



**Narodowy
Instytut
Onkologii**

im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Gliwicach

Rozprawa doktorska

Badanie aktywności przeciwnowotworowej nowych kombinacji terapeutycznych opartych na gemcytabinie i niesteroidowych lekach przeciwzapalnych z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych jako nośników

Agata Kawulok

**Promotor:
Dr hab. Violetta Kozik, prof. UŚ**

Instytut Chemii
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Uniwersytet Śląski



Katowice 2025

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania Pani Profesor Violetcie Kozik, której nieoceniona pomoc i wsparcie towarzyszyły mi na każdym etapie powstawania tej pracy. Nie tylko wiedza i doświadczenie Pani Profesor, stanowiące nieustanną inspirację i motywację do rozwoju, ale jej serdeczność, cierpliwość, otwartość i zaangażowanie sprawiły, że odebrałam kolejną lekcję na drodze do mojego naukowego i życiowego rozwoju – za to jestem ogromnie wdzięczna.

Z całego serca dziękuję również moim Koleżankom i Kolegom z Kliniki Transplantacji Szpiku i Onkohematologii, w szczególności z Banku i Pracowni Komórek Krwiotwórczych, za inspirujące dyskusje, niezliczone i bezcenne wskazówki, merytoryczne uwagi i pomoc podczas badań. Jestem wdzięczna, że mogę pracować w tak przyjaznym, życzliwym i wspierającym zespole.

SPIS TREŚCI

1. Przegląd literatury	7
1.1. Charakterystyka nowotworu trzustki	7
1.1.1. Podścielisko nowotworu trzustki	8
1.1.2. Geny supresorowe w nowotworze trzustki	9
1.1.3. Chemiooporność w nowotworze trzustki	10
1.1.4. Podścielisko desmoplastyczne a chemiooporność	11
1.1.5. Znaczenie bariery podścieliskowej w biotransformacji leków	12
1.2. Gembytabina i jej pochodne	13
1.2.1. Modyfikacje chemiczne gemcytabiny	15
1.2.2. Modyfikacje w pozycji 4-(N)	16
1.2.3. Modyfikacje w pozycji C-5'	18
1.3. Proces zapalny	19
1.3.1. Niesteroidowe leki przeciwzapalne	20
1.3.2. Klasyfikacja niesteroidowych leków przeciwzapalnych	22
1.4. Kombinacja gemcytabiny i NLPZ w leczeniu nowotworów	25
1.5. Metody syntezy 4-(N)- oraz C-5'-podstawionych pochodnych gemcytabiny	27
1.5.1. Synteza 4-(N)-podstawionych pochodnych gemcytabiny	28
1.5.2. Metody zabezpieczenia grup hydroksylowych gemcytabiny	28
1.5.3. Zastosowanie środków sieciujących	29
1.5.4. Synteza C-5'- podstawionych pochodnych gemcytabiny	30
1.6. Komórki macierzyste	35
1.6.1. Mezenchymalne komórki macierzyste	36

1.6.2.	Fenotyp mezenchymalnych komórek macierzystych	37
1.6.3.	Charakterystyka immunologiczna mezenchymalnych komórek macierzystych	40
1.6.4.	Mezenchymalne komórki macierzyste jako nośniki	43
2.	Cel badań	46
3.	Uwagi szczegółowe	47
4.	Materiały i metody badań	48
4.1.	Materiały badań	48
4.1.1.	Odczynniki i zestawy stosowane w badaniach biologicznych	48
4.1.2.	Aparatura oraz oprogramowania stosowane w badaniach biologicznych	49
4.1.3.	Odczynniki stosowane w badaniach chemicznych	52
4.2.	Metody badań	56
4.2.1.	Badania biologiczne	56
4.2.2.	Badania chemiczne	64
5.	Wyniki badań	77
5.1.	Część biologiczna	77
5.1.1.	Izolacja komórek BM-MSC	77
5.1.2.	Fenotyp komórek BM-MSC	77
5.1.3.	Działanie cytotoksyczne GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU na BM-MSC oraz PCC	78
5.1.4.	Analiza cyklu komórkowego oraz morfologii PCC poddanych działaniu GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU	85
5.1.5.	Analiza apoptozy i nekrozy komórek PCC oraz BM-MSC po traktowaniu GEM+ASA/IBU/FLU	89
5.1.6.	Ocena aktywności cytotoksycznej pożywek kondycjonowanych znad BM-MSC na komórki PCC	91
5.1.7.	Analiza potencjału pożywek kondycjonowanych znad BM-MSC do indukowania apoptozy i nekrozy w komórkach PCC	93

5.1.8.	Kokultura BM-MSC traktowanych GEM i FLU z komórkami PCC	95
5.1.9.	Identyfikacja białek kaspazy-3, PARP1, p-Ser-GSK3 β oraz FAS metodą immunochemiczną (Western blot) w komórkach PCC po traktowaniu kombinacją GEM+FLU oraz pożywkami kondycjonowanymi znad BM-MSC	97
5.2.	Część chemiczna	100
5.2.1.	Syntezy chlorków kwasowych NLPZ	100
5.2.2.	Syntezy koniugatów cytydyny z chlorkami kwasowymi NLPZ	103
5.2.3.	Synteza koniugatów cytydyny z kwasem acetylosalicylowym z użyciem środka sieciującego DCC	104
5.2.4.	Synteza koniugatu cytydyny z użyciem środka sieciującego EDC	108
5.2.5.	Podsumowanie syntez z wykorzystaniem cytydyny	109
5.2.6.	Próby syntezy koniugatu gemcytabiny z kwasem acetylosalicylowym w układzie DCC/DMAP	110
5.2.7.	Synteza koniugatu gemcytabiny z ibuprofenem w układzie DCC/DMAP	110
5.2.8.	Synteza gemcytabiny i ibuprofenu w stosunku molowym 1:2	112
5.2.10.	Synteza koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w polu mikrofalowym w stosunku molowym substratów 1:1	118
6.	DYSKUSJA	122
7.	WNIOSKI	130
8.	LITERATURA	133
9.	SPIS RYSUNKÓW	152
10.	SPIS TABEL	154
11.	DANE BIBLIOMETRYCZNE	155

SPIS SKRÓTÓW

ASA	Kwas acetylosalicylowy
BM-MSC	Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego
CAF	Fibroblasty związane z rakiem (ang. <i>cancer-associated fibroblast</i>)
CM	Pożywka kondycjonowana
COX	Cyklooksygenaza
CYT	Cytydyna
ECM	Macierz zewnątrzkomórkowa
EV	Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe
FBS	Płodowa surowica bydlęca
FLU	Flurbiprofen
GEM	Gemcytabina
hPLT	Ludzki lizat płytkowy
IBU	Ibuprofen
NLPZ	Niesteroidowe leki przeciwzapalne
NMR	Magnetyczny rezonans jądrowy
NT	Transportery nukleozydów
PCC	Komórki nowotworowe trzustki
PDAC	Gruzołakorak przewodowy trzustki
PSC	Komórki gwiaździste trzustki
TLC	Chromatografia cienkowarstwowa

1. Przegląd literatury

1.1. *Charakterystyka nowotworu trzustki*

Choroby nowotworowe stanowią jedno z największych wyzwań dla systemu zdrowia publicznego, zarówno w skali globalnej, jak i krajowej. Według danych American Cancer Society (ACS) oraz National Cancer Institute (NCI) około 40% populacji otrzyma diagnozę nowotworu. Standardowe metody leczenia, takie jak operacje resekcyjne, radioterapia, chemioterapia, immunoterapia oraz terapia biologiczna, choć szeroko stosowane, często okazują się mało skuteczne lub jedynie w ograniczonym stopniu poprawiają rokowanie dla pacjentów. Mimo intensywnych badań nad mechanizmami powstawania i rozwoju nowotworów odkrycie efektywnego leku oraz sposobu postępowania terapeutycznego pozostaje nadal celem do osiągnięcia.

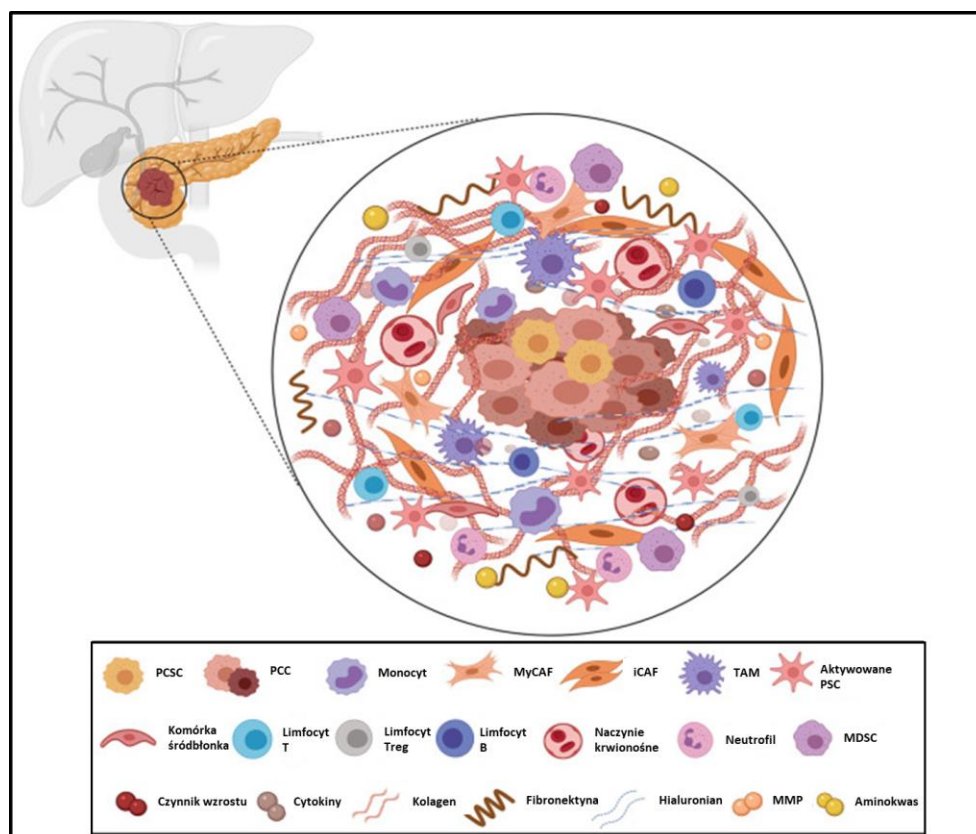
Współczesna nauka zorientowana jest na innowacyjne i interdyscyplinarne podejście do terapii przeciwnowotworowej. Postępy w dziedzinach takich jak genetyka, biochemia, biologia molekularna, czy biotechnologia otwierają nowe możliwości w projektowaniu skuteczniejszych metod leczenia. Połączenie wiedzy z różnych obszarów nauki pozwala na tworzenie kompleksowych metod terapeutycznych, które mogą znacząco zmienić oblicze walki z nowotworami.

Gruczolakorak przewodowy trzustki (ang. *pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) jest śmiertelną chorobą o rosnącej częstości i przewiduje się, że stanie się drugą najczęstszą przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych na świecie – rozpoznanie w zaawansowanym stadium przyczynia się do niskiego 5-letniego przeżycia na poziomie 10% [1,2]. Tym samym plasuje się wśród chorób z najniższym poziomem rokowań dla pacjentów. W ostatniej dekadzie odnotowano ogromny postęp w diagnostyce, leczeniu okołoperacyjnym, technikach radioterapii oraz terapiach systemowych stosowanych w zaawansowanych stadiach PDAC. Choć przyniosło to pewną poprawę wyników leczenia, zmiany te nadal są niewystarczające. Kluczowym wyzwaniem pozostaje opracowanie skutecznych strategii badań przesiewowych dla pacjentów z grup wysokiego ryzyka, umożliwiających wczesne wykrywanie PDAC, co jest czynnikiem determinującym skuteczność leczenia [3]. Jedyną formą terapii, która niesie za sobą szansę

wyleczenia PDAC, jest resekcja chirurgiczna. Jednak w wielu przypadkach nie jest ona możliwa z powodu zaawansowanego stadium choroby [4]. Systemowa chemioterapia kombinowana, w tym FOLFIRINOX (5-fluorouracyl, kwas folinowy [leukoworyna], irynotekan i oksaliplatyna) oraz gemcytabina i nab-paklitaksel pozostają podstawą leczenia tych pacjentów [5].

1.1.1. Podścielisko nowotworu trzustki

Jednym z głównych elementów modelu skutecznego leczenia jest przezwyciężenie gęstego podścieliska nowotworu (desmoplazji) (Rysunek 1.) Struktura desmoplastyczna nowotworu trzustki składa się z nieprawidłowych komórek gwiaździstych (ang. *pancreatic stellate cells*, PSC), których nadaktywność sprzyja rozwojowi komórek nowotworowych i tworzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej nowotworu (ang. *extracellular matrix*, ECM), która z kolei stanowi barierę dla leczenia cytotoksycznego. Jednak, jak pokazują wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych, degradacja macierzy skutkuje bardziej agresywną chorobą i pogorszeniem wyników leczenia. Skład ECM to głównie kolagen, fibronektyna, proteoglikany i kwas hialuronowy, a także katalitycznie aktywne enzymy i proteiny [6]. W wyniku nagromadzenia się elementów tkanki trzustkowej dochodzi do ucisku naczyń krwionośnych i limfatycznych w guzie, co prowadzi do obniżenia perfuzji. Tworzy się gęsta siatka włókien kolagenowych wokół komórek raka trzustki, a macierz zewnątrzkomórkowa utrudnia penetrację lekom przeciwnowotworowym w głąb guza. Oprócz tego włókna kolagenowe wiążą się z receptorami na powierzchni komórki nowotworowej, aktywując wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, które indukują wzrost guza. Ponadto macierz jest wzmacniana przez sieciowanie kolagenu i kwas hialuronowy. Poza interakcją z samą ECM, komórki nowotworowe komunikują się również z PSC [7,8]. Jeśli chodzi o składniki komórkowe, macierz nowotworu trzustki jest zdominowana przez fibroblasty związane z rakiem (ang. *cancer-associated fibroblast*, CAF) oraz aktywowane PSC. Co do samych komórek gwiaździstych, to w prawidłowej tkance trzustki są one w stanie spoczynku i syntezują zarówno białka macierzy, jak i enzymy degradujące macierz, w ten sposób zachowując jej równowagę [8].



Rysunek 1. **Struktura macierzy zewnątrzkomórkowej nowotworu trzustki.** PCSC – komórki macierzyste nowotworu trzustki (ang. *pancreatic cancer stem cells*); PCC – komórki nowotworowe trzustki (ang. *pancreatic cancer cells*); MyCAF – miofibroblasty związane z nowotworem (ang. *myofibroblastic cancer-associated fibroblasts*); iCAF – zapalne fibroblasty związane z nowotworem (ang. *inflammatory cancer-associated fibroblasts*); TAM – makrofagi związane z nowotworem (ang. *tumor-associated macrophages*); aktywowane PSC – aktywowane komórki gwiaździste trzustki (ang. *activated pancreatic stellate cells*); MDSC – komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (ang. *myeloid-derived suppressor cells*). Opracowanie własne na podstawie [9]. Rysunek utworzono w programie www.biorender.com

1.1.2. Geny supresorowe w nowotworze trzustki

Prawie wszyscy pacjenci z rozpoznaniem PDAC są nosicielami co najmniej jednej zmiany - onkogenu KRAS i/lub supresorów nowotworu CDKN2A, TP53 i SMAD4/DPC4 [10,11].

KRAS (ang. *Kirsten rat sarcoma virus*) jest genem kodującym białko K-Ras, które odgrywa kluczową rolę w szlaku sygnalizacyjnym Ras/MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*). Jest to szlak kinaz białkowych aktywowanych mitogenami za pośrednictwem białek Ras. Białko to przenosi sygnały z otoczenia komórki do jej jądra. Przekazywane sygnały kontrolują procesy, takie jak proliferacja oraz dojrzewanie i różnicowanie komórki. Białko K-Ras jest GTPazą - enzymem przekształcającym nukleotyd guanozynotrifosforan (GTP) w guanozynodifosforan (GDP). Działa jak

przełącznik, który jest aktywowany przez wiązanie z GTP i dezaktywowany poprzez hydrolizę GTP do GDP. W stanie związanym z GDP białko K-Ras nie przesyła sygnałów do jądra komórkowego [12].

CDKN2A (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) koduje niezbędny regulator cyklu komórkowego, jest najczęściej zmienionym genem supresorowym w PDAC. Często są również mutacje somatyczne w genie supresorowym nowotworu TP53. Białko kodowane przez TP53 odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi na stres komórkowy i jest zmutowane w wielu różnych typach nowotworów. Z kolei gen supresorowy SMAD4 (ang. *mothers against decapentaplegic homolog 4*) pośredniczy w przekazywaniu sygnału za receptorem transformującego czynnika wzrostu β (ang. *transforming growth factor β* TGF β) i jest inaktywowany w około 50% tych nowotworów [11].

1.1.3. Chemiooporność w nowotworze trzustki

Rozwój oporności PDAC na chemioterapię znacznie ogranicza jej skuteczność. Chemiooporność można ogólnie podzielić na dwie kategorie: oporność wewnętrzną (*de novo* lub wrodzoną) i oporność nabytą [13]. Oporność wewnętrzna występuje wtedy, gdy chemioterapia jest nieskuteczna od początku leczenia i jest konsekwencją profilu genetycznego, wariantów genetycznych i/lub zmian w genomie. Z kolei nabyta oporność rozwija się dopiero po pewnym czasie ekspozycji komórek nowotworowych na leki przeciwnowotworowe. Zmiany genetyczne lub epigenetyczne w komórkach nowotworowych mogą powstawać wraz z rozwojem nowotworu. W przypadku oporności nabytej komórki nowotworowe początkowo mogą wykazywać wrażliwość na leki, ale kontynuowane leczenie ostatecznie prowadzi do oporności na chemioterapię [14]. Chociaż komórki nowotworu trzustki są bardziej podatne na gemcytabinę w porównaniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi, u większości pacjentów rozwija się oporność w ciągu kilku tygodni od rozpoczęcia leczenia.

Zidentyfikowano kilka szlaków sygnałowych kontrolujących zarówno oporność wewnętrzną, jak i nabytą w raku trzustki [15]. Szlaki regulujące mikrośrodowisko guza i podścielisko niekoniecznie są bezpośrednio powiązane z mechanizmami cytotoksyczności gemcytabiny. Odgrywają jednak kluczową rolę w rozwoju chemiooporności. Szlaki sygnałowe odpowiadające za wzrost, proliferację, różnicowanie,

apoptozę, rozwój guza i angiogenezę, takie jak: AKT¹, receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), Notch², MAPK, szlaki czynnika jądrowego (NF)-κB³ i Sonic Hedgehog (SHH)⁴, wydają się bezpośrednio lub pośrednio wpływać na chemiowrażliwość guza trzustki. Ponadto komórki zaangażowane w proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT)⁵ i nowotworowe komórki macierzyste najprawdopodobniej mają swój udział w rozwoju chemiooporności w PDAC [21].

1.1.4. Podścielisko desmoplastyczne a chemiooporność

Trudności w leczeniu PDAC wynikają głównie z braku efektywnej drogi dostarczania leków w głąb nowotworu, co jest spowodowane zmniejszoną mikronaczyniowością (słabym unaczynieniem guza) i chemioopornością indukowaną przez podścielisko. Spośród różnych typów komórek zaangażowanych w desmoplazję nowotworu trzustki, CAF są głównymi komórkami odpowiedzialnymi za zwłóknienie guza

¹ AKT (znana również jako kinaza białkowa B, PKB), jest serynowo-treoninową kinazą białkową zaangażowaną w wiele procesów komórkowych, takich jak regulacja przeżycia komórek, proliferacji, angiogenezy, migracji oraz metabolizmu. Składa się z co najmniej trzech podjednostek (AKT1/PKBα, AKT2/PKBβ i AKT3/PKBγ) [16].

² Białka Notch to rodzaj białek, które odgrywają kluczową rolę w komunikacji komórka-komórka, szczególnie w rozwoju embrionalnym i procesach regeneracyjnych u dorosłych. Ich aktywność ma wpływ na rozwój układu nerwowego, angiogenezę i różnicowanie różnych typów komórek, takich jak keratynocyty i komórki T [17].

³ NF-κB (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) jest to jądrowy czynnik transkrypcyjny regulujący wrodzone i adaptacyjne funkcje odpornościowe. Pełni rolę kluczowego mediatora odpowiedzi zapalnych. NF-κB indukuje ekspresję różnych genów prozapalnych, w tym kodujących cytokiny i chemokiny, a także uczestniczy w regulacji inflamasyonu. Ponadto NF-κB odgrywa kluczową rolę w regulacji przeżycia, aktywacji i różnicowania komórek odpornościowych i limfocytów T [18].

⁴ Białko Sonic Hedgehog (SHH) jest główną cząsteczką sygnałową i regulatorową procesu morfogenezy embrionalnej u wszystkich zwierząt. Kontroluje organogenezę i organizację ośrodkowego układu nerwowego. Szlak sygnalizacyjny Hedgehog odgrywa istotną rolę również podczas tumorogenezy/onkogenezy oraz w rozwoju radio- i chemiooporności w wielu rodzajach nowotworów [19].

⁵ Przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT) to proces komórkowy, podczas którego zmiany w ekspresji genów, a mechanizmach regulacji potranslacyjnej prowadzą do zaniku cech nabłonkowych w komórkach i tym samym nabycia cech mezenchymalnych. EMT zachodzi w odpowiedzi na sygnały, które komórki otrzymują ze swojego mikrośrodowiska. Stan komórek nabłonkowych, w których inicjowane jest EMT, charakteryzuje się stabilnymi połączeniami komórka-komórka, biegunowością wierzchołkowo-podstawną i interakcjami z błoną podstawną. W wyniku procesu EMT komórki wykazują morfologię podobną do fibroblastów, a także zwiększoną zdolność migracyjną oraz (często) inwazyjną [20].

[22]. CAF są komórkami wydzielniczymi zarówno dla rozpuszczalnych, jak i nierozpuszczalnych czynników, które tworzą specyficzne cechy podścieliska wpływające na rozwój chemiooporności – barierę fizyczną (włóknienie), a także transformację komórek nowotworowych i komunikację parakrynną [14]. Uważa się, że CAF występujące w nowotworze trzustki pochodzą z różnych źródeł komórkowych, w szczególności z uśpionych PSC, ale prawdopodobnie również z uśpionych fibroblastów rezydentnych i mezenchymalnych komórek macierzystych [23]. W PDAC komórki PSC są aktywowane poprzez m. in. czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF), transformujący czynnik wzrostu (ang. *transforming growth factor* β , TGF- β), czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor* α , TNF- α) oraz interleukiny (IL)-1, -6 i -10 [22,23]. Aktywowane komórki PSC odgrywają decydującą rolę w rozwoju desmoplazji i przebudowie ECM w PDAC poprzez wydzielanie czynników takich, jak kolagen typu I, metaloproteinazy macierzy i inhibitory tkankowe metaloproteinaz [8,24]. Wykazano także, że utrata funkcji TP53 indukująca aktywację sygnalizacji JAK2-STAT3⁶ promuje zmiany w podścielisku, wzrost nowotworu i chemiooporność na gemcytabinę w modelach mysich. Wykazano również, że pacjenci z PDAC z niższymi poziomami fosforylowanego STAT3 i funkcjonalnym TP53 żyli dłużej w porównaniu z pacjentami z wysokimi poziomami fosforylowanego STAT3 i mutacją TP53 [25,26].

1.1.5. Znaczenie bariery podścieliskowej w biotransformacji leków

Włókniste podścielisko nowotworu trzustki jest uważane za fizyczną barierę dla dostarczania gemcytabiny i innych chemioterapeutyków do komórek nowotworowych. Opracowano i zbadano różne strategie polegające na rozluźnieniu gęstego podścieliska oraz przywróceniu funkcji naczyń krwionośnych. Na przykład, w różnych modelach

⁶ JAK2-STAT3 - Szlak sygnalizacyjny kinazy Janus 2 (ang. *janus-activated kinase 2*)/transduktora sygnału i aktywatora transkrypcji 3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*) (JAK2/STAT3). Jego rolą jest przekazywanie sygnałów ze środowiska zewnątrzkomórkowego do wewnątrzkomórkowego (jądra) po związaniu cytokin i czynników wzrostu. Ten szlak sygnałowy jest ściśle regulowany i odpowiada za wiele funkcji biologicznych, takich jak proliferacja komórek, różnicowanie i apoptoza. Ponadto, odgrywa kluczową rolę w rozwoju embrionalnym, hemopoecie i kontrolowaniu układu odpornościowego. Z drugiej strony, aberracyjnie aktywowany JAK2/STAT3 jest często wykrywany w różnych rodzajach nowotworów i bierze udział w onkogenezie, angiogenezie i przerzutach, które zwykle są odporne na standardową chemioterapię [25].

nowotworów trzustki u myszy, farmakologicznie indukowana przebudowa podścieliska lub enzymatyczna degradacja hialuronianu i kolagenu skutkowała zwiększonym dostarczaniem leku i lepszą odpowiedzią na leczenie gemcytabiną [27–30]. W innych badaniach opisano, że immunoterapia z wykorzystaniem zmodyfikowanych limfocytów T może przyczyniać się do rearanżacji ECM oraz indukcji śmierci komórek nowotworowych [31]. Zatem poprawa dostarczania leków do mikrośrodowiska nowotworowego zależy nie tylko od fizycznego ograniczenia desmoplazji. Co więcej, najlepsze efekty obserwowano w momencie zastosowania terapii kombinowanych, ukierunkowanych na różne elementy struktury nowotworu trzustki.

1.2. Gemcytabina i jej pochodne

Jak wspomniano, gemcytabina (2',2'-difluoro-2'-deoksycytydyna, dFdC) jest jednym z najczęściej stosowanych leków w terapii nowotworów trzustki. Należy do grupy antymetabolitów pirymidynowych i stanowi analog 2'-deoksycytydyny. W medycynie jest dostępna pod nazwą handlową Gemzar, jako wodny roztwór chlorowodoru gemcytabiny przeznaczony do podawania w formie infuzji dożylniej. W strukturze gemcytabiny atomy wodoru przy węglu C-2' deoksycytydyny zastąpiono atomami fluoru. Gemcytabina jest prolekiem, który ulega wewnątrzkomórkowej aktywacji. Częsteczka gemcytabiny jest hydrofilowa, a zatem transportowana do komórek przez różne transportery nukleozydów (ang. *nucleoside transporters*, NT). Dostępność NT determinuje zdolność gemcytabiny do zahamowania wzrostu komórek i jej skuteczność kliniczną [32]. NT z rodzin SLC28 i SLC29 odgrywają kluczową rolę w pierwszym etapie biosyntezy nukleotydów. Do rodziny SLC28 należą kationowo-zależne skoncentrowane transportery nukleozydów (ang. *human concentrative nucleoside transporters*, hCNT), natomiast rodzina SLC29 obejmuje ewilibracyjne transportery nukleozydów (ang. *human equilibrative nucleoside transporters*, hENT). Działanie białek transportowych z rodziny CNT jest zależne od obecności kationu sodu, co determinuje transport jednokierunkowy nukleozydów do komórek, podczas gdy ENT – w dwukierunkowym transporcie nukleozydów przez błony biologiczne zgodnie z gradientem stężeń [33]. Gemcytabina (dFdC) jest transportowana do komórek przez pięć NT: hCNT1, hCNT2, hCNT3, a także hENT1 i hENT2. Jednakże badania kinetyczne prowadzone na ludzkich liniach komórkowych wykazały, że wewnątrzkomórkowy wychwyt dFdC zachodzi głównie poprzez hENT1, a w pewnym stopniu również przez hENT2, hCNT1 i hCNT3 [32,34]. Metabolizm i aktywację

wewnątrzkomórkową gemcytabiny przedstawiono na Rysunku 2. Po wnikięciu gemcytabiny do komórki, kinaza deoksycytydynowa (dCK) przekształca ją do monofosforanu difluorodeoksycytydyny (dFdCMP), a potem do dwóch aktywnych metabolitów: difosforanu gemcytabiny (dFdCDP) i trifosforanu gemcytabiny (dFdCTP). Te metabolity hamują procesy kluczowe dla syntezy DNA. dFdCTP konkuruje z trifosforanem deoksycytydyny (dCTP) o włączenie do DNA. Włączenie dFdCTP do nici DNA prowadzi do przerwania replikacji, co uniemożliwia dalsze działanie polimeraz DNA, a to z kolei skutkuje zatrzymaniem syntezy DNA i prowadzi do śmierci komórek. Gemcytabina działa fazowo-specyficznie, w szczególności w fazie S cyklu komórkowego. W tej wewnątrzkomórkowej kaskadzie sygnalizacyjnej, fosforylacja dFdC do dFdCMP za pośrednictwem dCK jest uważana za etap ograniczający szybkość późniejszej produkcji aktywnych metabolitów gemcytabiny [35]. Większość podanej gemcytabiny jest jednak inaktywowana przez szybką deaminację indukowaną przez deaminazę cytydyny (CDA), co powoduje powstawanie wysokich stężeń mniej aktywnego metabolitu gemcytabiny: 2',2'-difluorodeoksyurydyny (dFdU) [36]. Fosforylowane metabolity gemcytabiny są redukowane przez komórkową 5'-nukleotydazę (5'-NT), a forma monofosforanowa dFdCMP jest również przekształcana i inaktywowana przez deoksycytydylanową deaminazę (DCTD) w 2'-deoksy-2',2'-difluorourydynomonofosforan (dFdUMP) [37,38].

Modyfikacje cząsteczki gemcytabiny mają na celu poprawę biodostępności i skuteczności. Badane są także nowe strategie dostarczania leku do komórek nowotworowych, przede wszystkim poprzez zastosowanie proleków⁷ i nanonośników. Aby poprawić skuteczność, aktywność oraz kontrolowany transport i uwalnianie gemcytabiny, szczególną uwagę poświęca się zmianom w pozycji (N)-4 (grupa aminowa) oraz C-5' (grupa hydroksylowa) cząsteczki, co pozwala na zwiększenie jej aktywności biologicznej i zmniejszenie toksyczności [38,41,42].

1.2.2. Modyfikacje w pozycji 4-(N)

1.2.2.1. PEG-gemcytabina

PEG-ylację stosuje się od wielu lat w modyfikowaniu leków o małej masie cząsteczkowej. Jest to proces dodawania łańcuchów polimerowych poliglikolu etylowego do leku poprzez wiązania kowalencyjne lub niekowalencyjne. PEG jest wysokorozpuszczalnym w wodzie polimerem o dobrej biokompatybilności, zatwierdzonym przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*). Proces PEG-ylacji skutkuje wydłużeniem okresu półtrwania leku, zmniejszeniem immunogenności i agregacji leku [43]. Metoda ta okazała się być rozwiązaniem większości problemów związanych z rozpuszczalnością i biokompatybilnością leków, a liczba PEG-ylowanych farmaceutyków na rynku oraz w badaniach klinicznych stale rośnie. Proces ten ma liczne zalety, takie jak zwiększenie rozpuszczalności w wodzie i biokompatybilności. PEG-gemcytabina została przetestowana przez szereg zespołów badawczych na całym świecie.

1.2.2.2. LY2334737

Prolek gemcytabiny LY2334737 został zsyntezowany przez połączenie gemcytabiny z kwasem walproinowym w pozycji 4-(N) poprzez wiązanie amidowe. W rezultacie, lek po podaniu doustnym w krwioobiegu utrzymuje się o kilka godzin dłużej

⁷ Prolek – biologicznie nieaktywna forma cząsteczki leku macierzystego, wykazująca lepsze właściwości transportowe niż lek macierzysty i wymagająca enzymatycznej lub chemicznej transformacji w organizmie, w celu uwolnienia aktywnej jednostki leku [40].

niż niezmodyfikowana gemcytabina. Badania fazy I wykazały wyższy poziomy krążącego proleku niż gemcytabiny w osoczu, co świadczy o jej wydłużonej hydrolizie i tym samym, przedłużonym czasie półtrwania [44,45].

1.2.2.3. Proleki lipofilowe

Działanie cytotoksyczne gemcytabiny można wzmocnić poprzez włączenie leku do cząsteczek takich jak liposomy, PLGA (poli kwas mlekowy-ko-glikolowy), policyjanoakrylan, chitosan, albumin, nanocząsteczki i nanorurki węglowe [46–49]. Ponadto, dzięki temu można zamknąć wraz z gemcytabiną inne leki przeciwnowotworowe o synergistycznym działaniu. Zastosowanie nanocząsteczek jako nośników jest korzystniejsze z punktu widzenia podwyższenia stabilności związków, wydłużenia czasu półtrwania, a także możliwości łączenia leków hydrofobowych i hydrofilowych. Synteza lipofilowej kapsułkowanej gemcytabiny została opatentowana przez Eli Lilly w 1998 roku. W tym procesie grupa aminowa została kowalencyjnie połączona w 4 pozycjach przez długołańcuchowe nasycone lipidy C18 i C20. W późniejszych latach stabilność metaboliczna gemcytabiny została wzmocniona przez syntezę wielu innych proleków gemcytabiny. Lipofilowość została zwiększona poprzez dołączenie w pozycji 4-(N) pochodnych lauroilu, waleroilu i stearoilu, a następnie zamknięcie ich w liposomach. Zaobserwowano, że pochodne lipofilowe wzmacniają działanie przeciwnowotworowe w porównaniu z natywną gemcytabiną [50].

1.2.2.4. Skwalenoilacja

Skwalenoilacja to specyficzny proces koniugacji, w którym gemcytabina jest łączona ze skwalem – naturalnym związkiem z klasy triterpenów, występującym m.in. w oleju z wątroby rekina. Powstały biokoniugat wykazuje znacznie większą oporność na deaminację oraz silniejsze działanie antyproliferacyjne w porównaniu z gemcytabiną. Koniugacja leków z nośnikami, takimi jak skwaleń, może poprawiać ich farmakokinetykę oraz zwiększać ich selektywność wobec określonych tkanek lub komórek [51].

