



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

mgr inż. Maria Błaszczuk

Związki hamujące biosyntezę cholesterolu jako modulatory aktywności przeciwnowotworowej leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych w komórkach raka jelita grubego – badania *in vitro*.

Praca doktorska została wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biofizyki i Neurobiologii
Uniwersytetu Medycznego
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Promotor: dr hab. Olga Wesołowska
Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Palko-Łabuz

WROCLAW 2023

Podziękowania

Dr hab. Oldze Wesołowskiej za opiekę naukową, wyrozumiałość oraz pomoc i zaangażowanie przy pisaniu niniejszej rozprawy doktorskiej

Dr inż. Annie Palko-Łabuz za życzliwość, cenne wskazówki i pomoc w realizacji badań

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Biofizyki i Neurobiologii za przyjazną atmosferę pracy i za to że zawsze można było liczyć na Waszą pomoc

Dziękuję Moim Najbliższym za wsparcie, cierpliwość i wiarę

Spis treści

Wykaz skrótów	6
Streszczenie	9
Summary	11
1. Część teoretyczna	13
1.1. Rak jelita grubego – epidemiologia i etiologia	13
1.2. Biosynteza cholesterolu i jej znaczenie w patologii chorób	17
1.3. Trójglicerydy	21
1.4. Związki hamujące biosyntezę cholesterolu	23
1.4.1. Statyny	23
1.4.2. Betulina	26
1.5. Leki przeciwpsychotyczne i przeciwdepresyjne	28
1.5.1. Właściwości przeciwnowotworowe leków psychotropowych	30
1.5.2. Wpływ leków przeciwpsychotycznych na homeostazę cholesterolu	32
1.6. Repozycjonowanie leków w terapii onkologicznej	35
1.7. Terapie kombinowane w onkologii	36
2. Część doświadczalna	40
2.1. Cel pracy	40
2.2. Materiały	42
2.2.1. Linie komórkowe	42
2.2.2. Startery DNA	42
2.2.3. Badane związki	43
2.2.4. Pozostałe odczynniki	47
2.3. Metodologia badań	50
2.3.1. Hodowle komórkowe linii nowotworowych i prawidłowych	50
2.3.2. Oznaczenie cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu SRB	50
2.3.3. Oznaczenie cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu MTT	51
2.3.4. Analiza oddziaływania między związkami	52

2.3.5.	Cytometria przepływowa	53
2.3.6.	Izolacja całkowitego RNA z komórek nowotworowych	55
2.3.7.	Reakcja odwrotnej transkrypcji	56
2.3.8.	Łańcuchowa reakcja polimeryzacji	57
2.3.9.	Elektroforeza DNA	58
2.3.10.	Barwienie wolnego cholesterolu w komórkach linii HT29 za pomocą filipiny	58
2.3.11.	Elektroformacja	59
2.3.12.	Mikroskopia fluorescencyjna	59
2.3.13.	Obliczenia fizykochemiczne i modelowanie molekularne	60
2.3.14.	Mikrokalorymetria	60
2.3.15.	Spektrofluorymetria	61
2.3.16.	Analiza statystyczna	62
3.	Wyniki	63
3.1.	Określenie aktywności cytotoksycznej względem linii HT29 i HT29/Dx	63
3.2.	Określenie aktywności cytotoksycznej względem linii COLO205	66
3.3.	Określenie aktywności cytotoksycznej względem komórek linii prawidłowych	67
3.4.	Aktywność cytotoksyczna w kombinacji z simwastatyną	72
3.4.1.	Klozapina	74
3.4.2.	Imipramina	77
3.4.3.	Flufenazyna	80
3.4.4.	Trifluoperazyna	82
3.4.5.	Flupentyksol	85
3.4.6.	Risperidon	88
3.5.	Aktywność cytotoksyczna w kombinacji z betuliną	90
3.5.1.	Klozapina	91
3.5.2.	Imipramina	94

3.5.3.	Flufenazyna	96
3.5.4.	Trifluoperazyna	99
3.5.5.	Flupentyksol	101
3.5.6.	Risperydón	104
3.6.	Wpływ leków antypsychotycznych na cykl komórkowy	106
3.7.	Wpływ leków antypsychotycznych na proces apoptozy	110
3.8.	Wpływ leków antypsychotycznych na poziom reaktywnych form tlenu	112
3.9.	Ekspresja genów zaangażowanych w biosyntezę cholesterolu	113
3.10.	Analiza ilości wolnego cholesterolu w komórkach HT29	117
3.11.	Wpływ badanych związków na mikrodomeny błonowe	119
3.12.	Właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne badanych związków	122
3.13.	Wpływ betuliny i jej pochodnych na termotropowe właściwości błony lipidowej	129
3.14.	Spektrofluorymetria	135
3.14.1.	Anizotropia DPH	135
3.14.2.	Anizotropia TMA-DPH	137
3.14.3.	Polaryzacja uogólniona Laurdanu	138
4.	Dyskusja	140
5.	Podsumowanie	158
6.	Wnioski	161
7.	Spis rysunków	162
8.	Spis tabel	164
	Literatura	166

Wykaz skrótów

5-FU – 5-fluorouracyl

5-HT_{2A} – receptor serotoniny

ABC – (ang. *ATP-binding cassette transporters*) – transportery z domeną wiążącą ATP

ACTB – gen kodujący β-aktynę

B1 – 3β,28-diacetoksy-lup-20(29)-en

B2 – 3β-acetoksy-lup-20 (29)-en-28-ol

BCRP – (ang. *breast cancer resistance protein*) – białko oporności raka piersi

BET – betulina

Chol – cholesterol

CI – (ang. *combination index*) –indeks kombinacji

CIMP – (ang. *CpG island methylator phenotype*) – fenotyp hipermetylacji wysp CpG

CIN – (ang. *chromosomal instability*) – fenotyp niestabilności chromosomalnej

CMS – (ang. *consensus molecular subtypes*) – podtypy molekularne RJG

CRC – (ang. *colon cancer*) – rak jelita grubego

D₂ – receptor dopaminy

DMPC – 1,2-dimirystoilo-sn-glicerolo-3-fosfatydylocholina

DMSO – dimetylosulfotlenek

DOPC – 1,2- dioleilo-sn-glicero-3 fosfatydylocholina

DPH – 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien

DPPC – 1,2-dipalmitoilo–sn-glicerolo-3-fosfatydylocholina

EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu

EGFR – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu

EPS – (ang. *extrapyramidal symptoms*) – objawy zespołu pozapirymidowego

ER – retikulum endoplazmatyczne

FBS – płodowa surowica wołowa

FLP – flupentyksol

FLU – flufenazyne

FPP – pirofosforan farnezyłu

GPP – pirofosforan geranylu

GUV – (ang. *giant unilamellar vesicles*) – ogromne jednowarstwowe liposomy

HCC – rak wątrobowokomórkowy

HDL – (ang. *high density lipoproteins*) – lipoproteiny o dużej gęstości

HMG-CoA – 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzym A

HMGCR – gen kodujący reduktazę HMG-CoA

IC₁₀ – (ang. *inhibitory concentration 10%*) – stężenie związku potrzebne do zahamowania proliferacji komórek w 10% w stosunku do próby kontrolnej

IC₂₅ – (ang. *inhibitory concentration 25%*) – stężenie związku potrzebne do zahamowania proliferacji komórek w 25% w stosunku do próby kontrolnej

IC₅₀ – (ang. *inhibitory concentration 50%*) – stężenie związku potrzebne do zahamowania proliferacji komórek w 50% w stosunku do próby kontrolnej

IDL – (ang. *intermediate density lipoproteins*) – lipoproteiny o pośredniej gęstości

IMP – imipramina

IPP – pirofosforan izopentenylu

KLZ – klozapina

LDL – (ang. *low density lipoproteins*) – lipoproteiny o małej gęstości

LDLR – gen kodujący receptor lipoprotein o małej gęstości

LOR – loratadyna

LUR – lurazydon

LV – leukoworyna

MDR – (ang. *multidrug resistance*) – oporność wielolekowa

MRP1 – (ang. *multidrug resistance associated protein 1*) – białko oporności wielolekowej 1

MRP3 – (ang. *multidrug resistance protein 3*) – białko oporności wielolekowej 3

MSI – (ang. *microsatellite instability*) – fenotyp niestabilności mikrosatelitarnej

OLZ – olanzapine

PBS – buforowany roztwór soli fizjologicznej

PCR – (ang. *polymerase chain reaction*) – łańcuchowa reakcja polimeryzacji

PCZ – prochlorperazyna

PFA – perfenazyna

P-gp – glikoproteina P

PI – jodek propidyny

PS – fosfatydyloseryna

QTP – kwetiapina

RIS – rysperydon

RJG – rak jelita grubego

ROS – (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

RT – reakcja odwrotnej transkrypcji

SI – (ang. *selectivity index*) – indeks selektywności

SIM – simwastatyna

SM – sfingomielinę

SRB – sulforodamina B

SREBP – (ang. *sterol regulatory element binding protein*) – czynnik transkrypcyjny SREBP

TCA – (ang. *tricyclic antidepressants*) – trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne

TFP – trifluoperazyna

TGF- β – (ang. *transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostu β

THX – tiotyksen

TMZ – temozolomid

TMA-DPH – 1-(4-trójmetylamino), 6-difenylo-1,3,5-heksatrien

TNM – klasyfikacja zaawansowania klinicznego nowotworów

VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

VLDL – (ang. *very low density lipoproteins*) – lipoproteiny o bardzo małej gęstości

ZIP – zyprazydon

Streszczenie

Leki przeciwpsychotyczne stosowane są w leczeniu chorób psychicznych, a ich zażywanie wiąże się z występowaniem wielu działań niepożądanych, takich jak: wzrost masy ciała, zwiększone ryzyko rozwoju cukrzycy oraz chorób sercowo-naczyniowych. Skutki uboczne powiązane są ze zdolnością tych leków do zaburzania metabolizmu kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Z drugiej strony wiele badań epidemiologicznych wykazało korelację między długotrwałym stosowaniem leków przeciwpsychotycznych, a zmniejszoną zapadalnością na nowotwory. Jedną z cech komórek nowotworowych jest ich odporność na apoptozę oraz większa zdolność do proliferacji i tworzenia przerzutów. Błona komórkowa pełni kluczową rolę w zachowaniu komórek przy życiu, a zmiany w szlakach sygnalizacyjnych związane z traktami lipidowymi są silnie zależne od ilości i rozmieszczenia cholesterolu w komórkach. Z tego powodu ważne jest prowadzenie badań mających na celu identyfikację leków zdolnych do zaburzania homeostazy lipidowej i modulowania właściwości błon komórek nowotworowych. Jednym z nowotworów, w którym zaobserwowano zwiększony poziom cholesterolu we krwi jest rak jelita grubego (RJG). Nowotwór ten, zajmuje trzecie miejsce wśród całkowitej liczby zachorowań na nowotwory na świecie. Występowanie raka jelita grubego silnie zależy od czynników środowiskowych, w tym niewłaściwej diety oraz otyłości. Leki, zdolne do zmniejszania poziomów kwasów tłuszczowych i cholesterolu mogą więc być obiecującymi kandydatami na substancje uzupełniające leczenie raka jelita grubego.

Celem pracy doktorskiej było zidentyfikowanie leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych zdolnych do selektywnego hamowania wzrostu komórek nowotworowych RJG w porównaniu z komórkami nienowotworowymi oraz określenie ich wpływu na zwiększenie ekspresji genów lipogennych. Dodatkowo sprawdzono antyproliferacyjne działanie badanych leków używanych samodzielnie, a także w kombinacjach z substancjami o udokumentowanym wpływie na metabolizm cholesterolu: simwastatyną oraz betuliną w poszukiwaniu synergii pomiędzy tymi związkami. Większość spośród badanych leków ma dobrze udokumentowane zdolności do oddziaływania z błonami lipidowymi, co potencjalnie może wpływać zarówno na ich właściwości cytotoksyczne, jak i na ich wpływ na poziom cholesterolu w komórce. Dodatkowym celem pracy było określenie wpływu badanych leków na mikrodomeny błonowe wzbogacone w cholesterol i sfingomielinę (tzw. tratwy lipidowe) w układach modelowych.

Badania cytotoksyczności przeprowadzone na liniach komórkowych RJG wykazały, że większość badanych leków przeciwpsychotycznych posiadała znaczną aktywność przeciwnowotworową wobec komórek linii HT29 oraz COLO205. Większą toksycznością charakteryzowały się leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji, niż leki drugiej generacji. Ponadto, wyższą aktywność antyproliferacyjną zaobserwowano wobec komórek linii COLO205. Związki znane ze zdolności do modulowania biosyntezy cholesterolu – simwastatyna (SIM) oraz betulina (BET) również posiadały istotną aktywność cytotoksyczną. Badania przeprowadzone na liniach nienowotworowych, wykazały, że badane leki charakteryzowały się selektywną cytotoksycznością wobec komórek rakowych. Dodatkowo przebadano dwie nowe pochodne BET i wykazano, że pochodna podstawiona jedną grupą acetylową (B1) posiadała znacznie wyższą aktywność przeciwnowotworową od pochodnej zawierającej dwie grupy acetylowe (B2). Trzy leki: trifluoperazyna (TFP), imipramina (IMP) oraz flupentyksol (FLP) działały synergistycznie w kombinacji z SIM, ale jedynie TFP wykazała synergizm również z BET. Dodatkowo połączenie SIM z FLP zwiększyło efekt proapoptyczny tego leku oraz zwiększyło zdolność TFP i IMP do generowania reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych. Wymienione wyżej leki, wykazujące synergizm w połączeniu z SIM mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu przeciwnowotworowym. Stwierdzono, że wszystkie badane leki, oprócz rysperydonu wykazywały zdolność do zwiększania ekspresji genów lipogennych, w tym genów kodujących reduktazę HMG-CoA oraz receptor LDL w komórkach linii nowotworowej RJG. Kolejny etap badań, mający na celu zbadanie wpływu badanych leków na poziom wolnego cholesterolu w komórkach RJG, wykazał, że zarówno SIM, jak i leki przeciwpsychotyczne takie jak FLU, TFP oraz FLP obniżały jego poziom w komórkach linii HT29. Zdolności tej nie zaobserwowano dla BET, natomiast wykazały ją jej acetylowane pochodne. Dodatkowo, TFP, FLP oraz B1 powodowały nierównomierny rozkład cholesterolu, co może oznaczać, że wpływają również na jego rozmieszczenie w błonie komórkowej. Także badania wykonane na ogromnych jednowarstwowych liposomach (GUV) o składzie lipidowym, powodującym pojawienie się w nich mikrodomen dowiodły, że badane związki wpływają na mikrodomeny lipidowe, modyfikując ich pole powierzchni, liczbę oraz kształt. Wydaje się więc, że leki wykazujące synergiczne działanie przeciwnowotworowe w połączeniu z SIM, jednocześnie istotnie wpływają na poziom i rozmieszczenie cholesterolu w komórkach nowotworowych.

Obliczenia fizykochemiczne i modelowanie molekularne, wykazały, że badane związki posiadają wysoką lipofilowość i zdolność do przenikania błon biologicznych, co ma wpływ na

ich aktywność biologiczną. Dodatkowo przeprowadzone badania oddziaływania nowych pochodnych betuliny, B1 oraz B2 z modelowymi błonami lipidowymi za pomocą metod spektrofluorymetrycznych i mikrokalorymetrycznych wykazały, że terpeny te wpływały na termotropowe właściwości dwuwarstw lipidowych. Wyniki otrzymane dla pochodnej B1 wskazują, że posiada ona silniejsze zdolności do interakcji, a także odmienną lokalizację w modelowych błonach lipidowych niż pochodna B2. Różnica ta może stanowić wyjaśnienie jej znacząco wyższej aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek RJG.

Badania wykonane w pracy doktorskiej przyczyniają się do szczegółowego wyjaśnienia mechanizmu działania leków przeciwpsychotycznych na komórki nowotworowe i dostarczają danych istotnych dla ewentualnych prób wprowadzenia niektórych z tych leków do terapii przeciwnowotworowej.

Summary

Antipsychotics are used to treat mental illness, However, their prolonged use is associated with several side effects, such as weight gain, increased risk of developing type II diabetes and cardiovascular diseases. Side effects of antipsychotic drugs are linked to their ability to disturb the fatty acid and cholesterol metabolism. On the other hand, many epidemiological studies have shown a correlation between long-term use of antipsychotics and a reduced incidence of cancer. One of the characteristics of cancer cells is their resistance to apoptosis and their greater ability to proliferate and metastasis. The cell membrane plays a key role in keeping cells alive, and changes in signaling pathways associated with lipid rafts are strongly dependent on the amount and distribution of cholesterol in cells. For this reason, it is important to conduct research to identify drugs capable of disrupting lipid homeostasis and modulating the membrane properties of cancer cells. Colon cancer (CRC) is one of the cancer types in which the increased cholesterol level in serum was observed. This cancer ranks third among the total number of cancers worldwide. The incidence of CRC is strongly influenced by environmental factors, including improper diet and obesity. Drugs capable of reducing levels of fatty acids and cholesterol may therefore be promising candidates as adjuncts to the treatment of CRC.

The aim of the present work was to identify antipsychotic and antidepressant drugs capable of selectively inhibiting the growth of CRC cancer cells compared to non-cancer cells, and to determine their effect on increasing lipogenic gene expression. In addition, the antiproliferative effect of the investigated drugs used alone, as well as in combinations with compounds with documented effects on cholesterol metabolism: simvastatin and betulin, was checked in search

of synergies between these compounds. Most of the drugs tested have well-documented abilities to interact with lipid membranes, potentially influencing both their cytotoxic properties and their effects on cholesterol levels in the cell. An additional aim of this study was to determine the effects of the tested drugs on membrane microdomains enriched in cholesterol and sphingomyelin (lipid rafts) in model systems.

Cytotoxicity studies conducted on CRC cell lines, revealed that the majority of the studied antipsychotics drugs had significant antitumor activity against cells of the HT29 and COLO205 lines. Generally, first-generation antipsychotics had greater cytotoxicity than second-generation drugs. Additionally, COLO205 cells were more vulnerable than HT29 cells. Compounds known for their ability to modulate cholesterol biosynthesis - simvastatin (SIM) and betulin (BET) also had significant cytotoxic activity. Tests conducted on non-cancerous lines, showed that the tested drugs exhibited selective cytotoxicity against cancer cells. In addition, two new BET derivatives were tested and showed that the derivative substituted with one acetyl group (B1) had significantly higher anticancer activity than the derivative containing two acetyl groups (B2). Three antipsychotic drugs: trifluoperazine (TFP), imipramine (IMP) and flupentixol (FLP) acted synergistically in combination with SIM, but only TFP showed synergy also with BET. Moreover, the combination with SIM increased the proapoptotic effect of FLP, and enhanced the ability of TFP and IMP to generate reactive oxygen species in tumour cells. The above-mentioned drugs showing synergy in combination with SIM may find application in anticancer treatment. It was found that all drugs tested, except for risperidone, showed the ability to increase the expression of lipogenic genes, including genes encoding HMG-CoA reductase and the LDL receptor in cells of the CRC cancer line. A further phase of the study to investigate the effects of the drugs tested on free cholesterol levels in CRC cells showed that both SIM and antipsychotic drugs such as FLU, TFP and FLP reduced its levels in HT29 cells. This ability was not observed for BET but was demonstrated by its acetylated derivatives. In addition, TFP, FLP and B1 caused an uneven distribution of cholesterol, which may mean that they also affect its distribution in the cell membrane. Also, studies performed on giant unilamellar liposomes containing raft-mimicking microdomains showed that the tested compounds affect lipid microdomains, modifying their surface area, number, and shape. Thus it was hypothesized that the drugs that behave synergistically in combination with SIM also significantly modify cholesterol level and distribution in cancer cells.

Physicochemical calculations and molecular modeling showed that some of the compounds are highly lipophilic and easily penetrate lipid membranes, which has an impact on their biological

activity. In addition, studies of the interaction of new betulin derivatives, B1 and B2 with model lipid membranes using spectrofluorimetric and microcalorimetric methods showed that these terpenes affected the thermotropic properties of the lipid bilayers. The results obtained for derivative B1 showed that it possessed stronger interaction abilities as well as a different localization in model lipid membranes than derivative B2. This difference may explain its significantly higher antiproliferative activity against CRC cells.

The research carried out in this thesis contributes to the detailed elucidation of the mechanism of action of antipsychotic drugs on cancer cells and provides data relevant to possible attempts to introduce some of these drugs into anticancer therapy.

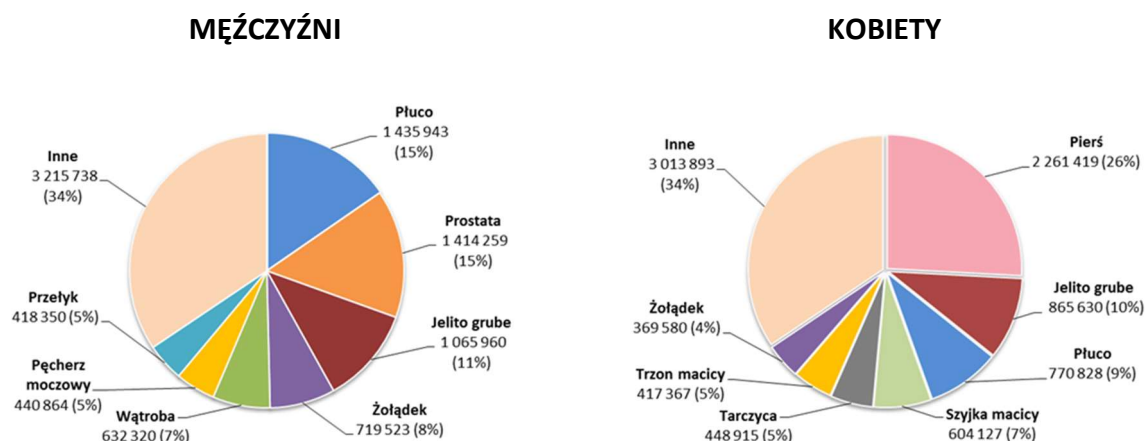
1. Część teoretyczna

1.1. Rak jelita grubego – epidemiologia i etiologia

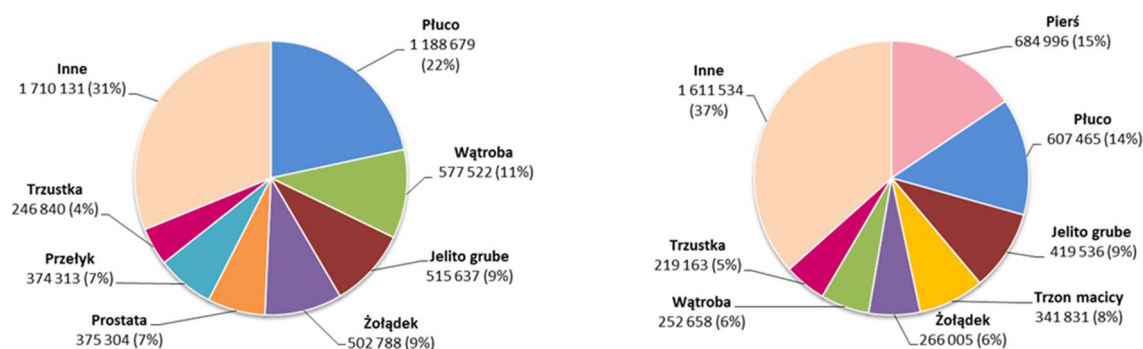
Nowotwory to grupa chorób, charakteryzującą się niekontrolowanym wzrostem i namnażaniem komórek. Komórki nowotworowe powstają w procesie onkogenezy i oprócz nieograniczonego wzrostu, cechują się niekontrolowanymi procesami replikacji, czy zahamowaniem procesu śmierci komórkowej w wyniku apoptozy. Nowotwory złośliwe są wynikiem nieprawidłowości genetycznych i epigenetycznych powstałych w wyniku długotrwałego oddziaływania czynników zewnętrznych.¹

Rakiem jelita grubego (RJG) określamy złośliwy nowotwór pochodzenia nabłonkowego występujący w okrężnicy i/lub w odbytnicy. Baza danych Globocan opracowana przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer, IARC) szacuje, że w roku 2020 na świecie zanotowano 18,1 mln nowych zachorowań na nowotwory oraz 9,9 mln zgonów spowodowanych chorobą nowotworową. RJG stanowi 10% całkowitej światowej liczby zachorowań na nowotwory, co plasuje go na trzecim miejscu. RJG odpowiada także za około 10% całkowitej liczby zgonów. Uwzględniając podział na płcie, RJG stanowi trzecią co do wielkości przyczynę śmierci spowodowanych chorobą nowotworową zarówno wśród mężczyzn, jak i wśród kobiet (Rys. 1).² W przypadku zapadalności, RJG jest drugim co do częstości nowotworem u kobiet, natomiast trzecim u mężczyzn.

ZACHOROWANIA



ZGONY



Rys. 1. Struktura zachorowań i zgonów na nowotwory w 2020 roku na świecie z podziałem na płeć (opracowano na podstawie danych z Globocan, International Agency for Research on Cancer).

Dane zebrane przez Krajowy Rejestr Nowotworów dotyczące roku 2019 wskazują, że w Polsce zanotowano 171,2 tys. nowych zachorowań i 100,3 tys. zgonów na nowotwory złośliwe. RJG stanowił około 11% zachorowań na nowotwory u mężczyzn (co dało mu 3. miejsce) oraz 8,5% u kobiet (4. miejsce). Najwięcej zachorowań na ten nowotwór u mężczyzn zaobserwowano w grupie wiekowej 55-79 lat, u kobiet natomiast w grupie 50-74 lat. Pod względem ilości zgonów na nowotwory, RJG zajmuje trzecie miejsce zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Liczba zachorowań i zgonów spowodowanych nowotworami złośliwymi w naszym kraju ma tendencję rosnącą, a nowotwory stanowią drugą przyczynę zgonów w Polsce.³

W ponad 90% RJG występuje w postaci guza zwanego gruczolakorakiem (ang. *adenocarcinoma*), który zajmuje tkankę nabłonkową okrężnicy i odbytnicy. Inne rzadziej występujące rodzaje histopatologiczne RJG to: rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (ang.

adenosquamous carcinoma), rak wrzecionowatokomórkowy (ang. *spindle cell carcinoma*), płaskonabłonkowy (ang. *squamous cell carcinoma*) oraz niezróżnicowany (ang. *undifferentiated carcinoma*). Gruczolakorak powstaje z łagodnej zmiany nowotworowej tzw. gruczolaka posiadającego formę polipa (uszypułowanego lub płaskiego). W procesie przemiany w nowotwór złośliwy, polip wzrasta w objętej zmianą tkance oraz nacieka na ścianę jelita. Następnie tworzy przerzuty, które rozprzestrzeniają się poprzez naczynia limfatyczne i krwionośne do węzłów chłonnych oraz pozostałych narządów (najczęściej wątroby i płuc). Za około 30% diagnozowanych przypadków RJG odpowiadają czynniki genetyczne, jednak aż 70% przypadków tego nowotworu ma charakter sporadyczny. Wśród czynników środowiskowych sprzyjających rozwojowi RJG wymienia się: wiek (powyżej 50 roku życia), niewłaściwą dietę (bogatą w tłuszcze zwierzęce), otyłość, siedzący tryb życia oraz palenie tytoniu.^{1,4}

Wcześnie wykryte przypadki RJG leczy się chirurgicznie, usuwając zmienioną nowotworowo tkankę, a następnie stosując leczenie adjuwantowe. Chemioterapia prowadzona jest za pomocą cytostatyków: 5-fluorouracylu skojarzonego z leukoworyną (5-FU/LV), oksaliplatyną lub irinotekaniem. 5-FU stosowany jest zamiennie z jego pochodną kapecytabiną.^{5,6} W przypadku zaawansowanego stadium raka i braku skuteczności chemioterapii w leczeniu RJG wykorzystywana jest terapia celowana, wykorzystująca przeciwciała monoklonalne. Najczęściej stosowane przeciwciała to Bevacizumab (przeciwko naczyniowo-śródbłonkowemu czynnikowi wzrostu – VEGF) oraz Cetuximab i Panitumumab (przeciwko receptorowi nabłonkowego czynnika wzrostu – EGFR). Immunoterapia spowalnia progresję nowotworu i przeciwdziała jego nawrotom poprzez stymulację układu odpornościowego pacjenta. Inne wspomagające leczenie RJG terapie, które obecnie znajdują się w fazie badań klinicznych, obejmują stosowanie m.in. niesteroidowego leku przeciwzapalnego celekoksybu czy szczepionek genetycznych.⁷⁻¹³

W przypadku leczenia adjuwantowego cytostatykami, wskaźnik 5-letniego przeżycia po zakończeniu leczenia według American Cancer Society wynosi około 65%, natomiast po 10 latach około 58%. W przypadku wczesnego wykrycia wynosi nawet 90% i może wymagać jedynie interwencji chirurgicznej (kolektomii).¹⁴ Badania wskazują również na poprawę całkowitego przeżycia pacjentów z przerzutami po zastosowaniu chemioterapii. Zastosowanie 5-FU z LV zwiększa przeżywalność chorych o prawie 4 miesiące względem leczenia wspomagającego, odpowiedzialnego za łagodzenie objawów chemioterapii. Oksaliplatyna i irinotekan również powodują częściową poprawę wskaźnika przeżycia. W większości badań

klinicznych, w których pacjenci posiadający przerzuty otrzymywali dwa lub trzy z wymienionych wcześniej chemioterapeutyków, mediana ich przeżycia wynosiła od 15 do 20 miesięcy, a nawet przekraczała dwa lata. W przypadku leczenia wspomagającego wskaźnik ten wynosił jedynie od 4 do 6 miesięcy.¹⁵

Wyróżniamy cztery podtypy molekularne RJG – oznaczane skrótem CMS (ang. *consensus molecular subtypes*) różniące się profilem ekspresji genów, a także odpowiedzią na leczenie: CMS1 – immunologiczny, CMS2 – kanoniczny, CMS3 – metaboliczny i CMS4 – podtyp mezenchymalny.¹⁶ CMS1 charakteryzuje się niestabilnością mikrosatelitarną – MSI (ang. *microsatellite instability*) powiązaną z inaktywacją genów (*MLH1*, *MSH1*, *PMS2*, *MSH6*) oraz mutacjami w genach *BRAF*, *PTEN* i *ATM*. Dodatkowo charakteryzuje się hipermetylacją wysp CpG (CIMP, ang. *CpG island methylator phenotype*) odpowiedzialną za wyłączenie genów supresorowych, zjawiska leżące u podstaw procesu kancerogenezy. CMS1 to typ RJG lokujący się głównie w odcinku proksymalnym jelita oraz posiadający dobre rokowanie. Podtyp CMS2 jest najczęściej rozpoznawanym wariantem u pacjentów chorych na RJG. Lokalizuje się w odcinku dystalnym jelita grubego i posiada najlepsze rokowanie. Ten typ RJG oraz pozostałe (CMS3 i CMS4) charakteryzuje niestabilność chromosomalna (CIN, ang. *chromosomal instability*). W CMS2 obserwujemy aktywację szlaku WNT/ β -kateniny, czynnika transkrypcyjnego MYC, receptora EGFR czy integryn. Podtypy CMS2 i CMS3 charakteryzuje występowanie mutacji w genach *APC*, *KRAS*, *TP53* oraz *PIK3CA*. CMS3 występuje w różnych rejonach jelita grubego. Podobnie jak w przypadku CMS1, w podtypie CMS3 spotykana jest hipermetylacja wysp CpG, jednak w mniejszym stopniu. Ostatni podtyp, CMS4, zaliczany również do typu podścieliskowego, charakteryzuje wysoka ekspresja transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β , ang. *transforming growth factor β*), inwazja podścieliska, zwiększona angiogeneza i immunosupresja. Typ ten lokuje się najczęściej w dystalnej części jelita i związany jest ze złym rokowaniem dla pacjentów. Badania kliniczne wskazują, że odpowiednie dostosowanie terapii lekami skojarzonymi (zazwyczaj łączące stosowanie chemioterapii z lekami biologicznymi) do typu RJG obecnego u pacjenta (tzw. leczenie personalizowane) może przynosić wymierne korzyści.¹⁷ Szczególnie korzystne wyniki otrzymano w przypadku leczenia lekami anty-EGFR wobec podtypów CMS2 i CMS4.¹⁸ Przykładowo, terapie zalecane w przypadku podtypu CMS1 zalecają oksaliplatynę z bewacyzumabem, natomiast w przypadku CMS2, CMS3 oraz CMS4 leczenie cetuksymabem w połączeniu z oksaliplatyną lub irynotekaniem.^{17,19,20}

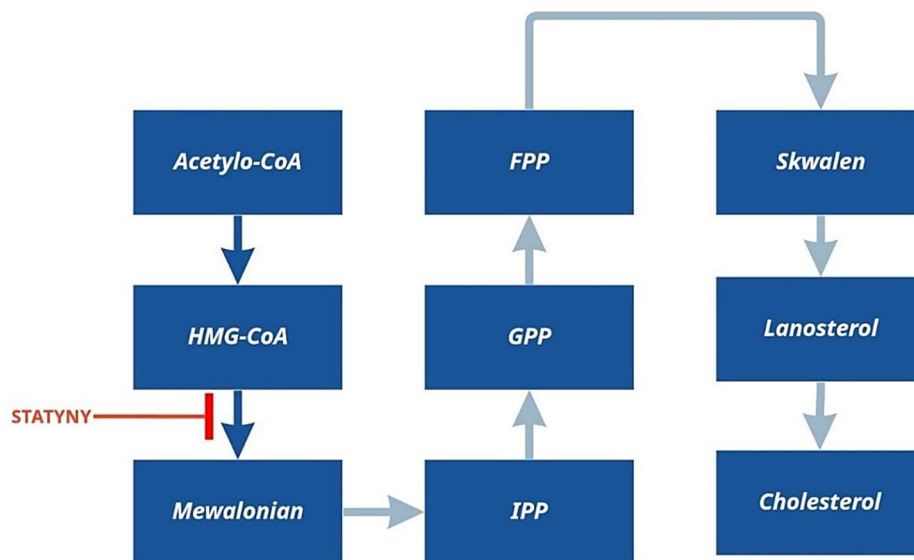
Jako modele różnych podtypów RJG w badaniach *in vitro* z powodzeniem stosuje się komercyjnie dostępne linie komórkowe. W celu klasyfikacji linii komórek nowotworowych do odpowiedniego typu używana jest między innymi analiza ekspresji genów markerów nowotworowych oraz metody bioinformatyczne. Linia komórkowa HT29 to linia komórek będących we wczesnym stadium raka jelita grubego, pobrana z pierwotnego guza 44-letniej kobiety rasy kaukaskiej. Zgodnie z klasyfikacją Duke'a pochodzą one z RJG będącego w stadium C, natomiast według klasyfikacji zaawansowania klinicznego (TNM) ze stadium TNM II.²¹ Komórki linii HT29 mają pochodzenie nabłonkowe i są adherentne, co ułatwia ich zastosowanie jako modelu RJG w warunkach laboratoryjnych w celu symulacji prawdziwej tkanki okrężnicy.²² Posłużyły one również do utworzenia modelu służącego do badania zdolności związków do pokonania oporności wielolekowej nowotworów. Sublinia HT29/Dx powstała w wyniku ekspozycji komórek linii wrażliwej HT29 na działanie doksorubicyny. Selekcja spowodowała, że linia ta charakteryzuje się wysoką opornością na ten chemioterapeutyk i zwiększoną ekspresją białek oporności wielolekowej, glikoproteiny P (P-gp) oraz MRP3 (ang. *multidrug resistance protein 3*).^{23,24} Inną linią również często stosowaną jako model RJG *in vitro* jest linia gruczolakoraka okrężnicy – COLO205. Komórki zapoczątkowujące tę linię pobrane zostały z płynu otrzewnowego 70-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej. Linia komórkowa COLO205 rośnie zarówno w zawiesinie, jak i tworzy monowarstwę w naczyniach hodowlanych. Komórki te, pochodzące z przerzutu nowotworowego reprezentują RJG zaliczanego do stadium D wg. klasyfikacji Duke'a, natomiast w przypadku klasyfikacji TNM można zaliczyć je do stadium 4, czyli nowotworu atakującego sąsiednie organy.^{25,26}

1.2. Biosynteza cholesterolu i jej znaczenie w patologii chorób

Cholesterol (Chol) to organiczny związek z grupy steroli zbudowany z pierścienia 1,2-cyklopentanoperhydrofenantrenowego. Lipid ten jest prekursorem syntezy hormonów, witaminy D, czy kwasów żółciowych. Jest istotnym składnikiem błon komórkowych, mającym wpływ na ich płynność oraz współtworzący bogate w Chol i sfingomielinę mikrodomeny błonowe. W około 50% za syntezę Chol *de novo* u ssaków odpowiada wątroba, w mniejszym stopniu jelito cienkie. Pozostały Chol egzogeny przyjmowany jest z pożywieniem i wchłaniany w jelitach.^{27,28}

Chol syntetyzowany jest w szlaku mewalonowym, którego reakcje zachodzą w siateczce śródplazmatycznej. Schematycznie proces ten przedstawiono na Rys. 2. Początkowym etapem

biosyntezy Chol jest reakcja katalizowana przez reduktazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA), w której z 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA powstaje mewalonian. Kwas mewalonowy przekształcany jest następnie do pirofosforanu izopentenyłu (IPP). Izopren ten to kluczowy budulec Chol, a także wielu związków pochodzenia naturalnego, m.in. terpenów. Następnie IPP ulega izomeryzacji i kondensacji tworząc pirofosforan geranylu (GPP). Produktem przyłączenia kolejnej cząsteczki IPP jest pirofosforan farnezylu (FPP). Z niego w wyniku reakcji kondensacji powstaje skwalen, który następnie ulega cyklizacji dając lanosterol. W ostatnim kroku lanosterol zostaje przekształcony w wieloetapowym procesie w Chol.²⁹ W szlaku mewalonowym oprócz Chol powstają również cząsteczki zaangażowane w transkrypcję DNA, glikozylację (dolichol) i prenylację białek (GPP, FPP), transport elektronów w mitochondriach (ubichinon) oraz inne cząsteczki istotne dla przeżycia komórki.³⁰



Rys. 2. Szlak biosyntezy cholesterolu z zaznaczonym miejscem inhibicji poprzez statyny.

Chol i inne lipidy ze względu na swój hydrofobowy charakter transportowane są w osoczu krwi w formie kompleksów z białkami, trójglicerydami i fosfolipidami określanych jako lipoproteiny. Wyróżniamy pięć rodzajów tych makrocząsteczek pogrupowanych w zależności od gęstości: chylomikrony, lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL, ang. *very low density lipoproteins*), o pośredniej gęstości (IDL, ang. *intermediate density lipoproteins*), o małej gęstości (LDL, ang. *low density lipoproteins*) oraz o dużej gęstości (HDL, ang. *high density lipoproteins*). Cząsteczki LDL są głównymi transporterami Chol z krwi do tkanek organizmu oraz odpowiadają za regulację biosyntezy Chol. HDL odpowiedzialne są za usuwanie uwolnionego do osocza Chol z obumarłych komórek i błon oraz kierowanie go do wątroby na

drodze transportu zwrotnego.³¹ Nadmiar Chol w osoczu w postaci LDL jest przyczyną powstawania płytek arteriosklerotycznych w naczyniach krwionośnych, z czym związane jest popularne określanie go mianem tzw. „złego Chol”. Za tzw. „dobry Chol” uznawane są lipoproteiny HDL, które przenoszą Chol do tkanek i obniżają jego poziom w osoczu. Stosunek poziomów tych frakcji Chol (HDL/LDL) jest stosowany do oceny ryzyka rozwoju chorób serca u danego pacjenta.³²

Główny regulator syntezy Chol w organizmie stanowi czynnik transkrypcyjny SREBP (ang. *sterol regulatory element binding protein*). Białko to wiąże sterolowy element regulatorowy SRE (ang. *sterol regulatory element*) znajdujący się w wielu genach kodujących białka zaangażowane w biosyntezę i transport Chol. Czynnikiem transkrypcyjnym SREBP kontroluje proces transkrypcji mRNA m.in. receptora LDL i reduktazy HMG-CoA. Czynnikiem SREBP syntezowany jest jako nieaktywny prekursor, który w retikulum endoplazmatycznym tworzy nieaktywny kompleks z białkiem SCAP (ang. *SREBP cleavage activating protein*). Białko SCAP posiada domenę wiążącą Chol, która pozwala mu reagować na poziom tego sterolu w komórce. W przypadku niskiego poziomu Chol, kompleks białkowy SREBP/SCAP przemieszcza się do aparatu Golgiego, gdzie zostaje aktywowany poprzez cięcie proteolityczne. Następnie aktywna forma czynnika SREBP wiąże się w jądrze z elementem SRE genów kodujących enzymy lipogenne. Powoduje to zwiększoną transkrypcję genów *HMGR* i *LDLR*, a co za tym idzie wzrost produkcji Chol w komórce. Z kolei, nadmiar Chol wewnątrz komórki powoduje zatrzymanie uwalniania SREBP z kompleksu SREBP/SCAP oraz obniżenie transkrypcji genów kodujących reduktazę HMG-CoA oraz receptor LDL. Skutkuje to zahamowaniem wchłaniania Chol do komórek z LDL obecnych w osoczu. Ponadto biosynteza Chol może być regulowana poprzez modulację aktywności reduktazy HMG-CoA. Aktywność tego enzymu hamowana jest przez mewalonian, glukagon, Chol egzogenny, a także przez leki, takie jak stosowane w leczeniu hipercholesterolemii statyny.³¹

Podwyższony poziom Chol w osoczu krwi powiązany jest ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia wielu schorzeń, takich jak otyłość, cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe, czy nowotwory. Zaburzenia w homeostazie Chol w tkankach organizmu mogą prowadzić także do miażdżycy oraz chorób neurodegeneracyjnych. Oprócz nieprawidłowego trybu życia, hipercholesterolemia spowodowana może być też stosowaniem niektórych leków lub stanowić objaw innych poważnych schorzeń np. niedoczynności tarczycy. Podwyższone stężenie całkowitego Chol oraz LDL może wynikać także z rodzinnej hipercholesterolemii, choroby genetycznej dziedziczonej autosomalnie dominująco.³³ Inne dziedziczne choroby tzw.

choroby spichrzeniowe, w których obserwujemy nadmierną akumulację Chol i innych lipidów w tkankach organizmu, to choroba Wolmana oraz śmiertelna choroba Niemann-Picka typu C.^{33,34}

Dane uzyskane z bazy The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://gco.iarc.fr/>) wskazują na korelację zaburzeń w szlaku homeostazy Chol z rozwojem nowotworów. Komórki nowotworowe będące na etapie proliferacji wykazują zwiększoną aktywność receptora reduktazy HMG-CoA oraz lipoproteiny LDL, zwiększając poziom Chol w porównaniu do komórek zdrowych. Akumulacja Chol jest cechą tkanek nowotworowych i wskazuje na jego istotną rolę w progresji nowotworów, takich jak: rak piersi, prostaty czy jelita grubego.^{35,36} Zaobserwowano również zaburzenia w transporcie Chol, sprzyjające zwiększeniu jego poziomu w komórkach nowotworowych. Chol, jest kluczową cząsteczką potrzebną w utrzymaniu struktury komórek oraz pełni istotne biologiczne funkcje, zatem podniesienie jego poziomu sprzyja proliferacji komórek. Zaburzenia metabolizmu Chol są czynnikiem utrudniającym proces leczenia wielu rodzajów nowotworów, dlatego też lepsze zrozumienie roli Chol w progresji raka może przyczynić się do skuteczniejszej terapii nowotworów.^{35,37,38} W przypadku zarówno RJG, jak i raka piersi, dieta wysokotłuszczowa oraz otyłość uważane są za istotne czynniki podnoszące ryzyko wystąpienia tych nowotworów.³⁹⁻⁴¹ Pacjenci posiadający odległe przerzuty RJG wykazują znacznie wyższy poziom całkowitego Chol oraz lipoprotein LDL we krwi w porównaniu z pacjentami bez przerzutów.^{42,43} Dodatkowo wyższe stężenie HDL w surowicy krwi powiązane zostało ze zmniejszonym ryzykiem raka okrężnicy.

Komórki nowotworowe różnią się kompozycją lipidową błony komórkowej od komórek zdrowych. Dodatkowo skład ich zależy od złośliwości i rodzaju nowotworu. Zmiany te mają na celu ich adaptację do warunków otoczenia: zwiększanie ich przeżywalności i tempa proliferacji. Charakteryzuje je m.in. zwiększona ilość fosfatydyloseryny (PS) po zewnętrznej stronie błony, określanej często mianem biomarkerem raka.⁴⁴ Jej zwiększona zawartość w błonie komórkowej prowadzi także do zaburzeń szlaków sygnałowych, a co za tym idzie osłabienia odpowiedzi układu odpornościowego wobec zmian nowotworowych. Ponadto wzrost poziomu Chol w błonach komórek nowotworowych powiązany został z ich zwiększoną odpornością na chemioterapię w porównaniu z komórkami o niższym stężeniu Chol.⁴⁵ Porównanie składu lipidowego komórek linii HT-29 (raka jelita grubego), MDA-MB231 (raka piersi) oraz HDF-n (fibroblastów skóry) wykazało, że komórki HT29 posiadały błony komórkowe o wyższym stosunku esterów kwasów tłuszczowych do ich estrów oraz wykazywały wyższą ekspresję fosfatydyloseryny w zewnętrznej monowarstwie błony.⁴⁶ Inaczej wygląda to

natomiast w przypadku komórek nowotworowych będących w czasie metastazy, gdzie obserwowano niższy poziom Chol, a co za tym idzie komórki te posiadały błony o większej płynności i plastyczności – istotnej dla ich zdolności do przenikania przez ściany naczyń krwionośnych.⁴⁷ Komórki nowotworowe regulują więc ilość Chol, by pozwolić komórkom guza na migrację w trakcie przerzutowania lub zmniejszać przepuszczalność błony komórek guza w celu jego ochrony przed chemioterapeutykami.^{48,49}

Błonę komórek nowotworowych o fenotypie oporności wielolekowej (MDR) charakteryzuje wyższa zawartość Chol, wynikająca z podwyższonej aktywności reduktazy HMG-CoA oraz wyższej ekspresji receptora LDL w porównaniu do komórek wrażliwych.⁵⁰ Zwiększona ilość Chol powoduje usztywnienie błony komórkowej i sprawia, że jest ona mniej przepuszczalna dla leków.⁵¹ Dodatkowo komórki MDR utrzymują niski poziom ceramidów poprzez zapobieganie rozpadowi sfingomieliny, będących ich prekursorem w syntezie *de novo*. Powoduje to zmniejszenie ilości bogatych w ceramidy tratw lipidowych, zaangażowanych w indukcję śmierci komórkowej na drodze apoptozy. Utrata asymetrii błony w wyniku translokacji PS oraz PE do zewnętrznej monowarstwy błony w komórkach nowotworowych, może zostać wykorzystana w projektowaniu skutecznej terapii celowanej. Przykładem wykorzystania tej strategii jest lek Bavituximab, przeciwciało monoklonalne ukierunkowane na PS, co pozwala na wywołanie odpowiedzi immunologicznej organizmu selektywnej wobec komórek nowotworowych.⁵²

1.3. Tratwy lipidowe

Tratwy lipidowe (ang. *lipid rafts*) to mikrodomeny błonowe występujące w błonie komórkowej i składające się głównie z cholesterolu, sfingolipidów oraz glikolipidów. Struktury te posiadają rozmiary mieszczące się w przedziale 10-200 nm.^{53,54} Podklasą tratw lipidowych są kaweole, wklęsłe struktury posiadające kształt kolbki, charakteryzujące się dużą ilością kaweolin, białek odpowiedzialnych m.in. za utrzymanie ich kształtu. Powodem powstawania mikrodomen są różnice w biofizycznych właściwościach lipidów je tworzących.⁵⁵ Uważa się, że tratwy lipidowe tworzą fazę ciekłokrystaliczną uporządkowaną (L_O, ang. *liquid ordered*), która współwystępuje w błonie komórkowej z fazą ciekłokrystaliczną nieuporządkowaną (L_D, ang. *liquid disordered*).⁵⁶ Sfingomielina i glikosfingolipidy charakteryzują się wyższymi temperaturami głównego przejścia fazowego niż glicerofosfolipidy. Sfingolipidy naturalnie występujące w błonach są z reguły dłuższe i bardziej nasycone niż glicerofosfolipidy. Sprzyja to separacji faz ze względu na hydrofobowe niedopasowanie pojawiające się między tymi

grupami lipidów. Dzięki obecności grup amidowych i hydroksylowych pomiędzy cząsteczkami sfingolipidów mogą tworzyć się wiązania wodorowe, które dodatkowo wzmacniają oddziaływania między ich cząsteczkami. Dodatkowo wiązania wodorowe mogą powstawać też pomiędzy resztami cukrowymi glikosfingolipidów. Sfingolipidy, które zawierają w swojej strukturze nasycone łańcuchy acylowe, umożliwiają ścisłe umiejscowienie cholesterolu w obszarach będących w fazie L_o.⁵⁷ W tratwach lipidowych Chol pełni istotną stabilizującą rolę, stanowiąc spoiwo, które utrzymuje zwartą strukturę tych mikrodomen.⁵⁸

Białkami specyficznymi wiążącymi się z tratwami lipidowymi są m.in. białka kotwiczące się w błonie za pomocą glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI), białka palmitylowane, kinazy z rodziny Src oraz białka transbłonowe np. CD44.⁵⁷ Wysoce heterogenne struktury błonowe, jakimi są tratwy, pełnią rolę w procesach przekazywania sygnałów komórkowych, w których biorą udział m.in. immunoglobulina E, receptor antygenów komórek T, receptor EGF, czy receptor insuliny. Zaangażowane są również w rozwój wielu chorób metabolicznych, autoimmunologicznych, neurodegeneracyjnych, o podłożu zapalnym oraz nowotworowych.⁵⁹ Tratwy lipidowe w procesach nowotworzenia wpływają na procesy adhezji komórek i ich migrację. Wykazano, że zaburzenie prawidłowej struktury i funkcji tratw lipidowych uniemożliwia tworzenie inwadiopodiów przez migrujące komórki nowotworowe.^{38,60} Badania nad białkami błonowymi pokazały, że obniżenie poziomu Chol w komórkach za pomocą czynników wiążących Chol, takich jak metylo- β -cyklodekstryna, filipina czy simwastatyna, zaburzało strukturę tratw lipidowych i powodowało zwiększone uwalnianie białek z nimi związanych. Simwastatyna w ludzkich komórkach glejaka zwiększała uwalnianie CD44 z błony komórkowej i jednocześnie blokowała ich migrację.⁵⁷ Białkowe składniki mikrodomen błonowych, tj. kaweolina czy flotylina, mogą być biomarkerami prognostycznymi dla wielu nowotworów.⁶¹ Zwiększona ekspresja flotyliny-1 oraz flotyliny-2 powiązana jest z większą proliferacją komórek nowotworowych RJG oraz jego gorszym rokowaniem.⁶²

W celu badania oddziaływania związków z mikrodomenami błonowymi użytecznym modelem są sztuczne błony lipidowe, w tym np. ogromne jednowarstwowe liposomy (GUV, ang. *giant unilamellar vesicles*). Zastosowanie odpowiedniej kompozycji lipidowej składającej się z nienasyconych fosfolipidów, sfingomieliny i Chol pozwala na otrzymanie błon lipidowych charakteryzujących się lateralną separacją faz. Dodatkowo rozmiar GUV, porównywalny do wielkości komórek, oraz odpowiedni dobór sond fluorescencyjnych pozwala na ich bezpośrednią obserwację pod mikroskopem.⁶³ Oprócz możliwości obserwacji fuzji błon lipidowych, te układy modelowe wykorzystywane mogą być również w badaniach

oddziaływania białek i kwasów nukleinowych z błonami, badaniach dynamiki i morfologii powierzchni błon lipidowych, czy transportu leków.⁶⁴⁻⁶⁶ Pierwsza praca wykorzystująca ten model w celu zbadania wpływu leków z grupy fenotiazyn na zmiany w organizacji domen lipidowych bogatych w sfingomielinę (SM) i Chol pochodzi z naszego zespołu badawczego.⁶⁷ Flawonoidy również wykazały wpływ na skład i funkcjonowanie mikrodomen lipidowych w liposomach utworzonych z DOPC i SM.⁶⁸ Dużą popularność zyskały również próby wykorzystania GUVów do badania zdolności antybiotyków peptydowych i toksyn do tworzenia porów w badanych modelowych błonach lipidowych.⁶⁹⁻⁷¹ Ogromne jednowarstwowe liposomy o składzie lipidowym imitującym błony komórek nowotworowych wykorzystane zostały również do badania właściwości przeciwnowotworowych związków, a w szczególności ich zdolności do zaburzania struktury błon komórek rakowych.⁷²

1.4. Związki hamujące biosyntezę cholesterolu

1.4.1. Statyny

W obniżeniu stężenia Chol we krwi istotny jest zdrowy tryb życia, w tym niskotłuszczowa dieta, ograniczenie nałogów i zwiększenie aktywności fizycznej. Jednak gdy to nie pomaga w obniżeniu poziomu Chol LDL w osoczu, konieczna jest interwencja farmakologiczna. Lekami najczęściej stosowanymi w tym celu są statyny. Statyny to związki stosowane w leczeniu hipercholesterolemii oraz w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych. Są one inhibitorami reduktazy HMG-CoA, kluczowego enzymu szlaku biosyntezy Chol (Rys. 2), powodującymi zmniejszenie jego syntezy w wątrobie.⁷³ Najważniejszym efektem stosowania statyn jest obniżenie stężenia LDL, trójglicerydów oraz zwiększenie stężenia frakcji HDL w osoczu. Leki te znane są od lat 70. XX wieku, kiedy to rozpoczęto poszukiwanie inhibitorów reduktazy HMG-CoA wśród metabolitów pochodzących od mikroorganizmów. Pierwszym związkiem pozyskanym z grzyba *Penicillium citrinum* była mewastatyna. Poszukiwanie jej analogów powiększyło następnie grono leków z tej grupy o lowastatynę, simwastatynę oraz prawastatynę.⁷⁴ W latach 80. i 90. XX wieku statyny trafiły na rynek farmaceutyczny i zaczęły być stosowane w leczeniu pacjentów z chorobą niedokrwinną serca oraz z hipercholesterolemią. Obecnie grupa statyn stosowana w leczeniu pacjentów jest jeszcze obszerniejsza, co pozwala na indywidualne dobranie ich do pacjentów, szczególnie tych obciążonych dodatkowymi schorzeniami. Skutki uboczne stosowania statyn obejmują zaburzenia żołądkowo-jelitowe oraz miopatię. Jednym z najczęstszych i najbardziej niebezpiecznych powikłań w stosowaniu statyn jest rabdomioliza.⁷⁵ Ryzyko tej choroby

szczególnie wysokie było przy stosowaniu syntetycznie pozyskanej ceriwestatyny, która została wycofana z rynku w 2001.⁷⁶

Statyny dzielimy na statyny pochodzenia naturalnego, w tym mewastatyna, lowastatyna, czy prawastatyna. Simwastatyna, która również zaliczana jest do tej grupy, jest związkiem półsyntetycznym, ponieważ oryginalnie syntetyzowana była z lowastatyny. Jednak może być ona również produkowana przez zmodyfikowaną genetycznie bakterię *Escherichia coli*. Do grupy statyn syntetycznych należą m.in. atorwarstatyna, ceriwestatyna, fluwastatyna, rosuwastatyna oraz pitawastatyna.⁷⁶ Innym sposobem podziału jest klasyfikacja statyn w zależności od ich chemicznej struktury. Na jej podstawie wyróżniamy typ 1, do którego należą statyny zawierające pierścień naftalenowy (lowastatyna, mewastatyna i simwastatyna) i typ 2, statyny zawierające grupę fluorofenylową i szereg pierścieni hydrofobowych kowalencyjnie przyłączonych do ugrupowania imitującego HMG-CoA. W przypadku atorwarstatyny ugrupowaniem naśladującym HMG-CoA jest pirol, ceriwestatyny – pirydyna, rosuwastatyny – pirymidyna, fluwastatyny – indol, a pitawastatyny – chinolina. Ugrupowania imitujące HMG-CoA odgrywają rolę w wiązaniu się leku z reduktazą HMG-CoA, a różnice w grupach bocznych pozwalają na modulację hydrofilowości leku, wpływając tym samym na jego farmakokinetykę.⁷⁷

Statyny posiadają również właściwości wykraczające poza ich główny mechanizm działania, którym jest leczenie zaburzeń lipidowych, czyli wykazują tzw. działanie plejotropowe. Leki te, między innymi posiadają zdolność do hamowania tworzenia blaszek miażdżycowych, zapobiegania chorobom naczyniowym, ale również wykazują działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, czy antykoagulacyjne.⁷⁸ Wczesne i regularne stosowanie statyn wpływa na zmniejszenie śmiertelności chorych na schorzenia sercowo-naczyniowe. Statyny zapobiegają występowaniu utlenionych frakcji LDL, HDL oraz VLDL w osoczu,⁷⁹ a ponadto modulują mechanizmy związane z odpowiedzią immunologiczną.^{78,80} Następstwem zablokowania powstawania mewalonianu przez statyny jest również zmniejszenie stężenia izoprenoidów: GPP i FPP, które odpowiadają za prenylację wielu białek sygnałowych (w tym białek G oraz Ras).⁸¹ Białka te biorą udział w ważnych procesach komórkowych, takich jak wzrost, różnicowanie, sygnalizacja międzykomórkowa, czy apoptoza.⁸¹ Zmiany w tych procesach prowadzą do zahamowania wzrostu i metastazy komórek nowotworowych. Wymienione powyżej działania statyn sugerują, że oprócz leczenia chorób związanych z akumulacją Cholesterolu i nowotworów, mogą znaleźć one zastosowanie w leczeniu lub wsparciu leczenia chorób neurodegeneracyjnych, autoimmunologicznych oraz reumatologicznych.

Wcześniej wspomniane właściwości plejotropowe statyn spowodowały, że możliwość zmiany ich pierwotnego przeznaczenia budzi duże zainteresowanie. Wiele badań prowadzonych na liniach komórkowych oraz badań klinicznych wykazało, że statyny posiadają właściwości przeciwnowotworowe, za które odpowiada więcej niż jeden mechanizm. Stwierdzono m.in. ich zdolność do indukcji apoptozy, zatrzymywania cyklu komórkowego w fazie G1 i S, czy inhibicji prenylacji białek G prowadzącej do zatrzymania proliferacji komórek nowotworowych.^{82,83} W inhibicji cyklu komórkowego brały udział cykliny i zależne od cyklin kinazy (CDK) oraz inhibitory CDK, których ekspresja była zaburzana przez zastosowanie statyn.⁸² Innym mechanizmem mogącym stać za tymi właściwościami jest bezpośrednio związana z zastosowaniem statyn redukcja stężenia Cholesterolu, która prowadzi do zmniejszenia jego ilości w tratwach komórkowych i zaburza szlaki sygnalizacji oraz integralność błony w komórkach. Statyny lipofilowe, takie jak simwastatyna i lowastatyna mogą łatwo przenikać błony komórkowe, co może tłumaczyć ich działanie przeciwnowotworowe.⁸⁴

Istnieje wiele doniesień potwierdzających zdolność statyn do indukowania programowanej śmierci komórek.⁸⁵ Badania na komórkach nowotworowych raka piersi, żołądka oraz niedrobnokomórkowego raka płuc wykazały, że simwastatyna wywoływała w nich fragmentację DNA. Dodatkowo zwiększała ona ekspresję proapoptycznego genu *Bax* oraz hamowała ekspresję genu *BCL-2*, znanego z ochrony komórek przed apoptozą.⁸⁶ Nie wpływała natomiast na śmierć komórkową komórek normalnych. Komórki ludzkich limfocytów oraz szpiczaka po ekspozycji na statyny wykazały spadek potencjału błonowego mitochondriów i uwolnienie do cytozolu kaspaz, białka Smac/DIABLO oraz cytochromu c.^{82,87,88} Z kolei fluwastatyna powodowała kondensację chromatyny, fragmentację DNA oraz powstawanie ciałek apoptotycznych w komórkach chłoniaka już w stężeniu 5 μM .⁸⁸

Badania na liniach komórkowych pochodzenia nabłonkowego, w tym raka piersi, prostaty, raka jelita grubego, pęcherza, skóry oraz płuc dowiodły, że hamowanie wzrostu komórek przez simwastatynę było silniejsze w przypadku słabiej zróżnicowanych komórek nowotworowych.⁸⁹ Działanie to może być powiązane z większym zapotrzebowaniem komórek rakowych na izoprenoidy, ponieważ namnażają się one szybciej niż komórki normalne i wymagają sprawniejszych mechanizmów sygnalizacji komórkowej.⁹⁰ Dodatkowo, hydrofobowa simwastatyna hamowała wzrost komórek w większym stopniu niż hydrofilowa prawastatyna.^{89,90}

Wiele doniesień wskazuje na wyższą aktywność przeciwnowotworową statyn lipofilowych tj. simwastatyny, lowastatyny, fluwastatyny i atorwastatyny, a ich zażywanie powiązane z istotnym zmniejszeniem ryzyka wystąpienia raka piersi.⁹¹ Statyny hydrofilowe (prawastatyna, rosuwastatyna) posiadają mniejszą efektywność od hydrofobowych. Związane to może być z większą zdolnością statyn lipofilowych do wnikania do komórek, z kolei statyny hydrofilowe z większą selektywnością wiążą się komórkami wątroby. Wyniki badań klinicznych wskazywały także na przewagę statyn lipofilowych w leczeniu schorzeń sercowo-naczyniowych, co związane może być z ich większą zdolnością do obniżania poziomu LDL we krwi.⁹² Najsilniejsze działanie hipolipemizujące posiada atorwastatyna i simwastatyna, najsłabsze natomiast fluwastatyna.^{80,93}

Badanie kohortowe przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych na grupie pacjentów z nowo zdiagnozowanym RJG wykazało, że stosowanie statyn wiązało się z u nich ich dłuższym czasem przeżycia.⁹⁴ Podobny wynik otrzymano w badaniu przeprowadzonym na duńskiej populacji, w którym zauważono, że regularne zażywanie statyn powiązane było ze zmniejszeniem śmiertelności z powodu nowotworów u badanych pacjentów.⁹⁵ Obecnie istnieje wiele badań klinicznych oraz badań populacyjnych badających wpływ statyn na przeżywalność pacjentów z nowotworami. Coraz więcej badań klinicznych idzie w kierunku badań nad wykorzystaniem ich w terapii kombinowanej, w celu wzmocnienia efektu terapeutycznego leków onkologicznych. Badane jest np. połączenie simwastatyny z paklitakselem u chorych na raka drobnokomórkowego płuc (NCT04698941), czy simwastatyny z doksorubicyną, w celu zminimalizowania kardiotoksycznego działania antracykliny (NCT02096588). Statyny zdają się posiadać zdolność do zwiększenia wydajności oraz wspierania leczenia konwencjonalnego nowotworów, co powoduje, że największe zainteresowanie budzi ich użycie w terapii kombinowanej z chemioterapeutykami, które pozwoliłyby na zwiększenie efektywności leczenia i przeżywalności pacjentów.

1.4.2. Betulina

Betulina (BET) to pentacykliczny triterpen posiadający szkielet lupanu. Jest związkiem pochodzenia naturalnego, najczęściej pozyskuje się go z kory brzozy. Ekstrakty, tj. olejek z kory brzozy, zawierające betulinę używane były medycynie ludowej w leczeniu chorób skóry, takich jak egzema i łuszczyca.⁹⁶ Terpen ten posiada właściwości przeciwwirusowe, przeciwzapalne, czy przeciwnowotworowe.^{97,98}

BET posiada zdolność do wiązania się z białkiem SCAP i zapobiega aktywacji białka SREBP-1.⁹⁹ Co za tym idzie, BET zmniejsza syntezę i gromadzenie kwasów tłuszczowych i trójglicerydów w komórkach. W badaniu przeprowadzonym na pacjentach z rakiem wątrobokomórkowym (HCC) zaobserwowano, iż wysoki poziom SREBP-1 korelował z gorszą odpowiedzią chorych na leczenie lekiem przeciwnowotworowym sorafenibem, a więc również z gorszą przeżywalnością i rokowaniem pacjentów. Dodatkowe zastosowanie BET w terapii tego nowotworu hamowało aktywność glikolityczną w komórkach HCC oraz zapobiegało występowaniu przerzutów w ksenograftach u myszy.^{100,101} Zahamowanie aktywności białka SREBP-1 wzmacniało działanie leku przeciwnowotworowego, sorafenibu u pacjentów chorych na HCC, wykazując efekt synergistyczny między lekiem a BET.

