, Vad NM, Ekogbo E, Moridani MY. Efficacy of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in skin B16-F0 melanoma tumor bearing C57BL/6 mice. *Investigational New Drugs*, **2011** Feb;29(1):52-62.
- 98.** Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, **1999** Mar;64(3):235-40.
- 99.** Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2018** Jun 1;2018(6).
- 100.** Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, Lin WL, Chou FP, Tseng TH. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Letters*, **2006** Mar 28;234(2):199-208.
- 101.** Kuo YY, Lin HP, Huo C, Su LC, Yang J, Hsiao PH, Chiang HC, Chung CJ, Wang HD, Chang JY, Chen YW, Chuu CP. Caffeic acid phenethyl ester suppresses proliferation and survival of TW2.6 human oral cancer cells via inhibition of Akt signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, **2013** Apr 24;14(5):8801-17.
- 102.** Kuo YY, Jim WT, Su LC, Chung CJ, Lin CY, Huo C, Tseng JC, Huang SH, Lai CJ, Chen BC, Wang BJ, Chan TM, Lin HP, Chang WS, Chang CR, Chuu CP. Caffeic Acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **2015** May 12;16(5):10748-66.
- 103.** Labriola D, Livingston R. Possible interactions between dietary antioxidants and chemotherapy. *Oncology (Williston Park)*, **1999** Jul;13(7):1003-8; discussion 1008, 1011-1012.
- 104.** Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2014** Mar;15(3):178-96.
- 105.** Lamson DW, Brignall MS. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. *Alternative Medicine Review*, **1999** Oct;4(5):304-29. PMID: 10559547.
- 106.** Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2007** Jun;85(6):1586-91.

107. Lee YJ, Kuo HC, Chu CY, Wang CJ, Lin WC, Tseng TH. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical Pharmacology*, **2003** Dec 15;66(12):2281-9.
108. Lee KJ, Choi JH, Khanal T, Hwang YP, Chung YC, Jeong HG. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology*, **2008** Jun 3;248(1):18-24.
109. Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **2019** Mar 22;26(1):1-7.
110. Li YJ, Wei ZM, Meng YX, Ji XR. Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World Journal of Gastroenterology*, **2005** Apr 14;11(14):2117-23.
111. Liao HF, Chen YY, Liu JJ, Hsu ML, Shieh HJ, Liao HJ, Shieh CJ, Shiao MS, Chen YJ. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003** Dec 31;51(27):7907-12.
112. Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, **2009** May;48(1):46-53.
113. Lin HP, Jiang SS, Chuu CP. Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction, Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. *PLoS One*, **2012**;7(2):e31286.
114. Lin HP, Lin CY, Huo C, Hsiao PH, Su LC, Jiang SS, Chan TM, Chang CH, Chen LT, Kung HJ, Wang HD, Chuu CP. Caffeic acid phenethyl ester induced cell cycle arrest and growth inhibition in androgen-independent prostate cancer cells via regulation of Skp2, p53, p21Cip1 and p27Kip1. *Oncotarget*, **2015** Mar 30;6(9):6684-707.
115. Marcucci C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, **1995**. 26 (2) 83-99.
116. Marin EH, Paek H, Li M, Ban Y, Karaga MK, Shashidharamurthy R, Wang X. Caffeic acid phenethyl ester exerts apoptotic and oxidative stress on human multiple myeloma cells. *Investigational New Drugs*, **2019** Oct;37(5):837-848.
117. Martino E, Della Volpe S, Terribile E, Benetti E, Sakaj M, Centamore A, Sala A, Collina S. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2017** Feb 15;27(4):701-707.
118. Mathijssen RH, Loos WJ, Verweij J, Sparreboom A. Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan. *Current Cancer Drug Targets*, **2002** Jun;2(2):103-23.