1.2.3. Modyfikacje w pozycji C-5'

1.2.3.1. CP-4126

CP-4126 to ester gemcytabiny i kwasu elaidynowego. Ten lipofilowy prolek gemcytabiny powstał poprzez koniugację leku z kwasem tłuszczowym. Łańcuch boczny składa się z 18 atomów węgla i jednego wiązania podwójnego w pozycji trans (kwas elaidynowy) w 9 pozycji. Ze względu na zmienioną strukturę cząsteczkową jest łatwo wychwytywany przez komórki nowotworowe, niezależne od poziomu hENT1. Lek w badaniach klinicznych I fazy w leczeniu nowotworów litych wykazał podobną toksyczność, co gemcytabina [52]. Aktualnie trwają badania kliniczne fazy II w zastosowaniu do leczenia nowotworu trzustki (*CP4126-201: A phase II study of CP-4126 in patients with advanced pancreatic cancer*). Badano również synergistyczne działanie CP-4126 i innych leków, takich jak docetaksel i oksaliplatyna [53].

1.2.3.2. NEO6002

NEO6002 to nowy konjugat estrowy gemcytabiny zsyntezowany poprzez sprzężenie gemcytabiny z eterowym analogiem kardiolipiny [54]. Badania nad NEO6002 wykazały cytotoksyczność w stosunku do różnych typów linii nowotworowych, takich jak nowotworu płuc, trzustki, piersi, jelita grubego i białaczki u myszy [55,56]. W badaniach *in vivo* porównano działa NEO6002 i Gemzar w leczeniu nowotworu trzustki oraz białaczki odpornej na gemcytabinę. Wyniki wykazały, że NEO6002 wywierał lepsze działanie cytotoksyczne i mniejsze skutki uboczne niż gemcytabina.

1.2.3.3. Fosforylowana gemcytabina

Fosforylacja jest etapem ograniczającym szybkość aktywacji wielu leków przeciwnowotworowych i stanowi jeden z czynników utrudniających terapeutyczne zastosowanie analogów nukleozydów. Zastosowanie zmodyfikowanych proleków nukleotydowych zawierających fosforanową grupę ochronną doprowadziło do selektywnego uwalniania monofosforylowanego analogu nukleozydu. Taka modyfikacja gemcytabiny umożliwia uzyskanie 1) oporności na degradację chemiczną, (2) biernej

dyfuzji przez błonę komórkową i (3) uwolnienia monofosforylowanego metabolitu, niezależnie od ekspresji kinazy. Proleki te ulegają aktywacji wewnątrzkomórkowej, w wyniku której powstaje niestabilny, pośredni anion fosforamidytowy, po czym następuje spontaniczna cyklizacja i rozszczepienie wiązania P–N przez wodę oraz uwolnienie monofosforanu nukleozydu [38].

1.2.3.4. Modyfikacje z wykorzystaniem D- i L-aminokwasów

Proleki gemcytabiny otrzymano poprzez jej sprzęganie z aminokwasami w konfiguracji D i L, co miało na celu zwiększenie stabilności związku. Oba proleki wykazywały wyższą skuteczność niż gemcytabina w zwalczaniu komórek nowotworu trzustki [57,58]. Podobnie, dipeptydowe proleki gemcytabiny charakteryzowały się lepszą aktywnością antyproliferacyjną wobec tych komórek [59].

1.3. Proces zapalny

Zapalenie jest procesem fizjologicznym aktywowanym w wyniku uszkodzenia tkanki, odpowiedzi na infekcję lub działania czynników szkodliwych, takich jak toksyny oraz autoimmunizacja. Głównym celem powstającego stanu zapalnego jest eliminacja czynnika zapalnego – patogenu, a także naprawa uszkodzonych tkanek oraz przywrócenie homeostazy. Pierwszym etapem rozwijającego się stanu zapalnego jest aktywacja komórek układu odpornościowego wydzielających mediatory zapalne, które pomagają przyciągnąć neutrofile do miejsca zapalenia [60]. Chociaż procesy odpowiedzi zapalnej zależą od początkowego bodźca i jego lokalizacji w organizmie, wszystkie mają wspólny mechanizm, który można podsumować następująco: 1) rozpoznanie czynników szkodliwych przez receptory wzorców na powierzchni komórek; 2) aktywacja ścieżek zapalnych; 3) uwolnienie markerów zapalnych; 4) aktywacja lub pobudzenie komórek układu odpornościowego [61].

Proces rozpoczyna się od aktywacji komórek śródbłonna i wydzielenie prozapalnych cytokin, co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności naczyń i ułatwia przejście komórek odpornościowych do miejsca zakażenia. Cytokiny chemotaktyczne (chemokiny) wpływają na migrację komórek układu immunologicznego do miejsca tworzącego się stanu zapalnego [62]. Neutrofile odgrywają kluczową rolę we wczesnej odpowiedzi zapalnej i fagocytowaniu czynników szkodliwych. Aktywacja neutrofili jest

czterostopniowa i zachodzi za pośrednictwem L-, P- i E-selektyny⁸, co prowadzi do toczenia się komórek wzdłuż śródbłonnki naczyń i aktywacji integrin [64]. Następnie aktywowane są monocyty, limfocyty (komórki NK, limfocyty T i B) i komórki tłuszczowe. Monocyty mogą różnicować się w makrofagi i komórki dendrytyczne. Są odpowiedzialne za produkcję czynników wzrostu i cytokin w kolejnych etapach rozwijającego się stanu zapalnego, w odpowiedzi na chemotaksję do uszkodzonych tkanek [61].

Odpowiedź zapalna jest samoograniczająca, a jej czas trwania jest regulowany przez kontrolowaną produkcję mediatorów, podczas której stężenie chemokin ulega rozcieńczeniu w czasie. Krążące białe krwinki ostatecznie nie reagują na ich stężenie [65]. Jeśli odpowiedź zapalna trwa zbyt długo, może przejść w stan zapalny przewlekły, charakteryzujący się obecnością limfocytów i makrofagów o nieprawidłowej morfologii, które stale wydzielają czynniki wzrostu i cytokiny. Ciągła produkcja mediatorów zapalnych może prowadzić do uszkodzenia tkanek oraz DNA i tym samym sprzyja powstawaniu mikrośrodowiska, które promuje proliferację komórek i predysponuje do rozwoju nowotworów [66].

1.3.1. Niesteroidowe leki przeciwzapalne

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) są najczęściej stosowaną grupą farmaceutyków na całym świecie i powszechnie znane ze swojego działania przeciwzapalnego, które wynika z hamowania syntezy prostaglandyn poprzez blokowanie enzymu cyklooksygenazy (COX) [67]. W literaturze naukowej opisano wiele przypadków korzystnego wpływu NLPZ w profilaktyce chorób nowotworowych, między innymi w nowotworach jelita grubego [68–73], wątroby [74,75], trzustki [76,77], jajnika [78–80], piersi [81–83], prostaty [84–86], tarczycy [87], skóry [88], głowy i szyi [89]. Dobrze udokumentowane działanie przeciwzapalne NLPZ sprawia, że rozważa się je nie tylko jako środki profilaktyczne, ale także potencjalne elementy terapii przeciwnowotworowej [90], co opisano w Tabeli 1. Oprócz redukcji stanu zapalnego, NLPZ mogą wykazywać również inne mechanizmy działania przeciwnowotworowego, takie jak indukcja apoptozy,

⁸ Selektyny – glikoproteiny należące do grupy białek adhezyjnych. Odgrywają rolę w odpowiedziach immunologicznych i zapalnych oraz gojeniu się ran poprzez pośredniczenie w procesie adhezji komórek hematopoetycznych i nowotworowych do komórek śródbłonnki, leukocytów i płytek krwi. Wyróżnia się trzy podrodziny selektyn: leukocytarną (L)-selektynę, płytkową (P)-selektynę i śródbłonkową (E)-selektynę [63].

hamowanie angiogenezy, czy modulacja odpowiedzi immunologicznej. Wśród kluczowych celów molekularnych terapii przeciwnowotworowej z użyciem NLPZ wymienia się COX, NF- κ B, cytokiny i chemokiny wraz z ich receptorami, czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) oraz czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF) [64]. W ostatnich dekadach wykazano nadekspresję COX w wielu typach nowotworów, między innymi w raku trzustki, prostaty, szyjki macicy, piersi, płuc i jelita grubego. Zwiększona aktywność COX wiąże się ze stymulacją angiogenezy, która odgrywa kluczową rolę w procesie tworzenia przerzutów [91]. Hamowanie COX przez NLPZ przyczyniło się do wzrostu ich popularności w kontekście chemioprewencji nowotworów, ze względu na ścisły związek między przewlekłym stanem zapalnym a mikrośrodowiskiem nowotworowym. Enzym COX występuje w dwóch głównych izoformach: COX-1 i COX-2. COX-1 jest konstytutywnie obecny w większości tkanek ssaczych i odpowiada za szereg fizjologicznych procesów, takich jak ochrona błony śluzowej przewodu pokarmowego oraz funkcje płytek krwi. Natomiast COX-2 ulega ekspresji głównie w odpowiedzi na bodźce zapalne w komórkach nabłonkowych, śródbłonkowych i makrofagach [91]. Nadekspresja COX-2 została stwierdzona w nowotworach płuc, piersi, przełyku, pęcherza moczowego, prostaty oraz trzustki. Nie jest ona jedynie skutkiem rozwoju nowotworu, lecz aktywnie przyczynia się do jego progresji oraz oporności na chemioterapię i radioterapię. Dodatkowo, enzym ten może być wydzielany przez CAF, makrofagi typu M2 oraz komórki nowotworowe obecne w mikrośrodowisku nowotworowym [92]. NLPZ, jako inhibitory COX, stanowią obiecującą klasę leków przeciwnowotworowych. Wykazano, że produkty aktywności COX takie, jak prostaglandyna E₂ (PGE₂), biorą udział w rozwoju nowotworów [92]. Nadekspresja PGE₂ została zaobserwowana w wielu rodzajach komórek nowotworowych, w tym także w przypadku nowotworu trzustki, i wiąże się ze stymulacją ich proliferacji [64,92,93]. Zarówno COX-1, jak i COX-2 biorą udział w syntezie prostaglandyn. Produkty COX-1 pełnią funkcje fizjologiczne, natomiast produkty COX-2, takie jak prostaglandyny, uczestniczą w procesach zapalnych i bólowych [94]. Te różnice funkcjonalne pozwalają zrozumieć zróżnicowane działanie terapeutyczne i występowanie działań niepożądanych poszczególnych NLPZ.

Lek	Efekt	Odniesienie
Kwas acetylosalicylowy	Aktywacja szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B w komórkach raka jelita grubego	[95]
	Aktywacja szlaków apoptotycznych w komórkach neuroblastomy poprzez hamowanie funkcji proteasomu	[96]
	Aktywacja szlaków sygnalizacyjnych kaspazy8/Bid oraz Bax w raku żołądka	[97]
	Działanie profilaktyczne w przypadku raka pęcherza moczowego, raka piersi, jelita grubego, przełyku, płuc	[69,71,72,98–101]
Kolekoksylb	Działanie profilaktyczne oraz aktywacja szlaków apoptotycznych w przypadku raka pęcherza moczowego, piersi, szyjki macicy, jelita grubego, płuc, w neuroblastomie, raku prostaty	[102–110]
Deksametazon	Indukowana śmierć komórek w szpiczaku mnogim pośredniczona przez ekspresję miR-125b	[111]
	Działanie profilaktyczne w przypadku raka piersi, odbytnicy, szpiczaka mnogiego	[112–114]
Flurbiprofen	Zahamowanie proliferacji komórek nowotworu tarczycy, jelita grubego, piersi	[87,115–117]
Ibuprofen	Zahamowana aktywacja jądrowej β -kateniny w ludzkich gruczolakach jelita grubego	[118]
	Działanie profilaktyczne w przypadku raka piersi, jelita grubego, nowotworu trzustki	[73,77,98]
Piroksykam	Działanie profilaktyczne oraz proapoptotyczne w przypadku raka jelita grubego i piersi	[119–121]
Sulindac	Indukowana aktywacja szlaku NF- κ B w komórkach raka jelita grubego	[122]
	Działanie profilaktyczne w przypadku raka piersi	[123,124]

Tabela 1. *Działanie profilaktyczne i przeciwnowotworowe wybranych leków przeciwzapalnych.* Opracowanie własne na podstawie [64,125].

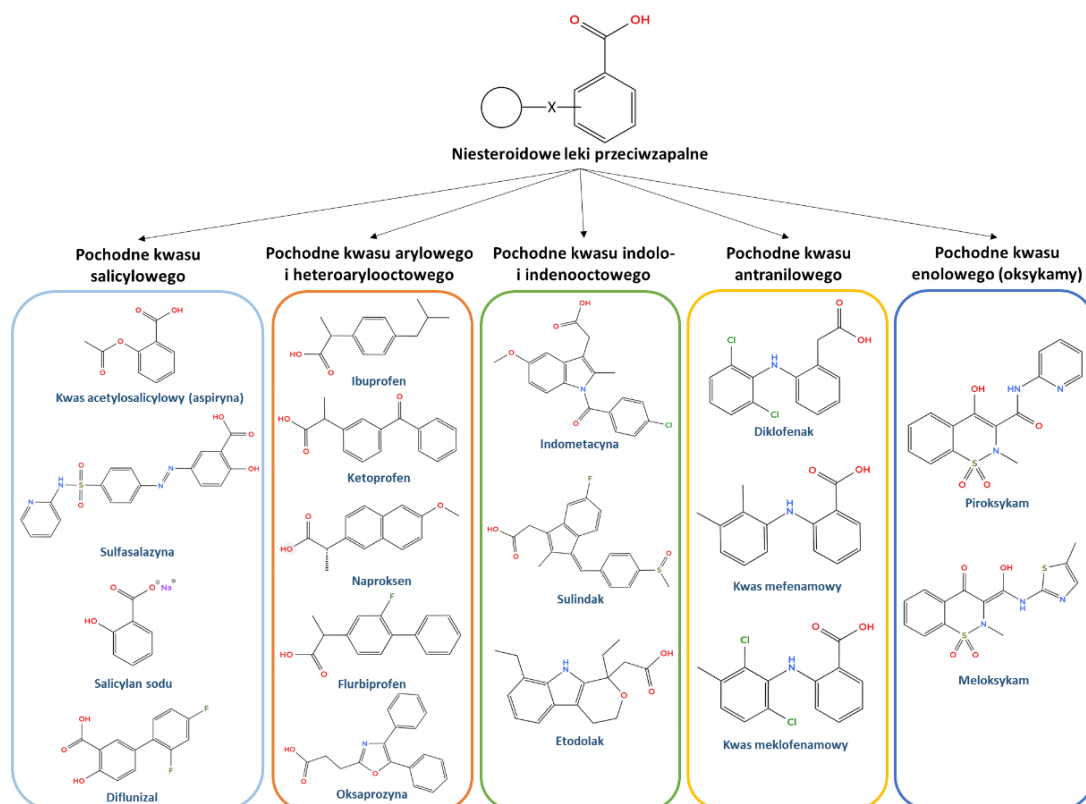
1.3.2. Klasyfikacja niesteroidowych leków przeciwzapalnych

NLPZ obejmują dużą klasę leków o ogromnej różnorodności strukturalnej i funkcjonalnej. Są to głównie słabe kwasy organiczne (składające się z fragmentu kwasowego wraz z aromatyczną grupą funkcyjną). NLPZ porządkowano na podstawie ich właściwości chemicznych, przy czym większość popularnych NLPZ klasyfikowano głównie jako pochodne kwasu salicylowego, kwasu octowego, kwasu enolowego, kwasu antranilowego lub kwasu propionowego. Jednak wraz z postępem nauki, klasyfikacja została rozszerzona o zdolność i selektywność NLPZ do inhibicji enzymów cyklooksygenazy/syntazy prostaglandyn-endoperoksydu (ang. *prostaglandin-*

endoperoxide synthase, PGHS), które są głównymi celami biologicznymi tych leków. Z kolei trzecia forma klasyfikacji bierze pod uwagę biodostępność NLPZ w surowicy, co odpowiada farmakokinetycznym aspektom działania NLPZ [126].

Na podstawie struktury chemicznej NLPZ można podzielić na salicylany, pochodne kwasu aryloowego i heteroarylooctowego, pochodne kwasu indolo- oraz indenooctowego, antranilany i oksykamy (kwasy enolowe) (Rysunek 3.) [127]. Ogólna struktura NLPZ składa się z fragmentu kwasowego (kwas karboksylowy, enol) przyłączonego do aromatycznej grupy funkcyjnej. Salicylany były pierwszymi zidentyfikowanymi NLPZ po ekstrakcji kwasu salicylowego z kory wierzby i są to pochodne kwasu 2-hydroksybenzoesowego (kwasu salicylowego) [128]. Początkowo kwas salicylowy był stosowany w medycynie w postaci soli sodowej; później związek ten został zastąpiony przez jego acetylowaną pochodną – kwas acetylosalicylowy. Po salicylanach, pochodne kwasu octowego, aryloowego lub heteroaryloowego stanowią kolejną ważną klasę NLPZ. Ibuprofen, fenoprofen, naproksen, ketoprofen, flurbiprofen i oksaprozyna to najpopularniejsze przykłady pochodnych kwasu octowego, aryloowego lub heteroaryloowego. Kolejną grupę stanowią pochodne kwasu indolowego lub indenooctowego, która obejmuje środki przeciwbólowe, takie jak indometacynę i sulindak. Następnie, antranilany, które są pochodnymi kwasu antranilowego podstawionymi grupą N-arylową. Diklofenak, pochodna kwasu 2-arylooctowego, jest najszerzej stosowanym antranilanowym NLPZ występującym w różnych formułacjach, w tym tabletkach przeciwbólowych, zastrzykach, maściach miejscowych i szybko działających sprayach. Do klasy tej zaliczamy także kwas mefenaminowy i meklofenamowy. Oksykamy, w skład których wchodzi głównie piroksykam oraz meloksykam, stanowią ostatnią strukturalną kategorię NLPZ, i charakteryzują się obecnością heterocyklu 4-hydroksybenzotiazyny. Oprócz klasyfikacji strukturalnej, NLPZ zostały również sklasyfikowane na podstawie ich aktywności hamującej specyficznej dla PGHS, a także okresu półtrwania w surowicy [126].

NLPZ można także klasyfikować m.in. na podstawie kinetyki ich oddziaływania z izoformami COX: odwracalne (np. ibuprofen, piroksykam), wolno odwracalne (np. diklofenak, indometacyna, celekoksyb) oraz nieodwracalne (np. kwas acetylosalicylowy). Innym kryterium klasyfikacyjnym jest ich selektywność względem COX-1 lub COX-2 *in vitro* (Tabela 2.) [129].



Rysunek 3. *Klasyfikacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych ze względu na ich strukturę.*
Opracowanie własne na podstawie [126].

Selektywność względem COX-1/COX-2	Niesteroidowy lek przeciwzapalny
Selektywne inhibitory COX-1	Kwas acetylosalicylowy w niskich dawkach
Nieselektywne inhibitory COX	Kwas acetylosalicylowy w wysokich dawkach
	Diklofenak
	Ibuprofen
	Ketoprofen
	Flurbiprofen
	Indometacyna
	Piroksykam
Niskoselektywne inhibitory COX-2	Naproksen
	Nimesulid
	Etodolak
	Meloksykam
Selektywne inhibitory COX-2	Nabumeton
	Celekoksyb
	Etorkoksyb

Tabela 2. *Klasyfikacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych ze względu na ich selektywność względem COX-1 i COX-2.* Opracowanie własne na podstawie [126].

1.4. *Kombinacja gemcytabiny i NLPZ w leczeniu nowotworów*

Działanie prewencyjne i terapeutyczne NLPZ, jak wspomniano wcześniej, zostało przebadane w różnych rodzajach nowotworów. Oprócz dobrze znanych właściwości przeciwzapalnych, NLPZ wykazują również działanie przeciwnowotworowe, obejmujące m.in. zdolność do indukowania apoptozy, hamowania angiogenezy oraz wzmacniania odpowiedzi immunologicznej. W praktyce, najczęstszymi celami terapeutycznymi w leczeniu stanów zapalnych są enzymy cyklooksygenazy, czynnik transkrypcyjny NF- κ B, cytokiny i chemokiny, czynniki wzrostu fibroblastów oraz naczyniowo-śródbłonkowe czynniki wzrostu [64,91–93,125,129]. Należy podkreślić, że nadekspresję COX odnotowano w wielu rodzajach nowotworów, takich jak nowotwór trzustki, prostaty, szyjki macicy, piersi, płuc oraz jelita grubego. Co istotne, nadekspresja COX pobudza angiogenezę, która jest kluczowym procesem sprzyjającym powstawaniu przerzutów [91]. Kombinacja gemcytabiny i NLPZ w terapii skojarzonej jest obecnie intensywnie badana jako potencjalna strategia zwiększająca skuteczność leczenia nowotworów. Połączenie tych leków może nasilić cytotoksyczne działanie gemcytabiny poprzez redukcję towarzyszącego nowotworowi stanu zapalnego. Takie podejście terapeutyczne może stanowić atrakcyjną alternatywę dla klasycznej monoterapii przeciwnowotworowej.

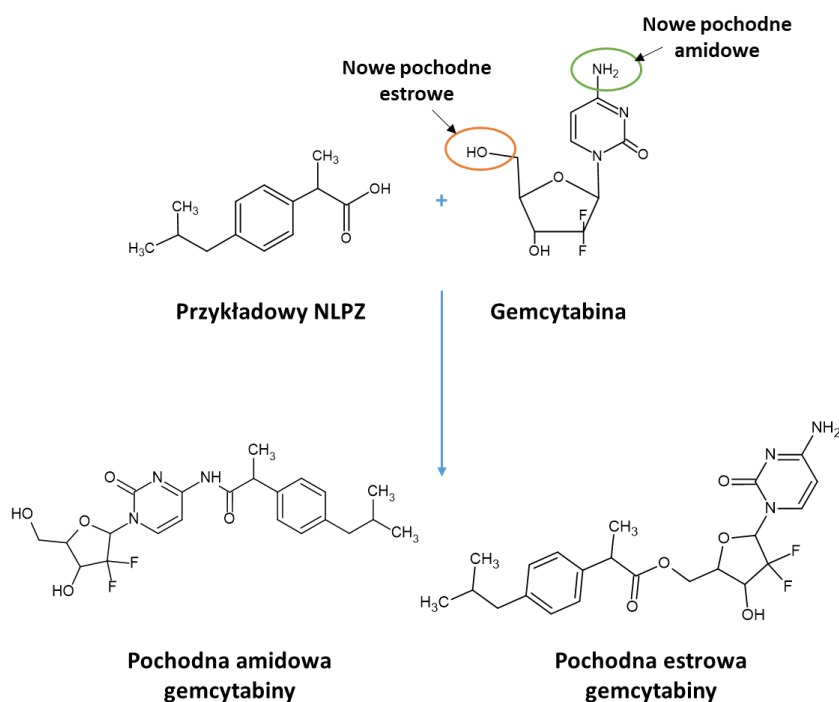
Zakłada się również, że połączenie NLPZ i gemcytabiny może wywoływać efekt synergistyczny, co przekłada się na poprawę ogólnej skuteczności terapii. Warto zauważyć, że kwas acetylosalicylowy hamuje proliferację komórek nowotworowych trzustki opornych na gemcytabinę oraz zwiększa cytotoksyczność samej gemcytabiny. Udowodniono, że samodzielnie stosowany kwas acetylosalicylowy istotnie hamuje wzrost komórek nowotworowych trzustki linii PANC-1, powodując zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [130]. Ponadto wykazano, że zastosowanie go w połączeniu z gemcytabiną zwiększało działanie przeciwnowotworowe oraz efekt proapoptotyczny wobec tych komórek. Sam kwas acetylosalicylowy nie indukuje apoptozy, jednak hamuje aktywację szlaku sygnalizacyjnego GSK-3 β i ekspresję jego docelowych genów (m.in. cykliny D1 i Bcl-2), które odpowiadają za proliferację, przeżycie oraz chemiooporność komórek nowotworowych trzustki (efekt ten zaobserwowano również w przypadku linii Capan-1). Wykazano, że niskie dawki aspiryny w połączeniu z gemcytabiną istotnie ograniczają proliferację i migrację komórek, zwiększają apoptozę, ekspresję E-kadheryny oraz hamują ekspresję wimentyny w porównaniu do samej gemcytabiny [131]. Porównując

terapię skojarzoną (kwas acetylosalicylowy + gemcytabina) do monoterapii, odnotowano wyraźne obniżenie aktywacji szlaku PI3K/AKT/mTOR w komórkach nowotworowych trzustki linii SW1990 i BxPC-3. Korzystne działanie z gemcytabiną potwierdzono również w połączeniu z celekoksybem w zaawansowanych badaniach przedklinicznych oraz klinicznych, wskazujących na skuteczność terapii wielolekowej [125,132–134].

Nowatorską koncepcją jest także bezpośrednie łączenie gemcytabiny z flurbiprofenem. Wpływ flurbiprofenu na komórki nowotworowe opisano w pracach, gdzie stosowano go w leczeniu raka tarczycy [87], jelita grubego [115], a także raka piersi [135,136]. W 2024 roku, Cerviño i in. zbadali skuteczność przeciwnowotworową szesnastu NLPZ i ich zdolność do hamowania transportu cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu (ang. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) przez transporter białkowy MRP4 (ang. *multidrug resistance-associated protein 4*) w dwóch liniach komórkowych nowotworu trzustki BxPC3 oraz PANC-1 [116]. Wyniki ich badań potwierdzają, że flurbiprofen wykazuje najsilniejsze działanie antyproliferacyjne i antymigracyjne wśród analizowanych NLPZ. Co więcej, opisano również zjawisko uwrażliwienia komórek raka trzustki na działanie gemcytabiny pod wpływem flurbiprofenu. Wykazano także, że leczenie ketorolakiem, diklofenakiem, fenylobutazonem, indometacyną, karprofenem, ibuprofenem i flurbiprofenem w stężeniu 100 μ M znacząco zmniejszyło pozakomórkowe poziomy cAMP, jednocześnie zwiększając wewnątrzkomórkowe poziomy cAMP. Natomiast flurbiprofen został opisany jako najsilniejszy inhibitor cAMP w komórkach nowotworowych trzustki, co prowadziło do zahamowania proliferacji, migracji oraz uwrażliwienia komórek na leczenie gemcytabiną.

1.5. Metody syntezy 4-(N)- oraz C-5'-podstawionych pochodnych gemcytabiny

Modyfikacja struktury chemicznej gemcytabiny zakłada wprowadzenie do jej struktury chemicznej znanych pochodnych profenowych w pozycji (N)-4 oraz C-5' cząsteczki uzyskując nowe pochodne estrowych i amidowe. Koncepcja ta zrodziła się w oparciu o warunki panujące w środowisku nowotworowym, które jest powiązane z powstawaniem przewlekłego stanu zapalnego oraz nadekspresją receptorów COX-2. Połączenie właściwości przeciwnowotworowych gemcytabiny z aktywnością przeciwzapalną NLPZ może skutkować jednoczesnym oddziaływaniem proleku na kilka kluczowych mechanizmów wspierających rozwój nowotworu takich, jak proliferacja, angiogeneza, oporność na apoptozę oraz immunosupresja. Co więcej, ze względu na dolegliwości bólowe, które często pojawiają się u pacjentów jako skutki uboczne terapii, a także proces zapalny zachodzący w trakcie choroby, użyteczne byłoby wprowadzenie leku przeciwzapalnego i przeciwbólowego razem ze środkiem chemioterapeutycznym. Tak więc wybrano profeny jako grupę NLPZ przeznaczoną do funkcjonalizacji gemcytabiny.

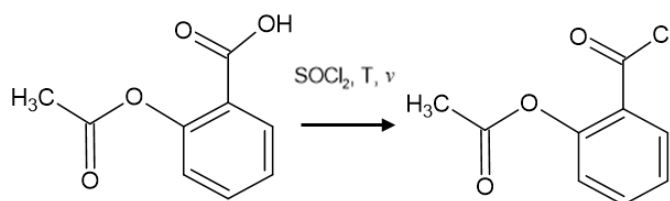


Rysunek 4. Schemat modyfikacji gemcytabiny z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi. Opracowanie własne.

Synteza koniugatów NLPZ i gemcytabiny stanowi obiecującą strategię rozwoju nowych związków o potencjalnie synergistycznym działaniu terapeutycznym. Połączenie właściwości cytotoksycznych gemcytabiny z działaniem przeciwzapalnym i proapoptotycznym niektórych NLPZ może prowadzić do powstania cząsteczek o zwiększonej selektywności względem komórek nowotworowych, obniżonej toksyczności systemowej oraz zdolności do przewyżniania mechanizmów oporności nowotworów.

1.5.1. Synteza 4-(N)-podstawionych pochodnych gemcytabiny

Jedną z najprostszych i najczęściej stosowanych metod syntezy amidów jest wykorzystanie chlorków kwasowych jako aktywnych pochodnych kwasów karboksylowych. Chlorki kwasowe to związki, w których grupa hydroksylowa została zastąpiona przez atom chloru. Dzięki swojej wysokiej reaktywności są powszechnie wykorzystywane w reakcjach sprzęgania. Jednym ze sposobów otrzymywania chlorku kwasowego jest reakcja NLPZ z chlorkiem tionylu (SOCl_2), która pozwala na aktywację grupy karboksylowej bez znaczącej degradacji cząsteczki macierzystej (Rysunek 5.).



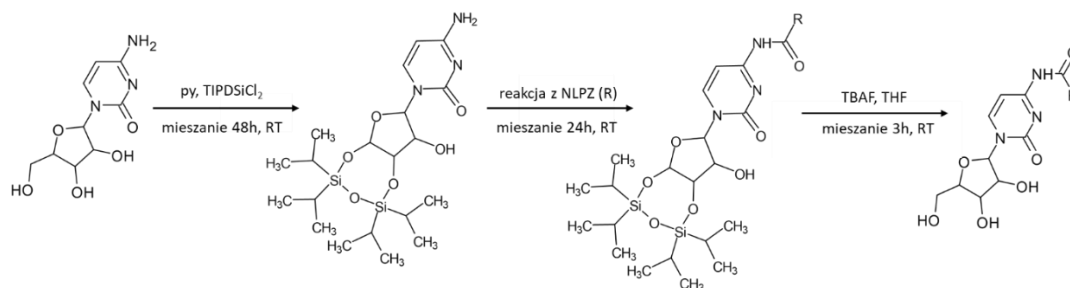
Rysunek 5. *Synteza chlorku kwasowego kwasu acetylosalicylowego za pomocą chlorku tionylu.* Opracowanie własne.

Chlorki kwasowe mogą reagować zarówno z grupami hydroksylowymi, jak i aminowymi. W związku z tym, podczas syntezy amidów z gemcytabiną konieczne jest wcześniejsze zabezpieczenie grup hydroksylowych obecnych w jej strukturze, zwłaszcza tych w pozycji C-5'- oraz C-3-cukrowej reszty deoksyrybozy. Ich obecność może prowadzić do niepożądanych reakcji ubocznych, które utrudniają uzyskanie selektywnych pochodnych amidowych 4-(N) gemcytabiny.

1.5.2. Metody zabezpieczenia grup hydroksylowych gemcytabiny

W celu zabezpieczenia grup hydroksylowych stosuje się różnorodne grupy ochronne, które mogą być selektywnie wprowadzane i usuwane w odpowiednich

warunkach reakcyjnych. Do najczęściej wykorzystywanych należą: tert-butyldimetylosilil (TBS), trimetylosilil (TMS), grupa metylowa (Me), benzyłowa (Bn) oraz acetylowa (Ac). Wybór odpowiedniej grupy zabezpieczającej zależy od wielu czynników, takich jak kompatybilność chemiczna z innymi funkcjonalnościami w cząsteczce, łatwość jej wprowadzenia i usuwania, a także stabilność w warunkach reakcyjnych. W przypadku gemcytabiny, która posiada dwie sąsiadujące grupy hydroksylowe, szczególnie efektywną strategią ochrony jest zastosowanie chlorku 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanu (TIPDSiCl₂). Reagent ten umożliwia jednocześnie, selektywne zabezpieczenie obu grup hydroksylowych w pozycjach 3'- i 5', tworząc stabilny układ cykliczny z resztą cukrową nukleozydu (Rysunek 6.) [137]. Dzięki temu możliwa jest dalsza modyfikacja w pozycji 4-(N), bez ryzyka niepożądanych reakcji z grupami hydroksylowymi. Zastosowanie tej strategii pozwala na precyzyjne prowadzenie wieloetapowej syntezy koniugatów NLPZ–gemcytabina, co ma kluczowe znaczenie dla uzyskania strukturalnie zdefiniowanych i farmakologicznie aktywnych związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworowej [138].



Rysunek 6. **Synteza 4-(N)-podstawionej pochodnej gemcytabiny z NLPZ z zastosowaniem TIPDSiCl₂ jako grupy zabezpieczającej grupy hydroksylowe przy 3-C' oraz 5-C'.** Opracowanie własne na podstawie [138].

1.5.3. Zastosowanie środków sieciujących

Środki koniugujące o zerowej długości łańcucha (ang. *zero-length crosslinkers*) to związki chemiczne umożliwiające bezpośrednie tworzenie kowalencyjnych wiązań między dwiema (lub więcej) cząsteczkami, bez wprowadzania dodatkowego łącznika pomiędzy nimi. Działają one poprzez aktywację jednej z grup funkcyjnych – najczęściej karboksylowej lub aminowej – w celu wytworzenia wysoko reaktywnego pośrednika, który następnie reaguje z drugą grupą funkcyjną, prowadząc do powstania stabilnego wiązania kowalencyjnego (np. amidowego lub estrowego) [139]. Środki te nie wprowadzają żadnych dodatkowych atomów pomiędzy sprzęgane cząsteczki, stąd określane są jako środki

o „zerowej długości”. W niektórych przypadkach mogą być również wykorzystywane jako katalizatory lub odczynniki transformujące stabilizujące pośrednie, nietrwałe kompleksy reaktywne. Strategie sprzęgania są szeroko wykorzystywane w chemii organicznej, chemii leków i inżynierii białek, szczególnie w syntezie biokoniugatów, np. w celu połączenia leków z nośnikami, przeciwciałami, peptydami lub powierzchniami biomateriałów [140].