Aktywność przeciwnowotworowa BET w dużym stopniu zależy od wybranego modelu komórkowego. BET nie wykazywała wysokiej toksyczności w liniach nowotworowych czerniaka, nerwiaka zarodkowego oraz białaczki.^{102,103} Z drugiej strony wykazała aktywność cytotoksyczną m.in. wobec komórek raka jelita grubego, piersi, płuc i prostaty.¹⁰⁴ W badaniu, w którym podano jednocześnie Chol oraz BET do hodowli komórek raka szyjki macicy, płuc oraz białaczki zaobserwowano wysoką śmiertelność komórek już w niskich stężeniach tych związków. Co istotne, BET zastosowana pojedynczo wykazywała średnią toksyczność wobec komórek tych linii, natomiast Chol był nietoksyczny. Natomiast połączenie tych związków powodowało widoczną fragmentację DNA, a za indukcję apoptozy komórek odpowiedzialny był szlak mitochondrialny.¹⁰⁵ Autorzy wysunęli przypuszczenie, że tak silne działanie połączenia Chol i BET na komórki nowotworowe związane jest prawdopodobnie z zaburzeniem integralności błon komórkowych przez Chol, a co za tym idzie ich większą przepuszczalnością dla BET. W badaniu przeprowadzonym na linii komórkowej RJG również stwierdzono zdolność BET do indukcji apoptozy za pośrednictwem szlaku mitochondrialnego, obserwowano uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy, a także aktywację kaspaz.¹⁰⁶

Betulina jest ważnym prekursorem związków biologicznie czynnych, w tym kwasu betulinowego. Kwas betulinowy posiada szerokie spektrum działania biologicznego i farmakologicznego, w tym działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwwirusowe oraz cytotoksyczne wobec wielu linii nowotworowych.^{96,107} Właściwości cytotoksyczne pochodnych betuliny związane są z ich zdolnością do indukcji apoptozy i są porównywalne do niektórych obecnie stosowanych leków klinicznych.⁹⁶ Aktywność przeciwnowotworową kwasu betulinowego stwierdzono w modelach wielu nowotworów m.in. czerniaka, płuc, raka

jelita grubego, prostaty, białaczki, czy piersi.^{108,109} Dodatkowo wykazano jego selektywność względem komórek nowotworowych, podczas gdy kwas betulinowy nie był toksyczny dla komórek pochodzących z linii nienowotworowych.¹¹⁰

Obszerne dowody wskazują na posiadanie przez triterpeny właściwości przeciwcukrzycowych oraz antydyslipidemicznych. BET i kwas betulinowy dzięki swoim właściwościom farmakologicznym mogą być użyteczne w leczeniu chorób metabolicznych, w tym cukrzycy, a także chorób zakaźnych, zaburzeń sercowo-naczyniowych i neurologicznych.¹¹¹ Długotrwałe zażywanie kwasu betulinowego powodowało spadek poziomu Chol i trójglicerydów w osoczu, zmniejszało masę ciała, zwiększało poziom insuliny i leptyny oraz zmniejszało poziom greliny u otyłych myszy.¹¹² Kwas betulinowy obniżał stężenie Chol LDL, a podnosił poziom Chol HDL w osoczu badanych zwierząt.¹¹¹

Lepsza rozpuszczalność zwiększa skuteczność leku *in vivo*, dużym zainteresowaniem cieszą się więc próby modyfikacji struktury BET i kwasu betulinowego w celu uzyskania lepiej rozpuszczalnych pochodnych np. przez dodanie grup hydroksylowych, bądź umieszczenie ich w mikronośnikach, nośnikach polimerowych, czy emulsjach.^{111,113}

1.5. Leki przeciwpsychotyczne i przeciwdepresyjne

Leki antypsychotyczne (neuroleptyki) i przeciwdepresyjne należą do grupy leków psychotropowych, stosowanych w leczeniu zaburzeń psychicznych. Antydepresanty stosowane są przede wszystkim w leczeniu zaburzeń depresyjnych, często również w leczeniu zaburzeń lękowych i bezsenności. Leki przeciwpsychotyczne używane są natomiast w leczeniu psychoz i schizofrenii. Wszystkie te leki wiążą ich zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg i oddziaływania na mózg oraz układ nerwowy człowieka. Farmakologiczne leczenie zaburzeń psychicznych jest skuteczne szczególnie w krótkim okresie. W dłuższej perspektywie niesie za sobą wiele skutków ubocznych i wymaga zmniejszenia dawek leku oraz wsparcia psychoterapią. Wśród najczęściej obserwowanych działań niepożądanych leków antypsychotycznych obserwujemy zmniejszenie objętości istoty szarej oraz wzrost objętości komory bocznej mózgu, cukrzycę, czy zespół metaboliczny (w tym: otyłość brzuszna, insulinooporność, dyslipidemię i nadciśnienie tętnicze).¹¹⁴

Większość leków przeciwdepresyjnych to selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu neuroprzekazników i monoamin: serotoniny (SSRI), noradrenaliny (NRI), serotoniny i noradrenaliny (SNRI), noradrenaliny i dopaminy (NDRI). Działanie to powoduje wzrost ilości

neuroprzekazników w połączeniach między synapsami. Inną, wyróżniającą się grupą są trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (TCA, ang. *tricyclic antidepressants*), tj. imipramina, amineptyna, dibenzepina, czy klomipramina. Ich mechanizm działania nie jest do końca poznany, przypuszcza się że również mogą blokować zwrotny wychwyty amin biogennych. TCA stanowią głównie pochodne dibenzoazepiny i są stosowane jako leki drugiego rzutu – zaraz po SSRI – w leczeniu klinicznej depresji.^{115,116}

Leki przeciwpsychotyczne dzieli się na dwie grupy w zależności od ich mechanizmu działania i skutków klinicznych jakie powodują. Jednym z pierwszych leków przeciwpsychotycznych odkrytych w latach 50. XX wieku była chloropromazyna, początkowo stosowana jako lek znieczulający. Zapoczątkowała ona skuteczne farmakologiczne leczenie psychoz, w tym schizofrenii.¹¹⁷ Na podstawie jej struktury powstały leki pierwszej generacji tzw. typowe neuroleptyki, wśród których liczną grupę stanowią pochodne fenotiazyny (m.in. promazyna, perfenazyna, flufenazyna i trifluoperazyna). Innymi należącymi do tej grupy lekami są pochodne tioksantenu (flupentyksol, tiotiksen, zuklopentyksol) oraz pochodne butyrofenonu (haloperidol). Działania niepożądane zaobserwowane przy stosowaniu leków I generacji to przede wszystkim objawy zespołu pozapiramidowego (EPS, ang. *extrapyramidal symptoms*): parkinsonizm, dystonia, akatyzya oraz dyskinezy. Stały się one też powodem, dla którego rozpoczęto poszukiwanie leków, których stosowanie będzie bezpieczniejsze. Tak powstały neuroleptyki drugiej generacji, określane jako atypowe. Pierwszym lekiem tej generacji była kłozapina, będąca pochodną dibenzodiazepiny, która nie powodowała objawów EPS ani dyskinez, za to powiązano ją z występowaniem agranulocytozy.¹¹⁷ Pomimo działań niepożądanych nadal jest ona stosowana w leczeniu lekoopornej schizofrenii, lecz stosowanie jej wymaga monitorowania wyników badania krwi pacjentów. Pozostałymi atypowymi lekami są rysperydon, olanzapina, zyprazydon, czy kwetiapina. Obie generacje obejmują leki będące antagonistami receptorów dopaminergicznych oraz serotoninowych, przy czym leki drugiej generacji silniej działają na receptor serotoniny (5-HT_{2A}) niż receptor dopaminy (D₂).¹¹⁸ Leki nowej generacji mają słabsze skutki uboczne, przede wszystkim zmniejszają możliwość wystąpienia EPS, a także posiadają lepszą skuteczność w zwalczaniu objawów psychotycznych. Najnowsze badania wskazują jednak, że stosowanie leków drugiej generacji wiąże się z większym prawdopodobieństwem wystąpienia zespołu metabolicznego, w tym cukrzycy, wzrostu wagi i hiperlipidemii.¹¹⁹ Obecnie na rynku dostępne są nowe leki przeciwpsychotyczne nazywane często lekami trzeciej generacji, które są agonistami receptora D₂, w tym arypirazol, brekspiprazol, kariprazyna.¹²⁰

1.5.1. Właściwości przeciwnowotworowe leków psychotropowych

Badania populacyjne wskazują, że związki przeciwpsychotyczne mogą mieć wpływ na rozwój nowotworów. U mężczyzn leczonych na schizofrenię zaobserwowano mniejszą zapadalność na nowotwory jąder i skóry, w tym czerniaka złośliwego.¹²¹ Nie obserwowano jednak znaczącego spadku zachorowań u kobiet, a nawet istnieją hipotezy, iż schizofrenia jest istotnie skorelowana ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi. Odpowiadać za to może podwyższenie poziomu prolaktyny przez leki antypsychotyczne.¹²² U pacjentów leczonych lekami przeciwpsychotycznymi obserwowano także mniejszą częstotliwość występowania nowotworów przewodu pokarmowego i mózgu.¹²³ Z kolei w badaniach na populacji duńskiej zauważono, że zażywanie neuroleptyków korelowało ze zmniejszonym ryzykiem raka okrężnicy u pacjentów obu płci oraz raka jelit grubego u kobiet, ale nie innych rodzajów nowotworów.¹²⁴ Inne badanie populacyjne wykazało obniżone ryzyko RJG, które skorelowane było ze stosowaniem leków antydepresyjnych. Cytotoksyczne działanie SSRI powiązane ze zdolnością tej grupy leków do hamowania proliferacji komórek. W przypadku leków z grupy TCA wyniki te zgodne były z doniesieniami naukowymi, mówiącymi że mają one zdolność do indukowania apoptozy w liniach RJG.¹²⁵ Inne badanie populacyjne również wykazało, że stosowanie leków przeciwpsychotycznych, w tym klozapiny, kwetiapiny i rysperydonu wiązało się z niższym ryzykiem zachorowania na RJG.¹²⁶ W pracy tej wykazano również, że rysperydon hamował wzrost komórek RJG, indukował w nich apoptozę, ponosił poziom reaktywnych form tlenu oraz hamował wzrost guza w badaniach *in vivo*. Może to sugerować, że długotrwałe zażywanie leków przeciwpsychotycznych pociąga za sobą zmniejszenie ryzyka zachorowania na przynajmniej niektóre rodzaje nowotworów.

Właściwości przeciwnowotworowe leków przeciwpsychotycznych stwierdzono w wielu badaniach *in vitro* i *in vivo*. Jednymi z pierwszych związków z grupy leków przeciwpsychotycznych, których właściwości przeciwnowotworowe wykazano były rezerpina oraz chloropromazyna, które hamowały wzrost mięsaków u myszy w porównaniu z nietraktowaną lekami grupą kontrolną.¹²⁷ Inne fenotiazyny, podobne strukturalnie do chloropromazyny, również hamowały wzrost mięsaka u myszy.^{128,129} Obecnie chloropromazyna w połączeniu z temozolomidem jest w drugiej fazie badań klinicznych w celu poprawy leczenia glejaka wielopostaciowego (NCT04224441).¹³⁰

Związki zawierające heterocykliczne struktury, a w szczególności pierścienie tiofenowe oraz pirazynowe, wykazywały właściwości antyproliferacyjne wobec komórek raka szyjki macicy, piersi, wątroby oraz płuc.¹³¹ W wielu badaniach stwierdzono też aktywność antyproliferacyjną

leków przeciwpsychotycznych wobec linii komórkowych pochodzących z ludzkich nowotworów, szczególnie cytotoksyczne okazywały się fenotiazyny.^{132,133} Trifluoperazyna była cytotoksyczna względem komórek linii raka jelita HCT116, wywoływała w nich apoptozę, hamowała zdolność komórek do migracji, a także zmniejszała rozrost guzów w modelu mysim.¹³⁴ Także flufenazyna, dzięki swej zdolności do hamowania proliferacji komórek rakowych, zaburzania ich cyklu komórkowego, wywoływania apoptozy, podwyższania poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach i interferencji z komórkowymi szlakami sygnałowymi, rozpatrywana jest jako obiecujący kandydat na lek, którego przeznaczenie mogłoby być zmienione.¹³⁵ Aktywność przeciwnowotworowa pochodnych fenotiazyny może być także związana z ich udokumentowaną zdolnością do hamowania aktywności transporterów związanych z opornością wielolekową komórek nowotworowych, takich jak ABCB1,¹³⁶ czy ABCG1.¹³⁷ Leki antydepresyjne, paroksentyna oraz sertalina, były cytotoksyczne względem linii komórkowych RJG: HT29 oraz linii LS1034. Oba leki indukowały apoptozę w komórkach nowotworowych, sertalina hamowała również wzrost guza w badaniach na ksenograftach u myszy.¹³⁸ Obszerne badania przesiewowe (ok. 300 leków wpływających na układ nerwowy człowieka) na mysich komórkach białaczki oraz czerniaka pokazały, że prawdopodobieństwo, że leki psychoaktywne będą posiadały aktywność antyproliferacyjną było ok. 18 razy większe w porównaniu do cząsteczek pochodzących z grupy dobranej przypadkowo.¹³⁹

Ponadto, w przypadku sześciu leków antypsychotycznych wykazano istnienie selektywności względem komórek rakowych.¹⁴⁰ Wartości parametru IC_{50} osiągnięte w komórkach nowotworowych były znacząco niższe niż w komórkach normalnych. Dodatkowo wykazano, że połączenie mewastatyny z pimozydem dało efekt synergistyczny względem większości badanych linii nowotworowych i spadek wartości IC_{50} .¹⁴⁰ Podobna selektywna cytotoksyczność względem komórek nowotworowych została także zanotowana dla grupy leków będących pochodnymi fenotiazyny. Zanotowano dla nich znacznie wyższą cytotoksyczność wobec komórek białaczkowych niż normalnych limfocytów.¹⁴¹

Aktywność przeciwnowotworowa leków antydepresyjnych może być wynikiem różnych mechanizmów. Wiele badań wskazuje, że wpływają one na proliferację komórek nowotworowych, ich metastazę, cykl komórkowy, apoptozę i autofagię, a także modulują odpowiedź immunologiczną i stres oksydacyjny.¹⁴² Prowadzone są badania kliniczne takich leków, jak tranilcypromina, fenzylina czy dezypramina, w celu oceny ich przydatności w terapii nowotworów.

Badacze podejrzewają, że cytotoksyczna aktywność leków przeciwpsychotycznych nie jest związana z ich zdolnością do oddziaływania na receptory serotoniny i dopaminy, ponieważ stężenie tych leków niezbędne, aby wywołać cytotoksyczność jest znacznie większe niż dawka terapeutyczna stosowana w leczeniu zaburzeń psychicznych.¹⁴⁰ Jedną z prawdopodobnych hipotez jest zdolność tych leków do oddziaływania z kalmoduliną.^{143,144} Alternatywnym wyjaśnieniem dla ich aktywności cytotoksycznej jest ich bezpośrednie oddziaływanie z błonami komórkowymi,^{145,146} a także ich wpływ na homeostazę Chol.¹⁴⁷

Dotychczas przeprowadzono niewiele badań klinicznych badających wpływ związków z grupy leków przeciwpsychotycznych na nowotwory u ludzi. Jedno z już wspomnianych wyżej dotyczy chlorpromazyny (NCT04224441). Z kolei pimozyd stosowany w małej grupie pacjentów chorych na czerniaka z obecnymi przerzutami spowodował pozytywną odpowiedź na leczenie, w tym stabilizację choroby.¹⁴⁸ Ze względu na coraz większą ilość dowodów przedklinicznych zebranych w ostatnich latach, zwłaszcza w przypadku typowych leków przeciwpsychotycznych, rośnie prawdopodobieństwo rozpoczęcia nowych badań klinicznych w ciągu najbliższych lat. Najczęściej badanymi lekami przeciwpsychotycznymi pod kątem ich działania przeciwnowotworowego są haloperidol, chlorpromazyna, tioridazyna i penfluridol.¹⁴⁹ Natomiast badania kliniczne dotyczące nowszych atypowych leków przeciwpsychotycznych wymagają większej ilości badań przedklinicznych, by udowodnić ich działanie przeciwnowotworowe.

1.5.2. Wpływ leków przeciwpsychotycznych na homeostazę cholesterolu

Wiele leków przeciwpsychotycznych posiada zdolność do zwiększania ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę Chol oraz kwasów tłuszczowych, tzw. genów lipogennych. Właściwość tą zaobserwowano dla klozapiny, haloperidolu, olanzapiny, pimozydu, a także grupy antydepresantów w ludzkich komórkach glejowych.^{140,150,151} Podobna aktywność leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych zanotowana została również w hepatocytach, a także w linii komórkowej pochodzącej z nerwiaka zarodkowego.^{152,153} Podwyższona ekspresja genów lipogennych została także wywołana w nienowotworowych komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki przez grupę neuroleptyków (11 typowych oraz 7 atypowych).¹⁵⁴ Podkreślić jednak należy, że stężenia leków przeciwpsychotycznych, które wpływały na zmianę ekspresji genów lipogennych, były ok. 10-100 razy większe niż ich stężenia w osoczu osiągnięte w leczeniu chorób psychicznych.¹⁵⁵ Co ciekawe, cechą wspólną wszystkich genów, których ekspresja wzrastała pod wpływem leków przeciwpsychotycznych, była ich zależność od czynnika transkrypcyjnego SREBP. Dodatkowo wykazano, że niektóre leki z tej grupy (m.

in. chloropromazyna, olanzapina, kłozapina i haloperidol) stymulowały proces proteolitycznego dojrzewania białka SREBP.^{150–153}

W związku z opisanymi powyżej obserwacjami, postawiono hipotezę, że powodowana przez leki przeciwpsychotyczne aktywacja genów lipogennych może być istotnym czynnikiem objaśniającym mechanizm ich aktywności farmakologicznej,¹⁵⁴ a także powodowanych przez nie efektów ubocznych, takich jak przybieranie na wadze, czy wystąpienie zespołu metabolicznego.¹⁵²

Należy zatem postawić pytanie: jaki jest mechanizm aktywacji genów będących pod kontrolą SREBP przez leki przeciwpsychotyczne? Powodem zwiększonej ekspresji genów lipogennych w komórce jest niski poziom Chol w retikulum endoplazmatycznym (ER) lub zaburzenie jego transportu do ER, gdzie znajduje się komórkowa maszyna regulująca homeostazę tego związku. Główną ścieżką wchłaniania egzogenego Chol przez komórki jest zależna od receptora endocytoza lipoprotein LDL, które stanowią kluczowe cząstki transportujące Chol we krwi. Po wchłonięciu, cząstki LDL są degradowane w lizosomach, co powoduje uwolnienie wolnego (niezestryfikowanego) Chol. Wolny Chol jest następnie transportowany do innych organelli, w tym do ER. Tam Chol jest ponownie estryfikowany i w tej formie przechowywany, a także „wyczuwany” przez wrażliwe na Chol białko SCAP. Pokazano, że trifluoperazyna oraz imipramina hamują estryfikację Chol, a także jego wewnątrzkomórkowy transport.¹⁴⁷ Dodatkowo wykazano, że haloperidol, pimozyd oraz 6 atypowych neuroleptyków hamowały estryfikację Chol, wywoływały wewnątrzkomórkową akumulację lipoprotein LDL pozbawionych cholesterolowego „ładunku”, a także redukowały biosyntezę Chol.¹⁵⁶ Tym zjawiskom towarzyszył wzrost ekspresji genów lipogennych. Autorzy pracy wyciągnęli zatem wniosek, że aktywacja genów lipogennych stanowiła odpowiedź komórki na pozorny brak Chol w ER, spowodowany zaburzeniem wewnątrzkomórkowego transportu tego związku. Postawiono hipotezę, że mechanizm takiego działania leków przeciwpsychotycznych wynikać może albo z ich bezpośredniego oddziaływania z wrażliwymi na Chol białkami, takimi jak SCAP (co może być skutkiem strukturalnego podobieństwa ich wielopierścieniowych cząsteczek do Chol), albo z ich zdolności do zaburzania fazy lipidowej błon komórkowych.¹⁵⁶ Z tego wynika, że mechanizm, w jaki leki przeciwpsychotyczne wpływają na homeostazę Chol, jest odmienny niż w przypadku statyn, które są inhibitorami reduktazy HMG-CoA.¹⁵⁷

Lange i Steck w swojej pracy na temat wpływu różnych związków amfifilowych na metabolizm Chol podzielili badane substancje na dwie klasy. Amfifile należące do klasy I (np. oksysterole)

stymulowały estryfikację Chol i hamowały jego biosyntezę. Z kolei związki zaliczone do klasy II wywierały przeciwny efekt – hamowały estryfikację Chol, stymulowały jego biosyntezę i zwiększały aktywność reduktazy HMG-CoA. Do grupy tej zaliczono m.in. progesteron, antybiotyki monomezynę i nigerycyne, lizofosfatydylocholinę, imipraminę oraz trifluoperazynę.¹⁴⁷ Wysunięto przypuszczenie, że związki te powodują aktywację czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów lipogennych poprzez redukcję ilości Chol w ER i zwiększenie wewnątrzkomórkowej akumulacji wolnego Chol^{147,158} Biorąc pod uwagę podobieństwa pomiędzy efektami, jakie na metabolizm Chol wywierają leki przeciwpsychotyczne oraz amfifile klasy II, można założyć, że należą one do tej samej klasy związków.

Związki wpływające na metabolizm Chol mogą także wpływać na strukturę oraz funkcje mikrodomen błonowych wzbogaconych w Chol, sfingomielinę i glikosfingolipidy, takich jak tratwy i kaweole. Mikrodomeny te pełnią istotną rolę w procesach przekazywania sygnałów w komórce, tworząc platformy, na których zachodzi asocjacja białek tworzących kompleksy sygnałowe.¹⁵⁹ Na przykład, czynniki wzrostu oraz insulina, działając za pośrednictwem powierzchniowych receptorów specyficznym związanych z tratwami lipidowymi, mogą aktywować szlak kinazy PI3-K/Akt, który jest kluczowy w regulacji wzrostu komórek, a także ich przeżycia i proliferacji.¹⁶⁰ Szlak ten ulega hiperaktywacji w wielu typach nowotworów,¹⁶⁰ włącznie z RJG.¹⁶¹ Wykazano, że działanie szlaku PI3-K/Akt zależy od zawartości Chol w tratwach lipidowych. Statyny, zmniejszając biosyntezę Chol, redukowały jednocześnie aktywację Akt, co obniżało przeżywalność komórek raka prostaty.¹⁶² Także inne inhibitory biosyntezy Chol, takie jak np. kwas zaragozowy, zmniejszały przeżywalność ludzkich promielocytów i powodowały zatrzymanie ich w fazie G2/M cyklu komórkowego.¹⁶³ Z kolei lek przeciwpsychotyczny, haloperidol, hamował biosyntezę Chol w komórkach nerwiaka zarodkowego, co powodowało zmniejszenie ilości Chol w tratwach lipidowych i ich rozpad, a następnie zaburzenia w przekazywaniu sygnałów na szlaku insulina/Akt.¹⁶⁴ Z kolei zastosowanie leków przeciwdepresyjnych wobec ludzkich linii zarodkowych i linii nerwiaka zarodkowego spowodowało translokację białka Gas z tratw lipidowych do pozostałych rejonów błony, a co za tym idzie łatwiejszą aktywację cykazy adenylowej i zwiększoną akumulację cAMP.¹⁶⁵ Stanowi to następny przykład zaburzającego sygnalizację komórkową działania leków przeciwdepresyjnych.

Wysunięto także przypuszczenie, że powodowana przez leki przeciwpsychotyczne aktywacja genów będących pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego SREBP, może być związana z

zaburzaniem przez te leki fazy lipidowej błony komórkowej.¹⁵⁶ We wcześniejszych pracach wykonanych w naszym zespole udało się pokazać, że leki przeciwpsychotyczne z grupy pochodnych fenotiazyny wywoływały separację faz w błonach utworzonych z fosfatydylocholiny z domieszką niewielkich ilości Chol i sfingomieliny,¹⁶⁶ a także, że powodowały wyraźne zmiany w organizacji przestrzennej mikrodomen w układach modelowych o składzie POPC:Chol:sfingomielina (1:1:1).⁶⁷

Mechanizmy związane z Chol wymieniane są także wśród istotnych czynników odpowiedzialnych za cytotoksyczność leków przeciwpsychotycznych.¹⁴⁰ Głównymi przesłankami, które wskazują na zasadność tej tezy są obserwacje, że zdecydowana większość genów, na których ekspresję wpływają leki przeciwpsychotyczne, związana jest z metabolizmem Chol, a także że zmniejszenie ilości Chol w komórkach, uzyskane jakąkolwiek metodą, skutkowało znacznym wzrostem wrażliwości komórek na te leki. W związku z powyższym, zasugerowano, iż cytotoksyczne właściwości leków przeciwpsychotycznych mają związek głównie z ich amfifilowym charakterem oraz z ich zdolnością do hamowania transportu Chol do ER. Toksyczny efekt tych leków miałby być wynikiem nieograniczonego poboru Chol przez komórkę (wynikającego z uszkodzenia maszynerii regulującej homeostazę Chol w ER) lub też zaburzonego przekazywania sygnałów wzdłuż szlaku Akt, co skutkowałoby zablokowaniem podziałów komórkowych.¹⁴⁰ Ponieważ skład lipidowy (w tym zawartość Chol) błon komórek nowotworowych znacznie różni się od komórek normalnych, przypuszczać można, że mechanizmy związane z Chol mogą być także odpowiedzialne za selektywną cytotoksyczność leków przeciwpsychotycznych względem tych pierwszych.

1.6. Repozycjonowanie leków w terapii onkologicznej

Wprowadzenie nowych leków przeciwnowotworowych na rynek farmaceutyczny to proces kosztowny, długotrwały i często kończący się niepowodzeniem.¹⁶⁷ Szacuje się, że koszt tego procesu dla nowego leku może sięgać nawet 2,5 miliarda dolarów, nie uwzględniając dalszych kosztów jego produkcji i rozwoju. Po przejściu badań przedklinicznych do etapu badań klinicznych dostaje się ledwie 5 z 5000 związków będących kandydatami na leki. Następnie jedynie jeden z nich otrzymuje dopuszczenie do użytku przez odpowiednie agendy administracyjne (np. FDA, Food and Drug Administration). Dodatkowo cały proces zajmuje od 10 do 15 lat badań. Jednym ze sposobów skrócenia tego czasu są badania nad poszukiwaniem dodatkowych aktywności biologicznych istniejących już leków. Obecne już na rynku substancje lecznicze często wpływają na wiele szlaków komórkowych bądź cząsteczek

docelowych w komórkach. Proces zmiany/rozszerzenia wskazań do stosowania znanych już leków, noszący nazwę repozycjonowania (ang. *drug repurposing*) jest nadzieją na znalezienie sposobu leczenia chorób rzadkich oraz terminalnych, a także na poprawę efektywności terapii, jak również na zwiększenie przeżywalności chorych. Czas dopuszczenia znanego leku w celu leczenia innej choroby niż pierwotnie jest znacznie krótszy w porównaniu z całkowicie nowymi substancjami i może wynieść jedynie od 3 do 12 lat. Leki już znane mają dobrze poznany profil bezpieczeństwa, dlatego też ich użycie wiąże się z niskim ryzykiem i dużym wskaźnikiem sukcesu. Liczba leków o zmienionym przeznaczeniu może stanowić nawet około 20-30% wszystkich leków dopuszczonych rocznie na rynek farmaceutyczny.¹⁶⁸ W przypadku chorób nowotworowych istotne jest sprawdzenie, czy znane już leki posiadają właściwości cytotoksyczne, dzięki którym można by zastosować je w terapii wspomagającej leczenie zasadnicze.

Wśród leków budzących zainteresowanie w celu zmiany ich przeznaczenia znajdują się zarówno leki, które zostały dawno odkryte i wycofane z obiegu oraz leki powszechnie stosowane. Przykładem znanego leku, który udało się repozycjonować jest aspiryna. Powszechnie stosowana jako lek przeciwbólowy i przeciwzapalny, znalazła również zastosowanie w leczeniu przeciwzakrzepowym. Talidomid, lek sedacyjny, który wykazywał właściwości teratogenne i został wycofany z listy leków, zyskał zastosowanie w leczeniu raka trzustki czy szpiczaka mnogiego, dzięki swoim właściwościom antyangiogennym.^{169,170} W przypadku leków, które udało się repozycjonować w celach terapii onkologicznej, wyróżnić możemy m.in. itrakonazol, lek przeciwgrzybiczy zaburzający integralność błony komórkowej i wpływający na metabolizm grzybów, a zarazem posiadający właściwości przeciwnowotworowe względem raka niedrobnokomórkowego płuc i raka prostaty.¹⁷¹ Nelfinawir to przeciwwirusowy lek, który znalazł zastosowanie w leczeniu mięsaka Kaposiego, a także jako dodatek do radiochemioterapii RJG (badanie kliniczne NCT00704600). Z kolei, antybiotyk nitroksolina w badaniach przedklinicznych *in vitro* oraz *in vivo* wykazała działanie cytotoksyczne wobec komórek raka prostaty, glejaka, szpiczaka mnogiego oraz została dopuszczona do II fazy badania klinicznego w leczeniu raka pęcherza moczowego.^{172,173}

1.7. Terapie kombinowane w onkologii

Terapie kombinowane, inaczej nazywane skojarzonymi, polegają na jednoczesnym zastosowaniu więcej niż jednej metody leczenia. Najczęściej dotyczy ona dwóch środków farmakologicznych, które mają różne mechanizmy działania, np. oddziałują na różne szlaki

sygnalizacyjne, oraz nie wchodzi z sobą w interakcje. Próby stosowania terapii kombinowanych podejmowane są najczęściej wobec chorób trudnych do wyleczenia, takich jak nowotwory, AIDS, czy choroby neurodegeneracyjne.^{174,175} Głównym ich celem jest ustalenie takiej procedury terapeutycznej, w której pomiędzy użytymi środkami wystąpi efekt synergistyczny. Przykładem terapii skojarzonej jest połączenie chemioterapii z radioterapią w chorobach nowotworowych, bądź zastosowanie dwóch leków o odmiennym działaniu farmakologicznym. Działanie to ma na celu zmniejszenie toksyczności i dawek stosowanych w leczeniu lub pokonanie – często występującej w nowotworach – lekooporności.¹⁷⁶

Obiecującymi kandydatami w terapii kombinowanej wobec nowotworów są statyny, które w wielu badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazały zdolność do hamowania proliferacji komórek rakowych, a ich mechanizm farmakologiczny różni się od mechanizmu leków stosowanych w chemioterapii. Jednym z podejść w walce przeciwko nowotworom o fenotypie oporności wielolekowej jest znalezienie takiego modulatora, który uwrażliwi komórki nowotworowe na działanie cytostatyku bądź wzmocni jego efekt. Antracykliny, np. doksorubicyna, stosowane w leczeniu wielu nowotworów, stanowią substrat dla transporterów błonowych o szerokiej specyficzności, takich jak P-gp. Transportery te usuwają leki z komórek rakowych i powodują spadek ich wewnątrzkomórkowego stężenia poniżej poziomu skuteczności.⁸⁴ Jednym z wyjść, aby przezwyciężyć MDR, jest podawanie inhibitorów tych białek, które zwiększyłyby stężenie doksorubicyny w komórkach rakowych. Stwierdzono, że statyny mogą hamować P-gp w komórkach międzybłoniaka i RJG, zmniejszając tym samym aktywność tego transportera.^{23,177} Statyny w połączeniu z antracyklinami wykazały działanie ochronne przed skutkami ubocznymi chemioterapii, takimi jak niewydolność sercowa. Wiele badań wskazuje na korzyść łączenia simwastatyny z innymi środkami terapeutycznymi w leczeniu nowotworów. Simwastatyna (SIM) zamknięta w nośniku liposomowym zastosowana z również liposomalnym fluorouracylem (5-FU) wobec linii RJG, wykazała silną aktywność przeciwnowotworową *in vivo*.¹⁷⁸ Działanie przeciwnowotworowe połączonych terapeutyków, sugerowało że SIM działała jako czynnik uwrażliwiający komórki nowotworowe na 5-FU. Również pochodne oksykamu w połączeniu z SIM znacząco hamowały wzrost komórek linii odpornej RJG – LoVo/Dx.¹⁷⁹ Wiele obecnie prowadzonych badań klinicznych poddaje ocenie wpływ przyjmowania statyn w trakcie terapii przeciwnowotworowych. Dotychczasowe wyniki pokazują, że stosowanie statyn nie pogarsza stanu zdrowia pacjentów i jest dobrze tolerowane przez organizm. Badane jest np. połączenie SIM z 5-FU oraz radioterapią w leczeniu zaawansowanego raka odbytnicy (NCT02161822), czy prawastatyny z antracyklinami wobec

chłoniaka, mięsaka i raka piersi, by zmniejszyć kardiotoksyczność tych cytostatyków (NCT04190433).

Wzrosło również zainteresowanie użyciem leków antydepresyjnych oraz przeciwpsychotycznych, które wykazały aktywność przeciwnowotworową w badaniach na liniach komórkowych w terapiach skojarzonych. W linii komórkowej glejaka wielopostaciowego haloperidol oraz rysperydon w połączeniu z temozolomidem (TMZ) zwiększały śmiertelność komórek nowotworowych w wyniku apoptozy i powodowały aktywację kaspazy-8.^{180,181} Trifluoperazyna zwiększała wrażliwość na radioterapię komórek glejaka wielopostaciowego *in vitro* i *in vivo*,¹⁸² a także wzmacniała cytotoksyczność dokсорubicyny wobec opornych komórek glejaka – SHG44/DOX.¹⁸³ Pochodna fenotiazyny w połączeniu z gefitynibem hamowała wzrost komórek raka płuc oraz uwrażliwiała je na działanie cytostatyku.¹⁸⁴ Chlorpromazyna natomiast hamowała proliferację komórek glejaka opornych na działanie temozolomidu.¹⁸⁵ Z kolei połączenie tej fenotiazyny z pantamidyną, lekiem przeciwdrobnoustrojowym, wykazało silny efekt antyproliferacyjny względem komórek raka płuc oraz RJG, także w modelach *in vivo*.¹⁸⁶ Kwetiapina wykazywała efekt synergistyczny z TMZ, hamując wzrost komórek nowotworowych.¹⁸⁷ Zdolność do wzmacniania efektu chemioterapeutyku i indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych wykazały również m.in. olanzapina, czy rysperydon.^{137,188} Olanzapina hamowała proliferację i indukowała apoptozę w komórkach glejaka i dodatkowo zwiększała efekt przeciwnowotworowy TMZ.¹⁴⁹ Natomiast, w badaniach na komórkach raka płuc, jajnika i trzustki, zmniejszała ona ekspresję białka surwininy oraz uwrażliwiała komórki na działanie 5-FU, gemcytabiny oraz cisplatyny.¹⁸⁹ Lek antypsychotyczny drugiej generacji – rysperydon zastosowany wspólnie z kwasem rumenowym, hamował proliferację komórek raka prostaty w badaniach *in vitro*. Dodatkowo, spowalniał wzrost guza w badaniach *in vivo* na myszach.¹⁹⁰ Autorzy innej pracy wykazali, że rysperydon hamował nadekspresję transportera związanego z opornością wielolekową (BCRP) w liniach RJG oraz odpornej linii raka piersi.¹³⁷

Triorydazyna, neuroleptyk będący pochodną fenotiazyny, w połączeniu z cytarabiną badana była wobec pacjentów w podeszłym wieku z oporną lub nawracającą białaczką szpikową (NCT02096289). W pierwszej fazie badań klinicznych zaobserwowano zmniejszenie ilości komórek blastycznych u części pacjentów, które powiązane było z hamowaniem ekspresji receptora dopaminy.¹⁹¹ Wyniki wskazują na to, że receptor dopaminowy może być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu tego typu nowotworu. W innym badaniu klinicznym analizowano skojarzenie chlorpromazyny z temozolamidem u pacjentów z nowo

zdiagnozowanym glejakiem wielopostaciowym (NCT04224441). Połączenie obu tych związków działało synergistycznie i indukowało apoptozę w komórkach glejaka w badaniach *in vitro*.¹⁹² Działanie przeciwnowotworowe leków przeciwpsychotycznych odbywa się za pośrednictwem wielu odrębnych mechanizmów molekularnych. Większość badań eksperymentalnych skupiła się na grupie leków typowych ze względu na ich niespecyficzność, czyli zdolność do interakcji z kilkoma receptorami w komórkach. Leki atypowe wykazują wyższą specyficzność względem receptora dopaminowego D2. W ostatnich latach obserwuje się rosnący trend badawczy, skupiający się na nowszych, atypowych lekach przeciwpsychotycznych, a otrzymywane dla nich wyniki są obiecujące. Leki przeciwpsychotyczne wydają się również wzmacniać działanie takich chemioterapeutyków, jak temozolomid i doksorubicyna, zwalczając chemo- i radiooporność guza. Jednak doświadczenia dotyczące nowszych, atypowych leków przeciwpsychotycznych wymagają większej ilości badań przedklinicznych, by udowodnić ich działanie przeciwnowotworowe.¹⁴⁹

2. Część doświadczalna

2.1. Cel pracy

Stosowanie leków przeciwpsychotycznych pociąga za sobą wiele skutków ubocznych, takich jak przybieranie na wadze, podwyższone ryzyko rozwoju cukrzycy czy, chorób sercowo-naczyniowych. Dodatkowo długotrwałe stosowanie tych leków wydaje się zmniejszać ryzyko zachorowania na nowotwory. Niepożądane działania uboczne powiązane są z udokumentowaną zdolnością wielu leków przeciwpsychotycznych do zaburzania produkcji kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Zmiany w ilości i rozmieszczeniu Chol w komórkach, a także zmiany w szlakach sygnalizacyjnych związanych z trawami lipidowymi, obserwowane są w wielu nowotworach. Z tego względu związki, które zaburzają homeostazę lipidową mogą również posiadać korzystne właściwości przeciwnowotworowe. Dodatkowo dla wielu leków przeciwpsychotycznych stwierdzono wyższą cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych niż nienowotworowych (czyli tzw. selektywność).

Celem pracy doktorskiej jest zidentyfikowanie, większej niż dotychczas znana, grupy związków wielopierścieniowych, które posiadają zdolność do selektywnego hamowania wzrostu komórek raka jelita grubego. Dla wybranych związków zbadano także wpływ na ekspresję genów zaangażowanych w biosyntezę cholesterolu. Większość badanych substancji należy do grupy leków antydepresyjnych i przeciwpsychotycznych, zbadano także jeden lek przeciwhistaminowy oraz jeden przeciwnowotworowy. Dodatkowo, sprawdzono antyproliferacyjne działanie badanych leków używanych samodzielnie, a także w kombinacjach z substancjami o udokumentowanym wpływie na metabolizm cholesterolu: simwastatyną (inhibitorem reduktazy HMG-CoA) oraz betuliną (inhibitorem dojrzewania czynnika transkrypcyjnego SREBP) w poszukiwaniu synergii pomiędzy simwastatyną lub betuliną a badanymi związkami. Badania te wpisują się w nowe podejście zakładające możliwość zmiany przeznaczenia (ang. *drug repurposing*) niektórych leków przeciwpsychotycznych i potencjalnego wykorzystania ich w terapii nowotworów.

Większość spośród badanych w pracy doktorskiej leków ma dobrze udokumentowane zdolności do oddziaływania z błonami lipidowymi, co potencjalnie może wpływać zarówno na ich właściwości cytotoksyczne, jak i na ich wpływ na poziom Chol w komórce. Dodatkowym celem pracy jest określenie wpływu badanych leków przeciwpsychotycznych na mikrodomeny błonowe wzbogacone w cholesterol i sfingomielinę (tzw. tratwy lipidowe). Dokonano tego przy zastosowaniu ogromnych jednowarstwowych liposomów (GUV) utworzonych z mieszaniny

lipidów o odpowiednim składzie. Dla nowych pochodnych betuliny dokonano pełniejszej charakterystyki ich oddziaływania z modelowymi dwuwarstwami fosfolipidowymi.

Ostatnim zagadnieniem podjętym w pracy doktorskiej jest próba przewidzenia oddziaływania badanych związków z dwuwarstwami lipidowymi oraz ich zachowania w błonie komórkowej za pomocą narzędzi bioinformatycznych. Modelowanie molekularne pozwoliło też na próbę określenia fizyko-chemicznych właściwości związków istotnych dla ich działania przeciwnowotworowego.

W mojej opinii badania te przyczyniają się do szczegółowego wyjaśnienia mechanizmu działania leków przeciwpsychotycznych na komórki nowotworowe i dostarczają danych istotnych dla ewentualnych prób wprowadzenia niektórych z tych leków do terapii przeciwnowotworowej.

2.2. Materiały

2.2.1. Linie komórkowe

Linie komórkową gruczolakoraka jelita grubego (HT29, HTB-38) otrzymano dzięki uprzejmości prof. Chiary Riganti z Zakładu Onkologii Uniwersytetu w Turynie (Włochy). Oporną na dokсорubicynę linię HT29/Dx otrzymano z tego samego źródła. Została ona wyprowadzona z komórek linii HT29 poprzez stałą ekspozycję na dokсорubicynę w stężeniu 68 nmol/l.²³

Ludzką linię gruczolakoraka okrężnicy (COLO205, CCL-222) oraz ludzką linię prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego (FHC, CRL-1831) zakupiono w banku komórek ATCC (American Type Culture Collection, Stany Zjednoczone). Linie prawidłową fibroblastów skóry ludzkiej (NHDF, CC-2509) otrzymano od dr hab. Magdaleny Skoniecznej z Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

2.2.2. Startery DNA

Specyficzne startery względem fragmentów badanych genów zaprojektowano za pomocą programu Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Oligonukleotydy zamówione zostały w Pracowni Sekwencjonowania DNA (IBB PAN, Warszawa). Sekwencje użytych starterów pokazano w Tab. 1.

Tab. 1. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji PCR. Tabela zawiera temperatury topnienia (T_M) oraz długość produktu otrzymanego z danych sekwencji starterów.

Nazwa genu		Sekwencja startera	T_M [°C]	Długość produktu [pz]
<i>LDLR</i>	forward	5'-GTCTGGAGGATGACGTGGCG-3'	62,9	190
	reverse	5'-AGCCATTGCATGGGCACTGT-3'	63,1	
<i>HMGCR</i>	forward	5'-AGCAAACATTGTCACCGCCATC-3'	62,3	275
	reverse	5'-TCCCACACACAATTCGGGCAAG-3'	63,6	
<i>ACTB</i>	forward	5'-CCAGAGCAAGAGAGGCATCC-3'	65,3	437
	reverse	5'-CTGTGGTGGTGAAGCTGAAG-3'	63,8	

HMGCR – gen kodujący reduktazę HMG-CoA, *LDLR* – gen kodujący receptor lipoprotein o małej gęstości LDL, *ACTB*-gen kodujący β -aktynę.

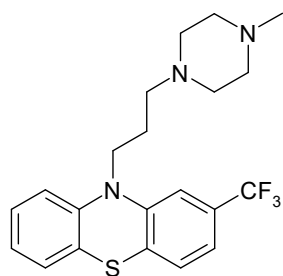
2.2.3. Badane związki

Wszystkie badane związki posiadają struktury wielopierścieniowe. Ich pełną listę przedstawia Tab. 2. Większość badanych związków należy do grupy leków antydepresyjnych i przeciwpsychotycznych: flufenazyne, flupentyksol, imipramina, klozapina, kwetiapina, lurasydony, olanzapina, perfenazyne, prochlorperazyne, rysperydon, tiotiksen, trifluoperazyne i ziprazydon. Ponadto badaniu poddano: loratadynę (lek przeciwhistaminowy), SN-38 (lek przeciwnowotworowy), simwastatynę (lek obniżający poziom cholesterolu LDL we krwi), betulinę (terpen, związek pochodzenia naturalnego), a także dwie syntetycznie wytworzone pochodne betuliny (B1 oraz B2). Pochodne betuliny otrzymano dzięki współpracy z dr inż. Agatą Kozioł z Zakładu Chemii i Immunochemii, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Struktury chemiczne badanych związków przedstawiono na Rys. 3.

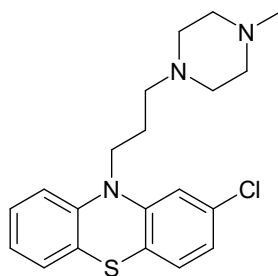
Tab. 2. Badane związki wraz ze stosowanymi w pracy skrótami wraz ze źródłami z których zostały pozyskane.

Nazwa	Skrót	Źródło
KLOZAPINA	KLZ	Sigma - Aldrich
KWETIAPINA	QTP	Sigma - Aldrich
OLANZAPINA	OLZ	Sigma - Aldrich
IMIPRAMINA	IMP	Sigma - Aldrich
LORATADYNA	LOR	Sigma - Aldrich
PERFENAZYNA	PFA	Sigma - Aldrich
FLUFENAZYNA	FLU	Sigma - Aldrich
PROCHLORPERAZYNA	PCZ	Sigma - Aldrich
TRIFLUOPERAZYNA	TFP	Sigma - Aldrich
FLUPENTYKSOL (CIS-(Z))	FLP	Sigma - Aldrich
TIOTYKSEN	THX	USP Reference Standards
RYSPERYDON	RIS	European Pharmacopoeia
LURAZYDON	LUR	Sigma - Aldrich
ZYPRAZYDON	ZIP	European Pharmacopoeia
SN-38	SN38	Sigma - Aldrich
SIMWASTATYNA	SIM	Sigma - Aldrich
BETULINA	BET	Merck

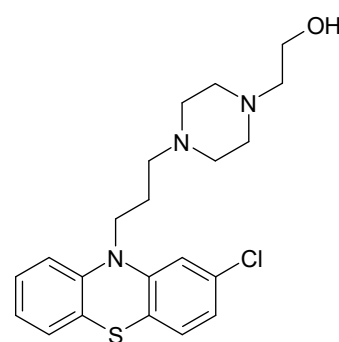
Nazwa	Skrót	Źródło
3B,28-DIACETOKSY-LUP-20(29)-EN	B1	Zakład Chemii i Immunochemii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
3B-ACETOKSY-LUP-20 (29)-EN-28-OL	B2	Zakład Chemii i Immunochemii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu



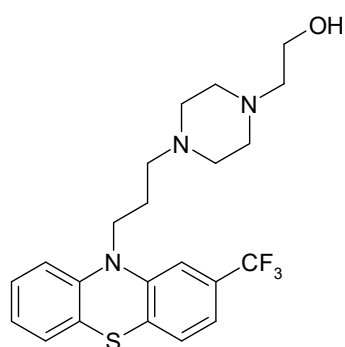
Trifluoperazyna



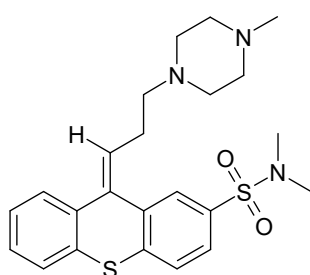
Prochlorperazyna



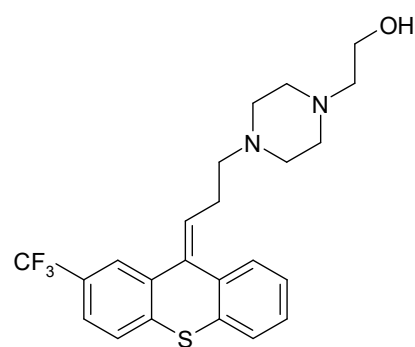
Perfenazyna



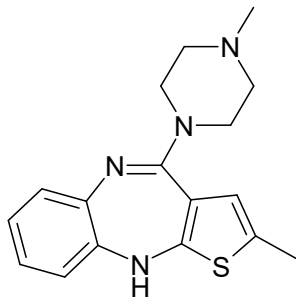
Flufenazyna



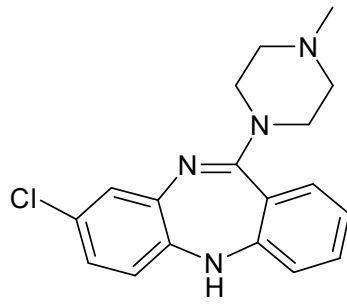
Tiotiksen



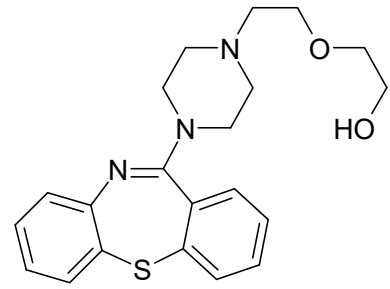
cis-Flupentyksol



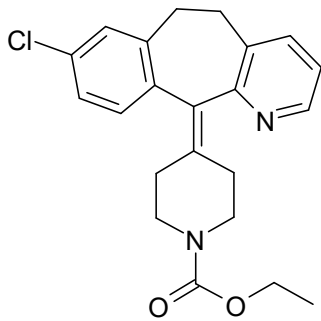
Olanzapina



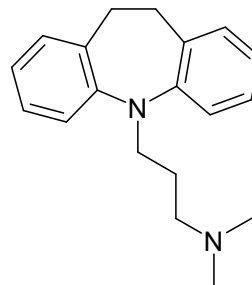
Klozapina



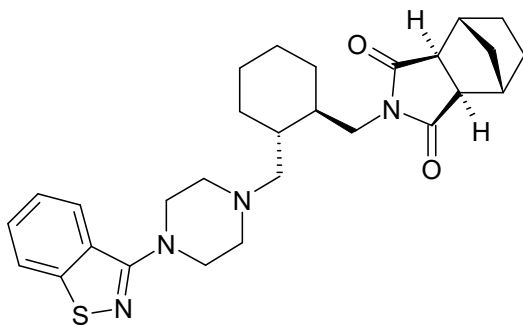
Kwetiapina



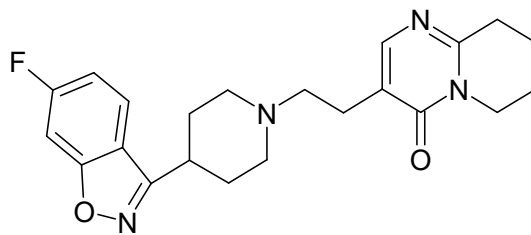
Loratadyna



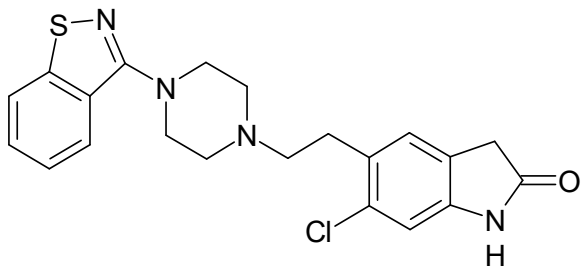
Imipramina



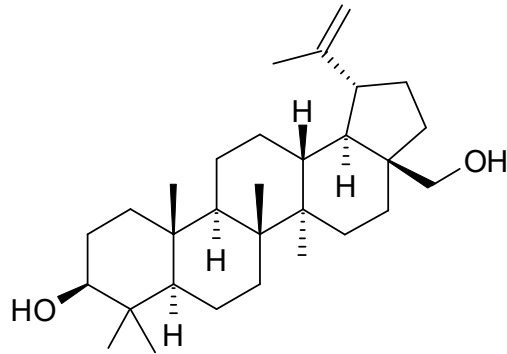
Lurazydon



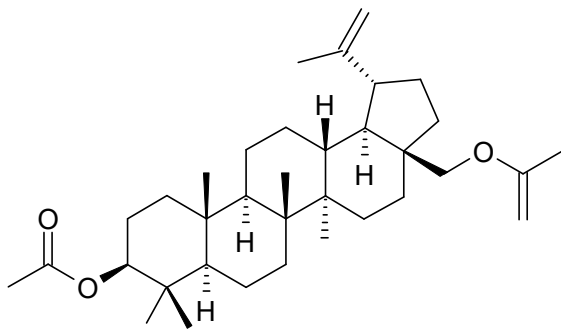
Risperidon



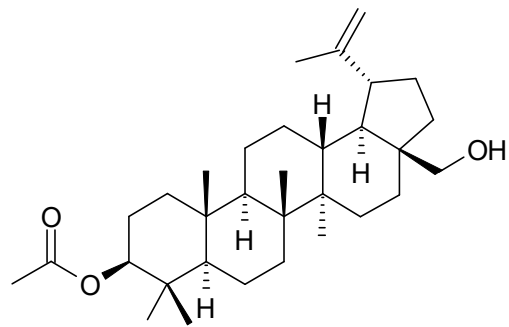
Zypreidon



Betulina



B1



B2

Rys. 3. Struktury chemiczne badanych związków.

2.2.4. Pozostałe odczynniki

Zestawienie pozostałych związków używanych w doświadczeniach wraz z ich źródłem pochodzenia zebrano w Tab. 3.

Tab. 3. Odczynniki użyte do doświadczeń.

Nazwa	Producent
Agar	Eurx
Annexin-V apoptosis assay	BioLegend
Antybiotyki (penicylina 10.000 U, streptomycyna 10mg/ml)	Sigma - Aldrich
Bromek 3-(4,5- dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylo-tetrazoliowy (MTT)	Sigma - Aldrich
Bufor wiążący aneksynę	Biolegend
Chloroform	Avantor (POCH)
Cholesterol	Avanti Polar Lipids
DCFH-DA (dioctan 2',7'- dichlorodihydrofluoresceiny)	Sigma - Aldrich
DiIC ₁₂ (3) (nadchloran 1,1-didodecylo-3,3,3,3-tetrametyloindokarbocyaniny)	Thermo Fischer Scientific
DMEM/F-12	Biowest
DMPC (1,2-dimirystoilo- <i>sn</i> -glicerolo-3-fosfatydylocholina)	Avanti Polar Lipids
DMSO (dimetylosulfotlenek)	Avantor (POCH)
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fischer Scientific
dNTP Mix	Thermo Fischer Scientific
Doksorubicyna	Sigma - Aldrich
DOPC (1,2- dioleilo- <i>sn</i> -glicero-3 fosfatydylocholina)	Avanti Polar Lipids
DPH (1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien)	Sigma - Aldrich
DPPC (1,2-dipalmitoilo- <i>sn</i> -glicerolo-3-fosfatydylocholina)	Avanti Polar Lipids
E.Z.N.A Total RNA Kit	Omega Bio - Tek
EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy)	Sigma - Aldrich

Nazwa	Producent
EGF (nabłonkowy czynnik wzrostu)	Thermo Fischer Scientific
Egg SM (sfingomielina)	Avanti Polar Lipids
Etanol	Avantor (POCH)
Fastruler Middle Range DNA Ladder (marker masy DNA)	Thermo Fischer Scientific
Filipina III	Sigma - Aldrich
FBS (płodowa surowica wołowa)	Gibco
Glicyna	Applichem
L-Glutamina (roztwór 200 mM)	Sigma - Aldrich
Hepes (kwas hydroksyetylopiperazynoetanosulfonowy)	Biowest
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fischer Scientific
Hydrokortyzon	Bausch
Insulina	Bioton
Jodek propidyny (PI)	Sigma - Aldrich
Kwas borowy	Chempur
Kwas cytrynowy	Avantor (POCH)
Kwas octowy	Chempur
Laurdan (2-(dimetyloamino)-6-dodekanylnaftalen)	Molecular Probes
Metanol	Avantor (POCH)
β -Merkaptoetanol	Sigma - Aldrich
NaCl (chlorek sodu)	Chempur
Nieenzymatyczny płyn do dysocjacji komórek na bazie PBSu (1x)	Merck
Paraformaldehyd	Fluka
PBS (buforowany roztwór soli fizjologicznej)	Sigma - Aldrich
Rekombinowana polimeraza Taq	Thermo Fischer Scientific
Rnase Inhibitor (Inhibitor Rnaz)	Bioshop Canada Inc.
RPMI-1640	Cytogen

Nazwa	Producent
Simply Safe (barwnik kwasów nukleinowych)	Eurx
Sulforodamina B (SRB)	Sigma - Aldrich
Sybr Safe Dna Gel Stain (barwnik kwasów nukleinowych)	Thermo Fischer Scientific
TCA (kwas trójchlorooctowy)	Chempur
Tetrahydrofuran	Merck
TMA-DPH (1-(4-trójmetylamino), 6-difenylo-1,3,5-heksatrien)	Biochemika
Toksyna cholery	Merck
Transferyna	Merck
Tris (trihydroksymetyloaminometan)	Sigma - Aldrich
Triton-X	Sigma - Aldrich
Trypsyna	Sigma - Aldrich

2.3. Metodologia badań

2.3.1. Hodowle komórkowe linii nowotworowych i prawidłowych

Hodowlę ludzkiej linii komórek raka okrężnicy COLO205, HT29 i jej odpornej na dokсорubicynę sublinii HT29/Dx prowadzono w medium hodowlanym RPMI-1640 suplementowanym: 1% roztworem penicyliny i streptomycyny, 10% FBS oraz 1% L-glutaminą. Linię HT29/Dx hodowano w obecności dokсорubicyny (stężenie leku w hodowli wynosiło 34 nM) w celu podtrzymania oporności. Komórki inkubowane były w warunkach standardowych, czyli w temperaturze 37°C i w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Komórki linii nowotworowych pasażowano dwa razy w tygodniu za pomocą wolnego od enzymów roztworu do dysocjacji na bazie PBS.

Linię prawidłową fibroblastów skóry ludzkiej (NHDF) hodowano w medium DMEM/F-12 (37°C i 5% CO₂) suplementowanym 10% FBS, 1% L-glutaminą oraz antybiotykami (1% roztworem penicyliny i streptomycyny). Linię komórek nabłonka okrężnicy (FHC) również hodowano w medium DMEM/F-12 (37°C i 5% CO₂). Medium wzbogacono 10% FBS, toksyną cholery (10 ng/ml), insuliną (5 µg/ml), transferyną (5 µg/ml), hydrokortyzonem (100 ng/ml), czynnikiem wzrostu EGF (20 ng/ml), dodatkowym buforem HEPES (stężenie końcowe 25 mM) oraz antybiotykami (1% roztworem penicyliny i streptomycyny). Linie prawidłowe pasażowano raz na dwa tygodnie za pomocą roztworu do dysocjacji.

Doświadczenia z użyciem wymienionych linii komórkowych wykonywane były, gdy komórki osiągnęły fazę logarytmicznego wzrostu.

2.3.2. Oznaczenie cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu SRB

W celu oceny działania cytotoksycznego badanych związków wykorzystano test z barwieniem sulforodaminą B (test SRB). Ten anionowy barwnik w roztworze kwasowym wiąże się elektrostatycznie z zasadowymi aminokwasami białek komórkowych. W metodzie tej mierzona jest spektrofotometrycznie całkowita ilość białka, która jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek. Test SRB przeprowadzono według następującej procedury:

1. Komórki nakładano na 96-dołkowe płytki (Tissue Culture-Treated Plates, Falcon). W dołkach umieszczono po 75 µl zawiesiny komórkowej z wyłączeniem dołków kontrolnych zawierających samo medium. Komórki HT29, HT29/Dx wysiewano w stężeniu 400 000/ml (30 000 na dołek), natomiast komórki linii NHDF w stężeniu

300 000/ml (22 500 na dołek). Następnie inkubowano przez 1 godz. (37°C, 5% CO₂), aby pozwolić komórkom na przytwierdzenie się do podłoża.

2. Do odpowiednich dołków dodawano po 75 µl medium zawierającego określone stężenie badanego związku (końcowa objętość w dołku wynosiła 150 µl). W celu zobrazowania efektu cytotoksycznego użyto 8 różnych stężeń każdego związku. W dołkach kontrolnych umieszczono taką samą ilość czystego medium (75 µl). Płytki inkubowano przez 48 godz. (37°C, 5% CO₂).
3. Do każdego dołka dodano 50 µl zimnego roztworu TCA (o stężeniu 50%) w celu utrwalenia komórek i inkubowano przez 1 godz. w 4°C.
4. Płytki przepłukano pięciokrotnie pod bieżącą wodą z kranu, a następnie wysuszono.
5. Do każdego dołka dodano 100 µl roztworu SRB (0,2% roztwór sulforodaminy B w 1% kwasie octowym). Płytki owinięto folią aluminiową w celu ochrony przed światłem i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godz.
6. Płytki płukano 1% roztworem kwasu octowego aż do usunięcia niezwiązanego białka, a następnie suszono.
7. Do każdego dołka dodano 150 µl roztworu Tris (10 mM) w celu rozpuszczenia związanego barwnika.
8. Odczytano absorbancję za pomocą czytnika mikropłytek Infinite M200 PRO (Tecan) przy długości fali 491 nm.
9. Przeżywalność komórek określano jako procent żywych komórek w próbie obliczony ze stosunku (A_{491} dla komórek badanych/ A_{491} dla komórek kontrolnych) \times 100%. Stężenie związku potrzebne do uzyskania 50% redukcji w liczbie komórek (IC₅₀) obliczono przy użyciu oprogramowania CompuSyn (ComboSyn).

2.3.3. Oznaczenie cytotoksyczności badanych związków za pomocą testu MTT

Test MTT jest metodą służącą do pośredniego pomiaru cytotoksyczności. Jest ona określana przez aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, obecnej w aktywnych mitochondriach komórek. W metodzie tej bromek tetrazoliowy jest redukowany do fioletowych kryształów formazanu przez obecną w mitochondriach dehydrogenazę. Ilość powstałych kryształów formazanu, która jest proporcjonalna do ilości żywych komórek, mierzy się spektrofotometrycznie. Metodę tę stosowano dla komórek linii COLO205, ponieważ są one jedynie częściowo adherentne i użycie testu SRB mogłoby spowodować utratę komórek nie przytwierdzonych do podłoża. Dokładną procedurę testu MTT opisano w punktach poniżej.

1. Wysiew komórek na płytki oraz dodanie odpowiednich związków przeprowadzano tak samo jak dla testu SRB (podpunkt 2.3.2, punkt 1 i 2). Komórki COLO205 wysiewano w stężeniu 400 000/ml (30 000 na dołek).
2. Po 48 godz. inkubacji komórek z badanymi związkami, usunięto medium i do każdego dołka wprowadzono 50 µl roztworu bromku tetrazoliowego (MTT) w stężeniu 0,5 mg/ml (MTT rozpuszczano w PBS (5 mg/ml), a następnie rozcieńczono w pożywce bezbarwnej DMEM/F12 do stężenia 0,5 mg/ml).
3. Płytki inkubowano ok. 4 godz. w inkubatorze (37°C, 5% CO₂), aż do uzyskania fioletowych kryształów formazanu.
4. Za pomocą pipety usunięto pozostały roztwór z nad komórek i dodano po 75 µl kwaśnego izopropanolu w celu rozpuszczenia kryształów.
5. Odczytano absorbancję za pomocą czytnika mikroplatek Infinite M200 PRO (Tecan) przy długości fali 570 nm.
6. Przeżywalność komórek określano jako procent żywych komórek w próbie obliczony ze stosunku (A_{570} dla komórek badanych/ A_{570} dla komórek kontrolnych) × 100%. Stężenie związku potrzebne do uzyskania 50% redukcji w liczbie komórek (IC₅₀) obliczono przy użyciu oprogramowania CompuSyn (ComboSyn).

2.3.4. Analiza oddziaływania między związkami

Do określenia typu wzajemnego oddziaływania kombinacji związków (synergizm lub antagonizm) wykorzystano programu CompuSyn (ComboSyn Inc.). Po określeniu wartości IC₁₀, IC₂₅, IC₅₀, obliczono indeks kombinacji – CI (ang. *combination index*). Parametr ten wyznaczono za pomocą metody Chou–Talalaya zgodnie z równaniem poniżej:

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2}$$

gdzie: (D)₁ oraz (D)₂ oznaczają dawki leków 1 i 2 zastosowanych w połączeniu, które powodują inhibicję wzrostu komórek o x%; (Dx)₁ oraz (Dx)₂ są odpowiednio dawką leku 1 lub 2 stosowanych pojedynczo, która powoduje inhibicję wzrostu o x%.¹⁹³ Jeżeli wartości CI < 1 wskazuje to na synergizm, CI = 1 oznacza efekt addytywny, natomiast CI > 1 antagonizm działania kombinacji leków.

Dodatkowo za pomocą oprogramowania Combobenefit przeprowadzono analizę i wizualizację efektu (synergia/antagonizm) badanych kombinacji leków przy użyciu modelu HSA (ang. highest single agent).^{194,195} W modelu tym wartości poniżej –5 wskazują na efekt

antagonistyczny, od -5 do 5 na efekt addytywny, natomiast powyżej 5 obserwujemy synergię działania leków.

2.3.5. Cytometria przepływowa

Pomiary na cytometrze przepływowym BD FACS Aria™ II (Becton Dickinson) wykonane zostały w Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej, dzięki uprzejmości Pani dr hab. Magdaleny Skoniecznej. W linii komórkowej HT29 dokonano analizy cyklu komórkowego, pomiaru ilości reaktywnych form tlenu (ROS) oraz określenia odsetka komórek apoptotycznych po inkubacji komórek z badanymi związkami. Komórki zawieszono w pożywce hodowlanej DMEM/F12 wysiano w ilości 100 000 na dołek. Po 24 godz. inkubacji (37°C, 5% CO₂) wymieniono medium hodowlane na świeże zawierające badane związki w odpowiednim stężeniu. Do dołków kontrolnych dodano natomiast czyste medium. Dalsze kroki postępowania dla poszczególnych rodzajów analiz opisano szczegółowo w metodach poniżej (2.3.5.1-2.3.5.3). Zastosowano stężenia poszczególnych związków równe ich wartościom IC₅₀ wyznaczonym wcześniej za pomocą testu SRB w linii komórkowej HT29. Mieszaniny związków z simwastatyną oraz betulina przygotowano tak, aby osiągały one stężenie końcowe 5 μM (analogicznie jak w kombinacji użytej w testach SRB). Analizy cytometryczne wykonano po 48 godz. inkubacji komórek ze związkami (37°C, 5% CO₂). Dodatkowo wykonano zdjęcia komórek za pomocą analizatora Juli FL (NanoEntek).

Tab. 4. Stężenia końcowe badanych związków użyte w cytometrii przepływowej.

Związek	Stężenie [μM]
FLP	20
TFP	20
IMP	200
SIM	5
BET	5

2.3.5.1. Cykl komórkowy

1. Ściągnięto medium znad komórek i umieszczono je w odpowiednio podpisanych wcześniej probówkach.
2. Do dołków dodano po 0,5 ml 1% trypsyny i inkubowano ok. 3 min. w celu oddysocjowania komórek.

3. Dodano do dołków zebrane w pkt.1 medium w celu neutralizacji trypsyny.
4. Zawartość dołków w ilości 1 ml umieszczono w probówkach i odwirowano (2 min., 25°C, 600 x g).
5. Usunięto supernatant i zawieszono otrzymany osad komórkowy w 250 µl buforu hipotonicznego (jodek propidyny 10 µg/ml, kwas cytrynowy 5 mg/l, 1:9 roztworu Triton-X, Rnaza 100 µg/ml).
6. Próbkę inkubowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej w ciemności, a następnie na lodzie do czasu pomiaru.
7. Pomiar przeprowadzono na cytometrze przepływowym BD FACS Aria™ II (Becton Dickinson). Długość fali wzbudzenia dla jodku propidyny wynosiła 547 nm, a emisji 585 nm. Analizie poddanych zostało 10 000 komórek.

2.3.5.2. Reaktywne formy tlenu

1. Do badania pobrano do eppendorfek 0,5 ml komórek przygotowanych zgodnie z pkt. 1-3 opisanymi w procedurze analizy cyklu komórkowego.
2. Dodano do nich po 10 µl sondy DCFH-DA rozcieńczonej w medium (stężenie końcowe 30 µM).
3. Próbkę inkubowano przez 20 min. w 37°C.
4. Odwirowano (3 min., 25°C, 150 x g) i zlano supernatant.
5. Otrzymany osad komórkowy zawieszono w 300 µl PBS-u i trzymano na lodzie do czasu pomiaru.
6. Pomiar przeprowadzono na cytometrze przepływowym BD FACS Aria™ II (Becton Dickinson) przy długości fali wzbudzenia 488 nm oraz emisji 530 nm. Analizie poddanych zostało 10 000 komórek.

2.3.5.3. Apoptoza

1. Do eppendorfek dodano po 1 ml komórek przygotowanych zgodnie z pkt. 1-3 opisanymi w procedurze analizy cyklu komórkowego.
2. Próbkę odwirowano (3 min., 25°C, 150 x g) i zlano supernatant.
3. Osad zawieszono w 50 µl 1x stężonego zimnego buforu wiążącego do aneksyny (10x; 0,1 M HEPES (pH 7,4); 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl₂) oraz dodano 2,5 µl skoniugowanego z FITC (izocyjanian fluoresceiny) przeciwciała wiążącego aneksynę V.

4. Do probówek dodano po 10 μ l jodku propidyny (100 μ g/ml) i inkubowano je w 37°C przez 20 min.
5. Dodano po 250 μ l buforu wiążącego do aneksyny, zamieszano i przechowywano probówki na lodzie do czasu pomiaru.
6. Pomiar przeprowadzono na cytometrze przepływowym BD FACS Aria™ II (Becton Dickinson) przy ustawieniach długości fali wzbudzenia 488 nm oraz emisji 530 nm dla FITC: oraz 547 nm i 585 nm dla PI. Analizie poddanych zostało 10 000 komórek.

2.3.6. Izolacja całkowitego RNA z komórek nowotworowych

Izolację całkowitego RNA z komórek linii HT29 i HT29/Dx przeprowadzono za pomocą zestawu E.Z.N.A.® Total RNA Kit I. Komórki poddawano lizie i homogenizacji w warunkach denaturujących dla rybonukleaz. Otrzymane RNA wiązane było w żelu krzemionkowym przy niskim pH, z którego następnie je wmywano i rozpuszczano w sterylnej wodzie zawierającej DEPC. Procedura izolacji RNA wyglądała następująco:

1. Przed rozpoczęciem procedury do buforu Wash Buffer II dodano 20 ml etanolu oraz przygotowano roztwór denaturujący zawierający β -merkptoetanol w buforze do lizy TRK (20 μ l β -merkptoetanolu na 1 ml buforu TRK).
2. Komórki wirowano (5 min., 25°C, 500 x g) i usunięto supernatant.
3. Komórki zawieszono w 350 μ l buforu TRK.
4. Za pomocą sterylnej igły (0,45 x 16) i strzykawki (2 ml) przeprowadzono homogenizację próbek.
5. Do próbek dodano 350 μ l 70% roztworu etanolu (rozcieńczonego wodą zawierającą DEPC) oraz mieszano.
6. Otrzymane roztwory nałożono na kolumny HiBind RNA umieszczone wcześniej w pustych probówkach. Próbkę odwirowano (1 min., 25°C, 10 000 x g) i usunięto supernatant.
7. Umieszczono kolumny w czystych probówkach i nałożono na nie po 500 μ l roztworu RNA Wash Buffer. Ponownie wirowano próbki (1 min., 25°C, 10 000 x g) i usunięto supernatant.
8. Nałożono na kolumny po 500 μ l roztworu RNA Wash Buffer II i ponownie zwirowano (1 min., 25°C, 10 000 x g). Krok ten wykonano dwukrotnie, za każdym razem usuwając przesącz.

9. Kolumny odwirowano ponownie w celu całkowitego wysuszenia membrany (2 min., 25°C, 14 000 x g).
10. Przeprowadzono elucję RNA przy użyciu wody z DEPC-em. Kolumny przełożono do czystych eppendorfek (2 ml) i naniesiono na nie po 40 µl wody DEPC. Kolumny odwirowano (1 min., 25°C, 10 000 x g).
11. Przeprowadzono pomiar stężenia (przy długości fali 260 nm) oraz czystości uzyskanego RNA (przy długości fali 260 nm oraz 280 nm) za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000c/2000 (Thermo Fisher Scientific). Do dalszych eksperymentów wykorzystywane były próbki RNA, dla których stosunek A260/280 wyniósł powyżej 1,8.

2.3.7. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Otrzymane w wyniku izolacji RNA rozcieńczono do stężenia 40-50 ng/µl i poddano reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) za pomocą zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fischer Scientific). Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji odwrotnej transkrypcji przedstawiono w Tab. 5.

Tab. 5. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany w reakcji odwrotnej transkrypcji.