- 119.** McEleny K, Coffey R, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW. Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *British Journal of Urology International*, **2004** Aug;94(3):402-6.
- 120.** Mehta VK, Cho C, Ford JM, Jambalos C, Poen J, Koong A, Lin A, Bastidas JA, Young H, Dunphy EP, Fisher G. Phase II trial of preoperative 3D conformal radiotherapy, protracted venous infusion 5-fluorouracil, and weekly CPT-11, followed by surgery for ultrasound-staged T3 rectal cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **2003** Jan 1;55(1):132-7.
- 121.** Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, Mestre JR, Grunberger D, Sacks PG, Tanabe T, Dannenberg AJ. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Research*, **1999** May 15;59(10):2347-52.
- 122.** Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science*, **2002** May 31;296(5573):1644-6.
- 123.** Murugan AK, Munirajan AK, Tsuchida N. Genetic deregulation of the PIK3CA oncogene in oral cancer. *Cancer Letters*, **2013** Sep 28;338(2):193-203.
- 124.** Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1996** Aug 20;93(17):9090-5.
- 125.** Nomura M, Kaji A, Ma W, Miyamoto K, Dong Z. Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester. *Molecular Carcinogenesis*, **2001** Jun;31(2):83-9.
- 126.** Norman, G.R.; Sloan, J.A.; Wyrwich, K.W. Interpretation of changes in health-related quality of life: The remarkable Universality of half a standard deviation. *Medical Care*, **2003**, 41, 582–592
- 127.** Omene CO, Wu J, Frenkel K. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. *Investigational New Drugs*, **2012** Aug;30(4):1279-88.
- 128.** Onori P, DeMorrow S, Gaudio E, Franchitto A, Mancinelli R, Venter J, Kopriva S, Ueno Y, Alvaro D, Savage J, Alpini G, Francis H. Caffeic acid phenethyl ester decreases cholangiocarcinoma growth by inhibition of NF-kappaB and induction of apoptosis. *International Journal of Cancer*, **2009** Aug 1;125(3):565-76.

- 129.** Oparka M, Walczak J, Malinska D, van Oppen LMPE, Szczepanowska J, Koopman WJH, Wieckowski MR. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods*. **2016** Oct 15;109:3-11.
- 130.** Orford K, Orford CC, Byers SW. Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *Journal of Cell Biology*, **1999** Aug 23;146(4):855-68.
- 131.** Ozen S, Akyol O, Iraz M, Söğüt S, Ozuğurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Applied Toxicology*, **2004** Jan-Feb;24(1):27-35.
- 132.** Ozyurt H, Söğüt S, Yildirim Z, Kart L, Iraz M, Armutçu F, Temel I, Ozen S, Uzun A, Akyol O. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clinica Chimica Acta*, **2004** Jan;339(1-2):65-75.
- 133.** Paulík A, Nekvindová J, Filip S. Irinotecan toxicity during treatment of metastatic colorectal cancer: focus on pharmacogenomics and personalized medicine. *Tumori Journal*, **2020** Apr;106(2):87-94.
- 134.** Peterlik M, Grant WB, Cross HS. Calcium, vitamin D and cancer. *Anticancer Research*, **2009** Sep;29(9):3687-98.
- 135.** Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, **2002** Nov;73 Suppl 1:S7-20.
- 136.** Piotrkowska A, Iżykowska I, Podhorska-Okołów M, Zabel M, Dzięgiel P.
Budowa białek z rodziny NF-kB i ich rola w procesie apoptozy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **2008**; 62: 64-74
- 137.** Prasad KN, Kumar, A.; Kochupillai, V.; Cole, W.C. High doses of multiple antioxidant vitamins: Essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy. *Journal of the American College of Nutrition*, **1999**, 18, 13-25
- 138.** Ricchi P, Di Matola T, Ruggiero G, Zanzi D, Apicella A, di Palma A, Pensabene M, Pignata S, Zarrilli R, Acquaviva AM. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on colon carcinoma Caco-2 cell responsiveness to topoisomerase inhibitor drugs. *British Journal of Cancer*, **2002** May 6;86(9):1501-9.
- 139.** Rivory LP. Irinotecan (CPT-11): a brief overview. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. **1996** Oct-Nov;23(10-11):1000-4.
- 140.** Rossi A, Ligresti A, Longo R, Russo A, Borrelli F, Sautebin L. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine*, **2002** Sep;9(6):530-5.