Przykładowe środki koniugujące o zerowej długości to:

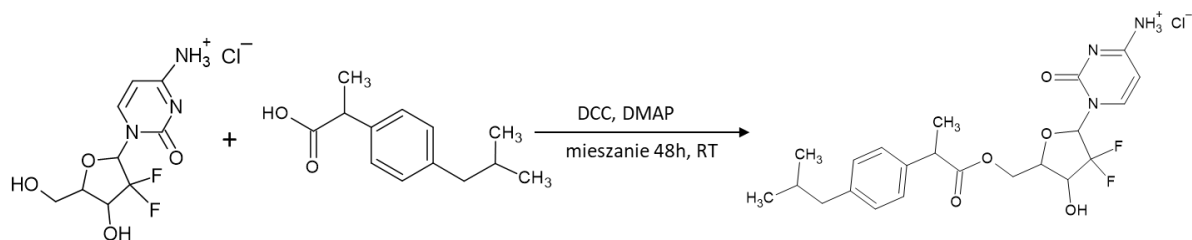
- DCC (N,N'-dicykloheksylokarbodiimid) – klasyczny odczynnik do tworzenia wiązań amidowych i estrowych,
- EDC (1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid) – rozpuszczalny w wodzie, często stosowany z HOBt lub NHS,
- CDI (karbonyldiimidazol) – umożliwia tworzenie aktywowanych pochodnych karboksylowych (np. acylimidazoli),
- NHS (N-hydroksysukcynimid) i jego pochodne – stabilizują pośrednie estry, poprawiając wydajność reakcji amidacji,
- HOBt (1-hydroksybenzotriazol) – często stosowany jako dodatek zapobiegający epimeryzacji i zwiększający reaktywność.

Zastosowanie środków sieciujących o zerowej długości pozwala na uzyskanie stabilnych produktów koniugacji bez obecności zbędnych grup łączących, co jest szczególnie istotne w projektowaniu cząsteczek bioaktywnych o precyzyjnie kontrolowanej strukturze (Tabela 3.).

1.5.4. Synteza C-5'- podstawionych pochodnych gemcytabiny

1.5.4.1. Zastosowanie DCC jako środka sprzęgającego

W literaturze opisano jak dotąd jeden przykład syntezy koniugatów gemcytabiny z NLPZ, obejmujący pochodne diklofenaku oraz indometacyny [141]. Autorzy tej pracy zaproponowali zastosowanie reakcji estryfikacji Steglicha, wykorzystującej sprzęganie karbodiimidowe jako efektywną metodę tworzenia wiązania estrowego między grupą hydroksylową gemcytabiny a aktywowaną grupą karboksylową NLPZ. W procesie tym zastosowano dicykloheksylokarbodiimid (DCC) jako środek sprzęgający oraz 4-dimetyloaminopirydynę (DMAP) jako katalizator nukleofilowy (Rysunek 7.).



Rysunek 7. *Synteza 5-C'-podstawionej pochodnej gemcytabiny z przykładowym NLPZ (ibuprofenem) w reakcji Steglicha.* Opracowanie własne na podstawie [141].

Estryfikacja Steglicha, mimo że często stosowana w chemii peptydów i syntezie estrów, wymaga odpowiedniego ukierunkowania reaktywności grup funkcyjnych obecnych w reagujących cząsteczkach. W tym przypadku kluczowe jest zmniejszenie reaktywności nukleofilowej grupy aminowej gemcytabiny, która w naturalnych warunkach preferencyjnie reaguje z aktywowanymi grupami karboksylowymi, prowadząc do tworzenia wiązań amidowych. Aby temu zapobiec, wykorzystuje się formę soli – chlorowodorek gemcytabiny, co pozwala na znaczne ograniczenie dostępności grupy aminowej do reakcji chemicznych. W tych warunkach bardziej reaktywną funkcjonalnością staje się grupa hydroksylowa, która może efektywnie reagować z aktywowanym NLPZ, prowadząc do powstania wiązania estrowego. Zgodnie z opisem metody opracowanej przez Shaheeda i in. [141], w pierwszym etapie reakcji przygotowywany jest roztwór NLPZ oraz DCC w chloroformie, mieszany przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (roztwór A). Równolegle przygotowuje się roztwór chlorowodoru gemcytabiny i DMAP w dimetyloformamidzie (DMF, roztwór B). Następnie obydwa roztwory łączy się i prowadzi reakcję przez 48 godzin w temperaturze pokojowej z ciągłym mieszaniem. W wyniku reakcji powstaje ester NLPZ-gemcytabiny, a produktem ubocznym jest nierozpuszczalny w wodzie dicykloheksylomocznik (DCU), który należy usunąć w procesie oczyszczania. Mechanizm reakcji rozpoczyna się od addycji DCC do grupy karboksylowej NLPZ, co prowadzi do utworzenia przejściowego pochodnego *O*-acyloizomocznika. Związek ten jest wysoce reaktywny i ulega dalszej transformacji w obecności DMAP, który działa jako katalizator nukleofilowy. DMAP promuje powstawanie acylowanych związków pośrednich i ułatwia transfer grupy acylowej na grupę hydroksylową gemcytabiny, prowadząc do powstania wiązania estrowego. Warto zauważyć, że niepożądanym, konkurencyjnym procesem jest spontaniczne przegrupowanie *O*-acyloizomocznika do nieaktywnego *N*-acyloizomocznika, co obniża wydajność reakcji.

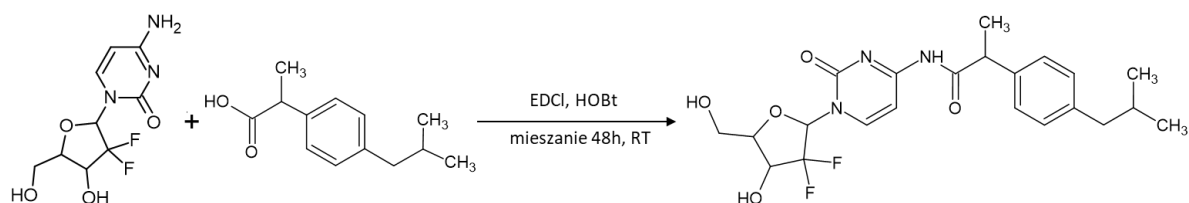
DCC jest jednym z najczęściej wykorzystywanych środków sprzęgających w syntezie organicznej, szczególnie w reakcjach estryfikacji i amidacji. Jego zaletą jest wysoka skuteczność aktywacji grup karboksylowych, natomiast wadą powstawanie trudno rozpuszczalnego produktu ubocznego (DCU), który musi zostać dokładnie oddzielony od produktu końcowego. W opisanym metodzie Shaheeda i in. uzyskano produkty z wydajnością w zakresie 58–61%, co stanowi dobry punkt wyjścia do dalszych modyfikacji tej strategii syntezy w przypadku innych NLPZ oraz ich pochodnych.

1.5.4.2. Zastosowanie EDC jako środka sprzęgającego

Inną potencjalnie efektywną metodą syntezy koniugatów gemcytabiny z NLPZ jest wykorzystanie chlorowodoru 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC·HCl, EDCI) jako środka sprzęgającego (Rysunek 8.) [58]. EDC to najczęściej stosowany karbodiimid w chemii biomolekularnej, ze względu na swoją wysoką skuteczność w aktywacji grup karboksylowych i dobrą kompatybilność z wodnym oraz organicznym środowiskiem reakcji. EDC, w odróżnieniu od DCC, tworzy produkt uboczny – N,N'-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)ureę (EDU) – który jest rozpuszczalny w wodzie, co znacznie ułatwia oczyszczanie produktu końcowego (np. poprzez dializę, ekstrakcję lub filtrację żelową). W reakcji sprzęgania EDC reaguje z grupą karboksylową NLPZ, tworząc aktywny pośredni kompleks O-acylomocznika, który może zostać zaatakowany przez nukleofil, np. grupę hydroksylową gemcytabiny, prowadząc do utworzenia wiązania estrowego. Reakcję można również ukierunkować w stronę amidacji, jeżeli grupy aminowe są dostępne. Aby zwiększyć efektywność i selektywność reakcji sprzęgania, do układu reakcyjnego często dodaje się aktywatory karboksylowe, takie jak 1-hydroksybenzotriazol (HOBt) lub N-hydroksysukcynimid (HOSu). Działają one jako dodatki stabilizujące, tworząc bardziej reaktywne i dłużej żyjące pośrednie estry aktywowane (np. estry HOBt), co ogranicza ryzyko epimeryzacji i przekształceń niepożądanych zachodzących podczas reakcji z udziałem karbodiimidów. Dodatkowo, obecność HOBt lub HOSu poprawia rozpuszczalność substratów, zwiększa wydajność sprzęgania oraz ogranicza powstawanie produktów ubocznych.

Zaletą metody z wykorzystaniem EDC jest jej duża wszechstronność i łagodne warunki reakcji, co czyni ją szczególnie atrakcyjną w przypadku cząsteczek wrażliwych na temperaturę lub silne odczynniki chemiczne (np. nukleozydy). W kontekście syntezy

koniugatów gemcytabiny z NLPZ, zastosowanie gemcytabiny w formie chlorowodoru pozwala na zablokowanie reaktywności grupy aminowej, co kieruje reakcję w stronę preferowanej estryfikacji z udziałem grupy hydroksylowej. To podejście może prowadzić do uzyskania selektywnych pochodnych estrowych, o potencjalnie zmodyfikowanych właściwościach farmakokinetycznych i biologicznych.



Rysunek 8. Synteza 4-(N)-podstawionej pochodnej gemcytabiny z przykładowym NLPZ (ibuprofenem) przy użyciu środka sprzęgającego EDCI oraz HOBT jako katalizatora reakcji. Opracowanie własne na podstawie [58].

2.5.4.3. Zastosowanie CDI jako środka sprzęgającego

Kolejną metodą otrzymywania koniugatów gemcytabiny z NLPZ, umożliwiającą uniknięcie powstawania trudno usuwalnych produktów ubocznych, jest zastosowanie karbonyldiimidazolu (CDI) jako środka aktywującego grupy karboksylowe [142]. CDI jest związkiem szeroko stosowanym w syntezie organicznej, szczególnie w reakcjach amidacji i estryfikacji, dzięki swojej wysokiej reaktywności wobec nukleofilów oraz korzystnemu profilowi czystości reakcji. W pierwszym etapie mechanizmu CDI reaguje z grupą karboksylową NLPZ, prowadząc do powstania reaktywnego pośredniego acylimidazolu, który następnie może reagować z odpowiednią grupą nukleofilową. W przeciwieństwie do metod opartych na DCC, reakcja nie generuje nierozpuszczalnych osadów, a produktem ubocznym jest imidazol. Sprzęganie z użyciem CDI wymaga zachowania bezwodnych warunków reakcji – CDI jest wrażliwy na obecność wody, która może prowadzić do jego hydrolizy i dezaktywacji. Dlatego reakcje z jego udziałem najczęściej prowadzi się w bezwodnych rozpuszczalnikach.

Metoda ta jest szczególnie przydatna w przypadkach, gdy zależy nam na uniknięciu powstawania uciążliwych produktów ubocznych, a także wtedy, gdy stosuje się wrażliwe substraty, takie jak nukleozydy i ich pochodne. CDI może również reagować z wolnymi grupami aminowymi, dlatego (podobnie jak w przypadku DCC) pożądane jest

zabezpieczenie grupy aminowej gemcytabiny (np. przez użycie chlorowodoru), aby promować reakcję estryfikacji zamiast amidacji. Metoda sprzęgania z CDI stanowi efektywną alternatywę dla klasycznego sprzęgania z użyciem DCC lub EDC, zwłaszcza w przypadku trudnych do oczyszczenia produktów lub wtedy, gdy wymagane są warunki bezwodne i wysoka czystość produktu końcowego.

Metoda	Środek aktywujący	Katalizator	Produkt uboczny
Synteza Steglich	DCC	DMAP	DCU
EDC	EDC·HCl	DMAP lub HOBt	EDU
CDI	CDI	–	Imidazol

Tabela 3. *Wybrane środki sprzęgające i ich katalizatory oraz produkty uboczne.* Opracowanie własne.

1.6. Komórki macierzyste

Komórki macierzyste to niewyspecjalizowane komórki pierwotne, które charakteryzują się zdolnością do samoodnowy oraz różnicowania w jeden lub więcej typów komórek dojrzałych. U ssaków można wyróżnić dwa typy komórek macierzystych: embrionalne i dorosłe. Embrionalne komórki macierzyste pozyskiwane są z wewnętrznej masy blastocysty na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego. Wykazują one zdolność różnicowania się we wszystkie typy komórek wywodzące się z trzech listków zarodkowych: ektodermy, endodermy i mezodermy. Z kolei dorosłe komórki macierzyste występują we w pełni rozwiniętych tkankach i pełnią głównie funkcje regeneracyjne, uczestnicząc w odnowie komórek krwi, skóry oraz nabłonka jelitowego [143]. Ze względu na zakres potencjału różnicowania, komórki macierzyste dzieli się na:

- totipotencjalne – zdolne do przekształcania się we wszystkie typy komórek organizmu, w tym również komórki łożyska; powstają w wyniku zapłodnienia komórki jajowej i występują we wczesnych podziałach zygoty,
- pluripotencjalne – pochodzące od komórek totipotencjalnych, zdolne do różnicowania we wszystkie komórki organizmu z wyjątkiem komórek łożyskowych,
- multipotencjalne – mogą różnicować się w wiele typów komórek w obrębie jednej linii rozwojowej,
- unipotencjalne – dają początek tylko jednemu typowi komórek, lecz zachowują zdolność do samoodnowy, co odróżnia je od komórek progenitorowych⁹.

Wybór odpowiedniego rodzaju komórek macierzystych do badań lub terapii zależy od takich czynników, jak ich dostępność, potencjał proliferacyjny, zdolność do różnicowania oraz kwestie etyczne. Biorąc pod uwagę te kryteria, jednymi z najczęściej wykorzystywanych w badaniach i zastosowaniach klinicznych są mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *mesenchymal stem cells*, MSC) [145].

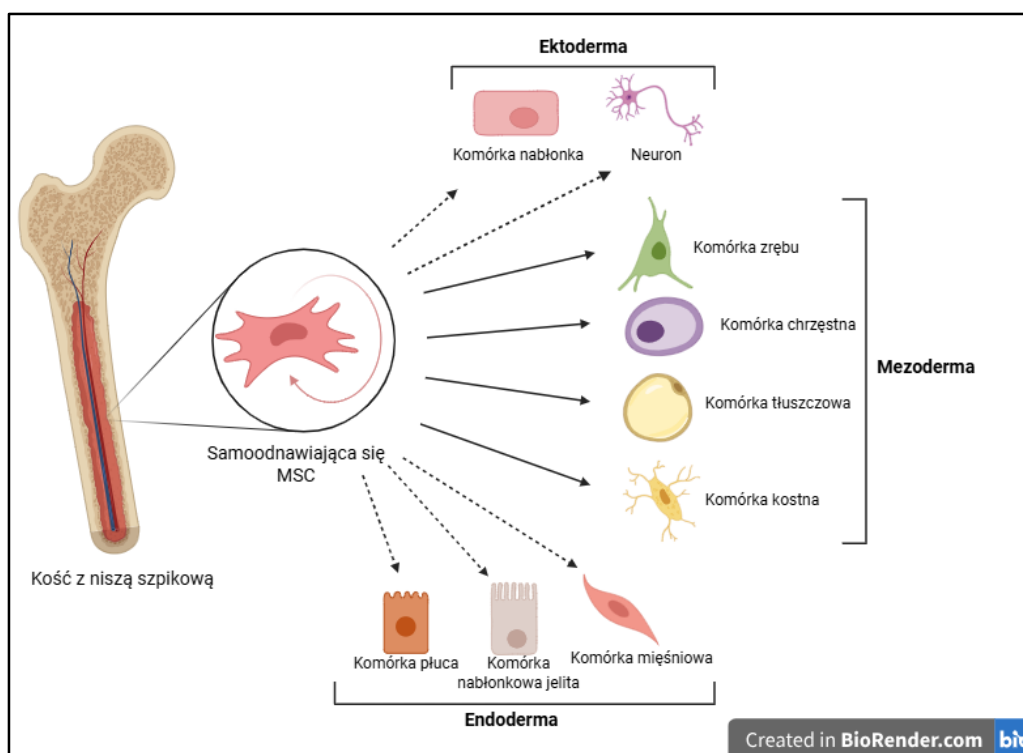
⁹ Komórki progenitorowe (prekursorowe) - to wyspecjalizowane komórki macierzyste o ograniczonym potencjale różnicowania, wykazujące swoistość tkankową. U dorosłych organizmów pełnią rolę w regeneracji narządów, różnicując się wyłącznie w jeden określony typ komórek somatycznych [144].

1.6.1. Mezenchymalne komórki macierzyste

Niehematopoetyczne komórki macierzyste w szpiku kostnym zostały odkryte po raz pierwszy ponad 130 lat temu przez niemieckiego patologa Juliusa Cohnheima, który zauważył, że szpik może być źródłem fibroblastów uczestniczących w gojeniu ran [146]. Na przełomie lat 60. i 70. XX wieku, Alexander Friedenstein i in. opisali komórki zdolne do tworzenia kolonii *in vitro* oraz różnicowania w kierunku osteocytów, chondrocytów i adipocytów (Rysunek 9.). Komórki te, nazwane CFU-F (ang. *colony forming unit-fibroblastoid*), wykazywały adherentność i morfologię fibroblastopodobną [147]. MSC ze szpiku kostnego stanowią rzadką, heterogenną populację, zawierającą m.in. progenitory mezodermalne i nieliczne komórki o cechach samoodnawiania [148]. Pierwotnie uważano, że są one jedynie komórkami zrębu szpiku wspomagającymi hematopoezę (ang. *mesenchymal stromal cells*), a nie właściwymi komórkami macierzystym. Z czasem jednak, ze względu na ich zdolność do różnicowania i ograniczoną samoodnowę, zaczęto określać je jako mezenchymalne komórki macierzyste [149,150]. W odpowiedzi na rosnącą niejednoznaczność terminologiczną, Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (ISCT) w latach 2005–2006 zaproponowało, aby zamiast określenia „stem” stosować termin „stromal”, wskazując na rolę tych komórek w mikrośrodkowisku tkankowym [151]. W rzeczywistości, określenia te stosowane są w literaturze wymiennie. Jednocześnie ustalono kryteria definiujące MSC:

- zdolność do adherencji i proliferacji w warunkach *in vitro*,
- ekspresja antygenów powierzchniowych CD73+, CD90+, CD105+ oraz brak markerów hematopoetycznych (CD14-, CD34-, CD45-, CD11b-, CD19-, CD79α),
- potencjał różnicowania w komórki tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej [152,153].

W ostatnich latach badania potwierdziły obecność MSC nie tylko w szpiku (ang. *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BM-MSC), ale także w tkance tłuszczowej (ang. *adipose-derived stem cells*, ADSC), pępowinie, łożysku, miazdze zębowej i innych tkankach, co poszerzyło ich zastosowanie w inżynierii tkankowej, terapii chorób zapalnych oraz immunomodulacji [154].



Rysunek 9. **Multipotencjalność MSC.** MSC pochodzące ze szpiku kostnego wykazują zdolność do samoodnawiania się (zakrzywiona strzałka) oraz różnicowania w komórki wywodzące się z linii mezodermalnych, takich jak osteocyty, chondrocyty oraz adipocyty (ciągłe strzałki proste). Liczne badania *in vitro* potwierdzają również ich zdolność do różnicowania się w kierunku linii ektodermalnych i endodermalnych (przerwane strzałki), jednak zakres tego potencjału w warunkach *in vivo* pozostaje przedmiotem dyskusji. Opracowanie własne na podstawie [148]. Rysunek utworzono w programie www.biorender.com.

1.6.2. Fenotyp mezenchymalnych komórek macierzystych

Kluczowym aspektem w identyfikacji i izolacji MSC jest profil antygenów powierzchniowych, który pozwala na odróżnienie ich od innych populacji komórkowych obecnych w mikrośrodkowisku szpiku kostnego takich, jak hematopoetyczne komórki macierzyste (ang. *hematopoietic stem cells*, HSC), komórki śródbłonna oraz progenitorowe komórki krwiotwórcze. Jak wspomniano, zgodnie z rekomendacjami ISCT, BM-MSK powinny wykazywać ekspresję następujących markerów: CD73+, CD90+, CD105+, CD166+ (ALCAM), CD44+, CD29+ i CD49e+. BM-MSK charakteryzuje również ekspresja CD106 (VCAM-1) – cząsteczki adhezyjnej charakterystycznej dla tej populacji, która nie występuje na MSC pochodzących z innych źródeł, np. tkanki tłuszczowej. CD106 uczestniczy w tworzeniu niszy hematopoetycznej oraz reguluje interakcje z HSC i komórkami układu immunologicznego. Obecność CD106 jest unikalną właściwością

BM-MSc pod względem funkcjonalności hematopoetycznej. Jednocześnie, BM-MSc nie wykazują ekspresji markerów charakterystycznych dla komórek hematopoetycznych, śródbłonkowych oraz linii krwiotwórczych, co stanowi jedno z kluczowych kryteriów ich identyfikacji. Do antygenów negatywnych należą: CD45-, CD34-, CD14-, CD11b-, CD19-, CD79 α -, CD31- (PECAM-1) [155].

Pod względem immunofenotypowym, BM-MSc wykazują ekspresję cząsteczek zgodności tkankowej klasy I (MHC I), przy jednoczesnym braku ekspresji MHC klasy II (HLA-DR) oraz cząsteczek kostymulacyjnych (CD80, CD86). Taki profil fenotypowy warunkuje ich niską immunogenność, co pozwala na stosowanie BM-MSc w terapii allogenicznej bez konieczności pełnej zgodności HLA. Ekspresja MHC I może być jednak modulowana w odpowiedzi na cytokiny prozapalne, takie jak IFN- γ , co może mieć znaczenie w przypadku uszkodzenia tkanek lub toczącego się stanu zapalnego [153,156].

Warto podkreślić, że choć wyżej wymienione markery są charakterystyczne dla populacji BM-MSc, ich ekspresja może ulegać zmianom w zależności od warunków hodowli, wieku dawcy, występowania stanu zapalnego lub ekspozycji na czynniki środowiskowe, co wskazuje na dużą plastyczność fenotypową tych komórek. Coraz więcej badań wskazuje także na obecność dodatkowych markerów funkcjonalnych, takich jak CD271 (receptor czynnika wzrostu nerwów) oraz CD146 (MCAM), które mogą być wykorzystywane do wyodrębnienia podpopulacji BM-MSc o podwyższonej zdolności regeneracyjnej i potencjale terapeutycznym. Namnażanie MSC do celów terapeutycznych przy użyciu różnych metod skutkuje nabywaniem odmiennych właściwości immunomodulacyjnych. W związku z tym, opracowany został zoptymalizowany protokół izolacji MSC, który zapewnia bezpieczeństwo oraz niezmienną właściwość komórek [157,158]. Charakterystykę markerów powierzchniowych obecnych na komórkach ADSC oraz BM-MSc przedstawiono w Tabeli 4.

Marker powierzchniowy	ADSC	BM-MSc	Charakterystyka
CD9	+	+	białko transbłonowe obecne na powierzchni wielu rodzajów komórek odpowiedzialne za zdolność adhezyjną, wydzielanie egzosomów oraz potencjał do migracji w kierunku miejsc uszkodzenia tkanek
CD10	+	+	metaloproteaza błonowa obecna m.in. na komórkach prekursorowych limfocytów B,

			fibroblastach i niektórych komórkach macierzystych, związana z regulacją aktywności peptydów sygnałowych
CD11b	-	-	marker obecny na monocytach, neutrofilach, komórkach NK oraz dendrytycznych
CD13	+	+	marker linii mieloidalnej, enzym powierzchniowy (aminopeptydaza N)
CD14	-	-	antygen mielomonocytów obecny na monocytach, makrofagach i niektórych granulocyty
CD19	-	-	kluczowy marker powierzchniowy limfocytów B
CD29 (integryna $\beta 1$)	+	+	receptor adhezyjny, który wraz z CD49e tworzy heterodimer odpowiadający za wiązanie do fibronektyny, lamininy i kolagenu, co umożliwia przyczepność do macierzy pozakomórkowej oraz regulację sygnalizacji integrynowej
CD31 (PECAM-1)	-	-	marker komórek śródbłónka naczyniowego
CD34	-	-	marker komórek prekursorowych krwiotwórczych i śródbłónka
CD44	+	+	receptor kwasu hialuronowego, uczestniczący w licznych procesach biologicznych, takich jak gojenie ran, migracja, interakcje z ECM oraz odpowiedź zapalna;
CD45	-	-	marker komórek krwiotwórczych, obecny na większości leukocytów, ale niewystępujący na mezenchymalnych komórkach macierzystych, co pozwala je odróżnić od komórek linii hematopoeatycznych
CD49d	+	-	marker obecny na BM-MSC umożliwiający interakcję z CD106 na komórkach śródbłónka, wspiera hematopoezę oraz umożliwia przemieszczanie się do nisz szpikowych
CD49e (integryna $\alpha 5$)	+	+	białko błonowe, które wraz z CD29 tworzą heterodimer odpowiadający za wiązanie do fibronektyny, lamininy i kolagenu, co umożliwia przyczepność do macierzy pozakomórkowej oraz regulację sygnalizacji integrynowej
CD73 (5'-nukleotydaza ektopowa)	+	+	enzym uczestniczący w metabolizmie adenozyiny, regulujący środowiskowe szlaki purynowe, często wykorzystywany jako marker uniwersalny MSC

CD79 α	-	-	białko błonowe, które wraz z CD79 β tworzy niezbędny kompleks sygnałowy z receptorem limfocytów B
CD90 (Thy-1)	+	+	glikoproteina GPI-zależna, pełniąca rolę w adhezji komórkowej, transdukcji sygnałów oraz regulacji odpowiedzi immunologicznej
CD105 (endoglina)	+	+	koreceptor transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β), zaangażowany w procesy proliferacji, różnicowania oraz angiogenezy
CD106 (VCAM-1)	-	+	cząsteczki adhezyjna charakterystyczna dla BM-MSC
CD117	-	-	protoonkogen c-Kit lub tyrozynowo-białkowa kinaza Kit, jest transbłonowym receptorem cytokinowym obecnym na powierzchni komórek macierzystych układu krwiotwórczego, komórek progenitorowych, komórek rozrodczych, a także komórek nowotworowych
CD146	+	+/-	marker adhezji komórkowej, którego obecność na części BM-MSC wiąże się z ich funkcją wspierania hematopoezy i zdolnościami regeneracyjnymi, natomiast w ADSC jego ekspresja jest znacznie słabsza
CD166 (ALCAM)	+	+	cząsteczka adhezyjna z rodziny immunoglobulin, obecna m.in. na komórkach progenitorowych i związana z migracją komórek oraz interakcjami z komórkami hematopoetycznymi
STRO-1	+	+	marker mezenchymalnych komórek macierzystych (zwłaszcza BM-MSC), wykorzystywany do identyfikacji niedojrzałych, multipotencjalnych komórek o wysokim potencjale proliferacyjnym i zdolności różnicowania

Tabela 4. *Charakterystyka markerów powierzchniowych obecnych na komórkach ADSC oraz BM-MSC.* Opracowanie własne na podstawie [155].

1.6.3. Charakterystyka immunologiczna mezenchymalnych komórek macierzystych

Charakterystyka profilu immunologicznego komórek MSC stanowi fundament ich potencjału terapeutycznego, szczególnie w przypadku leczenia chorób zapalnych, autoimmunologicznych oraz onkologicznych. Dzięki zdolności do modulowania

odpowiedzi immunologicznej, MSC odgrywają rolę w kształtowaniu mikrośrodowiska zapalnego, w którym aktywnie współdziałają z komórkami układu odpornościowego, regulując procesy, takie jak tolerancja immunologiczna lub hamowanie nadmiernych reakcji zapalnych [159]. Istotną cechą MSC jest tzw. immunologiczna plastyczność – zdolność do adaptacyjnego dostosowywania swojej funkcji w zależności od typu, stężenia i czasu ekspozycji na bodźce zapalne. W konsekwencji MSC mogą przyjmować fenotyp immunosupresyjny (MSC2), hamując odpowiedź zapalną, lub (rzadziej) immunostymulacyjny (MSC1), promujący odpowiedź odpornościową. Równowaga ta jest kluczowa dla skuteczności i bezpieczeństwa terapii komórkowej [160]. MSC posiadają na swojej powierzchni szereg cząsteczek adhezyjnych, w tym rodzinę integrzyn (np. integryna $\beta 1, \alpha 4$), które odgrywają kluczową rolę w interakcjach komórkowych, zwłaszcza w migracji komórek oraz ich integracji z różnymi składnikami ECM. Cząsteczki te umożliwiają MSC przyleganie do komórek układu odpornościowego takich, jak limfocyty T i makrofagi oraz wspomagają ich migrację do miejsc zapalnych. Ich zdolność do zmiany kierunku odpowiedzi immunologicznej, z prozapalnej na przeciwzapalną i odwrotnie, może być wykorzystywana w szerokim zakresie zastosowań terapeutycznych [161].

Immunomodulacyjne właściwości MSC są aktywowane przez cytokiny prozapalne wydzielane przez komórki układu odpornościowego jak $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ i $\text{IFN-}\gamma$. W odpowiedzi na te czynniki, komórki MSC mogą wykazywać różnorodne działanie, takie jak hamowanie proliferacji limfocytów T, indukowanie tolerancji immunologicznej oraz regulowanie wydzielania cytokin w kierunku tłumienia nadmiernych reakcji zapalnych. Efekt ten może różnić się w zależności od rodzaju i stężenia cytokin w mikrośrodowisku, co świadczy o plastyczności MSC [162].

Użycie MSC w terapii wymaga szczególnego rozważenia ich pochodzenia, ponieważ MSC autologiczne, czyli pochodzące od tego samego pacjenta, mogą być niewłaściwe w przypadku osłabionych funkcji immunomodulacyjnych, wynikających z wieku lub choroby. W takim przypadku zastosowanie MSC allogenicznych, pochodzących od młodszych, zdrowych dawców, może stanowić korzystną alternatywę, oferując możliwość uzyskania komórek o pełnych funkcjach immunomodulacyjnych. Ponadto MSC allogeniczne wykazują niski potencjał immunogeny, co zostało udowodnione w badaniach, gdzie fenotyp komórek MSC nie wywołuje silnej reakcji ze

strony układu odpornościowego biorcy [161]. Takie MSC nie są rozpoznawane jako obce przez organizm, co minimalizuje ryzyko odrzutu przeszczepu. Z kolei limfocyty T mimo, że mogą zostać aktywowane przez MHC I, pozostają anergiczne, ponieważ MSC nie wykazują ekspresji cząsteczek stymulujących (CD80 i CD86) [163]. Pomimo tych korzystnych właściwości, w niektórych pracach opisano możliwość wywołania alloimmunizacji przez MSC, co może prowadzić do rozwoju odpowiedzi immunologicznej i odrzutu przeszczepu. Zjawisko to może mieć związek z indukowalną ekspresją MHC klasy II (np. pod wpływem IFN- γ) oraz dynamiczną modulacją fenotypu immunologicznego MSC. Jest to szczególnie istotne w kontekście MSC allogenicznych, gdzie obecność niewielkiej liczby cząsteczek MHC klasy II może być wystarczająca do aktywacji odpowiedzi immunologicznej [164,165].

Ze względu na opisaną wyżej zmienność immunofenotypu MSC, zarówno w zależności od ich pochodzenia, jak i warunków hodowli, konieczne jest stałe monitorowanie tych komórek przed ich zastosowaniem terapeutycznym. Szczególne znaczenie ma kontrola ekspresji cząsteczek MHC oraz markerów kostymulacyjnych, które mogą decydować o ryzyku odrzutu lub alloimmunizacji. Dostosowanie MSC do potrzeb pacjenta oraz ich fenotypowa adaptacja są kluczowe dla zapewnienia bezpieczeństwa terapii. Ostatnie doniesienia podkreślają również znaczenie komórek MSC w leczeniu ciężkich zaburzeń immunologicznych – m.in. opornego na leczenie ostrego zespołu przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *graft-versus-host disease*, GvHD), w którym allogeniczne MSC wykazały kliniczną skuteczność, prowadząc do zatwierdzenia przez FDA pierwszego preparatu komórkowego MSC [166].

Z uwagi na powyższe, immunogenność i immunomodulacyjność MSC pozostają kluczowymi parametrami decydującymi o bezpieczeństwie i skuteczności terapii. Konieczna jest ich bieżąca ocena zarówno *in vitro* przed podaniem, jak i *in vivo* po przeszczepieniu. Optymalne wykorzystanie MSC w medycynie regeneracyjnej i immunoterapii wymaga zintegrowanego podejścia uwzględniającego ich zmienność, plastyczność oraz interakcje z układem odpornościowym biorcy.

1.6.4. Mezenchymalne komórki macierzyste jako nośniki

Jednym z obiecujących kierunków terapii celowanej nowotworów jest wykorzystanie komórek MSC jako czynników biologicznych pełniących funkcje nośnika ochronnego i transportowego dla leków, ale również mogących wywierać bezpośredni wpływ na rozwój nowotworu. Dzięki swoim unikalnym właściwościom (niskiej immunogenności, silnym zdolnościom immunomodulacyjnym i immunosupresyjnym, a także tropizmowi do miejsc objętych stanem zapalnym), MSC stanowią atrakcyjną platformę do zastosowania jako nośniki leków przeciwnowotworowych. Liczne badania wykazały, że MSC mogą hamować wzrost guza poprzez zahamowanie angiogenezy, zwiększenie infiltracji komórek zapalnych, aktywację apoptozy oraz zatrzymanie cyklu komórkowego [167–169]. Tropizm w kierunku ognisk nowotworowych, jak i przerzutów, czyni je efektywnym narzędziem dostarczania substancji o aktywności przeciwnowotworowej. Co istotne, niezależnie od drogi podania, komórki MSC ulegają stosunkowo szybkiemu usunięciu z organizmu, zachowując przy tym efekt terapeutyczny, co oznacza, że ich długotrwała obecność w ustroju nie jest konieczna do osiągnięcia efektu leczniczego. Co więcej, wykazano, że to właśnie komórki MSC apoptotyczne mają prawdopodobnie większy udział w działaniu immunomodulacyjnym [170].