Składnik	Objętość w próbce [µl]	Stężenie końcowe
Woda DEPC	4,6	
10x Bufor RT	2,0	1x
Inhibitor RNaz	0,5	5 U
25x dNTP Mix (100 mM)	0,4	2 mM
10x RT Random Primers	2,0	1x
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	0,5	25 U
RNA	10,0	400 ng

W termocyklerze zastosowano następujące warunki reakcji RT:

1. 10 min., 25°C – wstępna inkubacja,
2. 120 min., 37°C – elongacja,
3. 5 min., 85°C – przerwanie reakcji,
4. 4°C – schłodzenie reakcji.

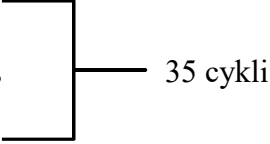
2.3.8. Łańcuchowa reakcja polimeryzacji

Otrzymane w wyniku reakcji RT cDNA poddano multipleksowej reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR) w celu oceny ekspresji dwóch genów lipogennych, kontrolowanych przez czynnik transkrypcyjny SREBP-2: reduktazy HMG-CoA oraz receptora LDR. Zastosowanym genem referencyjnym był gen kodujący β -aktynę (*actb*). Reakcję z jednoczesnym wykorzystaniem wszystkich trzech par starterów przeprowadzano z uwagi na ich podobną kinetykę reakcji oraz brak krzyżowej hybrydizacji pomiędzy oligonukleotydami (nie stwierdzono tworzenia dimerów). Zaprojektowane warunki eksperymentu pozwoliły na uniknięcie amplifikacji niespecyficzných produktów. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz przebieg reakcji PCR przedstawiono poniżej (Tab. 6):

Tab. 6. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany w reakcji łańcuchowej polimeryzacji.

Składnik	Objętość w próbce [μ l]	Stężenie końcowe
Woda miliQ	13,34	
10 \times bufor z KCl	2,50	1 \times
MgCl ₂ (25mM)	1,50	1,5 mM
dNTPmix (10mM)	0,63	0,25 mM
ACTB_for	0,13	0,20 μ M
ACTB_rev	0,13	0,20 μ M
LDLR_2_for	0,63	1 μ M
LDLR_2_rev	0,63	1 μ M
HMGCR_for	0,63	1 μ M
HMGCR_rev	0,63	1 μ M
polimeraza	0,25	1,25 U

Warunki reakcji PCR w termocyklerze:

1. 2 min., 95°C - wstępna denaturacja,
 2. 1 min., 95°C- denaturacja matrycowego DNA,
 3. 1 min., 61°C- przyłączenie starterów do matrycy DNA,
 4. 1 min., 72°C- elongacja i synteza DNA,
 5. 7 min., 72°C- końcowa elongacja,
 6. 4°C – schłodzenie reakcji.
- 

2.3.9. Elektroforeza DNA

Otrzymane w wyniku reakcji RT-PCR cDNA w objętości 20 µl przeniesiono do probówki zawierającej 4 µl barwnika DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Fischer Scientific). Roztwór delikatnie wymieszano i nałożono do dołków znajdujących się we wcześniej przygotowanym 2% żelu agarozowym zanurzonym w buforze TBE (45 mM Tris-boran, 1 mM EDTA). Elektroforezę przeprowadzono w zestawie do elektroforezy poziomej (Clever Scientific) przy napięciu 80 V. Do wizualizacji żelu użyto barwnika SYBR Safe (Invitrogen) lub SimplySafe (EURx) w objętościach zalecanych przez producentów. Zdjęcia żelu wykonano za pomocą programu Uvitec Cambridge MiniHD9. Analizę zdjęć wykonano za pomocą oprogramowania ImageJ.

2.3.10. Barwienie wolnego cholesterolu w komórkach linii HT29 za pomocą filipiny

1. Komórki HT29 nałożono na 6-dołkowe płytki w ilości 30- 60 000 komórek na dołek w objętości 2 ml na umieszczone w dołku szkiełko nakrywkowe. Płytki inkubowano przez 24 godz. w inkubatorze (37°C, 5% CO₂)
2. Usunięto medium znad komórek i dodano świeże medium zawierające związki. W kontrolach wymieniono medium na świeże. Komórki inkubowano przez 48 godz. (37°C i 5% CO₂).
3. Dołki przemyto trzykrotnie za pomocą roztworu PBS.
4. Dodano 2% roztwór paraformaldehydu i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej w celu utrwalenia komórek.
5. Ponownie przepłukano dołki trzykrotnie za pomocą roztworu PBS.
6. Do dołków dodano po 1 ml 20 mM roztworu glicyny w PBS i inkubowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej.
7. Dodano 1 ml roztworu filipiny III (50 µg/ml) i inkubowano przez 2 godz. w temperaturze pokojowej.

8. Ponownie przepłukano dołki trzykrotnie za pomocą roztworu PBS.
9. Uzyskany preparat nałożono delikatnie na szkiełko podstawowe i uszczelniono je za pomocą utrwalacza. Komórki oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Nikon Eclipse TE2000-E) w powiększeniu 40x (obiektyw Plan Fluor, NA=0,6) lub 100x (obiektyw PlanApo Chromat, NA=1,4). Zakres światła wzbudzającego mieścił się w zakresie 340-380 nm, emitowane przez próbki światło mierzono w zakresie 435-485 nm.
10. Otrzymane zdjęcia analizowano za pomocą oprogramowania Nikon (EZ-C1 i NIS ELEMENTS C A).

2.3.11. Elektroformacja

Ogromne jednowarstwowe liposomy (GUV) otrzymano metodą elektroformacji przy użyciu urządzenia Vesicle Prep Pro (Nanon Technologies). Roztwory wyjściowe lipidów (stężenie 0,6 mM) oraz barwnik karbocyjaninowy (DiIC₁₂(3)) (stężenie 0,3 mM) przygotowano w chloroformie, natomiast roztwory badanych związków (stężenie 2,5 mM) w etanolu. W celu uzyskania modelu błony lipidowej o składzie zbliżonym do tratw lipidowych występujących w błonach naturalnych (ang. *raft mimicking mixtures*) użyto trzech lipidów: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocholiny (DOPC), cholesterolu (Chol) i sfingomieliny (SM). Do równomolowej mieszaniny lipidów DOPC:Chol:SM (1:1:1) dodano barwnik fluorescencyjny (stężenie końcowe barwnika 0,1%) oraz odpowiednią ilość badanego związku (tak aby otrzymać stężenie 100 μM). Uzyskany roztwór nałożono w objętości 20 μl na przewodzącą stronę szkiełka ITO i odparowano rozpuszczalniki pod próżnią przez 1 godz. Następnie, uzyskany film lipidowy uwodniono 220 μl wody miliQ (dla pierścienia O-ring, 16x1 mm) i poddano elektroformacji w komorze Vesicle Prep Pro. Elektroformację przeprowadzono przy użyciu prądu o napięciu 3 V i częstotliwości 10 Hz przez 1 godz. Temperatura w komorze wynosiła 50°C (około 10°C wyższa od temperatury głównej przemiany fazowej lipidu o najwyższej temperaturze topnienia). Następnie temperaturę w komorze stopniowo zmniejszano do osiągnięcia temperatury pokojowej.

2.3.12. Mikroskopia fluorescencyjna

Otrzymane w wyniku elektroformacji liposomy obserwowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon Eclipse TE2000-E) w powiększeniu 40x (obiektyw Plan Fluor, NA=0,6). Liposomy znakowano lipofilnym barwnikiem karbocyjaninowym: DiIC₁₂(3). Zakres światła wzbudzającego mieścił się w zakresie 528-553 nm, natomiast emitowane przez próbki

światło fluorescencyjne mierzono w zakresie 565-605 nm. Uzyskane zdjęcia liposomów poddano analizie za pomocą oprogramowania Nikon (EZ-C1 i NIS ELEMENTS C A). Powierzchnie domen zmierzono zgodnie z metodą opisaną przez Juhasza i in. (2009)¹⁹⁶. W celu porównania różnic wyników uzyskanych dla próby kontrolnej i prób zmodyfikowanych związkiem wykonano test U Manna-Whitney'a. Wyniki uznano za istotne, jeśli $p < 0,05$.

2.3.13. Obliczenia fizykochemiczne i modelowanie molekularne

Do obliczenia deskryptorów molekularnych opisujących badane związki użyto oprogramowania Titan 1.0.8 (Wavefunction, Inc. & Schrodinger, Inc.). W programie wykorzystano zaimplementowaną metodę teorii struktury elektronowej: metodę półempiryczną AM1. Metoda ta wykorzystuje w swoich obliczeniach parametry uzyskane doświadczalnie.

Za pomocą dostępnego online programu OSIRIS (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>, Thomas Sander, Idorsia Pharmaceuticals) zbadano potencjał farmakologiczny badanych związków. W wyniku obliczeń otrzymano współczynnik lekopodobieństwa – DS (ang. *drug score*). DS oszacowany był poprzez obliczenie właściwości fizykochemicznych istotnych dla leków, takie jak: rozpuszczalność (wyrażona jako logS), TPSA (topologiczne pole powierzchni polarnej) czy liczba akceptorów i donorów wiązania wodorowego.

Serwer i baza danych PerMM (<https://permm.phar.umich.edu/server>, University of Michigan) posłużyły do ilościowej analizy i wizualizacji pasywnego przenikania aktywnych biologicznie związków przez modelowe błony lipidowe. W programie użyto opcji globalnej optymalizacji rotacyjnej (ang. *global rotational optimization*). Transfer energii w odniesieniu do zmiennych rotacyjnych cząsteczki w każdym punkcie (z) odbywał się wzdłuż normalnej błony.

2.3.14. Mikrokalorymetria

W celu zbadania wpływu betuliny i jej pochodnych (B1, B2) na termotropowe właściwości modelowej dwuwarstwy lipidowej wykorzystano technikę różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Do uformowania układów modelowych użyto dwóch fosfolipidów różniących się długością łańcuchów węglowodorowych: DPPC (16 atomów C) oraz DMPC (14 atomów C). Roztwory wyjściowe (5 mM) betuliny i pochodnej B2 przygotowano w metanolu, a pochodnej B1 w chloroformie. Dla każdej próbki odważano 3 mg lipidu i dodawano odpowiedniej ilości roztworów wyjściowych w celu otrzymania wybranych stosunków molowych związku do lipidu (0,02; 0,04; 0,06 oraz 0,08). Próbki mieszano, a następnie

odparowywano rozpuszczalnik pod strumieniem azotu. W celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika próbki umieszczono na 2 godz. pod próżnią. Następnie, otrzymany film lipidowy uwadniano za pomocą 15 μl buforu Tris-HCl (20 mM Tris; 0,5 mM EDTA; 150 mM NaCl; pH 7,4), mieszano i ogrzewano do temperatury 50°C. Uzyskany roztwór umieszczano w aluminiowym naczynku i szczelnie zamykano. Pomiary wykonano na mikrokalorymetrze Rigaku (Rigaku, Japonia) z prędkością skanowania 1,25°C/min. Każda próbka skanowana była co najmniej czterokrotnie, a dla każdego badanego stosunku molowego przygotowano minimum dwie niezależne próbki. Otrzymane termogramy analizowano za pomocą oprogramowania opracowanego w naszym laboratorium.

2.3.15. Spektrofluorymetria

Zmiany anizotropii fluorescencji badano przy użyciu sond fluorescencyjnych TMA-DPH (1-(4-trójmetylamino),6-difenylo-1,3,5-heksatrien) oraz DPH ((1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien), lokalizujących się w różnych rejonach błony lipidowej. Fluorofor pierwszej z sond lokuje się w rejonie główek polarnych fosfolipidu, podczas gdy DPH oddziałuje z błoną w pobliżu hydrofobowych łańcuchów węglowodorowych. Ponadto badano wartości uogólnionej polaryzacji (GP) sondy Laurdan (2-(dimetyloamino)-6-dodekanyloaftalen) sytuującej się w obszarze główek polarnych lipidów. W celu otrzymania jednowarstwowych liposomów przygotowano roztwór lipidu DPPC w buforze Tris-NaCl (20 mM Tris; 0,5 mM EDTA; 150 mM NaCl; pH 7,4) o stężeniu 2 mM i poddano procedurze sonikacji za pomocą sonikatora UP200s (Dr.Hilscher). Stężenie liposomów w kuwecie pomiarowej wynosiło 200 μM . Roztwory wyjściowe badanych związków (5 mM) przygotowano w DMSO. Szerokość szczeliny ustawiona dla wszystkich pomiarów wynosiła 2,5 nm. Roztwory wyjściowe sond fluorescencyjnych TMA-DPH (1 mM) oraz Laurdan (1 mM) przygotowano w DMSO, natomiast DPH (1 mM) w tetrahydrofuranie.

W badaniu anizotropii fluorescencji stężenie końcowe sond TMA-DPH oraz DPH wynosiło 5 μM . Pomiary prowadzono w temperaturze poniżej (22°C) oraz powyżej głównego przejścia fazowego (50°C) lipidu DPPC. Zakres badanych stężeń związków wynosił od 10 do 100 μM . Liposomy inkubowano wraz z użytą sondą przez 20 min. w ciemności, w temperaturze pokojowej. Następnie, dodawano odpowiednią ilość związku i inkubowano roztwór kolejne 20 min. Pomiary wykonywano przy następujących ustawieniach długości fali wzbudzenia i emisji: dla TMA-DPH odpowiednio 360 nm i 428 nm, dla DPH 380 nm oraz 450 nm. Do badań wykorzystywano spektrofluorymetr LS50B (Perkin Elmer). Szerokość szczeliny ustawiona dla

wszystkich pomiarów wynosiła 2,5 nm. Anizotropię fluorescencji danego znacznika obliczono według wzoru:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

gdzie: I_{\parallel} , I_{\perp} oznaczają natężenie światła emitowanego przechodzącego przez analizator, ustawiony odpowiednio równoległe i prostopadłe do kierunku polaryzacji światła wzbudzającego.

Pomiary zmian polaryzacji uogólnionej (GP) Laurdanu przeprowadzono przy użyciu stężenia sondy 1 μM . Roztwór liposomów inkubowano ze znacznikiem przez 15 min. w ciemności, w temperaturze pokojowej. Następnie, dodano badanego związku o stężeniu 25 μM i inkubowano w tych samych warunkach przez kolejne 30 min. Pomiary prowadzono w zależności od temperatury (24 – 58°C) za pomocą spektrofluorymetru LS50B (Perkin Elmer). Długości fali wzbudzenia wynosiła 390 nm, a szerokość szczeliny 2,5 nm. Widma analizowano za pomocą oprogramowania FLDM Perkin-Elmer 2000. Wartość GP obliczono według wzoru:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R}$$

gdzie: I_B , I_R oznaczają natężenie fluorescencji odpowiednio przy długości fali emisji 440 oraz 490 nm.

2.3.16. Analiza statystyczna

Opisane w metodologii eksperymenty powtarzano przynajmniej 3-krotnie (tzn. przygotowano minimum 3 niezależne próbki). Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne i odpowiadające im odchylenia standardowe. W celu określenia istotności wyników zastosowano Test Studenta dla prób niezależnych. W przypadku pomiarów ilości i powierzchni domen liposomów obserwacje zaprezentowano za pomocą mediany oraz pierwszego i trzeciego kwartyłu. W celu porównania różnic wyników uzyskanych dla próby kontrolnej i prób zmodyfikowanych związkiem wykonano test U Manna-Whitney'a. Do analiz statystycznych posłużono się programem Statistica 13. Wyniki uznano za istotne, jeśli $p < 0,05$.

3. Wyniki

3.1. Określenie aktywności cytotoksycznej względem linii HT29 i HT29/Dx

Pierwszym etapem badań była identyfikacja związków o aktywności przeciwnowotworowej spośród grupy leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych oraz innych związków wielopierścieniowych. W tym celu wykorzystano ludzkie linie komórkowe: gruczolakoraka jelita grubego HT-29, jej częściowo oporną na doksorubicynę sublinię HT29/Dx oraz linię gruczolakoraka okrężnicy COLO205. Wymienione powyżej linie komórkowe zostały wybrane jako układy modelowe w badaniach *in vitro*, ponieważ zmiany w poziomie stężenia cholesterolu są wymieniane wśród czynników wpływających na ryzyko wystąpienia raka jelita grubego¹⁹⁷⁻¹⁹⁹, ponadto w jelicie wytwarzane są również jego znaczne ilości.

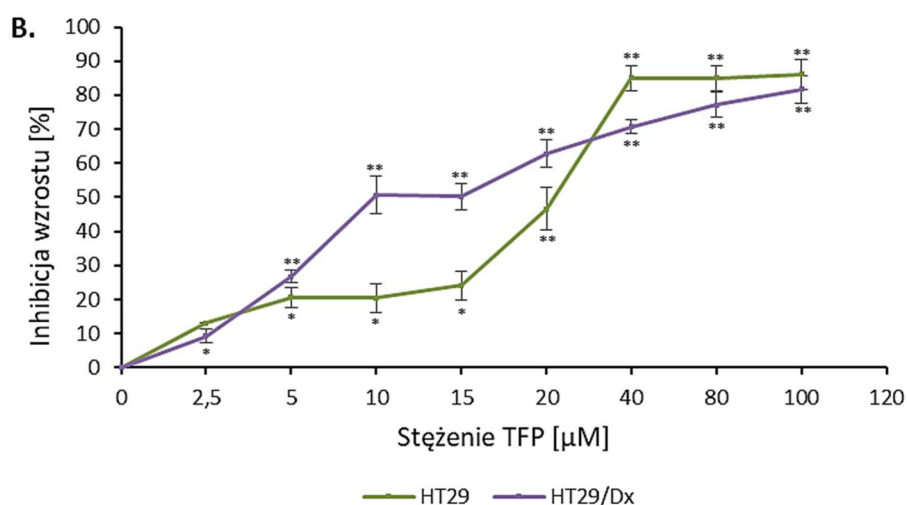
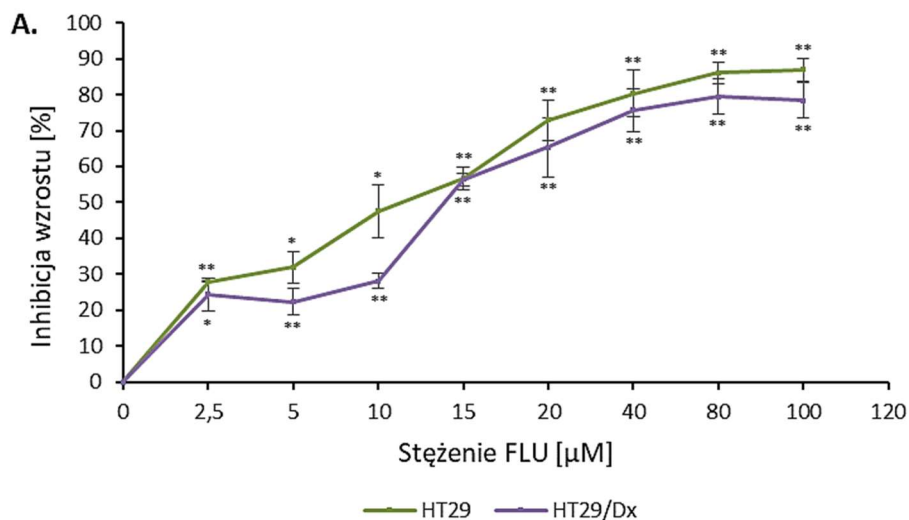
Aktywność cytotoksyczną badanych związków względem linii HT29 oraz odpornej na działanie doksorubicyny linii HT29/Dx oznaczono za pomocą testu SRB. Metoda ta polega na spektrofotometrycznym oznaczeniu ilości białka w komórce poprzez związanie go z anionowym barwnikiem – sulforodaminą B. Ilość białka w badanej próbce jest wprost proporcjonalna do ilości żywych komórek w hodowli. Dla każdego związku wyznaczono parametr IC_{50} (ang. *inhibitory concentration – 50%*), który oznacza stężenie związku potrzebne do zahamowania proliferacji komórek w 50% w stosunku do próby kontrolnej (komórki nietraktowane związkiem). W celu lepszego zobrazowania przebiegu zmian cytotoksyczności w zależności od stężenia związku wyznaczono również wartości IC_{25} i IC_{10} , czyli stężenia powodujące zahamowanie wzrostu komórek odpowiednio w 25 i 10%. Wszystkie parametry zostały obliczone za pomocą programu CompuSyn. Wartości te zaprezentowano w Tab. 7. Dla każdego badanego stężenia wykonano 5 powtórzeń, z których obliczano średnią oraz odchylenie standardowe. Zastosowane stężenia związków wynosiły od 0 do 200 μ M, natomiast w przypadku RIS i ZIP od 0 do 1000 μ M. Każde doświadczenie powtarzano co najmniej 3-krotnie.

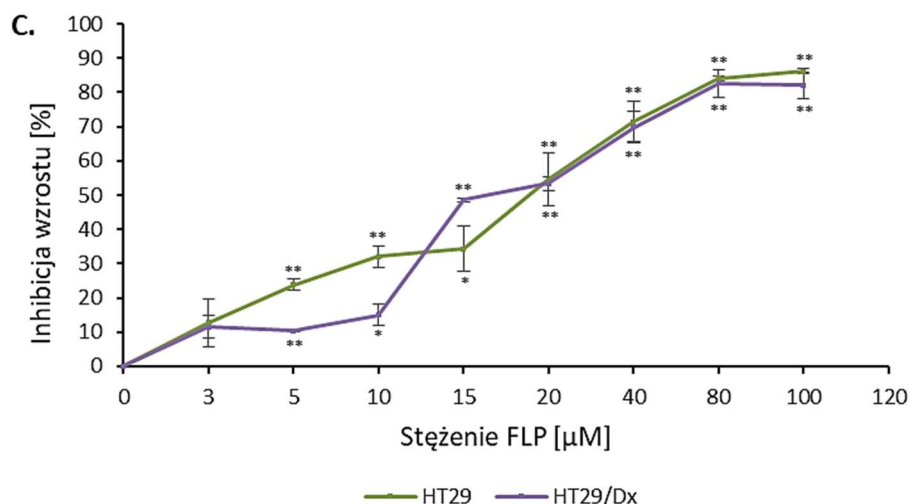
Tab. 7. Wartości IC₁₀, IC₂₅, IC₅₀ badanych związków względem linii HT29 oraz HT29/Dx.

	HT29			HT29/Dx		
	IC ₁₀ [μM]	IC ₂₅ [μM]	IC ₅₀ [μM]	IC ₁₀ [μM]	IC ₂₅ [μM]	IC ₅₀ [μM]
KLZ	1,59 ± 0,24	6,40 ± 2,75	41,81 ± 6,60	3,27 ± 0,93	10,85 ± 3,13	36,25 ± 11,49
QTP	7,56 ± 1,13	22,12 ± 5,15	89,12 ± 15,11	5,53 ± 1,42	21,36 ± 4,37	88,46 ± 2,64
OLZ	2,62 ± 0,78	21,94 ± 0,84	> 100	4,12 ± 1,85	25,37 ± 7,44	176,58 ± 3,66
IMP	2,28 ± 0,94	15,28 ± 8,50	> 100	2,62 ± 1,55	19,18 ± 2,57	88,36 ± 10,22
LOR	1,95 ± 1,53	5,97 ± 3,42	19,24 ± 6,29	0,58 ± 0,06	6,93 ± 3,27	40,25 ± 9,75
PFA	0,51 ± 0,20	1,92 ± 0,44	7,56 ± 2,33	0,66 ± 0,65	2,66 ± 2,45	11,23 ± 8,70
FLU	0,79 ± 0,21	2,66 ± 0,44	9,01 ± 1,41	0,82 ± 0,18	3,18 ± 0,63	12,45 ± 3,45
PCZ	1,11 ± 0,09	3,50 ± 0,23	11,07 ± 1,53	0,87 ± 1,32	2,65 ± 2,84	11,22 ± 3,51
TFP	4,21 ± 2,31	9,41 ± 3,79	21,37 ± 5,54	1,57 ± 1,51	4,95 ± 3,97	13,88 ± 2,28
FLP	3,15 ± 1,76	7,74 ± 2,89	19,56 ± 3,48	3,70 ± 1,01	9,23 ± 2,12	23,13 ± 5,20
THX	0,65 ± 0,02	2,32 ± 0,34	8,38 ± 2,67	2,55 ± 0,12	6,25 ± 0,14	15,36 ± 1,40
RIS	21,36 ± 12,21	58,04 ± 25,73	161,14 ± 31,63	17,19 ± 10,91	65,32 ± 24,88	295,67 ± 76,52
LUR	14,65 ± 5,72	41,18 ± 8,11	110,17 ± 27,65	2,81 ± 0,85	12,88 ± 0,82	60,81 ± 10,91
ZIP	52,76 ± 22,27	268,75 ± 102,42	> 500	57,16 ± 24,30	346,47 ± 60,43	> 500
SN-38	< 1,0E-05	< 1,0E-05	1,41E-04 ± 9,4E-05	< 1,0E-05	< 1,0E-05	0,20 ± 0,02
SIM	5,49 ± 4,35	12,47 ± 6,63	31,64 ± 10,34	5,35 ± 4,21	14,48 ± 6,04	45,25 ± 18,25
BET	3,74 ± 1,16	13,11 ± 0,77	32,85 ± 12,04	6,71 ± 0,33	17,42 ± 4,72	47,64 ± 23,69

Uzyskane wyniki wskazują na spadek przeżywalności komórek wraz ze wzrostem użytego stężenia badanych związków. Większość leków wykazała się średnią toksycznością względem komórek nowotworowych linii HT29 i HT29/Dx. Ich wartości IC₅₀ mieściły się w zakresie od 7 do 100 μM. Najslabszą aktywność cytotoksyczną wykazały ZIP oraz RIS, których wartość IC₅₀ wynosiła ponad 150 μM dla obu badanych linii. Niską toksycznością dla komórek linii

HT29 oraz HT29/Dx charakteryzowały się również IMP, QTP oraz OLZ. Stężenie IC_{50} wynosiło w ich przypadku ponad $80 \mu\text{M}$. Zgodnie z oczekiwaniami, najwyższą aktywnością cytotoksyczną wykazał się lek przeciwnowotworowy SN-38, którego wartość IC_{50} dla linii HT29 wynosiła $1,41\text{E}-04 \mu\text{M}$ oraz $0,20 \mu\text{M}$ dla HT29/Dx. Spośród związków należących do grupy leków przeciwpsychotycznych najsilniejszą toksycznością względem komórek linii komórkowej HT29 wykazały się FLU, PFA, PCZ oraz THX, dla których wartości parametru IC_{50} były mniejsze niż $12 \mu\text{M}$. Dla linii HT29/Dx zaobserwowano niższą bądź taką samą aktywność cytotoksyczną większości badanych związków. Wyjątki stanowiły LUR oraz TFP, dla których większą aktywność zaobserwowano w linii odpornej na dokсорubicynę – HT29/Dx. W porównaniu z powszechnie stosowanymi w terapiach nowotworowych cytostatykami badane związki posiadały znacznie niższą aktywność przeciwnowotworową, jednakże była ona znacząca.





Rys. 4. Inhibicja wzrostu komórek linii HT29 oraz HT29/Dx w zależności od stężenia FLU (A), TFP (B) i FLP (C). Wyniki istotne statystycznie względem kontroli oznaczono: *($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

3.2. Określenie aktywności cytotoksycznej względem linii COLO205

Cytotoksyczność wybranych związków scharakteryzowano także wobec komórek gruczolakoraka okrężnicy linii COLO205. Dla komórek tej linii zastosowano test MTT, ponieważ komórki te rosną zarówno w układzie jednowarstwowym (ang. *monolayer*), jak i w zawiesinie. Zastosowany test pozwolił uniknąć nadmiernej utraty komórek podczas płukania kwasem octowym, co miałyby miejsce w przypadku użycia testu SRB. Zakres użytych stężeń badanych związków wynosił od 0 do 200 μM . Dla każdego badanego stężenia wykonano 5 powtórzeń, z których obliczano średnią oraz odchylenie standardowe. Każdy eksperyment powtarzano co najmniej 3-krotnie. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tab. 8.

Tab. 8. Wartości IC₁₀, IC₂₅ i IC₅₀ dla linii komórkowej COLO205 uzyskane za pomocą testu MTT.

Związek	IC ₁₀ [μM]	IC ₂₅ [μM]	IC ₅₀ [μM]
KLZ	10,10 ± 2,61	19,81 ± 2,58	36,10 ± 0,44
IMP	7,25 ± 2,01	15,64 ± 3,40	34,05 ± 7,01
FLU	0,97 ± 0,01	2,68 ± 0,45	7,46 ± 2,52
TFP	0,39 ± 0,06	1,52 ± 0,24	4,91 ± 0,06
FLP	2,86 ± 0,28	5,78 ± 0,26	11,68 ± 0,12
RIS	18,89 ± 3,96	49,65 ± 12,96	237,35 ± 24,76
SIM	1,72 ± 0,27	5,74 ± 0,28	24,60 ± 6,27
BET	4,67 ± 0,29	13,26 ± 2,05	37,78 ± 9,40
B1	0,12 ± 0,08	0,43 ± 0,23	1,57 ± 0,68
B2	20,37 ± 4,85	35,33 ± 6,71	61,26 ± 9,34

W przypadku linii nowotworowej COLO205 najwyższą aktywnością cytotoksyczną wykazała się pochodna B1 oraz TFP (IC₅₀ < 5 μM). Stosunkowo wysoką toksycznością posiadały również FLU i FLP (IC₅₀ < 12 μM). Najniższą aktywnością wykazał się RIS (IC₅₀ powyżej 100 μM). Związek ten posiadał również niską wartość stężenia hamującego wzrost komórek linii HT29.

Jeżeli porównamy cytotoksyczność poszczególnych związków wobec komórek linii COLO205 i HT29, to stwierdzimy, że dla wszystkich badanych leków była ona wyższa wobec komórek COLO205. Jedynym wyjątkiem był RIS, który był najmniej cytotoksycznym związkiem spośród wszystkich badanych. Stężenie hamujące wzrost komórek o 50% nieznacznie zmieniło się przy zmianie linii komórkowej dla FLU, FLP, KLZ oraz SIM. Największe różnice zaobserwowano dla TFP, dla którego wartość IC₅₀ była 4-krotnie wyższa wobec komórek linii HT29 niż komórek COLO205.

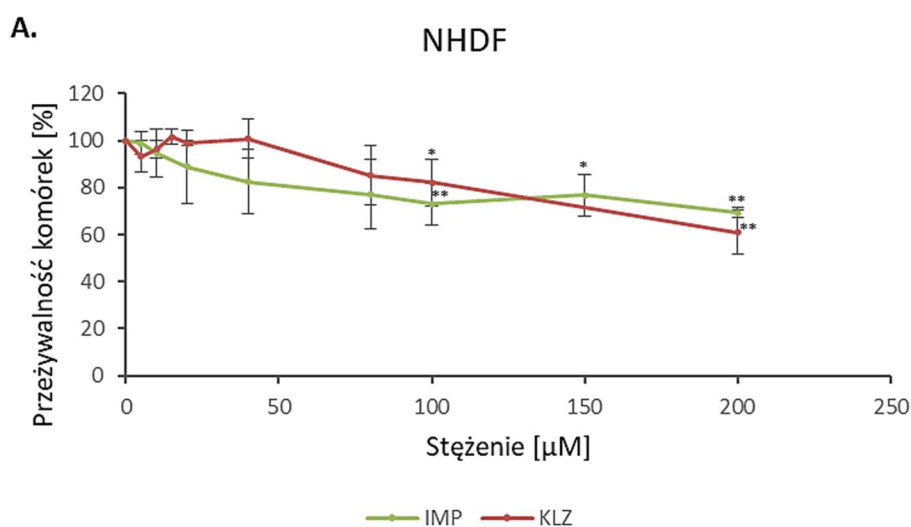
3.3. Określenie aktywności cytotoksycznej względem komórek linii prawidłowych

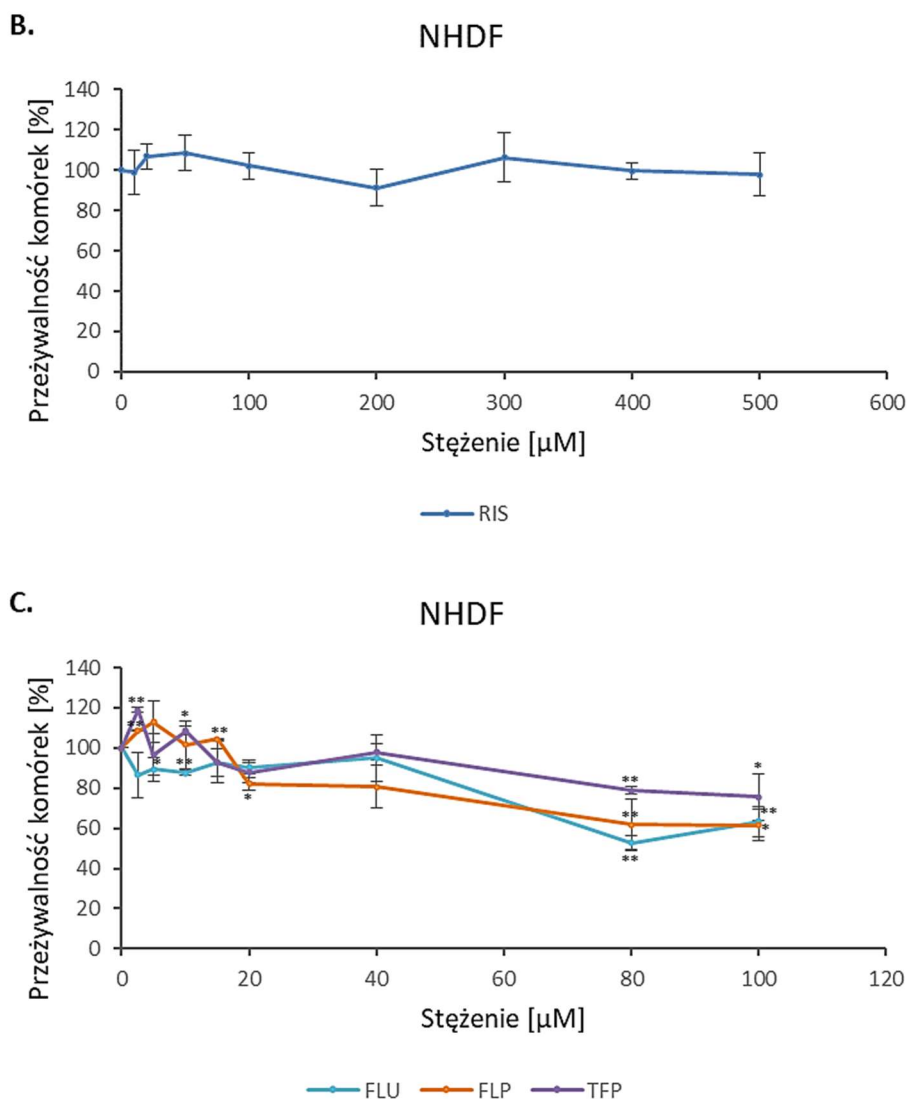
Aby określić selektywność wybranych związków wobec komórek nowotworowych przeprowadzono ocenę ich aktywności cytotoksycznej w dwóch liniach komórek prawidłowych: fibroblastów skóry ludzkiej (NHDF) oraz komórek ludzkiego nabłonka jelita grubego (FHC). Ekspozycja na wybrane leki przeciwpsychotyczne nie spowodowała wyraźnego spadku ich przeżywalności. Uzyskane wartości IC₅₀ zaprezentowano w Tab. 9.

Zaobserwowano wysoką przeżywalność komórek linii NHDF, gdzie stężenie IC₅₀ dla wszystkich badanych związków wynosiło ponad 100 μM. Najniższą toksycznością wykazały się RIS oraz TFP. Dla RIS przeżywalność komórek NHDF przy najwyższym zastosowanym stężeniu spadła zaledwie o około 10% (Rys. 5B). W przypadku TFP przy stężeniu 100 μM zaobserwowano około 20% spadek żywotności komórek względem kontroli (Rys. 5C). Dla pozostałych związków: FLU, FLP, IMP oraz KLZ przy najwyższych zastosowanych stężeniach zaobserwowano spadek przeżywalności komórek o 30-40% (Rys. 4A,C).

Tab. 9. Wartości IC₅₀ dla linii komórkowych NHDF oraz FHC uzyskane za pomocą testu SRB

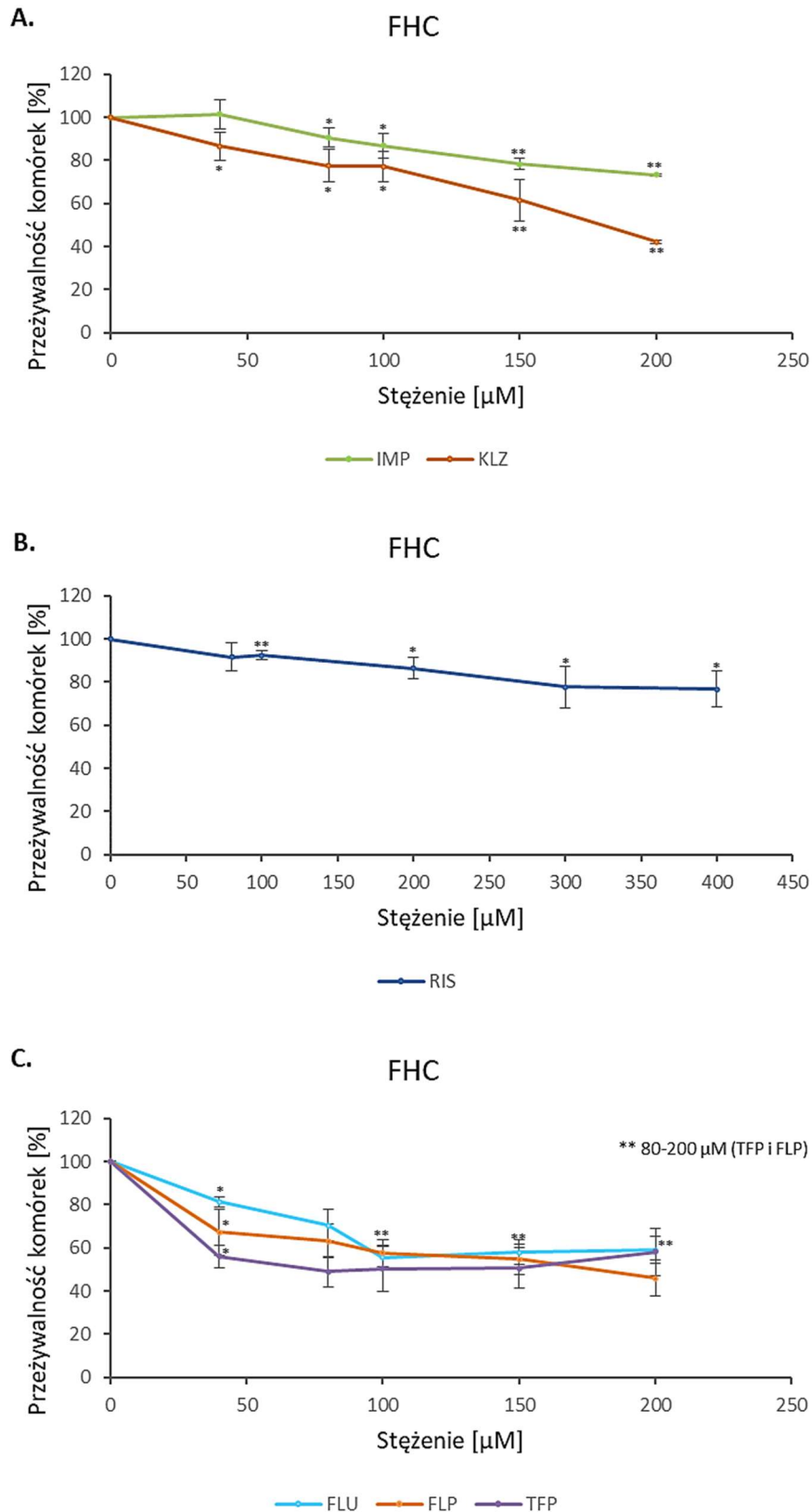
	NHDF	FHC
	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]
KLZ	585,11 ± 133,315	183,85 ± 29,15
IMP	> 300	286,58 ± 1,76
FLU	286,64 ± 64,06	35,06 ± 3,95
TFP	> 1 000	135,34 ± 36,54
FLP	> 100	> 80
RIS	> 10 000	> 4 000





Rys. 5. Przeżywalność komórek prawidłowych linii NHDF w zależności od stężenia IMP i KLZ (A), RIS (B) oraz od stężenia FLU, FLP i TFP (C). Wyniki istotne statystycznie względem kontroli oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

W przypadku linii prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego FHC badane związki wykazały niską aktywność cytotoksyczną, była ona jednak wyższa niż dla linii NHDF. Najwyższą aktywność hamującą przeżywalność komórek FHC posiadała FLU (Rys. 6C). Pozostałe związki posiadały IC_{50} mieszczące się w zakresie 80-300 μM i charakteryzowały się słabą toksycznością względem tej linii (Rys. 6A-B, Tab. 9). RIS był najmniej aktywnym lekiem, jego wartość IC_{50} oszacowano na ponad 4000 μM .



Rys. 6. Przeżywalność komórek prawidłowych linii FHC w zależności od stężenia (A) IMP i KLZ, (B) RIS oraz (C) od stężenia FLU, FLP i TFP. Wyniki istotne statystycznie względem kontroli oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

W celu sprawdzenia selektywności badanych związków, czyli ich zdolności do hamowania proliferacji komórek nowotworowych, przy jednoczesnym braku wpływu na komórki prawidłowe można posłużyć się indeksem selektywności (SI, ang. *selectivity index*), wyrażonym wzorem:

$$SI = \frac{IC_{50}(\text{komórki prawidłowe})}{IC_{50}(\text{komórki nowotworowe})}$$

Przyjmuje się, że jeśli wartość tego parametru jest wyższa od 3, to związek ma wysoki potencjał do bycia selektywnym względem komórek nowotworowych.^{200–202} SI jest ważną wartością predykcyjną w kontekście potencjalnego zastosowania związków w terapii nowotworowej. Wyniki obliczeń wartości SI dla wybranych związków przedstawiono w Tab. 10. W przypadku związków dla których nie udało się precyzyjnie wyznaczyć wartości IC_{50} do obliczenia parametru SI przyjmowano najniższą oszacowaną wartość (np. dla $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$, przyjęto $100 \mu\text{M}$).

Tab. 10. Wartości indeksu selektywności (SI) otrzymane dla wybranych leków w linii prawidłowej NHDF oraz FHC względem badanych linii nowotworowych HT29, HT29/Dx oraz COLO205.

	NHDF			FHC		
	SI _{HT29}	SI _{HT29/Dx}	SI _{COLO205}	SI _{HT29}	SI _{HT29/Dx}	SI _{COLO205}
FLU	31,81	23,02	22,27	21,86	15,82	15,31
FLP	> 5,11	> 4,32	> 8,56	4,09	3,46	> 6,85
IMP	> 3,00	> 3,40	> 8,81	> 2,87	3,24	8,42
KLZ	13,99	16,14	16,21	4,40	5,07	5,09
RIS	> 10,00	> 10,00	> 10,00	24,82	13,53	> 69,04
TFP	> 10,00	> 10,00	> 10,00	6,33	9,75	27,57

Wartości SI otrzymane dla linii NHDF wskazują, że wszystkie badane związki wykazują selektywność względem komórek badanych linii nowotworowych. Jeżeli chodzi o wyniki

parametru SI wyliczone wobec linii FHC, również otrzymano wartości wskazujące na selektywność badanych związków wobec linii nowotworów jelita grubego i okrężnicy. Wyjątek stanowiła IMP wobec linii HT29, natomiast w przypadku IMP i FLP w linii HT29/Dx parametr SI przyjmował wartości bliskie 3. Powyższe wyniki pozwalają nam wnioskować, iż badane leki posiadają zdolność do selektywnego hamowania wzrostu komórek nowotworowych, w małym stopniu wpływając na komórki nienowotworowe. Najsilniejszą selektywność związków wykazano względem linii COLO205. Szczególnie wysokie wartości indeksu selektywności wykazały FLU, RIS oraz TFP, wykazujące nawet 10-krotnie wyższą toksyczność względem komórek rakowych w linii COLO205 niż nienowotworowych.

3.4. Aktywność cytotoksyczna w kombinacji z simwastatyną

Kolejnym etapem pracy było określenie cytotoksyczności badanych leków wobec badanych linii RJG w połączeniu z lekiem hamującym biosyntezę cholesterolu, simwastatyną. Terapia lekowa wykorzystująca kombinację związków o różnych mechanizmach działania może wzmocnić działanie przeciwnowotworowe i zmniejszyć negatywne skutki leczenia, przez zmniejszenie dawki terapeutyków. Wcześniejsze badania wykonane w naszym zespole wykazały, że policykliczne związki chemiczne z grupy oksykamów, flawonoidów oraz fenotiazyn w połączeniu ze statynami (simwastatyna, mewastatyna) wykazywały wyższą aktywność antyproliferacyjną i proapoptotyczną względem linii raka jelita grubego LoVo oraz jej odpornej linii LoVo/Dx.^{179,203,204}

W celu zbadania połączonego wpływu leków przeciwpsychotycznych oraz SIM na komórki RJG (HT29, HT29/Dx oraz COLO205) wykonano testy cytotoksyczności w zależności od stężenia badanych leków w obecności SIM (o stężeniu końcowym 5 μM). SIM użyta w tym stężeniu powodowała zmniejszenie przeżywalności komórek o około 10%, z wyjątkiem linii COLO205, gdzie była nieco bardziej toksyczna. Stężenie związków mieściło się w zakresie od 2,5 do 100 μM z wyjątkiem RIS, przy którym użyto zakresu stężeń 50-500 μM . Komórki nowotworowe inkubowano z badanymi związkami przez 48 godz. W Tab. 11 przedstawiono wartości IC_{50} wyznaczone dla badanych kombinacji leków w liniach komórkowych HT29 oraz HT29/Dx i zestawiono je z wynikami uzyskanymi dla leków stosowanych samodzielnie. W przypadku OLZ i IMP w linii HT29 oraz ZIP w obu badanych linach nie udało się w sposób precyzyjny wyznaczyć wartości IC_{50} , dlatego też w tabeli zaprezentowano wartości IC_{25} . W większości przypadków simwastatyna nie zwiększała cytotoksyczności badanych leków, zarówno w przypadku komórek linii HT29, jak i HT29/Dx. Zaobserwowano jednak, że IMP,

TFP i FLP wykazywały silniejsze działanie wobec obu badanych linii RJG w obecności stosowanego inhibitora syntezy cholesterolu (niższe IC_{50} w kombinacji z SIM niż w monoterapii). Leki te zostały wybrane do dalszych badań obejmujących wpływ na cykl komórkowy, zdolność do indukcji apoptozy, jako że potencjalnie mogłyby one wykazywać działanie synergistyczne z SIM. Dodatkowo do badanej grupy dołączono FLU (pochodna fenotiazyny), KLZ (pochodna dibenzodiazepiny) oraz RIS (pochodna benzoksazolu) jako przedstawicieli neuroleptyków różnych generacji.

Tab. 11. Wartości IC_{50} [μ M] badanych związków wyznaczone bez i w obecności SIM (stężenie końcowe 5 μ M) w liniach HT29 oraz HT29/Dx.

Związek	HT29		HT29/Dx	
	bez SIM	+ 5 μ M SIM	bez SIM	+ 5 μ M SIM
KLZ	41,81 \pm 6,60	62,83 \pm 2,24	36,25 \pm 11,49	63,35 \pm 9,98
QTP	89,12 \pm 15,11	111,59 \pm 26,53	88,46 \pm 2,64	112,22 \pm 17,75
OLZ	21,94 \pm 0,84 ^a	39,41 \pm 3,10^a	25,37 \pm 7,44 ^a	19,65 \pm 7,29^a
	>100	117,00 \pm 29,74	176,58 \pm 3,66	107,60 \pm 38,93
IMP	15,28 \pm 8,50 ^a	3,44 \pm 0,68^a	19,18 \pm 2,57 ^a	15,20 \pm 5,27^a
	>100	15,97 \pm 1,84	88,36 \pm 10,22	40,92 \pm 15,54
LOR	19,24 \pm 6,29	40,19 \pm 9,94	40,25 \pm 9,75	55,57 \pm 15,21
PFA	7,56 \pm 2,33	7,92 \pm 2,17	11,23 \pm 8,70	10,40 \pm 1,99
FLU	9,01 \pm 1,41	16,46 \pm 5,93	12,45 \pm 3,45	12,99 \pm 0,21
PCZ	11,07 \pm 1,53	19,93 \pm 4,90	11,22 \pm 3,51	21,68 \pm 3,57
TFP	21,37 \pm 5,54	7,81 \pm 1,42	13,88 \pm 2,28	12,79 \pm 2,55
FLP	19,56 \pm 3,48	11,48 \pm 2,47	23,13 \pm 5,20	8,60 \pm 1,63
THX	8,38 \pm 2,67	17,61 \pm 1,12	15,36 \pm 1,40	15,93 \pm 4,87
RIS	161,14 \pm 31,63	247,90 \pm 16,33	295,67 \pm 76,52	442,02 \pm 107,64
LUR	110,17 \pm 27,65	268,97 \pm 78,38	60,81 \pm 10,91	126,15 \pm 8,45
ZIP	268,75 \pm 82,42 ^a	450,67 \pm 112,46 ^a	346,47 \pm 60,43 ^a	543,23 \pm 128,58 ^a
SN-38	1,41E-04 \pm 9,4E-05	5,58 \pm 1,58	0,20 \pm 0,02	5,34 \pm 1,53
BET	32,85 \pm 12,04	129,07 \pm 34,93	47,64 \pm 23,69	38,24 \pm 9,07

^a wartości IC₂₅; podano je w przypadkach, w których nie udało się dokładnie wyznaczyć wartości IC₅₀; pogrubioną czcionką zaznaczono wartości w których dodanie SIM spowodowało istotną statystycznie (p < 0,05) zmianę wartości inhibicji IC₅₀ lub IC₂₅ dla badanych związków.

Dla wybranych leków przebadano również aktywność cytotoksyczną w obecności 5 μM SIM w linii komórkowej COLO205. Wartości IC₅₀ uzyskane w obecności SIM oraz bez niej przedstawiono w Tab. 12. W przypadku tej linii komórkowej spadek wartości IC₅₀ w obecności SIM zaobserwowano dla KLZ, FLU i FLP, nie był on jednak istotny statystycznie, podczas gdy dla innych badanych leków wartości IC₅₀ w obecności SIM ulegały podwyższeniu. Wzrost wartości IC₅₀ był istotny statystycznie dla TFP oraz RIS.

Tab. 12. Wartości IC₅₀ [μM] badanych związków wyznaczone bez i w obecności SIM (stężenie końcowe 5 μM) w linii COLO205.

Związek	IC ₅₀ [μM]	
	bez SIM	+ 5 μM SIM
KLZ	36,10 ± 0,44	29,48 ± 6,66
IMP	34,05 ± 7,01	44,62 ± 3,74
FLU	7,46 ± 2,52	5,42 ± 1,46
TFP	4,91 ± 0,06	6,11 ± 0,02
FLP	11,68 ± 0,12	8,61 ± 3,24
RIS	237,35 ± 24,76	414,41 ± 14,24

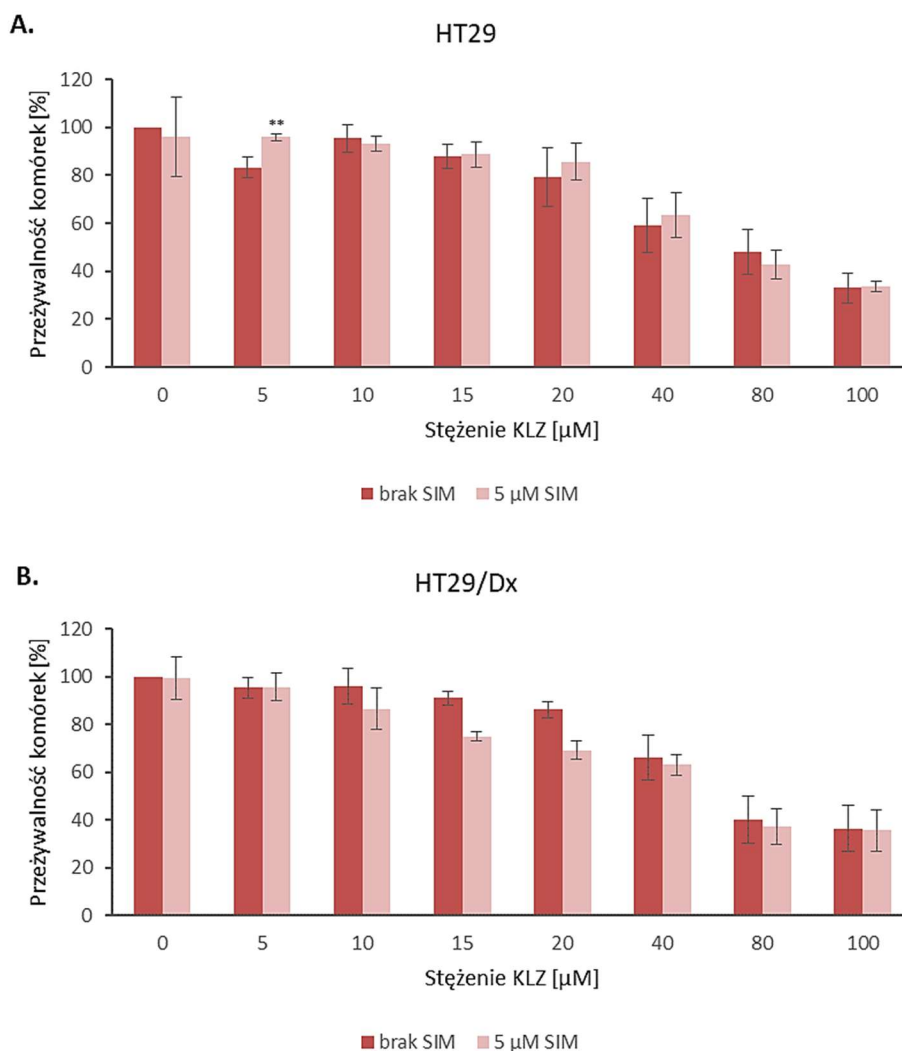
Pogrubioną czcionką zaznaczono wartości, w których dodanie SIM spowodowało istotną statystycznie (p < 0,05) zmianę wartości inhibicji IC₅₀.

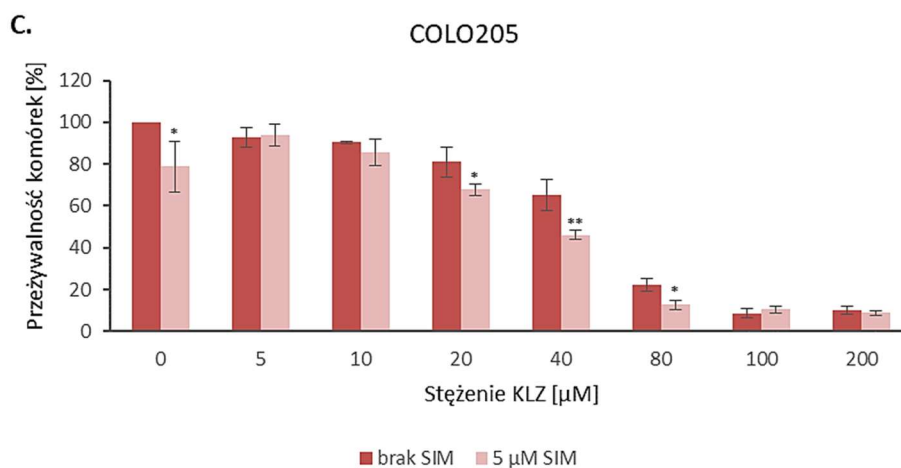
W dalszej części badań, za pomocą programu CompuSyn określono typ wzajemnego oddziaływania kombinacji związków (synergizm lub antagonizm). Do oceny sposobu interakcji leków posłużył indeks kombinacji (CI, ang. *combination index*). Wartości CI < 1 wskazują na synergizm, CI = 1 na efekt addytywny, natomiast CI > 1 na antagonizm działania leków. Ponadto, za pomocą oprogramowania Combobenefit przeprowadzono graficzną analizę i wizualizację efektu (synergia/antagonizm) badanych kombinacji leków. Wartości poniżej -5 wskazują na efekt antagonistyczny, od -5 do 5 na efekt addytywny, natomiast powyżej 5 obserwujemy synergizm działania.¹⁹⁴

3.4.1. Klozapina

Wartości przeżywalności komórek linii HT29, HT29/Dx oraz COLO205 w obecności KLZ oraz KLZ w połączeniu z SIM (stężenie końcowe 5 μM) przedstawiono na Rys. 7. We

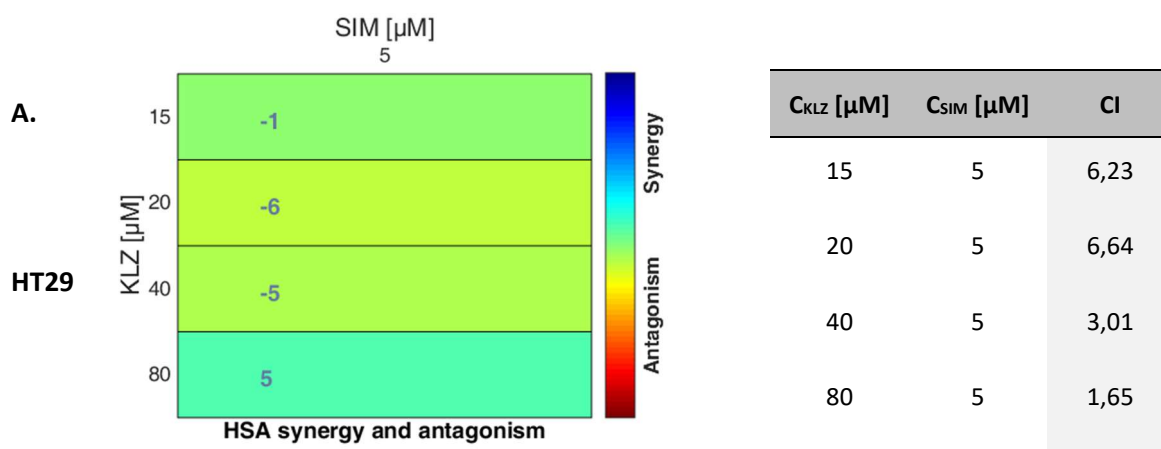
wszystkich badanych liniach komórkowych dodatek SIM nie wpłynął w sposób istotny na spadek przeżywalności komórek w porównaniu z zastosowaniem samej KLZ. Wartości indeksu kombinacji uzyskane dla KLZ i SIM (Tab. 13) świadczą o antagonistycznym działaniu badanych związków. Ponadto zanotowano istotne statystycznie zwiększenie wartości IC_{50} dla obu linii komórkowych ($p < 0,05$). Dla linii HT29 zaobserwowano wzrost tej wartości z 41,81 do 62,83 μM , a dla linii odpornej z 36,25 do 63,35 μM (Tab.11). W przypadku komórek linii COLO205 zastosowana kombinacja KLZ i SIM zmniejszyła ich przeżywalność względem samej KLZ. Słabą synergiją działania obu związków zaobserwowano powyżej stężenia 20 μM KLZ (Tab. 13C). Wartość IC_{50} spadła nieznacznie z 36,10 do 29,48 μM względem stosowania KLZ pojedynczo (Tab. 12).

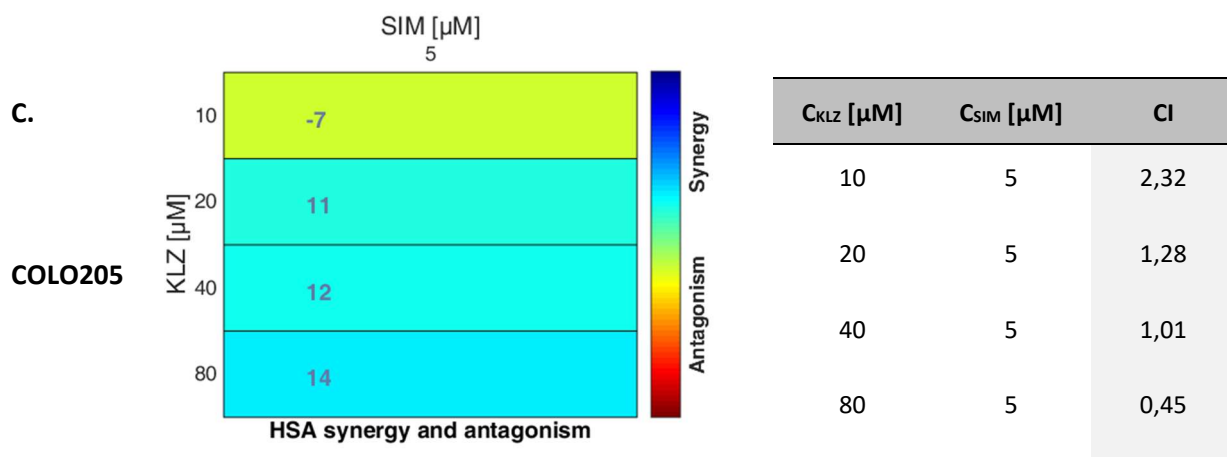
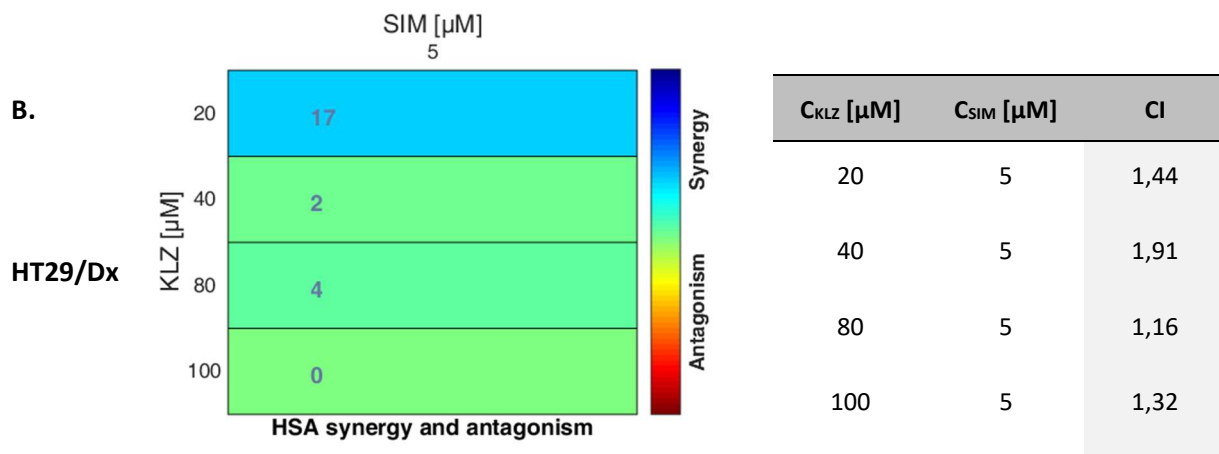




Rys. 7. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia KLZ oraz od stężenia kombinacji KLZ stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μM). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samej KLZ, a KLZ stosowanej z SIM oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

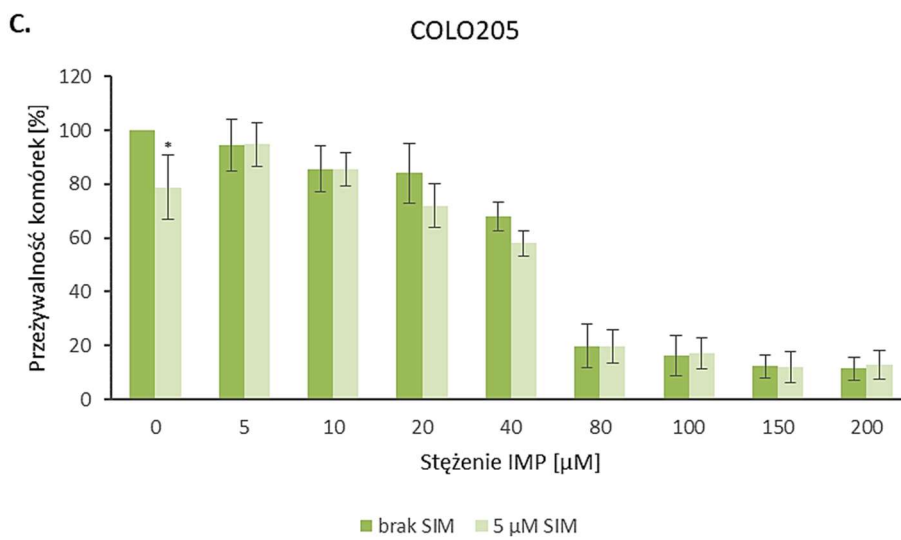
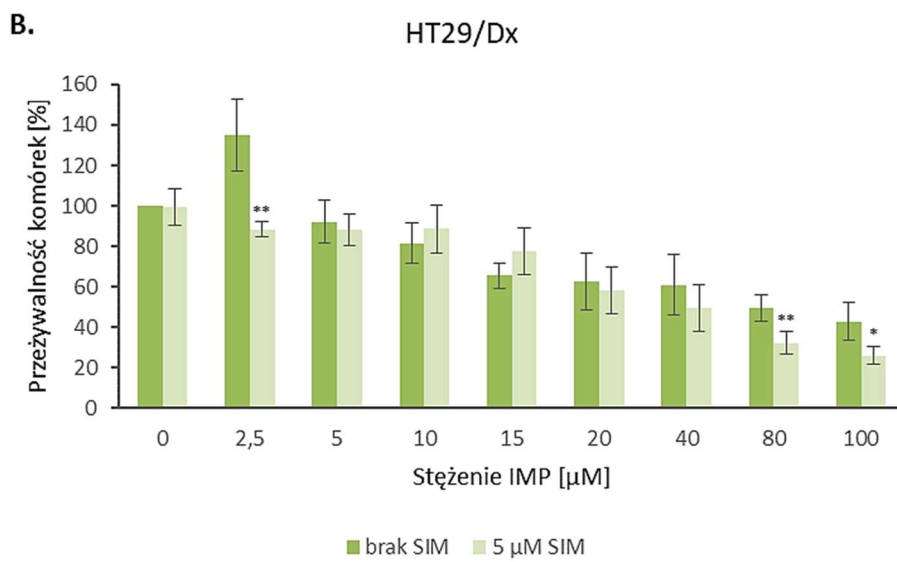
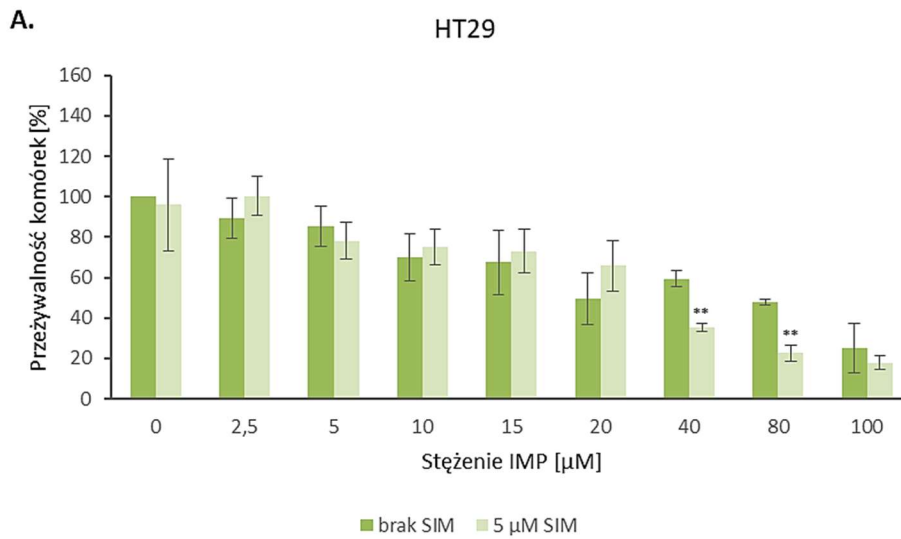
Tab. 13. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla KLZ z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).