- 141.** Rössig L, Badorff C, Holzmann Y, Zeiher AM, Dimmeler S. Glycogen synthase kinase-3 couples AKT-dependent signaling to the regulation of p21Cip1 degradation. *Journal of Biological Chemistry*, **2002** Mar 22;277(12):9684-9.
- 142.** Rothenberg ML. The current status of irinotecan (CPT-11) in the United States. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1996** Dec 13;803:272-81.
- 143.** Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, **2002** Nov;73 Suppl 1:S21-9.
- 144.** Saarem W, Wang FY, Farfel E. Propolis or Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) inhibits growth and viability in multiple oral cancer cell lines. *International Journal of Medical and Biomedical Studies*, **2019**;3(1):50-55.
- 145.** Şahin A, Kaya S, Türkcü G, Cingü AK, Yüksel H, Türkcü FM, Yüksel H, Cınar Y, Arı S, Şahin M, Çaça I, Gökalp O. The effects of caffeic acid phenethyl ester in acute methanol toxicity on rat retina and optic nerve. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, **2013** Oct;32(4):263-7.
- 146.** Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, **2005** Dec;17(6):596-603.
- 147.** Sawaya AC, Barbosa da Silva Cunha I, Marcucci MC. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, **2011** Jun 1;5(1):27.
- 148.** Sawicka D, Car H, Borawska MH, Nikliński J. The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, **2012** Apr 24;50(1):25-37.
- 149.** Scapagnini G, Foresti R, Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Green CJ, Motterlini R. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Molecular Pharmacology*, **2002** Mar;61(3):554-61.
- 150.** Schaeppi U, Fleischman RW, Cooney DA. Toxicity of camptothecin (NSC-100880). *Cancer Chemotherapy Reports. Part 3*, **1974** Sep;5(1):25-36.
- 151.** Sears S, McNally P, Bachinski MS, Avery R. Irinotecan (CPT-11) induced colitis: report of a case and review of Food and Drug Administration MEDWATCH reporting. *Gastrointestinal Endoscopy*, **1999** Dec;50(6):841-4.
- 152.** Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2013**;5(4):008714
- 153.** Shen YC, Yen JC, Liou KT. Ameliorative effects of caffeic acid phenethyl ester on an eccentric exercise-induced skeletal muscle injury by down-regulating NF- κ b mediated inflammation. *Pharmacology*, **2013**; 91(3-4):219-28.
- 154.** Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2019. *CA – A Cancer Journal for Clinicians*, **2019** Jan;69(1):7-34.

- 155.** Silici S, Ünlü M, Vardar-Ünlü G. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2007** Dec;23(12):1797-803.
- 156.** Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **1988** Mar;175(1):184-91.
- 157.** Song JJ, Cho JG, Hwang SJ, Cho CG, Park SW, Chae SW. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on LPS-induced inflammation of human middle ear epithelial cells. *Acta Oto-Laryngologica*, **2008**; 128(12):1303-7.
- 158.** Souglakos J, Syrigos K, Potamianou A, Polyzos A, Boukovinas I, Androulakis N, Kouroussis Ch, Vardakis N, Christophilakis Ch, Kotsakis A, Georgoulas V. Combination of irinotecan (CPT-11) plus oxaliplatin (L-OHP) as first-line treatment in locally advanced or metastatic gastric cancer: a multicentre phase II trial. *Annals of Oncology*, **2004** Aug;15(8):1204-9.
- 159.** Sun L, Wang K, Xu X, Ge M, Chen Y, Hu F. Potential Protective Effects of Bioactive Constituents from Chinese Propolis against Acute Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide in Cardiac H9c2 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2017**;2017:7074147.
- 160.** Tang H, Yao X, Yao C, Zhao X, Zuo H, Li Z. Anti-colon cancer effect of caffeic acid p-nitrophenethyl ester *in vitro* and *in vivo* and detection of its metabolites. *Scientific Reports*, **2017** Aug 8;7(1):7599.
- 161.** Tolba MF, Esmat A, Al-Abd AM, Azab SS, Khalifa AE, Mosli HA, Abdel-Rahman SZ, Abdel-Naim AB. Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances docetaxel and paclitaxel cytotoxicity in prostate cancer cells. *Journal of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, **2013** Aug;65(8):716-29.
- 162.** Toyoda T, Tsukamoto T, Takasu S, Shi L, Hirano N, Ban H, Kumagai T, Tatematsu M. Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor-kappaB inhibitor, on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *International Journal of Cancer*, **2009** Oct 15;125(8):1786-95.
- 163.** Trusheva B, Todorov I, Ninova M, Najdenski H, Daneshmand A, Bankova V. Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. *Chemistry Central Journal*, **2010** Mar 29;4:8.
- 164.** Ueda T, Inden M, Shirai K, Sekine SI, Masaki Y, Kurita H, Ichihara K, Inuzuka T, Hozumi I. The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Scientific Reports*, **2017** Jun 6;7(1):2882.