W ostatnich latach udowodniono, że MSC są zdolne do wychwytu cząsteczek gemcytabiny z otoczenia za pośrednictwem transporterów nukleozydowych, zarówno typu hENT, jak i hCNT, a następnie ich skutecznego uwalniania, co prowadzi do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych. Badania *in vitro* oraz *in vivo* wskazują, że wykorzystanie MSC jako nośnika gemcytabiny umożliwia obniżenie dawki terapeutycznej leku przy jednoczesnym zachowaniu jego skuteczności przeciwnowotworowej [171–173]. Efekt terapeutyczny wynikający z podania MSC jest również konsekwencją wydzielania przez te komórki szerokiego spektrum czynników wzrostu, cytokin oraz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EV), które wspólnie uczestniczą w regeneracji tkanek oraz łagodzeniu reakcji zapalnych i immunologicznych [168,174].

Niestety, wykorzystanie MSC jako nośników leków przeciwnowotworowych wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Zgodnie z dostępnymi danymi, skuteczna modyfikacja MSC stanowi czynnik krytyczny, ograniczający ich zastosowanie i funkcjonalność jako nośnika. Ponadto, MSC stosowane jako żywe komórki mogą również wspierać rozwój

mikrośrodowiska nowotworowego, wpływając tym samym na proliferację, migrację oraz rozwój oporności komórek nowotworowych. Zdolność MSC do pochłaniania cząsteczek leków, jak i ich ewentualny efekt pronowotworowy, może różnić się w zależności od ich pochodzenia oraz warunków hodowli. W związku z tym kluczowe znaczenie ma uwzględnienie zarówno heterogenności, jak i źródła MSC [175].

Pomimo kontrowersji, MSC są nadal uznawane za obiecujące narzędzie terapeutyczne w zastosowaniach klinicznych. Z drugiej strony, ich wykorzystanie jako komórek immunoterapeutycznych wymaga spełnienia rygorystycznych norm jakościowych, zgodnych z zasadami Dobrej Praktyki Wytwarzania (GMP, ang. *Good Manufacturing Practice*). Aby zachować potencjał immunomodulacyjny MSC, konieczne jest zachowanie standaryzowanych warunków izolacji, namnażania i przechowywania komórek [176]. Wykazano również, że różne metody namnażania MSC mogą prowadzić do nabywania przez nie odmiennych właściwości immunomodulacyjnych, dlatego opracowano zoptymalizowane protokoły izolacji i hodowli MSC, które pozwalają na zachowanie ich stabilności biologicznej i bezpieczeństwa [157,158].

W kontekście działania MSC i ich zastosowania terapeutycznego, coraz większe znaczenie przypisuje się wydzielanym przez nie pęcherzykom zewnątrzkomórkowym. Można wyróżnić trzy główne typy EV: egzosomy, mikropęcherzyki oraz ciała apoptotyczne. Struktury te, otoczone podwójną warstwą lipidową, zawierają szeroki wachlarz cząsteczek bioaktywnych, takich jak RNA, DNA, białka oraz lipidy. EV uczestniczą w komunikacji międzykomórkowej, regulacji homeostazy tkankowej, czy procesach immunomodulacji [177]. Doniesienia naukowe wskazują na duży potencjał terapeutyczny egzosomów pochodzących z MSC, zwłaszcza w kontekście regeneracji tkanek – promują one różnicowanie osteogenne, angiogenezę oraz regulację odpowiedzi immunologicznej, co może znaleźć zastosowanie m.in. w terapii ubytków kostnych [178]. Biogeneza i mechanizmy działania egzosomów są w dużej mierze wspólne i niezależne od ich źródła, w tym egzosomów MSC. Uwolnione egzosomy oddziałują na komórki docelowe poprzez endocytozę zależną od klatryny, interakcje z receptorami błonowymi lub bezpośrednie fuzje błon komórkowych [179]. Co więcej, dowiedziono, że ludzkie MSC wykazują preferencyjne powinowactwo do ognisk nowotworowych, gdzie wykazują aktywność biologiczną. Kluczowe znaczenie dla efektu terapeutycznego egzosomów ma

ich zawartość – tzw. „ładunek” (cargo), obejmujący białka, peptydy, kwasy nukleinowe lub cząsteczki leków. Egzosomy mogą być wzbogacane w substancje czynne na drodze pasywnej (np. inkubacja z lekiem) lub aktywnej (np. transfekcja, sonikacja). Każda z metod ma swoje ograniczenia, np. pasywne ładowanie lekiem jest najprostsze, lecz wiąże się z brakiem kontroli nad ilością zaabsorbowanej substancji. Jeśli rozważa się zastosowanie wyłącznie egzosomów MSC jako nośnika, konieczne jest określenie wszystkich mechanizmów i kinetyki ich „ładowania” badaną substancją [180].

2. Cel badań

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie innowacyjnych kombinowanych terapeutyków opartych na gemcytabinie i NLPZ oraz metod ich dostarczania do komórek nowotworowych. W ramach przeprowadzonych eksperymentów zbadano połączenia gemcytabiny (GEM) z wybranymi NLPZ – kwasem acetylosalicylowym (ASA), ibuprofenem (IBU) oraz flurbiprofenem (FLU) jako potencjalnych czynników wzmacniających cytotoksyczne działanie GEM wobec wybranych linii komórkowych nowotworu trzustki PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 (ang. *pancreatic cancer cells*, PCC), a następnie wyselekcjonowanie najbardziej obiecującego NLPZ do dalszych badań. Dodatkowo, postawiono hipotezę, że mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (BM-MSC), a także pożywka kondycjonowana uzyskana z tych komórek (CM) traktowanych wybraną kombinacją GEM i NLPZ, wykazują potencjał jako elementy wspomagające działanie cytotoksyczne tych leków w warunkach *in vitro*. Szczególny nacisk położono na ocenę oporności BM-MSC na połączenie GEM i NLPZ w kontekście możliwości uzyskania efektu przeciwnowotworowego w kombinacji leków, przewyższającego działanie poszczególnych związków stosowanych oddzielnie. Na podstawie obserwacji przeprowadzonych podczas badań *in vitro*, zsyntezowano koniugaty gemcytabiny i NLPZ, a także wykonano badania fizykochemiczne nowych pochodnych.

Cele szczegółowe:

1. Zbadanie (*in vitro*) kombinacji GEM z ASA/IBU/FLU na liniach nowotworowych trzustki (PCC) oraz wyselekcjonowanie najbardziej obiecującego związku do dalszych badań poprzez badania cytotoksyczności, apoptozy i nekrozy, cyklu komórkowego, badań wybranych białek apoptotycznych metodą Western blottingu.
2. Izolacja i namnażanie BM-MSC od zdrowych dawców szpiku, badanie fenotypu oraz ocena przydatności BM-MSC jako nośników najbardziej obiecującej kombinacji GEM i NLPZ.
3. Synteza szeregu chemioterapeutyków do leczenia nowotworu trzustki; modyfikacje cytydyny i gemcytabiny w pozycji 4-(N) i 5'-C z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi.

3. Uwagi szczegółowe

Badania realizowano w ramach grantu ExCELLent ufundowanego przez Polski Bank Komórek Macierzystych S.A. pt. „Ocena przydatności mezenchymalnych komórek macierzystych jako nośnika nowych pochodnych gemcytabiny” oraz subwencji grupy „Bioorganika” działającej w Instytucie Chemii na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach.

Badania wykonano we współpracy z Narodowym Instytutem Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytutem Badawczym Oddziałem w Gliwicach w Klinice Transplantacji Szpiku i Onkohematologii. Uzyskano akceptację Komisji Bioetycznej Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie (nr akceptacji KB/430-86/22 i nr KB/430-86/22/1/2023).

4. Materiały i metody badań

4.1. *Materiały badań*

4.1.1. Odczynniki i zestawy stosowane w badaniach biologicznych

- 4',6-diamidyno-2-fenyloindol (DAPI) (Thermo Fisher)
- 7-AAD (BioLegend)
- Aceton (POCh)
- Aneksyna V (BioLegend)
- Błękit bromofenolowy (Sigma)
- Cell wash buffer (BD Biosciences)
- DAPI Antifade Mounting Medium (Vectashield)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma)
- Etanol (POCh)
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (BioLegend)
- Flurbiprofen (Acros Organicss)
- Gemcytabina (Accord)
- Glicyna (Fluka)
- H_3PO_4 (Fluka)
- HCl (Fluka)
- Heparyna (Polfa Warszawa)
- Human MSC Analysis Kit (BD Biosciences)
- Ibuprofen (Acros Organicss)
- Jodek propidyny (Merck)
- KCl (Fluka)
- KH_2PO_4 (POCh)
- Ludzki lizat płytkowy (hPLT) (Stem Cell Technologies)
- Metanol (POCh)
- MgCl_2 (Fluka)

- Minimal Eagle's Medium (MEM) (Sigma)
- MTS (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) (Promega)
- *N, N, N', N'*-tetraetyloetylenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich)
- Na₂HPO₄ (POCh)
- NaCl (Fluka)
- Nonidet-P40 (NP-40) (Sigma)
- Penicylina/Streptomycyna 100× (Gibco)
- Płodowa surowica bydlęca (FBS) (Eurx)
- RNAza A (EURx)
- Roztwór aminokwasów nie niezbędnych 100× (MEM Non-essential amino acids) (Gibco)
- RPMI 1640 (Sigma)
- Siarczan dodecyłu sodu (SDS) (Sigma)
- Sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) (Fluka)
- Trypsyna-EDTA 0,25% (Gibco)
- Tween 20 (Sigma)
- Vybrant™ CFDA SE Cell Tracer Kit, Thermo Fisher Scientific
- β-merkaproetanol (Fluka)

4.1.2. Aparatura oraz oprogramowania stosowane w badaniach biologicznych

- Cieplarka, Thermo Scientific HERATHERM
- Cytometr przepływowy, BD FACS Lyric
- Czytnik do mikropłytek, Tecan Spark
- Inkubator, Thermo Scientific Heracell™ 150i
- Komora laminarna, Thermo Scientific Herasafe KS
- Licznik komórek TC20 Automated Cell Counter, Bio-Rad
- Mikroskop fluorescencyjny, ZEISS Axio Imager
- Mikroskop świetlny odwrócony, ZEISS Axiovert 40
- Oprogramowanie BioRender
- Oprogramowanie GraphPad Prism

- Wirówka, Eppendorf Centrifuge 5702
- Wywoływarka fotograficzna Automated X-Ray Film Processor, OPTIMAX

4.1.2.1. *Linie komórkowe i warunki hodowli komórek eukariotycznych*

BM-MSC	Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego
AsPC-1	Linia komórek ludzkiego nowotworu trzustki wyizolowana z płynu otrzewnowego pacjenta chorego na gruczolakoraka przewodowego trzustki
BxPC-3	Linia komórek ludzkiego nowotworu trzustki wyizolowana z przewodu trzustkowego pacjenta chorego na gruczolakoraka przewodowego trzustki
PANC-1	Linia komórek ludzkiego nowotworu trzustki wyizolowana z przewodu trzustkowego pacjenta chorego na gruczolakoraka przewodowego trzustki

Wszystkie wykorzystywane linie komórkowe hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, 95% wilgotności oraz 5% CO₂.

4.1.2.2. *Pożywki stosowane w hodowli komórek eukariotycznych:*

- **Pożywka do hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych:**

Pożywka MEM + 10% ludzkiego lizatu płytkowego (hPLT) + 1% antybiotyków (penicylina: 100 jednostek/ml pożywki, streptomycyna: 100 µg/ml pożywki) + 1% aminokwasów + 2 U/ml heparyny

- **Pożywka do hodowli komórek linii PANC-1:**

Pożywka DMEM high glucose + 10% FBS + 1% antybiotyków (penicylina: 100 jednostek/ml pożywki, streptomycyna: 100 µg/ml pożywki)

- **Pożywka do hodowli komórek linii AsPC-1 i BxPC-3:**

Pożywka RPMI 1640 + 10% FBS + 1% antybiotyków (penicylina: 100 jednostek/ml pożywki, streptomycyna: 100 µg/ml pożywki)

4.1.2.3. *Bufory i odczynniki stosowane do identyfikacji ekspresji białek metodą immunochemiczną (Western blot)*

- **Bufor stosowany do przygotowania lizatów komórkowych (IP):**

50 mM Tris-Cl (pH 8.0)

120 mM NaCl

0,5% Nonidet-P40 (NP-40)

- **Odczynnik Bradforda:**

0,01% Coomassie Brilliant Blue

4,75% metanol

8,5% H₃PO₄

- **Bufor do elektroforezy białek (pH 8,8):**

125 mM Tris

1,25 M glicyna

0,5% SDS

- **Bufor SDS-PAGE do nanoszenia białek na żel:**

150mM Tris (pH 6,8)

6% SDS

30% glicerol

- **Bufor do elektrotransferu białek (pH 8,3-8,6):**

192 mM glicyna

25 mM Tris

20% metanol

- **Bufor 10 × TBS:**

1,6 M NaCl

0,1 M Tris (pH 7,4)

- **Bufor TBST:**

1 × TBS

0,1% Tween 20

4.1.3. Odczynniki stosowane w badaniach chemicznych

- 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylidisiloksan (TIPDSiCl₂) (Acros Organics)
- Aceton (POCH)
- Bezwodnik octowy (POCH)
- Chlorek (1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu (EDCI) (Acros Organics)
- Chlorek tionylu (POCH)
- Chloroform (Pol-Aura)
- Chlorowodorek gemcytabiny (Acros Organics)
- Cytydyna (Acros Organics)
- Dichlorometan (POCH)
- Dicykloheksylokarbodiimid (DCC) (Sigma)
- Dimetyloaminopirydyna (DMAP) (Merck)
- Dimetyloformamid (DMF) (Chempur)
- Dimetylosulfotlenek (DMSO) (Sigma)
- Etanol (Pol-Aura)
- Eter dietylowy (POCH)
- Fluorek tetrabutylamoniowy (TBAF) (Sigma)
- Flurbiprofen (Acros Organics)
- Hydroksybenzotriazol (HOBt) (Sigma)
- Ketoprofen (Sigma)
- Kwas chlorowodorowy 38% (Pol-Aura)
- Kwas fosforowy (V) (POCH)
- Kwas salicylowy (POCH)
- Metanol (Sigma-Aldrich)
- MgSO₄ (Pol-Aura)
- NaHCO₃ (POCH)
- Naproksen (Sigma)
- N-hydroksysukcynoimid (HOSu) (Sigma)
- Octan etylu (Chempur)
- Pirydyna (Pol-Aura)

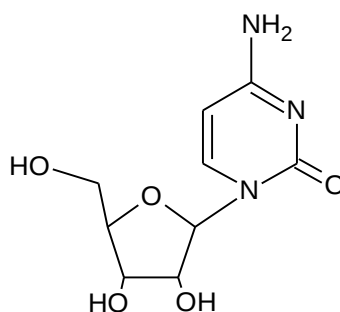
- S-ibuprofen (Acros Organics)
- Tetrahydrofuran (THF) (Chempur)

4.1.4. Aparatura oraz oprogramowania stosowane w badaniach chemicznych

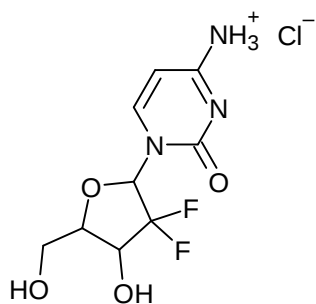
- Aparat do pomiaru temperatury topnienia, Stuart SMP10
- Chromatograf FLASH, Biotage
- Czasza grzejna z mieszadłem, CHEMLAND
- Lampa UV, TB TELBID
- Myjka ultradźwiękowa, Sonic 3 Polsonic
- Oprogramowanie Chems sketch
- Oprogramowanie Mestrenova
- Reaktor mikrofalowy, Botti Electronic
- Rotacyjna wyparka próżniowa, Heidolph Laborota 4000
- Spektrometr mas, Bruker Impact II
- Spektrometr NMR, Bruker Ascend 600 MHz
- Spektrometr NMR, Bruker Avance 400 MHz
- Waga, RADWAG

4.1.4.1. Cząsteczki wybrane do modyfikacji

Cytydyna (CYT) ($M=243,22 \text{ g/mol}$; temperatura topnienia = $210\text{--}220^\circ\text{C}$)

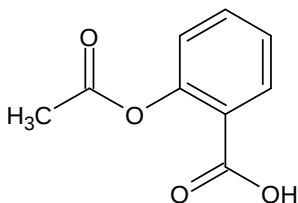


Chlorowodorek 2',2'-difluoro-2'-deoksycytydyny (chlorowodorek gemcytabiny, GEM) ($M=299,66 \text{ g/mol}$; temperatura topnienia: $168,64^\circ\text{C}$)

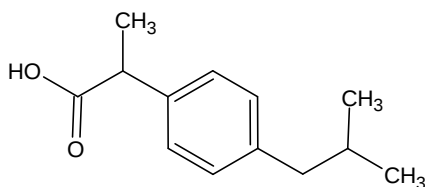


4.1.4.2. Wybrane niesteroidowe leki przeciwzapalne

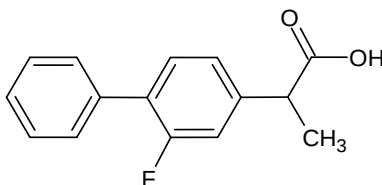
Kwas acetylosalicylowy (aspiryna, ASA) ($M=180,16 \text{ g/mol}$; temperatura topnienia: 136°C)



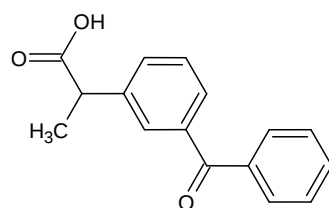
Kwas 2-(p-izobutylofenylo) propionowy (ibuprofen, IBU) ($M=206,28 \text{ g/mol}$; temperatura topnienia: 76°C)



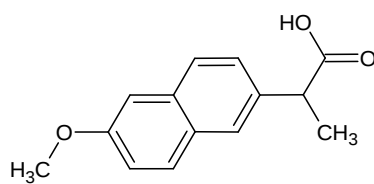
Kwas 2-(2-fluorobifen-4-ylo) propanowy (flurbiprofen, FLU) ($M=244,27 \text{ g/mol}$; temperatura topnienia: 111°C)



Kwas-2-(3-benzoilofenylo) propanowy (ketoprofen) ($M=254,28 \text{ g/mol}$; temperatura topnienia: 94°C)



Kwas 2-(6-metoksynaftalen-2-ylo) propanowy (naproksen) ($M=230,26 \text{ g/mol}$;
temperatura topnienia: 152°C)



4.2. Metody badań

4.2.1. Badania biologiczne

4.2.1.1. Izolacja mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego

Próbki szpiku kostnego uzyskano od zdrowych dawców z talerza kości biodrowej (NIO-PIB w Gliwicach). Około 1-2 ml szpiku zawieszono w pożywce do hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych. Tak przygotowaną mieszaninę przeniesiono do butelki hodowlanej o powierzchni 25 cm² i inkubowano w warunkach 37°C z 5% CO₂. Po 24 godzinach kulturę przemyto dwukrotnie 1×PBS w celu usunięcia komórek nieadherentnych i dodano świeżej pożywki hodowlanej. Kultury subkonfluentne BM-MSC pasażowano w stosunku 1:3, a komórki z pasaży od 2 do 5 wykorzystano w kolejnych eksperymentach.

Aby potwierdzić prawidłowość fenotypu wyizolowanych BM-MSC, zbadano występowanie specyficznych antygenów powierzchniowych przy użyciu zestawu Human MSC Analysis Kit (BD Biosciences). Analizowano ekspresję antygenów pozytywnych, charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych (CD73, CD90 i CD105) oraz antygenów negatywnych typowych dla linii komórkowych krwi (CD11b, CD19, CD34, CD45 i HLA-DR). Komórki hodowane BM-MSC oddzielono od podłoża hodowlanego za pomocą trypsyny, przemyto dwukrotnie PBS i inkubowano w ciemności z odpowiednimi przeciwciałami przez 20 minut, w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, komórki przemyto buforem Cell Wash Buffer i zawieszono w 250µL PBS. Wykonano ocenę immunofenotypu przy użyciu cytometru przepływowego (BD FACS Lyric). Parametry bramkowania w celu odróżnienia populacji dodatnich od ujemnych ustalono na podstawie sygnałów z dedykowanych kontroli izotypowych IgG zawartych w zestawie Human MSC Analysis Kit.

4.2.1.2. *Test cytotoksyczności gemcytabiny w połączeniu z NLPZ na komórkach nowotworu trzustki oraz BM-MSC*

Komórki linii PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 oraz BM-MSC zostały wysiane na płytkę 96-dołkową w zagęszczeniu 4×10^3 komórek na dołek. Po 24 godzinach komórki poddano działaniu gemcytabiny, wybranych NLPZ oraz gemcytabiny i NLPZ w kombinacjach. Grupę kontrolną stanowiły komórki niepoddane działaniu leków.

Komórki linii PCC traktowano lekami:

1. GEM w stężeniach od $0,01\mu\text{M}$ do $100\mu\text{M}$,
2. GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w równych stężeniach od $0,01\mu\text{M}$ do $100\mu\text{M}$,
3. oraz GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w różnych stężeniach, przy zastosowaniu znacznie wyższej dawki FLU ($1\mu\text{M}+1\text{mM}$; $10\mu\text{M}+1\text{mM}$; $1\mu\text{M}+2\text{mM}$; $10\mu\text{M}+2\text{mM}$).

Komórki linii BM-MSC poddano działaniu leków:

1. GEM w stężeniach od $0,01\mu\text{M}$ do $100\mu\text{M}$,
2. ASA/IBU/FLU w stężeniach od $0,01\mu\text{M}$ do $100\mu\text{M}$,
3. oraz GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w równych stężeniach od $0,01\mu\text{M}$ do $100\mu\text{M}$.

Komórki inkubowano z lekami przez 24 i 48 godzin w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO_2 . Następnie do każdego dołka dodano odczynnik MTS (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) i inkubowano przez 1,5 godziny, zgodnie z instrukcją producenta. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm z użyciem czytnika mikropłytek (Tecan Spark). Procent przeżywalności komórek obliczano według wzoru:

$$\frac{\text{Absorbancja próby badanej [nm]} - \text{Absorbancja próby kontrolnej [nm]}}{\text{Absorbancja próby kontrolnej [nm]} - \text{Absorbancja próby ślepej [nm]}} \times 100$$

4.2.1.3. *Badanie apoptozy i nekrozy komórek PCC oraz BM-MSK za pomocą Aneksyny V oraz 7-AAD*

Komórki PCC i BM-MSK zostały wysiane na płytki 6-dołkowe w zagęszczeniu 2×10^5 komórek/dołek. Po 24 godzinach komórki poddano działaniu leków:

1. GEM $10 \mu\text{M}$,
2. GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w równych stężeniach ($10 \mu\text{M} + 10 \mu\text{M}$),
3. GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w różnych stężeniach ($10 \mu\text{M} + 2 \text{mM}$).

Grupę kontrolną stanowiły komórki nietraktowane lekami. Komórki inkubowano przez 24 i 48 godzin w 37°C i 5% CO_2 . W każdym punkcie czasowym wykonano barwienie za pomocą Aneksyny V i 7-AAD przy użyciu zestawu FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (BioLegend). Oceniono procentowy udział komórek żywych, we wczesnej i późnej apoptozie oraz w nekrozie za pomocą cytometrii przepływowej (BD FACS Lyric):

- komórki żywe (Aneksyna V⁻ / 7-AAD⁻),
- we wczesnej apoptozie (Aneksyna V⁺ / 7-AAD⁻),
- w późnej apoptozie lub martwe (Aneksyna V⁺ / 7-AAD⁺),
- oraz komórki martwe nekrotyczne (Aneksyna V⁻ / 7-AAD⁺).

4.2.1.4. *Analiza cyklu komórkowego komórek PCC*

Komórki linii PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 i zostały wysiane na płytkach 6-dołkowych w liczbie 2×10^5 komórek/dołek. Po 24 godzinach komórki poddano działaniu leków:

1. GEM $10 \mu\text{M}$,
2. GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w równych stężeniach ($10 \mu\text{M} + 10 \mu\text{M}$),
3. GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w różnych stężeniach ($10 \mu\text{M} + 2 \text{mM}$).

Grupę kontrolną stanowiły komórki nietraktowane lekami. Komórki inkubowano przez 24 godziny w 37°C i 5% CO_2 . Następnie komórki strypsynizowano i utrwalano 70% etanolem przez noc w 4°C . Alkohol usunięto i dodano $100 \mu\text{g/ml}$ RNAzy i $100 \mu\text{g/ml}$ jodku propidyny. Inkubowano w ciemności 20 minut, RT. Zbadano cykl komórkowy przy użyciu cytometrii przepływowej (BD FACS Lyric). Jodek propidyny przenika przez błonę

komórkową utrwalonych komórek, po czym wiąże się z DNA i interkaluje pomiędzy komplementarnymi zasadami azotowymi. Stężenie fluorescencji jodku propidyny jest proporcjonalne do ilości DNA w komórce, dzięki czemu można określić proporcje między komórkami w poszczególnych fazach cyklu:

- G0/G1 – komórki nie dzielące się/przygotowujące do podziału,
- S – komórki w czasie replikacji DNA,
- G2/M – komórki po replikacji DNA.

4.2.1.5. *Traktowanie gemcytabiną oraz NLPZ komórek BM-MSC oraz przygotowanie pożywek kondycjonowanych*

Przygotowano następujące roztwory gemcytabiny i NLPZ w pożywkach hodowlanych bez dodatku hPLT:

1. GEM 10 μ M;
2. GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w równych stężeniach (10 μ M + 10 μ M)

Powyższe stężenia ustalono na podstawie wyników uzyskanych w teście MTS dla komórek BM-MSC oraz PCC.

Leki dodano do subkonfluentnych komórek BM-MSC. Po 24 godzinach usunięto pożywkę hodowlaną z lekami, a komórki przemyto dwukrotnie PBS celem pozbycia się wolnych leków. Komórki BM-MSC oddzielono od podłoża za pomocą trypsyny i sprawdzono ich żywotność. W tym celu komórki płukano jednokrotnie za pomocą PBS, a następnie dodano 5 μ L DAPI – barwnika fluorescencyjnego wiążącego się z DNA. Po 5 minutach inkubacji wykonano odczyt na cytometrze przepływowym (BD FACS Lyric).

Komórki w liczbie 1×10^6 zawieszono w pożywce bez hPLT i przeniesiono do nowej butelki hodowlanej 75cm². Po 24 godzinach zebrano pożywki kondycjonowane i przefiltrowano przez filtr 0,22 μ m. Uzyskano następujące pożywki kondycjonowane:

1. znad komórek BM-MSC nietraktowanych (CM),
2. znad komórek BM-MSC traktowanych GEM (CM-G),

3. znad komórek BM-MSC traktowanych GEM i ASA (CM-G+A), GEM i IBU (CM-G+I), GEM i FLU (CM-G+F).

Zebrane pożywki kondycjonowane przechowywano w -70°C.

Z kolei komórki BM-MSC strypsynizowano i przemyto dwukrotnie PBS. Uzyskano w ten sposób:

1. BM-MSC bez leku (BM-MSC),
2. BM-MSC z dodatkiem GEM (BM-MSC-G),
3. BM-MSC z dodatkiem GEM i FLU (BM-MSC-G+F).

Komórki te wykorzystano do przygotowania kokultury z komórkami PCC tego samego dnia.

4.2.1.6. Ocena cytotoksyczności pożywek kondycjonowanych znad BM-MSC na komórki PCC

Komórki linii PANC-1, AsPC-1 i BxPC-3 wysiano na płytki 96-dołkowe w ilości 2×10^3 komórek/dołek. Po 24 godzinach inkubacji komórki traktowano pożywkami kondycjonowanymi znad BM-MSC (CM, CM-G, CM-G+A, CM-G+I, CM-G+F).

Pożywki kondycjonowane rozcieńczono 1:1 pożywką odpowiednią dla danej linii komórkowej. Po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji, do dołków dodano odczynnik MTS i inkubowano 1,5 godziny. Następnie zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 490nm za pomocą czytnika do mikropłytek. Procent żywych komórek obliczono wg wzoru podanego powyżej w punkcie 5.2.1.2.

4.2.1.7. Badanie apoptozy i nekrozy w komórkach PCC po traktowaniu pożywką kondycjonowaną znad BM-MSC

Komórki linii PANC-1, AsPC-1 i BxPC-3 inkubowano 72 godziny w pożywce kondycjonowanej znad BM-MSC: CM, CM-G, CM-G+F.

Pożywki kondycjonowane rozcieńczono 1:1 pożywką dla danej linii komórkowej. Następnie komórki oddzielono od podłoża za pomocą trypsyny i wykonano barwienie za

pomocą Aneksyny V i 7-AAD przy użyciu zestawu FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD. Detekcję komórek apoptotycznych i nekrotycznych wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej (BD FACS Lyric).

4.2.1.8. Ocena ekspresji białek kaspazy-3, PARP1, p-Ser-GSK3 β oraz FAS metodą immunochemiczną (Western blot) w komórkach PCC po traktowaniu kombinacją GEM+FLU oraz CM

Komórki linii PANC-1, AsPC-1 i BxPC-3 wysiano na szalki o promieniu 6 cm w liczbie 4×10^5 komórek i poddano działaniu GEM (10 μ M), GEM+FLU w równych stężeniach (10 μ M+10 μ M) oraz GEM + FLU w różnych stężeniach (10 μ M + 2mM) przez 24 lub 48 godzin. Ponadto komórki traktowano pożywką kondycjonowaną pochodzącą znad BM-MSC: CM, CM-GEM oraz CM-GEM + FLU, rozcieńczoną 1:1 w pożywce przeznaczonej dla danej linii komórkowej, przez 72 godziny. Po inkubacji, komórki oddzielono od naczynia hodowlanego za pomocą trypsyny, płukano dwa razy roztworem PBS, a następnie suchą peletkę komórek zamrożono w -80°C . W celu uzyskania lizatów komórkowych, zamrożone peletki zawieszono w buforze lizującym IP uzupełnionym inhibitorami proteaz (PMSF, pepstatyna A, aprotynina i leupeptyna) oraz inhibitorami fosfataz, aby zapobiec degradacji białek i defosforylacji. Zawiesinę inkubowano w 4°C , 20 minut, a następnie wirowano 20 minut z prędkością 14000 rpm w 4°C . Pobrano nadsącz i określono stężenie białka metodą Bradforda. Do próbek dodano bufor SDS-PAGE, do nanoszenia białek na żel, w 0,5 objętości próbki. Następnie przeprowadzono denaturację termiczną w 95°C , 5 minut. Uzyskane lizaty przechowywano w -80°C .

Lizaty komórkowe (15–30 μ g białka) poddano rozdzielowi za pomocą elektroforezy SDS-PAGE na żelach o stężeniu 8% lub 13%, w zależności od masy cząsteczkowej analizowanego białka. Zastosowano wzorzec wielkości białek Prestained Protein Ladder. Przeprowadzono elektroforezę w buforze do elektroforezy białek (pH 8,8) w napięciu 75-105 V przez 1,5 godziny.

Następnie białka przeniesiono na membrany PVDF metodą elektrotransferu w buforze do elektrotransferu (pH 8,3-8,6), przez 2 godziny w natężeniu 370 mA w 4°C . Przed inkubacją z przeciwciałami pierwszego rzędu, membrany blokowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze blokującym zawierającym 5% odtłuszczonego mleka w PBS

z dodatkiem 0,1% Tween-20, aby zredukować nieswoiste wiązanie przeciwciał. Do wykrywania badanych białek użyto następujących przeciwciał pierwszorzędowych króliczych: anty-kaspaza-3 (Asp175), anty-P-Ser-GSK3 β , anty-Fas, a także mysich: anty-PARP oraz anty-HSC70 (przeciwciało kontrolne). Wszystkie przeciwciała pochodzą z Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA. Inkubację z przeciwciałami prowadzono przez całą noc w temperaturze 4°C w roztworze blokującym.

Membranę płukano pięciokrotnie w roztworze TBST, następnie umieszczono w roztworze przeciwciała drugorzędowego. Detekcję białek przeprowadzono przy użyciu przeciwciał drugorzędowych sprzężonego z peroksydazą chrzanową (HRP) skierowanych przeciwko anty-mysz lub anty-królik. Sygnał wizualizowano metodą chemiluminescencji przy użyciu substratów dla peroksydazy chrzanowej SuperSignal West Pico lub SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Wywołano na kliszy fotograficznej na wywoływarce OPTIMAX Automated X-Ray Film Processor.

4.2.1.9. Barwienie za pomocą barwnika cytoplazmatycznego CFDA

Komórki nowotworowe linii PANC-1, AsPC-1 oraz BxPC-3 wysiano na butelki hodowlane o powierzchni 25 cm² i hodowano do uzyskania 80% konfluencji. W celu wykonania barwienia za pomocą barwnika cytoplazmatycznego CFDA, komórki oddzielono od podłoża za pomocą trypsyny, jednokrotnie płukano buforem PBS i zawieszono w roztworze PBS zawierającym barwnik CFDA w stężeniu 5 μ M (Vybrant™ CFDA SE Cell Tracer Kit, Thermo Fisher Scientific). Zawiesinę inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37 °C. Po inkubacji komórki ponownie odwirowano i zawieszono w świeżej pożywce hodowlanej. Tak wybarwione komórki wykorzystywano do obserwacji mikroskopowych (Metody badań 5.2.1.10) oraz w badaniu kokultury z komórkami BM-MSK (Metody badań 5.2.1.11)

4.2.1.10. Obserwacje mikroskopowe komórek PCC poddanych działaniu GEM i NLPZ

Komórki nowotworowe linii PANC-1, AsPC-1 oraz BxPC-3 zabarwione za pomocą barwnika CFDA wysiano na szkiełka z komorami typu chamber-slides w zagęszczeniu 2 $\times$ 10⁴ komórek na studzienkę. Po 24 godzinach inkubacji komórki poddano działaniu:

1. GEM 10 μ M,
2. GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w równych stężeniach (10 μ M + 10 μ M),
3. GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w różnych stężeniach (10 μ M + 2mM).