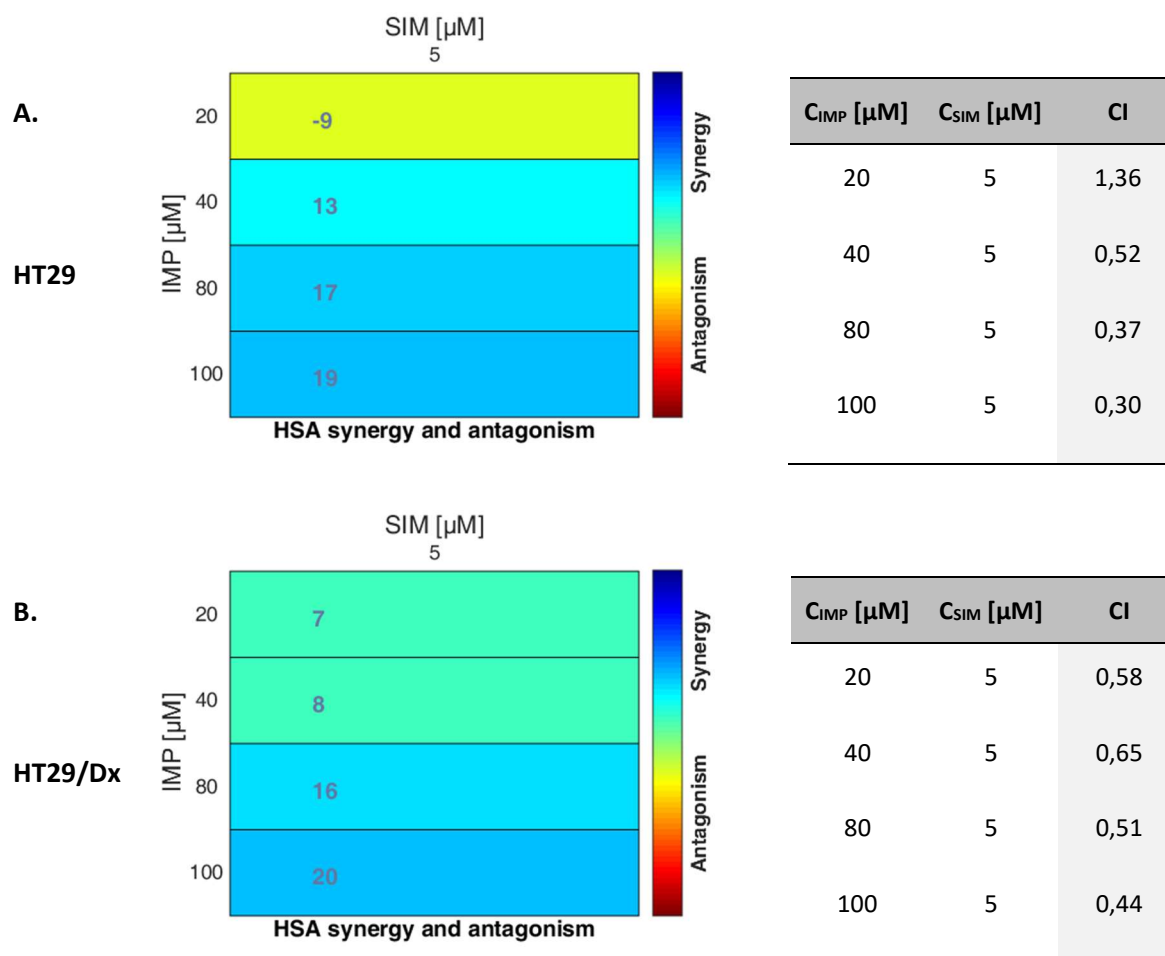
3.4.2. Imipramina

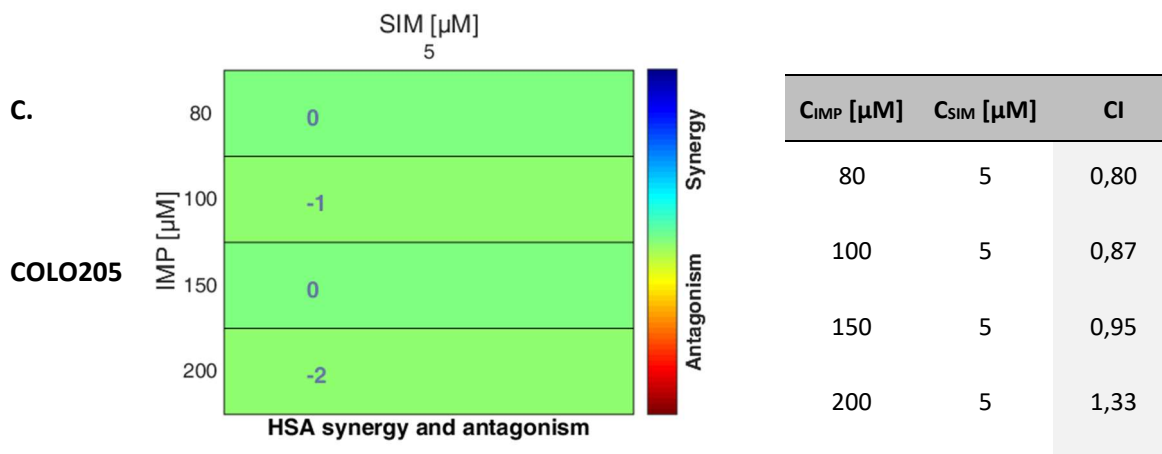
Zastosowanie kombinacji IMP z SIM spowodowało efekt synergistyczny, o czym świadczą uzyskane wartości CI (poniżej 1) dla linii HT29 oraz HT29/Dx (Tab. 14A,B). Dla linii HT29 spadek przeżywalności komórek w wyniku jednoczesnego zastosowania IMP z SIM względem samej IMP zaobserwowano powyżej stężenia 40 μM (Rys. 8A). W przypadku linii HT29/Dx synergii zaobserwowano już od stężenia 5 μM (Rys. 8B). Podanie SIM razem z IMP spowodowało wyraźny spadek wartości IC_{50} dla obu linii. Dla HT29 wartość IC_{50} zmniejszyła się z ponad 100 μM do 15,97 μM , natomiast dla linii HT29/Dx z 88,36 μM do 40,92 μM (Tab. 11). W przypadku linii COLO205 w niższych stężeniach zaobserwowano działanie antagonistyczne IMP względem SIM. Dopiero w zakresie stężeń IMP od 80 μM do 150 μM zauważono słaby synergizm (Tab. 14C). Wartość IC_{50} wzrosła w porównaniu ze stosowaniem samej IMP z 34,05 μM do 44,62 μM (Tab. 12). Reasumując, zastosowanie SIM zwiększyło toksyczność IMP względem komórek nowotworowych HT29 i HT29/Dx, natomiast nie wpłynęło na jej toksyczność względem komórek COLO205.



Rys. 8. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia IMP zastosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μ M). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samej IMP, a IMP stosowanej z SIM oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

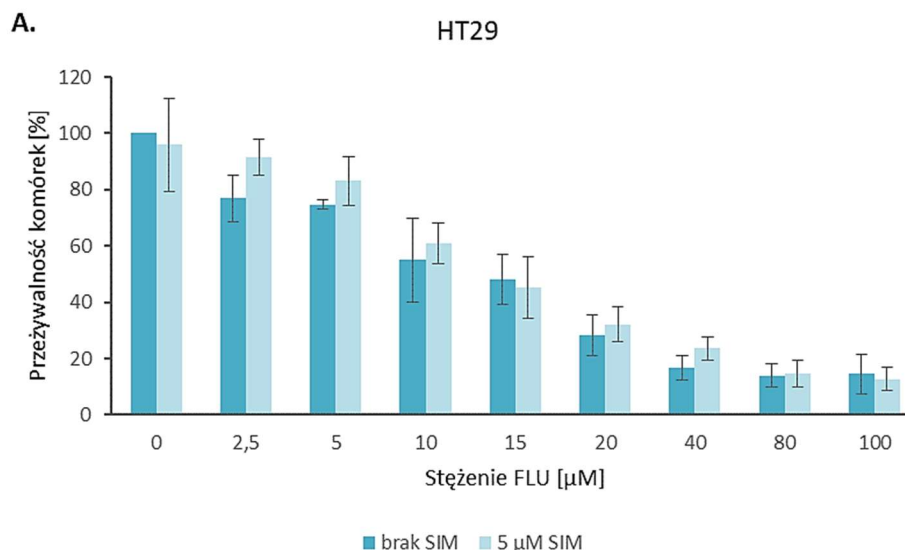
Tab. 14. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla IMP z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).

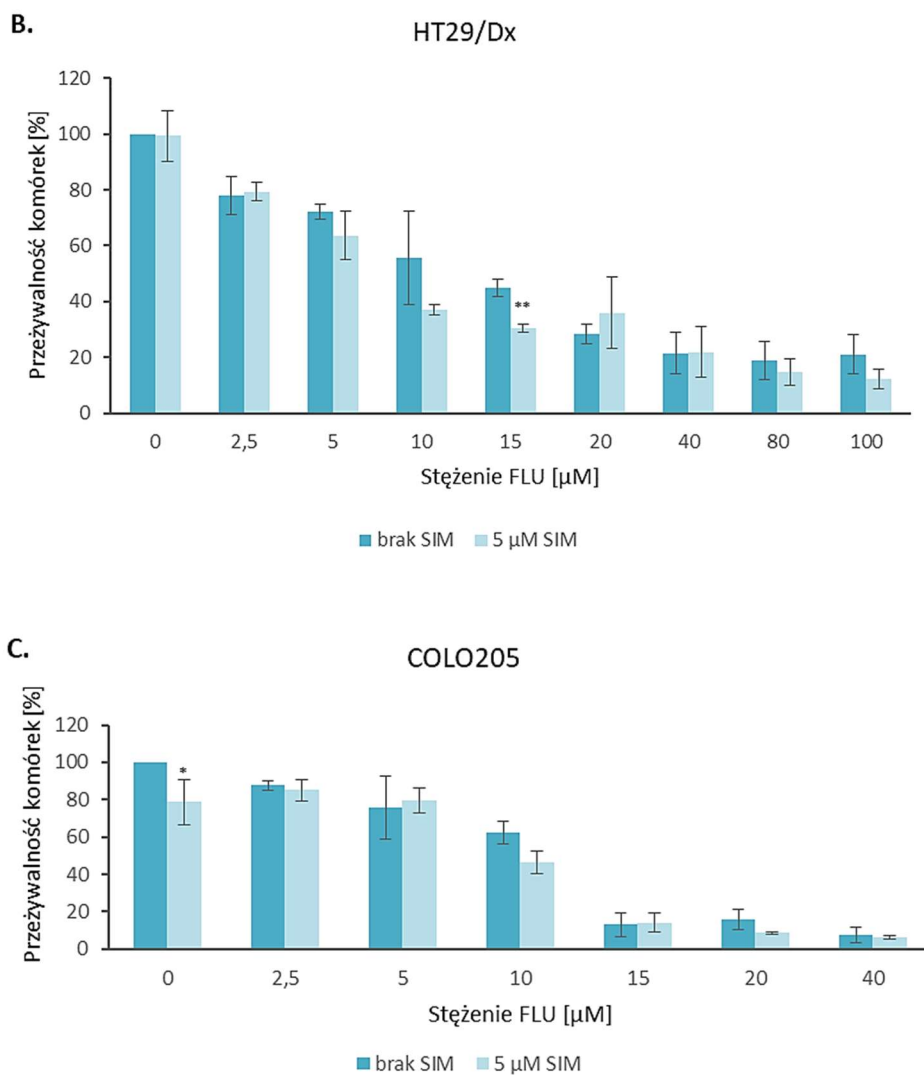




3.4.3. Flufenazyna

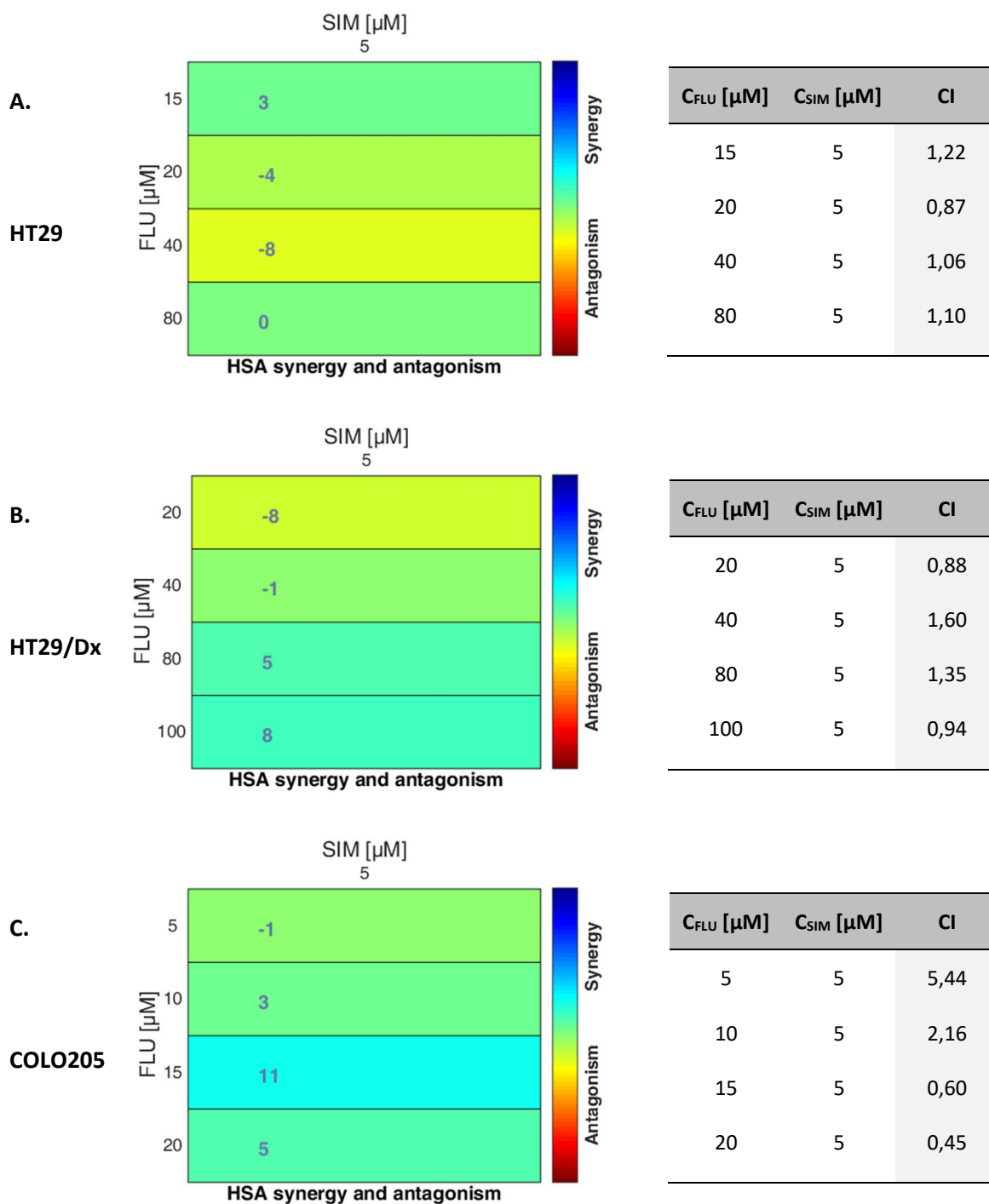
Połączenie FLU, będącej pochodną fenotiazyny, ze statyną nie wywołało znaczącej różnicy w przeżywalności komórek linii HT29 oraz HT29/Dx w porównaniu z zastosowaniem samej FLU (Rys. 9A,B). Kombinacja tych leków wykazała słaby efekt antagonistyczny lub brak zmian w toksyczności w zakresie stosowanych stężeń (Tab. 15A,B). Dla linii HT29 oraz HT29/Dx dodanie SIM spowodowało nieznaczny wzrost wartości IC_{50} w stosunku do samodzielnie stosowanej FLU (Tab. 11). Dla linii COLO205 połączenie FLU z SIM wykazało synergię obserwowaną już od stężenia $15 \mu\text{M}$ (Rys. 9C, Tab. 15C). Uzyskana wartość IC_{50} spadła z $7,46$ do $5,42 \mu\text{M}$ przy dodatkowym zastosowaniu statyny (Tab. 12).





Rys. 9. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia FLU stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μM). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samej FLU, a FLU stosowanej z SIM oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

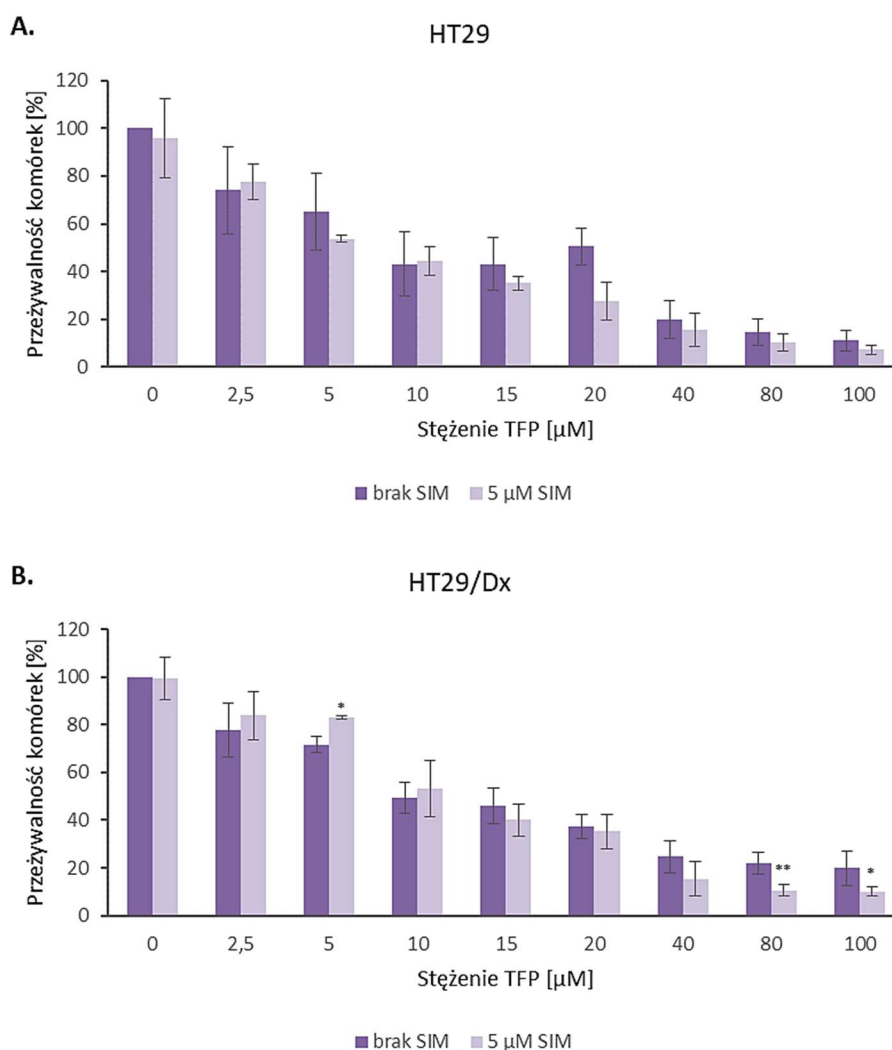
Tab. 15. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla FLU z SIM uzyskane za pomocą programu Combenefit (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx(B) i COLO205 (C).

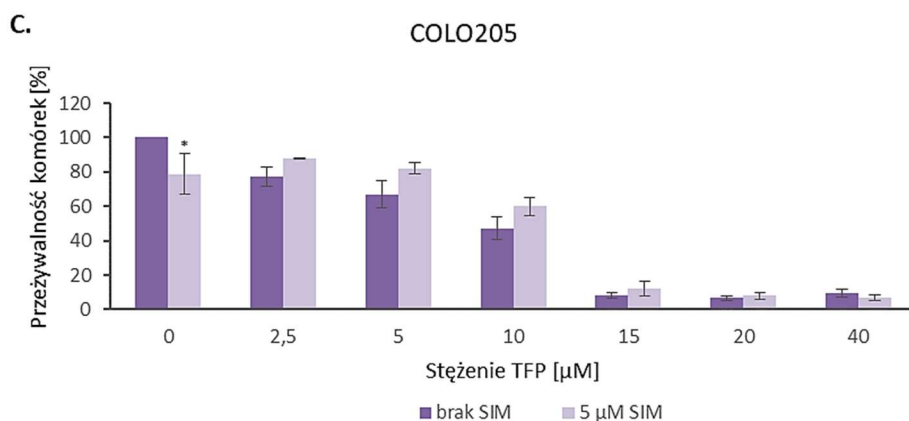


3.4.4. Trifluoperazyna

Kombinacja kolejnej badanej pochodnej fenotiazyny – TFP z SIM wykazywała większą toksyczność względem komórek raka jelita grubego HT29 niż samodzielnie stosowana TFP (Rys. 10A). Zaobserwowano silne synergistyczne działanie kombinacji tych leków, które

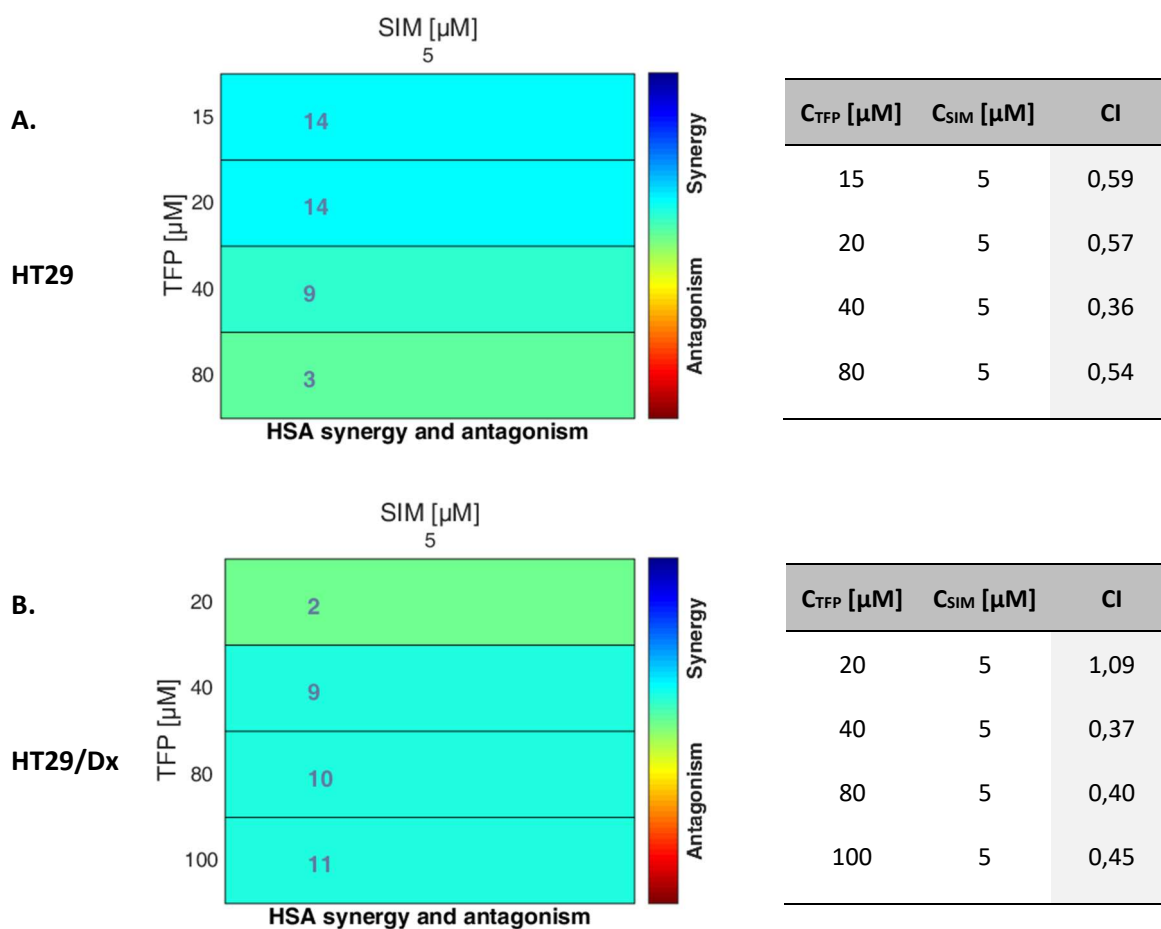
nasilało się wraz ze wzrostem stężenia TFP (wartości CI mieszczące się w zakresie 0,5 – 0,8) (Tab. 16A). Dla linii HT29 zaobserwowano również istotną statystycznie różnicę w wartościach IC_{50} (ponad dwukrotny spadek z 21,37 do 7,81 μM) (Tab. 11). Podobny efekt połączenia TFP i SIM występował także w linii HT29/Dx (Rys. 10B). Analiza indeksów kombinacji wykazała synergię między TFP a SIM również w linii częściowo odpornej na doksorubicynę, przy czym efekt ten występował przy nieco wyższych stężeniach TFP niż w linii HT29 (Tab. 16B). Co zastanawiające, w linii HT29/Dx nie obserwowano zmiany w wartości IC_{50} wyznaczonej w obecności SIM i bez tego leku (Tab. 11). Dla linii COLO205 połączenie TFP z SIM w niskich stężeniach wykazało efekt antagonistyczny. Dopiero w stężeniach TFP powyżej 15 μM obserwowano synergję działania statyny i pochodnej fenotiazyny (Rys. 10C, Tab. 16C) W rezultacie wartość IC_{50} uzyskana dla kombinacji tych leków wzrosła w porównaniu z zastosowaniem samej TFP z 4,91 do 6,11 μM , jednak dalej aktywność cytotoksyczną względem komórek RJG była wysoka.

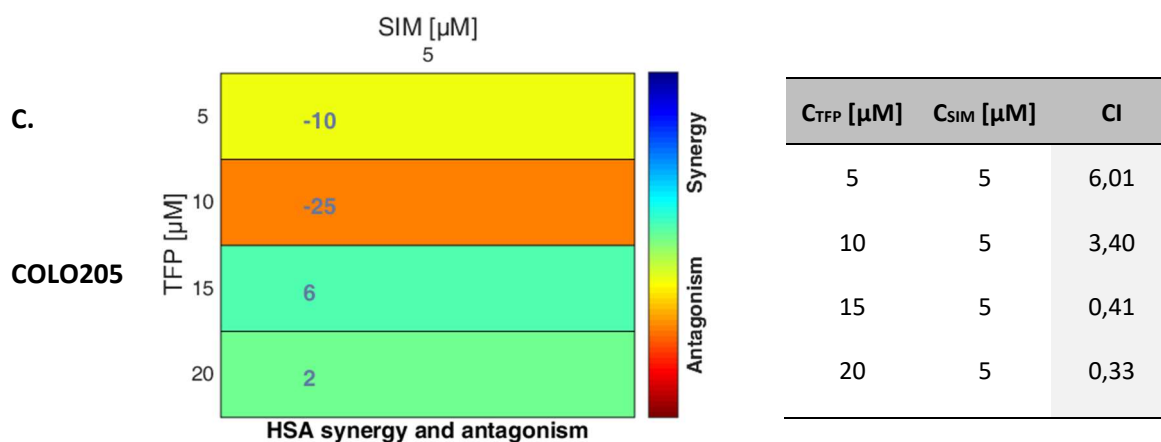




Rys. 10. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia TFP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μM). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samej TFP, a TFP stosowanej z SIM oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

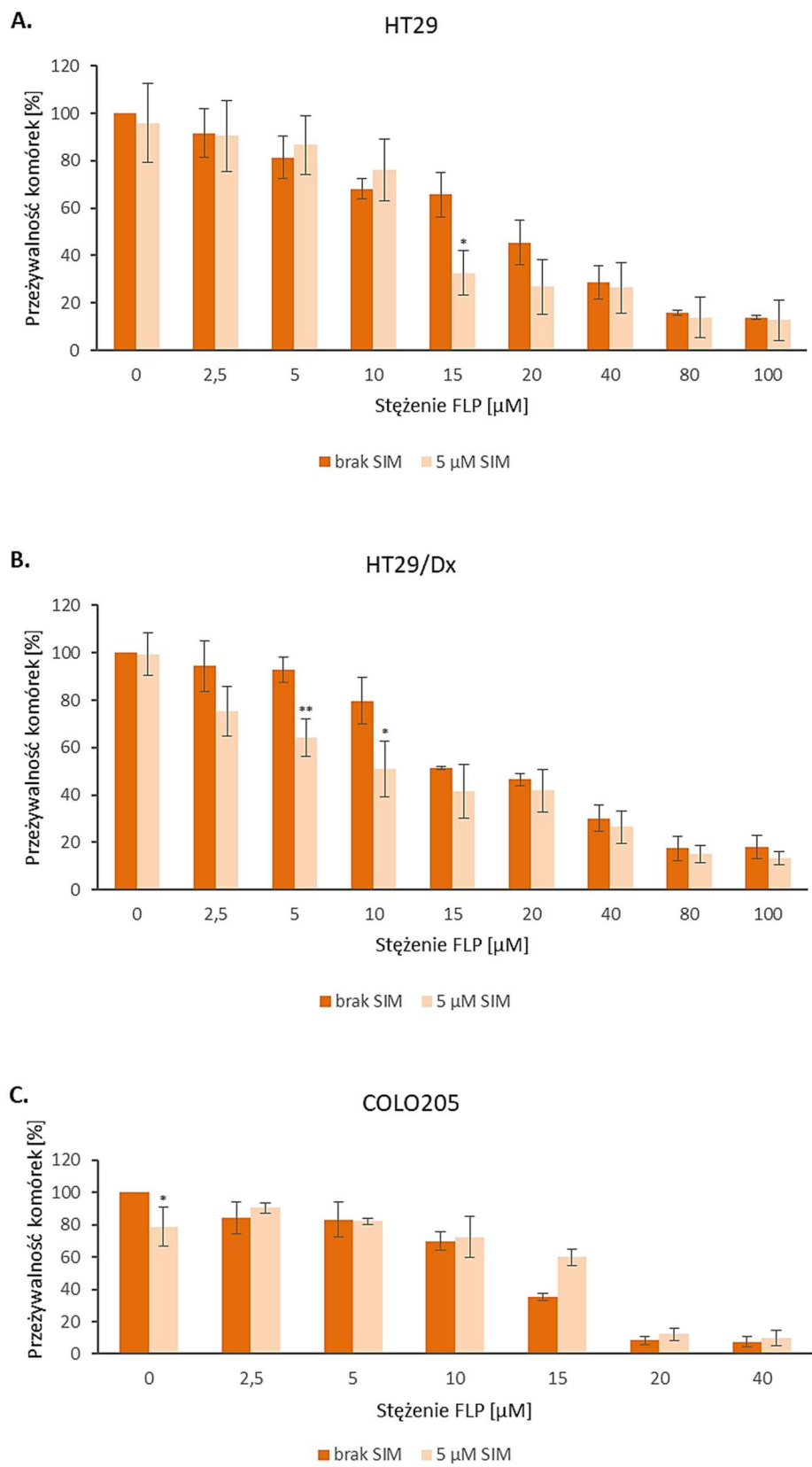
Tab. 16. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla TFP z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29, HT29/Dx oraz COLO205.





3.4.5. Flupentyksol

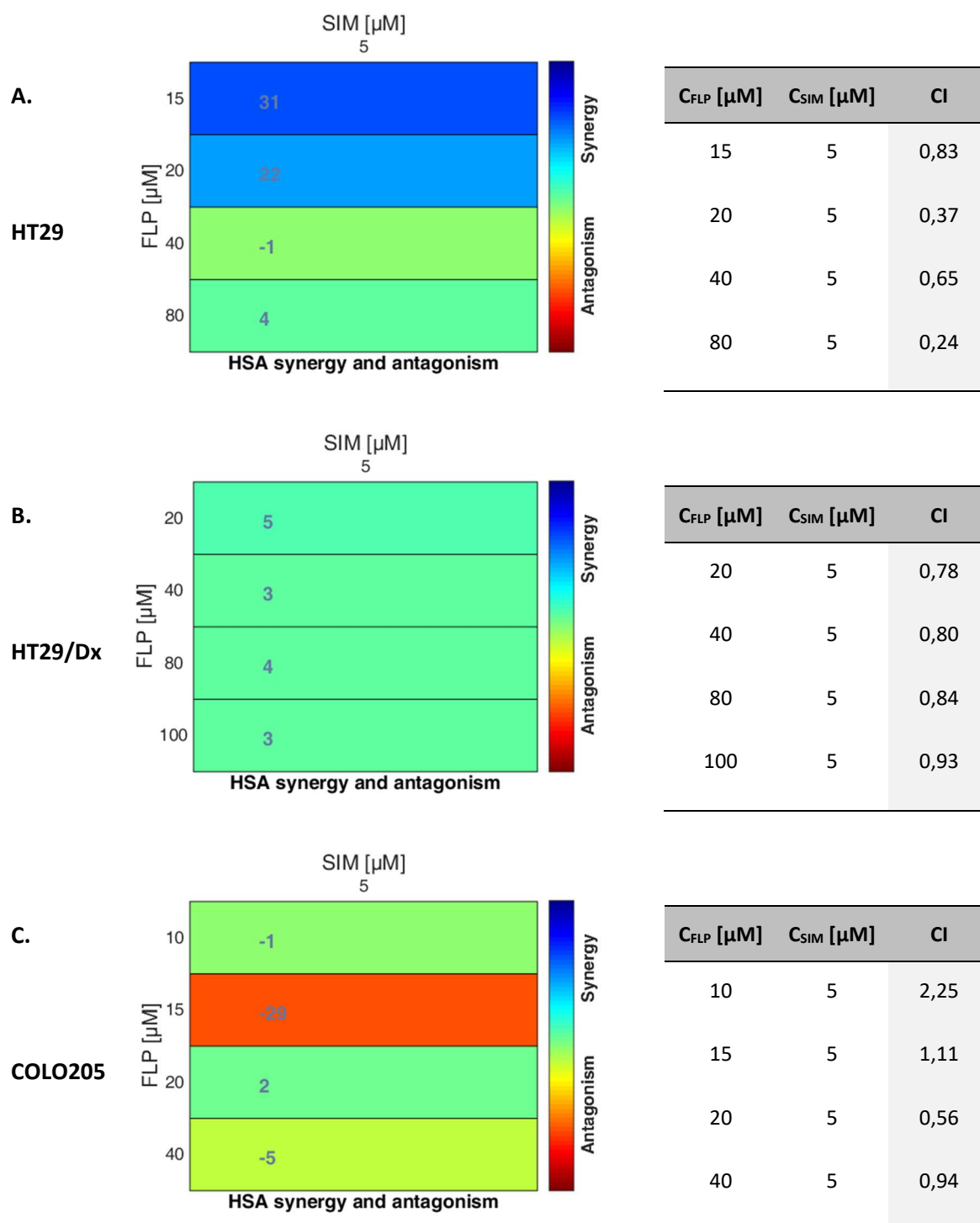
Zastosowanie kombinacji FLP z SIM wobec komórek linii HT29 skutkowało wyraźnym efektem synergistycznym, widocznym szczególnie w wyższych stężeniach FLP (powyżej 10 µM) (Rys. 11A, Tab. 17A). Jak wskazują wykresy (Rys. 11B) oraz obliczone parametry CI (Tab. 17B), w przypadku linii HT29/Dx również występowało działanie synergistyczne zauważalne dla wszystkich stężeń FLP. Istotnie statystycznie ($p < 0,05$) różnice w wartości IC_{50} zaobserwowano dla linii HT29/Dx, gdzie wartość ta dla badanej kombinacji wynosiła 8,60 µM – około 3 razy mniej niż w przypadku zastosowania samego FLP ($IC_{50} = 23,12$ µM). Natomiast w linii HT29 zauważono nieznacznie słabsze obniżenie wartości IC_{50} (z 21,37 do 7,81 µM w obecności SIM) (Tab. 11). W przypadku linii komórkowej COLO205 zarówno wykres przeżywalności (Rys. 11C) jak i wartości indeksu kombinacji (Tab. 17C) wskazują na brak występowania synergistycznego działania FLP z SIM, a przy niskich stężeniach FLP nawet na efekt antagonistyczny. Największą różnicę w przeżywalności zaobserwowano przy stężeniu FLP 15 µM i 5 µM SIM (około 25% wzrost). Wartość IC_{50} w obecności statyny zmniejszyła się z 11,68 do 8,61 µM, zmiana ta nie była jednak istotna statystycznie (Tab. 12). FLP zarówno stosowany pojedynczo, jak i w kombinacji z SIM, wykazywał dobrą aktywność cytotoksyczną względem badanych linii raka okrężnicy.



Rys. 11. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia FLP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μM). Istotność statystyczną

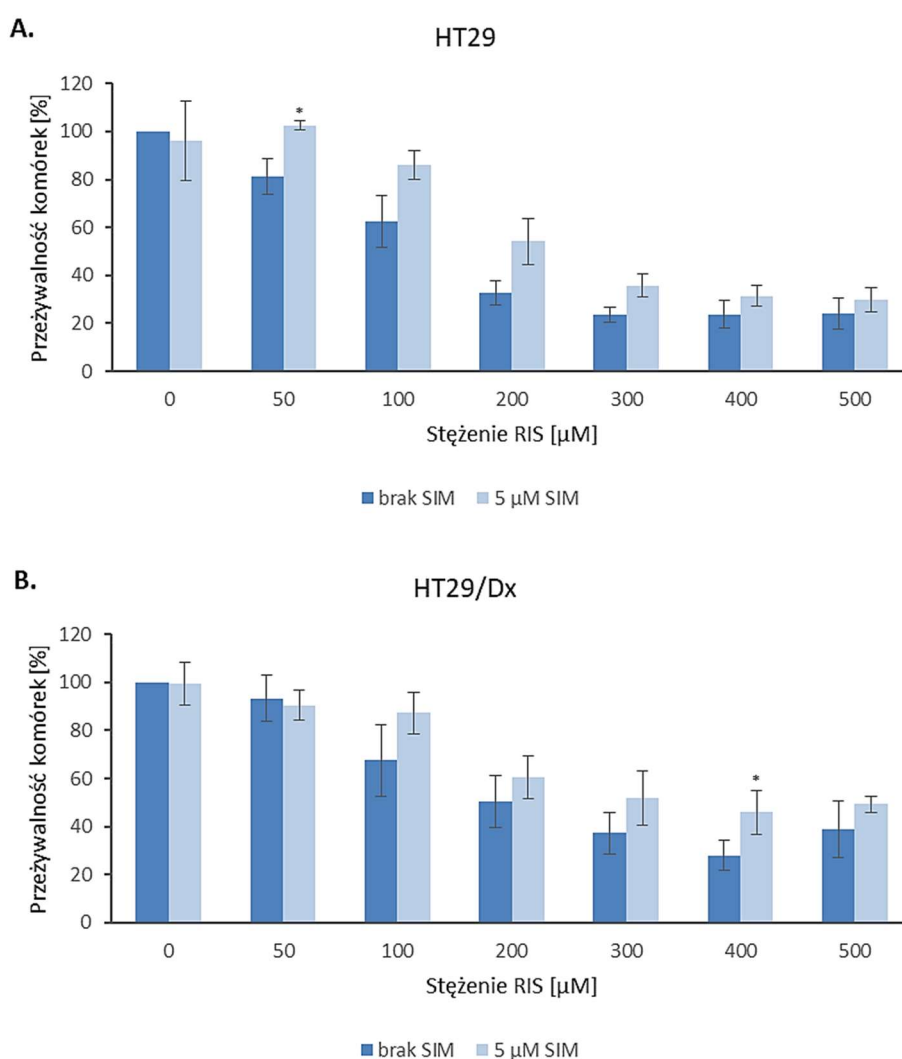
pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samego FLP, a FLP stosowanego z SIM oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

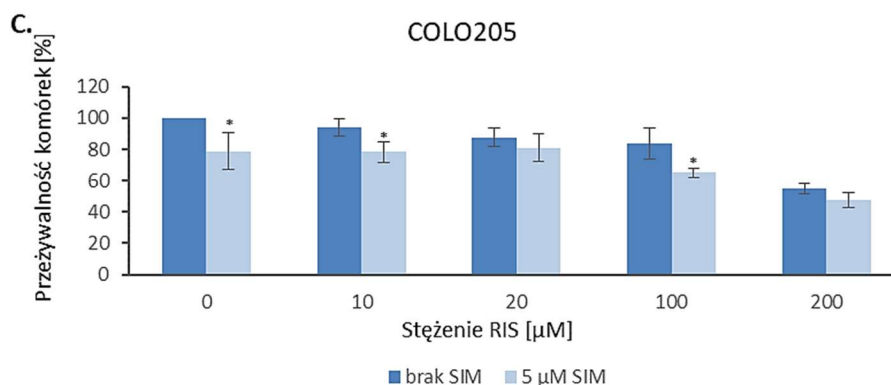
Tab. 17. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla FLP z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).



3.4.6. Rysperydon

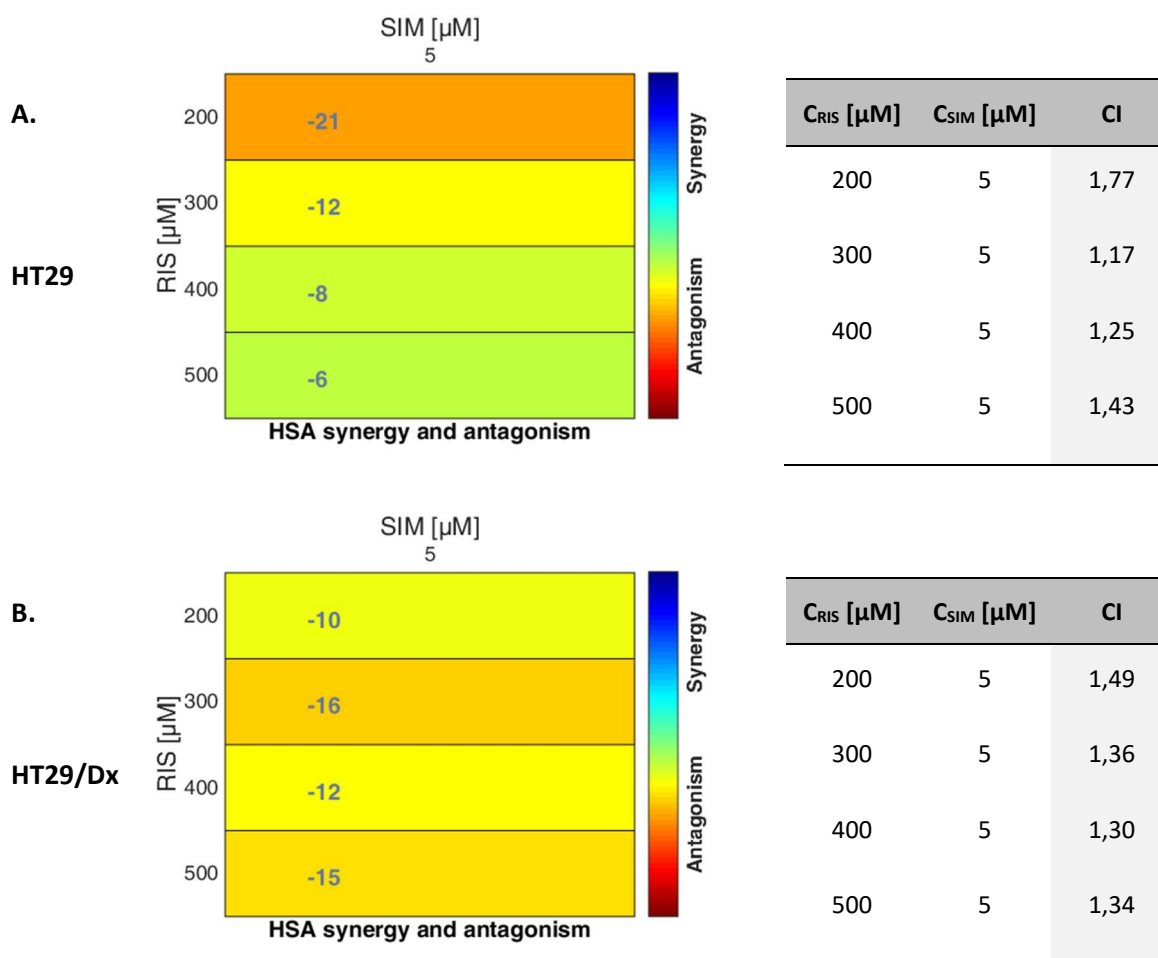
Wartości CI uzyskane dla kombinacji RIS z SIM wskazują na antagonistyczne działanie tych związków we wszystkich badanych liniach komórkowych (Rys. 12, Tab. 18). Wartości IC_{50} dla kombinacji RIS z SIM są blisko dwukrotnie wyższe niż RIS stosowanego samodzielnie we wszystkich badanych przypadkach. Dla linii HT29 wartość IC_{50} wzrosła w wyniku połączenia RIS z SIM z 161,14 do 247,90 μM , dla HT29/Dx z 295,67 do 442,02 μM (Tab. 11), natomiast w przypadku COLO205 z 237,35 do 414,41 μM (Tab. 12). Najslabszy efekt antagonistyczny zaobserwowano w linii COLO205, zaś w wysokich stężeniach RIS praktycznie nie występował wyraźny efekt współdziałania tych leków (Rys. 12C, Tab. 18C).

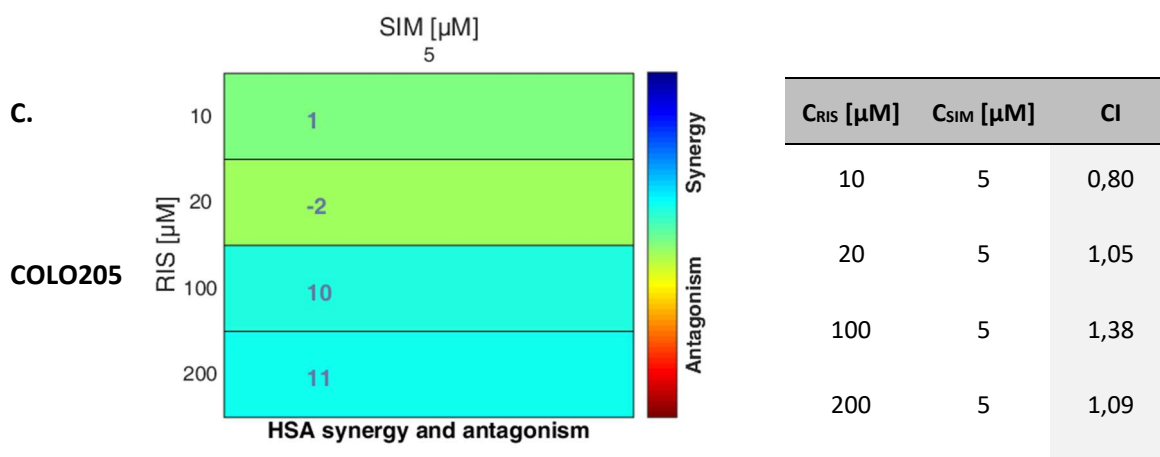




Rys. 12. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia RIS stosowanego samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μM). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samego RIS, a RIS stosowanego z SIM oznaczono: * ($p < 0,05$).

Tab. 18. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla RIS z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).





3.5. Aktywność cytotoksyczna w kombinacji z betuliną

Dla wybranych związków przeprowadzono także badania nad ich toksycznością w połączeniu z betuliną, związkiem pochodzenia naturalnego, który wpływa na proces biosyntezy cholesterolu. W celu określenia, czy betulina wykazuje zdolności do zwiększenia cytotoksyczności badanych związków, w liniach nowotworowych HT29 i HT29/Dx zastosowano ponownie test SRB. W przypadku linii COLO205 wykonano test MTT. Wyniki zaprezentowano w Tab. 19 oraz za pomocą wykresów wykazujących zależność przeżywalności komórek od zastosowanego stężenia leków znajdujących się w następnym podrozdziałach. Porównano efekt hamowania proliferacji komórek przez badane związki podane pojedynczo z efektem uzyskanym po zastosowaniu ich kombinacji z BET. Stężenie BET wynosiło 5 μM dla każdego badanego stężenia związków. Dodatkowa analiza wartości CI w programie CompuSyn pozwoliła na ocenę charakteru oddziaływań kombinacji związków. Jak widać w tabeli poniżej (Tab. 19) obecność BET w zasadzie we wszystkich przypadkach zwiększała stężenia badanych leków potrzebne, aby zahamować proliferację komórek w 50%. Jedynie dla TFP w linach HT29 oraz COLO205 wartości IC_{50} wyznaczone w obecności BET były nieco mniejsze niż bez dodatku tego modulatora.

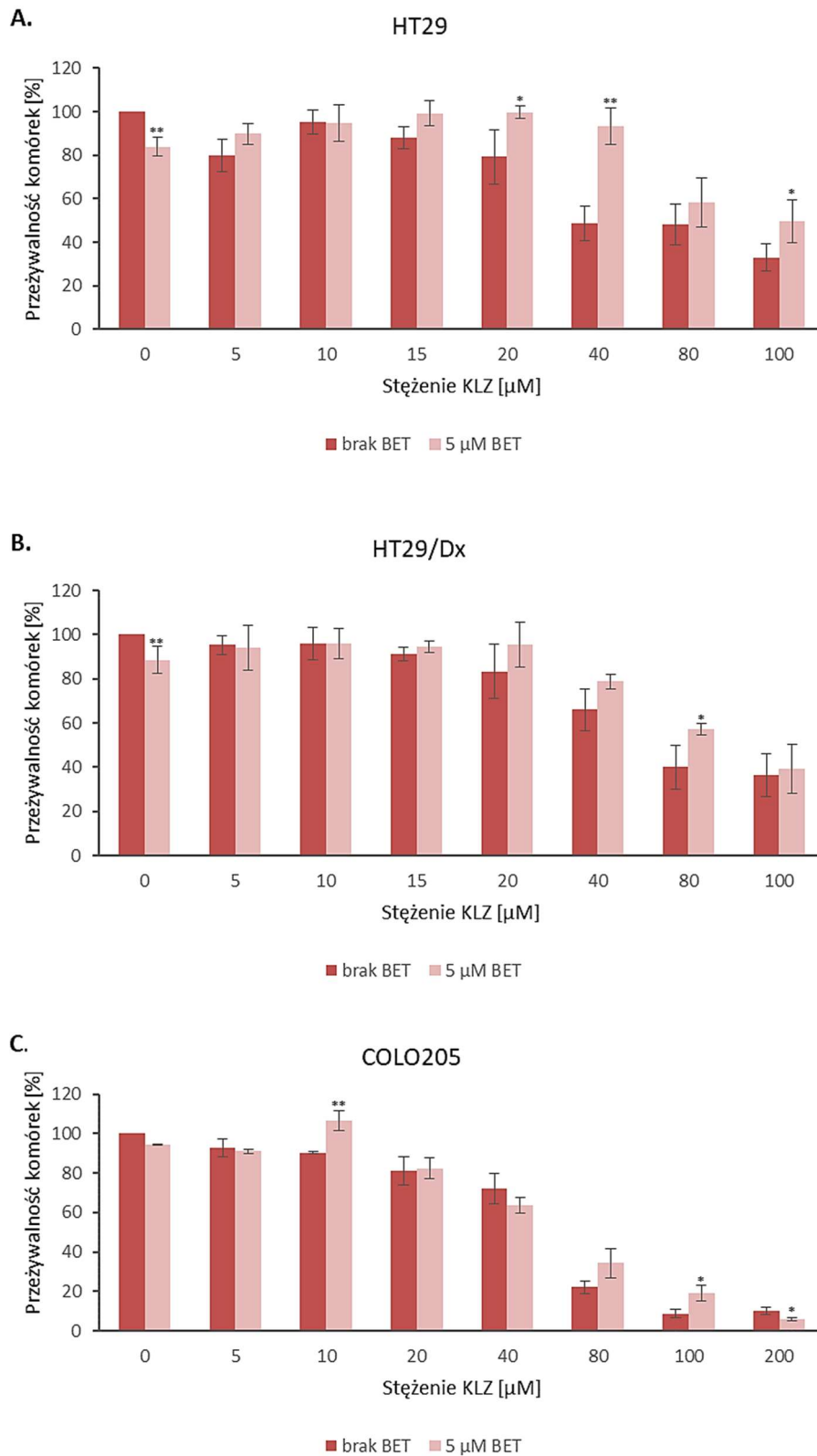
Tab. 19. Wartości IC₅₀ [μM] badanych związków wyznaczone bez i w obecności BET (stężenie końcowe 5 μM) w liniach HT29, HT29/Dx oraz COLO205.

	HT29		HT29/Dx		COLO205	
	bez BET	+ 5 μM BET	bez BET	+ 5 μM BET	bez BET	+ 5 μM BET
KLZ	41,81 ± 6,60	83,93 ± 12,08	36,25 ± 11,49	77,79 ± 2,55	36,10 ± 0,44	38,97 ± 0,03
IMP	>100	84,50 ± 5,12	88,36 ± 10,22	81,83 ± 11,95	34,05 ± 7,01	49,13 ± 5,18
FLU	9,01 ± 1,41	12,08 ± 1,85	12,45 ± 3,45	15,24 ± 3,47	7,46 ± 2,52	9,11 ± 1,05
TFP	21,37 ± 5,54	10,41 ± 0,68	13,88 ± 2,28	12,37 ± 2,22	4,91 ± 0,06	3,87 ± 0,14
FLP	19,56 ± 3,48	27,78 ± 0,82	23,13 ± 5,20	45,20 ± 4,91	11,68 ± 0,12	11,76 ± 0,82
RIS	161,14 ± 31,63	143,78 ± 36,68	295,67 ± 76,52	339,95 ± 36,58	237,35 ± 24,76	339,32 ± 81,51
SIM	34,64 ± 10,34	45,21 ± 0,64	45,25 ± 18,25	34,88 ± 10,71	—	—

– nie wyznaczano, pogrubioną czcionką zaznaczono wartości IC₅₀ które istotnie statystycznie (p < 0,05) zmieniły się przy zastosowaniu kombinacji z BET względem samego leku.

3.5.1. Klozapina

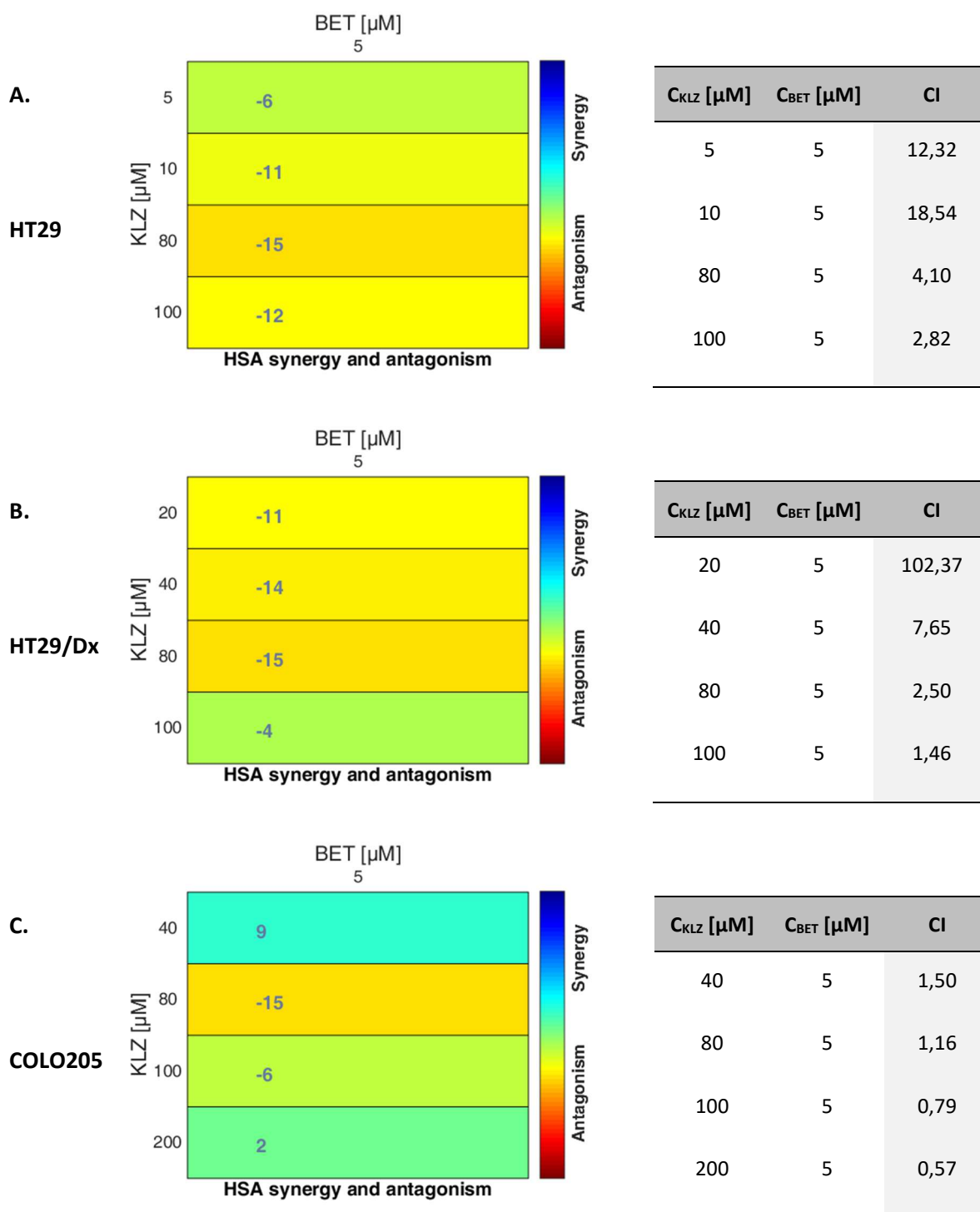
W badanym zakresie stężeń KLZ dodatek BET spowodował zmniejszenie toksyczności tego leku wobec komórek linii HT29 oraz HT29/Dx (Rys. 13A,B). Uzyskane wartości indeksu kombinacji wskazują na antagonizm działania tych związków (Tab. 20A,B). Najwyższy wzrost przeżywalności komórek linii HT29 pod wpływem użytej kombinacji w porównaniu z KLZ zastosowaną pojedynczo zaobserwowano przy stężeniu 40 μM (ok. 40%) (Rys. 13A). Obliczone wartości IC₅₀ dla kombinacji KLZ z BET w porównaniu z samą KLZ wzrosły ponad dwukrotnie. W przypadku linii HT29 nastąpił wzrost ze stężenia 41,81 do 83,93 μM (p < 0,05), a w linii HT29/Dx z 36,25 na 77,79 μM (p < 0,01). Dla linii COLO205 zaobserwowano istotny statystycznie wzrost wartości IC₅₀ z 36,10 do 38,97 μM (p < 0,05) (Tab. 19). W badanym zakresie stężeń dla tej linii komórkowej przeważało antagonistyczne działanie połączenia związków z wyjątkiem najwyższego badanego stężenia (200 μM), gdzie parametr CI uzyskany w programie CompuSyn przyjmował wartość poniżej 1 (CI = 0,57) (Tab. 20C). Podsumowując, KLZ sama i w kombinacji z BET wykazała średnią aktywność cytotoksyczną względem badanych linii RJG. Zastosowanie triterpenu powodowało wzrost przeżywalności komórek badanych linii RJG poddanych ekspozycji na KLZ.



Rys. 13. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia KLZ stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μM). Istotność statystyczną

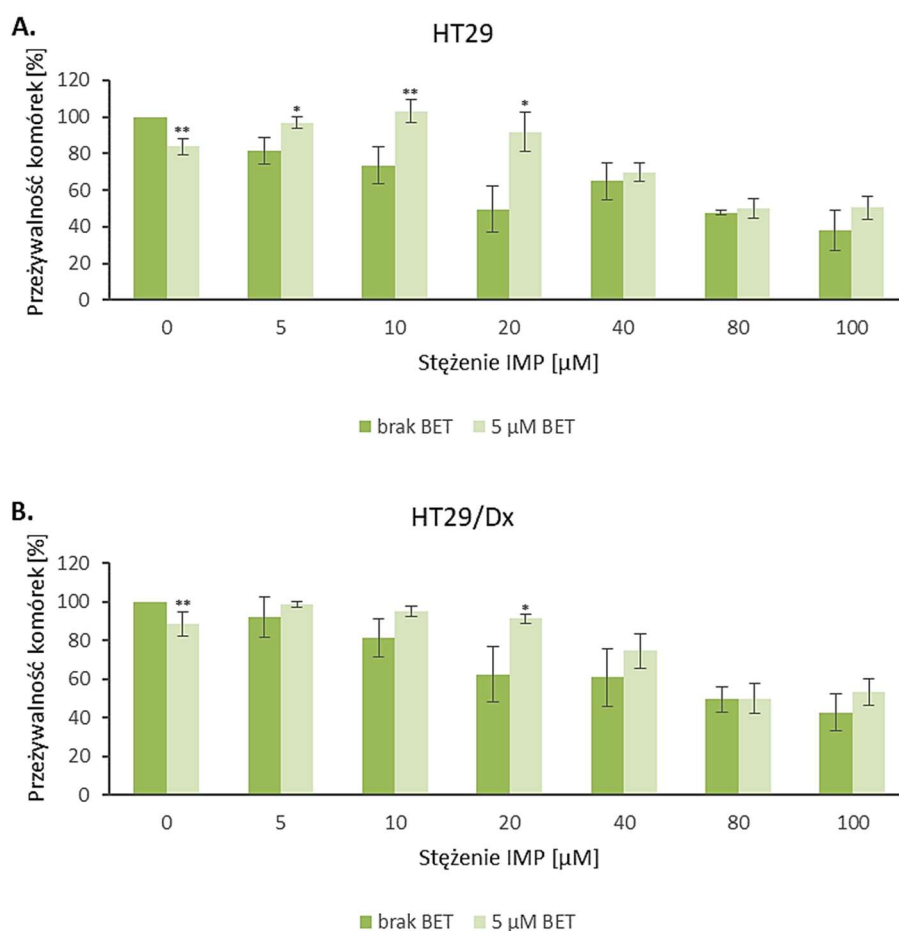
między wartościami otrzymanymi dla samej KLZ, a KLZ stosowanej z BET oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

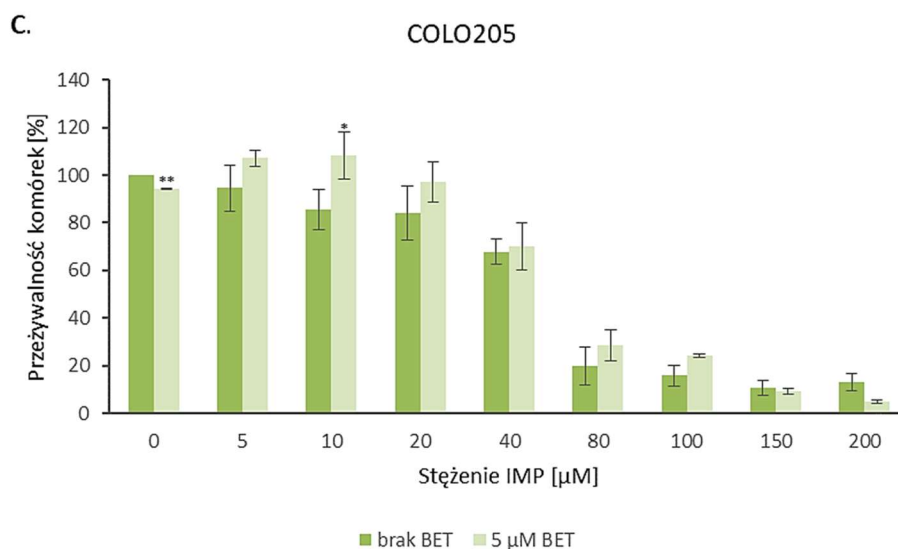
Tab. 20. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla KLZ z BET uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).



3.5.2. Imipramina

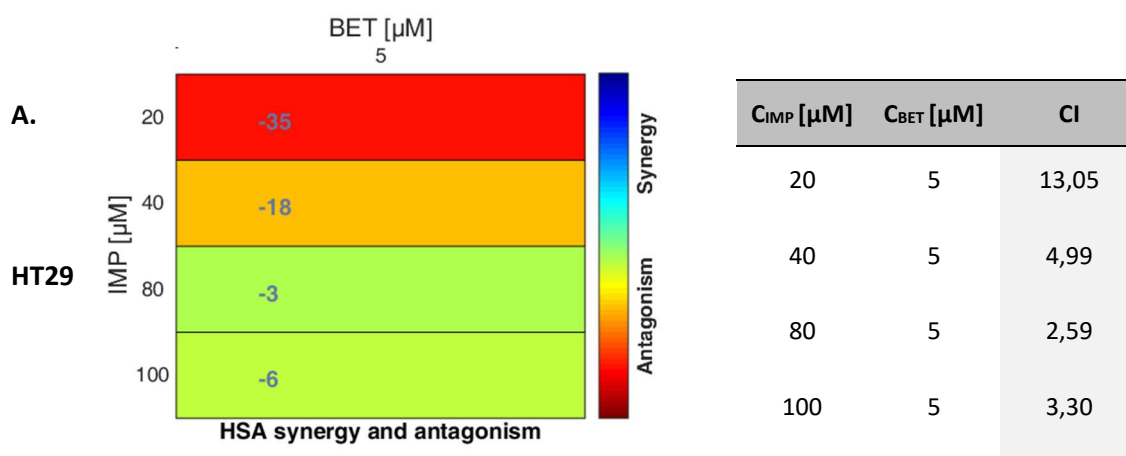
Zastosowanie IMP w połączeniu z BET nie spowodowało zwiększonej śmiertelności komórek nowotworowych linii HT29 oraz HT29/Dx w porównaniu do zastosowania samej IMP. Wykresy oraz obliczone wartości CI uzyskane dla tych linii wskazują na działanie antagonistyczne leków w niższych stężeniach IMP (Rys. 14A,B, Tab. 21A,B). Jednak, obliczone wartości IC_{50} nie wykazują różnic istotnych statystycznie (na poziomie istotności 5%). Dla linii HT29 zaobserwowano jej spadek z ponad 100 μM do 84,50 μM , w przypadku jej odpornej sublinii wartość IC_{50} praktycznie się nie zmieniła. Dla linii COLO205 zaobserwowano wzrost tej wartości z 34,05 μM do 49,13 μM (Tab. 19). Analiza typu oddziaływania między IMP a BET wskazuje na addytywne działanie związków na komórki nowotworowe tej linii (Tab. 21C). Podsumowując uzyskane wyniki, aktywność cytotoksyczna IMP względem badanych modeli komórkowych raka jelita grubego była średnia. Dodatkowe zastosowanie BET nie wpływało znacząco na toksyczność IMP względem badanych linii komórkowych.

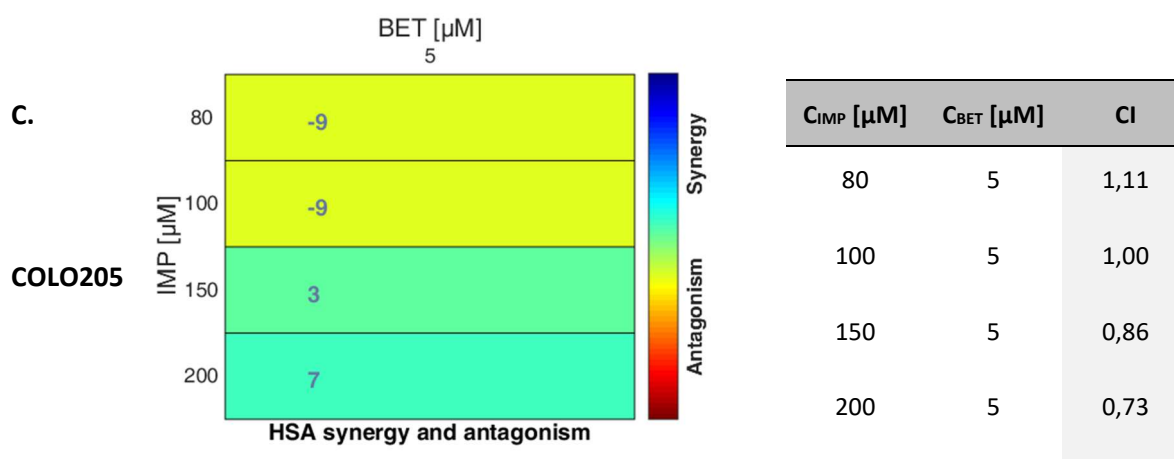
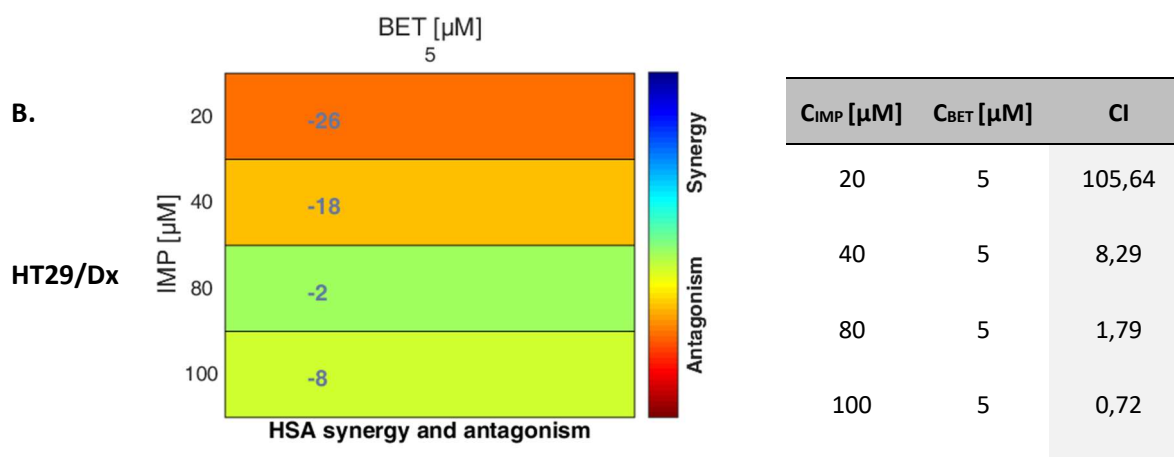




Rys. 14. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia IMP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μM). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samej IMP, a IMP stosowanej z BET oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

Tab. 21. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla IMP z BET uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).