165. Uysal E, Yilmaz HR, Ugan Y, Altuntas A, Dogru A, Kutlucan A, Tunc SE. Protective Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **2015** Dec;29(12):559-63.
166. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, Yilmaz HR, Yurekli VA, Kucuker H, Songur A. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology*, **2006** Feb 1;218(2-3):125-33.
167. Wagh VD, Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, **2013**;308249.
168. Wall ME, Wani M.C, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA. Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *Journal of the American Chemical Society*, **1966**;16(88):3888-3890
169. Wang D, Xiang DB, He YJ, Li ZP, Wu XH, Mou JH, Xiao HL, Zhang QH. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. *World Journal of Gastroenterology*, **2005** Jul 14;11(26):4008-12.
170. Wang X, Stavchansky S, Zhao B, Bynum JA, Kerwin SM, Bowman PD. Cytoprotection of human endothelial cells from menadione cytotoxicity by caffeic acid phenethyl ester: the role of heme oxygenase-1. *European Journal of Pharmacology*, **2008** Sep 4;591(1-3):28-35.
171. Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Biological Chemistry*, **2004** Feb 13;279(7):6017-26.
172. Woźniak M, Ratajczak I, Kędzia B, Rogoziński T. Zawartość wybranych pierwiastków w propolisie i jego etanolowym ekstrakcie. *Postępy Fitoterapii*, **2016**; 17(1):3-7
173. Wu J, Omene C, Karkoszka J, Bosland M, Eckard J, Klein CB, Frenkel K. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Letters*, **2011** Sep 1;308(1):43-53.
174. Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, Li Z, Xie J. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs*, **2006** Aug;17(7):753-62.
175. Xu Y, Villalona-Calero MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Annals of Oncology*, **2002** Dec;13(12):1841-51.

- 176.** Yagmurca M, Erdogan H, Iraz M, Songur A, Ucar M, Fadillioglu E. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clinica Chimica Acta*, **2004** Oct;348(1-2):27-34.
- 177.** Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **2004**;18(4):234-8.
- 178.** Yilmaz HR, Uz E, Altunbasak A, Sakalli E, Ozcelik N. Anticlastogenic effect of caffeic acid phenethyl ester on cisplatin-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. *Toxicology and Industrial Health*, **2010** Feb;26(1):33-7.
- 179.** Yu HJ, Shin JA, Yang IH, Won DH, Ahn CH, Kwon HJ, Lee JS, Cho NP, Kim EC, Yoon HJ, Lee JI, Hong SD, Cho SD. Apoptosis induced by caffeic acid phenethyl ester in human oral cancer cell lines: Involvement of Puma and Bax activation. *Archives of Oral Biology*, **2017** Dec;84:94-99.
- 180.** Yu M, Tong X, Qi B, Qu H, Dong S, Yu B, Zhang N, Tang N, Wang L, Zhang C. Berberine enhances chemosensitivity to irinotecan in colon cancer via inhibition of NF- κ B. *Molecular Medicine Reports*, **2014** Jan;9(1):249-54.
- 181.** Yue B, Gao R, Wang Z, Dou W. Microbiota-Host-Irinotecan Axis: A New Insight Toward Irinotecan Chemotherapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2021** Oct 14;11:710945.
- 182.** Zhang L, Wang H, Li W, Zhong J, Yu R, Huang X, Wang H, Tan Z, Wang J, Zhang Y. Pazopanib, a novel multi-kinase inhibitor, shows potent antitumor activity in colon cancer through PUMA-mediated apoptosis. *Oncotarget*, **2017** Jan 10;8(2):3289-3303.
- 183.** Zhang M, Wang L, Wen D, Ren C, Chen S, Zhang Z, Hu L, Yu Z, Tombran-Tink J, Zhang X, Li X, Barnstable CJ. Neuroprotection of retinal cells by Caffeic Acid Phenylethyl Ester (CAPE) is mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *Neurochemistry International*, **2021** Dec;151:105214.
- 184.** Zhang Y, Gan B, Liu D, Paik JH. FoxO family members in cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **2011** Aug 15;12(4):253-9.
- 185.** Zhang Y, Kong D, Han H, Cao Y, Zhu H, Cui G. Caffeic acid phenethyl ester protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity and increases chemotherapeutic efficacy by regulating the unfolded protein response. *Food and Chemical Toxicology*, **2022** Jan;159:112770.

Strongy internetowe:

Strona internetowa 1.

<https://pasiekisadowskich.pl/blog/blog-pasieki-rodziny-sadowskich/propolis-kit-pszczeli-nalewka-poznaj-przepis-i-wlasciwosci>

Strona internetowa 2.

<https://www.atcc.org/products/crl-1739>

Strona internetowa 3.

<https://www.atcc.org/products/htb-38>

Strona internetowa 4.

<https://www.atcc.org/products/ccl-247>

Strona internetowa 5.

<https://www.atcc.org/products/htb-37>

Strona internetowa 6

https://pl.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/apotox_glo-triplex-assay/?catNum=G6320