Po 24 godzinach inkubacji komórki płukano dwukrotnie PBS i utrwalano zimnym 70% etanolem przez 15 minut, po czym powtórzono płukanie PBS. Komory usunięto pozostawiając szkiełko podstawowe z utrwalonymi komórkami do wyschnięcia. Na szkiełko podstawowe rozprowadzono równomiernie 20 μ L medium zamykającego z DAPI (Antifade Mounting Medium with DAPI) wybarwiając równocześnie jądra komórkowe, przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss.

4.2.1.11. *Kokultura komórek BM-MSK traktowanych GEM i FLU z komórkami PCC*

Komórki linii PANC-1, AsPC-1 oraz BxPC-3 zabarwione za pomocą barwnika CFDA, wysiano na płytki 6-dołkowe w ilości 1×10^5 komórek na dołek. Po 24 godzinach inkubacji do komórek PCC dodano komórki BM-MSK natywne (kontrola), BM-MSK-GEM lub BM-MSK-GEM+FLU w ilości 1:2 oraz 1:3. Po 24 godzinach inkubacji, kokultury oddzielono od podłoża hodowlanego za pomocą trypsyny. Następnie przy użyciu cytometrii przepływowej (BD FACS Lyric) porównano stosunek komórek BM-MSK (niebarwionych CFDA) do komórek odpowiedniej linii PCC (barwionych CFDA).

4.2.1.12. *Analiza statystyczna*

Wszystkie eksperymenty powtórzono co najmniej trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Analizy statystyczne wykonano przy użyciu programu GraphPad Prism. Porównania wielu grup danych przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), przy czym wartości $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ oraz $****p \leq 0,0001$ uznano za istotne statystycznie. W przypadku naruszenia założenia jednorodności wariancji (sprawdzanego testem Brown-Forsythe) zastosowano wariant ANOVA według Welcha, a dla analiz post-hoc – test Dunnetta T3. W pozostałych przypadkach wykorzystano klasyczną

jednoczynnikową ANOVA z testami Šidáka lub Holm-Šidáka do porównań wybranych grup (np. pojedynczy lek vs. kombinacja leków).

4.2.2. Badania chemiczne

4.2.2.1. *Synteza kwasu acetylosalicylowego*

W zlewce umieszczono 7 g (0,05 mol) kwasu salicylowego, 14 ml (0,15 mol) bezwodnika octowego oraz kilka kropli kwasu fosforowego (V). Zlewkę przykryto szkiełkiem zegarkowym i umieszczono w reaktorze mikrofalowym na 5 minut (moc reaktora 400 W). Zlewkę pozostawiono do ochłodzenia, a następnie umieszczono w łaźni lodowej, w celu rozpoczęcia krystalizacji. Następnie wykonano rekrytalizację z etanolu oraz sączenie na gorąco z węglem aktywnym. Z przeprowadzonej syntezy otrzymano 4,05 g kwasu acetylosalicylowego (wydajność 79%, temperatura topnienia 135°C).

4.2.2.2. *Opis syntezy chlorków kwasowych wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych*

W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 0,5 g aspiryny (2,7 mmol) w 5 ml zimnego chloroformu. W celu ujednolicenia roztworu zastosowano sonikację przez około 2 minuty. Następnie dodano stopniowo, kroplami, 0,6 ml chlorku tionylu (stosunek molowy 1:2,5). Zastosowano reaktor mikrofalowy przez 6 cykli po 30 sekund o mocy 400W. Rozpuszczalnik odparowano z zastosowaniem wyparki próżniowej. Otrzymany związek pozostawiono do wykrystalizowania. Następnie wykonano rekrytalizację oraz sączenie na gorąco z węglem aktywnym, w celu oczyszczenia związku. Z przeprowadzonej syntezy otrzymano 0,47g chlorku kwasowego aspiryny (wydajność 85%).

Według powyższej procedury (zachowując stosunek molowy substratów 1:2,5) zsyntezowano także:

- a. Chlorek kwasowy ibuprofenu z 0,5 g ibuprofenu (2,4 mmol) otrzymując 0,49 g chlorku kwasowego ibuprofenu (wydajność 90%)
- b. Chlorek kwasowy flurbiprofenu z 0,5 g flurbiprofenu (2 mmol) otrzymując 0,45 g chlorku kwasowego flurbiprofenu (wydajność 84%)

- c. Chlorek kwasowy ketoprofenu z 0,2 g ketoprofenu (0,78 mmol) otrzymując 0,18 g chlorku kwasowego ketoprofenu (wydajność 86%)
- d. Chlorek kwasowy naproksenu z 0,2 g naproksenu (0,9 mmol) otrzymując 0,17 g chlorku kwasowego naproksenu (wydajność 81%)

4.2.2.3. *Syntezy koniugatów cytydyny z wykorzystaniem chlorków kwasowych:*

4.2.2.3.1. Synteza koniugatu cytydyny i kwasu acetylosalicylowego

Chlorek kwasowy kwasu acetylosalicylowego o masie 0,222 g (1,1 mmol) oraz 0,25g cytydyny (1 mmol) rozpuszczono w 3 ml pirydyny. Otrzymany roztwór poddano działaniu reaktora mikrofalowego o mocy 400 W przez 5 cykli po 30 sekund, a następnie mieszano przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Użyto wyparki próżniowej w celu odparowania rozpuszczalnika. Przeprowadzono rekrystalizację w metanolu. Wykonano chromatografię kolumnową z zastosowaniem rozpuszczalnika DCM:MeOH 9:1. Z przeprowadzonej syntezy otrzymano 0,05 g związku (wydajność 52%).

4.2.2.3.2. Próba syntezy koniugatu cytydyny i naproksenu

Chlorek kwasowy naproksenu o masie 0,24 g (1 mmol) oraz 0,25 g cytydyny (1 mmol) rozpuszczono w 3 ml pirydyny. Otrzymany roztwór poddano działaniu reaktora mikrofalowego przez 5 cykli po 30 sekund (moc reaktora 400W), a następnie mieszano przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Użyto wyparki próżniowej w celu odparowania rozpuszczalnika. Przeprowadzono rekrystalizację w metanolu. Wykonano chromatografię kolumnową z zastosowaniem rozpuszczalnika DCM:MeOH 9:1. Z przeprowadzonej syntezy otrzymano oleistą substancję o jasnożółtym zabarwieniu w bardzo małej ilości.

4.2.2.3.3. Próba syntezy koniugatu cytydyny i ketoprofenu

Chlorek kwasowy ketoprofenu o masie 0,151 g (0,55 mmol) oraz 0,123 g cytydyny (0,5 mmol) rozpuszczono w 2 ml pirydyny. Otrzymany roztwór poddano działaniu reaktora mikrofalowego przez 5 cykli po 20 sekund (moc reaktora 400 W), a następnie mieszano przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Użyto wyparki próżniowej w celu odparowania rozpuszczalnika. Przeprowadzono rekrystalizację w metanolu. Wykonano

chromatografię kolumnową z zastosowaniem rozpuszczalnika DCM:MeOH 9:1. Z przeprowadzonej syntezy otrzymano oleistą substancję w bardzo niewielkiej ilości.

4.2.2.3.4. Próba syntezy koniugatu cytydyny i flurbiprofenu

Chlorek kwasowy flurbiprofenu o masie 0,15 g (0,53 mmol) oraz 0,123 g cytydyny (0,5 mmol) rozpuszczono w 2 ml pirydyny. Otrzymany roztwór poddano działaniu reaktora mikrofalowego o mocy 400 W przez 5 cykli po 20 sekund, a następnie mieszano przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Użyto wyparki próżniowej w celu odparowania rozpuszczalnika. Przeprowadzono rekrystalizację w metanolu. Z przeprowadzonej syntezy otrzymano oleistą substancję w niewielkiej ilości.

4.2.2.4. *Syntezy koniugatów cytydyny z chlorkami kwasowymi NLPZ z zabezpieczeniem grup hydroksylowych C-3' oraz C-5' cytydyny*

4.2.2.4.1. Reakcja cytydyny z chlorkiem kwasowym aspiryny

W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 0,125 g cytydyny (0,51 mmol) w 4 ml pirydyny. Do roztworu dodano 0,17 ml TIPDSiCl₂ (0,53 mmol) kroplami, w celu zabezpieczenia grup hydroksylowych C-3' i C-5'. Mieszano w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Otrzymano biały, siliłowany związek, do którego dodano 0,2 g chlorku kwasowego aspiryny (1 mmol) w 3 ml pirydyny. Mieszano w temperaturze pokojowej przez 48 godzin.

Do roztworu dodano 10 ml DCM oraz 10 ml nasyconego roztworu NaHCO₃. Ekstrahowano trzykrotnie z zastosowaniem DCM. Zebraną fazę organiczną osuszono siarczanem magnezu. Pozostawiono do odparowania. Uzyskano produkt w fazie oleistej.

Uzyskany koniugat odbezpieczono bez oczyszczania za pomocą 1 M TBAF w THF (0,3 ml). Całość mieszano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano kleisty, bezbarwny związek zanieczyszczony pirydyną, który następnie oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM:MeOH 9:1.

4.2.2.4.2. Reakcja cytydyny z chlorkiem kwasowym flurbiprofenu

Do roztworu cytydyny o masie 0,126 g (0,52 mmol) w pirydynie (4 ml) powoli, przy ciągłym mieszaniu, dodano 0,17 ml TIPDSiCl₂ w celu zabezpieczenia grup hydroksylowych w pozycjach C-3' i C-5'. Reakcję prowadzono w kolbie okrągłodennej, mieszając mieszaninę w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Otrzymano biały związek, który rozpuszczono w 3 ml pirydyny. Do otrzymanego roztworu wprowadzono chlorek kwasowy flurbiprofenu o masie 0,15 g (0,5 mmol). Mieszaninę ponownie mieszano w temperaturze pokojowej przez kolejne 24 godziny.

Do roztworu dodano 10 ml DCM oraz 10 ml nasyconego roztworu NaHCO₃. Ekstrahowano trzykrotnie z zastosowaniem DCM. Zebraną fazę organiczną osuszono siarczanem magnezu. Pozostawiono do odparowania. Uzyskano produkt w fazie oleistej.

Uzyskany koniugat odbezpieczono bez oczyszczania za pomocą 1 M TBAF w THF (0,3 ml). Całość mieszano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano kleisty, ciemnożółty związek zanieczyszczony pirydyną. metodą chromatografii kolumnowej w układzie eluentów DCM:MeOH 9:1.

4.2.2.5. *Syntezy koniugatów cytydyny z NLPZ z użyciem środka sieciującego DCC*

4.2.2.5.1. Synteza koniugatu cytydyny z kwasem acetylosalicylowym z użyciem DCC w DCM

W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 94 mg (0,52 mmol) aspiryny w 10 ml DCM, mieszano. Dodano kolejno 100 mg DCC (0,49 mmol), 57 mg HOSu (0,5 mmol) i 133 mg cytydyny (0,54 mmol). Mieszano 24 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mętny roztwór reakcyjny przesączono grawitacyjnie. Przesącz odparowano za pomocą wyparki próżniowej w 40°C. Produkt oczyszczono na złożu krzemionkowym za pomocą chromatografii kolumnowej z zastosowaniem mieszaniny toluenu:octanu etylu 10:1 do 6:1. Uzyskano produkt lekko żółty, kleisty z bardzo niską wydajnością.

4.2.2.5.2. Reakcja koniugatu cytydyny z kwasem acetylosalicylowym z użyciem DCC

W celu otrzymania koniugatu estrowego cytydyny i kwasu acetylosalicylowego przygotowano dwa roztwory:

Roztwór A: 360 mg aspiryny (2 mmol) rozpuszczono w 20 ml chloroformu, a następnie dodano 412 mg DCC (2 mmol). Po około 3 minutach mieszania roztwór zmętniał. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę.

Roztwór B: 486 mg cytydyny (2 mmol) i 16 mg DMAP rozpuszczono w 24 ml DMF. Mieszano około 15 minut.

Następnie dodano roztwór B do A i mieszano przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Roztwór był ciepły i zmętniał po około 3 minutach. Po reakcji wytrąciło się dużo białego osadu (N,N'-dicykloheksylomocznika, DCU), roztwór przesączono grawitacyjnie. Rozpuszczalnik z przesączu odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do otrzymanej pozostałości dodano zimnej wody (90 ml). Roztwór zmętniał, powstały gęste grudki białego produktu, które odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Przesącz był mętny, mleczny. Pozostałość w kolbie po przesączeniu rozpuszczono w metanolu. Wytworzyły się kryształy. Wykonano rekrytalizację z etanolu, oczyszczono na węglu aktywnym.

4.2.2.5.3. Reakcja koniugatu estrowego cytydyny z ibuprofenem z użyciem DCC

W celu otrzymania koniugatu estrowego cytydyny i ibuprofenu przygotowano dwa roztwory:

Roztwór A: W kolbie okrągłodennej umieszczono 413 mg ibuprofenu (0,2 mmol), rozpuszczono w 20 ml chloroformu, a następnie dodano 412 mg DCC (0,2 mmol). Po około 3 minutach mieszania roztwór zmętniał. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę.

Roztwór B: W kolbie okrągłodennej umieszczono 486 mg cytydyny (2 mmole) i 21 mg DMAP. Substancje rozpuszczono w 30 ml DMF (roztwór B). Mieszano około 15 minut.

Następnie dodano roztwór B do A i mieszano przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Nie zaobserwowano osadu DCU, mimo tego roztwór przesączono grawitacyjnie. Rozpuszczalnik z przesączu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do otrzymanej pozostałości dodano zimnej wody (90 ml). Roztwór podzielił się na dwie fazy. Pomiędzy fazami roztworu powstał biały osad. Odsączono roztwór pod zmniejszonym ciśnieniem. Klarowny przesącz odparowano z zastosowaniem wyparki próżniowej. Dodano 30 ml wody. Wytrącił się biały osad w bardzo dużej ilości. Ponownie odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Do przesączu dodano około 10 ml wody. Mniej mętny roztwór odsączono. Odparowano przesącz pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano klarowny, zatężony przesącz. Wykonano chromatografię kolumnową w układzie rozpuszczalników chloroform:metanol 1,5:8,5.

4.2.2.6. Synteza koniugatu cytydyny z użyciem środka sieciującego EDC

4.2.2.6.1. Synteza koniugatu cytydyny z ibuprofenem z użyciem EDCI w DMF:DMSO

Do 3 ml DMF:DMSO (3:1) dodano N-metylomorfolinę (0,065 ml; 0,6 mmol), mieszano około 5 minut. Następnie, kolejno 121 mg cytydyny (0,5 mmol), 81 mg HOBt (0,6 mmol), 123 mg ibuprofenu (0,6 mM), 153 mg EDCI (0,8 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną do 60°C przez 24 godziny. Po około 2 minutach mieszania, roztwór przybrał intensywnie żółte zabarwienie, klarowny.

Po 24 godzinach roztwór wleto do lodowatej wody, zaobserwowano szybkie mętnienie. Mieszaninę ekstrahowano octanem etylu 3 razy po 10 ml. Fazę organiczną przemyto 20% roztworem chlorku litu, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Osuszono nad bezwodnym MgSO₄.

Uzyskano bezbarwną fazę organiczną, z której odparowano rozpuszczalnik za pomocą wyparki próżniowej w temperaturze 70°C. W celu oczyszczenia związku zastosowano chromatografię cienkowarstwową w układzie rozpuszczalników toluen:octan etylu 1:1. Uzyskano kleisty związek o jasnożółtym zabarwieniu (wydajność 21%).

4.2.2.7. Synteza koniugatu estrowego gemcytabiny i kwasu acetylosalicylowego z wykorzystaniem DCC

W celu otrzymania koniugatu estrowego gemcytabiny i kwasu acetylosalicylowego przygotowano dwa roztwory:

Roztwór A: W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 360 mg kwasu acetylosalicylowego (2 mmol) w 20 ml chloroformu. Następnie dodano 412 mg DCC (2 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Po 5 minutach obserwowano zmętnienie mieszaniny.

Roztwór B: Do kolby okrągłodennej dodano 600 mg chlorowodoru gemcytabiny (2 mmol) oraz 20 mg DMAP. Substancje rozpuszczono w 30 ml DMF. Proces przyspieszono stosując łąźnię ultradźwiękową przez 8 minut. Otrzymano klarowny roztwór.

W kolejnym etapie połączono roztwór A i B, po czym kontynuowano mieszanie przy użyciu mieszadła magnetycznego w temperaturze pokojowej. Po 8 minutach, mieszanina ponownie uległa zmętnieniu, a reakcja przebiegała z wydzielaniem ciepła (reakcja egzotermiczna). Całość mieszano przez 48 godzin.

Po zakończeniu reakcji odsączono grawitacyjnie biały osad DCU, będący produktem ubocznym reakcji z użyciem DCC. Z przesączu odparowano częściowo rozpuszczalnik na wyparce próżniowej w 60°C, a następnie dodano 90 ml zimnej wody, co spowodowało zmętnienie roztworu. Osad przesączono grawitacyjnie. Przesącz ekstrahowano trzykrotnie z zastosowaniem octanu etylu. Zebraną fazę organiczną przemyto 5% roztworem HCl, nasyconym roztworem NaHCO₃ i solanką. Osuszono siarczanem magnezu. Pozostawiono do odparowania. Wykonano rekrytalizację w gorącym etanolu z oczyszczaniem na węglu aktywnym. Wykonano chromatografię cienkowarstwową w układzie eluentów chloroform:metanol 8,5:1,5. Z powodu wysokiego wysunięcia produktu na płycie chromatograficznej zastosowano inny układ eluentów DCM:octan etylu (6:1) i zwolnienia retencji.

4.2.2.8. *Synteza koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w stosunku molowym substratów 1:1 z wykorzystaniem DCC*

Przygotowano dwa roztwory:

Roztwór A: W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 412,6 mg ibuprofenu (2 mmol) w 20 ml chloroformu. Następnie, do roztworu dodano 412 mg DCC (2 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Otrzymano mętny roztwór.

Roztwór B: W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 600 mg chlorowodoru gemcytabiny (2 mmol) i 20 mg DMAP w 30 ml DMF. Mieszaninę poddano działaniu ultradźwięków przez 5 minut. Uzyskano klarowny roztwór.

Połączono roztwory A i B i kontynuowano mieszanie w temperaturze pokojowej. Po 6 minutach roztwór zmętniał, zaobserwowano zajście reakcji egzotermicznej. Roztwór mieszano przez kolejne 48 godzin. Odsączono grawitacyjnie biały osad DCU, który stanowi produkt uboczny. Następnie na wyparce odparowano część przesączu.

Do uzyskanej pozostałości dolano 90 ml zimnej wody. Przesącz ekstrahowano trzykrotnie z zastosowaniem octanu etylu. Zebraną fazę organiczną przemyto 5% roztworem HCl, nasyconym roztworem NaHCO_3 i solanką. Osuszono siarczanem magnezu. Pozostawiono do odparowania. Uzyskano produkt w fazie oleistej. Wykonano chromatografię cienkowarstwową w układzie eluentów chloroform:metanol 8,5:1,5.

4.2.2.8.1. *Preparatywna chromatografia cienkowarstwowa fazy organicznej*

W celu oczyszczenia otrzymanych koniugatów pochodzących z mieszanin poreakcyjnych zastosowano preparatywną chromatografię cienkowarstwową. Do komory chromatograficznej wprowadzono mieszaninę eluentów chloroform:metanol 8,5:1,5. Na płytkę TLC do zastosowań preparatywnych naniesiono całość organicznej fazy poreakcyjnej uzyskanej po syntezie koniugatu estrowego gemcytabiny i ibuprofenu. Po zakończeniu rozwijania, płytkę wyjęto z komory i pozostawiono do całkowitego wyschnięcia. Następnie przystąpiono do mechanicznego oddzielenia widocznych stref

odpowiadających poszczególnym izomerom – zeszkrobane fragmenty krzemionki zawierające wyodrębnione związki umieszczono w osobnych zlewkach. Każdą frakcję poddano ekstrakcji w gorącym etanolu, a następnie przesączono grawitacyjnie w celu usunięcia pozostałości stałych. Otrzymane roztwory analizowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej w celu oceny czystości i obecności produktów. Procedurę powtarzano do otrzymania czystego koniugatu.

4.2.2.9. *Synteza koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w stosunku molowym substratów 1:2 z wykorzystaniem DCC*

Przygotowano dwa roztwory:

Roztwór A: W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 2,042 g ibuprofenu (9,7 mmol) w 100 ml chloroformu. Następnie, do roztworu dodano 2,06 g DCC (9,7 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Otrzymano mętny roztwór.

Roztwór B: W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 1,5 g chlorowodoru gemcytabiny (5 mmol) i 100 mg DMAP w 30 ml DMF. Mieszaninę poddano działaniu ultradźwięków przez 5 minut. Uzyskano klarowny roztwór.

Połączono roztwory A i B i kontynuowano mieszanie w temperaturze pokojowej. Po 6 minutach roztwór zmętniał, zaobserwowano zajście reakcji egzotermicznej. Roztwór mieszano przez kolejne 48 godzin. Odsączono grawitacyjnie biały osad DCU, który stanowi produkt uboczny. Następnie na wyparce odparowano część przesączu.

Do uzyskanej pozostałości dolano 90 ml zimnej wody. Przesącz ekstrahowano trzykrotnie z zastosowaniem octanu etylu. Zebraną fazę organiczną przemyto 5% roztworem HCl, nasyconym roztworem NaHCO₃ i solanką. Osuszono siarczanem magnezu. Pozostawiono do odparowania. Uzyskano produkt w fazie oleistej. Wykonano chromatografię cienkowarstwową w układzie eluentów chloroform:metanol 8,5:1,5. W celu oczyszczenia produktu wykonano chromatografię preparatywną zgodnie z wcześniej podaną procedurą. Otrzymano związek o konsystencji przejrzystego kleju i jasnożółtym zabarwieniu.

Następnie związek analizowano za pomocą chromatografii HPLC przy długości fali 225 nm oraz 250 nm w układzie rozpuszczalników MeOH:H₂O 7:3.

4.2.2.10. Synteza koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w polu mikrofalowym w stosunku molowym substratów 2:1

Przygotowano dwa roztwory:

Roztwór A: W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 1,05 g ibuprofenu (5 mmol) w 50 ml chloroformu. Następnie, do roztworu dodano 1 g (5 mmol) DCC. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 5 minut (moc reaktora 400 W), co pewien czas mieszając. Otrzymano klarowny roztwór.

Roztwór B: W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 750 mg chlorowodoru gemcytabiny (2,5 mmol) i 50 mg DMAP w 50 ml DMF:DMSO 5:1. Mieszaninę ogrzewano w polu mikrofalowym przez 5 minut. Otrzymano klarowny roztwór.

Połączono roztwory A i B, a następnie prowadzono reakcję w polu mikrofalowym w 10 cyklach po 1 minucie, mieszając roztwór pomiędzy cyklami. Mieszano 48 godzin w temperaturze pokojowej. Odsączono grawitacyjnie biały osad DCU, który stanowi produkt uboczny. Następnie na wyparce odparowano część przesączu.

Do uzyskanej pozostałości dolano 90 ml zimnej wody. Przesącz ekstrahowano trzykrotnie z zastosowaniem octanu etylu. Zebraną fazę organiczną przemyto 5% roztworem HCl, nasyconym roztworem NaHCO₃ i solanką. Osuszono siarczanem magnezu. Pozostawiono do odparowania. Uzyskano produkt bezbarwny o kleistej konsystencji. Wykonano chromatografię cienkowarstwową w układzie eluentów chloroform:metanol 8,5:1,5. W celu oczyszczenia produktu wykonano chromatografię preparatywną zgodnie z wcześniej podaną procedurą. Otrzymano związek bezbarwny o konsystencji przejrzystego kleju.

Po dwukrotnym oczyszczaniu za pomocą chromatografii preparatywnej, wykonano analizę chromatograficzną TLC w odwróconej fazie RP-18F. Związek rozpuszczaono w mieszaninie MeOH:H₂O 7:3. Następnie związek analizowano za pomocą chromatografii HPLC przy długości fali 225 nm oraz 250 nm.

4.2.2.11. *Synteza koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w polu mikrofalowym w stosunku molowym substratów 1:1*

W celu otrzymania koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu z zastosowaniem reaktora mikrofalowego przygotowano dwa roztwory:

Roztwór A: W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 200 mg ibuprofenu (1 mmol) w 10 ml chloroformu. Następnie, do roztworu dodano 200 mg DCC (1 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 5 minut przy mocy reaktora 400 W, co pewien czas mieszając. Otrzymano klarowny roztwór.

Roztwór B: W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 150 mg chlorowodoru gemcytabiny (1 mmol) i 10 mg DMAP w 12 ml DMF. Mieszaninę ogrzewano w polu mikrofalowym przez 5 minut. Otrzymano klarowny roztwór.

Połączono roztwory A i B i poddano je działaniu pola mikrofalowego w 3 cyklach po 5 minut, z minutową przerwą pomiędzy cyklami. Następnie roztwór mieszano przez kolejne 24 godziny w temperaturze pokojowej. Odsączono grawitacyjnie biały osad DCU, który stanowi produkt uboczny. Następnie na wyparce odparowano część przesączu.

Zgodnie z procedurami powyżej wykonano trzykrotną ekstrakcję w octanie etylu i wodzie. Zebraną fazę organiczną przemyto 5% roztworem HCl, nasyconym roztworem NaHCO₃ i solanką i osuszono siarczanem magnezu. Uzyskano produkt w fazie oleistej. Wykonano chromatografię cienkowsarstwową w układzie eluentów chloroform:metanol 8,5:1,5. W celu oczyszczenia produktu wykonano chromatografię preparatywną.

4.2.2.12. *Synteza koniugatu amidowego gemcytabiny i ibuprofenu*

W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 591 mg chlorowodoru gemcytabiny (2 mmol) w 6 ml mieszaniny DMF:DMSO (3:1). Dodano 272 mg imidazolu (4 mmol) i mieszano 5 min w temperaturze pokojowej w celu zneutralizowania HCl. Po całkowitym rozpuszczeniu dodano 610 µL TIPDSiCl₂ (2,2 mmol) kroplami, wciąż mieszając. Roztwór

mieszano przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji, wlano mieszaninę do 70 mL zimnego eteru dietylowego. Wytracił się biały osad, który przefiltrowano na zimno i przemyto 3 razy eterem dietylowym.

Do kolby okrągłodennej dodano 412 mg ibuprofenu (2 mmol) i 3 mL DCM oraz 1 kroplę DMF. Powoli wkroplono 190 μ L SOCl_2 (2,5 mmol). Mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Po zakończeniu reakcji odparowano SOCl_2 i DCM.

4.2.2.12.1. Sprzężenie TIPDS-gemcytabiny i chlorku ibuprofenu

W celu otrzymania pochodnej amidowej gemcytabiny, zabezpieczonej grupą TIPDS (TIPDS-gemcytabina) zastosowano procedurę kondensacji z użyciem chlorku kwasowego ibuprofenu. Do roztworu TIPDS-gemcytabiny w 3 ml DMF dodano chlorek ibuprofenu rozpuszczony w 3 ml DCM. Pracowano na lodzie. Następnie wprowadzono 600 μ L (3 mmol) trietyloaminy pełniącej funkcję zasady wychytującej uwalniający się HCl. Reakcję prowadzono przez noc w temperaturze pokojowej mieszając. Utworzył się biały osad $\text{TEA} \cdot \text{HCl}$, który przesączono grawitacyjnie. Bezpośrednio po zakończeniu reakcji sprzęgania, bez uprzedniej izolacji powstałego produktu pośredniego, przystąpiono do usunięcia grup ochronnych TIPDS. W tym celu do przesączu dodano 5 ml THF. Powoli wkroplono 2 mL TBAF i mieszano 3 godziny w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji odbezpieczania kontrolowano za pomocą TLC w eluencie $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 8,5:1,5.

Po zakończeniu odbezpieczania do mieszaniny reakcyjnej dodano 10 ml zimnej wody destylowanej i ekstrahowano 3 razy 10 ml octanu etylu, a następnie przemyto 10 ml wody, 10 mL 5% roztworem HCl, 10 mL nasyconego NaHCO_3 oraz solanką. Fazę organiczną osuszono siarczanem magnezu i pozostawiono do odparowania. Otrzymano szklisty olej o jasnożółtym zabarwieniu.

4.2.2.13. Synteza koniugatu gemcytabiny z chlorkiem kwasowym ibuprofenu

Do kolby okrągłodennej dodano 412 mg ibuprofenu (2 mmol), rozpuszczono w 3 ml DCM z dodatkiem 1 kropli DMF pełniącego funkcję aktywatora. Powoli wkroplono 190 μ L SOCl_2 (2,5 mmol), stale mieszając i chłodząc kolbę reakcyjną. Mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Po zakończeniu reakcji odparowano SOCl_2 i DCM za pomocą wyparki próżniowej.

Do roztworu gemcytabiny (2 mmol) rozpuszczonej w 3 ml DMF dodano otrzymany wcześniej chlorek ibuprofenu rozpuszczony w 3 ml DCM. Następnie wprowadzono 600 μ L (3 mmol) trietyloaminy, mieszaninę reakcyjną chłodzono przez pół godziny. Reakcję prowadzono przez noc w temperaturze pokojowej, mieszano. Utworzył się biały osad TEA*HCl, który przesączono grawitacyjnie.

Po zakończeniu reakcji do mieszaniny reakcyjnej dodano 10 ml zimnej wody destylowanej i ekstrahowano 3 razy 10ml octanu etylu, przemyto 10 ml wody, 10 ml 5% roztworem HCl, 10 ml nasyconego NaHCO₃ oraz solanką. Fazę organiczną osuszono siarczanem magnezu, odparowano za pomocą wyparki próżniowej. Otrzymano szklisty olej o jasnożółtym zabarwieniu.

4.2.2.14. Oczyszczanie estrów i amidów gemcytabiny z ibuprofenem metodą chromatografii kolumnowej typu Flash z odwróconą fazą C18

Surowy produkt reakcji sprzęgania gemcytabiny z ibuprofenem uzyskanego metodą prowadzoną w temperaturze pokojowej, w polu mikrofalowym oraz z chlorkiem kwasowym ibuprofenu po wcześniejszym zabezpieczeniu grup hydroksylowych C-3' oraz C-5' gemcytabiny, poddano oczyszczaniu metodą chromatografii kolumnowej na kolumnie typu Flash z odwróconą fazą C18 (RediSep GOLD C18, 50 g). Produkty przeznaczone do oczyszczania rozpuszczono w 1 mL metanolu i dodano na kolumnę za pomocą strzykawki.

Rozdział przeprowadzono w systemie gradientowym przy użyciu mieszaniny metanolu i wody (MeOH:H₂O) jako fazy ruchomej. Do eluentów dodano 0,05% kwasu octowego, w celu zapobiegania tailingowi. Elucję monitorowano za pomocą detektora UV przy długościach fali 225 nm i 250 nm. Frakcje zbierano co 14 ml. Frakcje identyfikowano na podstawie analizy metodą TLC na płytkach z odwróconą fazą RP-18. Rozwijanie prowadzono w MeOH:H₂O 7:3, wizualizowano pod UV.

5. Wyniki badań

5.1. Część biologiczna

5.1.1. Izolacja komórek BM-MSC

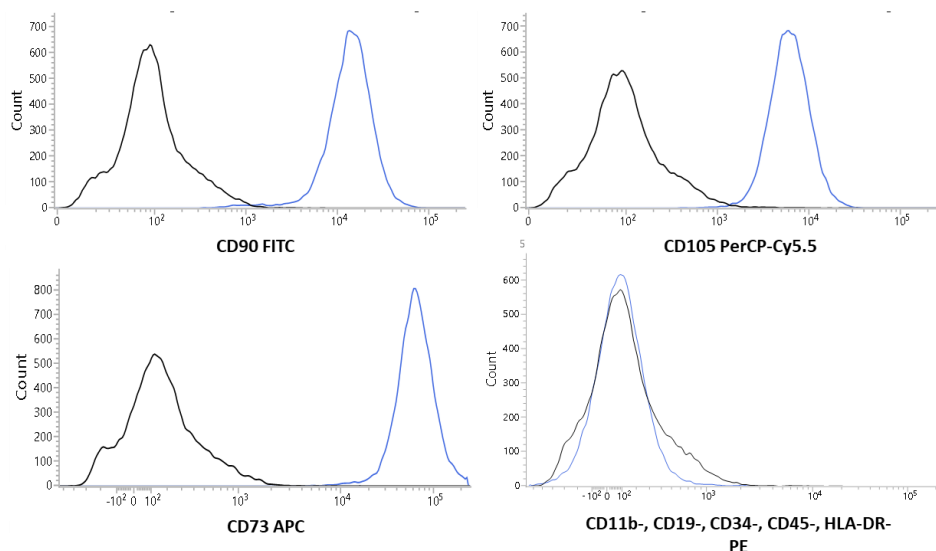
Komórki BM-MSC wyizolowano ze szpiku kostnego pobranego od zdrowych dawców szpiku. Materiał zawieszono w pożywce i dodano do butelek hodowlanych. Po 48 godzinach zaobserwowano na podłożu hodowlanym pojedyncze, adherentne komórki o wrzecionowatym kształcie (Rysunek 10.).



Rysunek 10. *Komórki BM-MSC wyizolowane ze szpiku kostnego obserwowane 48 godzinach hodowli.*
Pasaż 0. Powiększenie 10× (mikroskop świetlny Zeiss Axiovert).

5.1.2. Fenotyp komórek BM-MSC

Mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowane z ludzkiego szpiku kostnego (BM-MSC), wykazywały prawidłową morfologię, zdolność do adhezji do powierzchni naczynia hodowlanego oraz możliwość namnażania się w warunkach *in vitro*. Analiza cytometryczna przeprowadzona na komórkach w trzecim pasażu wykazała obecność charakterystycznych antygenów powierzchniowych dla komórek MSC: CD73+, CD90+ oraz CD105+, jednocześnie przy braku ekspresji markerów CD11b-, CD19-, CD34-, CD45- i HLA-DR- (Rysunek 11.).