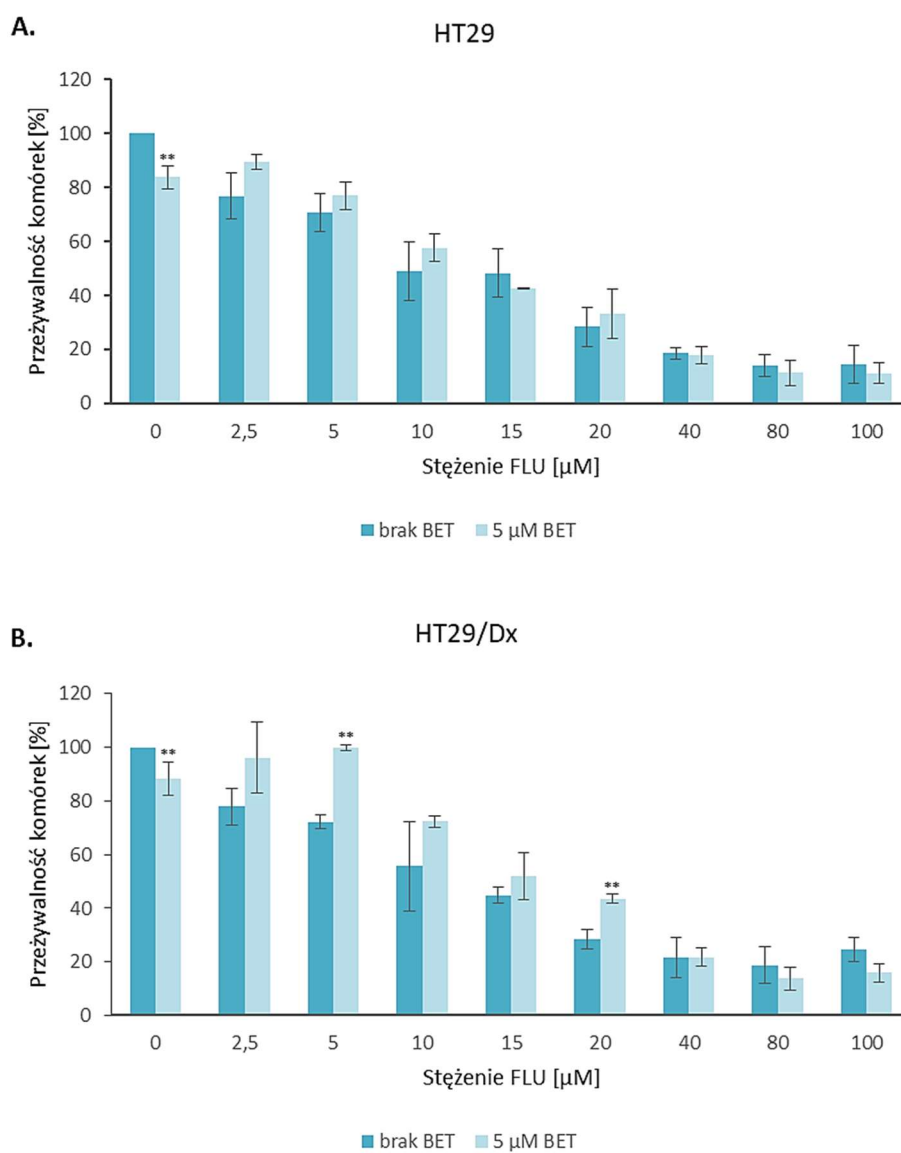


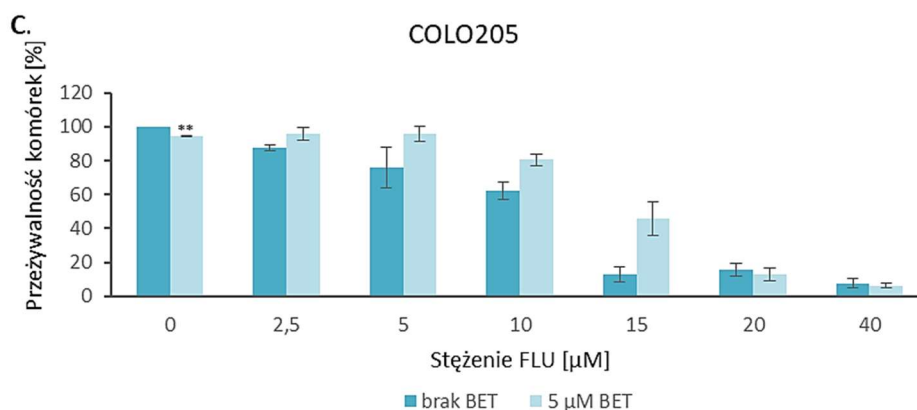


3.5.3. Flufenazyna

W przypadku FLU, połączenie jej z BET nie wpłynęło w sposób istotny na wartość IC_{50} uzyskaną dla żadnej z badanych linii komórkowych. Jeżeli spojrzymy na przeżywalność komórek linii HT29 i HT29/Dx w zależności od stężenia leku, to zaobserwujemy, że w niskich stężeniach FLU dodatek BET powodował zwiększenie przeżywalności komórek. Dopiero w wyższych stężeniach FLU (powyżej 40 μM w linii HT29) (Rys. 15A) łączne zastosowanie związków skutkowało zmniejszeniem przeżywalności komórek. Z kolei wartości indeksu kombinacji uzyskane w programie CompuSyn wskazują na lekki efekt synergii zastosowanego połączenia leków w linii HT29 (CI w zakresie 0,7-0,9) (Tab. 22A). W przypadku linii HT29/Dx, spadek przeżywalności komórek w wyniku zastosowanej kombinacji FLU z BET zanotowano dopiero w stężeniach FLU powyżej 80 μM (Rys. 15B). Otrzymane dla tej linii wartości CI były poniżej jedności dla stężeń FLU powyżej 40 μM (Tab. 22B). W przypadku linii komórkowej COLO205 dla niskich stężeń leku przeważał efekt antagonistyczny, który przechodził w efekt synergistyczny dla najwyższych badanych stężeń FLU (Rys. 15C, Tab. 22C). FLU zarówno sama, jak i w połączeniu z BET, wykazywała wysoką aktywność

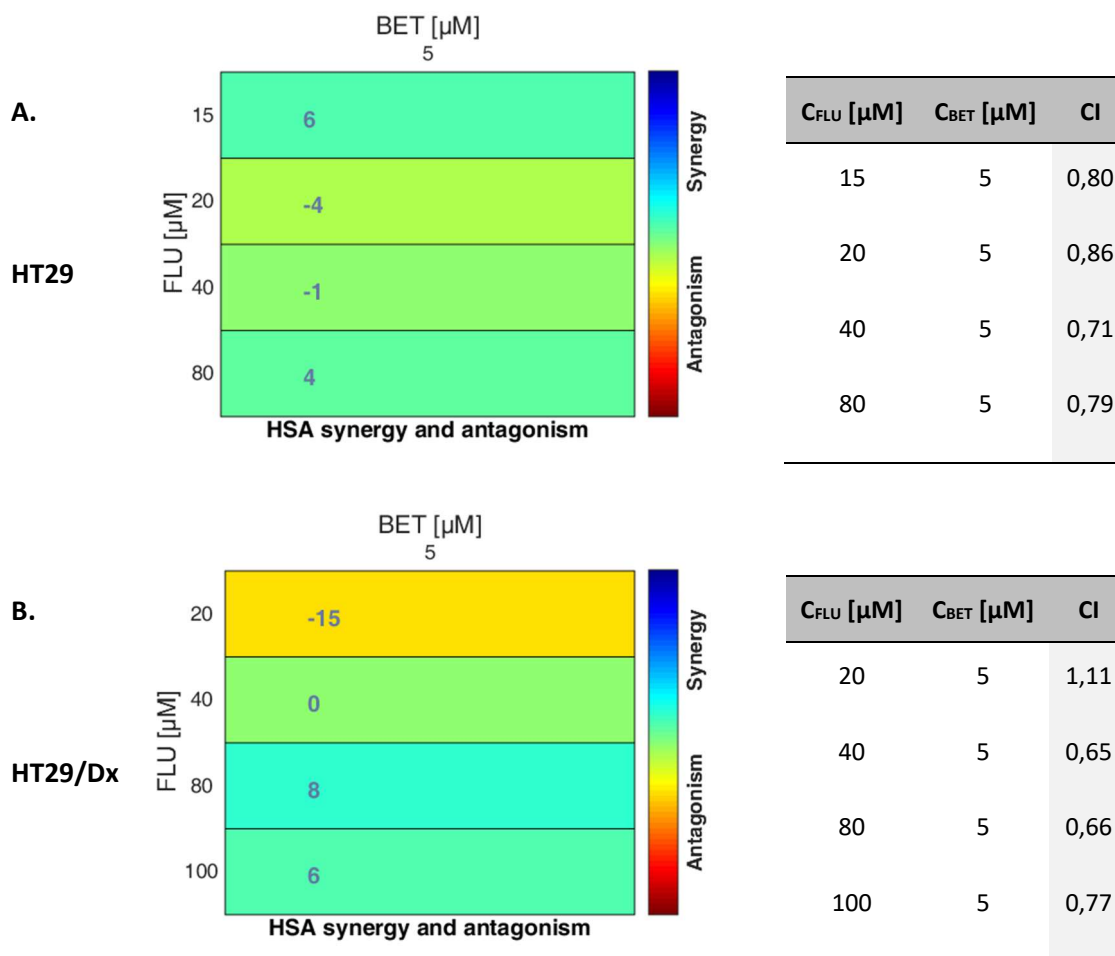
cytotoksyczną względem komórek raka jelita grubego, w przypadku linii komórkowej COLO205 wartość IC_{50} w obu przypadkach była niższa niż $10 \mu\text{M}$ (Tab. 19).

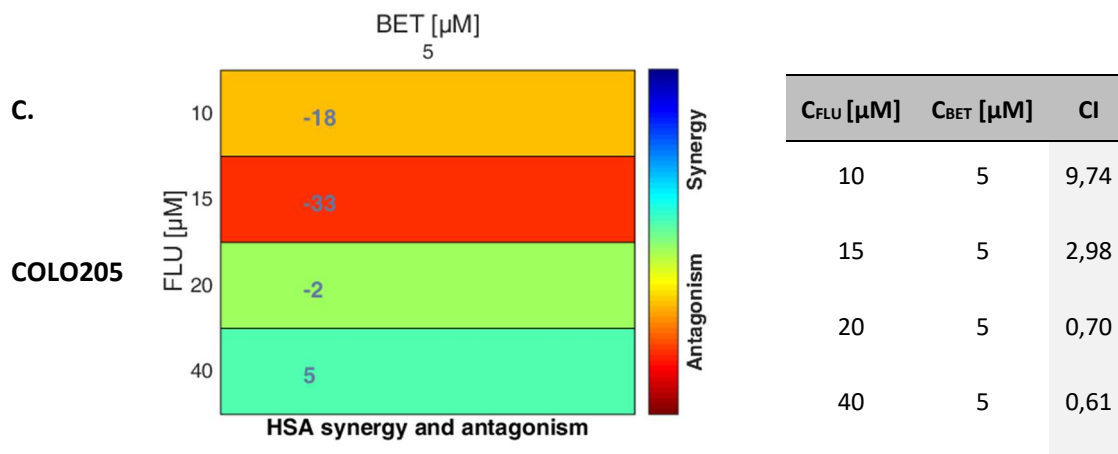




Rys. 15. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia FLU stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μM). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samej FLU, a FLU stosowanej z BET oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

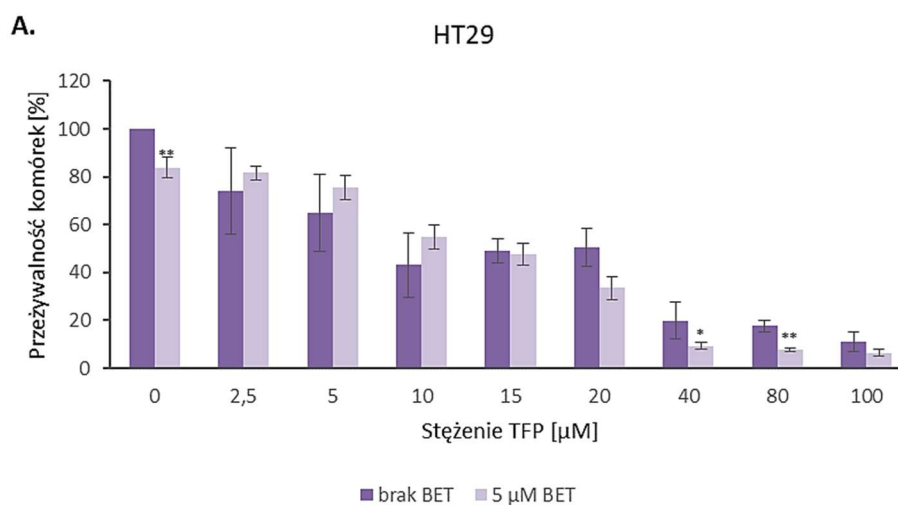
Tab. 22. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla FLU z BET uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).

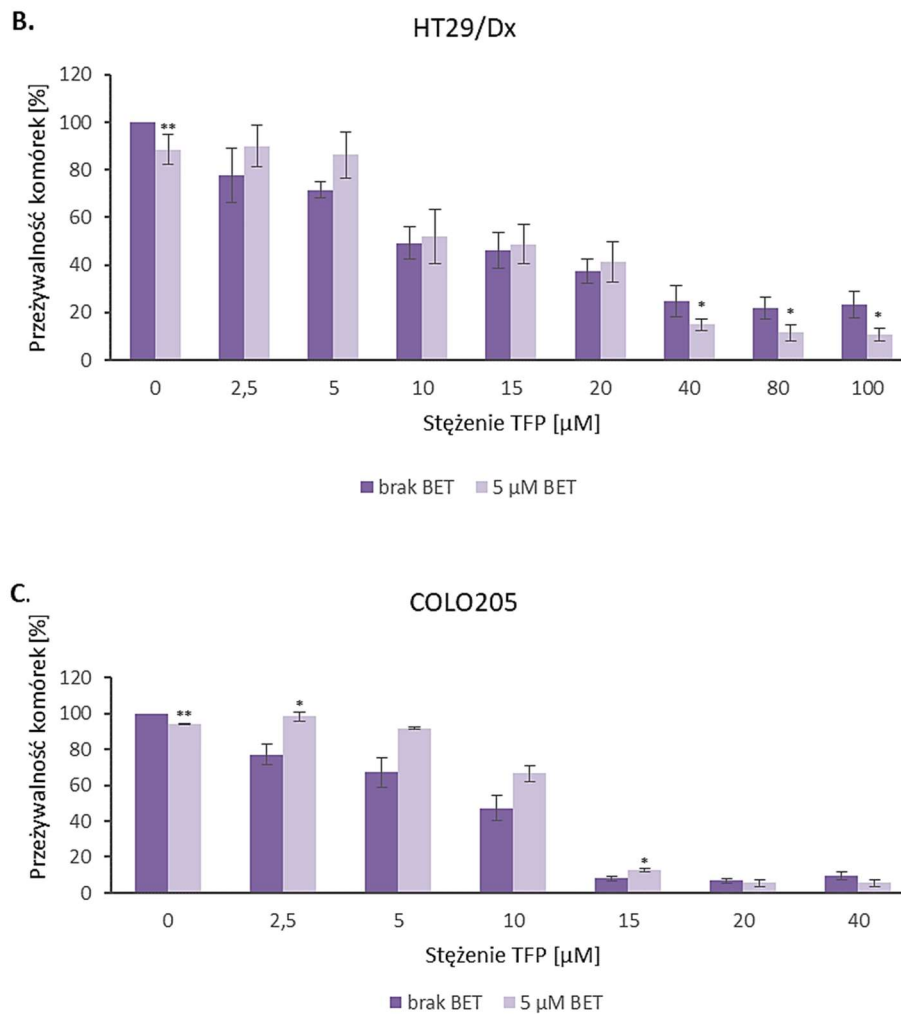




3.5.4. Trifluoperazyna

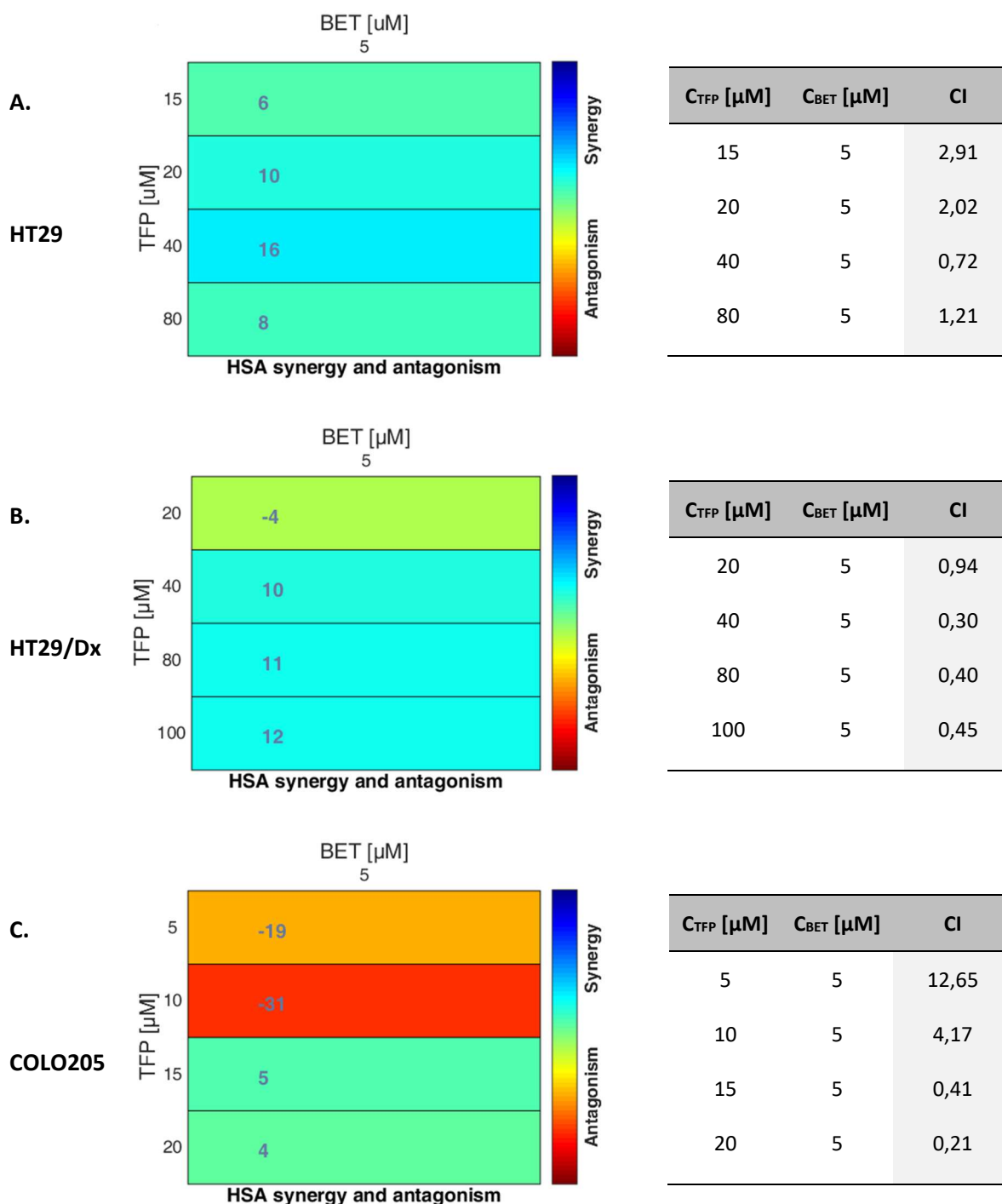
Efekt cytotoksyczny kombinacji TFP z BET wyraźnie zależał od stężenia TFP we wszystkich badanych liniach komórek RJG. W niższych stężeniach kombinacja związków powodowała mniejszą cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych w porównaniu z TFP zastosowaną pojedynczo. Z kolei, w stężeniach powyżej 20 μ M dla linii HT29, 40 μ M dla linii HT29/Dx oraz powyżej 15 μ M dla COLO205 zaobserwowano wyraźny synergizm działania TFP i BET oraz większą toksyczność mieszaniny niż pojedynczego związku (Rys. 16). Wartości stężenia hamującego wzrost komórek o 50% uległy zmniejszeniu. W linii HT29 wartość IC_{50} zmniejszyła się w obecności BET o połowę (z 21,37 do 10,41 μ M), w linii odpornej z 13,88 do 12,37 μ M, natomiast dla COLO205 z 4,91 do 3,87 μ M (Tab. 19). TFP posiadała wysoką aktywność cytotoksyczną względem komórek raka jelita grubego oraz wykazała synergiczne działanie z BET (Tab. 23).





Rys. 16. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia TFP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μM). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samej TFP, a TFP stosowanej z BET oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

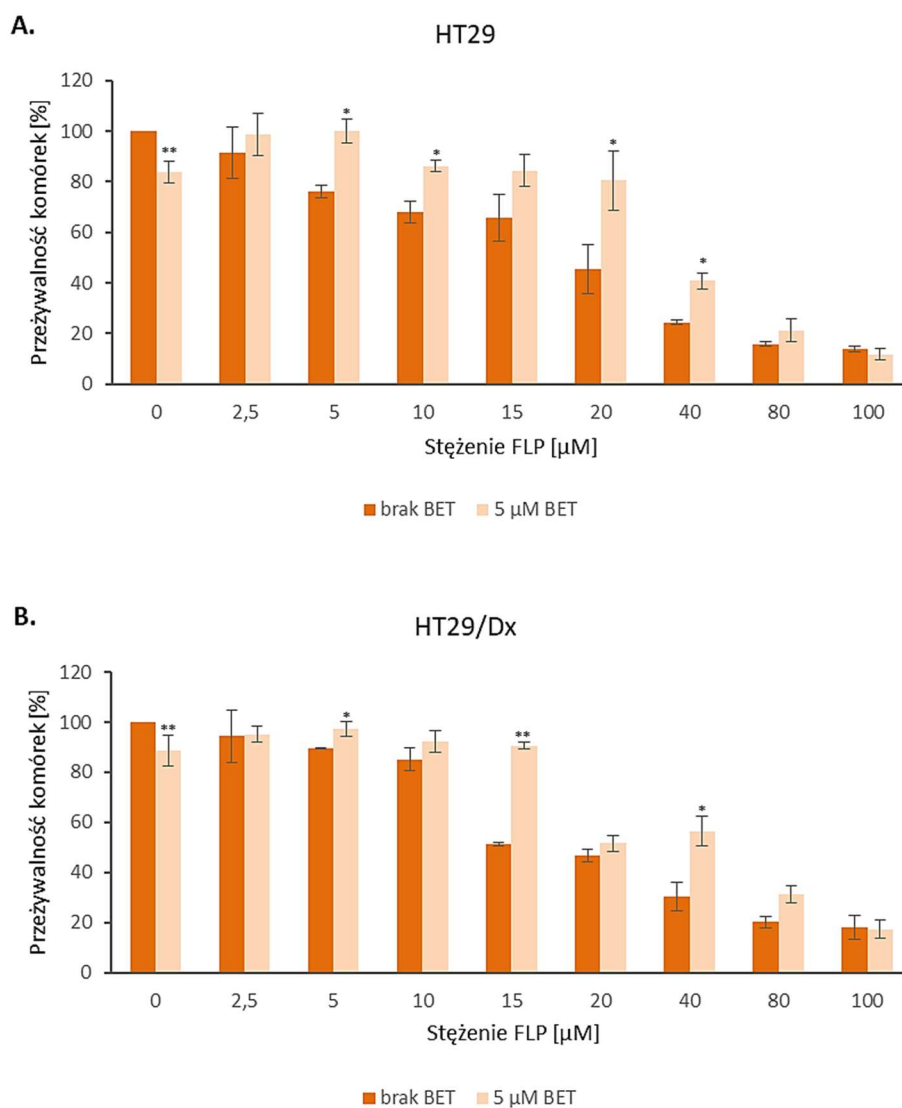
Tab. 23. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla TFP z BET uzyskane za pomocą programu CombeneFit (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).

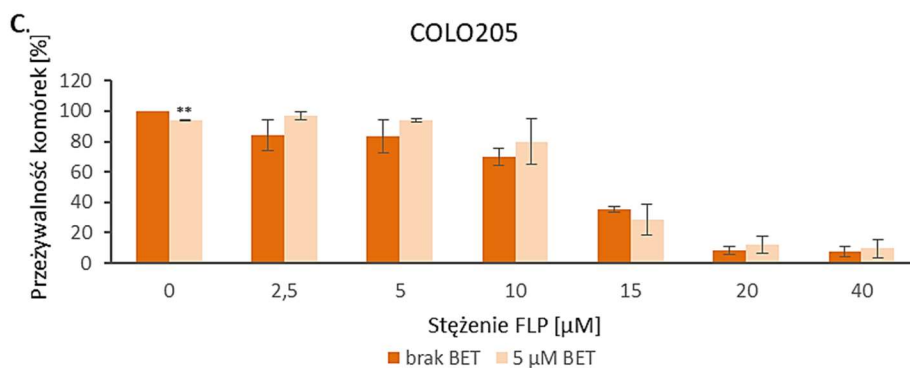


3.5.5. Flupentyksol

FLP zastosowany pojedynczo wykazywał średnią aktywność cytotoksyczną wobec komórek RJG. Dodanie BET zwiększyło przeżywalność komórek linii HT29 oraz HT29/Dx (Rys. 17A,B). Zastosowanie kombinacji z BET dla stężeń FLP od 2,5 do 80 μM wywołało efekt

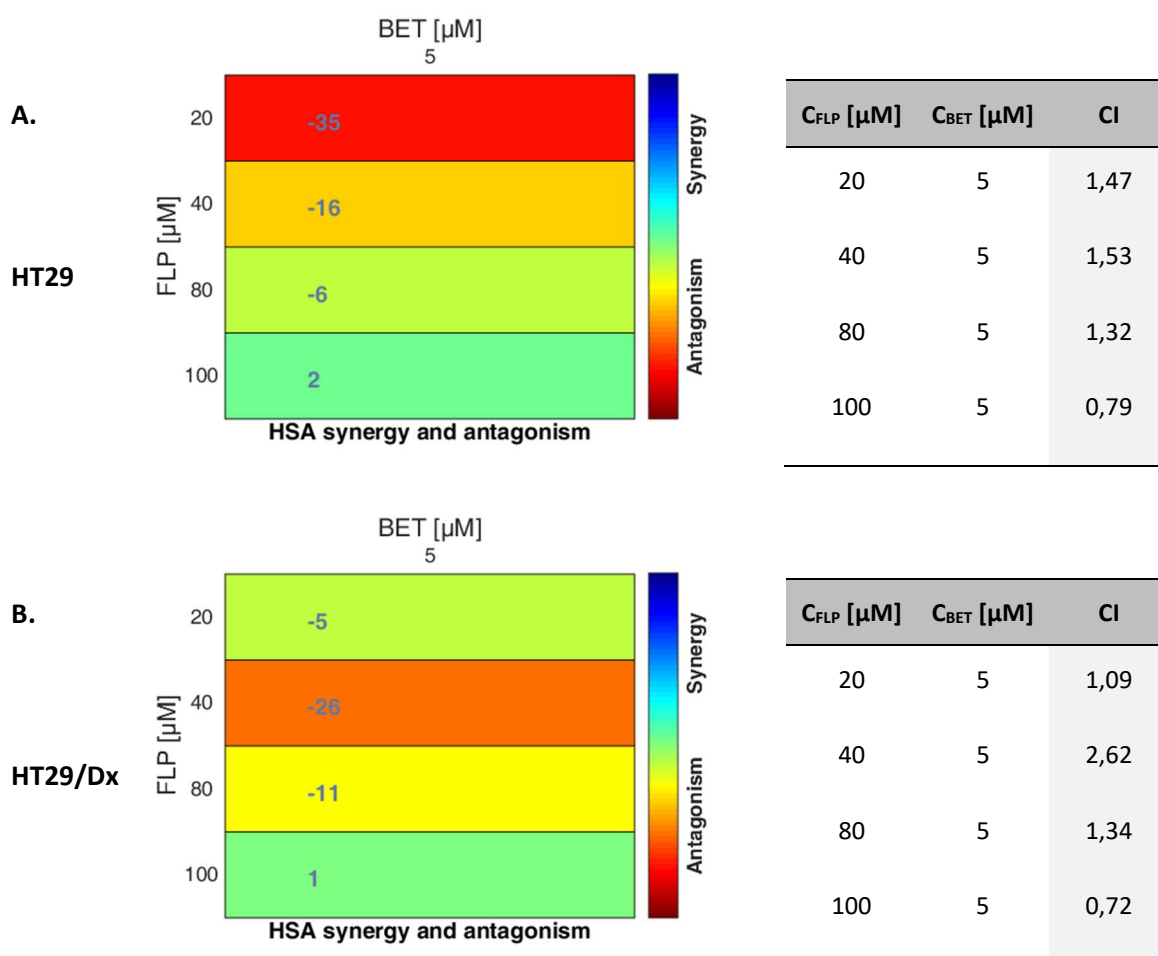
antagonistyczny w obu tych liniach, który jednak zanikał przy najwyższym badanym stężeniu FLP (100 μM) (Tab. 24A,B). Największą różnicę przy użyciu kombinacji FLP z BET względem samego FLP zaobserwowano przy stężeniu 20 μM dla linii HT29. Przeżywalność komórek w tym stężeniu wzrosła o 35% w porównaniu do samego FLP (Rys. 17A, Tab.24A). Dla linii HT29/Dx najwyższą różnicę (39%) w przeżywalności komórek zaobserwowano przy stężeniu FLP równym 15 μM (Rys. 17B, Tab. 24B). Należy zaznaczyć, że zastosowanie BET spowodowało prawie dwukrotny wzrost wartości IC_{50} dla linii odpornej (z 23,12 do 45,20 μM) i wzrost z 19,56 do 27,78 μM w przypadku linii HT29 ($p < 0,05$) (Tab. 19). Nieco inne oddziaływanie FLP z BET zaobserwowano w linii komórkowej COLO205. Użycie kombinacji związków nie spowodowało istotnej zmiany wartości IC_{50} w porównaniu z wartością wyznaczoną dla samego FLP (Tab. 19), natomiast oddziaływanie pomiędzy lekiem a modulatorem miało charakter addytywny (Tab. 24C).

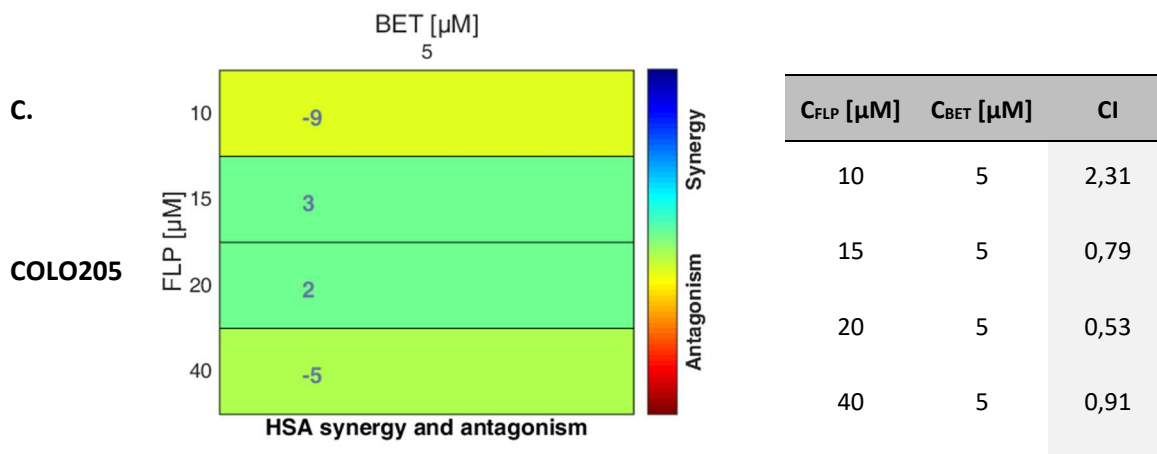




Rys. 17. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia FLP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μM). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samego FLP, a FLP stosowanego z BET oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

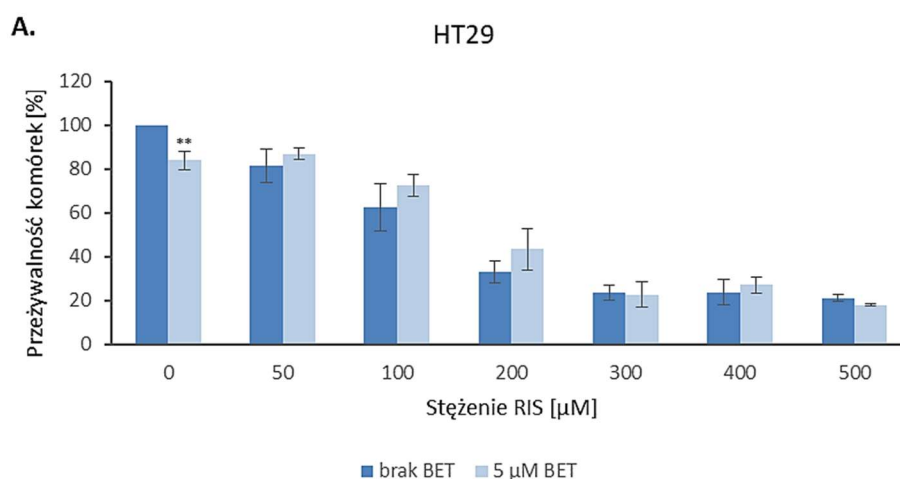
Tab. 24. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla FLP z BET uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabelki) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).

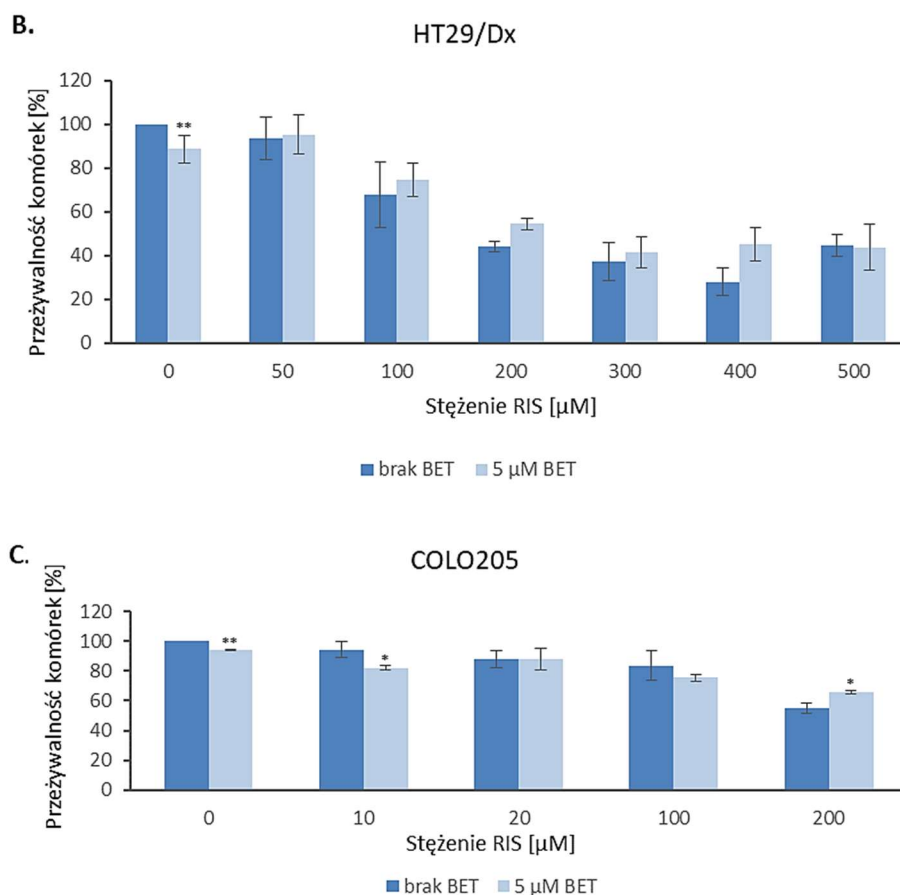




3.5.6. Rysperydon

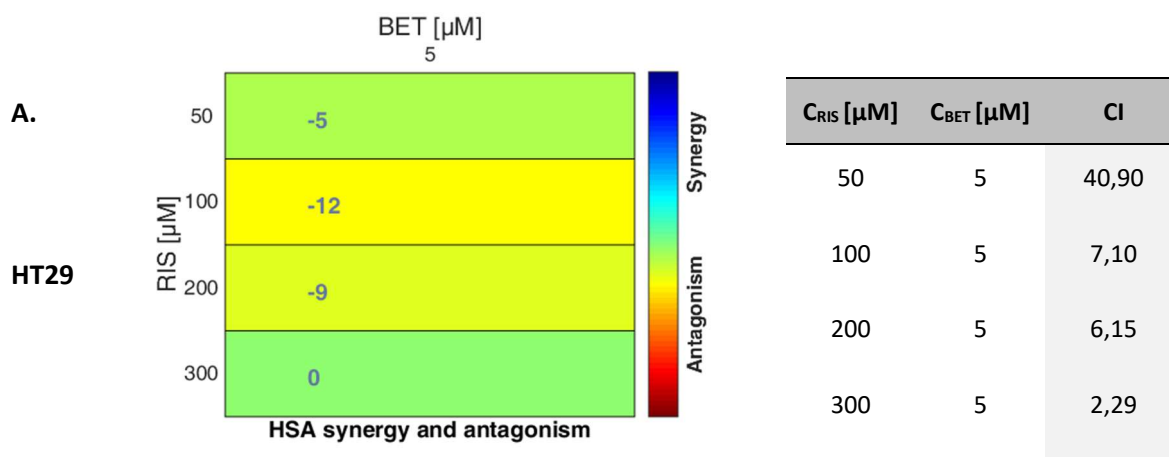
RIS posiada niską aktywność cytotoksyczną względem wszystkich badanych linii komórek nowotworowych (Rys. 18). W linii HT29 i HT29/Dx zastosowanie RIS w kombinacji z BET spowodowało, że w całym zakresie badanych stężeń leku przeżywalność komórek wzrosła jedynie nieznacznie. W obu tych liniach komórkowych pomiędzy RIS a BET obserwowano antagonizm działania (Tab. 25A,B). Dla linii COLO205 w niskich stężeniach (5-30 μM) zaobserwowano działanie synergistyczne kombinacji RIS z BET (Tab. 25C), jednak przy wyższych stężeniach efekt ten zanikał. Zastosowanie kombinacji RIS z terpenem trójcyklicznym nie spowodowało więc zwiększenia aktywności cytotoksycznej tego leku przeciwpyschotycznego.

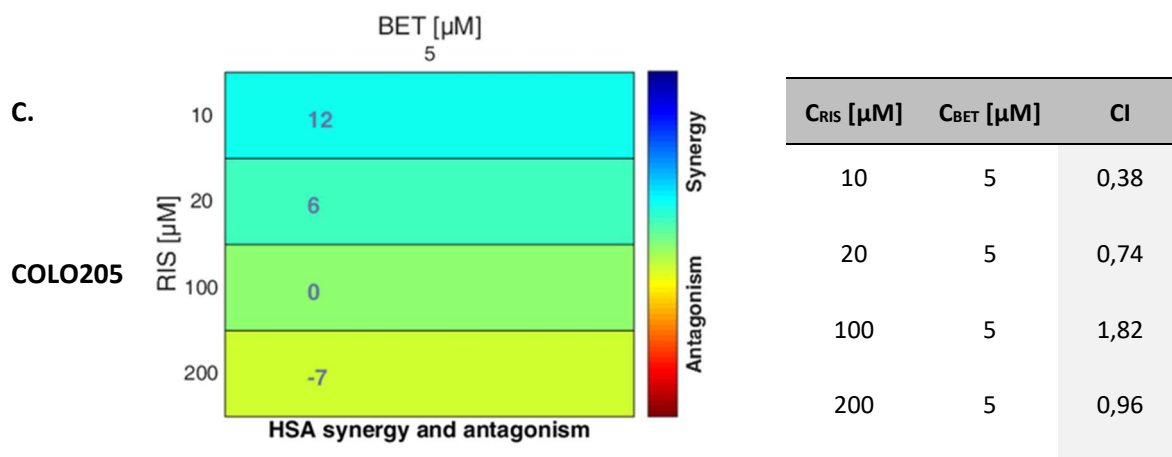
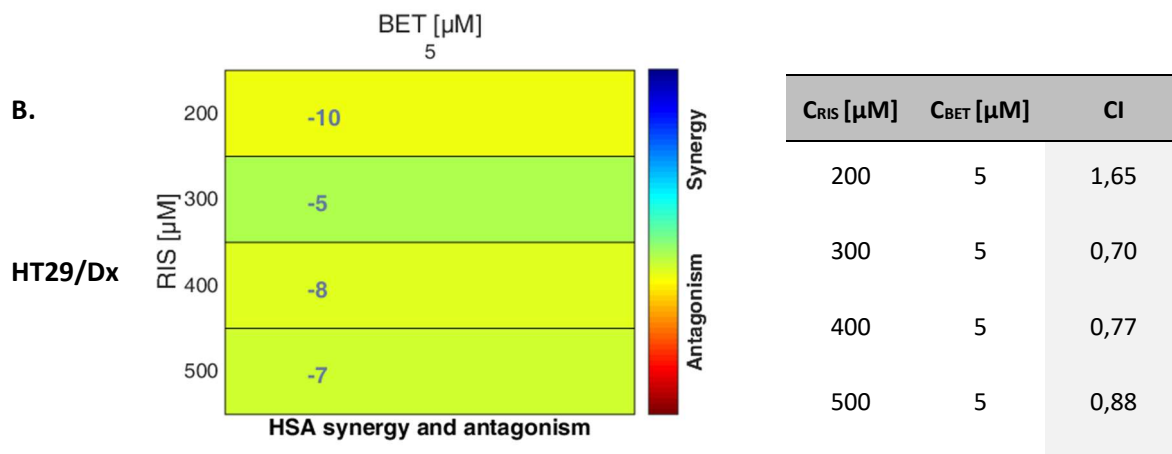




Rys. 18. Przeżywalności komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia RIS stosowanego samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μM). Istotność statystyczną pomiędzy wartościami otrzymanymi dla samego RIS, a RIS stosowanego z BET oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

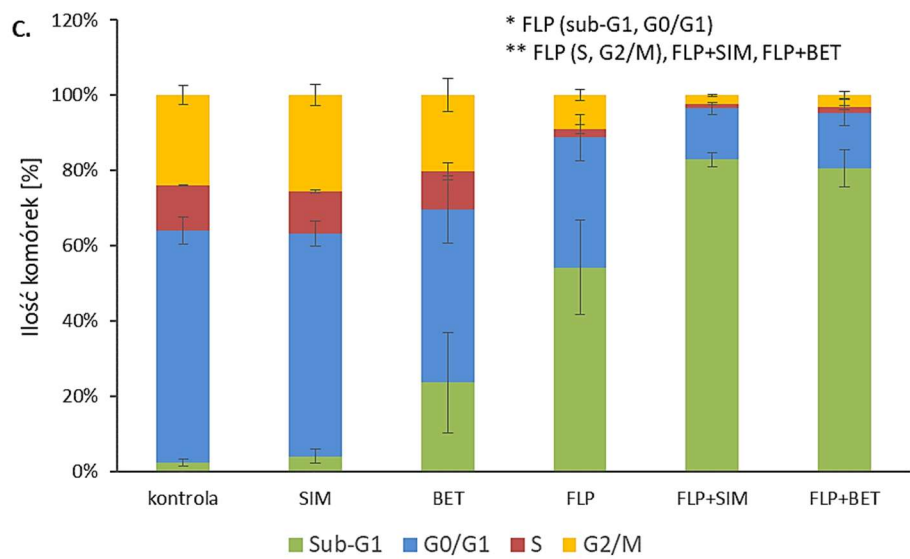
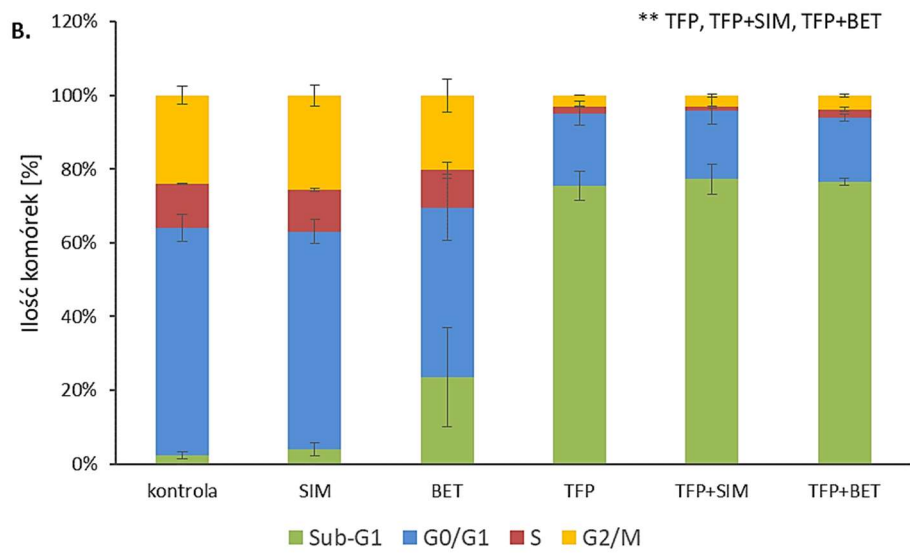
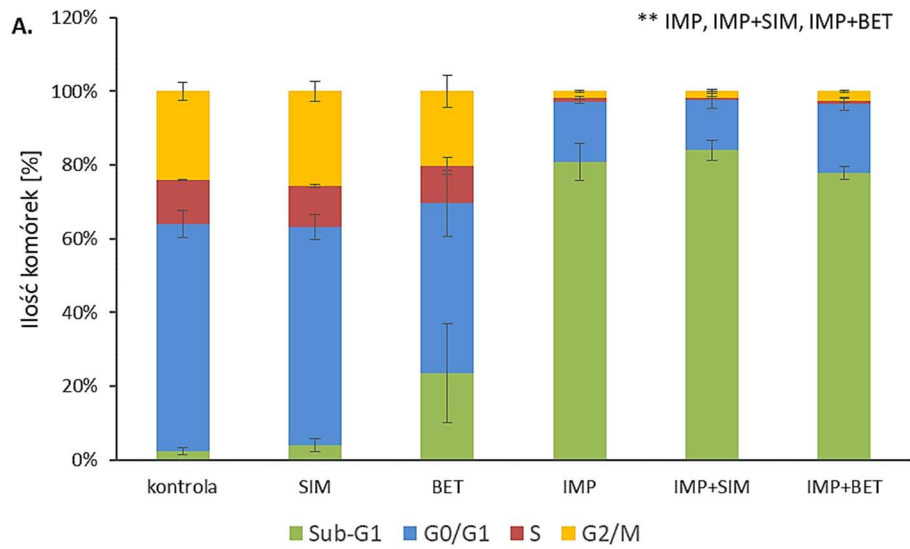
Tab. 25. Wartości indeksów kombinacji (CI) dla RIS z BET uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) i COLO205 (C).





3.6. Wpływ leków antypsychotycznych na cykl komórkowy

Do bardziej szczegółowej analizy przeciwnowotworowych właściwości leków, które w poprzednich doświadczeniach wykazały się synergia działania ze związkami redukującymi biosyntezę cholesterolu, wykorzystano cytometrię przepływową. Zbadano wpływ wybranych związków na cykl komórkowy i poziom reaktywnych form tlenu, a także ich zdolność do indukowania apoptozy w komórkach linii HT29. W celu zbadania wpływu FLP, IMP i TFP oraz ich kombinacji z SIM i BET na cykl życiowy komórek posłużono się metodą bazującą na pomiarze ilości DNA w komórce przy użyciu jodku propidyny. Komórki inkubowano z badanymi związkami (w stężeniu równym ich wartości IC_{50} , natomiast stężenie BET oraz SIM wynosiło $5 \mu M$) przez 48 godz., a następnie barwiono za pomocą jodku propidyny. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie oraz odchylenia standardowe z trzech niezależnych pomiarów (Rys. 19A-C).



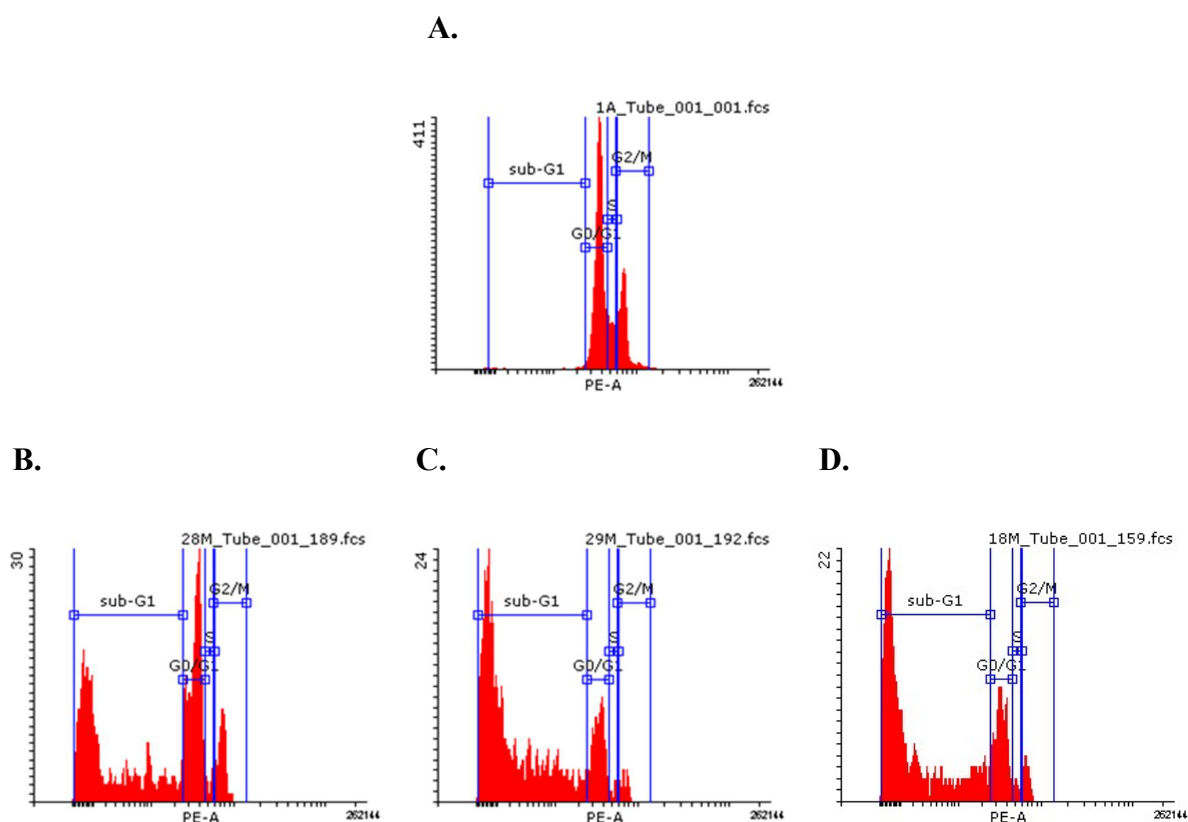
Rys. 19. Względny procentowy rozkład liczebności komórek linii HT29 znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego po 48 godz. inkubacji z IMP (A), TFP (B) oraz FLP (C). Wykresy zostały znormalizowane do 100%. Istotność statystyczną oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$) w nawiasie wymieniając poszczególne związki i fazy komórkowe, których ona dotyczy.

Badanie cyklu komórkowego pozwala nam na obserwację wpływu badanych związków na wzrost i podział komórek nowotworowych. W tym celu obserwowano zmiany w dystrybucji komórek w cyklu komórkowym w fazach: sub-G1, w której obserwujemy głównie martwe komórki, powstałe w wyniku nekrozy lub późnej apoptozy (zawierające uszkodzony materiał genetyczny), fazę G0/G1 to zdrowe komórki somatyczne, S w której następują procesy replikacji DNA oraz G2/M reprezentującą komórki zatrzymane w procesie mitozy, posiadające uszkodzone DNA. Podczas wymienionych faz cyklu zmianie ulega ilość komórkowego DNA. W przypadku fazy G1 komórki zawierają dwie kopie chromosomów ($2n$), w fazie S ilość kwasów nukleinowych wzrasta stopniowo i ulega podwojeniu w fazie G2/M ($4n$) przed następującą po niej mitozą. Komórki znajdujące się w fazie sub-G1 oznaczają populację ze zmniejszoną ilością DNA ($< 2n$).²⁰⁵

Badane leki antypsychotyczne zarówno zastosowane samodzielnie, jak i w kombinacji z SIM oraz BET, wpłynęły na wyraźny wzrost ilości komórek znajdujących się w fazie sub-G1. Obecność licznej populacji komórek HT29 w fazie sub-G1 stwierdzono w przypadku działania wszystkich trzech badanych związków. Było ich ok. 63% w obecności FLP, ok. 75% w obecności TFP i ponad 80% w obecności IMP. Wskazuje to na wysoką toksyczność badanych związków, co dodatkowo potwierdził wygląd hodowli. Komórki traktowane lekami wykazywały morfologiczne zmiany w porównaniu z komórkami nietraktowanymi związkami, tj. zmniejszoną objętość komórek i utratę przyczepności komórek względem podłoża oraz samych siebie. Zaobserwowano również znaczny spadek ilości komórek znajdujących się w fazie S oraz G2/M. Ilość komórek w fazie G2/M nie przekraczała 4% w próbkach traktowanych lekami (z wyłączeniem FLP dla którego w fazie G2/M znajdowało się 10% komórek), podczas gdy w tej fazie znajdowało się ponad 20% komórek w próbie kontrolnej. Wzrost frakcja komórek będących w fazie sub-G1 związana jest z obecnością komórek ze zdegradowanym DNA (apoptotycznych i nekrotycznych).

Zastosowanie SIM w stężeniu $5 \mu\text{M}$ nie spowodowało istotnych zmian w rozmieszczeniu komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w odniesieniu do kontroli. W

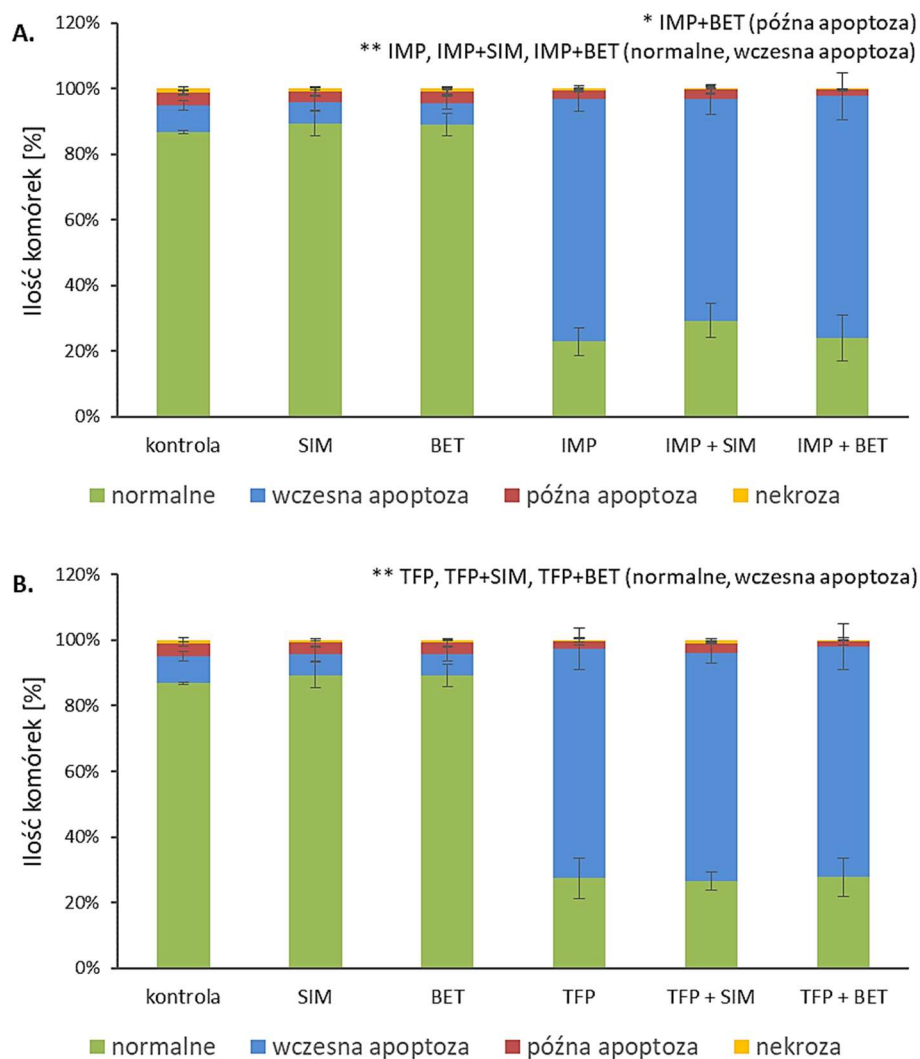
przypadku betuliny (w stężeniu 5 μM) zaobserwowano wzrost frakcji komórek w fazie sub-G1 cyklu komórkowego (ok. 20 %) przy jednoczesnym niewielkim spadku liczby komórek w fazie G0/G1 i G2/M. W przypadku IMP oraz TFP dodatkowe zastosowanie SIM oraz BET nie spowodowało widocznych zmian w dystrybucji komórek HT29 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (Rys. 19 A-B). Zupełnie inaczej wyglądało to w przypadku FLP, gdzie dodatkowe zastosowanie SIM czy BET spowodowało znaczny wzrost frakcji sub-G1 o prawie 20 punktów procentowych (w przypadku dodania SIM z około 63% do 83% natomiast w przypadku BET z 63% do 81%). Zastosowanie kombinacji FLP z SIM i FLP z BET spowodowało spadek populacji komórek HT29 w fazie G0/G1 o około 25 punktów procentowych (Rys. 19C). Opisane zmiany widoczne były również na otrzymanych histogramach (Rys. 20A-D).

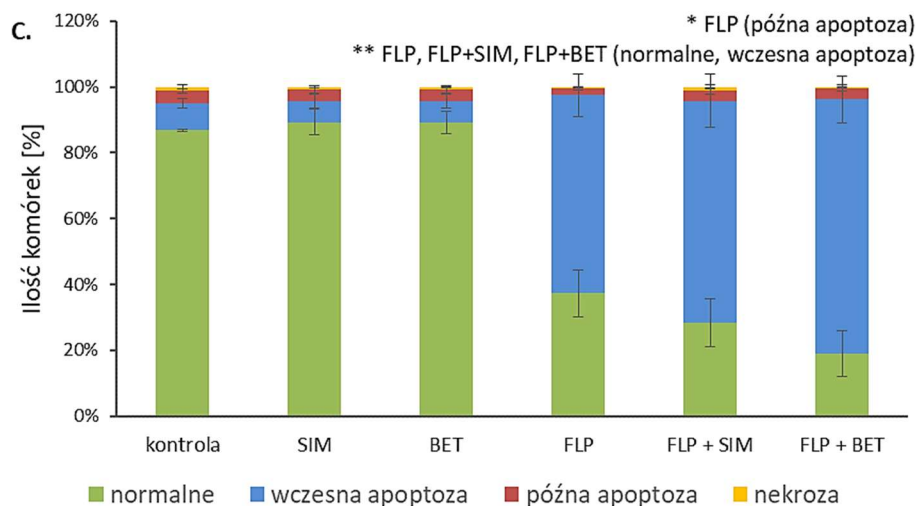


Rys. 20. Przykładowe histogramy przedstawiające dystrybucję komórek linii HT29 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego: A -populacja kontrolna komórek HT29 nietraktowana związkiem, B- komórki inkubowane z FLP, C-komórki inkubowane z FLP oraz SIM, D- komórki inkubowane z FLP oraz BET.

3.7. Wpływ leków antypsychotycznych na proces apoptozy

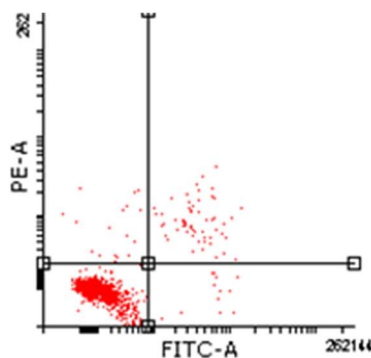
W celu oceny wpływu wybranych leków na indukcję śmierci komórkowej, komórki HT29 barwiono fluorescencyjnie znakowaną aneksyną V oraz jodkiem propidyny (PI). Aneksyna V łączy się z fosfatydyloseryną, która pojawia się w zewnętrznej monowarstwie błony komórkowej na początku fazy wykonawczej apoptozy.²⁰⁶ Komórki emitujące światło fluorescencyjne w zakresie zielonym są więc komórkami apoptotycznymi o nienaruszonej jeszcze integralności błony. DNA komórek znajdujących się w późnej fazie apoptozy oraz nekrotycznych barwiony jest dodatkowo przez jodek propidyny (emituje światło w zakresie czerwonym), który wnika do wnętrza komórek poprzez uszkodzoną błonę komórkową. Komórki inkubowano przez 48 godz. z badanym związkiem bądź kombinacją związków. Zastosowano stężenia równe wartości IC_{50} dla FLP, TFP, IMP, natomiast w przypadku BET i SIM stężenie wynosiło 5 μ M.





Rys. 21. Procentowy rozkład komórek linii HT29: normalnych, nekrotycznych bądź znajdujących się w stanie wczesnej lub późnej apoptozy inkubowanych z IMP (A), TFP (B) oraz FLP (C). Wyniki zaprezentowano za pomocą średniej arytmetycznej i odchyłeń standardowych uzyskanych z trzech powtórzeń.

Komórki obserwowane w tym badaniu dzielone są na następujące frakcje: komórki żywe, czyli nie wiążące się zarówno z aneksyną V jak i PI (kwadrant dolny lewy), komórki nekrotyczne łączące się z tylko z PI (kwadrant górny lewy), komórki znajdujące się w wczesnej apoptozie barwiące się jedynie aneksyną V (kwadrant dolny prawy) oraz komórki w stadium późnej apoptozy, które łączą się z oboma odczynnikami (kwadrant górny prawy)²⁰⁵ (Rys. 22).



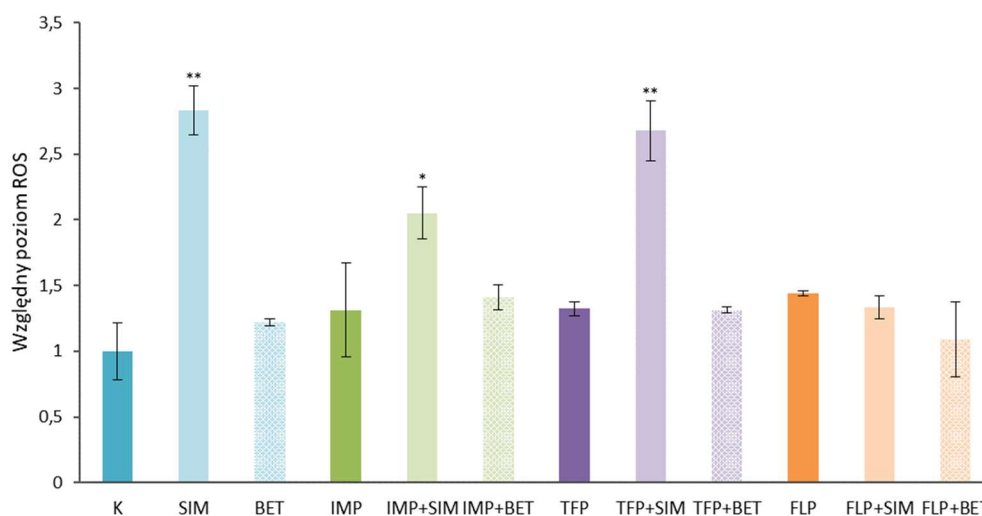
Rys. 22. Przykładowy wykres przedstawiający rozkład komórek linii HT29 otrzymany w teście z aneksyną oraz PI dla populacji kontrolnej komórek HT29 nietraktowanych związkiem.

Uzyskane wyniki wykazały, że ani SIM ani BET zastosowane samodzielnie nie wpłynęły znacząco na proces indukcji apoptozy w komórkach HT29. Z kolei, badane leki antypsychotyczne i lek antydepresyjny uruchamiały proces apoptozy, czego wynikiem jest znaczny wzrost populacji komórek znajdujących się w fazie wczesnej apoptozy. W przypadku

FLP frakcja tych komórek wzrosła o ponad 50 punktów procentowych względem kontroli nietraktowanej związkami, natomiast dla TFP oraz IMP o ponad 60. W obecności FLP oraz SIM populacja komórek apoptotycznych wzrosła o około 10 punktów procentowych względem samego FLP, a w przypadku połączenia FLP z BET wzrost ten wynosił około 16 punktów procentowych (Rys. 21C). Połączenie TFP zarówno z SIM, jak i z BET praktycznie nie spowodowało zmian w liczebności komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych w porównaniu z zastosowaniem pochodnej fenotiazyny samodzielnie (Rys. 21B). W przypadku IMP, jej połączenie z BET również nie wywołało widocznych zmian w liczebności poszczególnych populacji komórek HT29 (Rys. 21A). Z kolei w próbkach traktowanych łącznie IMP oraz SIM zauważono niewielki wzrost liczby komórek żywych, połączony ze spadkiem liczby komórek apoptotycznych w porównaniu z zastosowaniem samej IMP.

3.8. Wpływ leków antypsychotycznych na poziom reaktywnych form tlenu

Poziom reaktywnych form tlenu (ROS) zmierzono przy użyciu diocjanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA). Sonda ta wnika do komórki, gdzie jest hydrolizowana przez esterazy do DCFH (2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny). Związek ten ulega następnie procesom utlenienia przez wewnątrzkomórkowe ROS, w wyniku czego powstaje produkt zdolny do emisji promieniowania – DCF (2',7'-dichlorofluoresceina). Pomiar intensywności fluorescencji tego produktu daje możliwość zbadania wpływu związków na produkcję ROS wewnątrz komórki. Analogicznie jak w poprzednich eksperymentach, komórki HT29 inkubowano ze związkami przez 48 godz., leki podawano w stężeniu równym ich IC₅₀, a SIM i BET w stężeniu 5 μM.