Rysunek 11. Wykresy z cytometrii przepływowej przedstawiające charakterystykę immunofenotypową komórek BM-MSC. Potwierdzono obecność antygenów powierzchniowych charakterystycznych dla komórek BM-MSC (CD73, CD90 i CD105) oraz jednoczesny brak ekspresji markerów specyficznych dla linii komórek krwi (CD11b, CD19, CD34, CD45 i HLA-DR). Komórki MSC oznaczono kolorem niebieskim, natomiast izotypową kontrolę negatywną przedstawiono w kolorze czarnym.

5.1.3. Działanie cytotoksyczne GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU na BM-MSC oraz PCC

W teście cytotoksyczności MTS po 24 godzinach BM-MSC wykazały niewielką wrażliwość na GEM (Rysunek 12.) Przy najwyższym testowanym stężeniu 100 μ M GEM zaobserwowano spadek żywotności komórek o zaledwie 10%. Traktowanie komórek BM-MSC wybranym NLPZ nie wpływało istotnie na przeżycie komórek w 24-godzinny teście. Wykazano natomiast statystycznie istotne zwiększenie toksyczności kombinacji GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w porównaniu z samą GEM. Efekt ten był obserwowany dla szerokiego zakresu stężeń (10nM-100 μ M).

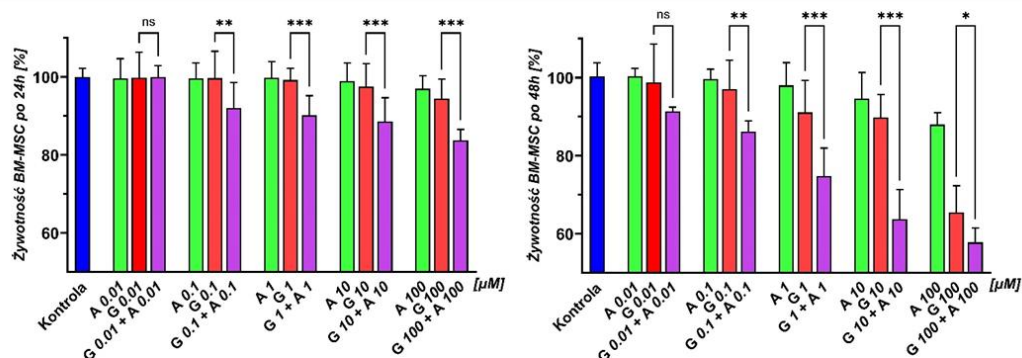
Dwudziestoczerogodzinna ekspozycja na stężenie GEM+ASA od 0,1 μ M i większa spowodowała istotne zmniejszenie żywotności BM-MSC, przy czym efekt nasilał się wraz ze wzrostem stężenia. Wysokie dawki kombinacji (GEM 100 μ M + ASP 100 μ M) po 48 godzinach powodowały spadek przeżywalności o ponad 40%.

Kombinacja GEM+IBU po 24 godzinach ekspozycji wywoływała istotny spadek żywotności przy stężeniach leków ≥ 1 μ M, a największy obserwowano dla 100 μ M GEM

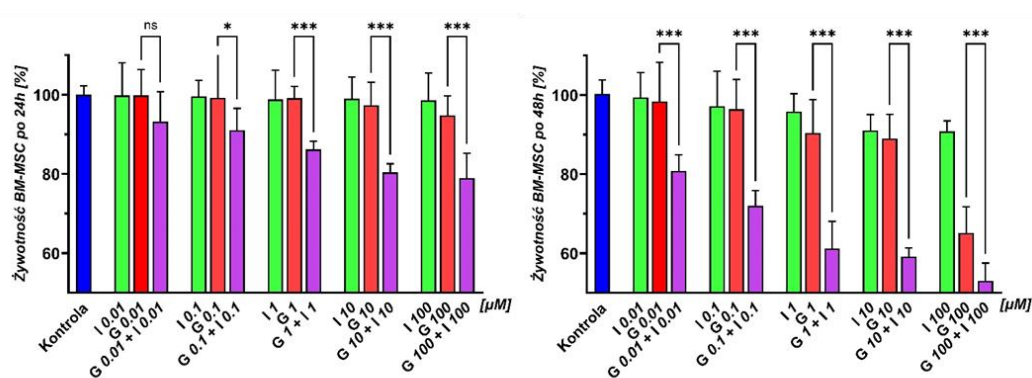
+ 100 μ M IBU. Po 48 godzinach efekt toksyczny był silniejszy, a zmniejszenie żywotności następowało w niższych stężeniach ($\geq 0,1 \mu$ M).

W przypadku GEM+FLU, po 24 godzinach nie odnotowano istotnych zmian żywotności BM-MSD dla większości kombinacji stężeń, z wyjątkiem tendencji spadkowej przy najwyższych dawkach leków. Po 48 godzinach ekspozycji, kombinacja GEM + FLU wywołała wyraźny spadek żywotności, istotny statystycznie od stężenia 0,01 μ M GEM, z największym efektem dla stężeń GEM 10–100 μ M + FLU 10–100 μ M.

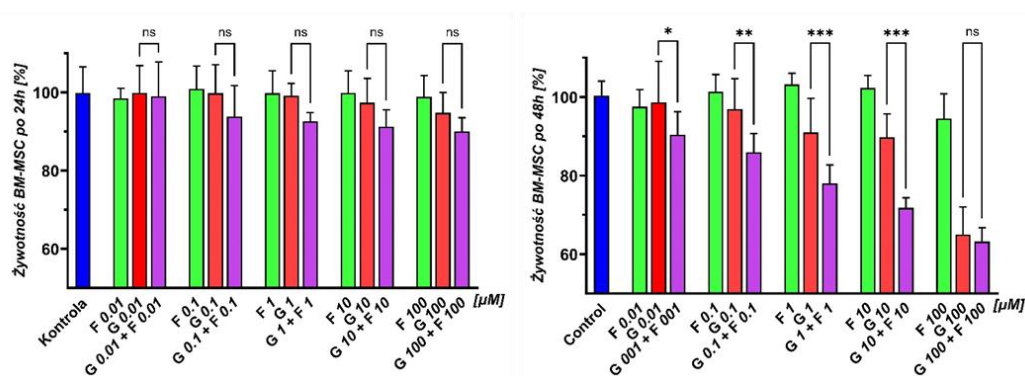
Gemcytabina + kwas acetylosalicylowy



Gemcytabina + ibuprofen



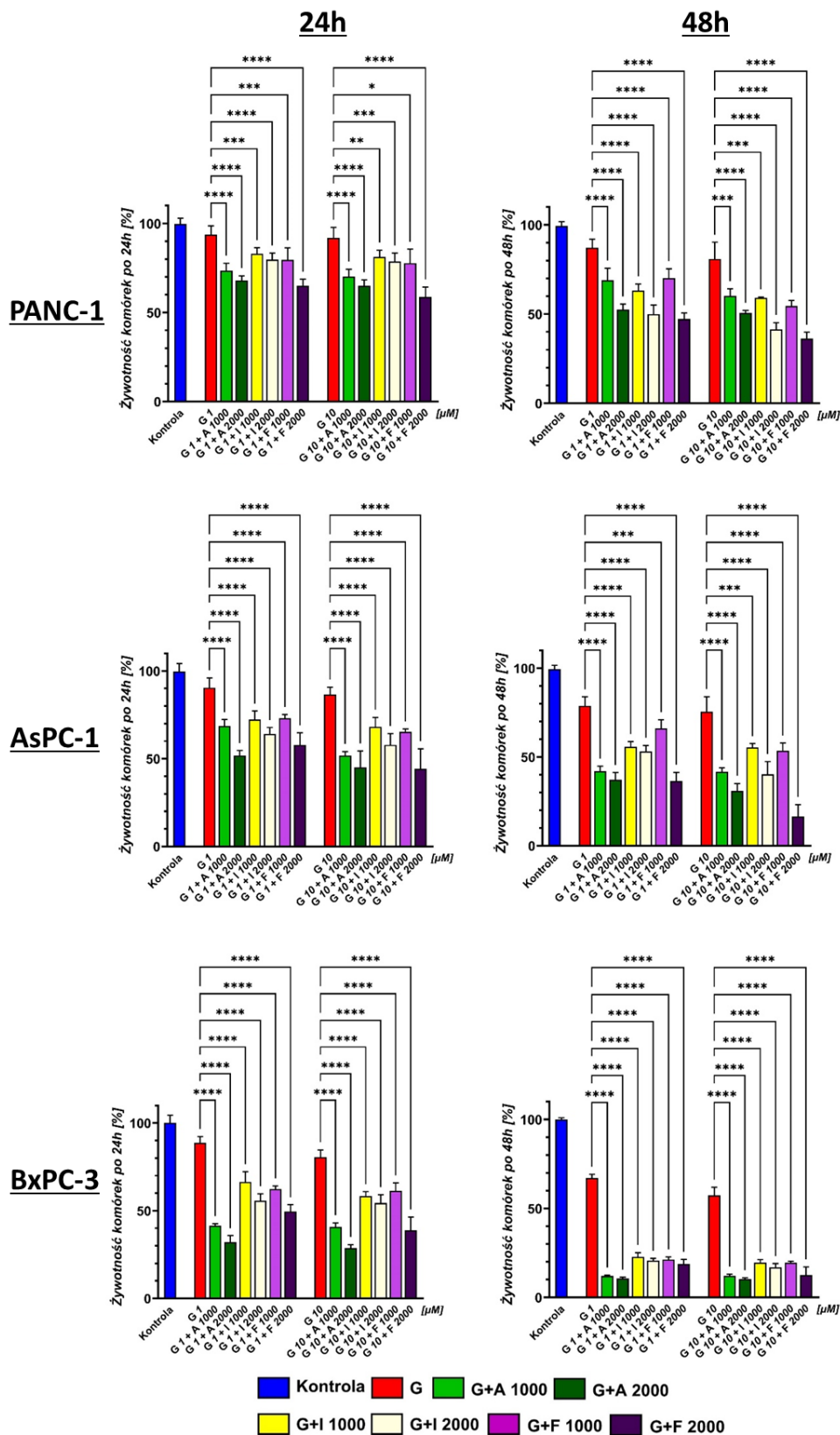
Gemcytabina + flurbiprofen



Rysunek 12. Żywotność BM-MSC poddanych działaniu ASA/IBU/FLU, GEM lub kombinacją leków GEM+ASA/IBU/FLU w równych stężeniach w zakresie 0,01μM -100μM. Kolorem niebieskim oznaczono kontrolę, zielonym – ASA/IBU/FLU, czerwonym – GEM, fioletowym – GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU. Efekt oceniano za pomocą testu MTS, a następnie analizowano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA) z zastosowaniem testu wielokrotnych porównań Sidaka, porównując grupy GEM i GEM + ASA/IBU/FLU w każdym badanym stężeniu (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z trzech niezależnych eksperymentów wykonanych w trzech powtórzeniach.

Analiza wpływu GEM stosowanej samodzielnie oraz w połączeniu z ASA, IBU oraz FLU, wykazała istotne statystycznie zmniejszenie przeżywalności komórek we wszystkich analizowanych liniach komórkowych nowotworowych trzustki (Rysunek 13.). Zastosowanie kombinacji leków w równych stężeniach prowadziło do wyraźnego nasilenia efektu cytotoksycznego w porównaniu do GEM, co było szczególnie widoczne po 48 godzinach inkubacji. W przypadku kombinacji GEM+ASA i GEM+FLU różnice statystycznie istotne odnotowano we wszystkich liniach po traktowaniu stężeniem związków 100nM+100nM i wyższym po dwudziestoczterogodzinnej inkubacji w porównaniu z samą GEM. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic po poddaniu działaniu GEM+IBU komórek linii PANC-1 po 24 inkubacji z lekami. Najsilniejszy efekt przeciwnowotworowy wykazano w przypadku kombinacji GEM + FLU – dla wszystkich testowanych stężeń i linii komórkowych odnotowano najniższe wartości przeżywalności. Obserwowane zmiany były istotnie niższe niż w grupie GEM oraz kombinacji GEM + ASA/IBU ($p < 0,001$). Wskazuje to, że zarówno ASA, IBU, jak i FLU mogą zwiększać skuteczność gemcytabiny, przy czym największy efekt synergistyczny we wszystkich badanych liniach PCC wykazuje FLU.

W celu dalszej oceny potencjału terapeutycznego połączeń lekowych, komórki linii PANC-1, AsPC-1 i BxPC-3 poddano działaniu GEM w dwóch stężeniach (1 μM i 10 μM) w połączeniu z wyższym stężeniem ASA, IBU oraz FLU w stężeniach 1000 i 2000 μM (Rysunek 14.). Po 24 i 48 godzinach inkubacji odnotowano istotne zmniejszenie przeżywalności wszystkich linii PCC w kombinacjach leków w porównaniu do samej GEM ($p < 0,0001$), a linią najbardziej wrażliwą na zastosowanie połączeń lekowych były komórki BxPC-3. Największy efekt cytotoksyczny uzyskano dla kombinacji GEM 10 μM + FLU 2000 μM , gdzie żywotność komórek spadła poniżej 40% w każdej z badanych linii. Kombinacje GEM + ASA oraz GEM + IBU również prowadziły do obniżenia żywotności w sposób istotny statystycznie w porównaniu do GEM zastosowanej samodzielnie. FLU natomiast wykazał najsilniejszy efekt cytotoksyczny w każdym modelu i czasie inkubacji, co czyni go najbardziej obiecującym kandydatem do terapii skojarzonej z GEM.



Rysunek 14. Żywotność komórek linii *PANC-1*, *AsPC-1*, *BxPC-3* po 24 i 48 godzinach traktowania GEM 1 μ M lub 10 μ M (kolor czerwony) oraz kombinacją leków w różnych stężeniach: GEM 1 μ M lub 10 μ M+ASA 1000 μ M (kolor jasnozielony),

GEM 1 μ M lub 10 μ M + ASA 2000 μ M (kolor ciemnozielony),
 GEM 1 μ M lub 10 μ M + IBU 1000 μ M (kolor żółty),
 GEM 1 μ M lub 10 μ M + IBU 2000 μ M (kolor jasnożółty),
 GEM 1 μ M lub 10 μ M + FLU 1000 μ M (kolor jasnofioletowy),
 GEM 1 μ M lub 10 μ M + FLU 2000 μ M (kolor ciemnofioletowy).

Efekt cytotoksyczny oceniano za pomocą testu MTS. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu analizy wariancji Welcha z korektą Brown-Forsythe'a, a następnie testem wielokrotnych porównań Dunnett's T3, porównując grupy: GEM 1 μ M z GEM 1 μ M + ASA/IBU/FLU 1 mM oraz GEM 1 μ M + ASA/IBU/FLU 2 mM, a także GEM 10 μ M z GEM 10 μ M + ASA/IBU/FLU 1mM oraz GEM 10 μ M + ASA/IBU/FLU 2mM (* p $\leq$ 0,05; ** p $\leq$ 0,01; *** p $\leq$ 0,001; ****p $\leq$ 0,0001). Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD) z trzech niezależnych eksperymentów wykonanych w trzech powtórzeniach.

Wartość IC₅₀ obliczono po 48 godzinach dla GEM oraz GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU (Tabela 5.) Dla linii komórkowej PANC-1, IC₅₀ kombinacji GEM+ASA, GEM+IBU, GEM+FLU w porównaniu z samą GEM wynosiło kolejno 106,1 μ M $\pm$ 8,8; 115,5 μ M $\pm$ 10,2; 109,3 μ M $\pm$ 9,6 do 228,2 μ M $\pm$ 16,3. Dla AsPC-1 138 μ M $\pm$ 9,8; 123,8 μ M $\pm$ 14,4; 104,3 μ M $\pm$ 7,3 do 194,6 μ M $\pm$ 11,2. A także dla BxPC-3 22,6 μ M $\pm$ 10,7; 38,7 μ M $\pm$ 9,6; 1,9 μ M $\pm$ 0,5 do 98,6 μ M $\pm$ 8,8, co wskazuje na szczególnie wysoką wrażliwość tej linii na kombinację GEM i NLPZ. Największą oporność zaobserwowano w przypadku BM-MSC, odpowiednio – 126 μ M $\pm$ 16,3; 110 μ M $\pm$ 11,2; 179,1 μ M $\pm$ 13,5179,1 do 240 μ M $\pm$ 19,8.

Związek	IC ₅₀ [μ M] $\pm$ SD			
	PANC-1	AsPC-1	BxPC-3	BM-MSC
GEM	228,2 $\pm$ 16,3	194,6 $\pm$ 11,2	98,6 $\pm$ 8,8	240 $\pm$ 19,8
GEM+ASA	106,1 $\pm$ 8,8	138 $\pm$ 9,8	22,6 $\pm$ 10,7	126 $\pm$ 16,3
GEM+IBU	115,5 $\pm$ 10,2	123,8 $\pm$ 14,4	38,7 $\pm$ 9,6	110 $\pm$ 11,2
GEM+FLU	109,3 $\pm$ 9,6	104,3 $\pm$ 7,3	1,9 $\pm$ 0,5	179,1 $\pm$ 13,5

Tabela 5. *Wartości IC₅₀ obliczone dla komórek PCC oraz BM-MSC po poddaniu ich działaniu GEM i GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU w równych stężeniach po 48 godzinach.*

5.1.3.1. Dobór stężeń leków do dalszych badań

Na podstawie uzyskanych wyników badań cytotoksyczności, do dalszych eksperymentów wybrano stężenie GEM 10 μ M, zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z ASA, IBU oraz FLU. Dla każdej kombinacji leków uwzględniono dwa stężenia NLPZ – 10 μ M oraz 2000 μ M.

Kryteria doboru opierały się na dwóch kluczowych założeniach:

1. Zachowanie wysokiej przeżywalności komórek BM-MSC, których potencjał jako nośniki leków planowano zbadać w następnych etapach.

2. Uzyskanie wyraźnego, lecz kontrolowanego efektu cytotoksycznego wobec PCC umożliwiającego obserwację ewentualnych różnic synergistycznych wynikających z zastosowania kombinacji GEM + NLPZ.

Wstępne analizy wykazały, że po 24 godzinach GEM 10 μ M + NLPZ 10 μ M powodują znaczny spadek żywotności komórek nowotworowych (średnio o 20–30% po 24 godzinach, względem kontroli), przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej przeżywalności BM-MSK (>85%). Taki układ umożliwia ocenę wczesnych efektów cytotoksycznych bez nadmiernego uszkodzenia komórek BM-MSK, co jest kluczowe dla dalszych testów z użyciem BM-MSK jako nośników. Niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym, który wykazywał najniższą cytotoksyczność względem BM-MSK, a najwyższą wobec komórek nowotworowych trzustki był flurbiprofen.

Dodatkowo, do analizy włączono także kombinację z wyższym stężeniem NLPZ – 2000 μ M, którego zastosowanie skutkowało silniejszą cytotoksycznością. Ujęcie tej grupy miało na celu umożliwienie bezpośredniego porównania wpływu zwiększonego stężenia NLPZ (przy zachowaniu tego samego stężenia GEM) na efekt terapeutyczny, co stanowi istotny punkt odniesienia dla oceny skuteczności terapii skojarzonej.

Wybrane kombinacje GEM oraz ASA, IBU oraz FLU do dalszych badań:

1. GEM 10 μ M,
2. GEM 10 μ M+ASA/IBU/FLU 10 μ M,
3. oraz GEM 10 μ M+ASA/IBU/FLU 2000 μ M.

5.1.4. Analiza cyklu komórkowego oraz morfologii PCC poddanych działaniu GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU

Wykonano analizę cyklu komórkowego komórek PCC poddanych działaniu GEM 10 μ M, GEM 10 μ M+ASA/IBU/FLU 10 μ M oraz GEM 10 μ M+ASA/IBU/FLU 2000 μ M (Rysunek 15). W kontroli (komórki nietraktowane) rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu był równomierny pomiędzy liniami, z przewagą populacji w fazie G1 (ok. 56–69%) oraz umiarkowanym udziałem fazy G2/M (ok. 23–31%). Traktowanie komórek PCC samą GEM (10 μ M) powodowało wzrost odsetka komórek w fazie G1 w liniach PANC-1 oraz AsPC-1 przy jednoczesnym spadku liczby komórek w fazie G2/M.

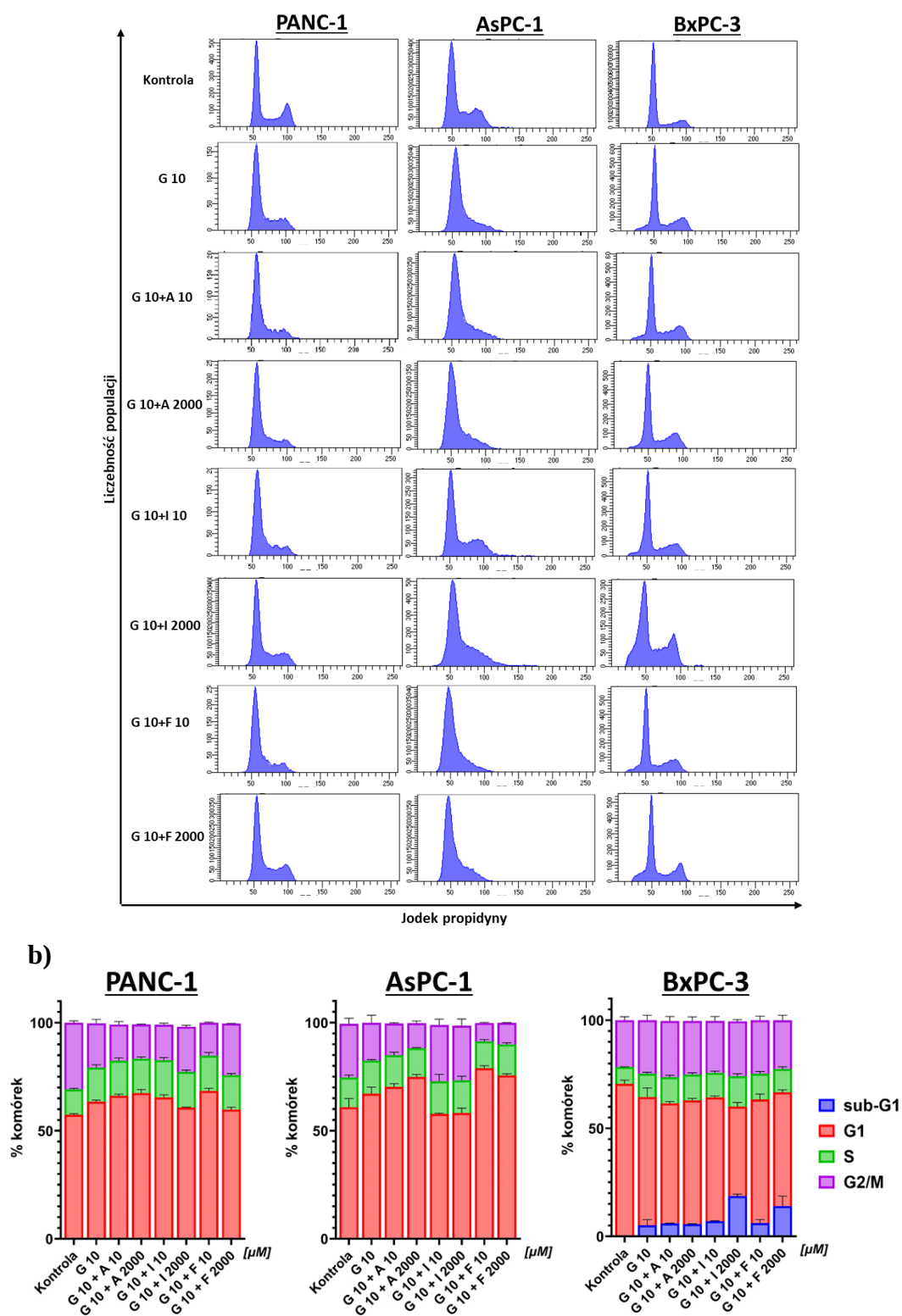
Zastosowanie kombinacji leków GEM + ASA w niższym stężeniu (10 μ M) spowodowało wzrost komórek w fazie G1 w przypadku linii PANC-1 i AsPC-1, z niewielkim spadkiem w fazie G2/M. Z kolei w linii BxPC-3 zaobserwowano zatrzymanie komórek w fazie G2/M i pojawienie się komórek w fazie spoczynkowej G0 (sub-G1). Wyższe stężenie ASA (2 mM) silniej kumulowało komórki w fazie G1 linii PANC-1 i AsPC-1, przy równoczesnym obniżeniu liczby komórek w fazie G2/M.

Dodatek IBU w obu stężeniach (10 μ M oraz 2000 μ M) do GEM 10 μ M wpłynął słabiej na zmianę rozkładu faz cyklu komórkowego w liniach PANC-1 i AsPC-1 w porównaniu z kontrolą. W komórkach linii BxPC-3 wyższe stężenie IBU (2000 μ M) wyraźnie obniżyło liczbę komórek w fazie G1 przy istotnym wzroście populacji G0 (18,1%), co może wskazywać na indukcję stanu spoczynkowego w tej linii.

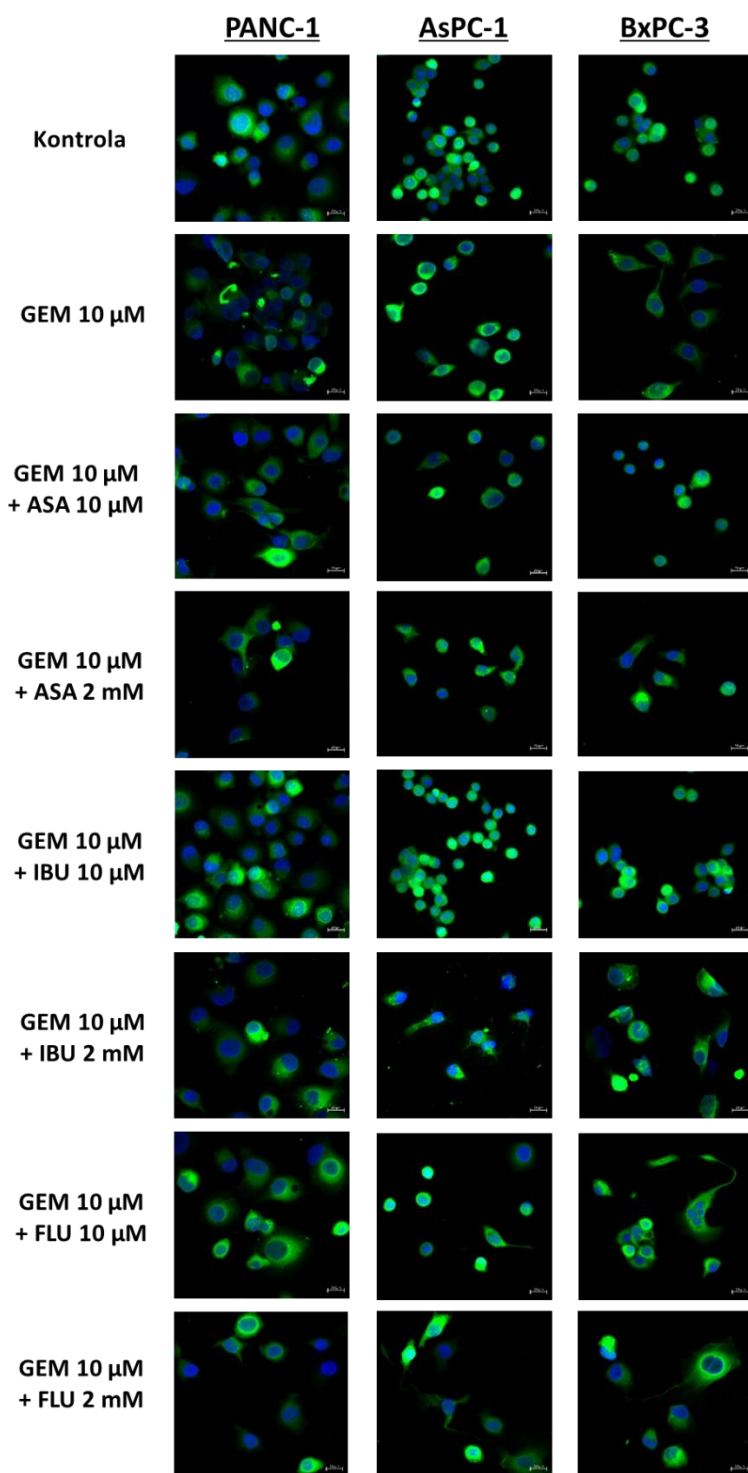
Zastosowanie kombinacji leków GEM 10 μ M+ FLU 10 μ M spowodowało największy wzrost odsetka komórek w fazie G1 w linii AsPC-1, co towarzyszyło wyraźnemu spadkowi populacji komórek w fazie G2/M. Przy wyższym stężeniu FLU (2000 μ M) obserwowano obniżenie liczby komórek w fazie G1 w linii PANC-1 w porównaniu do GEM oraz istotny wzrost populacji G0 w linii BxPC-3.

Obserwacja cyklu komórkowego trzech linii PCC po zastosowaniu kombinacji tych leków może wskazywać na występowanie odmiennego mechanizmu odpowiedzi na działanie leków w zależności od linii komórkowej, stężenia i rodzaju NLPZ.

Wpływ badanych leków skutkował również zmianami morfologii komórek oraz występowaniem wakuolizacji w liniach komórkowych PCC, co przedstawiono na Rysunku 16.



Rysunek 15. *Cykl komórkowy komórek PCC* po 24-godzinnej ekspozycji na GEM (10 μM), GEM + ASA/IBU/FLU (10 μM + 10 μM) oraz GEM + ASA/IBU/FLU (10 μM + 2 mM); (a) zależność liczby komórek od względnej intensywności fluorescencji jodku propidyny (cytometria przepływowa); (b) procentowy udział komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (sub-G1 – niebieski, G1 – czerwony, S – zielony, G2/M – fioletowy).



Rysunek 16. Zdjęcia komórek PCC po 24 godzinach traktowania GEM (10 μ M), GEM + ASA/IBU/FLU (10 μ M + 10 μ M) oraz GEM + ASA/IBU/FLU (10 μ M + 2 mM). Barwienie CFDA (zielony kolor cytoplazmy) i DAPI (zabarwione na niebiesko jądra komórkowe), powiększenie 40 $\times$, skala 20 μ m, mikroskop Zeiss).

5.1.5. Analiza apoptozy i nekrozy komórek PCC oraz BM-MSC po traktowaniu GEM+ASA/IBU/FLU

W celu oceny śmierci komórkowej przeprowadzono analizę apoptozy i nekrozy komórek linii PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 oraz BM-MSCs po 24 i 48 godzinach traktowania GEM (10 μ M) w połączeniu z ASA, IBU oraz FLU w stężeniu 10 μ M oraz 2000 μ M (Rysunek 17.). Analiza cytometryczna z użyciem barwienia aneksyną V i 7-AAD wykazała, że dodatek wszystkich badanych NLPZ do GEM nasila indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach w sposób zależny od czasu i stężenia leków.

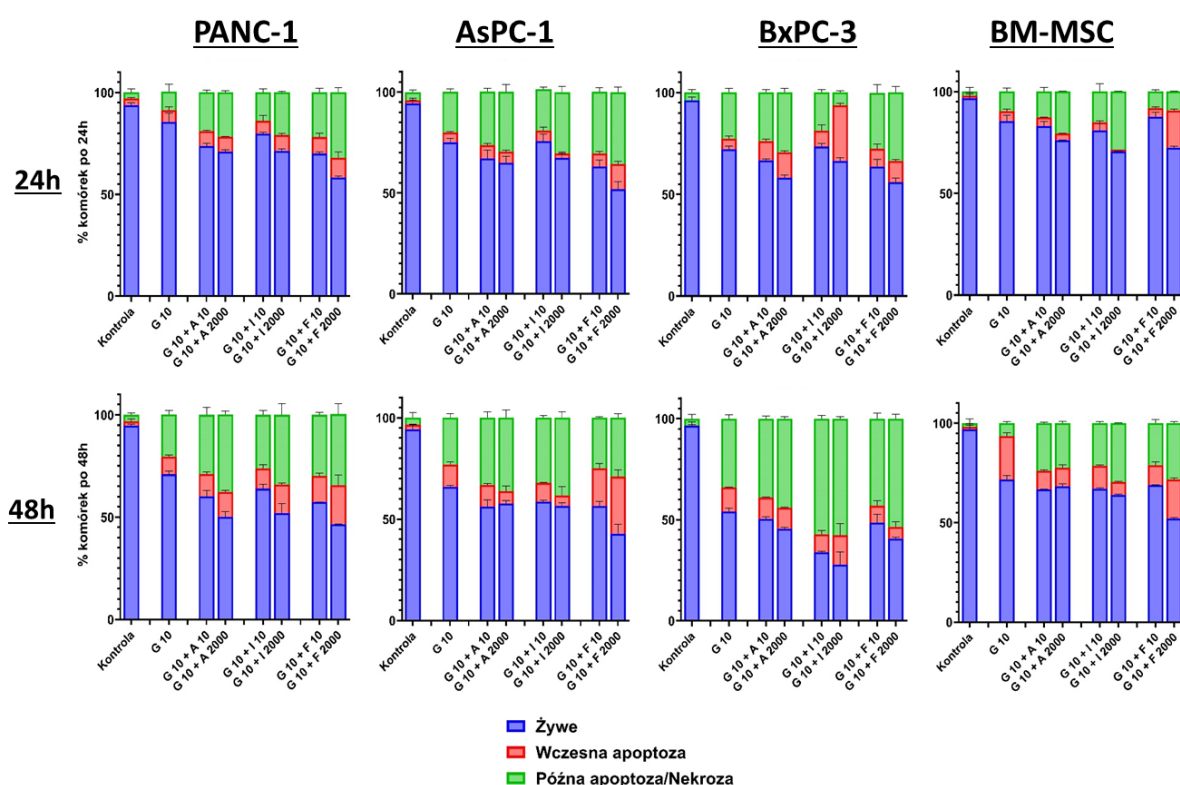
Najsilniejszy efekt po 24 godzinach obserwowano dla kombinacji GEM+FLU (10 μ M+2000 μ M), która prowadziła do istotnego zmniejszenia odsetka komórek żywych i dominacji populacji w późnej apoptozie/nekrozie we wszystkich badanych liniach PCC. Istotność statystyczna żywych komórek PCC między grupami GEM 10 μ M a GEM+FLU (10 μ M+10 μ M), GEM 10 μ M a GEM+FLU (10 μ M+2000 μ M) oraz GEM+FLU (10 μ M+10 μ M) a GEM+FLU (10 μ M+2000 μ M) wynosiła $p < 0,0001$ po 24 godzinach. Średni odsetek komórek żywych po 48 godzinach dla linii PANC-1, AsPC-1 oraz BxPC-3 wynosił odpowiednio $46,4\% \pm 0,1$, $42,8\% \pm 4,61$, $40,5\% \pm 5,78$ dla grupy traktowanej GEM+FLU (10 μ M+2000 μ M).

Dla linii PANC-1 oraz AsPC-1 kombinacja GEM+ASA oraz GEM+IBU wywoływała słabszy efekt niż GEM+FLU zarówno po 24, jak i 48 godzinach inkubacji. W przypadku linii BxPC-3 najwyższą cytotoksyczność po 48 godzinach zaobserwowano jednak po zastosowaniu kombinacji GEM+IBU (10 μ M+10 μ M) oraz (10 μ M+2000 μ M), gdzie przeżycie wynosiło odpowiednio $33,7\% \pm 0,28$ oraz $27,7\% \pm 8,25$ z istotnością statystyczną $p < 0,0001$ pomiędzy grupami GEM 10 μ M a GEM+IBU (10 μ M+10 μ M), GEM 10 μ M a GEM+IBU (10 μ M+2000 μ M) oraz GEM+IBU (10 μ M+10 μ M) a GEM+IBU (10 μ M+2000 μ M).

W komórkach BM-MSC zmiany były łagodniejsze, a odsetek komórek żywych pozostawał stosunkowo wysoki, co może świadczyć o ich mniejszej wrażliwości na zastosowane leki (w porównaniu z komórkami PCC). Linia BM-MSC wykazywała najwyższy odsetek komórek żywych po 24 godzinach po zastosowaniu kombinacji GEM+FLU (10 μ M + 10 μ M), który wynosił $87,68 (\pm 2,15)$. Różnice w przeżywalności BM-MSC po 24 godzinach pomiędzy grupami: GEM (10 μ M) vs. GEM+FLU (10 μ M +

10 μM), GEM (10 μM) vs. GEM+FLU (10 μM + 2 mM) oraz GEM+FLU (10 μM + 10 μM) vs. GEM+FLU (10 μM + 2 mM) były statystycznie istotne, odpowiednio $p < 0,5$, $p < 0,001$ oraz $p < 0,001$. Przeżycie komórek po zastosowaniu GEM+ASA/IBU/FLU 10 μM +2000 μM było zbyt niskie, by BM-MSC mogły być nośnikami takiej kombinacji i wynosiło 76,06% ($\pm 2,4\%$) dla GEM+ASA, 70,6% ($\pm 1,2\%$) dla GEM+IBU oraz 72,4% ($\pm 2,18\%$) dla GEM+FLU. W związku z tym stężenie NLPZ 2000 μM zostały wykluczone z dalszych badań dla oceny potencjału BM-MSC jako nośników.

Na podstawie zaprezentowanych wyników można przypuszczać, że komórki BM-MSC po dwudziestoczterogodzinnej inkubacji z GEM+FLU (10 μM + 10 μM), mogą potencjalnie pełnić rolę nośnika. Kombinacja ta wykazywała najsilniejsze działanie cytotoksyczne wobec testowanych komórek PCC, a jednocześnie najslabsze wobec komórek BM-MSC, których jak najwyższa żywotność ma znaczenie z punktu widzenia wykorzystania ich jako nośników leków.



Rysunek 17. *Apoptoza i nekroza komórek PCC oraz BM-MSC po 24h i 48h traktowania GEM (10 μM), GEM + ASA/IBU/FLU (10 μM + 10 μM) oraz GEM + ASA/IBU/FLU (10 μM + 2000 μM) (barwienie Annexin V i 7-AAD, cytometria przepływowa). Wykresy przedstawiają odsetek komórek żywych (niebieski), we wczesnej fazie apoptozy (czerwony) oraz w późnej fazie apoptozy/nekrozy (zielony) po zastosowaniu odpowiedniej kombinacji leków. Dane analizowano przy użyciu jednoczynnikowej analizy*

wariancji (one-way ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Sidaka, porównując GEM 10 μ M z GEM 10 μ M + ASA/IBU/FLU 10 μ M/GEM 10 μ M + ASA/IBU/FLU 2000 μ M oraz GEM 10 μ M + ASA/IBU/FLU 10 μ M z GEM 10 μ M + ASA/IBU/FLU 2000 μ M. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SD z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu.

5.1.6. Ocena aktywności cytotoksycznej pożywek kondycjonowanych znad BM-MSc na komórki PCC

Oceniono aktywność cytotoksyczną pożywek kondycjonowanych znad BM-MSc (CM, CM-GEM, CM-GEM+ASA, CM-GEM+IBU, CM-GEM+FLU) na komórki PCC (Rysunek 18.). Wykazano istotne obniżenie przeżycia komórek PCC po 48 i 72 godzinach inkubacji z CM-GEM oraz CM-GEM+ASA, CM-GEM+IBU, CM-GEM+FLU we wszystkich badanych liniach komórkowych, jednak nie wykazano statystycznie istotnych różnicy między poszczególnymi kombinacjami CM-GEM+ASA, CM-GEM+IBU, CM-GEM+FLU a CM-GEM. Istotność statystyczna między grupami: kontrola vs. CM-GEM oraz kontrola vs. CM-GEM+ASA, CM-GEM+IBU, CM-GEM+FLU wynosiła $p < 0,0001$ dla wszystkich badanych kombinacji we wszystkich liniach PCC po 48 i 72 godzinach inkubacji.

Po 24 godzinach traktowania odnotowano statystycznie istotne różnice w przeżyciu komórek linii PANC-1 w przypadku zastosowania CM-GEM oraz CM-GEM+ASA, CM-GEM+IBU, CM-GEM+FLU w porównaniu z kontrolą ($p < 0,0001$). W linii BxPC-3 istotnie zmniejszyła się populacja komórek po traktowaniu kombinacją CM-GEM+IBU, CM-GEM+FLU, kolejno $p < 0,01$ oraz $p < 0,001$.

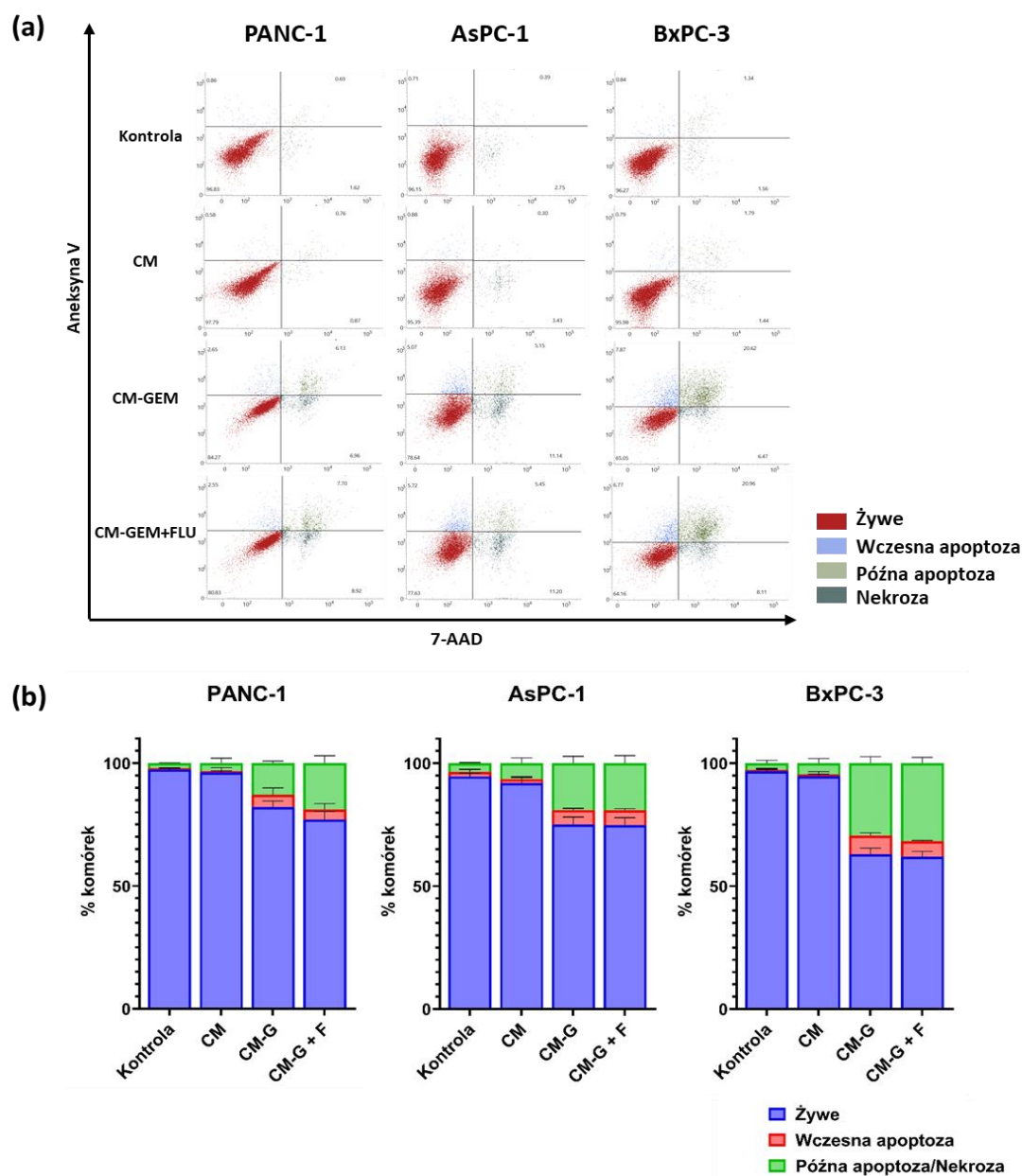
Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost komórek nowotworowych linii AsPC-1 po traktowaniu CM we wszystkich badanych punktach czasowych ($p < 0,0001$) w porównaniu z kontrolą. Odmienny efekt obserwowano w linii PANC-1 (istotne zmniejszenie populacji po 72h – $p < 0,0001$). W przypadku linii BxPC-3, traktowanie CM nie miało wpływu na żywotność komórek.

5.1.7. Analiza potencjału pożywek kondycjonowanych znad BM-MSc do indukowania apoptozy i nekrozy w komórkach PCC

Oceniono wpływ pożywek kondycjonowanych zebranych znad BM-MSc (CM, CM-GEM i CM-GEM+ FLU) na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach PCC (Rysunek 19.) Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost odsetka komórek apoptotycznych i nekrotycznych po 72 godzinach traktowania CM-GEM CM-GEM+FLU. W przypadku zastosowania CM-GEM, średni odsetek komórek żywych po 72 godzinach wynosił odpowiednio: 84,27% dla linii PANC-1, 78,64% dla AsPC-1 oraz 65,05% dla BxPC-3. Natomiast dla CM-GEM+FLU wartości te wynosiły odpowiednio: 80,83%, 77,63% i 64,16%.

Analiza statystyczna wykazała, że różnice w odsetku komórek żywych pomiędzy grupą kontrolną a grupami CM-GEM oraz CM-GEM + FLU były istotne dla wszystkich badanych linii PCC po 72 godzinach ($p < 0,001$). Z kolei porównania pomiędzy grupami CM-GEM i CM-GEM + FLU nie wykazały istotnych różnic.

Uzyskane wyniki wskazują, że połączenie gemcytabiny z flurbiprofenem w pożywce kondycjonowanej nie wywołało dodatkowego, istotnego statystycznie efektu redukcji żywotności komórek PCC w porównaniu z działaniem samego CM-GEM. Ponadto, zastosowanie pożywki kondycjonowanej zebranej znad BM-MSc nietraktowanych (CM) nie wpłynęło istotnie na zmniejszenie odsetka komórek żywych w badanych liniach nowotworowych trzustki.



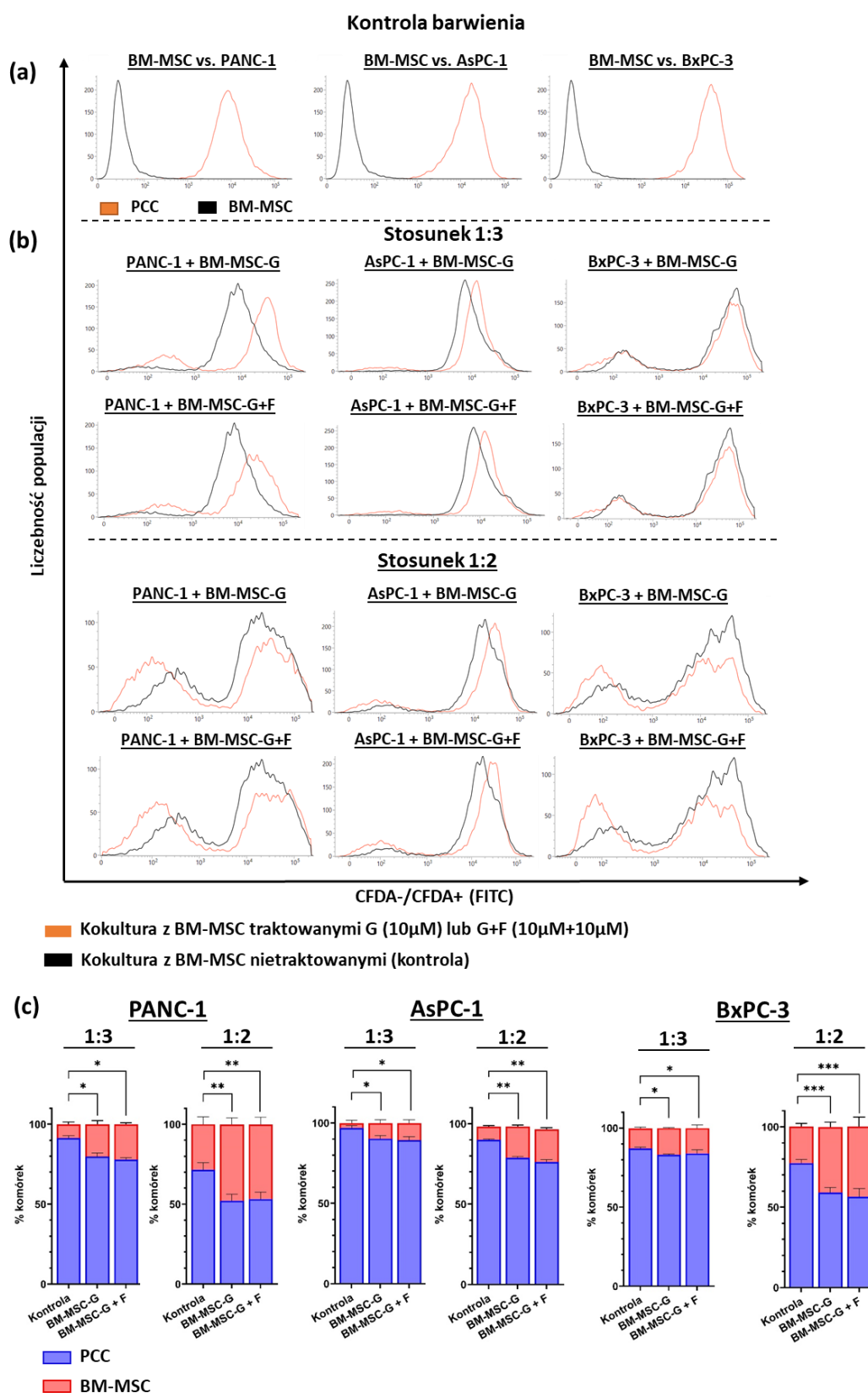
Rysunek 19. *Apoptoza i nekroza komórek nowotworowych trzustki po 72-godzinny traktowaniu CM, CM-GEM oraz CM-GEM + FLU. Komórki analizowano metodą cytometrii przepływowej po znakowaniu aneksyną V i 7-AAD, co pozwalało rozróżnić komórki żywe, we wczesnej fazie apoptozy oraz w późnej apoptozie oraz nekrozie. a) wykresy cytometrii przepływowej obrazujące rozkład poszczególnych populacji, b) wykresy porównujące procentowy udział komórek żywych (niebieskie), we wczesnej apoptozie (czerwone) oraz w późnej apoptozie/nekrozie (zielone) po poddaniu ich działaniu CM lub CM z dodatkiem leków. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA), a następnie testu wielokrotnych porównań Sidaka, porównując grupę CM z CM-GEM/CM-GEM + FLU oraz CM-GEM z CM-GEM + FLU. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SD z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentalnych.*

5.1.8. Kokultura BM-MSK traktowanych GEM i FLU z komórkami PCC

Analizę ilościową komórek PANC-1, AsPC-1 oraz BxPC-3, znakowanych barwnikiem CFDA, przeprowadzono po 24 godzinach kokultury z nietraktowanymi BM-MSK oraz z BM-MSK poddanymi działaniu GEM (10 μ M) lub GEM + FLU (10 μ M + 10 μ M). Kokulturę prowadzono w stosunku 1:3 oraz 1:2 (BM-MSK:PCC), co przedstawiono na Rysunku 20.

BM-MSK traktowane GEM, zarówno w zastosowaniu samodzielnym, jak i w połączeniu z FLU, wywoływały efekt cytostatyczny wobec badanych linii PCC. Szczególnie wyraźny efekt cytostatyczny obserwowano przy zastosowaniu traktowanych BM-MSK w stosunku 1:2, co zilustrowano na Rysunku 21b.

Nietraktowane BM-MSK, stosowane w stosunku 1:2 i 1:3, stymulowały wzrost komórek nowotworowych (Rysunek 21 c, kontrola). Dodatek FLU nie potęgował działania GEM, a analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy próbkami traktowanymi GEM (10 μ M) i GEM + FLU (10 μ M + 10 μ M).



Rysunek 20. *Kokultura PCC i BM-MSC po poddaniu BM-MSC działaniu GEM (10 μ M) oraz GEM + FLU (10 μ M + 10 μ M). Komórki PCC wcześniej znakowano barwnikiem CFDA, a badanie wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej. (a) Kontrola barwienia komórek PCC (linia pomarańczowa) i BM-MSC (linia*

czarna); (b) Porównanie kokultury nietraktowanej kontrolnej (linia czarna) z kokulturą badaną (BM-MS-C-GEM lub BM-MS-C-GEM + FLU) (linia pomarańczowa) w stosunku 1:3 lub 1:2 (BM-MS-C:PCC); (c) Wykresy przedstawiające procentowy udział komórek poszczególnych linii PCC i BM-MS-C w poszczególnych grupach. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu post hoc Holm-Sidak, porównując grupę kontrolną z GEM/GEM + FLU oraz GEM z GEM + FLU (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$) dla procentowego udziału PCC pomiędzy grupami. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SD z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentalnych.

5.1.9. Identyfikacja białek kaspazy-3, PARP1, p-Ser-GSK3 β oraz FAS metodą immunochemiczną (Western blot) w komórkach PCC po traktowaniu kombinacją GEM+FLU oraz pożywkami kondycjonowanymi znad BM-MS-C

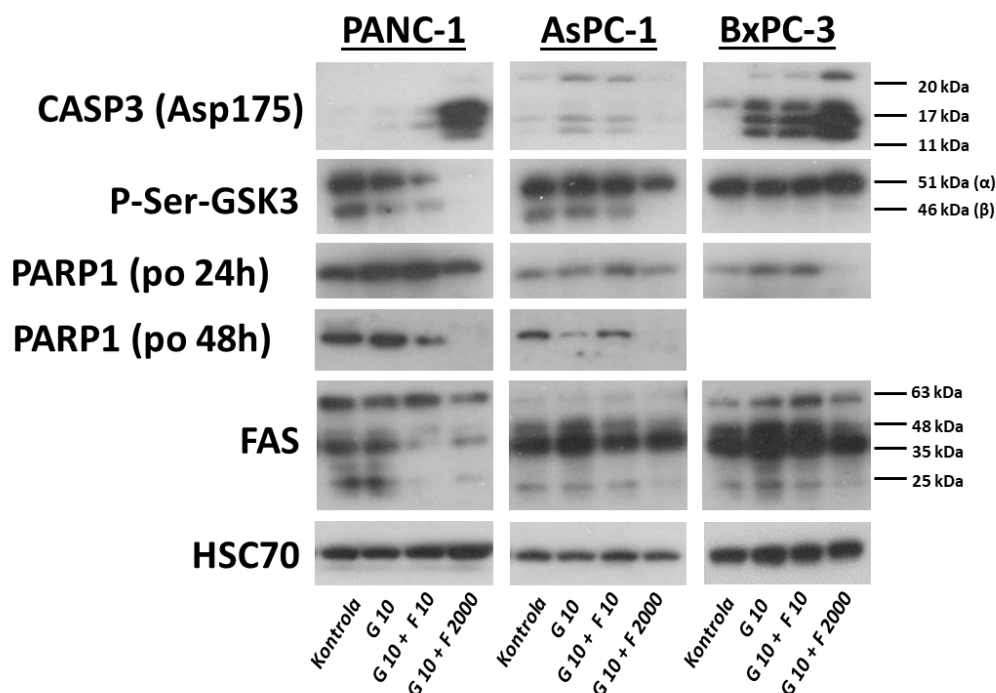
Na podstawie wcześniejszych wyników cytotoksyczności, cyklu komórkowego oraz apoptozy i nekrozy, do badań wykonanych techniką western blot wybrano kombinację GEM + FLU. Oceniono ekspresję białek kaspazy-3, PARP1, p-Ser-GSK3 β oraz FAS w wybranych liniach PCC po traktowaniu GEM (10 μ M), GEM + FLU (10 μ M + 10 μ M) oraz GEM + FLU (10 μ M + 2 mM) (Rysunek 21.) oraz mediów kondycjonowanych CM, CM-GEM oraz CM-GEM+FLU (Rysunek 22.).

Istotny wzrost ekspresji kaspazy-3 zaobserwowano w linii PANC-1 po zastosowaniu kombinacji GEM + FLU (10 μ M + 2000 μ M), co wskazuje na intensywną aktywację procesu apoptozy. Nie zaobserwowano zmian PARP1 po 24 godzinach w porównaniu z kontrolą, ale po 48 godzinach była niewykrywalna w przypadku zastosowania najwyższej dawki leków (10 μ M + 2000 μ M). Obniżenie poziomu p-Ser-GSK3 β , szczególnie po zastosowaniu kombinacji GEM + FLU (10 μ M + 2000 μ M) w linii PANC-1, może wskazywać na aktywację szlaku GSK3 β . Z kolei zmniejszona ekspresja FAS po traktowaniu GEM + FLU (10 μ M + 2000 μ M) może wynikać z zachodzących zmian w szlakach sygnalizacyjnych zależnych od receptorów śmierci komórkowej oraz zahamowanie ścieżki apoptozy opartej na FAS (Rysunek 21.). Po traktowaniu komórek PANC-1 CM-GEM i CM-GEM+FLU kaspaza-3 nadal była wyraźnie wykrywalna, mimo niższych zastosowanych dawek leków. Zaobserwowano także zwiększoną ekspresję PARP1 w porównaniu z kontrolą oraz CM. Ekspresja białka p-Ser-GSK3 β była niewykrywalna w przypadku CM-GEM i CM-GEM+FLU. Również ekspresja FAS malała po zastosowaniu CM-GEM+FLU, podobnie jak w przypadku stosowania samych leków (Rysunek 22.).

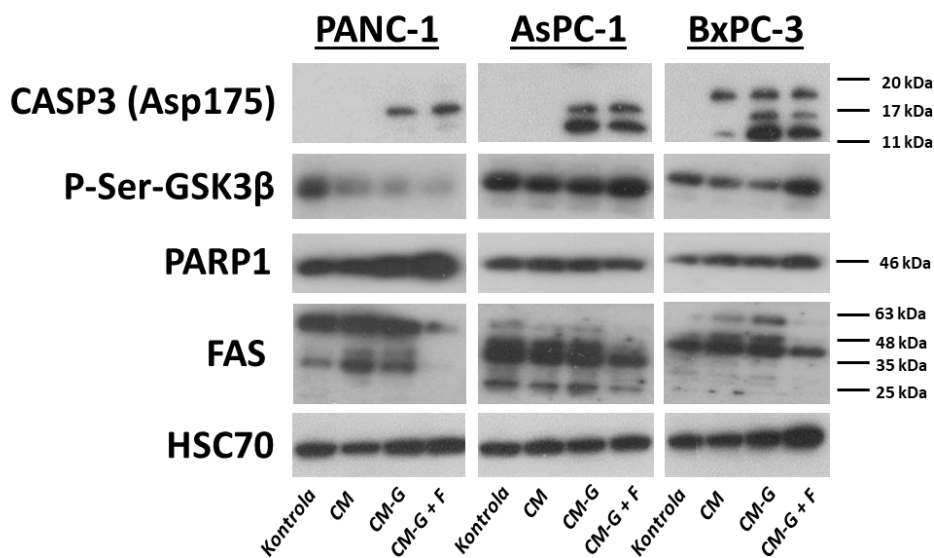
W komórkach linii AsPC-1 kaspaza-3 była obecna po traktowaniu GEM (10 μ M) oraz GEM+FLU (10 μ M+10 μ M), ale nie uwidoczniło jej po zastosowaniu kombinacji

GEM+FLU (10 μ M+2mM). Po traktowaniu GEM+FLU (10 μ M+2mM) ekspresja p-Ser-GSK3 β była niewykrywalna, a p-Ser-GSK3 α niższa w porównaniu z kontrolą i pozostałymi kombinacjami leków. Nie zaobserwowano zmian PARP1 po 24 godzinach w porównaniu z kontrolą, ale po 48 godzinach jego ilość obniżyła się do poziomu niewykrywalnego w przypadku traktowania GEM+FLU (10 μ M+2mM). Ekspresja FAS uległa obniżeniu po traktowaniu wyższą dawką leków (Rysunek 21.). Po zastosowaniu pożywki kondycjonowanej, ekspresja kaspazy-3 była wyraźnie widoczna (CM-GEM i CM-GEM+FLU), co wskazuje na obecność apoptozy w wyższym stopniu, niż w przypadku zastosowania samych leków. p-Ser-GSK3 β i PARP1 nie wykazywały widocznych zmian w ekspresji. Natomiast FAS był na niewykrywalnym poziomie po traktowaniu CM-GEM+FLU (Rysunek 22).

W przypadku linii BxPC-3 zastosowanie kombinacji GEM+FLU (10 μ M+2mM) doprowadziło do silnej aktywacji kaspazy-3. Ekspresja p-Ser-GSK3 α pozostawała stabilna we wszystkich warunkach. Ekspresja PARP1 nie była widoczna już po 24 godzinach w przypadku zastosowania kombinacji GEM+FLU (10 μ M+2mM) wskazując na silną aktywację procesu apoptozy. FAS wykazywał większą ekspresję przy zastosowaniu GEM oraz GEM+FLU (10 μ M+10 μ M), natomiast malał przy największej dawce GEM+FLU (10 μ M+2mM) (Rysunek 21.). Traktowanie CM-GEM oraz CM-GEM+FLU również doprowadziło do wzrostu ekspresji kaspazy-3, mimo niższej zastosowanej dawki leków. Poziom p-Ser-GSK3 β wzrastał po traktowaniu CM-GEM+FLU, co wskazuje na inhibicję GSK3 β i może sugerować zupełnie odmienny mechanizm regulacji w porównaniu do bezpośredniego traktowania lekami. Ekspresja PARP1 zwiększyła się, co może świadczyć o wzmożonych procesach naprawy DNA. Ekspresja białka FAS, podobnie jak przy zastosowaniu samych leków, zwiększyła się po traktowaniu CM-GEM, natomiast zanikała w przypadku CM-GEM+FLU, co ponownie wskazuje na specyficzne zmiany w szlaku sygnalizacyjnym zależnym od receptorów śmierci komórkowej w tej linii komórkowej po poddaniu ich dodatkowemu działaniu FLU (Rysunek 22.).



Rysunek 21. *Ekspresja CASP3, P-Ser-GSK3 α i β , FAS oraz HSC70* (kontrola) po poddaniu działaniu komórek PCC: GEM (10 μ M), GEM+FLU (10 μ M+10 μ M) oraz GEM+FLU (10 μ M+2000 μ M) przez 24h. Ekspresja PARP1 przedstawiona jest po 24h i 48h. Badanie przeprowadzono metodą western blot na komórkach linii PANC-1, AsPC-1, BxPC-3.



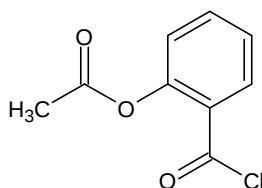
Rysunek 22. *Ekspresja CASP3, P-Ser-GSK3 α i β , FAS oraz HSC70* (kontrola) po poddaniu działaniu komórek PCC: CM, CM-GEM oraz CM-GEM+FLU przez 72h. Badanie przeprowadzono metodą western blot na komórkach linii PANC-1, AsPC-1, BxPC-3.

5.2. Część chemiczna

5.2.1. Syntezy chlorków kwasowych NLPZ

W ramach badań przeprowadzono syntezę chlorków kwasowych wybranych NLPZ: kwasu acetylosalicylowego, ibuprofenu, flurbiprofenu, ketoprofenu i naproksenu. Syntezy zostały przeprowadzone przy użyciu chlorku tionylu w stosunku molowym 1:2,5 w chloroformie, z zastosowaniem sonikacji i aktywacji mikrofalowej, co umożliwiło skrócenie czasu reakcji i ograniczenie degradacji substratów. Produkty oczyszczono metodą rekrytalizacji z węglem aktywnym, uzyskując chlorki kwasowe o wydajności 81–90%.

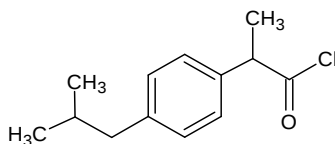
- a. Chlorek kwasowy kwasu acetylosalicylowego [o-acetoksybenzylowy chlorek] (wydajność 85%, temperatura topnienia 79°C, masa molowa 198,6 g/mol)



^{13}C -NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 169.86, 169.70, 151.28, 134.87, 132.52, 126.16, 124.02, 122.26, 21.00.

^1H -NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 9.49 (s, 1H), 8.15 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.65 (td, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.42 – 7.34 (m, 1H), 7.20 – 7.13 (m, 1H), 2.37 (s, 3H)

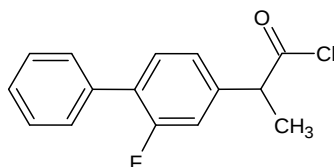
- b. Chlorek kwasowy ibuprofenu [(2-(4-izobutylofenylo)propanoilo)-chlorek] (wydajność 90 %, temperatura topnienia 90°C, masa 224,72 g/mol)



^{13}C -NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 180.72, 140.86, 136.99, 129.40, 127.29, 45.06, 44.95, 30.16, 22.40, 18.12.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform- d) δ 8.80 (s, 1H), 7.29 – 7.21 (m, 2H), 7.16 – 7.10 (m, 2H), 3.74 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 2.47 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 1.87 (dp, J = 13.5, 6.7 Hz, 1H), 1.53 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.6 Hz, 6H)

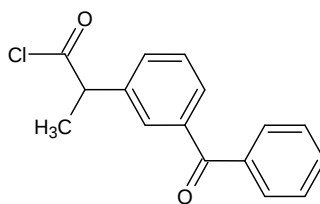
- c. Chlorek kwasowy flurbiprofenu [(2-(3-fluoro-4-biphenyl)propanilo-chlorek)]
(wydajność 84 %, temperatura topnienia 108°C, masa 262,723 g/mol)



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, Chloroform- d) δ 179.94, 179.78, 140.99, 140.92, 135.44, 131.35, 130.92, 130.88, 128.98, 128.95, 128.53, 128.46, 128.26, 127.95, 127.72, 123.98, 123.94, 123.70, 123.66, 115.88, 115.64, 115.51, 115.28, 56.79, 44.82, 18.56, 18.01

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.61 – 7.53 (m, 3H), 7.57 – 7.42 (m, 5H), 7.41 (s, 1H), 7.42 – 7.31 (m, 1H), 7.24 – 7.11 (m, 2H), 7.07 – 6.95 (m, 1H), 4.19 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 3.82 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 1.67 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 1.57 (dd, J = 18.7, 7.2 Hz, 3H)

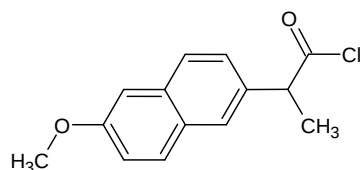
- d. Chlorek kwasowy ketoprofenu [(2-(3-benzoilofenylo)propanilo-chlorek)]
(wydajność 86 %, temperatura topnienia 95°C, masa 272,72 g/mol)



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, Chloroform- d) δ 196.50, 180.04, 140.12, 137.96, 137.44, 132.56, 131.66, 130.11, 129.36, 129.28, 128.62, 128.33, 45.22, 18.12

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform- d) δ 9.96 (s, 1H), 7.86 – 7.75 (m, 3H), 7.71 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.60 (dt, J = 7.6, 5.6 Hz, 2H), 7.48 (dt, J = 9.6, 7.7 Hz, 3H), 3.85 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 1.58, (d, J = 7.2 Hz, 3H)

- e. Chlorek kwasowy naproksenu [(2-(6-metoksynaftalen-2-yl)propanilo-chlorek)]
(wydajność 81 %, temperatura topnienia 104°C, masa 248,7 g/mol)



^{13}C -NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 175.15, 157.67, 135.70, 133.72, 129.28, 128.96, 127.19, 126.20, 125.95, 119.00, 105.63, 55.32, 52.04, 45.37, 18.60.

^1H -NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.76 – 7.67 (m, 3H), 7.43 (dd, J = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.20 – 7.11 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.88 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 1.61 (d, J = 7.2 Hz, 3H)

Analiza widm ^1H i ^{13}C NMR potwierdziła strukturę oczekiwanych chlorków kwasowych. W widmach ^{13}C NMR obserwowano charakterystyczne sygnały karbonylowe chlorków kwasowych w zakresie 169–180 ppm (chlorki kwasowe kwasu acetylosalicylowego, ibuprofenu, flurbiprofenu, naproksenu) oraz dodatkowy sygnał ketonowy przy 196 ppm w przypadku chlorku kwasowego ketoprofenu. Sygnały aromatyczne i alkilowe odpowiadały przewidywanym wartościom chemicznym dla danego NLPZ. W widmach ^1H -NMR obecne były protony aromatyczne, bocznych łańcuchów alkilowych oraz charakterystyczne dla protonów przy grupach karbonylowych.