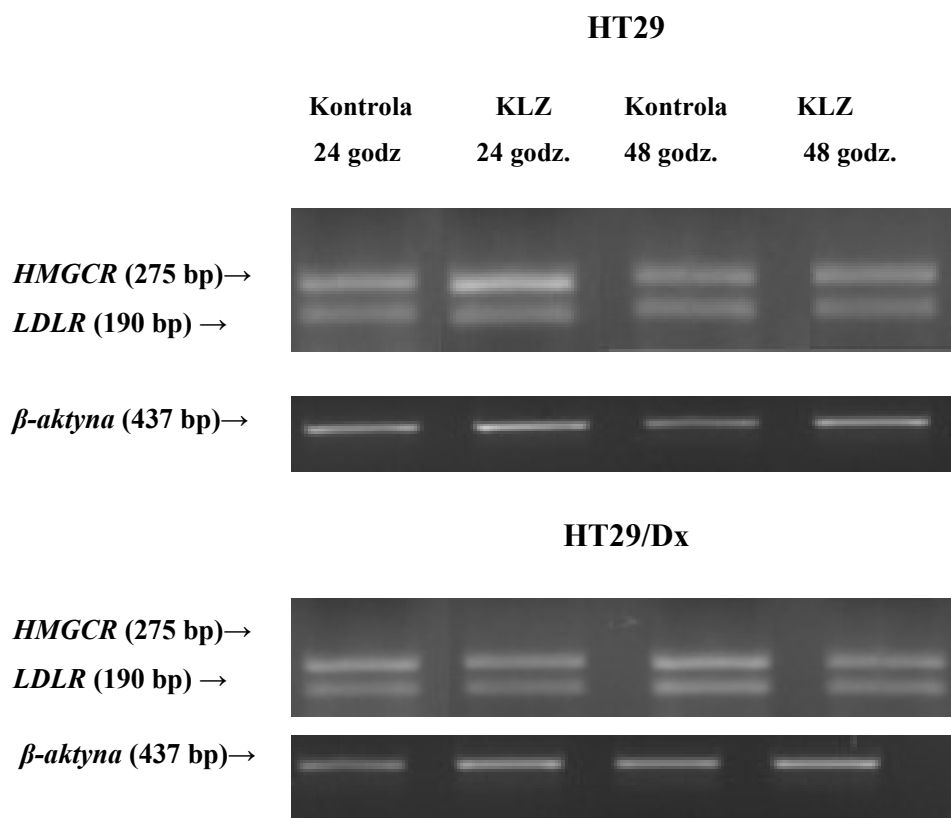


Rys. 23. Względny poziom reaktywnych form tlenu w komórkach linii HT29 inkubowanych ze związkami. Wartości istotnie różniące się od kontroli nietraktowanej związkiem (K) oznaczono: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

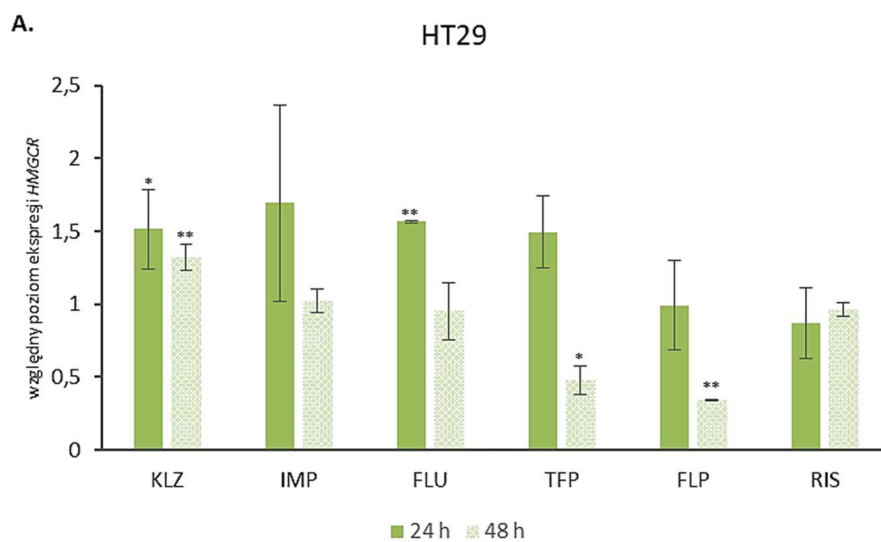
Wyniki przedstawione na Rys. 23 pokazują, że jedynie SIM podniosła poziom ROS w komórkach w linii HT29 w sposób znaczący. BET, a także leki antypsychotyczne stosowane samodzielnie powodowały lekki wzrost poziomu ROS w komórkach, który jednak nie był istotny statystycznie. Równoczesne podanie TFP z SIM oraz IMP z SIM również spowodowało istotne podniesienie poziomu ROS, nie był on jednak większy niż dla samej SIM. Zarówno połączenie FLP z SIM, jak i wszystkich badanych leków z BET nie skutkowało zmianą poziomu ROS w porównaniu z kontrolą. Porównanie względnego poziomu ROS otrzymanego dla pojedynczych leków, a ich mieszanek z SIM i BET wykazało, że jedynie zastosowanie TFP z SIM spowodowało istotny statystycznie wzrost poziomu ROS względem samego TFP ($p < 0,05$). Wszystkie związki posiadały aktywność prooksydacyjną, co jest korzystną cechą w przypadku potencjalnego zastosowania ich do zwalczania komórek nowotworowych. Związki zdolne do generowania ROS mogą pobudzać procesy odpowiedzialne za uszkodzenia DNA w komórce, prowadząc do jej śmierci w wyniku apoptozy.

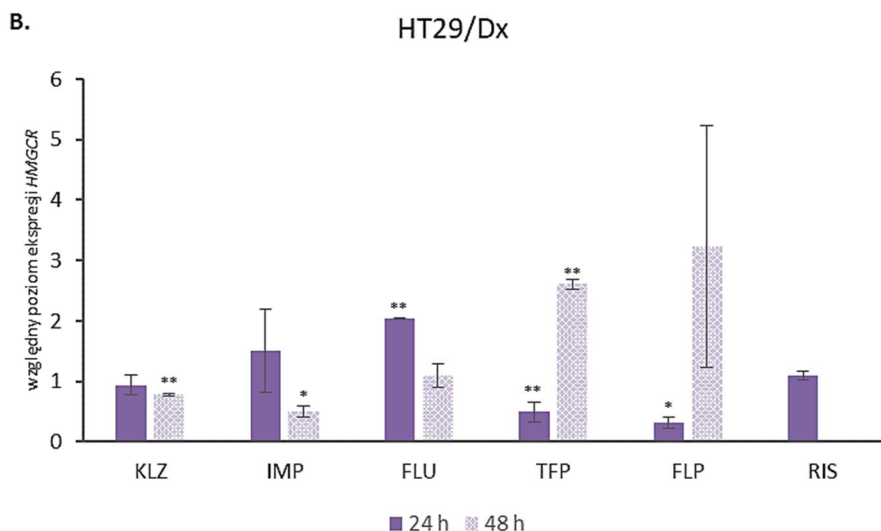
3.9. Ekspresja genów zaangażowanych w biosyntezę cholesterolu

Ponieważ istnieją doniesienia, że niektóre leki antypsychotyczne mogą wpływać na ekspresję genów zaangażowanych w biosyntezę cholesterolu w komórce, następnym etapem badań było sprawdzenie wpływu wyselekcjonowanych związków na poziom ekspresji dwóch genów kontrolowanych przez czynnik transkrypcyjny SREBP-2. W tym celu za pomocą metody RT-PCR określono poziom ekspresji genów lipogennych w komórkach linii HT29 i HT29/Dx. Komórki inkubowano w obecności wybranych związków przez 24 i 48 godz. w stężeniu odpowiadającym ich wartości IC_{50} . Otrzymane w wyniku reakcji RT-PCR cDNA poddano elektroforezie w żelu agarozowym. Po rozdziale i wybarwieniu, mierzono intensywność fluorescencji emitowanej z poszczególnych prążków. Zmierzona intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do ilości DNA w próbce. Przykładowy elektroforegram przedstawiono na Rys.24. Poziom ekspresji genów określono poprzez porównanie intensywności fluorescencji badanych próbek względem próbki kontrolnej nietraktowanej związkiem, dla której przyjęto poziom ekspresji genów jako równy 1. Wyniki przedstawiono za pomocą średnich i odchylenia standardowego z 3 niezależnych pomiarów.



Rys. 24. Przykładowy elektroforegram przedstawiający poziom ekspresji genów *HMGCR*, *LDLR* oraz genu referencyjnego *β-aktyny* w komórkach HT29 oraz HT29/Dx inkubowanych w obecności KLZ.

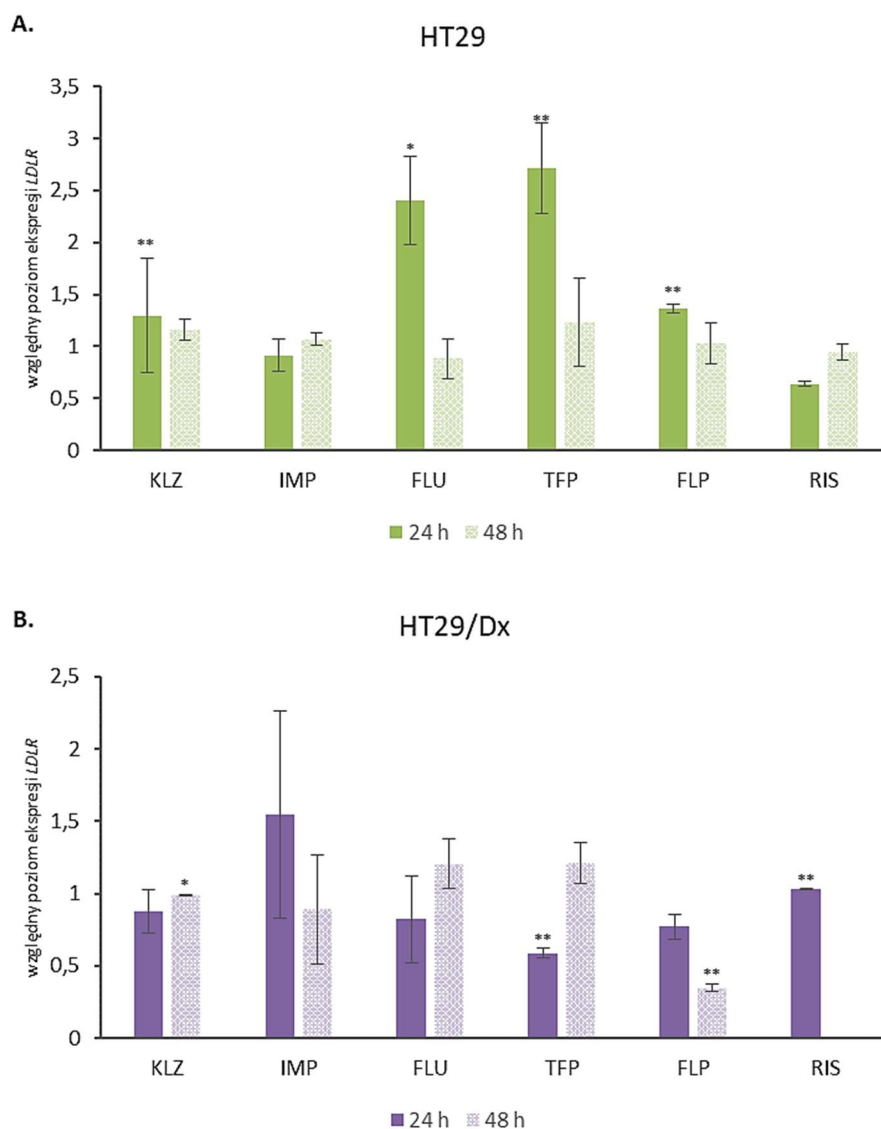




Rys. 25. Poziom ekspresji *HMGCR* w komórkach linii HT29 (A) oraz linii HT29/Dx (B) po 24 i 48 godz. inkubacji ze związkami w stężeniu równym wartości IC_{50} , w przypadku IMP użyto stężenia IC_{25} . Istotność statystyczną badanych prób traktowanych związkiem względem kontroli oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

Jak przedstawiono na Rys. 25A poziom ekspresji genu *HMGCR* kodującego reduktazę HMG-CoA w komórkach linii HT29 po 24 godz. inkubacji wzrósł istotnie dla FLU oraz KLZ (około 1,5x) względem kontroli nietraktowanej związkami. Podobny wzrost zaobserwowano dla IMP oraz TFP, jednak wyniki nie wykazały istotności statystycznej. FLP i RIS nie spowodowały zmiany w ekspresji tego genu względem kontroli. Z kolei po 48 godz. inkubacji zaobserwowano istotny spadek ekspresji genu *HMGCR* o ponad połowę dla FLP oraz TFP, podczas gdy w przypadku KLZ utrzymała się podwyższona ekspresja genu reduktazy (o ok. 1,3x względem kontroli). Pozostałe związki: FLU, IMP oraz RIS nie wykazały istotnych zmian w ekspresji badanego genu po dwóch dobach inkubacji.

Dla linii HT29/Dx po 24 godz. inkubacji związków zaobserwowano dwukrotny wzrost ekspresji *HMGCR* dla FLU oraz istotny spadek o ponad połowę dla FLP i TFP. Inne badane leki: IMP, KLZ i RIS nie wpływały na poziom ekspresji tego genu po 24 godz. (Rys. 25B). Kiedy komórki HT29/Dx inkubowane były z lekami antypsychotycznymi przez 48 godz., zaobserwowano prawie 3-krotny wzrost poziomu ekspresji badanego genu dla TFP i ponad 3-krotny dla FLP. Natomiast KLZ oraz IMP spowodowały istotne obniżenie względnego poziomu ekspresji *HMGCR*. Wpływ FLU był podobny jak w linii HT29 – związek ten indukował wzrost ekspresji genu *HMGCR* po 24 godz. inkubacji, która po dłuższym czasie (48 godz.) spadała, lecz nie różniła się znacznie od kontroli.



Rys. 26. Poziom ekspresji *LDLR* w komórkach linii HT29 (A) oraz HT29/Dx (B) po 24 i 48 godz. inkubacji ze związkami w stężeniu równym wartości IC_{50} , w przypadku IMP użyto stężenia IC_{25} . Istotność statystyczną badanych prób traktowanych związkiem względem kontroli oznaczono: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

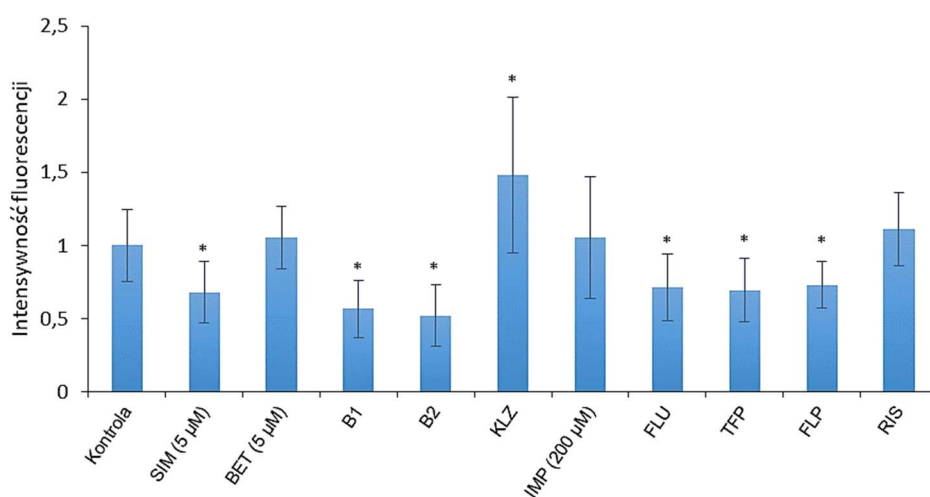
Poziom ekspresji genu kodującego receptor lipoproteiny o małej gęstości (LDL) w komórkach linii HT29 po jednej dobie inkubacji z badanymi związkami wykazał najwyższy wzrost 2,4 i 2,7-krotny odpowiednio pod wpływem FLU i TFP. Również FLP oraz KLZ zwiększały ekspresję badanego genu (ponad 1,3 raza). Brak istotnych zmian względem kontroli zaobserwowano dla IMP, zaś RIS powodował spadek ekspresji, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie. Po 48 godz. inkubacji komórek linii HT29 ze związkami obserwowane wcześniej efekty zanikły, żaden z leków nie powodował istotnych statystycznie zmian w

poziomie względnej ekspresji genu *LDLR*, uzyskane wyniki mieściły się w zakresie 0,9- 1,3 (Rys. 26A).

Wpływ badanych związków na względny poziom ekspresji genu *LDLR* w komórkach linii HT29/Dx był niewielki (Rys. 26B). Po 24 godz. inkubacji obserwowano obniżenie poziomu ekspresji tylko dla TFP oraz niewielki wzrost dla IMP (nieistotny statystycznie). Po 48 godz. inkubacji nie zanotowano wpływu żadnego z badanych leków na badany parametr, z wyjątkiem FLP, który powodował istotny spadek względnego poziomu ekspresji genu *LDLR* o ponad połowę.

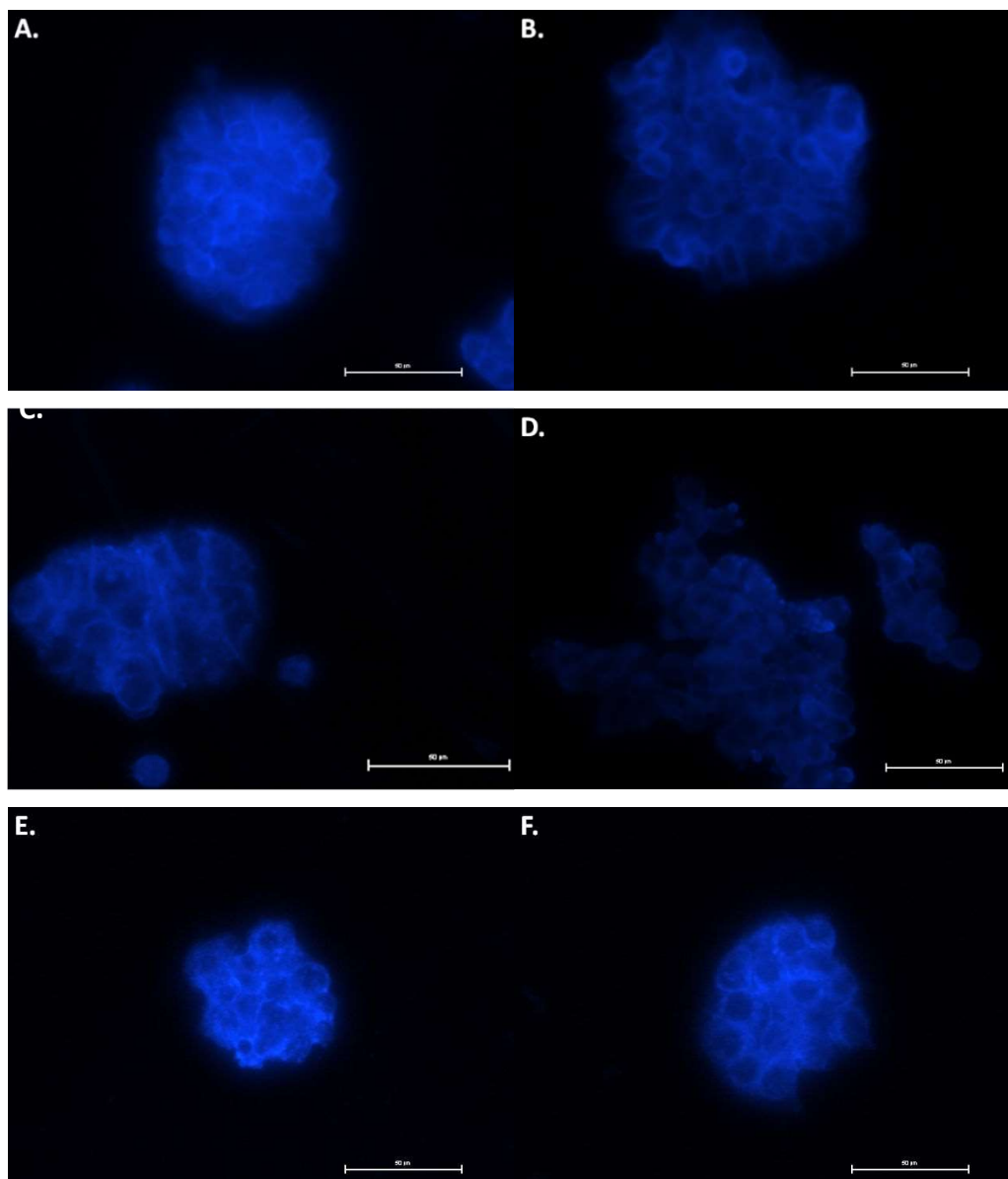
3.10. Analiza ilości wolnego cholesterolu w komórkach HT29

Barwienie komórek linii HT29 filipiną posłużyło do zbadania zmiany poziomu wolnego (niezwiązanego) Chol w komórkach inkubowanych z badanymi związkami. Ten antybiotyk polienowy o właściwościach fluorescencyjnych posiada silne powinowactwo do niezestryfikowanego Chol i jest powszechnie stosowany w celu określenia jego poziomu i rozmieszczenia w komórkach za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Intensywność fluorescencji filipiny jest skorelowana z poziomem cholesterolu w komórkach linii HT29. Komórki przed poddaniem barwieniu utrwalono aby uniknąć cytotoksycznego wpływu samej filipiny na komórki, związanego z jej zdolnością do zaburzania integralności błon komórkowych.²⁰⁷



Rys. 27. Względna intensywność fluorescencji filipiny w komórkach HT29 inkubowanych przez 48 godz. z badanymi związkami. Dla związków bez zaznaczonego stężenia użyto wartości odpowiadającej IC_{50} . Istotnie statystycznie wartości względem kontroli oznaczono: * ($p < 0,05$).

Wyniki analizy otrzymanych obrazów przedstawiono na Rys. 27. Jak widać, większość badanych związków nie wpływała w sposób istotny na poziom cholesterolu w komórkach HT29. Jedynie KLZ spowodowała około 1,5-krotny wzrost intensywności fluorescencji filipiny w porównaniu z komórkami nietraktowanymi związkami. Z kolei dla SIM zastosowanej w stężeniu 5 μ M zaobserwowano istotny statystycznie spadek intensywności fluorescencji filipiny. Podobny spadek intensywności fluorescencji zanotowano także dla B1, B2, FLP, FLU i TFP, co może świadczyć o ich zdolności do obniżania stężenia wolnego cholesterolu w komórkach linii HT29. Na Rys. 28 pokazano przykładowe zdjęcia komórek HT29 wybarwionych za pomocą filipiny. Jak widać intensywnemu wybarwieniu ulegały powierzchnie komórek, podczas gdy intensywność fluorescencji pochodząca z wnętrza komórek była zdecydowanie mniejsza. Co warto zauważyć, w przypadku TFP, FLP oraz B1 obserwowano również zmianę obrazu komórek w stosunku do komórek kontrolnych. W komórkach nietraktowanych związkami oraz traktowanych innymi lekami rozkład fluorescencji w komórkach wydawał się równomierny, podczas gdy w próbkach inkubowanych w obecności TFP, FLP i B1 obserwowano pojawienie się niejednorodności w wybarwieniu, tak jakby w niektórych miejscach na powierzchni błony pojawiały się obszary wzbogacone w filipinę, a co za tym idzie – również w cholesterol.



Rys. 28. Przykładowe zdjęcia komórek linii HT29 barwionych filipiną po 48 godz. inkubacji z badanymi związkami. Długość paska skali wynosi 50 μm , zdjęcia wykonano przy użyciu powiększenia 40x. Warunki oświetlenia i ekspozycji były identyczne w każdym przypadku. A- kontrola nietraktowana związkiem, B- komórki z SIM (5 μM), C- komórki z B1, D, E, F- komórki inkubowane odpowiednio z: FLU, TFP, FLP.

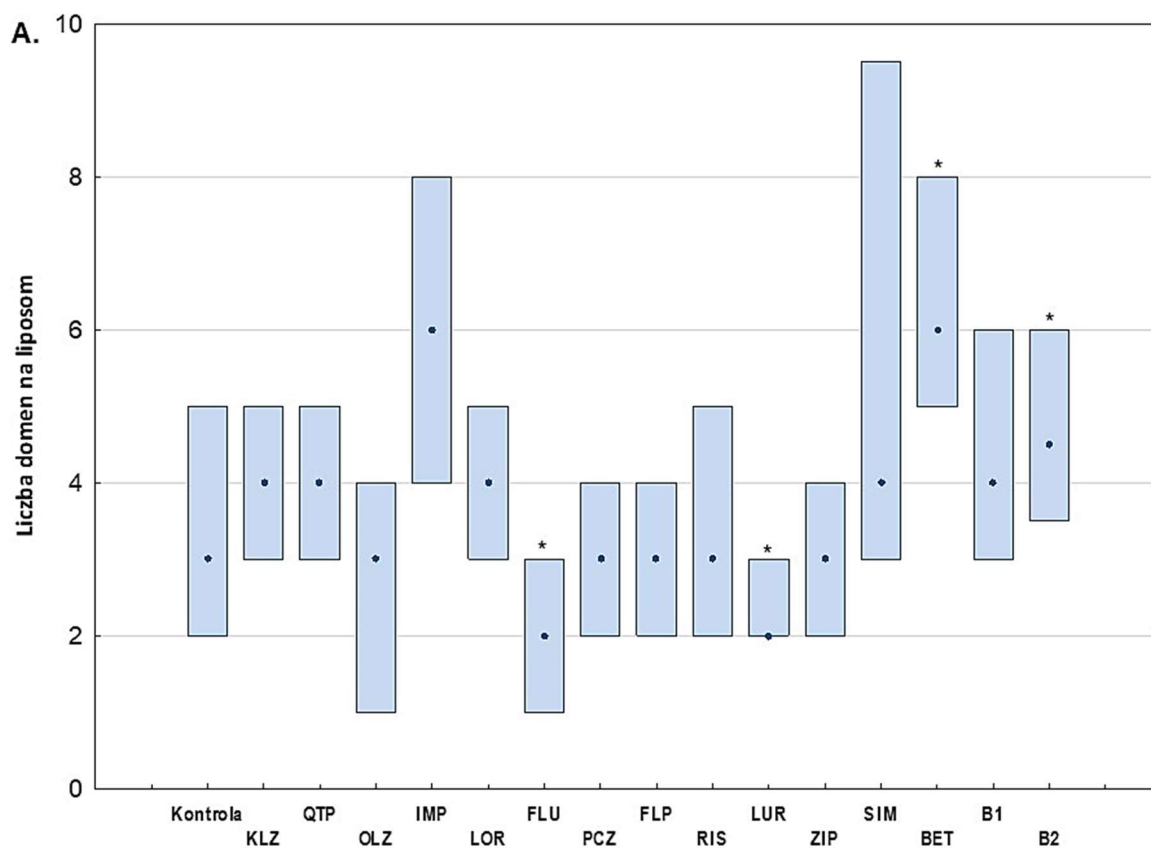
3.11. Wpływ badanych związków na mikrodomeny błonowe

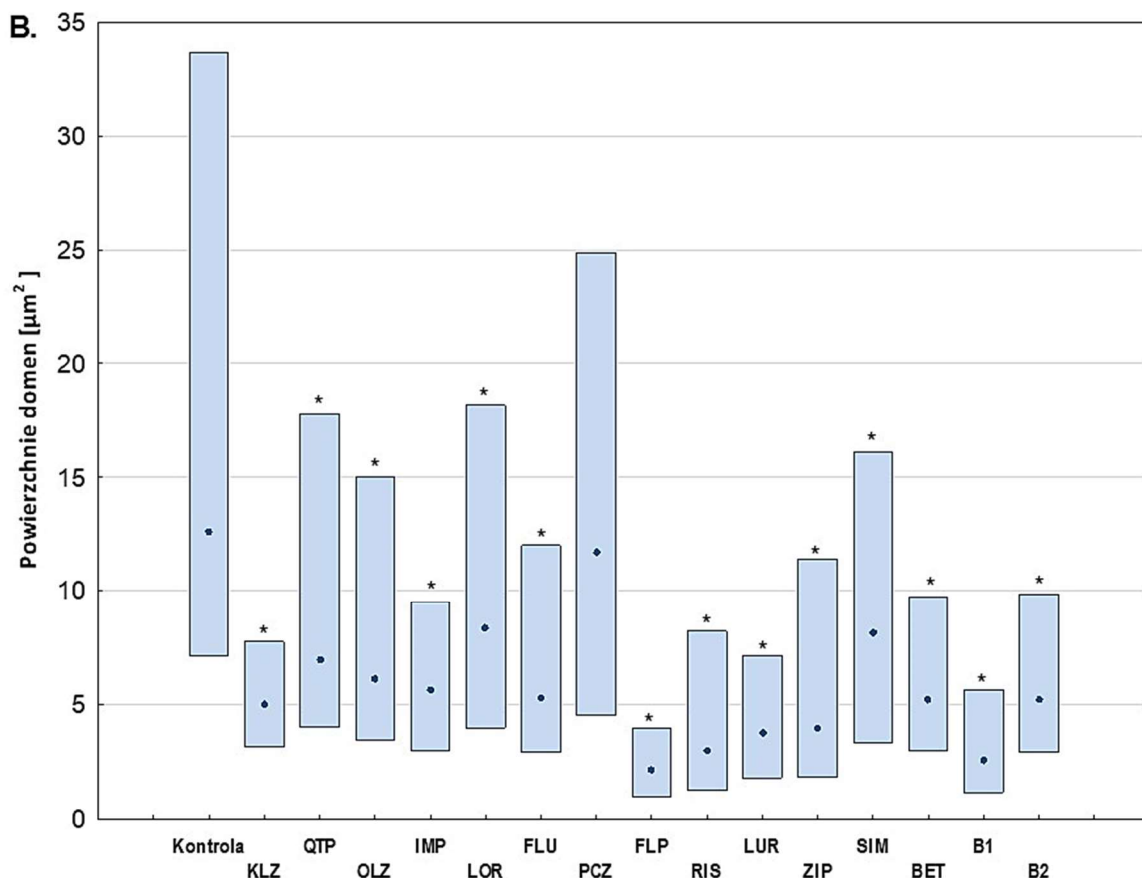
Cholesterol jest jednym z głównych składników mikrodomen obecnych w błonie komórkowej, tzw. tratw lipidowych. Kolejnym etapem badań było więc sprawdzenie, czy badane związki oddziałują z domenami lipidowymi. Jako układu modelowego użyto ogromnych jednowarstwowych liposomów (GUV), o składzie lipidowym warunkującym pojawienie się

lateralnej separacji faz w błonach pęcherzyków. Wielkość uzyskanych liposomów (10-40 μm) pozwoliła na bezpośrednią obserwację domen lipidowych za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.

Za pomocą metody elektroformacji uzyskano liposomy utworzone z równomolowej mieszaniny DOPC, Chol i SM. Analiza mikroskopowa wykazała obecność w błonach liposomów kolistych obszarów różniących się intensywnością fluorescencji. Ponieważ do znakowania liposomów użyto sondy fluorescencyjnej DiIC₁₂(3), która preferencyjnie lokalizuje się w fazie ciekłokrystalicznej nieuporządkowanej (L_D ; ang. *liquid disordered*)²⁰⁸ można założyć, że jasne regiony obserwowane na powierzchni liposomów odpowiadały fragmentom błony w fazie L_D , zaś ciemne – obszarom w fazie ciekłokrystalicznej uporządkowanej (L_O ; ang. *liquid ordered*).

Tak przygotowane liposomy stanowiły układ modelowy, w którym bezpośrednio obserwowano wpływ badanych związków na morfologię i liczebność domen lipidowych. Stężenie badanych związków wynosiło 100 μM , z wyjątkiem IMP dla której zastosowano stężenie 50 μM (większe stężenia zapobiegały formowaniu się liposomów). Grupę kontrolną stanowiły GUVy uzyskane bez dodatku związków.





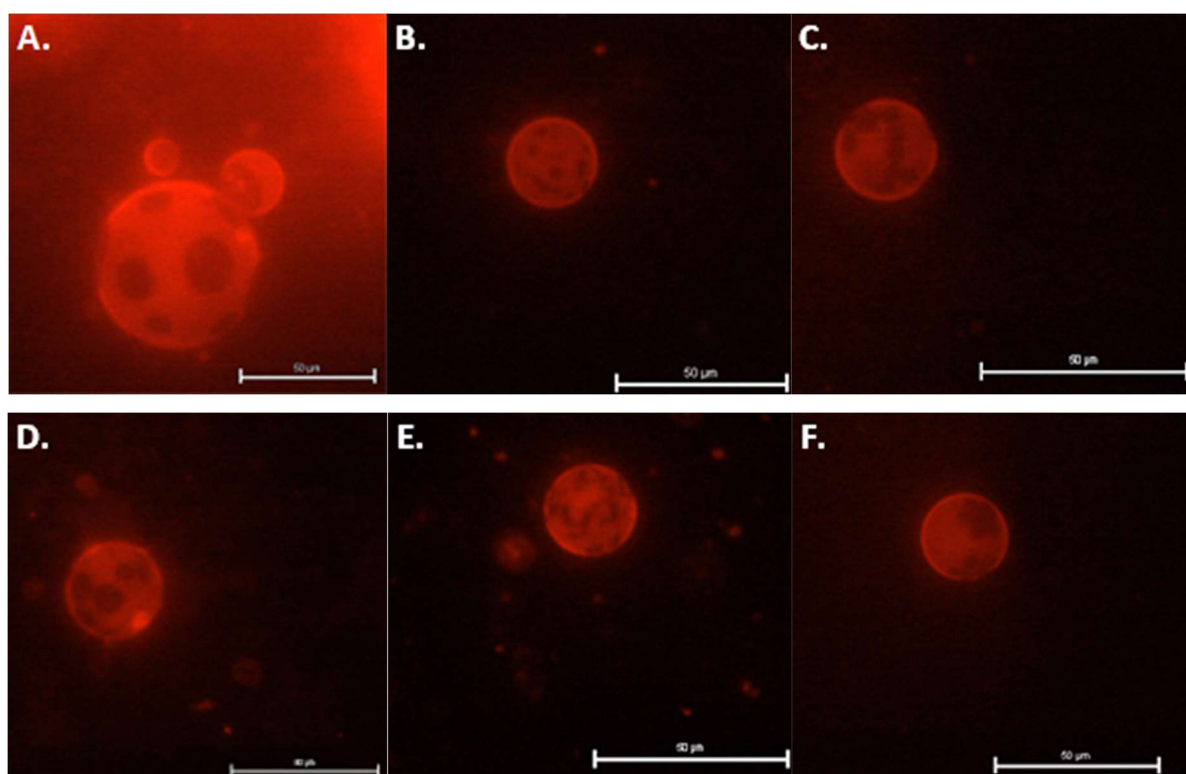
Rys. 29. Rozkład liczby domen (A) oraz powierzchni domen (B) w GUVach w obecności badanych związków. Ramka prezentuje rozrzut wewnętrzny otrzymanych wartości, ograniczony pierwszym i trzecim kwartyłem. Punkt wewnątrz pudełka określa wartość mediany. Istotność statystyczną badanych prób względem kontroli oznaczono: * ($p < 0,05$).

Otrzymane wyniki pokazują, że badane związki w niewielkim stopniu wpływały na liczebność domen obserwowanych w poszczególnych liposomach (Rys. 29A). FLU i LUR powodowały zmniejszenie obserwowanej liczby domen. Z kolei BET oraz B2 powodowały wzrost ich liczebności. W przypadku kilku związków: IMP, SIM i – w mniejszym stopniu – KLZ i QTP także obserwowano niewielki wzrost liczby domen, lecz zmiana ta nie była istotna statystycznie. Z analizy wyłączono TFP, ponieważ jej wpływ na modelowe układy lipidowe zawierające mikrodomeny został już opisany.⁶⁷

Z drugiej strony wpływ badanych związków na powierzchnie poszczególnych domen był znacznie większy (Rys. 29B). Dodanie wszystkich związków, z wyjątkiem PCZ, spowodowało istotny statystycznie spadek powierzchni domen w porównaniu do grupy kontrolnej. Największe zmiany w powierzchni zaobserwowano dla KLZ, IMP, FLU, FLP, RIS, LUR, ZIP,

BET, B1 oraz B2. Powierzchnia domen w ich wypadku spadła o ponad połowę względem kontroli nietraktowanej związkami.

Warto także zauważyć, że dodatek badanych związków do mieszaniny lipidów, z której formowano liposomy miał także wpływ na kształt domen (Rys. 30). Oprócz dużych okrągłych domen (np. dla SIM) podobnych do domen w próbce kontrolnej, obserwowano też niewielkie okrągłe domeny jak dla RIS, FLU i B1. W niektórych przypadkach domeny zaczynały zlewać się ze sobą tworząc kształty podłużne (IMP), łańcuchowate (KLZ, BET), czy też o kształcie kwiatu (LOR) (Rys.30).



Rys. 30. Przykładowe zdjęcia liposomów znakowanych DiIC₁₂(3) uzyskanych w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności badanych związków. Długość paska skali wynosi 50 μm. A- próba kontrolna, B- KLZ, C-BET, D-SIM, E- IMP, F-LOR.

3.12. Właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne badanych związków

Badania *in silico* wykonane zostały przy użyciu trzech programów: Titan, OSIRIS i PerMM. Programy te na podstawie wprowadzonej struktury chemicznej badanego związku obliczają jego parametry fizykochemiczne, takie jak lipofilowość, czy wielkość powierzchni polarnej (PSA) oraz pozwalają na predykcję ich właściwości biologicznych, np. rozpuszczalności (logS), zdolności do przenikania błon komórkowych, czy mutagenności. Pozwalają również na

ocenę, czy dany związek może zostać potencjalnym farmaceutykiem, co jest niezwykle istotne przy wstępnym wyborze cząsteczek o nowych strukturach do dalszych badań *in vitro* i *in vivo*. Jedną z najbardziej popularnych metod służących do sprawdzenia czy badany związek posiada potencjał do stania się lekiem, czyli tzw. lekopodobieństwo (DL, ang. *druglikeness*), jest „reguła pięciu” zaproponowana przez Christophera A. Lipińskiego.²⁰⁹ Według tego modelu potencjalny przyszły lek podawany doustnie, charakteryzujący się pasywną absorpcją jelitową powinien posiadać takie cechy jak:

- Masa molowa < 500 g/mol
- $\log P < 5$
- Liczba donorów wiązania wodorowego (HBD) ≤ 5
- Liczba akceptorów wiązania wodorowego (HBA) ≤ 10

Związki chemiczne spełniające te kryteria (dopuszcza się naruszenie jednej z wymienionych wyżej zasad) mogą zostać lekami doustnymi oraz mają dobrą absorpcję i zdolność do przenikania błon biologicznych. Modyfikacją tych reguł są zasady stworzone przez Daniela F. Vebera²¹⁰, według których dobra biodostępność związku po podaniu doustnym występuje, gdy spełnione zostaną dodatkowo dwa kryteria:

- Liczba wiązań rotacyjnych ≤ 10
- Pole powierzchni polarnej (PSA) $\leq 140 \text{Å}^2$

Veber dodatkowo wymienia kryterium, w którym suma akceptorów i donorów wiązań wodorowych w cząsteczce jest mniejsza lub równa liczbie 12.

Tab. 26. Parametry fizykochemiczne i farmakologiczne badanych związków obliczone za pomocą programu OSIRIS.

Związek	MW [g/mol]	logP	logS	TPSA [Å ²]	DL	HBA	HBD	DS	T
KLZ	326,83	3,24	-3,27	30,87	8,76	4	1	0,87	
QTP	383,51	2,73	-2,46	73,60	2,97	5	1	0,67	I
OLZ	312,44	3,04	-3,04	59,11	8,37	4	1	0,89	
IMP	280,41	3,89	-3,92	6,48	5,50	2	0	0,51	R
LOR	382,89	4,98	-4,78	42,43	-3,73	4	0	0,35	
PFA	403,98	4,16	-4,16	55,25	11,84	4	1	0,45	R
FLU	437,53	4,41	-4,20	55,25	4,48	4	1	0,25	M, R
PCZ	373,95	4,69	-4,37	35,02	12,45	3	0	0,43	R
TFP	407,50	4,93	-4,41	35,02	5,10	0	0	0,24	M, R
FLP	434,52	4,92	-3,96	52,01	2,74	3	1	0,37	R
THX	443,63	3,81	-2,53	77,54	10,2	5	0	0,44	R
RIS	410,49	3,54	-4,32	61,94	5,22	6	0	0,79	
LUR	492,69	3,92	-3,97	84,99	2,73	6	0	0,39	I
ZIP	412,94	3,68	-3,89	76,71	8,37	5	1	0,78	
SN38	392,41	2,03	-3,77	99,96	4,50	7	2	0,87	
SIM	418,57	4,46	-4,75	72,83	0,67	5	1	0,58	
BET	442,73	6,72	-6,3	40,46	-12,93	2	2	0,24	
B1	526,8	7,69	-7,12	52,60	-20,49	4	0	0,11	I
B2	484,76	7,20	-6,71	46,53	-24,08	3	1	0,21	

Wartości zaznaczone pogrubioną czcionką odbiegają od reguły pięciu Lipińskiego. Oznaczenia skrótów wykorzystanych w Tab. 26: MW – masa molowa [g/mol], logP – współczynnik podziału oktanol-woda, logS – współczynnik rozpuszczalności, TPSA – topologiczne pole powierzchni polarnej [Å²], DL – lekopodobieństwo, HBA/HBD – liczba akceptorów/donorów wiązania wodorowego, DS – wynik leku (ang. *drug score*), T - potencjalne niekorzystne działania leku (I – działanie drażniące, R – działanie na procesy reprodukcyjne, M – działanie mutagenne).

Analiza właściwości fizykochemicznych i farmakologicznych badanych związków za pomocą programu OSIRIS wykazała, że wszystkie leki antypsychotyczne i przeciwdepresyjne spełniają „regułę pięciu” (Tab. 26) Cechują się one dobrą absorpcją i zdolnością do przenikania błon

biologicznych. Wszystkie badane związki są silnie lipofilowe, wartość logP jest niższa od 3 jedynie dla QTP i SN-38. Z kolei BET i jej obie pochodne łamią co najmniej jedną z „reguł pięciu”, przez co ich parametry lekopodobieństwa (DL) posiadają ujemne wartości. Dodatkowo są one silnie lipofilowe, co wynika z ich wysokiej wartości logP. Związki te mogą więc być zatrzymywane w tkance tłuszczowej oraz być absorbowane w błonie komórkowej. Pochodna B1 łamie dwa kryteria, co oznacza, że jej właściwości w małym stopniu pokrywają się z występującymi komercyjnie lekami. Większość badanych związków jest nierozpuszczalnych bądź słabo rozpuszczalnych w wodzie, o czym świadczą wartości logS znajdujące się w zakresie -4 do -2. Związki o logS niższym od -4 określa się jako nierozpuszczalne.²¹¹ Analog kamptomecyny, SN-38 znany ze swoich właściwości przeciwnowotworowych charakteryzuje słaba hydrofilowość jak i lipofilowość, co za tym idzie źle rozpuszcza się w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach i charakteryzuje się słabym przenikaniem przez błony komórkowe. Posiada on również najwyższą wartość TPSA, co również przemawia za jego gorszą zdolnością do przenikania barier biologicznych.²¹² Wszystkie pozostałe związki posiadają korzystną wartość TPSA, świadczącą o dobrej absorpcji i zdolności do przenikania błon biologicznych. Dla większości leków przeciwdepresyjnych wartość TPSA mieściła się w zakresie 6-85 Å², podczas gdy wartości poniżej 60-70 Å² oznaczają, że związek może przenikać barierę krew- mózg.²¹⁰ Potencjalny negatywny wpływ na procesy reprodukcyjne wykazały leki przeciwdepresyjne pierwszej generacji będące antagonistami receptorów dopaminowych: PFA, PCZ, FLU, TFP, FLP, THX i IMP. Prawdopodobne właściwości mutagenne wykazały FLU i TFP, natomiast drażniące –QTP, LUR oraz B1.

Tab. 27. Deskryptory molekularne uzyskane za pomocą programu Titan.

Związek	E_{HOMO} [eV]	E_{LUMO} [eV]	E_g [eV]	μ [D]	H [eV]
KLZ	-8,42	-0,49	7,92	3,57	0,145
QTP	-8,2	-0,46	7,75	3,21	0,142
OLZ	-8,19	-0,45	7,73	2,86	0,142
IMP	-8,57	0,36	8,93	0,96	0,164
LOR	-9,18	-0,28	8,9	3,84	0,164
PFA	-7,56	-0,29	7,27	3,18	0,133
FLU	-7,79	-0,63	7,16	4,87	0,131
PCZ	-7,53	-0,26	7,27	1,93	0,133
TFP	-7,96	-0,6	7,36	5,12	0,135
FLP	-8,22	-0,67	7,54	3,6	0,139
THX	-8,26	-0,89	7,37	6,63	0,135
RIS	-8,8	-0,55	8,24	4,00	0,151
LUR	-8,15	-0,27	7,87	2,88	0,145
ZIP	-8,27	-0,37	7,89	2,93	0,145
SN-38	-8,74	-1,28	7,46	6,86	0,137
SIM	-8,94	0,28	9,23	4,11	0,169
BET	-9,6	1,23	10,83	1,84	0,199
B1	-9,73	1,11	10,84	4,4	0,199
B1	-9,58	1,19	10,77	1,6	0,198

E_{HOMO} - energia najwyższego zajętego orbitalu molekularnego [eV], E_{LUMO} - energia najniższego nieobsadzonego orbitalu molekularnego [eV], E_g - przerwa energetyczna [eV], μ - moment dipolowy [D], H- twardość chemiczna [eV].

Oprogramowanie Titan posłużyło do określenia deskryptorów molekularnych charakteryzujących badane cząsteczki, a co za tym idzie, przewidzenia ich właściwości fizykochemicznych. Otrzymane parametry przedstawiono w Tab. 27. Polarność związków opisywana jest przez ich momenty dipolowe (μ). Wartości uzyskane za pomocą programu Titan dla badanych związków świadczą o polarności ich wiązań i asymetrycznej strukturze, przy czym najwyższą wartość posiadał THX oraz SN-38 (ponad 6 D). Najniższy moment dipolowy posiadała IMP (0,96 D), w związku z tym cząsteczka ta posiada większą symetrię i mniejszą

polarność. Przerwa energetyczna (E_g) definiowana jest jako różnica energii pomiędzy najwyższym obsadzonym orbitalem molekularnym (E_{HOMO} ; ang. *highest occupied molecular orbital*), a najniższym nieobsadzonym orbitalem molekularnym (E_{LUMO} ; ang. *lowest unoccupied molecular orbital*). Parametr ten pośrednio określa reaktywność związku. Wartości E_g badanych związków mieściły się w przedziale 7-11 eV, przy czym najwyższymi wartościami tego parametru (ponad 10 eV) charakteryzowały się badane terpeny: BET, B1 oraz B2. Wysoka wartość E_g świadczy o małej zdolności tych związków do wchodzenia w reakcję chemiczną z innymi molekułami oraz o ich wysokiej stabilności kinetycznej. Największą reaktywnością z badanych związków charakteryzowała się FLU, przyjmując wartość przerwy energetycznej 7,16 eV. Twardość chemiczna (H), będąca wyznacznikiem reaktywności i stabilności cząsteczek wskazuje na ich odporność na polaryzację chmury elektronowej.²¹³ Najwyższe wartości uzyskano ponownie dla BET, B1 oraz B2, co oznacza, że charakteryzuje je największa twardość chemiczna oraz najmniejsza reaktywność z wszystkich badanych związków. Najniższą wartość twardości zanotowano dla PFA, PCZ oraz FLU (0,13 eV).

Tab. 28. Współczynniki przepuszczalności clogPr oraz energii swobodnej wiązania (ΔG) z błoną lipidową zbudowaną z DOPC obliczone za pomocą programu PerMM w modelowych błonach sztucznych i naturalnych.

Związek	ΔG dla DOPC [kcal/mol]	clogPr				
		BLM	BBB	Caco-2	PAMPA DS	PM
KLZ	-3,87	0,05	-2,88	-3,47	-1,18	-1,84
QTP	-4,52	-2,34	-3,72	-4,08	-3,39	-3,77
OLZ	-3,64	0,10	-2,86	-3,45	-1,13	-1,80
IMP	-5,34	2,71	-1,94	-2,79	1,27	0,31
LOR	-5,70	0,59	-2,69	-3,33	-0,68	-1,40
PFA	-4,27	-2,11	-3,64	-4,02	-3,18	-3,59
FLU	-4,26	-2,71	-3,85	-4,17	-3,73	-4,07
PCZ	-3,82	-0,02	-2,90	-3,49	-1,25	-1,90
TFP	-3,82	-0,09	-2,92	-3,5	-1,31	-1,95
FLP	-5,43	-0,82	-3,18	-3,69	-1,99	-2,55
THX	-3,79	-2,59	-3,81	-4,14	-3,61	-3,97
RIS	-5,12	0,99	-2,55	-3,23	-0,32	-1,08
LUR	-4,86	-0,06	-2,92	-3,50	-1,29	-1,93
ZIP	-4,51	-2,27	-3,70	-4,06	-3,32	-3,72
SN38	-3,28	-5,38	-4,79	-4,86	-6,20	-6,24
SIM	-7,52	2,29	-2,09	-2,89	0,89	-0,02
BET	-6,90	3,90	-1,52	-2,48	2,37	1,28
B1	-10,10	6,18	-0,72	-1,90	4,47	3,12
B2	-7,64	4,21	-1,41	-2,40	2,66	1,53

ΔG - energia swobodna wiązania z błoną zbudowaną z DOPC [kcal/mol], clogPr – współczynnik przepuszczalności dla modelowych błon: BLM (czarne błony lipidowe), BBB (bariera krew-mózg), Caco-2 (komórki nabłonka jelitowego), Pampa DS. (sztuczna membrana na bazie lecytyny) oraz PM (błona komórkowa).

Do wyznaczenia parametrów decydujących o oddziaływaniu badanych związków z błonami lipidowymi oraz ich przenikaniu przez dwuwarstwy lipidowe wykorzystano program PerMM (Tab. 28). Wyznaczone wartości energii swobodnej wiązania z błoną lipidową zbudowaną z

DOPC dla badanych związków wykazały, że związki te wiążą się z błoną z energią wiązania mieszczącą się w przedziale od -3 do -5 kcal/mol. Jedynie dla SIM, BET i jej pochodnych dla których wartości te mieściły się w przedziale -6 do -11 kcal/mol. Otrzymane wartości przemawiają za korzystnym energetycznie oddziaływaniem związków z dwuwarstwą lipidową zbudowaną z DOPC, przy czym największą łatwością w przekraczaniu tej błony wykazały SIM, BET i jej pochodne. Wartości współczynnika przepuszczalności dla bariery krew-mózg (BBB) uzyskane w programie PerMM dla wszystkich związków z wyjątkiem SN-38 posiadały wartości większe od wartości progowej: -4,35 co oznacza, że mogą one posiadać zdolność do przenikania tej bariery i oddziaływać na układ nerwowy (jeśli nie stanowią substratów dla białek transportowych).²¹⁴ Najniższe wartości $\log Pr$ otrzymano dla modelu naturalnej błony komórkowej Caco-2 (komórki nabłonka jelitowego). Gorsza przepuszczalność w tym modelu niż w modelu płaskiej czarnej błony lipidowej BLM (ang. *black lipid membranes*) może być spowodowana obecnością cholesterolu i sfingomieliny w modelu naturalnej błony. W modelu PAMPA DS również zaobserwowano niższe wartości współczynnika przepuszczalności niż dla błony BLM, co związane może być z większą grubością i bogatszym składem lipidowym tego układu modelowego. Podobnie prezentują się wyniki dla błony komórkowej PM (ang. *plasma membrane*), które są niższe względem BLM dla wszystkich badanych związków. Niższa przepuszczalność dla błon naturalnych i bardziej złożonych ma związek z ich budową, w szczególności z obecnością cholesterolu i sfingomieliny, których obecność powoduje spadek wartości $\log Pr$. Najsilniejszą interakcję z modelowymi błonami zastosowanymi w programie PerMM wykazała pochodna B1, która posiadała najwyższe współczynniki przepuszczalności dla wszystkich modeli błonowych oraz najniższą energię swobodną wiązania.

3.13. Wpływ betuliny i jej pochodnych na termotropowe właściwości błony lipidowej

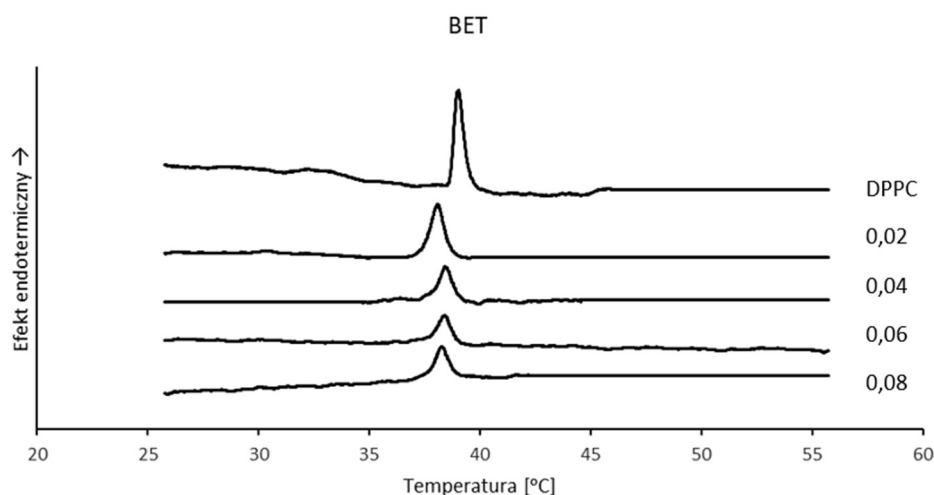
Oddziaływanie większości leków z błonami lipidowymi jest dość dobrze poznane i było przedmiotem wielu prac w przeszłości,^{215,216} dlatego w niniejszej pracy ograniczyliśmy się do przeprowadzenia eksperymentów jedynie dla nowo zsyntezowanych związków. W celu określenia oddziaływania BET i jej pochodnych B1 oraz B2 na termotropowe właściwości dwuwarstwy lipidowej posłużono się metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Do badań wykorzystano dwa fosfolipidy DMPC oraz DPPC, różniące się długością łańcuchów acylowych. Badanych związków użyto w różnych stosunkach molowych związek:lipid, w celu szczegółowego określenia ich wpływu na parametry głównej przemiany fazowej fosfolipidów. Uzyskane termogramy przedstawiono na Rys. 31A-C (dla DPPC) oraz Rys.32A-C (dla

DMPC), zaś obliczone parametry głównej przemiany fazowej zamieszczono odpowiednio w Tab. 29 oraz Tab. 30. Analiza termogramów pozwoliła na określenie wpływu terpenów na następujące parametry przemiany fazowej:

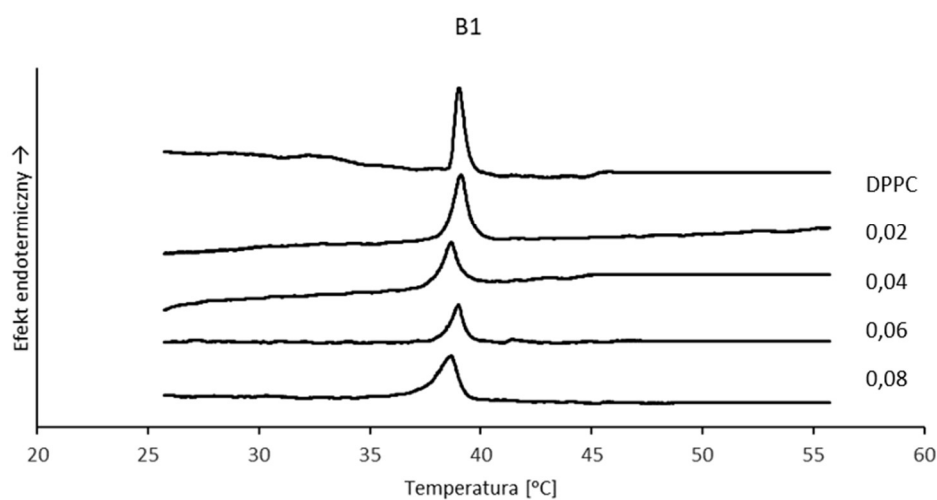
- T_M - temperaturę głównego przejścia fazowego [$^{\circ}\text{C}$],
- ΔH – zmianę entalpii głównego przejścia fazowego [kJ/mol],
- $T_{1/2}$ - szerokość połówkową piku głównego przejścia fazowego [$^{\circ}\text{C}$].

Dla czystych fosfolipidów w termogramach obserwujemy dwa charakterystyczne piki, odpowiadające dwóm przemianom fazowym: przedprzejściu oraz głównemu przejściu fazowemu. Dla DPPC pojawiają się one odpowiednio w temperaturze 35 i 41 $^{\circ}\text{C}$, zaś dla DMPC w 14 i 23 $^{\circ}\text{C}$.

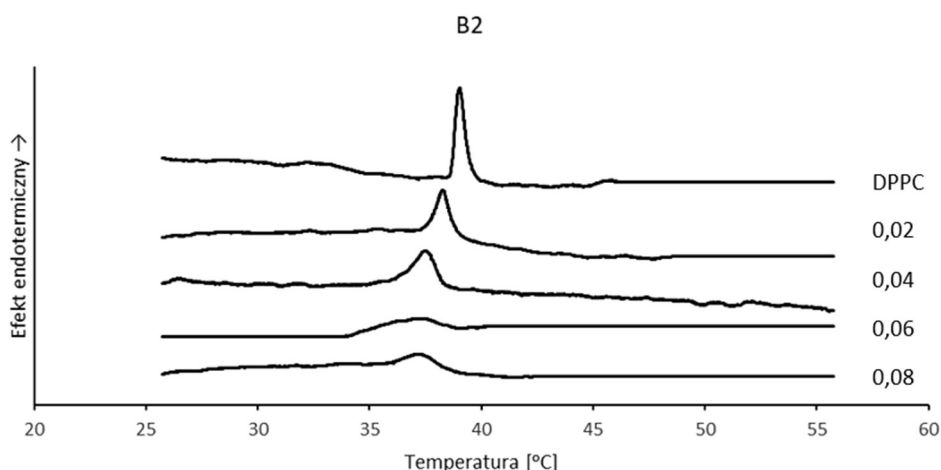
A.



B.



C.



Rys. 31. Przykładowe termogramy otrzymane dla DPPC oraz mieszanin DPPC z BET (A), B1 (B) lub B2 (C) w zastosowanych stosunkach molowych związek:DPPC. Wykresy zostały znormalizowane względem jednakowej ilości lipidu w próbce. Liczby na wykresie określają stosunki molowe leku do lipidu.

Tab. 29. Parametry głównej przemiany fazowej dla DPPC oraz mieszanin związek:DPPC w różnych stosunkach molowych.

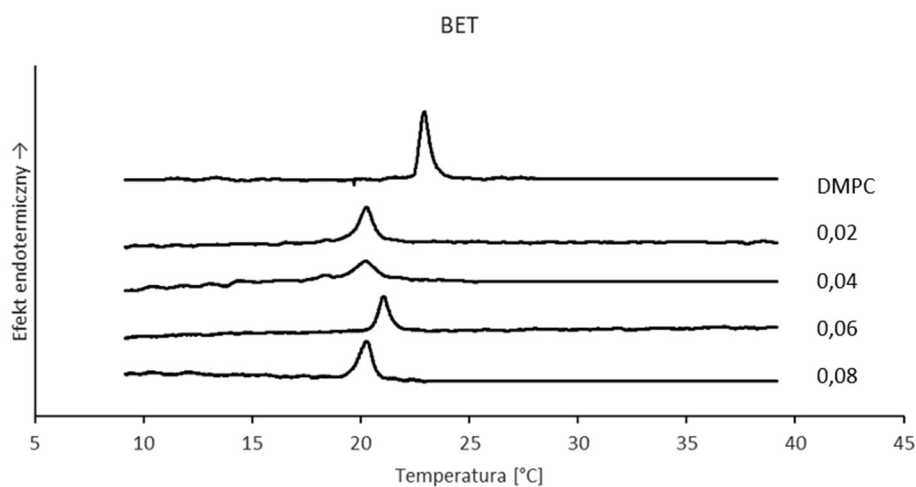
Związek	Stosunek			
	molowy związek:DPPC	T_M [°C]	ΔH [kJ/mol]	$T_{1/2}$ [°C]
DPPC	0	$39,30 \pm 0,24$	$36,50 \pm 0,00$	$0,521 \pm 0,05$
BET	0,02	$38,15 \pm 0,14^*$	$27,90 \pm 1,48^*$	$0,597 \pm 0,11$
	0,04	$38,44 \pm 0,12^*$	$13,66 \pm 3,21^*$	$0,626 \pm 0,09^*$
	0,06	$38,27 \pm 0,15^*$	$18,52 \pm 3,00^*$	$0,645 \pm 0,11^*$
	0,08	$38,03 \pm 0,27^*$	$13,39 \pm 3,42^*$	$0,709 \pm 0,03^*$
B1	0,02	$38,84 \pm 0,25^*$	$54,31 \pm 11,77$	$0,707 \pm 0,07^*$
	0,04	$38,74 \pm 0,11^*$	$33,49 \pm 9,10$	$0,847 \pm 0,15^*$
	0,06	$38,69 \pm 0,19^*$	$26,91 \pm 8,09^*$	$0,759 \pm 0,14^*$
	0,08	$38,92 \pm 0,43^*$	$40,53 \pm 7,38$	$0,767 \pm 0,20^*$
B2	0,02	$38,42 \pm 0,20^*$	$26,46 \pm 6,22^*$	$0,820 \pm 0,14^*$
	0,04	$37,42 \pm 0,16^*$	$26,38 \pm 5,93^*$	$1,332 \pm 0,20^*$
	0,06	$37,28 \pm 0,18^*$	$20,03 \pm 6,53^*$	$2,208 \pm 0,62^*$
	0,08	$37,02 \pm 0,17^*$	$11,25 \pm 3,64^*$	$1,456 \pm 0,24^*$

T_M - temperatura głównego przejścia fazowego [°C], ΔH - entalpia głównego przejścia fazowego [kJ/mol], $T_{1/2}$ - szerokość połówkowa piku głównego przejścia fazowego [°C]. Istotną zmianę badanych prób względem samego lipidu oznaczono: * ($p < 0,05$).

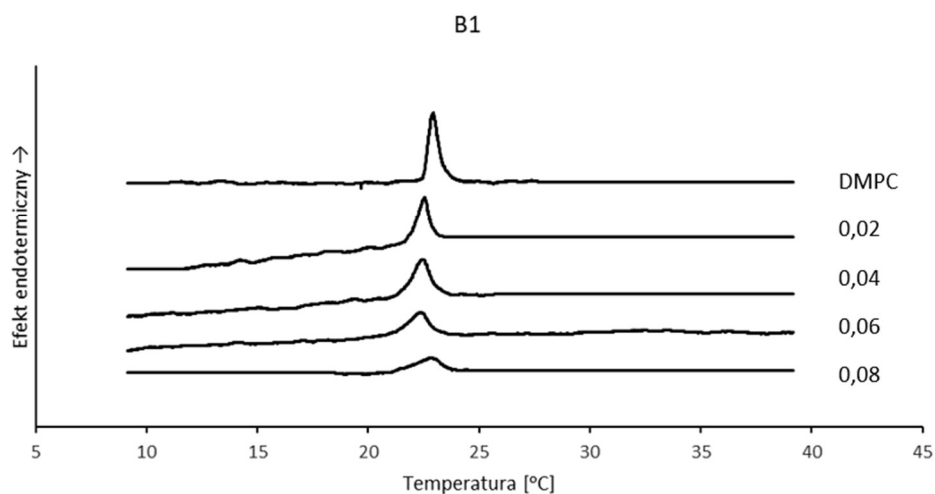
W dwuwarstwach utworzonych z DPPC wszystkie badane terpenoidy spowodowały zanik przedprzejścia już przy najniższych zastosowanych stężeniach. Wraz ze wzrostem stężenia badanych związków obserwowano także przesunięcie T_M w kierunku niższych wartości wraz z poszerzeniem piku głównej przemiany fazowej. BET oraz B2 powodowały również obniżenie zmiany entalpii przejścia fazowego, podczas gdy dla pochodnej B1 efekt ten był niewielki.

Największy wpływ na parametry przemiany fazowej DPPC miał związek B2. Zaobserwowano tu najsilniejsze obniżenie temperatury głównej przemiany fazowej (o ponad 2°C) i zmiany entalpii (o ponad 25 kJ/mol) przy najwyższym zastosowanym stosunku molowym B2:DPPC. Szerokość połówkowa dla B2 posiadała najwyższe wartości spośród badanych związków, co świadczy o niskiej kooperatywności przejścia w obecności tej pochodnej.

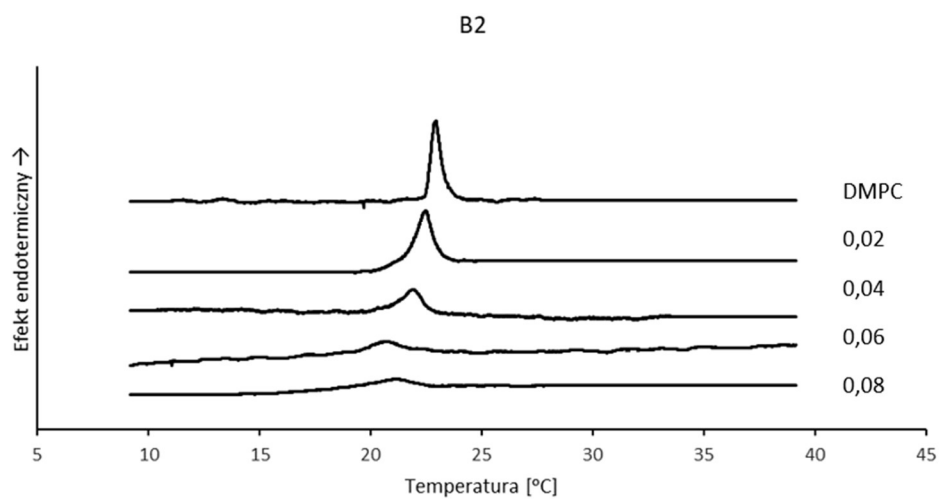
A.



B.



C.



Rys. 32. Przykładowe termogramy otrzymane dla DMPC oraz mieszanin DMPC z BET (A), B1 (B) lub B2 (C) w zastosowanych stosunkach molowych związek:DMPC. Wykresy zostały znormalizowane względem jednakowej ilości lipidu w próbce. Liczby na wykresie określają stosunki molowe leku do lipidu.

Tab. 30. Parametry głównej przemiany fazowej dla DMPC oraz mieszanin związek:DMPC w zastosowanych stosunkach molowych.

Związek	Stosunek		T_M [°C]	ΔH [kJ/mol]	$T_{1/2}$ [°C]
	molowy	związek:DMPC			
DMPC	0		23,00 ± 0,21	26,00 ± 0,00	0,526 ± 0,03
BET	0,02		20,64 ± 0,26*	18,96 ± 2,71*	0,733 ± 0,07*
	0,04		20,18 ± 0,25*	7,83 ± 1,97*	0,808 ± 0,19*
	0,06		20,80 ± 0,34*	12,05 ± 1,02*	0,535 ± 0,05
	0,08		20,37 ± 0,23*	16,69 ± 1,43*	0,706 ± 0,02*
B1	0,02		22,43 ± 0,21*	19,32 ± 3,14*	0,589 ± 0,03*
	0,04		22,02 ± 0,32*	18,42 ± 3,57*	0,921 ± 0,13*
	0,06		22,02 ± 0,27*	20,31 ± 4,71*	1,614 ± 0,67*
	0,08		22,46 ± 0,24*	17,42 ± 2,93*	1,111 ± 0,18*
B2	0,02		22,33 ± 0,23*	29,19 ± 1,58	0,889 ± 0,08*
	0,04		21,65 ± 0,20*	17,12 ± 2,05*	1,083 ± 0,05*
	0,06		20,99 ± 0,15*	7,47 ± 1,25*	1,393 ± 0,15*
	0,08		nd	nd	nd

T_M - temperatura głównego przejścia fazowego [°C], ΔH - entalpia głównego przejścia fazowego [kJ/mol], $T_{1/2}$ - szerokość połowkową piku głównego przejścia fazowego [°C], nd – nie udało się określić. Istotną zmianę badanych prób względem samego lipidu oznaczono: * ($p < 0,05$).

W przypadku fosfolipidu o krótszym łańcuchu acylowym – DMPC, dodanie badanych związków również zmniejszyło wartości T_M oraz spowodowało zanik przedprzejścia fazowego. Zmiany obserwowane dla dwuwarstw utworzonych z DMPC były silniejsze niż dla DPPC. Najwyższy wpływ na temperaturę głównej przemiany fazowej posiadały BET oraz B2. W najwyższych stężeniach tych związków zaobserwowano zmniejszenie jej wartości o ponad 2°C. Związek B2 powodował również największy spadek wartości zmiany entalpii, przy stosunku molowym B2:DMPC 0,06 wynosiła ona 7,46 kJ/mol, natomiast przy najwyższym badanym stężeniu B2 otrzymane termogramy były zbyt zniekształcone by określić parametry przemiany fazowej. Z kolei działanie BET było dwufazowe. Największe zmiany wartości ΔH , T_M oraz $T_{1/2}$ zaobserwowano przy stosunku molowym BET:DMPC 0,04, przy wyższych stężeniach BET zakres zmian malał dla wszystkich badanych parametrów. W przypadku pochodnej B1 nie zaobserwowano istotnej zmiany w T_M oraz ΔH w stosunku do czystego DMPC. Z kolei,

pochodne B1 oraz B2 w porównaniu do BET wywierały większy wpływ na kooperatywność przemiany fazowej, o czym świadczą zanotowane dla nich wartości $T_{1/2}$ wynoszące ponad 1 °C.

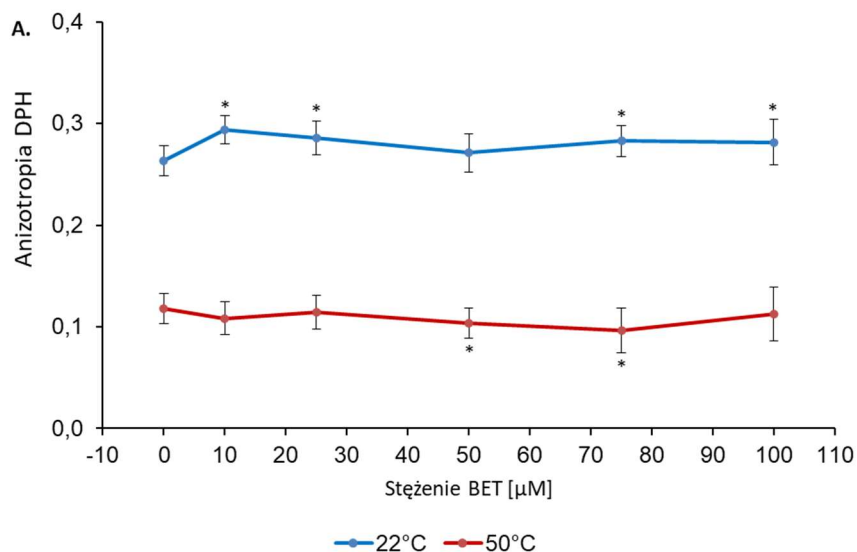
Badania uzyskane za pomocą metody mikrokalorymetrii wykazały, że największy wpływ na parametry głównej przemiany fazowej fosfolipidów DMPC i DPPC posiadała pochodna betuliny B2. BET w większym stopniu wpływała na zmianę parametrów dwuwarstwy lipidowej zbudowanej z DMPC niż DPPC. Z kolei pochodna B1 miała najmniejszy wpływ na badane parametry.

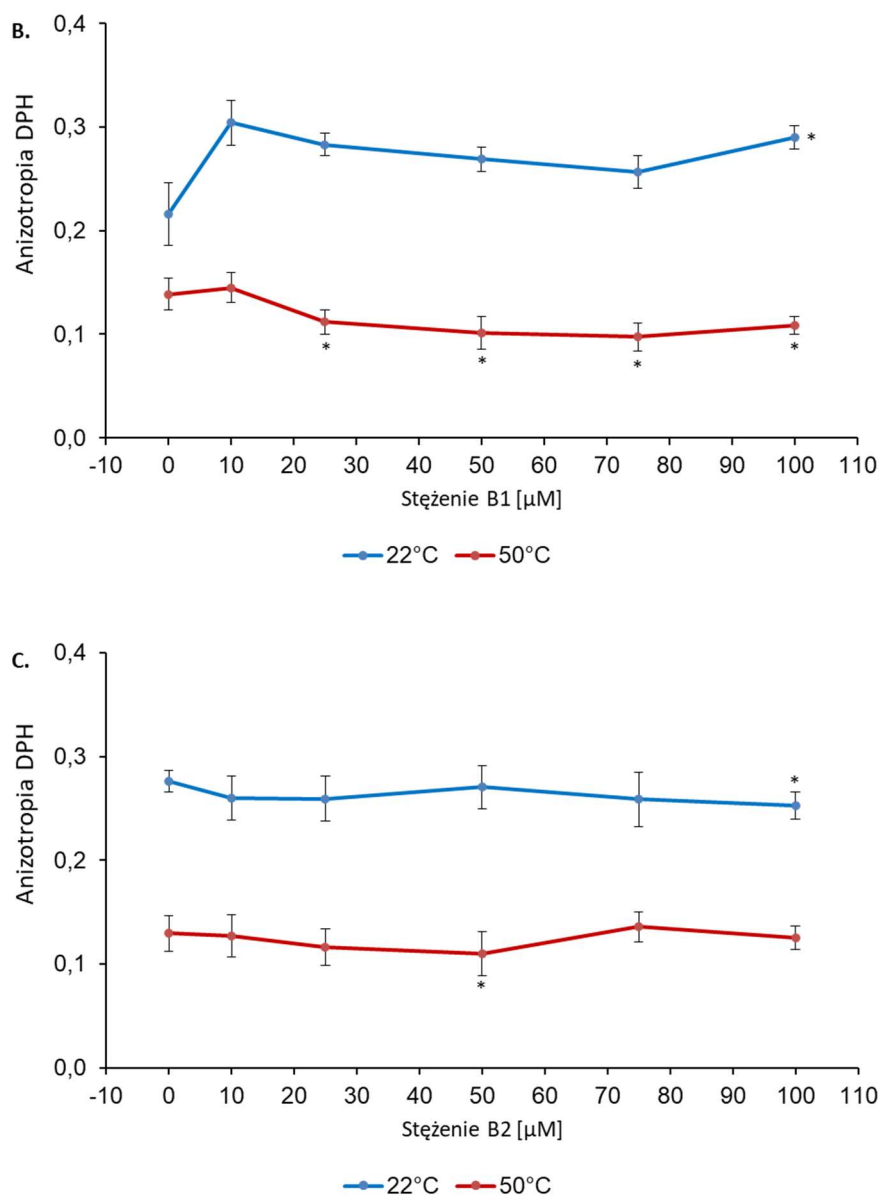
3.14. Spektrofluorymetria

Metoda spektroskopii fluorescencyjnej została wykorzystana w celu zbadania wpływu BET i jej pochodnych na uporządkowanie błony liposomów zbudowanych z DPPC, a także próby przybliżonego określenia ich lokalizacji w błonie. W tym celu wykorzystano sondy fluorescencyjne wbudowujące się w różne regiony błony lipidowej: DPH, TMA-DPH oraz Laurdan.

3.14.1. Anizotropia DPH

Za pomocą znacznika fluorescencyjnego DPH sprawdzono wpływ badanych związków BET, B1 i B2 na zmiany w płynności dwuwarstwy lipidowej zbudowanej z DPPC. Znacznik DPH posiada charakter hydrofobowy oraz lokuje się w hydrofobowym rejonie błony lipidowej, ustawiając się równolegle do łańcuchów acylowych lipidu.²¹⁷ Zmiana anizotropii DPH świadczy o oddziaływaniu badanego modulatora z hydrofobowymi częściami błony lipidowej.



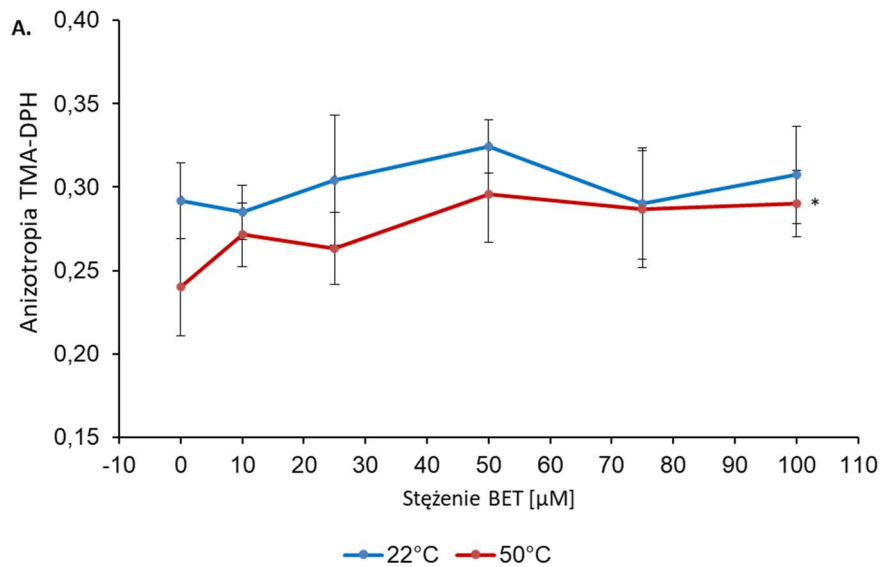
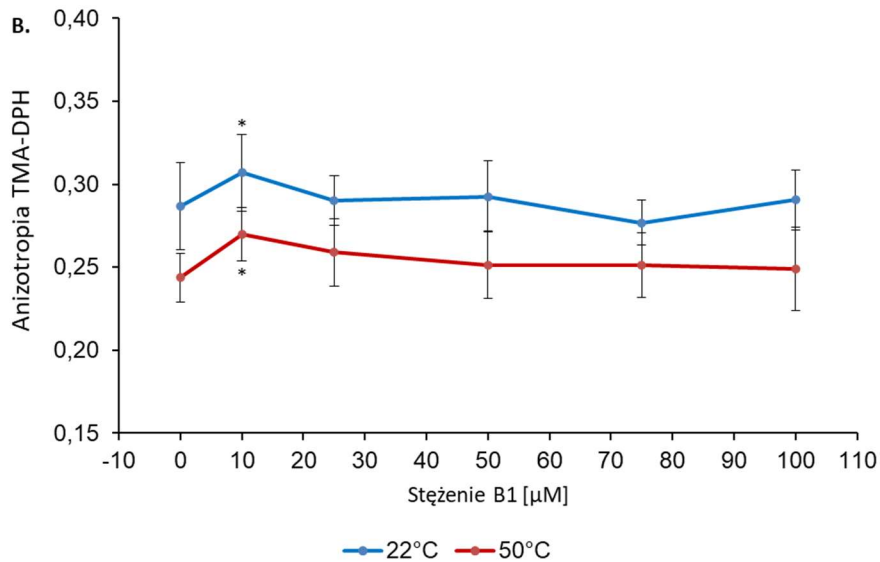


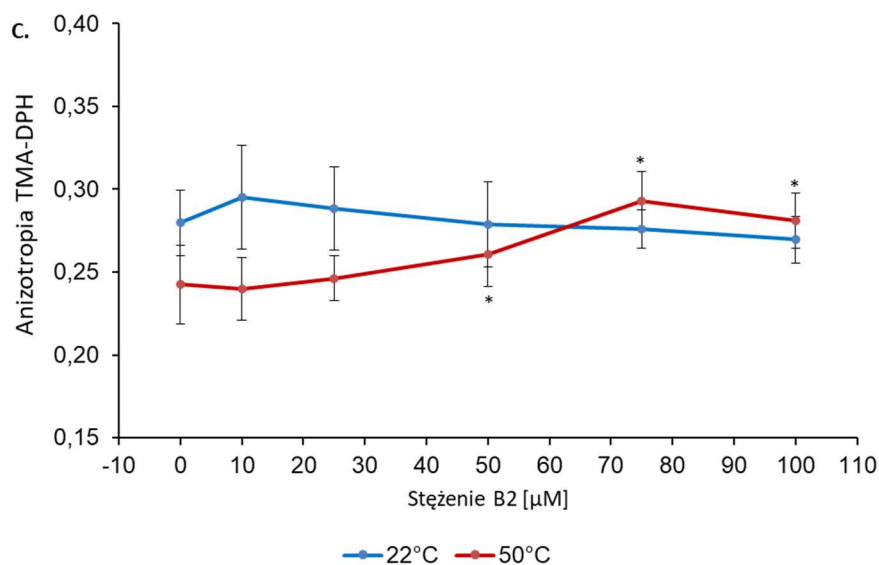
Rys. 33. Zmiany anizotropii fluorescencji DPH dla BET (A), B1 (B) oraz B2 (C) w zależności od stężenia w dwóch temperaturach: 22 i 50°C. Wyniki istotne statystycznie względem kontroli nietraktowanej związkiem oznaczono: * (dla $p < 0,05$).

BET spowodowała niewielki wzrost anizotropii DPH w temperaturze poniżej temperatury głównego przejścia fazowego badanego lipidu. Z kolei w temperaturze powyżej T_M zaobserwowano niewielki spadek anizotropii DPH (Rys. 33A). B1, podobnie jak BET powodowała lekki wzrost anizotropii fluorescencji znacznika DPH w temperaturze 22°C, a w temperaturze 50°C zaobserwowano obniżenie anizotropii (Rys. 33B). Ponadto zakres obserwowanych zmian był większy dla B1 niż dla BET. Pochodna B2 nie wpłynęła na anizotropię DPH w badanych warunkach.

3.14.2. Anizotropia TMA-DPH

Użycie kolejnego znacznika lipidowego: TMA-DPH pozwoliło na porównanie wpływu badanych związków na nieco płytsze rejony błony lipidowej. Sonda ta umiejscawia się w rejonie polarnych główek lipidów, dzięki hydrofilowej grupie aminowej.²¹⁷ Zmiana anizotropii fluorescencji TMA-DPH świadczyć więc może o oddziaływaniu związku z polarnym rejonem błony lipidowej.





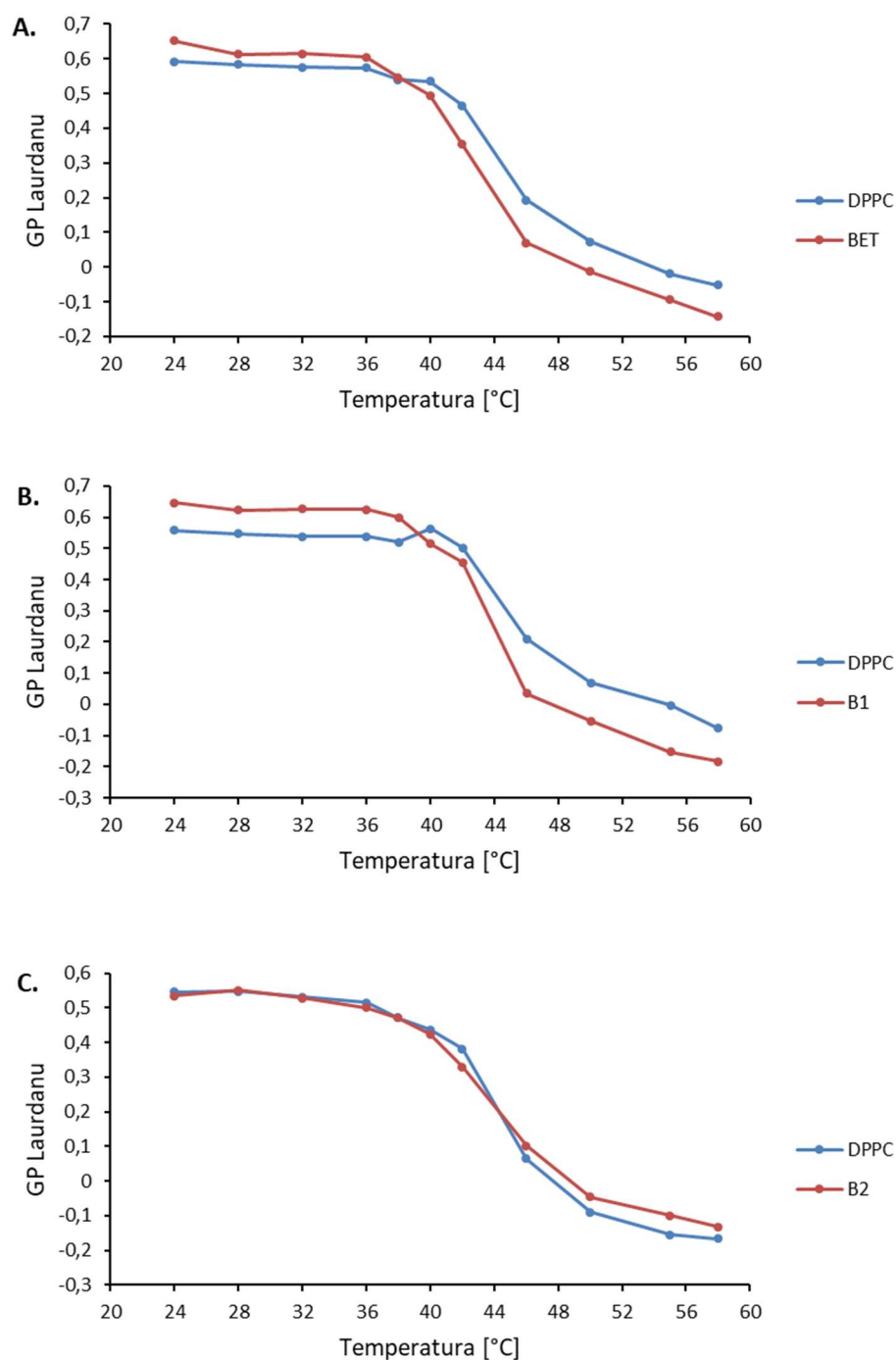
Rys. 34. Zmiany anizotropii fluorescencji TMA-DPH dla BET (A), B1 (B) oraz B2 (C) w zależności od stężenia w dwóch temperaturach: 22 i 50°C. Wyniki istotne statystycznie względem kontroli nietraktowanej związkiem oznaczono: * (dla $p < 0,05$)

Zarówno BET jak i B1 nie spowodowały istotnych zmian w anizotropii fluorescencji TMA-DPH w błonie lipidowej znajdującej się w stanie ciekłokrystalicznym oraz stanie żelu (Rys. 34A,B). Z kolei pochodna B2 w wyższych stężeniach powodowała wzrost anizotropii tego znacznika w lipidzie w stanie ciekłokrystalicznym (Rys. 34C).

Wyniki uzyskane dla obu znaczników wykazały, że zarówno BET jak i B1 wpływały na anizotropię fluorescencji DPH, nie wpływając znacząco na TMA-DPH. Odwrotne działanie zaobserwowano w przypadku pochodnej B2: większy wpływ miała ona na anizotropię fluorescencji TMA-DPH przy braku wpływu na DPH. Wnioskować więc można, że pochodne te różnią się lokalizacją w dwuwarstwie lipidowej, oddziałując z odmiennymi jej regionami.

3.14.3. Polaryzacja uogólniona Laurdanu

Badanie zmian wartości polaryzacji uogólnionej (GP, ang. *generalized polarization*) znacznika fluorescencyjnego Laurdanu umożliwiło określenie wpływu badanych związków na przejście fazowe dwuwarstwy lipidowej utworzonej z DPPC. Fluorofor Laurdanu lokalizuje się na wysokości glicerolowego szkieletu cząsteczek fosfolipidu, podczas gdy hydrofobowy łańcuch kotwiczy cząsteczkę znacznika w rejonie hydrofobowym dwuwarstwy. Ponieważ właściwości spektralne Laurdanu silnie zależą od stanu fazowego błony, analiza GP w funkcji temperatury pozwala na śledzenie wpływu badanego związku na parametry głównego przejścia fazowego fosfolipidu.²¹⁸



Rys. 35. Zależność polaryzacji uogólnionej Laurdanu od temperatury dla BET, B1 oraz B2. Długość fali wzbudzenia wynosiła 390 nm. Stężenie sondy wynosiło 1 μM , a stężenie użytych związków 25 μM .

W porównaniu do liposomów utworzonych z DPPC, wartość uogólnionej polaryzacji Laurdanu w liposomach potraktowanych BET i B1 była wyższa w temperaturach poniżej przejścia fazowego, natomiast powyżej temperatury topnienia obserwowano spadek tej wartości. Może to świadczyć o tym, że BET oraz B1 zmieniały uporządkowanie błony znajdującej się zarówno

w fazie żelowej, jak i ciekłokrystalicznej. Te dwa związki wpłynęły także na redukcję temperatury głównej przemiany fazowej DPPC. Pochodna B2 nie wykazała znaczącego wpływu na wartości GP Laurdanu w badanym zakresie temperatur, co sugeruje jej niewielki wpływ na rejony dwuwarstwy z DPPC, w których lokalizuje się badany znacznik fluorescencyjny.

4. Dyskusja

Regularne zażywanie leków przeciwpsychotycznych wywołuje wiele skutków ubocznych, w tym wzrost masy ciała, zwiększone ryzyko cukrzycy oraz chorób kardiologicznych. Przypuszcza się, że te niepożądane zdarzenia związane są ze zdolnością tych leków do zakłócania produkcji kwasów tłuszczowych i Chol w komórkach.^{219,220} Zaburzenia w ilości i rozmieszczeniu Chol oraz w powiązanych z traktami lipidowymi komórkowych szlakach sygnałowych występują również w komórkach nowotworowych. Badania wykonane w pracy miały na celu sprawdzenie, czy leki z grupy leków przeciwpsychotycznych oraz przeciwdepresyjnych mają zdolność do hamowania proliferacji komórek linii RJG oraz czy działanie to jest skorelowane z ich zdolnością do zaburzenia w nich homeostazy Chol. Cytotoksyczność badanych związków sprawdzono na liniach komórkowych RJG: HT29, HT29/Dx oraz COLO205. Komórki RJG wybrano jako układ modelowy, ponieważ w nowotworach jelita grubego obserwuje się wysoką akumulację Chol w komórkach, a także wysokie stężenie całkowitego Chol oraz lipoprotein LDL we krwi.^{42,43,199} Dodatkowo badania populacyjne wskazują, że dieta wysokotłuszczowa i otyłość są czynnikami istotnie zwiększającymi ryzyko wystąpienia RJG.^{4,39-41}

Większość badanych leków wykazało się średnią toksycznością wobec linii HT29 i HT29/Dx, a wyznaczone dla nich wartości IC_{50} mieściły się w zakresie od 7 do 100 μM . Brak cytotoksyczności wobec komórek linii HT29 i HT29/Dx wykazały tylko dwa leki przeciwpsychotyczne drugiej generacji: zyprazydon (ZIP) oraz rysperydon (RIS), dla których wartości IC_{50} wynosiły ponad 150 μM . Niską toksyczność wykazały też olanzapina (OLZ), kwetiapina (QTP) oraz lurazydon (LUR), również zaliczające się do atypowych leków przeciwpsychotycznych. Z kolei inny lek atypowy, klozapina (KLZ) posiadał średnią aktywność cytotoksyczną zarówno wobec komórek linii HT29, jak i HT29/Dx. Leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji, w tym pochodne fenotiazyny wykazały większą cytotoksyczność względem linii komórkowych HT29 i HT29/Dx niż leki drugiej generacji. Wśród pochodnych fenotiazyny najniższe wartości IC_{50} (ok. 10 μM) wykazały perfenazyna (PFA), prochlorperazyna (PCZ) oraz flufenazyna (FLU). Nieco słabszą toksycznością charakteryzowała się trifluoperazyna (TFP), w jej przypadku z kolei zaobserwowano silniejsze

działanie wobec komórek linii odpornej HT29/Dx niż wrażliwej HT29. Również pochodne tioksantenu okazały się silnie cytotoksyczne wobec komórek RJG, przy czym wyższą toksyczność wykazał tiotiksen (THX) niż flupentyksol (FLP). Jeśli chodzi o badany lek przeciwdepresyjny – imipraminę (IMP), to wykazała ona niską aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowej HT29 oraz HT29/Dx. Zgodnie z oczekiwaniem, toksyczność badanych leków przeciwpsychotycznych względem użytych linii komórkowych RJG była znacznie słabsza w porównaniu ze stosowanym w leczeniu RJG lekiem – SN-38. Co ciekawe, również związki wybrane przeze mnie jako modulatory biosyntezy Chol – lek simwastatyna (SIM) oraz związek pochodzenia naturalnego, betulina (BET) – wykazały znaczącą aktywność cytotoksyczną wobec komórek linii HT29 oraz HT29/Dx. Wartość parametru IC_{50} tych związków wobec linii HT29 oscylowała w okolicach 30 μ M, natomiast w przypadku linii odpornej w okolicach 50 μ M.

Stosowanie SN-38 w leczeniu pacjentów chorych na RJG niesie za sobą wiele efektów ubocznych, dodatkowo powiązane jest z powstawaniem lekooporności (MDR). SN-38 zwiększał ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za oporność, tj. *MRP1*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP4* oraz *BCRP* w linii komórkowej raka piersi.^{221,222} Leki przeciwpsychotyczne i antydepresyjne mogą być obiecującymi kandydatami na modulatory oporności wielolekowej występującej w wielu rodzajach nowotworów. Wykazano, że zmniejszają one ekspresję genu *MDR1* poprzez hamowanie szlaków sygnałowych regulujących jego transkrypcję, a także posiadają zdolność do zaburzania aktywności mitochondriów, odpowiedzialnych za produkcję ATP, niezbędnego do działania transporterów ABC.²²³ Wiele badań *in vitro* i *in vivo* wykazało, że leki przeciwpsychotyczne są inhibitorami lub substratami P-gp. Fenotiazyny, w tym TFP, wykazały zdolność do wiązania się z miejscem substratowym białka P-gp w badaniach *in vitro*, a ich działanie potrafiło doprowadzić do uwrażliwiania komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyków.²²⁴ Inną możliwą hipotezą tłumaczącą zdolność fenotiazyn do redukcji MDR w komórkach nowotworowych jest ich silne oddziaływanie z błoną komórkową, co może pociągnąć za sobą zmianę jej przepuszczalności oraz zaburzanie działania białek błonowych.^{225,226} Wysoką cytotoksyczność wobec komórek RJG zaobserwowano szczególnie w przypadku leków przeciwpsychotycznych pierwszej generacji. Mniejsza aktywność cytotoksyczna leków atypowych może wynikać ich wyższej specyficzności wobec receptorów dopaminowych oraz mniejszej sile działania niż leków pierwszej generacji, co przyczynia się do ich niższej toksyczności.

Do badań na kolejnej linii nowotworowej RJG (COLO205) wybrano 6 związków, w tym: dwa leki przeciwpsychotyczne drugiej generacji: RIS oraz KLZ, trzy leki należące do pierwszej generacji: FLU, TFP i FLP oraz jeden lek przeciwdepresyjny – IMP. Dodatkowo zbadano aktywność BET i jej pochodnych. Badania na linii komórkowej COLO205 wykazały, że najbardziej toksycznymi związkami wobec tych komórek była pochodna B1 oraz TFP. Wyznaczone dla nich IC_{50} było mniejsze od 5 μM . Wysoką toksyczność wykazały również pozostałe badane leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji. Podobnie jak dla linii HT29 najmniej toksyczny okazał się RIS. W przypadku BET i jej pochodnych B1 i B2, zaobserwowano duże różnice w ich toksyczności wobec komórek linii COLO205. B1, w której wymieniono obie grupy hydroksylowe BET na grupy acetylowe, posiadała najwyższą cytotoksyczność spośród wszystkich badanych związków (IC_{50} poniżej 2 μM). Druga pochodna z wymienioną jedną grupą hydroksylową miała prawie dwukrotnie wyższą wartość IC_{50} od BET i wykazała słabą aktywność cytotoksyczną wobec linii COLO205.

Cytotoksyczność badanych związków wobec komórek linii COLO205 była na ogół nieco większa niż wobec komórek linii HT29. Związki, które wykazały zbliżoną aktywność cytotoksyczną wobec obu linii nowotworowych RJG to KLZ, FLU, FLP, SIM i BET. Największą różnicę zaobserwowano dla TFP, której wartość IC_{50} w linii COLO205 była 4 razy niższa niż dla linii HT29. Również IMP wykazała wyższą toksyczność wobec komórek linii COLO205. Różnice we wrażliwości na badane związki mogą wynikać z innej morfologii i podtypu molekularnego wybranych linii RJG. Zastosowane linie nowotworowe różnią się swoim pochodzeniem, linia HT29 została pozyskana bezpośrednio z guza, natomiast linia COLO205 z komórek oderwanych od guza, wyizolowanych z płynu otrzewnowego. Ze względu na cechy morfologiczne komórki HT29 można określić jako komórki typu nabłonkowego, które charakteryzuje tworzenie ścisłych warstw wynikających z oddziaływań międzykomórkowych oraz brak skłonności do migracji. Komórki linii COLO205 należą do typu mezenchymalnego, w którym komórki mniej ściśle do siebie przylegają oraz posiadają zdolność do migracji pojedynczych komórek. Linie te różnią się również klasyfikacją do podtypów molekularnych CMS. Linia HT29 sklasyfikowana została jako model *in vitro* podtypu CMS3 (metaboliczny), natomiast linia COLO205 jako CMS1 (immunologiczny).^{227,228} Posiadają natomiast taki sam fenotyp metylatorowy wysp CpG (CIMP), dla którego charakterystyczna jest zwiększona metylacja wysp CpG.²²⁹ Klasyfikacja Duke'a mówiąca o zaawansowaniu raka jelita grubego wskazuje na klasę C dla linii HT29 (guz naciekający i posiadający przerzuty w węzłach chłonnych), zaś dla linii COLO205 na wyższe

zaawansowanie, o czym świadczy jej zakwalifikowanie do klasy D (przerzuty odległe).²³⁰ Wymienione wyżej różnice pomiędzy użytymi modelowymi liniami komórkowymi RJG mogą wyjaśniać większą toksyczność związków względem linii COLO205 niż HT29.

Istotną cechą leków jest selektywność, mówiąca o tym, w jakim stopniu oddziałują one na cel terapeutyczny. Leki nieselektywne wpływają na wiele różnych tkanek i narządów, co powoduje występowanie działań niepożądanych. W terapii przeciwnowotworowej istotne jest więc, aby przyszedł lek był selektywny wobec komórek nowotworowych, a nie wpływał znacząco na komórki zdrowe. Dlatego też zbadano toksyczność wybranych związków wobec komórek nienowotworowych. Wykorzystano w tym celu linię NHDF (fibroblasty) oraz linię komórkową nabłonka jelita grubego – FHC. Wszystkie związki wykazały istotnie mniejszą cytotoxycznosc wobec komórek normalnych w porównaniu z komórkami nowotworowymi. W przypadku linii NHDF leki przeciwpyschotyczne i przeciwdpresyjne posiadały IC_{50} wyższe od 100 μM , przy czym najmniej cytotoxyczny był RIS oraz TFP. Nieco większą cytotoxycznosc zaobserwowano wobec komórek linii FHC. W celu porównania różnicy w cytotoxycznosci leków wobec linii nowotworowych a normalnych zastosowano indeks selektywnosci (SI). Analiza ta wykazała, że badane leki przeciwpyschotyczne wykazywały selektywnosc wobec komórek rakowych. Najbardziej selektywne okazały się FLU, RIS oraz TFP względem linii COLO205. Były one ponad 10-krotnie bardziej toksyczne wobec komórek linii nowotworowej COLO205 niż wobec komórek normalnych linii FHC oraz NHDF. Wyniki te wskazują na duży potencjał tych związków w potencjalnym wykorzystaniu ich w terapii przeciwnowotworowej oraz szansy jej większego bezpieczeństwa i efektywnosci. Selektywne działanie cytotoxyczne leków przeciwpyschotycznych względem komórek nowotworowych zaobserwowano również w innych modelach komórkowych.^{141,142} Zanotowano je m. in. dla haloperidolu, OLZ, RIS i rezerpiny,¹⁴¹ a także dla pochodnych fenotiazyny.¹⁴²

Ponieważ, jak wspomniano we wstępie, leki z grupy leków przeciwpyschotycznych posiadają zdolność zaburzania homeostazy Chol i kwasów tłuszczowych, postanowiono sprawdzić, czy połączenie ich z modulatorami szlaku biosyntezy Chol, takimi jak SIM i BET, wpłynie na ich aktywnosc przeciwnowotworową. W doświadczeniach SIM i BET użyte zostały w stężeniu 5 μM , w którym obserwowano ich niską toksyczność wobec linii HT29 oraz HT29/Dx (bliską wartości IC_{10}). W przypadku linii COLO205, wartość IC_{10} dla SIM była nieco niższa. Większość badanych leków nie wykazała znacznego wzrostu cytotoxycznosci w połączeniu z SIM. Istotny spadek wartości stężenia hamującego wzrost komórek o 50% wobec linii komórkowej HT29 oraz HT29/Dx wykazały jedynie IMP, TFP oraz FLP. Dalsza analiza ich

oddziaływania z SIM potwierdziła możliwy synergizm działania tych trzech leków wobec linii HT29 oraz HT29/Dx. Natomiast analiza oddziaływania IMP, TFP i FLP w połączeniu z SIM wobec linii COLO205 przyniosła odmienne wyniki. IMP oraz FLP w połączeniu z SIM zachowywały się addytywnie, Z kolei TFP w niskich stężeniach wykazywała antagonizm wobec SIM, natomiast w wysokich stężeniach leku jego oddziaływanie z SIM było synergistyczne. W przypadku KLZ oraz FLU w obecności SIM nie zaobserwowano istotnej statystycznie zmiany wartości IC_{50} dla linii komórkowej HT29 oraz HT29/Dx. Wartości indeksu kombinacji wskazują na efekt addytywny działania FLU oraz KLZ wobec tych linii, bez wyraźnej synergii ani antagonizmu z SIM. Związki te odmienne zachowywały się w linii komórkowej COLO205, gdzie zaobserwowano synergię działania zarówno KLZ, jak i FLU z SIM, w szczególności w wysokich stężeniach leków. RIS we wszystkich badanych liniach wykazał antagonistyczne działanie z SIM, o czym świadczą zarówno zwiększone wartości stężenia IC_{50} , jak i obliczone indeksy kombinacji. Efekt antagonistyczny najslabiej widoczny był w linii COLO205. W uzyskanych wynikach uwagę zwraca fakt, że obserwowany efekt połączenia danego leku w dużym stopniu zależał od użytej linii komórkowej, a także od stężenia leku. Istnieje niewiele doniesień w których badano synergię leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych z innymi lekami w celu zbadania ich działania względem komórek nowotworowych. Badania wykonane wcześniej naszym zespołem wykazały, że policykliczne związki chemiczne z grupy oksyamów, flawonoidów oraz fenotiazyn w połączeniu ze statynami (simwastatyna, mewastatyna) przejawiały wyższą aktywność antyproliferacyjną i proapoptotyczną względem komórek linii RJG LoVo oraz odpornej na doksorubicynę linii LoVo/Dx.^{179,203,204} Ponadto działanie synergiczne tych związków spowodowało redukcję oporności komórek LoVo/Dx. Synergę w działaniu antynowotworowym zaobserwowano także dla połączenia statyn ze związkami pochodzenia naturalnego²³¹⁻²³³ oraz lekami przeciwzapalnymi.^{234,235} Statyny były również badane w połączeniu ze standardowymi lekami przeciwnowotworowymi. I tak na przykład lowastatyna wzmacniała działanie doksurubicyny w komórkach raka jajnika oraz mysiego czerniaka,^{236,237} fluwastatyna podnosiła efektywność leków stosowanych w leczeniu białaczki, raka piersi i jajnika,²³⁸⁻²⁴⁰ a SIM wykazywała synergę z lenalidomidem w komórkach szpiczaka.²⁴¹ Ostatnie badania przeprowadzone na linii komórkowej RJG dowiodły także istnienia synergii działania przeciwnowotworowego pomiędzy SIM a nowoczesnymi lekami przeciwnowotworowymi z grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych.²⁴² Wydaje się, że przeciwnowotworowa aktywność statyn oraz ich zdolność do potęgowania aktywności klasycznych cytostatyków jest ściśle związana z ich wpływem na syntezę Chol. Warita *et al.* w

swoich badaniach obejmujących linie komórkowe raka piersi, jajnika, jelita grubego, prostaty, mózgu oraz czerniaka wykazali, że ich wrażliwość na działanie atorwastatyny była pozytywnie skorelowana z wielkością redukcji wewnątrzkomórkowego poziomu Chol wywołanego przez statynę.²⁴³ Inhibicja reduktazy HMG-CoA przez statyny, oprócz zmniejszenia biosyntezy Chol, pociąga za sobą również zmniejszenie wytwarzania wielu ważnych związków pośrednich, np. mewalonianu. Skutkuje to obniżeniem poziomu stężenia izoprenoidów, które odpowiadają za prenylację wielu białek sygnałowych (w tym białek G oraz Ras).⁸¹ To z kolei powoduje zakłócenie ważnych procesów komórkowych, takich jak wzrost, różnicowanie, czy apoptoza.⁸¹ W kontekście mechanizmu antyproliferacyjnego działania statyn, interesujące są wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Yanga *et al.* w liniach komórkowych RJG.²⁴⁴ Autorzy dowiedli, że dodatek zarówno skwalenu, jak i mewalonianu zapobiegały obniżeniu poziomu Chol w komórkach nowotworowych wywołanemu przez atorwastatynę. Z kolei jedynie mewalonian, redukował wpływ statyny na wzrost komórek, co mogłoby sugerować, że to brak tego właśnie związku stanowi podstawę mechanizmu przeciwnowotworowego działania statyn.

Badania aktywności cytotoksycznej leków w kombinacji z innym modulatorem biosyntezy Chol – betuliną, wykazały w większości działanie addytywne lub antagonistyczne. KLZ oraz FLP w skojarzeniu z BET wykazały mniejszą cytotoksyczność względem linii HT29 oraz HT29/Dx. Zarówno wartości CI uzyskane dla obu tych linii, jak i około dwukrotny wzrost wartości IC₅₀, wskazują na efekt antagonistyczny działania kombinacji KLZ oraz FLP z BET. Warto zaznaczyć, że efekt antagonistyczny połączenia FLP z BET w liniach komórkowych HT29 oraz HT29/Dx zanikał przy najwyższych zastosowanych stężeniach FLP. Połączenie KLZ z BET w linii COLO205 również wykazało efekt antagonistyczny, był on jednak znacznie słabszy. Odmienne wyniki uzyskano dla kombinacji FLP i BET w trzeciej badanej linii RJG – COLO205, gdzie kombinacja związków nie spowodowała dużych zmian w wartości IC₅₀, a wartości CI wskazują na efekt addytywny. W przypadku FLU w niskich stężeniach obserwowano efekt antagonistyczny w połączeniu z BET wobec linii HT29, HT29/Dx oraz COLO205, natomiast w wyższych stężeniach efekt addytywny. Połączenie tej fenotiazyny z BET nie wpłynęło znacząco na zmianę wartości IC₅₀ we wszystkich badanych liniach nowotworowych. Co istotne, FLU stosowana sama, jak i z terpenem wykazała wysoką aktywność cytotoksyczną wobec badanych linii RJG. IMP w obu badanych liniach komórkowych w połączeniu z BET zachowywała się addytywnie. Z kolei RIS posiadał niską aktywność wobec badanych linii komórkowych RJG, przy czym w liniach HT29 i HT29/Dx dodanie do niego BET spowodowało lekki wzrost przeżywalności komórek, co przemawia za

antagonistycznym efektem kombinacji związków. Ten lek atypowy wykazał natomiast synergistyczne działanie w połączeniu z BET w linii COLO205 w szczególności w niższych stężeniach RIS. Kombinacja ta spowodowała duży spadek wartości IC_{10} oraz IC_{25} , przy wyższych stężeniach RIS efekt ten jednak zanikał. Połączenie tych związków nie powodowało jednak istotnych zmian w badanych liniach RJG, ponieważ RIS sam jak i w kombinacji z BET posiadał niską aktywność cytotoksyczną wobec linii nowotworowych RJG. Zupełnie odmiennie niż wyżej wymienione leki, zachowywała się TFP. Ta pochodna fenotiazyny jako jedyna wykazała synergię działania w połączeniu z BET w liniach komórkowych RJG. Zaobserwowano w nich wyraźny spadek wartości IC_{50} po dodaniu BET, najwyższy dla linii HT29 – gdzie wartość ta spadła o połowę. W niższych stężeniach TFP była bardziej toksyczna od kombinacji TFP z BET, natomiast w wyższych stężeniach obserwowano większą aktywność cytotoksyczną kombinacji. TFP wykazała się wysoką toksycznością wobec badanych linii RJG oraz wykazała synergię działania z BET. Uzyskane wyniki badania oddziaływania leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych oraz BET wobec linii komórkowych RJG zależały zarówno od ich stężenia, jak i użytej linii komórkowej. Istnieje niewiele doniesień na temat aktywności przeciwnowotworowej BET w połączeniu z innymi związkami. Preinkubacja komórek raka wątrobowokomórkowego z BET zwiększała ich wrażliwość na sorafenib, co zostało przez autorów powiązane z inhibicją czynnika SREBP-1 przez BET.¹⁰⁰ Z kolei komórki białaczkowe Jurkat wykazywały się większą wrażliwością na BET w obecności Chol, co sugeruje, że cytotoksyczność BET w jakiś sposób zależy od integralności i przepuszczalności błony komórkowej.¹⁰⁵ BET jest prekursorem kwasu betulinowego, którego działanie biologiczne było znacznie szerzej badane. Wykazano, że związek ten wykazywał się synergia działania przeciwnowotworowego zarówno w połączeniu z lekami,^{245–249} jak i związkami pochodzenia naturalnego²⁵⁰ w liniach komórkowych pochodzących z wielu rodzajów nowotworów. Obserwowane interakcje pomiędzy kwasem betulinowym a lekiem różniły się w zależności od badanej linii komórkowej. Kombinacja kwasu betulinowego z cisplatyną wykazywała działanie synergistyczne w linii płaskonabłonkowego raka języka SCC25, zaś w linii SCC9 działanie antagonistyczne.²⁵¹

Dalsze badania nad lekami, które wykazały synergia działania z BET lub SIM, w tym analiza ich wpływu na cykl komórkowy, zdolność indukcji apoptozy oraz generowania reaktywnych form tlenu (ROS) w linii HT29, pozwoliły na zbadanie mechanizmu stojącego za działaniem przeciwnowotworowym kombinacji tych związków. FLP, IMP oraz TFP wykazały się wysoką

toksycznością wobec komórek linii HT29. Analiza cyklu komórkowego wykazała, że wszystkie badane leki wyraźnie zwiększały liczebność komórek martwych w populacji w porównaniu z komórkami nietraktowanymi lekiem. Najsilniejsze zmiany wywoływała IMP, następnie TFP, a najsłabsze FLP. Z kolei, tylko w przypadku FLP dodanie SIM powodowało zwiększenie liczebności komórek będących w fazie sub-G1 w porównaniu z lekiem stosowanym pojedynczo. Traktowanie komórek linii HT29 lekami wyraźnie podnosiło również ilość komórek apoptotycznych, co potwierdziły także mikroskopowe obserwacje komórek, w trakcie których dostrzeżono zmiany morfologiczne, w tym mniejszą objętość komórek oraz utratę adhezji.

Badane leki indukowały proces apoptozy w komórkach linii HT29, o czym świadczy znaczny wzrost populacji komórek w fazie wczesnej apoptozy po traktowaniu lekami. Zmiany w liczebności populacji komórek apoptotycznych największe były dla IMP i TFP, a nieco słabsze dla FLP. Z kolei ani BET, ani SIM nie indukowały apoptozy w komórkach linii HT29. W przypadku IMP i TFP dodatkowe zastosowanie SIM lub BET nie spowodowało zwiększenia liczebności populacji komórek apoptotycznych, czyli silniejszej indukcji apoptozy w porównaniu z lekami antypsychotycznymi zastosowanymi samodzielnie. Inaczej prezentowała się sytuacja dla FLP. W tym przypadku, zastosowanie go w kombinacji z SIM lub BET skutkowało znacznym wzrostem ilości komórek apoptotycznych i nekrotycznych w linii HT29. Dodatkowo, wszystkie z badanych związków posiadały aktywność prooksydacyjną w badanej linii RJG. Najsilniejszy wpływ na zdolność do generowania ROS miała SIM. BET i leki antypsychotyczne stosowane samodzielnie nie wykazały istotnej zdolności do generowania ROS. Dodanie SIM do TFP i IMP zwiększyło względny poziom ROS, natomiast dodanie BET nie wpłynęło znacząco na zdolność do generowania ROS przez badane leki w komórkach linii HT29. W przypadku FLP, połączenie go zarówno z SIM, jak i z BET nie zmieniło istotnie poziomu ROS. Otrzymane wyniki wykazują, że badane leki przeciwpsychotyczne mogą pobudzać procesy uszkodzające DNA w komórkach linii HT29 oraz prowadzić do ich śmierci w wyniku procesu apoptozy. Co ciekawe, wzmocnienie efektu proapoptotycznego względem leku stosowanego pojedynczo pod wpływem kombinacji z SIM lub BET zaobserwowano jedynie dla FLP. Częściowo może to być wyjaśnione, przez fakt, że efekt toksyczny i proapoptotyczny TFP oraz IMP stosowanych samodzielnie był tak silny, że jego ewentualne dodatkowe wzmocnienie było już nieobserwowalne za pomocą używanych metod. Upřednio zaobserwowano, że obecność inhibitorów reduktazy HMG-CoA może wpływać na dystrybucję komórek nowotworowych w cyklu komórkowym. Statyny w połączeniu z innymi związkami

mogą powodować zatrzymanie komórek RJG w fazie G0/G1 cyklu.^{244,252} Atowarstatyna zastosowana ze związkiem naturalnym, floretyną, wobec linii komórkowych RJG, wykazała działanie synergistyczne w indukcji apoptozy, a także zdolność do zatrzymania cyklu komórkowego.²³² W grupie komórek traktowanych tą kombinacją, zaobserwowano silniejszą indukcję apoptozy niż dla związków zastosowanych osobno oraz znaczny wzrost komórek znajdujących się w fazie S. Kombinacja związków zatrzymywała komórki w punkcie G2/M, co wynikało z obniżonej aktywności kinazy cdc2. Z kolei połączenie pochodnych fenotiazyny z SIM powodowało zmniejszenie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2, zwiększenie ekspresji proapoptotycznego białka Bax oraz wzrost aktywności kaspazy-3 w komórkach RJG.²⁰⁴ Proapoptotyczny efekt kombinacji związków był silniejszy w porównaniu z zastosowaniem pojedynczych substancji, a dodatkowo zaobserwowano synergizm w ich działaniu cytotoksycznym wobec komórek nowotworowych.

Następnym etapem badań było sprawdzenie wpływu badanych leków na poziom ekspresji dwóch genów będących pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego SREBP: *HMGCR* i *LDLR*. Doświadczenia przeprowadzono na liniach komórkowych HT29 oraz HT29/Dx. Zmiany w poziomie ekspresji genów pod wpływem leków przeciwpsychotycznych zaobserwowane w tej pierwszej były zdecydowanie większe niż w komórkach linii HT29/Dx. Może to świadczyć o tym, że komórki odporne na dokсорubicynę, ze względu na aktywne w nich transportery wielolekowe, mają zdolność do ograniczenia wnikania leków do komórek i – tym samym – ograniczenia ich wpływu na poziom ekspresji genów. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych na poziom ekspresji genów lipogennych w dużym stopniu zależał od czasu inkubacji komórek ze związkami. KLZ zwiększała poziom ekspresji genu *HMGCR*, w komórkach linii HT29 zarówno po 24, jak i po 48 godz. inkubacji. FLU zwiększała ekspresję genu *HMGCR* po krótszym czasie inkubacji, natomiast nie wpływała na zmianę ekspresji po dłuższym czasie stosowania. W przypadku IMP, TFP i FLP hodowla komórek linii HT29 w obecności tych leków przez 24 godz. spowodowała niewielki wzrost ekspresji tego genu, natomiast po 48 godz. następował albo spadek ekspresji (TFP, FLP) lub powrót poziomu ekspresji do wartości obserwowanych w komórkach HT29 nietraktowanych lekiem (IMP). Wpływ badanych leków na poziom ekspresji genu *LDLR* widoczny był tylko w krótszym czasie inkubacji, gdzie KLZ, FLU, TFP i FLP zwiększały ekspresję, a IMP i RIS nie miały na nią wpływu. Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że KLZ oraz wszystkie leki, w przypadku których zaobserwowano synergizm działania z SIM, wpływały na ekspresję badanych genów lipogennych. Jest to w zgodzie z poprzednio publikowanymi wynikami. W badaniu na

komórkach glejaka, KLZ użyta w podobnym stężeniu i po 24-godzinnym czasie inkubacji, wykazała podobną zdolność do zwiększania ekspresji genu *HMGCR* (względny poziom ekspresji wynosił 1,8),¹⁵⁵ jak zaobserwowano w niniejszej pracy dla linii komórkowej RJG — HT29 (względny poziom ekspresji ok. 1,5). Również inne leki przeciwpsychotyczne indukowały wzrost ekspresji genów *HMGCR* i *LDLR*, właściwości takie stwierdzono m. in. dla pimozydu i haloperidolu,^{140,156} a także KLZ i RIS.²⁵³ Ekspresja genu *LDLR*, stymulowana była również w obecności TFP oraz IMP;²⁵⁴ ten ostatni lek podwyższał również ekspresję genu *HMGCS1*, kodującego syntazę HMG-CoA.¹⁵² Zauważyć należy, że otrzymane przez nas poziomy wzrostu ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm Chol są nieco niższe niż podawane w literaturze dla tych samych leków, ponadto nie zaobserwowaliśmy aktywności RIS. Wydaje się, że – poza różnicami wynikającymi z użycia innych linii komórkowych – może mieć to związek z doбором parametrów doświadczenia, a szczególnie czasu inkubacji ze związkami. W wielu pracach najsilniejsze wzrosty ekspresji obserwowano w czasie do 10 godzin inkubacji z lekiem, później efekt ten zanikał lub nawet ekspresja badanych genów ulegała obniżeniu.^{155,255,256} Prawdopodobne więc jest, że zastosowanie krótszego czasu inkubacji pozwoliłoby na obserwację silniejszych zmian ekspresji genów lipogennych pod wpływem badanych leków również w komórkach RJG.

Analiza ekspresji genów wykonana w celu zbadania mechanizmu aktywności leków przeciwpsychotycznych ujawniła, że leki te posiadają wspólną właściwość, którą jest zdolność do zaburzania biosyntezy kwasów tłuszczowych i Chol.¹⁵⁴ Oprócz zwiększania ekspresji genów związanych z czynnikiem transkrypcyjnym SREBP, leki przeciwpsychotyczne należące do grupy leków atypowych, jak i typowych, hamowały transport Chol przenoszonego za pomocą lipoprotein do retikulum endoplazmatycznego (ER).¹⁵⁶ Zdolność do zaburzania transportu Chol LDL została wykazana m.in. dla IMP, TFP oraz KLZ.^{147,257} Zaobserwowano gromadzenie się Chol związanego z lipoproteinami wewnątrz komórek ludzkich pochodzenia mózgowego i wątrobowego, oraz zmniejszoną estryfikację Chol w ER. Ponadto amfifile należące do klasy II (wg klasyfikacji zaproponowanej w pracy Langego i Stecka¹⁴⁷) wykazały zdolność do zwiększania aktywności reduktazy HMG-CoA,¹⁴⁷ Dodatkowo w pracy opublikowanej przez Wiklunda *et al.* powiązано zdolność selektywnego hamowania przeżywalności komórek nowotworowych względem komórek normalnych z ich zdolnością do regulacji homeostazy Chol i modyfikacji właściwości biofizycznych błon komórkowych.¹⁴⁰ Należy przy tym podkreślić, że wpływ leków przeciwpsychotycznych na ekspresję genów lipogennych jest silnie

związany z ich stężeniem w osoczu, a dawka potrzebna do zwiększenia ekspresji genów jest znacznie większa od stosowanych dawek terapeutycznych.¹⁵³

Biorąc pod uwagę opisane powyżej obserwacje, zbadano jak leki przeciwpsychotyczne wpływały na poziom wolnego (niezestryfikowanego) Chol w komórkach RJG. Analiza ilości wolnego Chol za pomocą barwienia filipiną, wykazała że badane leki wpływały na jego poziom w komórkach linii HT29. Chol obserwowano głównie na powierzchni komórek, dodatkowo rozmieszczony był on równomiernie w większości badanych przypadków. Zgodnie z oczekiwaniem, SIM powodowała znaczący spadek intensywności fluorescencji pochodzącej z traktowanych nią komórek HT29. Podobny wpływ statyn, w tym SIM, na poziom wolnego Chol był już wcześniej obserwowany.^{258,259} Istotny wzrost poziomu wolnego Chol w komórkach HT29 zaobserwowano po zastosowaniu KLZ. Stosowanie tego leku drugiej generacji, powiązane jest ze zwiększeniem poziomu glukozy, Chol i trójglicerydów w osoczu pacjentów, a co za tym idzie sprzyja wystąpieniu u nich cukrzycy typu 2, hiperlipidemii oraz agranulocytozy. W badaniu, w którym połączono stosowanie KLZ z flawonoidem pochodzenia naturalnego – naringeniną, u szczurów z indukowaną psychozą zaobserwowano działanie ochronne flawonoidu przed skutkami niepożądanymi tego leku przeciwpsychotycznego.²⁶⁰ Kombinacja tych związków spowodowała także zmniejszenie poziomu Chol, trójglicerydów oraz glukozy w osoczu, zmniejszając prawdopodobieństwo wystąpienia hiperlipidemii indukowanej przez KLZ w modelu zwierzęcym. Warto również podkreślić, że KLZ jest uznawana za jeden z najsilniejszych leków przeciwpsychotycznych i – mimo występowania działań niepożądanych – dalej stosowana jest w terapii schizofrenii odpornej na leczenie. Podobnie w komórkach raka wątroby inkubowanych z KLZ i haloperidolem zaobserwowano zwiększoną akumulację Chol.²⁶¹ Leki przeciwpsychotyczne zakłócały też wewnątrzkomórkowy transport Chol, poprzez zmniejszenie jego estryfikacji. Dodatek związku polifenolowego, kurkuminy, zwiększał sekrecję Chol i jednocześnie zmniejszał jego akumulację wewnątrz komórek raka wątroby.²⁶¹ Akumulacja niezestryfikowanego Chol w komórkach jest cechą charakterystyczną wielu chorób i może wynikać z adaptacji komórek do stresu oksydacyjnego. Dla BET, RIS i IMP nie zaobserwowano wpływu na poziom Chol w komórkach HT29. Stoi to w kontraście do badań Bala i Birda,²⁶² którzy wykazali zmniejszenie ilości kompleksów filipina-Chol w błonach neuronów szczurów, którym podawano IMP lub mianserynę. Z drugiej strony, leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji, FLU, TFP oraz FLP, a także pochodne betuliny B1 oraz B2, istotnie obniżały poziom wolnego Chol w komórkach HT29. Warto podkreślić, że w przypadku TFP, FLP oraz B1 zaobserwowano

nierównomierny rozkład fluorescencji filipiny. Występowanie niejednorodności w wybarwieniu na powierzchni komórek HT29, nasuwa przypuszczenie, że w błonie komórkowej mogą pojawiać się obszary wzbogacone w Chol.

W podsumowaniu części pracy opartej na doświadczeniach na komórkach RJG, chciałabym przedyskutować możliwe mechanizmy, które mogą decydować o przeciwnowotworowym działaniu badanych leków przeciwpsychotycznych, a w szczególności o występowaniu synergii między nimi a związkami hamującymi biosyntezę Chol. Interesujące wyniki uzyskano szczególnie dla leków przeciwpsychotycznych pierwszej generacji, które wykazały się wysoką cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych. Przy tym cytotoksyczność badanych związków była na ogół wyższa względem linii COLO205 niż linii HT29 oraz HT29/Dx. Ponadto, TFP oraz FLP wykazały synergiczne działanie w połączeniu z SIM. Efekt ten nie był widoczny dla FLU, dla której słabą synergicę z SIM obserwowano jedynie w linii komórkowej COLO205 i przy bardzo wysokich stężeniach leku. Kolejnym lekiem wykazującym synergistyczne działanie w połączeniu z SIM była IMP. Z kolei kombinacja SIM i KLZ charakteryzowała się antagonizmem działania, podczas gdy RIS i SIM zachowywały się addytywnie. Gdy badane leki połączono z BET, synergicę zaobserwowano jedynie dla TFP, dla KLZ widoczny był antagonizm, podczas gdy pozostałe badane leki wykazywały się działaniem addytywnym. Widać więc, że połączenie leków przeciwpsychotycznych z SIM dawało większą szansę na zaobserwowanie synergii działania przeciwnowotworowego niż w przypadku kombinacji z BET. Wydaje się, że za uzyskane obserwacje odpowiadać może różnica we wpływie SIM i BET na poziom wolnego Chol w komórkach nowotworowych. Statyna, w stężeniach użytych w doświadczeniach nad kombinacjami leków, w sposób wyraźny obniżała poziom Chol wewnątrz komórek, podczas gdy w przypadku BET nie obserwowano takiego działania. Dodatkowo, wszystkie leki, dla których wykazano synergicę z SIM, same w sobie także obniżały poziom wolnego Chol. Przypuszczać więc można, że za cytotoksycznym działaniem TFP, FLU, FLP oraz prawdopodobnie B1 stać może mechanizm związany z pozbawieniem komórki odpowiedniej ilości Chol, który stanowi jeden z najważniejszych składników budulcowych błon komórkowych. Ponadto TFP, FLP oraz B1 wpływały na rozmieszczenie Chol w błonie komórkowej, jak pozwala przypuszczać analiza obrazów komórek barwionych filipiną. Interesujące byłoby zatem zbadanie, czy pochodna B1 w połączeniu z SIM również wykazywałaby synergicę działania przeciwnowotworowego. Pozwoliłoby to potwierdzić przypuszczenie o istotności wpływu związku na poziom i rozmieszczenie Chol w komórce na prawdopodobieństwo pojawienia się synergii działania ze

statyną. Z drugiej strony, synergia z SIM była obserwowana także dla IMP, która nie wpływała istotnie na poziom wolnego Chol w komórkach, co świadczy o tym, że w tym przypadku za obserwowanym efektem musi stać jakiś inny mechanizm. W przypadku KLZ wykazano z kolei działanie antagonistyczne w kombinacji zarówno z SIM, jak i z BET. Jednocześnie był to jedyny z badanych leków, który powodował znaczący wzrost poziomu Chol w komórkach RJG. Świadczyć to może, że także w tym przypadku wpływ leku na poziom tego ważnego sterydu decyduje o jego działaniu cytotoksycznym. Wydaje się, że KLZ podnosząc poziom Chol mogłaby chronić komórki nowotworowe przed szkodliwym działaniem SIM. Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na istnienie – w badanej grupie leków – powiązania pomiędzy wpływem związków na poziom Chol w komórce, a ich aktywnością przeciwnowotworową. Zmniejszenie ilości wolnego Chol w komórkach może modyfikować zarówno fizyczne (np. płynność i przepuszczalność), jak i funkcjonalne parametry błony komórkowej (np. aktywność białek błonowych), w ten sposób sprawiając, że komórki nowotworowe stają się bardziej podatne na toksyczne działanie leków.

Ponieważ, wpływ badanych leków na poziom Chol w komórce wydaje się mieć istotne znaczenie dla ich aktywności przeciwnowotworowej, następnym zagadnieniem podjętym w niniejszej pracy było badanie oddziaływania leków przeciwpsychotycznych z modelowymi błonami lipidowymi o składzie powodującym pojawienie się w nich mikrodomen. Użycie ogromnych jednowarstwowych liposomów (GUV) o składzie DOPC:Chol:SM (1:1:1) pozwoliło na bezpośrednią mikroskopową obserwację obszarów błony będących w fazie ciekłokrystalicznej nieuporządkowanej (L_D ; jasne obszary) oraz ciekłokrystalicznej uporządkowanej (L_O ; ciemne obszary). Uzyskane wyniki jasno pokazały, że wszystkie badane związki wpływały na mikrodomeny. Wszystkie badane leki zmniejszały pole powierzchni pojedynczych domen, choć tylko kilka z nich zmieniało istotnie liczbę domen obserwowanych na powierzchni pojedynczego liposomu. Tylko BET i IMP zwiększały liczbę domen na liposom, zaś FLU i LUR obniżały ją. Analiza uzyskanych obrazów mikroskopowych ujawniła, że mikrodomeny w GUVach formowanych w obecności leków na ogół pozostawały okrągłe, ale w niektórych przypadkach badane związki wpływały także na ich kształt. W szczególności widoczne to było dla KLZ, IMP, BET i LOR. Przepuszczalnym mechanizmem prowadzącym do powstania niesferycznych domen, była fuzja pojedynczych domen, prowadząca do powstania bardziej skomplikowanych kształtów. To z kolei mogło być spowodowane tendencją niektórych leków do „unikania” regionów błony stanowiących granice pomiędzy obszarami w fazie L_D i L_O . Fuzja domen prowadziłyby więc do redukcji całkowitej długości

międzyfazowych rejonów granicznych w układzie. Ponadto niewykluczone jest, że niektóre związki powodujące powstanie niesferycznych domen mogły indukować pojawienie się w układzie obszarów błony w fazie stałej (żelowej). Wśród związków wpływających na kształt domen były: BET o strukturze cząsteczki podobnej do Chol, a także IMP, LOR i KLZ. Te trzy leki zawierają w cząsteczkach hydrofobowy układ pierścieni dibenzocykloheptenu. Wszystkie będą więc wykazywały tendencje do silnego oddziaływania z hydrofobową częścią błony. Tego typu oddziaływanie zostało uprzednio udokumentowane dla KLZ.^{263,264} GUVy stanowią bardzo wygodny model do badania separacji faz w układach lipidowych. Pomimo to, są stosunkowo rzadko wykorzystywane do badania oddziaływania różnych związków z błonami. Poza pionierską pracą pochodzącą z naszego laboratorium,⁶⁷ do tej pory GUVy były użyte jedynie w badaniach nad flawonoidami⁶⁸ oraz antybiotykami polienowymi.²⁶⁵ W poprzedniej pracy pokazaliśmy, że pochodne fenotiazyny, a w szczególności TFP, silnie zwiększały liczbę domen w GUVach od składu DOPC:Chol:SM (1:1:1), zmniejszając jednocześnie ich powierzchnię.⁶⁷ Wyciągnięto wniosek, że leki z tej grupy preferencyjnie oddziaływały z międzyfazowym rejonem granicznym (L_D/L_O) w błonach liposomów. Uzyskane wyniki wskazują, że badane leki mają zdolności do oddziaływania z błonami zawierającymi mikrodomeny lipidowe. Badania na prostym układzie modelowym nie pozwalają jednak na wyciągnięcie wniosków, co do istotności oddziaływania leków z domenami lipidowymi dla ich aktywności biologicznej, a w szczególności przeciwnowotworowej. Naturalnym kierunkiem kontynuacji opisanych w niniejszej pracy badań jest przeprowadzenie doświadczeń nad oddziaływaniem badanych leków z tratwami lipidowymi izolowanymi z komórek lub bezpośrednio w błonach komórkowych. Jest to zagadnienie o tyle ciekawe, że tego typu badania w zasadzie nie były do tej pory prowadzone. Jedyne znane mi doniesienie, to praca Eisensamera *et al.*, w której technikami immunochemicznymi potwierdzono, że KLZ, FLU i haloperidol, ale nie RIS, wiązały się z tratwami lipidowymi w komórkach nerwiaka zarodkowego.²⁶⁶

Badania *in silico* związków badanych w pracy, wykonane zostały w celu określenia ich właściwości fizykochemicznych oraz farmakologicznych. Wszystkie leki spełniały kryteria reguły Lipińskiego, a co za tym idzie charakteryzowały się dobrą absorpcją i zdolnością do przenikania błon biologicznych, co sugeruje ich potencjalną biodostępność w przypadku podania doustnego.^{209,210} Obliczenia uzyskane w programie OSIRIS wskazały również na możliwe negatywne skutki stosowania leków. Działania takie wykazały głównie leki I generacji, w tym potencjalny negatywny wpływ na procesy reprodukcyjne w przypadku PFA, PCZ, FLU, TFP, FLP, THX i IMP, a także właściwości mutagenne w przypadku FLU i TFP. Z

kolei potencjalne własności drażniące posiadały QTP, LUR i pochodna betuliny, B1. Mimo spełnienia kryteriów dla leków stosowanych doustnie, leki przeciwpsychotyczne i przeciwdepresyjne charakteryzuje wysoka lipofilowość i słaba rozpuszczalność w wodzie. Właściwości te są m.in. powodem występowania skutków ubocznych ich stosowania oraz zmniejszają ich skuteczność terapeutyczną. Leki przeciwpsychotyczne i przeciwdepresyjne posiadały niskie wartości parametru TPSA, które wskazują, że posiadają one zdolność do przenikania bariery krew-mózg,²¹⁰ istotnej z punktu ich przeznaczenia farmakologicznego. Lipofilowość jest ważnym deskryptorem fizykochemicznym, który wpływa na transport cząsteczek przez błony biologiczne. Determinuje on procesy wchłaniania i dystrybucji związków w organizmie. Leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji wykazywały generalnie większą lipofilowość od leków drugiej generacji, znajduje to potwierdzenie również w innych pracach. Największą lipofilowość wśród tych leków wykazały TFP oraz FLP (logP w okolicach 5). Najmniejszą natomiast QTP oraz OLZ (logP w okolicach 3). Niska rozpuszczalność leków w wodzie natomiast może być powodem gorszego wchłaniania leku oraz jego transportu z miejsca podania do krwi. W tym przypadku lekiem przeciwpsychotycznym o najgorszej rozpuszczalności w wodzie była TFP, natomiast najlepiej rozpuszczalnym okazała się QTP – oba wyniki korelują z ich lipofilowością – wysoką dla TFP i niską dla QTP. Leki pierwszej generacji charakteryzują się także niższym wchłanianiem jelitowym niż leki drugiej generacji, które wykazują wysoką rozpuszczalność i umiarkowaną lipofilność.²⁶⁷ Typowe leki przeciwpsychotyczne, charakteryzują się silnym charakterem lipofilnym oraz słabą rozpuszczalnością w wodzie, co odpowiada za ich ograniczoną przepuszczalność i wychwyty przez barierę krew-mózg. Leki te są również szeroko dystrybuowane do miejsc nieobjętych leczeniem tymi lekami, skutkując ich poważnymi skutkami niepożądanymi (zaburzenia ruchowe, przyrost masy ciała, zdarzenia sercowo-naczyniowe). Typowe i atypowe leki przeciwpsychotyczne ulegają również metabolizmowi pierwszego przejścia, co powoduje ich powolny początek działania oraz niskie wchłanianie po podaniu doustnym. W celu zwiększenia skuteczności terapeutycznej oraz zmniejszenia ogólnoustrojowych działań niepożądanych tych leków podejmowane są próby tworzenia nanoemulsji by zwiększyć ich biodostępność.²⁶⁸

SN38, lek przeciwnowotworowy będący analogiem kamptotecyny charakteryzuje się słabą hydrofilowością, jak i lipofilowością, a co za tym idzie źle rozpuszcza się w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach oraz posiada niskie zdolności do przenikania błon komórkowych. Posiadał on najwyższą wartość TPSA, co także przemawia za jego gorszą

zdolnością do przenikania barier biologicznych od innych badanych leków, a także większym powinowactwem do glikoproteiny P.²¹² Właściwości te tłumaczą skutki uboczne SN-38, w tym wysoką toksyczność, stąd powstały próby zamykania tego leku w liposomach w celu zmniejszenia jego toksyczności i zwiększenia zdolności do przenikania błon komórkowych.²⁶⁹

Leki antypsychotyczne oraz lek przeciwnowotworowy – SN38 o dobrze poznanym profilu farmakologicznym i toksykologicznym posłużyły jako zestaw modelowy do porównania ich z pochodnymi BET i sprawdzenia, czy mogą one posiadać podobne właściwości. Najwyższe wartości logP uzyskała BET i jej pochodne, co wskazuje na możliwość słabej absorpcji tych związków w jelitach oraz duże prawdopodobieństwo ich interakcji z wieloma białkami.²⁷⁰ Pochodna B1 nie spełniała kryterium reguły pięciu, co może oznaczać że jej właściwości w małym stopniu pokrywają się z lekami dostępnymi komercyjnie. Ujemne wartości lekopodobieństwa posiadała także BET i pochodna B2. Terpeny te posiadały również najmniejszą reaktywność, świadczącą o wysokiej stabilności kinetycznej i małej zdolności tych związków do wchodzenia w reakcje chemiczną z innymi cząsteczkami.

Jeżeli weźmiemy pod uwagę, istnienie ewentualnych zależności pomiędzy fizykochemicznymi właściwościami cząsteczek związków, a ich aktywnością cytotoksyczną, to otrzymane wyniki nie pozwalają na wyciągnięcie wiążących wniosków. Zauważono, że wiele związków o wysokiej aktywności antyproliferacyjnej posiadało wysokie wartości momentu dipolowego oraz wartości logP na ogół powyżej 4. Może to sugerować, że zarówno polarność, jak i lipofilowość związku, mają wpływ na jego aktywność biologiczną. Z drugiej strony, nie wykazano istnienia korelacji pomiędzy chemiczną reaktywnością związku (wyrażoną jako różnica energii między poziomami HOMO i LUMO), a jego aktywnością cytotoksyczną.

W celu sprawdzenia zdolności badanych związków do przenikania dwuwarstwy lipidowej użyto programu PerMM. Wyznaczone energie wiązania z modelowymi błonami wskazują na korzystne energetycznie oddziaływanie badanych leków oraz BET i jej pochodnych z dwuwarstwą zbudowaną z DOPC. SIM, BET i jej pochodne wykazały największą zdolność do przenikania tej bariery lipidowej. W przypadku bardziej skomplikowanego modelu odwzorowującego barierę krew-mózg (BBB), wartości współczynnika przepuszczalności dla leków były wyższe od wartości progowej -4,35; co oznacza, że mogą one przenikać tę barierę i oddziaływać na układ nerwowy człowieka.²¹⁴ Wynik taki spodziewany był w przypadku leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych. Co ciekawe, najwyższą przepuszczalnością w modelu BBB wykazała się pochodna B1, przy czym BET i B2 posiadały

również wysoką zdolność do jej przenikania — bliskie wartości otrzymanej dla IMP. Kolejny model błony komórkowej nabłonka jelitowego (Caco-2) wykazał najniższe wartości współczynnika przepuszczalności, co związane jest z większą złożonością jego budowy, w tym obecnością Chol i SM. Badane związki wykazywały też wysoką zdolność do przenikania modeli błon lipidowych o prostym składzie lipidowych, tj. BLM czy PAMPA DS. Związkiem, dla którego zaobserwowano najwyższą zdolność do interakcji z modelowymi błonami, jest pochodna B1, która wykazała najwyższe wartości współczynnika przepuszczalności wobec wszystkich badanych modeli błon komórkowych, zarówno sztucznych, jak i naturalnych, oraz posiadała najniższą energię swobodną wiązania z dwuwarstwą lipidową. Podsumowując można stwierdzić, że procesy związane z oddziaływaniem z błonami lipidowymi mogą być ważne dla aktywności biologicznej wszystkich badanych związków, a w szczególności pochodnej B1.

Ze względu na brak danych literaturowych na temat oddziaływania z błonami lipidowymi pochodnych betuliny B1 i B2, przeprowadziłam dodatkowo badania doświadczalne w celu określenia wpływu tych związków na właściwości dwuwarstw lipidowych metodą mikrokalorymetrii oraz spektroskopii fluorescencyjnej. Dodatkowo, zbadalam wpływ BET, jako związku wyjściowego do uzyskania obu pochodnych. Badania mikrokalorymetryczne wykazały, że wszystkie badane terpeny wpływały na termotropowe właściwości dwuwarstw lipidowych zbudowanych z DMPC i DPPC. Dodatek tych związków powodował obniżenie temperatury, zmniejszenie zmiany entalpii oraz zwiększenie szerokości piku głównej przemiany fazowej obu lipidów. Największy wpływ na badane parametry w tych modelowych dwuwarstwach lipidowych wykazała pochodna B2, natomiast najsłabszym modulatorem okazała się pochodna B1. Zmiany tego typu uznaje się za charakterystyczne dla związków zaburzających obszar graniczny między polarnym i apolarnym rejonem błony.²⁷¹ Zmiany obserwowane w dwuwarstwach utworzonych z DMPC były silniejsze niż dla DPPC. Wynikać to może z faktu, że DMPC posiada krótszy łańcuch acylowy niż DPPC, a co za tym idzie, słabsze oddziaływania międzyłańcuchowe i mniej zwartą strukturę dwuwarstwy niż DPPC, co czyni błonę modelową utworzoną z DMPC bardziej podatną na wpływ związków wbudowujących się w nią. Interesującym faktem jest dwufazowy efekt wywierany przez BET obserwowany w dwuwarstwach zbudowanych z DMPC. Związek ten mocno wpływał na parametry przemiany fazowej błony aż do stosunku molowego związek:lipid 0,04, a następnie – wraz ze zwiększaniem zawartości związku – efekt ten ulegał osłabieniu. Może, to sugerować separację BET z dwuwarstwy lipidowej powyżej pewnego stosunku molowego.

Spektroskopia fluorescencyjna jest techniką bardzo przydatną do badania oddziaływania związków z błonami lipidowymi ze względu na ogromny wybór znaczników fluorescencyjnych wiążących się z różnymi rejonami błony. Badania z użyciem znaczników fluorescencyjnych, DPH i TMA-DPH wykazały, że BET i B1 słabo wpływają na anizotropię sondy DPH, nie wpływając w ogóle na anizotropię znacznika TMA-DPH. Natomiast w przypadku B2 obserwowano odwrotną sytuację. Sonda fluorescencyjna DPH lokuje się w obszarze hydrofobowych łańcuchów fosfolipidów, natomiast sonda TMA-DPH w rejonach polarnych główek w dwuwarstwie lipidowej.²¹⁷ Uzyskane wyniki świadczą o odmiennej lokalizacji pochodnych BET w błonie lipidowej. Prawdopodobnie lokalizacja błonowa B2 jest płytsza niż w przypadku BET i B1. Eksperymenty z użyciem Laurdanu, znacznika lokującego się w rejonie szkieletów glicerolowych dwuwarstwy, pokazały, że polaryzacja uogólniona (GP) tej sondy w liposomach z DPPC była zmieniona w obecności BET i B1. Pochodna B2 natomiast nie wpływała na wartości GP Laurdanu, co oznacza że zmieniała ona znacząco właściwości błony lipidowej z DPPC na wysokości szkieletów glicerolowych. Zarówno BET, jak i B1 obniżały temperaturę głównej przemiany fazowej dla lipidu DPPC wyznaczaną za pomocą analizy GP Laurdanu. W dodatku oba związki wpływały na uporządkowanie błony znajdującej się zarówno w fazie żelowej, jak i ciekłokrystalicznej, przy czym większe zmiany obserwowane były dla fazy ciekłokrystalicznej. Podobne wyniki dla BET oraz dla pentacyklicznych kwasów triterpenowych uzyskano także we wcześniejszych pracach.^{272,273} Badania, w których za pomocą DSC i spektroskopii fluorescencyjnej sprawdzano wpływ pentacyklicznych kwasów triterpenowych pokazały, że wpływały one zarówno na obniżenie T_M i ΔH , przy czym wpływ na GP Laurdanu był niewielki. Autorzy pracy zaobserwowali również ograniczoną zdolność tych terpenów do mieszania się z błoną, co mogło prowadzić do separacji faz i micelaryzacji w badanych dwuwarstwach lipidowych. Ponadto, dodatek Chol do DPPC silnie wpływał na oddziaływanie badanych związków z błoną o mieszanym składzie, co doprowadziło autorów do wniosku, że związki te mogłyby zaburzać także strukturę tratw lipidowych w błonach komórkowych. Do ciekawych wniosków prowadziły także symulacje wykonane metodą dynamiki molekularnej, w których zaobserwowano, że kwas ursolowy w prostym modelu zbudowanym z POPC lokalizuje się w obszarze polarnych główek lipidowych, ustawiając się równolegle do powierzchni błony, natomiast w układach modelowych bogatych w Chol i SM, cząsteczki tego związku wbudowywały się głęboko w rejon hydrofobowy błony, przyjmując orientację prostopadłą do powierzchni błony.²⁷⁴ Podsumowując, wyniki otrzymane dla pochodnej B1 dotyczące jej zdolności do przenikania błon lipidowych oraz wpływania na ich parametry biofizyczne zarówno w modelach doświadczalnych, jak i modelach symulacyjnych,

wykazały, że posiada ona wyższe zdolności do interakcji z błonami niż pochodna B2. Ta różnica w oddziaływaniu z dwuwarstwą lipidową może stanowić jedną z przyczyn znacząco różnej aktywności antyproliferacyjnej pomiędzy badanymi pochodnymi BET.

5. Podsumowanie

Badania wykonane w niniejszej pracy wykazały, że prawie wszystkie spośród badanych leków przeciwpsychotycznych posiadają znaczną aktywność przeciwnowotworową wobec komórek RJG linii HT29. Szczególnie leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji, takie jak: PFA, PCZ, FLU, TFP, THX oraz. FLP. Leki drugiej generacji wykazały się średnią (KLZ) lub niską (OLZ, QTP, LUR) cytotoksycznością względem komórek nowotworowych. ZIP i RIS praktycznie nie były cytotoksyczne. Także lek przeciwdepresyjny, IMP, wykazywał się niską aktywnością. Modulatory biosyntezy Chol – SIM i BET również wykazywały się istotnym działaniem przeciwnowotworowym w badanej linii komórkowej. Podobne wyniki uzyskano dla innej linii komórek RJG, COLO205, chociaż w tym typie komórek odnotowywano z reguły wyższą cytotoksyczność badanych związków w porównaniu z linią HT29. W linii COLO205 przebadano także dwie nowe pochodne BET, B1 oraz B2, demonstrując, że cytotoksyczność związku B1 była bardzo wysoka, podczas gdy różniąc się od tej pochodnej jedną grupą acetylową B2 była bardzo słabo aktywna.

Wstępne eksperymenty nad cytotoksycznością badanych leków dla komórek linii HT29 w połączeniu z SIM, pozwoliły na wskazanie leków, które potencjalnie mogłyby wykazywać synergiczne działanie z tym inhibitorem biosyntezy Chol. Działanie tego typu zidentyfikowano dla TFP, FLP oraz IMP. Związki te przebadano bardziej szczegółowo, dołączając do tej grupy również KLZ, RIS i FLU, jako przedstawicieli różnych generacji leków przeciwpsychotycznych, znacznie różniących się strukturą cząsteczek.

Badania nad cytotoksycznością tych leków wobec linii nienowotworowych jasno pokazały, że wszystkie z nich odznaczały się selektywną cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych w porównaniu z nienowotworowymi liniami nabłonka jelitowego oraz fibroblastów. Dodatkowo, wszystkie badane leki, oprócz RIS, posiadały zdolność do indukcji ekspresji genów lipogennych. Sytuuje je to więc w grupie związków, które mogą wpływać na homeostazę Chol w komórkach nowotworowych, co z kolei może przyczynić się do wykazywania przez nie aktywności przeciwnowotworowej.

W następnym kroku przeprowadzono bardziej szczegółowe badania nad cytotoksycznym działaniem leków przeciwpsychotycznych stosowanych w połączeniu ze związkami

hamującymi biosyntezę Chol, SIM oraz BET. W przypadku użycia kombinacji badanych leków z SIM wobec linii HT29 synergicznie wykazały jedynie TFP, IMP oraz FLP. Z kolei w obecności BET jedynie TFP wykazywała silniejsze działanie cytotoksyczne niż zastosowana pojedynczo. Dodatkowo pokazano, że kombinacja FLP z SIM wywołuje silniejszy efekt proapoptotyczny niż sam FLP, a dodanie SIM do TFP i IMP powoduje podwyższoną zdolność kombinacji leków do generowania ROS w komórkach nowotworowych. Wśród leków przeciwpsychotycznych udało się więc zidentyfikować trzy związki, które w połączeniu z SIM mogłyby potencjalnie znaleźć zastosowanie jako silnie działające substancje przeciwnowotworowe.

Analiza poziomu wolnego (niezestryfikowanego) Chol w komórkach RJG udowodniła, że oprócz SIM, również takie leki przeciwpsychotyczne jak FLU, TFP oraz FLP obniżały poziom tego steroidu w błonach. Nie miała takiej zdolności BET, w kontraście do swoich pochodnych B1 i B2. Ponadto w przypadku TFP, FLP oraz B1 zaobserwowano nierównomierny rozkład fluorescencyjnie wybarwionego Chol na powierzchni komórek HT29, co nasuwa przypuszczenie, że leki te mogą wpływać nie tylko na ilość, ale też na rozmieszczenie Chol w błonie komórkowej. Wydaje się, że obniżenie poziomu Chol w komórce przez leki może sprzyjać ich właściwościom cytotoksycznym, a także zwiększać szansę na ich synergiczne działanie z innym modulatorem poziomu Chol, a mianowicie SIM. Z kolei KLZ, która podnosiła poziom Chol w komórkach RJG, charakteryzowała się antagonistycznym działaniem przeciwnowotworowym w połączeniu z SIM.

Badania na ogromnych jednowarstwowych liposomach (GUV) o składzie lipidowym DOPC:Chol:SM (1:1:1), powodującym pojawienie się w nich mikrodomen, dowiodły, że badane związki wpływają na zmniejszenie pola powierzchni domen lipidowych, a niektóre z nich także na ich liczbę oraz kształt. Na liczbę domen najsilniej wpływały TFP oraz IMP, zaś na ich kształt IMP oraz BET. Sugeruje to, że związki, dla których obserwowano synergiczne działanie z SIM, wpływają na mikrodomeny lipidowe zawierające Chol w układach modelowych i – przypuszczalnie – także w komórkach.

W badanej grupie związków nie udało się zidentyfikować jasnych zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi cząsteczek, a ich aktywnością cytotoksyczną. Wydaje się, że zarówno wysoka polarność oraz lipofilowość mogą sprzyjać wysokiej aktywności biologicznej. Zastosowanie modelowania do oceny zdolności badanych związków do przenikania błon sugeruje, że oddziaływanie z dwuwarstwą lipidową może być ważne dla ich aktywności.

Dodatkowe, badania wpływu BET i jej pochodnych na modelowe błony fosfolipidowe pokazały, że związki te wpływają na ich termotropowe właściwości. Wyniki uzyskane za pomocą spektrofluorymetrii wykazały, że BET i B1 oddziałują z głębiej położonymi rejonami dwuwarstwy lipidowej niż pochodna B2. Modelowanie molekularne pokazało, że pochodna B1, posiadająca najwyższą aktywność przeciwnowotworową wobec komórek RJG, jednocześnie najsilniej oddziaływała z błonami modelowymi. Sugeruje to, że aktywność przeciwnowotworowa pochodnych BET może być, do pewnego stopnia, zależna od ich zdolności do interakcji z błonami komórkowymi.

Podsumowując, w pracy wykazano, że wszystkie badane pod tym względem leki przeciwpsychotyczne wykazywały się selektywną cytotoksycznością względem komórek nowotworowych RJG. Zidentyfikowano trzy leki, które wykazują synergię działania cytotoksycznego w kombinacji z inhibitorem biosyntezy Chol, SIM. Po raz pierwszy wykazano też wpływ leków przeciwpsychotycznych na mikrodomeny lipidowe w układach modelowych zawierających Chol i SM.

6. Wnioski

Główne wnioski, wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych badań są następujące:

- Leki przeciwpsychotyczne wykazują się selektywną cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych RJG.
- Wszystkie badane leki, oprócz jednego, indukują ekspresję genów lipogennych.
- Zidentyfikowano trzy leki (TFP, FLP, IMP), których działanie cytotoksyczne potęgowane jest przez dodatek SIM. W przypadku TFP synergii obserwowano również w połączeniu z BET.
- SIM, a także większość leków wykazujących synergii działania z tym inhibitorem biosyntezy Chol, obniżała poziom wolnego Chol w komórkach. Przypuszczać więc można, że podstawą cytotoksycznego działania badanych leków wobec komórek RJG, a także występowania synergii w połączeniu z SIM, jest pozbawienie komórek nowotworowych Chol, koniecznego do ich przeżycia.
- Leki przeciwpsychotyczne silnie wpływają na pole powierzchni, kształt i liczbę mikrodomen lipidowych w układach modelowych.
- Analiza interakcji nowosyntezyzowanych pochodnych BET z dwuwarstwami lipidowymi sugeruje, że ich oddziaływanie z błonami może mieć istotny wpływ na ich zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych RJG.

7. Spis rysunków

Rys. 1. Struktura zachorowań i zgonów na nowotwory w 2020 roku na świecie z podziałem na płeć	14
Rys. 2. Szlak biosyntezy cholesterolu.	18
Rys. 3. Struktury chemiczne badanych związków.	46
Rys. 4. Inhibicja wzrostu komórek linii HT29 oraz HT29/Dx w zależności od stężenia FLU (A), TFP (B) i FLP (C).	66
Rys. 5. Przeżywalność komórek prawidłowych linii NHDF w zależności od stężenia (A) IMP i KLZ, (B) RIS oraz (C) od stężenia FLU, FLP i TFP.	69
Rys. 6. Przeżywalność komórek prawidłowych linii FHC w zależności od stężenia (A) IMP i KLZ, (B) RIS oraz (C) od stężenia FLU, FLP i TFP.	70
Rys. 7. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia KLZ oraz od stężenia kombinacji KLZ stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μ M).	76
Rys. 8. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia IMP zastosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μ M).	79
Rys. 9. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia FLU stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μ M).	81
Rys. 10. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia TFP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μ M).	84
Rys. 11. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia FLP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μ M).	86
Rys. 12. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia RIS stosowanego samodzielnie lub w kombinacji z SIM (5 μ M).	89
Rys. 13. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia KLZ stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μ M).	92
Rys. 14. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia IMP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μ M).	95
Rys. 15. Przeżywalność komórek HT (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia FLU stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μ M).	98
Rys. 16. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia TFP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μ M).	100
Rys. 17. Przeżywalność komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia FLP stosowanej samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μ M).	103
Rys. 18. Przeżywalności komórek HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C) w zależności od stężenia RIS stosowanego samodzielnie lub w kombinacji z BET (5 μ M).	105
Rys. 19. Względny procentowy rozkład liczebności komórek linii HT29 znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego po 48 godz. inkubacji z IMP (A), TFP (B) oraz FLP (C).	108

Rys. 20. Przykładowe histogramy przedstawiające dystrybucję komórek linii HT29 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego: A -populacja kontrolna komórek HT29 nietraktowana związkiem, B- komórki inkubowane z FLP, C-komórki inkubowane z FLP oraz SIM, D- komórki inkubowane z FLP oraz BET.	109
Rys. 21. Procentowy rozkład komórek linii HT29: normalnych, nekrotycznych bądź znajdujących się w stanie wczesnej lub późnej apoptozy inkubowanych z IMP (A), TFP (B) oraz FLP (C).....	111
Rys. 22. Przykładowe wykresy przedstawiające rozkład komórek linii HT29 otrzymane w teście z aneksyną oraz PI: A -populacja kontrolna komórek HT29 nietraktowana związkiem, B- komórki inkubowane z FLP, C-komórki inkubowane z FLP oraz SIM, D- komórki inkubowane z FLP oraz BET.	111
Rys. 23. Względny poziom reaktywnych form tlenu w komórkach linii HT29 inkubowanych ze związkami.....	113
Rys. 24. Poziom ekspresji <i>HMGCR</i> w komórkach linii HT29 (A) oraz linii HT29/Dx (B) po 24 i 48 godz. inkubacji ze związkami w stężeniu równym wartości IC_{50} , w przypadku IMP użyto stężenia IC_{25} ..	115
Rys. 25. Poziom ekspresji <i>LDLR</i> w komórkach linii HT29 (A) oraz HT29/Dx (B) po 24 i 48 godz. inkubacji ze związkami w stężeniu równym wartości IC_{50} , w przypadku IMP użyto stężenia IC_{25} ..	116
Rys. 26. Względna intensywność fluorescencji filipiny w komórkach HT29 inkubowanych przez 48 godz. z badanymi związkami.	117
Rys. 27. Przykładowe zdjęcia komórek linii HT29 barwionych filipiną po 48 godz. inkubacji z badanymi związkami.....	119
Rys. 28. Rozkład liczby domen (A) oraz powierzchni domen (B) w GUVach w obecności badanych związków.....	121
Rys. 29. Przykładowe zdjęcia liposomów znakowanych DiIC ₁₂ (3) uzyskanych w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności badanych związków.	122
Rys. 30. Przykładowe termogramy otrzymane dla DPPC oraz mieszanin DPPC z BET (A), B1 (B) lub B2 (C) w zastosowanych stosunkach molowych związek:DPPC.	131
Rys. 31. Przykładowe termogramy otrzymane dla DMPC oraz mieszanin DMPC z BET (A), B1 (B) lub B2 (C) w zastosowanych stosunkach molowych związek:DMPC.....	133
Rys. 32. Zmiany anizotropii fluorescencji DPH dla BET (A), B1 (B) oraz B2 (C) w zależności od stężenia w dwóch temperaturach: 22 i 50°C.	136
Rys. 33. Zmiany anizotropii fluorescencji TMA-DPH dla BET (A), B1 (B) oraz B2 (C) w zależności od stężenia w dwóch temperaturach: 22 i 50°C	138
Rys. 34. Zależność polaryzacji uogólnionej Laurdanu od temperatury dla BET, B1 oraz B2.....	139

8. Spis tabel

Tab. 1. Sekwencje starterów użytych do reakcji łańcuchowej polimeryzacji. Sekwencje podano w kierunku od końca 5' do końca 3'. Tabela zawiera temperatury topnienia (T_M) oraz długość produktu otrzymanego z danych sekwencji starterów.....	42
Tab. 2. Badane związki wraz ze stosowanymi w pracy skrótami oraz nazwy firm w których zostały zakupione.	43
Tab. 3. Odczynniki użyte do doświadczeń.....	47
Tab. 4. Stężenia końcowe badanych związków użyte w cytometrii przepływowej.....	53
Tab. 5. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany w reakcji odwrotnej transkrypcji.....	56
Tab. 6. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany w reakcji łańcuchowej polimeryzacji.....	57
Tab. 7. Wartości IC_{10} , IC_{25} , IC_{50} badanych związków względem linii HT29 oraz HT29/Dx.	64
Tab. 8. Wartości IC_{10} , IC_{25} i IC_{50} dla linii komórkowej COLO205 uzyskane za pomocą testu MTT. .	67
Tab. 9. Wartości IC_{50} dla linii komórkowych NHDF oraz FHC uzyskane za pomocą testu SRB.....	68
Tab. 10. Wartości indeksu selektywności (SI) otrzymane dla wybranych leków w linii prawidłowej NHDF oraz FHC względem badanych linii nowotworowych HT29, HT29/Dx oraz COLO205.	71
Tab. 11. Wartości IC_{50} [μM] badanych związków wyznaczone bez i w obecności SIM (stężenie końcowe 5 μM) w liniach HT29 oraz HT29/Dx.....	73
Tab. 12. Wartości IC_{50} [μM] badanych związków wyznaczone bez i w obecności SIM (stężenie końcowe 5 μM) w linii COLO205.....	74
Tab. 13. Wartości indeksów kombinacji dla KLZ z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	76
Tab. 14. Wartości indeksów kombinacji dla IMP z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	79
Tab. 15. Wartości indeksów kombinacji dla FLU z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx(B) oraz COLO205 (C).....	82
Tab. 16. Wartości indeksów kombinacji dla TFP z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29, HT29/Dx oraz COLO205.	84
Tab. 17. Wartości indeksów kombinacji dla FLP z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	87
Tab. 18. Wartości indeksów kombinacji dla RIS z SIM uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	89
Tab. 19. Wartości IC_{50} [μM] badanych związków wyznaczone bez i w obecności BET (stężenie końcowe 5 μM) w liniach HT29, HT29/Dx oraz COLO205.....	91
Tab. 20. Wartości indeksów kombinacji dla KLZ z BET uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	93
Tab. 21. Wartości indeksów kombinacji dla IMP z BET uzyskane za pomocą programu Combeneft (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	95

Tab. 22. Wartości indeksów kombinacji dla FLU z BET uzyskane za pomocą programu Combenefit (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	98
Tab. 23. Wartości indeksów kombinacji dla TFP z BET uzyskane za pomocą programu Combenefit (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	101
Tab. 24. Wartości indeksów kombinacji dla FLP z BET uzyskane za pomocą programu Combenefit (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	103
Tab. 25. Wartości indeksów kombinacji dla RIS z BET uzyskane za pomocą programu Combenefit (kolorowe tabele) i CompuSyn dla linii HT29 (A), HT29/Dx (B) oraz COLO205 (C).....	105
Tab. 26. Parametry fizykochemiczne i farmakologiczne badanych związków obliczone za pomocą programu OSIRIS.....	124
Tab. 27. Deskryptory molekularne uzyskane za pomocą programu Titan.....	126
Tab. 28. Współczynniki przepuszczalności clogPr oraz energii swobodnej wiązania (ΔG) z błoną lipidową zbudowaną z DOPC obliczone za pomocą programu PerMM w modelowych błonach sztucznych i naturalnych.....	128
Tab. 29. Parametry głównej przemiany fazowej dla DPPC oraz mieszanin związek:DPPC w różnych stosunkach molowych.....	131
Tab. 30. Parametry głównej przemiany fazowej dla DMPC oraz mieszanin związek:DMPC w zastosowanych stosunkach molowych.....	134

Literatura

1. Deptała, A. Onkologia w praktyce. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, (2006).
2. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* **144**, 1941-1953 (2019).
3. Didkowska, J. *et al.* Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. *Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie* (2019).
4. Thanikachalam, K. *et al.* Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients* **11**, 164-175 (2019).
5. Fakih, M. G. Metastatic colorectal cancer: Current state and future directions. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 1809-1824 (2015).
6. Lepage, C. & Manfredi, S. Adjuvant chemotherapy for colon cancer. *Hepato-Gastro et Oncologie Digestive* **28**, 621–625 (2021).
7. Meyerhardt, J. A. *et al.* Effect of Celecoxib vs Placebo Added to Standard Adjuvant Therapy on Disease-Free Survival among Patients with Stage III Colon Cancer: The CALGB/SWOG 80702 (Alliance) Randomized Clinical Trial. *Journal of the American Medical Association* **325**, 1277-1286 (2021).
8. Tołoczko-Iwaniuk, N. *et al.* Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention – Review. *Curr Drug Targets* **20**, 302-315 (2018).
9. Martinez, J. A. *et al.* Celecoxib use and circulating oxylipins in a colon polyp prevention trial. *PLoS One* **13**, (2018).
10. Waluga, M. *et al.* Pharmacological and dietary factors in prevention of colorectal cancer. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **69**, 325-336 (2018).
11. Ahn, E. *et al.* A loss of antitumor therapeutic activity of CEA DNA vaccines is associated with the lack of tumor cells' antigen presentation to Ag-specific CTLs in a colon cancer model. *Cancer Lett* **356**, 676-685 (2015).
12. Lopes, A. *et al.* Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **38**, 146 (2019).
13. Mohammed, A. *et al.* Clinically relevant anti-inflammatory agents for chemoprevention of colorectal cancer: New perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 2332-2350 (2018).

14. Miller, K. *et al.* Cancer Treatment & Survivorship Facts & Figures 2016-2017. *American Cancer Society* (2016).
15. Braun, M. S. & Seymour, M. T. Balancing the efficacy and toxicity of chemotherapy in colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **3**, 43-52 (2011).
16. Fontana, E. *et al.* Context matters - Consensus molecular subtypes of colorectal cancer as biomarkers for clinical trials. *Annals of Oncology* **30**, 520–527 (2019).
17. Frąckowiak, M., *et al.* Molecular subtypes of colorectal cancer as a potential prognostic and predictive factor in the selection of the optimal treatment strategy. *Oncology in Clinical Practice* **15**, 320–325 (2019).
18. Frąckowiak, M. *et al.* Molecular subtypes of colorectal cancer as a potential prognostic and predictive factor in the selection of the optimal treatment strategy. *Oncology in Clinical Practice* **15**, 320–325 (2019).
19. Thanki, K. *et al.* Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *Int Biol Biomed J* **3**, (2017).
20. Miller, S. A. *et al.* Consensus molecular subtyping of colorectal cancers is influenced by goblet cell content. *Cancer genetics* **254-255**, 34-39 (2020).
21. Armistead, F. J. *et al.* Physical Biomarkers of Disease Progression: On-Chip Monitoring of Changes in Mechanobiology of Colorectal Cancer Cells. *Scientific Reports* **10**, 3254 (2020).
22. Hekmati, M. *et al.* A morphological study of a human adenocarcinoma cell line (HT29) differentiating in culture. Similarities to intestinal embryonic development. *Cell Differentiation and Development* **31**, 207-218 (1990).
23. Riganti, C. *et al.* Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux. *Cancer Research* **65**, 516-525 (2005).
24. Wang, J. *et al.* Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget* **8**, 84559-84571 (2017).
25. Semple, T. *et al.* Tumor and Lymphoid Cell Lines from a Patient with Carcinoma of the Colon for a Cytotoxicity Model. *Cancer Research* **38**, 1345–1355 (1978).
26. Akkoca, A. N. *et al.* TNM and modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med* **7**, 2828-35 (2014).

27. Shi, Q. *et al.* Intracellular Cholesterol Synthesis and Transport. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**, (2022).
28. Silva Afonso, M. *et al.* Molecular pathways underlying cholesterol homeostasis. *Nutrients* **10**, 760 (2018).
29. Nes, W. D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chemical Reviews* **111**, 6423–6451 (2011).
30. Trapani, L. *et al.* Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic ‘power station’. *World J Hepatol* **4**, 184-190 (2012).
31. Luo, J. *et al.* Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **21**, 225–245 (2020).
32. Soppert, J. *et al.* Lipoproteins and lipids in cardiovascular disease: from mechanistic insights to therapeutic targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews* **159**, 4–33 (2020).
33. Użarowska, M. *et al.* Dwie twarze cholesterolu: znaczenie fizjologiczne i udział w patogenezie wybranych schorzeń. *Kosmos* **67**, 375-390 (2018).
34. Cortes, V. A. *et al.* Physiological and pathological implications of cholesterol. *Frontiers in Bioscience - Landmark* **19**, 416-28 (2014).
35. Kuzu, O. *et al.* The role of cholesterol in cancer. *Cancer Research* **76**, 2063–2070 (2016).
36. Wei, Y. *et al.* The significances and clinical implications of cholesterol components in human breast cancer. *Science Progress* **104** (2021).
37. Mayengbam, S. S. *et al.* Influence of cholesterol on cancer progression and therapy. *Translational Oncology* **14**, 101043 (2021).
38. Murai, T. The role of lipid rafts in cancer cell adhesion and migration. *International Journal of Cell Biology* **2012**, (2012).
39. Hopkins, B. D. *et al.* Obesity and cancer mechanisms: Cancer metabolism. *Journal of Clinical Oncology* **34**, 4277–4283 (2016).
40. Quénéhervé, L. *et al.* Obesity and colorectal cancer. *Hepato-Gastro et Oncologie Digestive* **28**, 46-53 (2021).
41. Avgerinos, K. I. *et al.* Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism: Clinical and Experimental* **92**, 121-135 (2019).

42. Yan, G. *et al.* Lipidome in colorectal cancer. *Oncotarget* **7**, 33429-33439 (2016).
43. Van Duijnhoven, F. J. B. *et al.* Blood lipid and lipoprotein concentrations and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Gut* **60**, 1094-1102 (2011).
44. Sharma, B. & Kanwar, S. S. Phosphatidylserine: A cancer cell targeting biomarker. *Seminars in Cancer Biology* **52**, 17-25 (2018).
45. Alves, A. C. *et al.* Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1858**, 2231-2244 (2016).
46. Hoejholt, K. L. *et al.* Calcium electroporation and electrochemotherapy for cancer treatment: Importance of cell membrane composition investigated by lipidomics, calorimetry and in vitro efficacy. *Sci Rep* **9**, 4758 (2019).
47. Yang, Z. *et al.* Cholesterol inhibits hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by promoting CD44 localization in lipid rafts. *Cancer Lett* **429**, 66-77 (2018).
48. Mollinedo, F. & Gajate, C. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: Implications in tumor progression and therapy. *Journal of Lipid Research* **61**, 611-635 (2020).
49. Szlasa, W. *et al.* Lipid composition of the cancer cell membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **52**, 321-342 (2020).
50. Kopecka, J. *et al.* A LDL-masked liposomal-doxorubicin reverses drug resistance in human cancer cells. *Journal of Controlled Release* **149**, 196-205 (2011).
51. Peetla, C. *et al.* Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 1686-1698 (2013).
52. Stasi, I. & Cappuzzo, F. Profile of bavituximab and its potential in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy* **5**, 43-50 (2014).
53. Pike, L. J. Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res* **47**, 1597-1598 (2006).
54. Sezgin, E. *et al.* The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**, 361-374 (2017).

55. Harder, T. & Simons, K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 534-542 (1997).
56. Brown, D. A. & London, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **14**, 111–36 (1998).
57. Murai, T. Cholesterol lowering: Role in cancer prevention and treatment. *Biological Chemistry* **396**, 1-11 (2015).
58. Barenholz, Y. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to ‘rafts’. *Progress in Lipid Research* **41**, 1-5 (2002).
59. Schmitz, G. & Grandl, M. Update on lipid membrane microdomains. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **11**, 106-112 (2008).
60. Yamaguchi, H. *et al.* Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Research* **69**, 8594-8602 (2009).
61. Greenlee, J. D. *et al.* Rafting down the Metastatic Cascade: The Role of Lipid Rafts in Cancer Metastasis, Cell Death, and Clinical Outcomes. *Cancer Research* **81**, 815–817 (2021).
62. Li, T. *et al.* FLOT2 overexpression is associated with the progression and prognosis of human colorectal cancer. *Oncol Lett* **17**, 2802–2808 (2019).
63. Wesolowska, O. *et al.* Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochimica Pol* **56**, 33–39 (2009).
64. Doeven, M. K. *et al.* Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophys J* **88**, 1134–1142 (2005).
65. Bagatolli, L. A. *et al.* Giant phospholipid vesicles: Comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods - A two photon fluorescence microscopy study. *Chem Phys Lipids* **105**, 135–147 (2000).
66. Lira, R. B. *et al.* Highly Efficient Protein-free Membrane Fusion: A Giant Vesicle Study. *Biophys J* **116**, 79–91 (2019).
67. Wesolowska, O. *et al.* Direct visualization of phase separation induced by phenothiazine-type antipsychotic drugs in model lipid membranes. *Mol Membr Biol* **28**, 103–114 (2011).
68. Ostroumova, O. S. *et al.* Effect of flavonoids on the phase separation in giant unilamellar vesicles formed from binary lipid mixtures. *Chem Phys Lipids* **178**, 77-83 (2014).

69. Ponmalar, I. I. *et al.* Correlated protein conformational states and membrane dynamics during attack by pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 12839–12844 (2019).
70. Tamba, Y. & Yamazaki, M. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry* **44**, 15823–15833 (2005).
71. Lee, M. T. *et al.* Comparison of the Effects of Daptomycin on Bacterial and Model Membranes. *Biochemistry* **57**, 5629–5639 (2018).
72. Wodlej, C. *et al.* Interaction of two antitumor peptides with membrane lipids - Influence of phosphatidylserine and cholesterol on specificity for melanoma cells. *PLoS ONE* **14** (2019).
73. Pang, J. *et al.* The Knowns and Unknowns of Contemporary Statin Therapy for Familial Hypercholesterolemia. *Current Atherosclerosis Reports* **22**, 64 (2020).
74. Endo, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research* **33**, 1569-1582 (1992).
75. Newman, C. B. *et al.* Statin Safety and Associated Adverse Events A Scientific Statement from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**, 38-89 (2019).
76. Tobert, J. A. Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**, 517-526 (2003).
77. Murphy, C. *et al.* The role of structure and biophysical properties in the pleiotropic effects of statins. *International Journal of Molecular Sciences* **21** (2020).
78. Kotyla, P. J. Plejotropowe działanie inhibitorów 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-koenzymu a (statyn). potencjał leczniczy w układowych chorobach tkanki łącznej. *Annales Academiae Medicae Stetinensis* **60**, 39-46 (2014).
79. Jamialahmadi, T. *et al.* The Effects of Statin Therapy on Oxidized LDL and Its Antibodies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2022** (2022).
80. Gąsior, M. *et al.* Plejotropowe działanie statyn. *Choroby Serca i Naczyń* **5**, 141–145 (2008).
81. Greenwood, J. *et al.* Statin therapy and autoimmune disease: From protein prenylation to immunomodulation. *Nature Reviews Immunology* **6**, 358-70 (2006).
82. Matuszewicz, L. *et al.* The effect of statins on cancer cells—review. *Tumor Biology* **36**, 4889-904 (2015).

83. Wong, W. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: The statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* **16**, 508-519 (2002).
84. Safwat, S. *et al.* Statins anticancer targeted delivery systems: re-purposing an old molecule. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **69**, 613-624 (2017).
85. Cafforio, P. *et al.* Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* **26**, 883-891 (2005).
86. Spampanato, C. *et al.* Simvastatin inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis correlated to activation of Bax and down-regulation of BCL-2 gene expression. *Int J Oncol* **40**, 935-41 (2012).
87. Tu, Y. S. *et al.* Involvement of Chk1-Cdc25A-cyclin A/CDk2 pathway in simvastatin induced S-phase cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *Eur J Pharmacol* **670**, 356-364 (2011).
88. Qi, X. F. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis of lymphoma cells by promoting ROS generation and regulating Akt, Erk and p38 signals via suppression of mevalonate pathway. *Cell Death Dis* **4**, 518 (2013).
89. Menter, D. G. *et al.* Differential effects of pravastatin and simvastatin on the growth of tumor cells from different organ sites. *PLoS One* **6**, (2011).
90. Duarte, J. A. *et al.* The potential use of simvastatin for cancer treatment: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **141**, 111858 (2021).
91. Liu, B. *et al.* The relationship between statins and breast cancer prognosis varies by statin type and exposure time: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment* **164**, 1-11(2017).
92. Climent, E. *et al.* Hydrophilic or Lipophilic Statins? *Front Cardiovasc Med* **8**, (2021).
93. Jiang, W. *et al.* Statins: a repurposed drug to fight cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **40**, 241 (2021).
94. Cardwell, C. R. *et al.* Statin Use after colorectal cancer diagnosis and survival: A population-based cohort study. *Journal of Clinical Oncology* **32**, 3177-3183 (2014).
95. Nielsen, S. F. *et al.* Statin Use and Reduced Cancer-Related Mortality. *New England Journal of Medicine* **367**, 1792-1802 (2012).
96. Alakurtti, S. *et al.* Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **29**, 1-13 (2006).

97. Pavlova, N. I. *et al.* Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. *Fitoterapia* **74**, 489-92 (2003).
98. Bernard, P. *et al.* Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: Application to phospholipase A2 inhibitors. *Phytochemistry* **58**, 865-874 (2001).
99. Tang, J. J. *et al.* Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab* **13**, 44-56 (2011).
100. Yin, F. *et al.* SREBP-1 inhibitor Betulin enhances the antitumor effect of Sorafenib on hepatocellular carcinoma via restricting cellular glycolytic activity. *Cell Death Dis* **10**, 672-684 (2019).
101. Shimano, H. *et al.* Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *Journal of Clinical Investigation* **98**, 1575-1584 (1996).
102. Kim, D. S. H. L. *et al.* Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* **8**, 1707-1712 (1998).
103. Hata, K. *et al.* Differentiation- and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. *J Nat Prod* **65**, 645-648 (2002).
104. Gauthier, C. *et al.* Synthesis and cytotoxicity of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins. *J Nat Prod* **72**, 72-81 (2009).
105. Mullauer, F. B. *et al.* Betulin is a potent anti-tumor agent that is enhanced-by cholesterol. *PLoS One* **4**, (2009).
106. Zhou, Z. *et al.* Betulin induces cytochrome c release and apoptosis in colon cancer cells via NOXA. *Oncol Lett* **15**, 7319-7327 (2018).
107. Aiken, C. & Chen, C. H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends in Molecular Medicine* **11**, 31-36 (2005).
108. Baglin, I. *et al.* New ursolic and betulinic derivatives as potential cytotoxic agents. *J Enzyme Inhib Med Chem* **18**, 111-117 (2003).
109. Cichewicz, R. H. & Kouzi, S. A. Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection. *Medicinal Research Reviews* **24**, 90-114 (2004).

110. Zuco, V. *et al.* Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett* **175**, 17-25 (2002).
111. Amiri, S. *et al.* Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. *Biotechnology Advances* **38**, 1-39 (2020).
112. De Melo, C. L. *et al.* Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. *J Agric Food Chem* **57**, 8776-8781 (2009).
113. Drag-Zalesinska, M. *et al.* Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 4814-4817 (2009).
114. Bjornestad, J. *et al.* Antipsychotic treatment—a systematic literature review and meta-analysis of qualitative studies. *Journal of Mental Health* **29**, 513-523 (2020).
115. Duval, F. Treatments in depression. *Dialogues Clin Neurosci* **8**, 191-206 (2006).
116. Bleakley, S. Review of choice and use of antidepressants. *Progress in Neurology and Psychiatry* **13**, 18-26 (2009).
117. Shen, W. W. A history of antipsychotic drug development. *Compr Psychiatry* **40**, 407-414 (1999).
118. Aringhieri, S. *et al.* Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences. *Pharmacology and Therapeutics* **192**, 20-41 (2018).
119. Nasrallah, H. A. Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: Insights from receptor-binding profiles. *Molecular Psychiatry* **13**, 27-35 (2008).
120. Mailman, R. & Murthy, V. Third Generation Antipsychotic Drugs: Partial Agonism or Receptor Functional Selectivity? *Curr Pharm Des* **16**, 488–501 (2010).
121. Mortensen, P. B. The occurrence of cancer in first admitted schizophrenic patients. *Schizophr Res* **12**, 185–194 (1994).
122. Zhuo, C. & Triplett, P. T. Association of schizophrenia with the risk of breast cancer incidence a meta-analysis. *JAMA Psychiatry* **75**, 363-369 (2018).
123. Grinshpoon, A. *et al.* Cancer in schizophrenia: Is the risk higher or lower? *Schizophr Res* **73**, 333-341 (2005).

124. Dalton, S. O. *et al.* Cancer risk among users of neuroleptic medication: A population-based cohort study. *Br J Cancer* **95**, 934-939 (2006).
125. Chubak, J. *et al.* Colorectal cancer risk in relation to antidepressant medication use. *Int J Cancer* **128**, 227–232 (2011).
126. Chen, V. C. H. *et al.* New use for old drugs: The protective effect of risperidone on colorectal cancer. *Cancers (Basel)* **12**, 1560 (2020).
127. Belkin, M. & Hardy, W. G. Effect of reserpine and chlorpromazine on sarcoma 37. *Science (1979)* **125**, 233-4. (1957).
128. Kamgar-Dayhoff, P. & Brelidze, T. I. Multifaceted effect of chlorpromazine in cancer: implications for cancer treatment. *Oncotarget* **12**, 1406–1426 (2021).
129. Kanzawa, F., Hoshi, A. & Kuretani, K. Relationship between antitumor activity and chemical structure in psychotropic agents. *Gann, The Japanese Journal of Cancer Research* **61**, 529-34 (1970).
130. Pace, A. *et al.* CTNI-12. Phase II multicentric italian trial on repositioning of the antipsychotic drug chlorpromazine and its synergism with temozolomide in MGMT unmethylated glioblastoma patients: the ractac trial. *Neuro Oncol* **23**, (2021).
131. Zhao, F. *et al.* Synthesis of novel, DNA binding heterocyclic dehydroabietylamine derivatives as potential antiproliferative and apoptosis-inducing agents. *Drug Deliv* **27**, 216-227 (2020).
132. Motohashi, N. *et al.* Antitumor Potential and Possible Targets of Phenothiazine-Related Compounds. *Curr Drug Targets* **1**, 237-245 (2005).
133. Azuine, M. A. *et al.* Cancer chemopreventive effect of phenothiazines and related tri-heterocyclic analogues in the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate promoted Epstein-Barr virus early antigen activation and the mouse skin two-stage carcinogenesis models. *Pharmacol Res* **49**, 161-169. (2004).
134. Qian, K. *et al.* Trifluoperazine as an alternative strategy for the inhibition of tumor growth of colorectal cancer. *J Cell Biochem* **120**, 15756-15765 (2019).
135. Duarte, D. & Vale, N. Antipsychotic Drug Fluphenazine against Human Cancer Cells. *Biomolecules* **12**, 1360 (2022).
136. Ramu, A. & Ramu, N. Reversal of multidrug resistance by phenothiazines and structurally related compounds. *Cancer Chemother Pharmacol* **30**, 165-173 (1992).

137. Wang, J. S. *et al.* Antipsychotic drugs inhibit the function of breast cancer resistance protein. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **103**, 336-341 (2008).
138. Gil-Ad, I. *et al.* Evaluation of the potential anti-cancer activity of the antidepressant sertraline in human colon cancer cell lines and in colorectal cancer-xenografted mice. *Int J Oncol* **33**, 277-286 (2008).
139. Driscoll, J. S. *et al.* Psychotropic drugs as potential antitumor agents: A selective screening study. *Cancer Treat Rep* **62**, 45-74 (1978).
140. Wiklund, E. D. *et al.* Cytotoxic effects of antipsychotic drugs implicate cholesterol homeostasis as a novel chemotherapeutic target. *Int J Cancer* **126**, 28–40 (2010).
141. Zhelev, Z. *et al.* Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes: Phenothiazines and leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* **53**, 267-275 (2004).
142. Song, Y. *et al.* Repurposing antidepressants for anticancer drug discovery. *Drug Discovery Today* **27**, 1924-1935 (2022).
143. Donohoe, D. R. *et al.* Antipsychotic drugs disrupt normal development in *Caenorhabditis elegans* via additional mechanisms besides dopamine and serotonin receptors. *Pharmacol Res* **54**, 361-372 (2006).
144. Hait, W. N. & Lee, G. L. Characteristics of the cytotoxic effects of the phenothiazine class of calmodulin antagonists. *Biochem Pharmacol* **34**, 3973-3978 (1985).
145. Murata, T. *et al.* A comparative study of the plasma membrane permeabilization and fluidization induced by antipsychotic drugs in the rat brain. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **10**, 683-689 (2007).
146. Suwalsky, M. *et al.* Human cells and cell membrane molecular models are affected in vitro by chlorpromazine. *Biophys Chem* **135**, 7-13 (2008).
147. Lange, Y. & Steck, T. L. Cholesterol homeostasis. Modulation by amphiphiles. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 29371-29374 (1994).
148. Neifeld, J. P. *et al.* Phase II trial of the dopaminergic inhibitor pimozide in previously treated melanoma patients. *Cancer Treat Rep* **67**, 155-157 (1983).
149. Vlachos, N. *et al.* Repurposing antipsychotics for cancer treatment. *Biomedicines* **9**, 1785 (2021).

150. Fernø, J. *et al.* Antipsychotic drugs activate SREBP-regulated expression of lipid biosynthetic genes in cultured human glioma cells: A novel mechanism of action? *Pharmacogenomics Journal* **5**, 298-304 (2005).
151. Raeder, M. B. *et al.* Antidepressant drugs activate SREBP and up-regulate cholesterol and fatty acid biosynthesis in human glial cells. *Neurosci Lett* **395**, 185-190 (2006).
152. Raeder, M. B. *et al.* SREBP activation by antipsychotic- and antidepressant-drugs in cultured human liver cells: Relevance for metabolic side-effects? *Mol Cell Biochem* **289**, 167–173 (2006).
153. Fernø, J. *et al.* Drug-induced activation of SREBP-controlled lipogenic gene expression in CNS-related cell lines: Marked differences between various antipsychotic drugs. *BMC Neurosci* **7**, 69 (2006).
154. Polymeropoulos, M. H. *et al.* Common effect of antipsychotics on the biosynthesis and regulation of fatty acids and cholesterol supports a key role of lipid homeostasis in schizophrenia. *Schizophr Res* **108**, 134-142 (2009).
155. Fernø, J. *et al.* Antipsychotic drugs activate SREBP-regulated expression of lipid biosynthetic genes in cultured human glioma cells: A novel mechanism of action? *Pharmacogenomics Journal* **5**, 298–304 (2005).
156. Kristiana, I. *et al.* Antipsychotic drugs upregulate lipogenic gene expression by disrupting intracellular trafficking of lipoprotein-derived cholesterol. *Pharmacogenomics Journal* **10**, 396–407 (2010).
157. Slater, E. E. & MacDonald, J. S. Mechanism of Action and Biological Profile of HMG CoA Reductase Inhibitors: A New Therapeutic Alternative. *Drugs* **36**, 72-82 (1988).
158. Lange, Y., Ye, *et al.* Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res* **40**, 2264-2270 (1999).
159. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50 (2010).
160. Altomare, D. A. & Testa, J. R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24**, 7455-7464 (2005).
161. Malinowsky, K. *et al.* Activation of the PI3K/AKT pathway correlates with prognosis in stage II colon cancer. *Br J Cancer* **110**, 2081-2089 (2014).

162. Zhuang, L. *et al.* Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 959-968 (2005).
163. Fernández, C. *et al.* Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res* **46**, 920-929 (2005).
164. Sánchez-Wandelmer, J. *et al.* Haloperidol disrupts lipid rafts and impairs insulin signaling in SH-SY5Y cells. *Neuroscience* **167**, 143-153 (2010).
165. Senese, N. B. & Rasenick, M. M. Antidepressants produce persistent Gαs-associated signaling changes in lipid rafts after drug withdrawal. *Mol Pharmacol* **100**, 66–81 (2021).
166. Hendrich, A. B. *et al.* Phase separation is induced by phenothiazine derivatives in phospholipid/sphingomyelin/cholesterol mixtures containing low levels of cholesterol and sphingomyelin. *Biophys Chem* **130**, 32-40(2007).
167. Morgan, S. *et al.* The cost of drug development: A systematic review. *Health Policy* **100**, 4-17 (2011).
168. Roessler, H. I. *et al.* Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* **42**, 255–267 (2021).
169. Sobocińska, A. A. *et al.* Mechanisms of angiogenesis in neoplasia. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* **70**, 1166-1181 (2016).
170. Bhagat, R. T. & Butle, S. R. Drug Repurposing: A Review. *J Pharm Res Int* **33**, 161-169 (2021).
171. Aftab, B. T. *et al.* Itraconazole inhibits angiogenesis and tumor growth in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **71**, 6764-6772 (2011).
172. Mitrović, A. & Kos, J. Nitroxoline: Repurposing its antimicrobial to antitumor application. *Acta Biochim Pol* **66**, 521-531 (2019).
173. Zhang, Q. *et al.* Preclinical pharmacodynamic evaluation of antibiotic nitroxoline for anticancer drug repurposing. *Oncol Lett* **11**, 3265-3272 (2016).
174. Chou, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research* **70**, 440-446 (2010).
175. Patel, L. & Grossberg, G. T. Combination therapy for alzheimers disease. *Drugs and Aging* **28**, 539–546 (2011).

176. Hill, J. A. & Cowen, L. E. Using combination therapy to thwart drug resistance. *Future Microbiology* **10**, 1719-1726 (2015).
177. Riganti, C. *et al.* Statins revert doxorubicin resistance via nitric oxide in malignant mesothelioma. *Int J Cancer* **119**, 17-27 (2006).
178. Luput, L. *et al.* Liposomal simvastatin sensitizes C26 murine colon carcinoma to the antitumor effects of liposomal 5-fluorouracil in vivo. *Cancer Sci* **111**, 1344–1356 (2020).
179. Michalak, K. *et al.* Simvastatin Strongly Augments Proapoptotic, Anti-inflammatory and Cytotoxic Activity of Oxicam Derivatives in Doxorubicin-resistant Colon Cancer Cells. *Anticancer Res* **39**, 727–734 (2019).
180. Papadopoulos, F. *et al.* Haloperidol induced cell cycle arrest and apoptosis in glioblastoma cells. *Biomedicines* **8**, 595 (2020).
181. Liu, Z. *et al.* Synergistic Suppression of Glioblastoma Cell Growth by Combined Application of Temozolomide and Dopamine D2 Receptor Antagonists. *World Neurosurg* **128**, 68-77 (2019).
182. Zhang, X. *et al.* Trifluoperazine, a novel autophagy inhibitor, increases radiosensitivity in glioblastoma by impairing homologous recombination. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **36**, 118 (2017).
183. Chen, X., Luo, X. & Cheng, Y. Trifluoperazine prevents FOXO1 nuclear excretion and reverses doxorubicin-resistance in the SHG44/DOX drug-resistant glioma cell line. *Int J Mol Med* **42**, 3300-3308 (2018).
184. Yeh, C. T. *et al.* Trifluoperazine, an antipsychotic agent, inhibits cancer stem cell growth and overcomes drug resistance of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 1180-1188 (2012).
185. Oliva, C. R. *et al.* Repositioning chlorpromazine for treating chemoresistant glioma through the inhibition of cytochrome c oxidase bearing the COX4-1 regulatory subunit. *Oncotarget* **8**, 37568-37583 (2017).
186. Lee, M. S. *et al.* The novel combination of chlorpromazine and pentamidine exerts synergistic antiproliferative effects through dual mitotic action. *Cancer Res* **67**, 11359-11367 (2007).
187. Wang, Y. *et al.* Promoting oligodendroglial-oriented differentiation of glioma stem cell: A repurposing of quetiapine for the treatment of malignant glioma. *Oncotarget* **8**, 37511–37524 (2017).

188. Karpel-Massler, G. *et al.* Olanzapine inhibits proliferation, migration and anchorage-independent growth in human glioblastoma cell lines and enhances temozolomide's antiproliferative effect. *J Neurooncol* **122**, 21-33 (2015).
189. Sanomachi, T. *et al.* Olanzapine, an atypical antipsychotic, inhibits survivin expression and sensitizes cancer cells to chemotherapeutic agents. *Anticancer Res* **37**, 6177-6188 (2017).
190. Dilly, S. J. *et al.* A chemical genomics approach to drug reprofiling in oncology: Antipsychotic drug risperidone as a potential adenocarcinoma treatment. *Cancer Lett* **393**, 16-21 (2017).
191. Aslostovar, L. *et al.* A phase 1 trial evaluating thioridazine in combination with cytarabine in patients with acute myeloid leukemia. *Blood Adv* **2**, 1935-1945 (2018).
192. Matteoni, S. *et al.* Anticancer Properties of the Antipsychotic Drug Chlorpromazine and Its Synergism With Temozolomide in Restraining Human Glioblastoma Proliferation In Vitro. *Front Oncol* **11**, 635472 (2021).
193. Chou, T.-C. & Martin, N. *CompuSyn For Drug Combinations User's Guide A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug CompuSyn for Drug Combinations* (2004).
194. di Veroli, G. Y. *et al.* Combenefit: An interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics* **32**, 2866–2868 (2016).
195. Berenbaum, M. C. What is synergy? *Pharmacological Reviews* **41**, 93-141 (1989).
196. Juhasz, J. *et al.* Quantitative characterization of coexisting phases in DOPC/DPPC/cholesterol mixtures: Comparing confocal fluorescence microscopy and deuterium nuclear magnetic resonance. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1788**, 2541-2552 (2009).
197. Feng, J. L. & Qin, X. Does adherence to lipid-lowering medications improve cancer survival? A nationwide study of breast and colorectal cancer, and melanoma. *Br J Clin Pharmacol* **87**, 1847-1858 (2021).
198. Agnoli, C. *et al.* Colorectal cancer risk and dyslipidemia: A case-cohort study nested in an Italian multicentre cohort. *Cancer Epidemiol* **38**, 144-151 (2014).
199. Luo, X., Tu, Z., Chen, H. & Ding, J. Blood lipids and risk of colon or rectal cancer: a Mendelian randomization study. *J Cancer Res Clin Oncol* **147**, 3591-3599 (2021).
200. Weerapreeyakul, N. *et al.* Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. *Chinese Medicine (United Kingdom)* **7**, 15 (2012).

201. Sutejo, I. R., Putri, H. & Meiyanto, E. The Selectivity of Ethanolic Extract of Buah Makassar (*Brucea javanica*) on Metastatic Breast Cancer Cells. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences* **2**, 1-6 (1970).
202. Elmongy, E. I. *et al.* In-Silico Screening of Novel Synthesized Thienopyrimidines Targeting Fms Related Receptor Tyrosine Kinase-3 and Their In-Vitro Biological Evaluation. *Pharmaceuticals* **15**, 170 (2022).
203. Palko-Łabuz, A. *et al.* MDR reversal and pro-apoptotic effects of statins and statins combined with flavonoids in colon cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **109**, 1511–1522 (2019).
204. Środa-Pomianek, K. *et al.* The Combined Use of Phenothiazines and Statins Strongly Affects Doxorubicin-Resistance, Apoptosis, and Cox-2 Activity in Colon Cancer Cells. *Int J Mol Sci* **20**, 955 (2019).
205. Skierski, J. Badanie działania cytotoksycznego substancji chemicznych. *Postępy Biologii Komórki. Suplement* **24**, 147-163 (2008).
206. Martin, S. J. *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of BCL-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 1545-1556 (1995).
207. Gimpl, G. Cholesterol–protein interaction: Methods and cholesterol reporter molecules. *Subcell Biochem* **51**, 1–45 (2010).
208. Mouritsen, O. G. & Jorgensen, K. Dynamic lipid-bilayer heterogeneity: A mesoscopic vehicle for membrane function? *BioEssays* **14**, 129-136 (1992).
209. Lipinski, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 3-26 (2012).
210. Veber, D. F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **45**, 2615–2623 (2002).
211. Sorkun, M. C. *et al.* AqSolDB, a curated reference set of aqueous solubility and 2D descriptors for a diverse set of compounds. *Sci Data* **6**, 143 (2019).
212. Nisha, C. M. *et al.* Molecular docking and in silico admet study reveals acylguanidine 7a as a potential inhibitor of β -secretase. *Adv Bioinformatics* **2016**, (2016).

213. Senet, P. Chemical hardnesses of atoms and molecules from frontier orbitals. *Chem Phys Lett* **275**, 527-532 (1997).
214. Lomize, A. L. & Pogozheva, I. D. Physics-Based Method for Modeling Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J Chem Inf Model* **59**, 3198-3213 (2019).
215. Pérez-Isidoro, R. & Costas, M. The effect of neuroleptic drugs on DPPC/sphingomyelin/cholesterol membranes. *Chem Phys Lipids* **229**, 104913 (2020).
216. Alves, I. *et al.* The interaction of antipsychotic drugs with lipids and subsequent lipid reorganization investigated using biophysical methods. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1808**, 2009-2018 (2011).
217. Prendergast, F. G. *et al.* 1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: Synthesis, Fluorescence Properties, and Use as a Fluorescence Probe of Lipid Bilayers. *Biochemistry* **20**, 7333-7338 (1981).
218. Parasassi, T. & Gratton, E. Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. *J Fluoresc* **5**, 59-69 (1995).
219. Pillinger, T. *et al.* Comparative effects of 18 antipsychotics on metabolic function in patients with schizophrenia, predictors of metabolic dysregulation, and association with psychopathology: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry* **7**, 64-77 (2020).
220. Rognoni, C. *et al.* Second-Generation Antipsychotic Drugs for Patients with Schizophrenia: Systematic Literature Review and Meta-analysis of Metabolic and Cardiovascular Side Effects. *Clinical Drug Investigation* **41**, 303-319 (2021).
221. Beretta, G. *et al.* Mechanisms of Cellular Resistance to Camptothecins. *Curr Med Chem* **13**, 3291-3305 (2006).
222. Lee, H. J. & Choi, C. H. Characterization of SN38-resistant T47D breast cancer cell sublines overexpressing BCRP, MRP1, MRP2, MRP3, and MRP4. *BMC Cancer* **22**, 446 (2022).
223. Rácz, B. & Spengler, G. Repurposing Antidepressants and Phenothiazine Antipsychotics as Efflux Pump Inhibitors in Cancer and Infectious Diseases. *Antibiotics* **12**, 137 (2023).
224. Mishra, R. *et al.* Phenothiazines and Related Drugs as Multi Drug Resistance Reversal Agents in Cancer Chemotherapy Mediated by p-glycoprotein. *Curr Cancer Ther Rev* **13**, 28-42 (2017).

225. Hendrich, A. B. *et al.* New phenothiazine-type multidrug resistance modifiers: Anti-MDR activity versus membrane perturbing potency. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 260-265(2003).
226. Wesołowska, O. *et al.* Presence of anionic phospholipids rules the membrane localization of phenothiazine type multidrug resistance modulator. *Biophys Chem* **109**, 399-412 (2004).
227. Berg, K. C. G. *et al.* Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol Cancer* **16**, 116 (2017).
228. Sawayama, H. *et al.* Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification. *Annals of Gastroenterological Surgery* **4**, 528–539 (2020).
229. Bosman, F. T. & Yan, P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Polish Journal of Pathology* **65**, 257–266 (2014).
230. Ahmed, D. *et al.* Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* **2**, 71 (2013).
231. Wu, X. *et al.* Synergistic chemopreventive effects of nobiletin and atorvastatin on colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **38**, 455-464 (2017).
232. Zhou, M. *et al.* Synergistic inhibition of colon cancer cell growth by a combination of atorvastatin and phloretin. *Oncol Lett* **15**, 1985-1992 (2018).
233. Popovich, D. G. *et al.* Lovastatin interacts with natural products to influence cultured hepatocarcinoma cell (Hep-G2) growth. *J Am Coll Nutr* **29**, 204-210 (2010).
234. Xiao, H. & Yang, C. S. Combination regimen with statins and NSAIDs: A promising strategy for cancer chemoprevention. *International Journal of Cancer* **123**, 983-990 (2008).
235. Mercurio, S. *et al.* Evidence for new targets and synergistic effect of metronomic celecoxib/fluvastatin combination in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol Commun* **2**, 1-17 (2014).
236. Feleszko, W. *et al.* Synergistic interaction between highly specific cyclooxygenase-2 inhibitor, MF-tricyclic and lovastatin in murine colorectal cancer cell lines. *Oncol Rep* **9**, 879-885 (2002).
237. Martirosyan, A. *et al.* Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: Potential therapeutic relevance. *BMC Cancer* **10**, 1471-2407 (2010).
238. Calabro, A. *et al.* In-vitro synergism of m-TOR inhibitors, statins, and classical chemotherapy: Potential implications in acute leukemia. *Anticancer Drugs* **19**, 705-712 (2008).

239. Budman, D. R. *et al.* Fluvastatin enhancement of trastuzumab and classical cytotoxic agents in defined breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res Treat* **104**, 93-101 (2007).
240. Taylor-Harding, B. *et al.* Fluvastatin and cisplatin demonstrate synergistic cytotoxicity in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* **119**, 549-556 (2010).
241. van der Spek, E. *et al.* Inhibition of the mevalonate pathway potentiates the effects of lenalidomide in myeloma. *Leuk Res* **33**, 100–108 (2009).
242. Andersson, C. R. *et al.* Assessment in vitro of interactions between anti-cancer drugs and noncancer drugs commonly used by cancer patients. *Anticancer Drugs* **34**, 92-102 (2023).
243. Warita, K. *et al.* Statin-induced mevalonate pathway inhibition attenuates the growth of mesenchymal-like cancer cells that lack functional E-cadherin mediated cell cohesion. *Sci Rep* **4**, (2014).
244. Yang, Z. *et al.* Synergistic actions of atorvastatin with γ -tocotrienol and celecoxib against human colon cancer HT29 and HCT116 cells. *Int J Cancer* **126**, 7593 (2010).
245. Sawada, N. *et al.* Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *Br J Cancer* **90**, 1672-1678 (2004).
246. Pandita, A. *et al.* Synergistic combination of gemcitabine and dietary molecule induces apoptosis in pancreatic cancer cells and down regulates PKM2 expression. *PLoS One* **9**, (2014).
247. Kutkowska, J. *et al.* Sorafenib in combination with betulinic acid synergistically induces cell cycle arrest and inhibits clonogenic activity in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Int J Mol Sci* **19**, 3234 (2018).
248. Sarwar, S. *et al.* Synergistic cytotoxic effect from combination of wedelolactone and cisplatin in hela cell line: A novel finding. *Drug Des Devel Ther* **14**, 3841–3852 (2020).
249. Vu, M. *et al.* Betulinic acid–doxorubicin-drug combination induced apoptotic death via ROS stimulation in a relapsed aml MOLM-13 cell model. *Antioxidants* **10**, 1456 (2021).
250. Li, Q. *et al.* Co-treatment with ginsenoside Rh2 and betulinic acid synergistically induces apoptosis in human cancer cells in association with enhanced caspase-8 activation, bax translocation, and cytochrome c release. *Mol Carcinog* **50**, 760-769 (2011).
251. Eder-Czembirek, C. *et al.* Combination of betulinic acid with cisplatin - Different cytotoxic effects in two head and neck cancer cell lines. *Oncol Rep* **14**, 667-671 (2005).

252. Xiao, H. *et al.* Combination of atorvastatin and celecoxib synergistically induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Int J Cancer* **122**, 2115-2124 (2008).
253. Raeder, M. B. *et al.* Antidepressant drugs activate SREBP and up-regulate cholesterol and fatty acid biosynthesis in human glial cells. *Neurosci Lett* **395**, 185–190 (2006).
254. Lange, Y. *et al.* Cholesterol homeostasis is modulated by amphiphiles at transcriptional and post-transcriptional loci. *Journal of Lipid Research* **37**, 534-539 (1996).
255. Fernø, J. *et al.* Acute clozapine exposure in vivo induces lipid accumulation and marked sequential changes in the expression of SREBP, PPAR, and LXR target genes in rat liver. *Psychopharmacology (Berl)* **203**, 73–84 (2009).
256. Liu, X. *et al.* Acute effects of oral olanzapine treatment on the expression of fatty acid and cholesterol metabolism-related gene in rats. *Life Sci* **128**, 72–78 (2015).
257. Lange, Y. *et al.* Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17468-17475 (2000).
258. Parihar, S. P. *et al.* Simvastatin Enhances Protection against *Listeria monocytogenes* Infection in Mice by Counteracting *Listeria*-Induced Phagosomal Escape. *PLoS One* **8**, (2013).
259. Lee, E. J. *et al.* Effectiveness of atorvastatin in suppressing MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells. *Int Forum Allergy Rhinol* **6**, 1159-1166 (2016).
260. George, M. Y. *et al.* Naringin treatment improved main clozapine-induced adverse effects in rats; emphasis on weight gain, metabolic abnormalities, and agranulocytosis. *Drug Dev Res* **82**, 980-989 (2021).
261. Canfrán-Duque, A. *et al.* Curcumin mitigates the intracellular lipid deposit induced by antipsychotics *in vitro*. *PLoS One* **10**, (2015).
262. Bal, A. & Bird, M. M. Changes in filipin-sterol binding in the rat cingulate cortex after the administration of antidepressant drugs. A freeze-fracture study. *Brain Res* **550**, 147-151 (1991).
263. Jutila, A. *et al.* Comparison of the effects of clozapine, chlorpromazine, and haloperidol on membrane lateral heterogeneity. *Chem Phys Lipids* **112**, 151-163 (2001).
264. Tessier, C. *et al.* Modification of membrane heterogeneity by antipsychotic drugs: An X-ray diffraction comparative study. *J Colloid Interface Sci* **320**, 469-475 (2008).
265. Chulkov, E. G. *et al.* Direct visualization of solid ordered domains induced by polyene antibiotics in giant unilamellar vesicles. *Chem Phys Lipids* **183**, 204-207 (2014).

266. Eisensamer, B. *et al.* Antidepressants and antipsychotic drugs colocalize with 5-HT₃ receptors in raft-like domains. *Journal of Neuroscience* **25**, 10198-10206 (2005).
267. Odovic, J. A Study of Absorption and Selected Molecular Physicochemical Properties of Some Antipsychotic Drugs. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* Preprint (2022).
268. Pires, P. C. *et al.* Antipsychotics-Loaded Nanometric Emulsions for Brain Delivery. *Pharmaceutics* **14**, 2174 (2022).
269. Wu, C. *et al.* Novel SN38 derivative-based liposome as anticancer prodrug: An *in vitro* and *in vivo* study. *Int J Nanomedicine* **14**, 75–85 (2019).
270. Shimizu, A. *et al.* HOMO-LUMO Energy-Gap Tuning of π -Conjugated Zwitterions Composed of Electron-Donating Anion and Electron-Accepting Cation. *Journal of Organic Chemistry* **86**, 770–781 (2021).
271. Jain, M. K. & Wu, N. M. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. *J Membr Biol* **34**, 157–201 (1977).
272. Dubinin, M. V. *et al.* Effect of betulin and betulonic acid on isolated rat liver mitochondria and liposomes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1862**, 183383 (2020).
273. Prades, J. *et al.* Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1808**, 752-760 (2011).
274. Fajardo-Sánchez, E. *et al.* Location of the bioactive pentacyclic triterpene ursolic acid in the membrane. A molecular dynamics study. *J Biomol Struct Dyn* **35**, 2688-2700 (2017).

Strongy internetowe:

<https://gco.iarc.fr/> (dostęp 03.2022)

<http://onkologia.org.pl> (dostęp 03.2022)