Mimo, że widma NMR wskazywały na czystość produktów bez widocznych zanieczyszczeń organicznych, obserwowano szybkie hydrolizowanie chlorków kwasowych w kontakcie z wilgocią, co jest charakterystyczne dla tej grupy związków. Uzyskane wydajności (81–90%) wskazują na skuteczność zastosowanej procedury, jednak krótka trwałość produktów wymaga szybkiego dalszego wykorzystania w reakcjach pośrednich, np. amidacji, czy estryfikacji. Metoda mikrofalowa i sonikacja pozwoliły ograniczyć degradację substratów i skrócić czas reakcji w porównaniu do klasycznych procedur chlorku tionylu w temperaturze pokojowej lub podgrzewanych.

5.2.2. Syntezy koniugatów cytydyny z chlorkami kwasowymi NLPZ

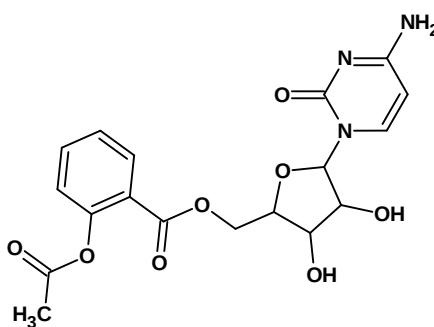
5.2.2.1. Synteza koniugatu cytydyny z chlorkiem kwasu acetylosalicylowego

W procesie syntezy otrzymano koniugat cytydyny z kwasem acetylosalicylowym w postaci białego ciała stałego. Reakcję przeprowadzono w pirydynie, stosując chlorek kwasu acetylosalicylowego jako czynnik acylujący. W celu przyspieszenia procesu zastosowano technikę aktywacji mikrofalowej. Otrzymano 0,050 g produktu, co odpowiada 52% wydajności.

Strukturę związku potwierdzono za pomocą spektroskopii NMR. W widmie ^1H NMR uwidoczniono sygnały charakterystyczne zarówno dla fragmentu cytydyny, jak i pierścienia benzenowego reszty acetylosalicylowej. Widmo ^{13}C NMR potwierdza obecność sygnału węgla karbonylowego przy 172,37 ppm, a także sygnały charakterystyczne dla szkieletu rybozy i fragmentów aromatycznych. Całokształt danych spektroskopowych wskazuje na otrzymanie koniugatu estrowego cytydyny i aspiryny w pozycji C-5' cytydyny.

Wzór: $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_8$

Masa molowa: 405,36 g/mol



Widma NMR:

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 172.37 (s), 161.74 (s), 142.70–142.37 (m), 135.79 (s), 130.72 (s), 119.40 (s), 117.46 (s), 89.78 (s), 84.66 (s), 74.41 (m), 69.78 (s), 40.02 (dp, $J = 4.19, 21.0$ Hz).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.58 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), δ 7.94 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), δ 7.79 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), δ 7.62 (s, 1H), δ 7.44 (ddd, $J = 13.0, 10.7, 6.4$ Hz, 1H), δ 6.91 (dd, $J = 14.0, 7.6$ Hz, 1H), δ 5.77 (dd, $J = 8.2, 5.8$ Hz, 1H), δ 5.32 (s, 1H), δ 5.02 (s, 1H), δ 3.93 (dd, $J = 14.9, 5.5$ Hz, 1H), δ 3.80 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), δ 3.50 (dt, $J = 14.6, 3.5$ Hz, 1H), δ 2.51 (s, 3H)

5.2.2.2. *Syntezy koniugatów cytydyny z chlorkiem kwasowym naproksenu*

Synteza koniugatu cytydyny i naproksenu zakończyła się uzyskaniem produktu z bardzo niską wydajnością. Pomimo wielokrotnego oczyszczania metodą chromatografii kolumnowej, w analizie TLC nie uzyskano czystego produktu, co wskazuje na obecność mieszaniny związków i/lub częściową degradację produktu w trakcie syntezy lub oczyszczania. Ilość uzyskanego materiału była niewielka, co uniemożliwiło przeprowadzenie pełnej charakterystyki strukturalnej.

5.2.2.3. *Syntezy koniugatów cytydyny z chlorkiem kwasowym ketoprofenu oraz flurbiprofenu*

W analogicznej procedurze syntezy zastosowanej dla chlorków kwasowych ketoprofenu oraz flurbiprofenu, nie uzyskano oczekiwanych produktów estryfikacji z cytydyną. Po przeprowadzonych reakcjach oraz długotrwałym oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej otrzymano znikome ilości związków. Obserwacje te wskazują na możliwość degradacji reagentów lub otrzymanych produktów reakcji. Szczególnie podatne na hydrolizę lub rozpad są chlorki kwasów karboksylowych.

5.2.3. **Synteza koniugatów cytydyny z kwasem acetylosalicylowym z użyciem środka sieciującego DCC**

5.2.3.1. *Synteza koniugatu cytydyny z kwasem acetylosalicylowym w układzie DCC/HOSu*

Syntezę koniugatu cytydyny z kwasem acetylosalicylowym przy użyciu DCC/HOSu w DCM przeprowadzono na podstawie procedury opisanej w pracy Brzuski i in. [181]. W wyniku syntezy otrzymano produkt kleisty, co uniemożliwiło zbadanie

temperatury topnienia oraz o bardzo niskiej wydajności. Widma ^1H i ^{13}C -NMR wskazują na obecność zarówno fragmentów cytydyny, jak i salicylanu, jednak widoczne są także liczne sygnały alifatyczne charakterystyczne dla DCU, będącego ubocznym produktem aktywacji DCC. W chromatografii TLC zaobserwowano co najmniej dwa produkty, co wskazuje na powstanie mieszaniny izomerów O-acylo-cytydyny. Otrzymany materiał nie stanowi czystego związku i nie pozwala na jednoznaczną identyfikację struktury, ogranicza to możliwość pełnej charakterystyki fizykochemicznej.

Widma NMR:

^1H -NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.26 – 8.18 (m, 1H), 8.17 (dd, $J = 16.9, 1.7$ Hz, 1H), 8.05 – 7.98 (m, 1H), 7.98 (dd, $J = 7.5, 1.7$ Hz, 1H), 7.98 – 7.93 (m, 1H), 7.95 – 7.87 (m, 1H), 7.87 – 7.77 (m, 2H), 7.80 – 7.75 (m, 2H), 7.77 – 7.70 (m, 1H), 7.72 – 7.67 (m, 1H), 7.67 – 7.24 (m, 18H), 7.26 – 7.14 (m, 2H), 6.98 – 6.85 (m, 4H), 4.65 (tt, $J = 12.1, 3.7$ Hz, 1H), 2.55 (s, 5H), 2.30 – 2.17 (m, 11H), 1.91 (s, 1H), 1.83 – 1.74 (m, 3H), 1.74 – 1.65 (m, 3H), 1.58 – 1.42 (m, 1H), 1.41 – 1.27 (m, 2H), 1.29 – 1.21 (m, 1H), 1.23 (s, 2H), 1.15 (dddd, $J = 23.1, 13.7, 9.3, 3.4$ Hz, 1H), 0.82 – 0.67 (m, 1H).

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO) δ 172.39, 169.67, 169.54, 169.42, 166.08, 165.93, 162.93, 161.68, 161.26, 153.33, 152.86, 151.01, 150.65, 150.20, 146.98, 136.50, 135.97, 135.31, 134.47, 134.28, 132.37, 132.01, 131.98, 131.85, 130.93, 130.72, 130.33, 129.63, 129.11, 127.89, 127.24, 126.96, 126.86, 126.55, 125.82, 125.59, 124.70, 124.68, 124.51, 124.30, 124.25, 123.11, 122.84, 119.53, 117.51, 116.51, 115.02, 113.68, 54.16, 49.33, 40.87, 32.99, 32.58, 31.65, 30.56, 28.49, 26.23, 26.00, 25.91, 25.62, 25.57, 25.48, 25.42, 25.27, 24.49, 21.52, 21.35, 21.33, 21.15.

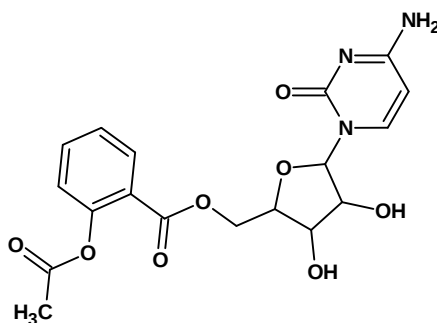
5.2.3.2. *Synteza koniugatu cytydyny z kwasem acetylosalicylowym w układzie DCC/DMAP*

Reakcja kondensacji cytydyny z kwasem acetylosalicylowym przeprowadzona w układzie DCC/DMAP, na podstawie pracy Shaheeda i in. [141], przebiegła z wytrąceniem dużej ilości DCU. Po filtracji i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano osad, który po rekrytalizacji z etanolu i oczyszczaniu na węglu aktywnym dał biały

produkt o masie 0,15 g (41% wydajności) oraz temperaturze topnienia 198°C. Otrzymany produkt w widmach ^1H oraz ^{13}C -NMR wykazuje sygnały odpowiadające strukturze cytydyny, jak i fragmentom aromatycznym cząsteczki kwasu acetylosalicylowego. Uwidoczniono słaby sygnał w zakresie 174 ppm, charakterystyczny dla atomu węgla karbonylowego grupy estrowej. Jednocześnie widoczne są dodatkowe sygnały wskazujące na obecność pozostałości DCU, którego nie udało się całkowicie usunąć w procesie oczyszczania. Produkt końcowy można uznać za mieszaninę pożądanego koniugatu estrowego cytydyny z aspiryną wraz z domieszkami ubocznego DCU i produktów hydrolizy. Mimo tego w widmach można zidentyfikować sygnały odpowiadające strukturom obu substratów, co świadczy o zajściu reakcji estryfikacji.

Wzór: $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_8$

Masa molowa: 405,36 g/mol



Widma NMR:

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 174.83, 162.24, 83.50, 83.28, 83.07, 52.88, 45.27, 45.13, 45.00, 44.86, 44.72, 44.58, 44.44, 38.63, 35.13, 30.48, 29.69, 29.06.

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 12.57 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 12.15 (pd, $J = 7.4, 4.4$ Hz, 1H), 11.95 (dtd, $J = 28.5, 13.0, 7.1$ Hz, 1H), 9.97 (s, 1H), 8.13 (tdt, $J = 10.7, 7.1, 4.1$ Hz, 3H), 8.05 (s, 14H), 7.26 (dt, $J = 5.3, 3.3$ Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.02 – 6.90 (m, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.50 (dt, $J = 11.3, 4.8$ Hz, 8H), 6.35 (dh, $J = 11.0, 3.8$ Hz, 6H), 6.24 (dhept, $J = 11.4, 4.1$ Hz, 3H), 6.16 (s, 4H), 6.04 – 5.91 (m, 7H), 5.81 (dddd, $J = 45.7, 18.8, 9.8, 5.7$ Hz, 10H), 5.43 – 5.38 (m, 1H).

5.2.3.3. Synteza koniugatu cytydyny z ibuprofenem w układzie DCC/DMAP

Przeprowadzono reakcje kondensacji cytydyny z S-ibuprofenem w obecności DCC/DMAP na podstawie pracy Shaheeda i in. [141]. Otrzymano produkt o masie 36 mg (9% wydajności) i temperaturze topnienia 181°C. Analiza widma NMR otrzymanego produktu nie potwierdziła jednoznacznie powstania oczekiwanego koniugatu. Widmo ^1H NMR wykazało obecność licznych sygnałów w zakresie δ 8.6–7.0 ppm, charakterystycznych dla protonów aromatycznych fragmentu ibuprofenu, a także szerokiego multipletu w obszarze δ 6.6–5.5 ppm, odpowiadającego protonom rybozy cytydyny. Obecność sygnałów w δ 12.3–11.7 ppm wskazuje dodatkowo na obecność protonów kwasowych lub amidowych, najprawdopodobniej związanych z pozostałością wolnego ibuprofenu oraz produktami ubocznymi kondensacji (DCU). Widmo ^{13}C NMR ujawniło sygnały odpowiadające węglom aromatycznym ibuprofenu (δ 133.9, 132.0 ppm), węglom szkieletu rybozy (δ 83–53 ppm) oraz węglom bocznego łańcucha izobutyłowego (δ 44.9–22.0 ppm). W zakresie δ ~159–163 ppm zaobserwowano dwa słabe sygnały, które można przypisać karbonyłowi pirymidynowemu cytydyny lub karbonyłom mocznikowym powstałym w trakcie reakcji z udziałem DCC. Sygnał charakterystyczny dla karbonyłu estrowego, oczekiwany w obszarze δ 170–175 ppm, nie został jednoznacznie zarejestrowany.

Widma NMR:

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 162.98, 159.88, 133.93, 132.04, 82.95, 82.74, 82.52, 52.85, 49.63, 45.07, 44.93, 44.79, 44.65, 44.51, 44.37, 44.23, 43.47, 43.33, 43.20, 43.06, 38.59, 37.07, 35.60, 35.21, 30.44, 29.67, 27.11, 25.05.

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 12.33 (dd), 12.28 (s), 11.87 (dt), 11.73 (h), 9.27 (d), 9.22 – 9.17 (m), 8.65 (s), 8.57 (dt), 8.25 (t), 8.13 (ddp), 7.98 (d), 7.08 (td), 6.57 (s), 6.51 (dd), 6.44 – 6.37 (m), 6.37 – 6.29 (m), 6.27 (s), 6.25 – 6.19 (m), 6.17 – 6.07 (m), 6.03 – 5.92 (m), 5.92 – 5.79 (m), 5.83 (s), 5.75 (q), 5.57 – 5.50 (m)

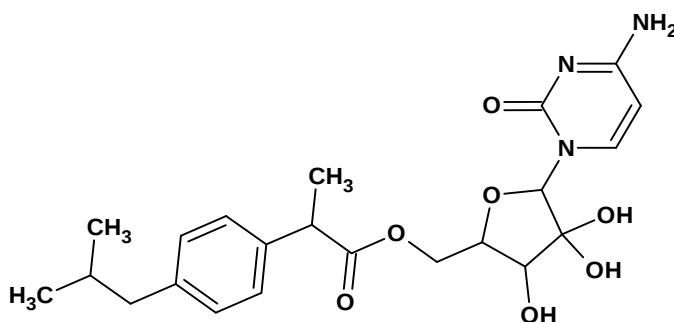
5.2.4. Synteza koniugatu cytydyny z użyciem środka sieciującego EDC

5.2.4.1. Synteza koniugatu cytydyny z ibuprofenem z użyciem EDCI/HOBt

Koniugat cytydyny z S-ibuprofenem otrzymano przez sprzężanie karboksylu ibuprofenu z grupami hydroksylowymi nukleozydu przy użyciu EDCI/HOBt na podstawie pracy Zhena i in. [182]. Po ekstrakcji uzyskano jasnożółty, kleisty produkt w wydajności 21% o dużym zanieczyszczeniu produktami ubocznymi. Widmo ^{13}C -NMR wykazuje obecność charakterystycznych sygnałów zarówno dla fragmentu cytydyny, jak i ibuprofenu. Najważniejszym potwierdzeniem powstania produktu sprzężenia są sygnał karbonylowy w zakresie około 172 ppm, który odpowiadają wiązaniu estrowemu. Zaobserwowano obecność przesunięć chemicznych dla cytozyny (ok. 145–160 ppm) oraz aromatyczne sygnały pochodzące ze struktury ibuprofenu w zakresie 120–140 ppm. Na podstawie analizy ^{13}C -NMR można przypuszczać, że w opisanej reakcji powstał ester cytydyny z ibuprofenem, jednak o bardzo dużym zanieczyszczeniu.

Wzór: $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$

Masa molowa: 447,48 g/mol



Widmo ^{13}C -NMR:

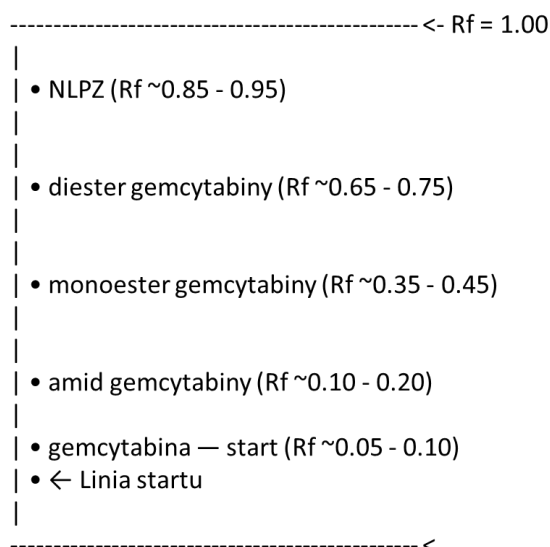
^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO) δ 172.54, 171.60, 170.82, 170.68, 168.84, 168.29, 167.81, 167.57, 163.10, 163.02, 162.79, 160.57, 160.52, 160.43, 160.35, 155.33, 155.02, 145.94, 145.90, 145.63, 136.55, 136.39, 136.34, 136.17, 135.26, 131.48, 131.09, 131.06, 131.04,

130.97, 130.95, 130.71, 130.43, 127.73, 124.95, 120.27, 119.88, 119.83, 119.67, 119.47, 118.99, 118.34, 117.96, 117.85, 117.73, 117.25, 113.43, 113.29, 96.34, 96.14, 96.03, 91.76, 91.69, 90.33, 90.15, 88.59, 85.72, 85.52, 82.93, 82.82, 77.57, 77.51, 74.35, 74.25, 73.75, 73.71, 73.29, 73.20, 69.65, 68.72, 68.40, 68.30, 64.66, 64.59, 60.88, 60.85, 60.37, 60.23, 40.82, 36.24, 31.22, 24.85, 24.81, 21.50, 21.19, 21.12, 21.10, 21.07, 20.69, 14.51.

5.2.5. Podsumowanie syntez z wykorzystaniem cytydyny

Przeprowadzono wiele prób uzyskania koniugatów cytydyny i NLPZ dostosowując warunki reakcji oraz oczyszczania, rozpuszczalniki oraz katalizatory, a także środki sieciujące. Większość produktów uzyskano w bardzo małych ilościach, często w fazie oleistej lub kleju, co uniemożliwiało zbadanie temperatury topnienia, a całość produktu wykorzystano do wykonania analiz fizykochemicznych. Występowały trudności z usunięciem odczynników wysokowrzących takich, jak pirydyna, DMF oraz DMSO. Widma ^1H oraz ^{13}C NMR wskazują na obecność zarówno fragmentów cytydyny, jak i NLPZ, co potwierdza częściowy przebieg reakcji sprzęgania. Jednak na podstawie braku wyraźnego sygnału karbonylu estrowego w ^{13}C NMR w części otrzymanych produktów oraz obecności sygnałów typowych dla DCU można stwierdzić, że proces estryfikacji był mało wydajny i w próbkach dominują substraty oraz produkty uboczne. Konieczne będzie zoptymalizowanie warunków reakcji lub zastosowanie alternatywnej metody aktywacji grupy karboksylowej, aby zwiększyć udział koniugatu w mieszaninie reakcyjnej. Wyciągnięto wnioski na podstawie rozmieszczenia plamek poszczególnych koniugatów na płytkach TLC oraz ich R_f (Rysunek 23.).

Zdecydowano, że dalsze eksperymenty z użyciem gemcytabiny zostaną przeprowadzone z użyciem kwasu acetylosalicylowego oraz S-ibuprofenu z zastosowaniem DCC oraz chlorków kwasowych.



Rysunek 23. *Schematyczny rozdział koniugatów cytydyny lub gemcytabiny z NLPZ na płytce TLC w układzie eluentu chloroform:metanol 8,5:1,5.*

5.2.6. Próby syntezy koniugatu gemcytabiny z kwasem acetylosalicylowy w układzie DCC/DMAP

W wyniku syntezy koniugatu gemcytabiny i kwasu acetylosalicylowego z wykorzystaniem DCC otrzymano biały, krystaliczny osad z wydajnością około 10% i o temperaturze topnienia 210°C. Analiza widm spektroskopii NMR nie potwierdziła jednoznacznie powstania koniugatu kwasu acetylosalicylowego z gemcytabiną. Ponadto, widmach zaobserwowano obecność zanieczyszczeń oraz zbyt niskie stężenie produktu w próbce, co utrudniło jednoznaczną interpretację wyników.

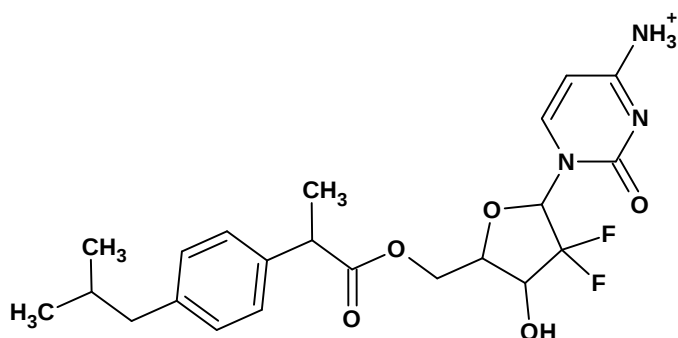
5.2.7. Synteza koniugatu gemcytabiny z ibuprofenem w układzie DCC/DMAP

W wyniku reakcji gemcytabiny i ibuprofenu w obecności DCC/DMAP otrzymano żółty, krystaliczny produkt o konsystencji kleistej, co uniemożliwiło zbadanie temperatury topnienia, jednak obecność związku potwierdzono na podstawie widm ^1H -NMR oraz spektrometrii mas. Analiza widma ^1H NMR wykazała, że uzyskanym związkiem jest estrowy koniugat gemcytabiny i ibuprofenu z obecnością związków ubocznych. Zaobserwowano charakterystyczne przesunięcia chemiczne koniugatu, jednak ze względu na obecność produktów ubocznych przypisanie sygnałów do poszczególnych protonów

było utrudnione. Szczególną trudność sprawiły nakładające się sygnały w rejonie około 7 ppm oraz 1,5–1,7 ppm. Analiza spektrometrii mas potwierdziła obecność koniugatu. Zarejestrowano jon $[M+NH_3]^+$ o masie związku równej 452,1963, z intensywnością 8,8% w próbce. Przeprowadzono dalsze oczyszczanie i izolację związku.

Wzór: $C_{22}H_{28}F_2N_3O_5^+$

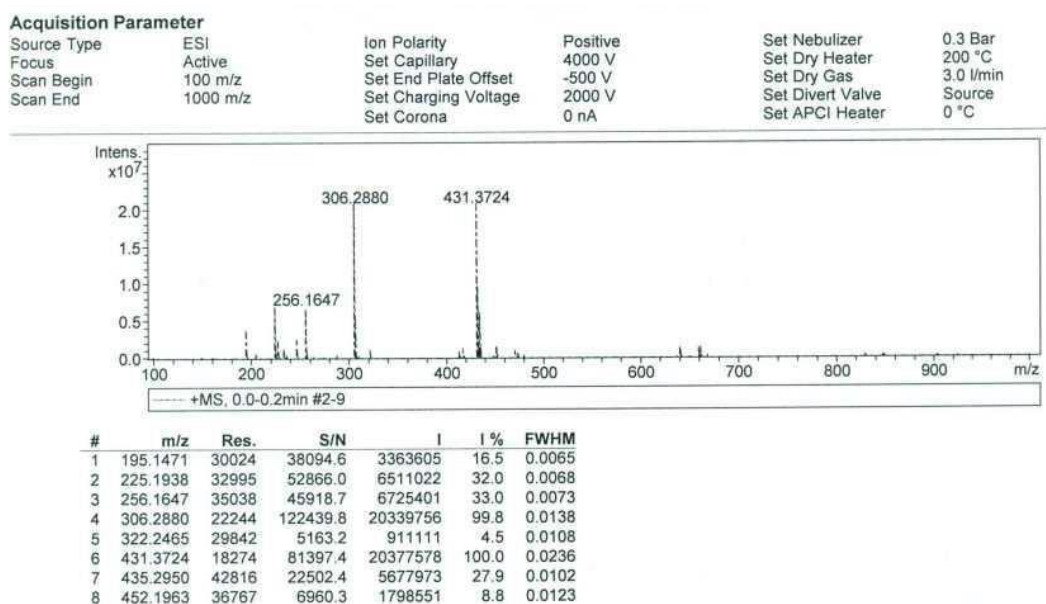
Masa molowa: 452,47 g/mol



Widmo 1H -NMR:

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.29–7.11 (dt), 3.75–3.71 (q), 2.50 (d), 1.90–1.80 (m), 1.50 (d), 0.99 (d)

Widmo spektrometrii mas:



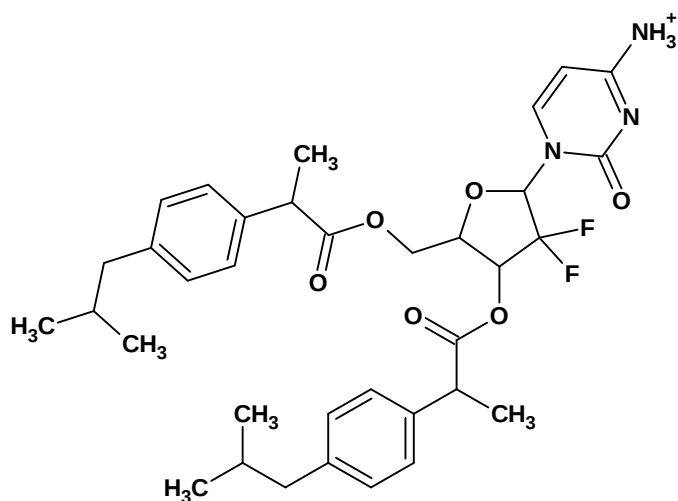
Rysunek 24. *Widmo spektrometrii mas estrowego koniugatu gemcytabiny ibuprofenu.*

5.2.8. Synteza gemcytabiny i ibuprofenu w stosunku molowym 1:2

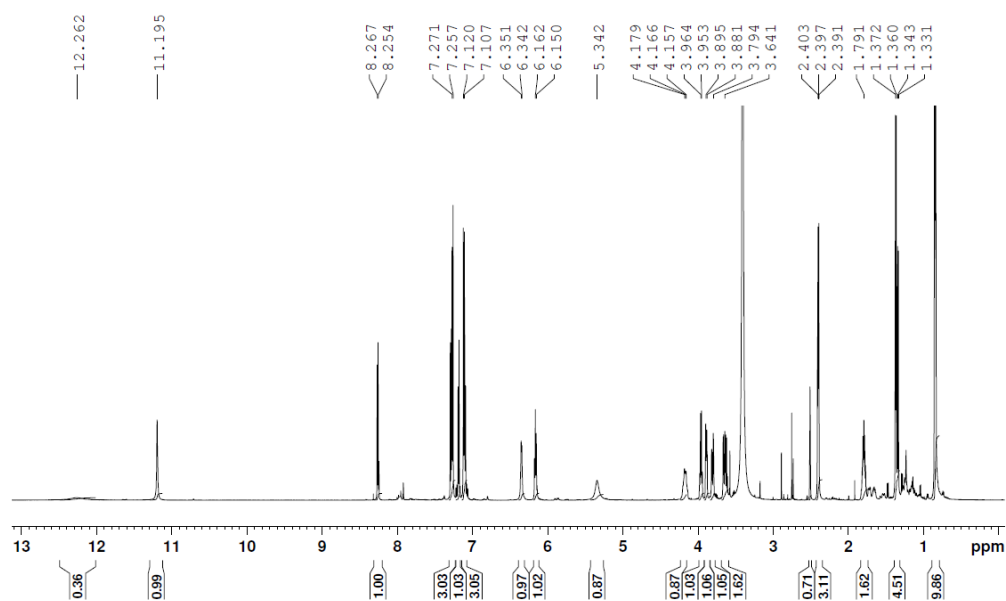
W procesie syntezy gemcytabiny i ibuprofenu w stosunku molowym 1:2 prawdopodobnie otrzymano koniugat estrowy gemcytabiny z dwiema cząsteczkami ibuprofenu w pozycjach C-3' oraz C-5'. W widmie ^1H -NMR zaobserwowano charakterystyczne sygnały gemcytabiny oraz ibuprofenu. Uwidoczniono również niewielki sygnał wolnej grupy karboksylowej ibuprofenu, co wskazuje na niecałkowite przereagowanie substratu. W widmie ^{13}C NMR obecne są dwa sygnały karbonylowe w δ 175.97, 175.56 ppm, charakterystyczne dla wiązań estrowych. Przesunięcia chemiczne w zakresie węgli cukrowych (δ 60–95 ppm) oraz sygnałów aromatycznych i alifatycznych ibuprofenu (δ 18–30 ppm i δ 126–140 ppm) dodatkowo potwierdzają utworzenie estrów. Analiza TLC wykazała obecność czterech plamek odpowiadających kolejno wolnej gemcytabinie, produktom reakcji – mono- i diestrowi gemcytabiny z ibuprofenem oraz wolnemu ibuprofenowi. Dodatkowo, analiza HPLC wykazała obecność dwóch pików obserwowanych przy długości fali 250nm, prawdopodobnie pochodzących od podwójnego koniugatu estrowego gemcytabiny i ibuprofenu.

Wzór: $C_{35}H_{44}F_2N_3O_6^+$

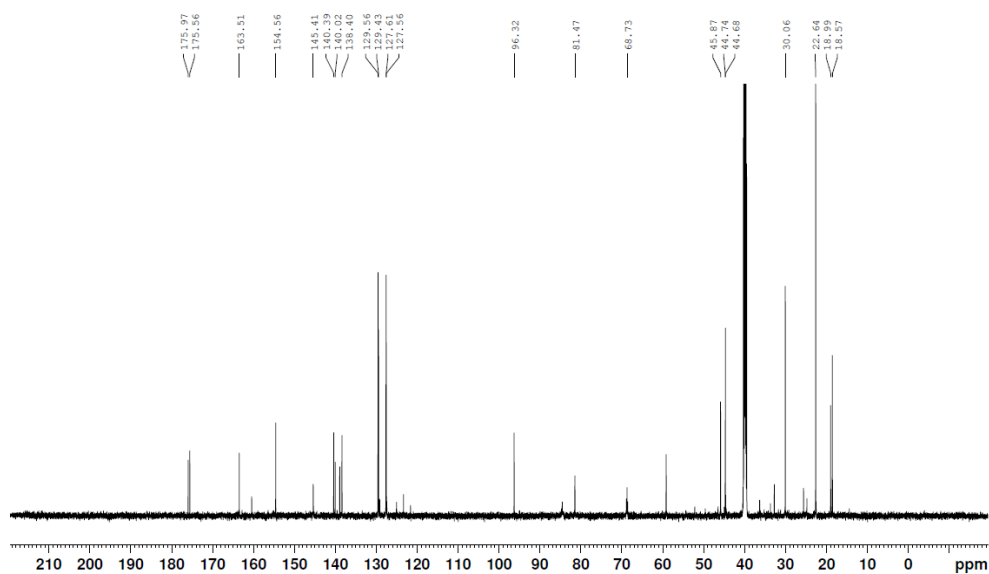
Masa molowa: 640,74 g/mol



Widma NMR:

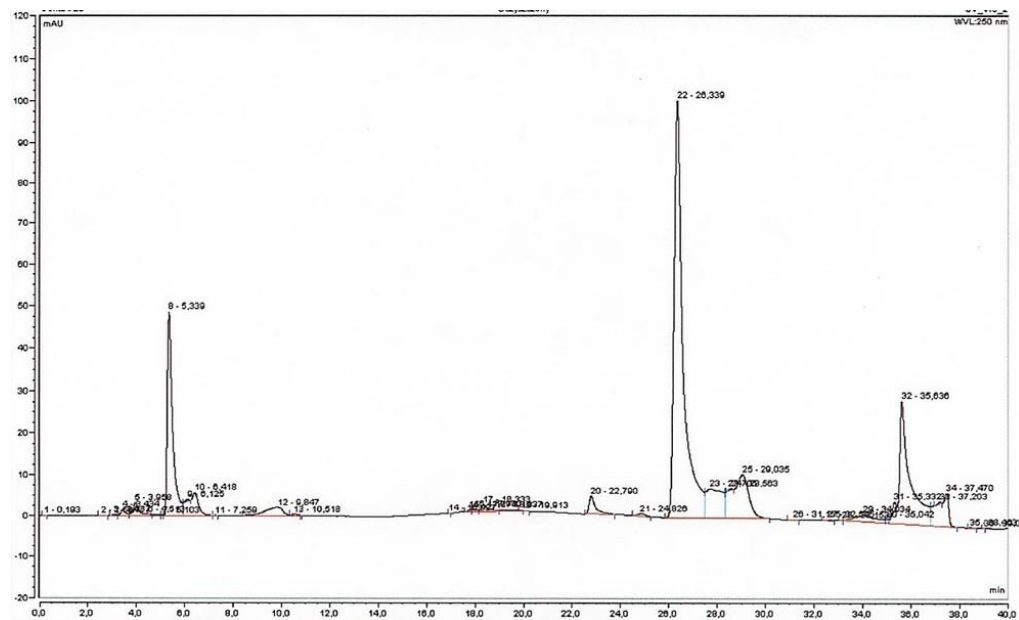


^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) 12.262 (s), 11.195 (s), 8.267 (s), 8.254 (s), 7.271 (m), 7.257 (m), 7.210 (m), 7.107 (m), 7.091 (m), 6.342 (m), 6.312 (m), 6.150 (m), 5.342 (d), 4.179 (m), 4.176 (m), 4.167 (m), 4.156 (m), 4.137 (m), 3.895 (m), 3.852 (m), 3.841 (m), 3.781 (sept), 3.641 (m), 2.497 (m), 2.391 (m), 1.791 (m), 1.762 (m), 1.497 (m), 1.370 (d), 1.331 (d)

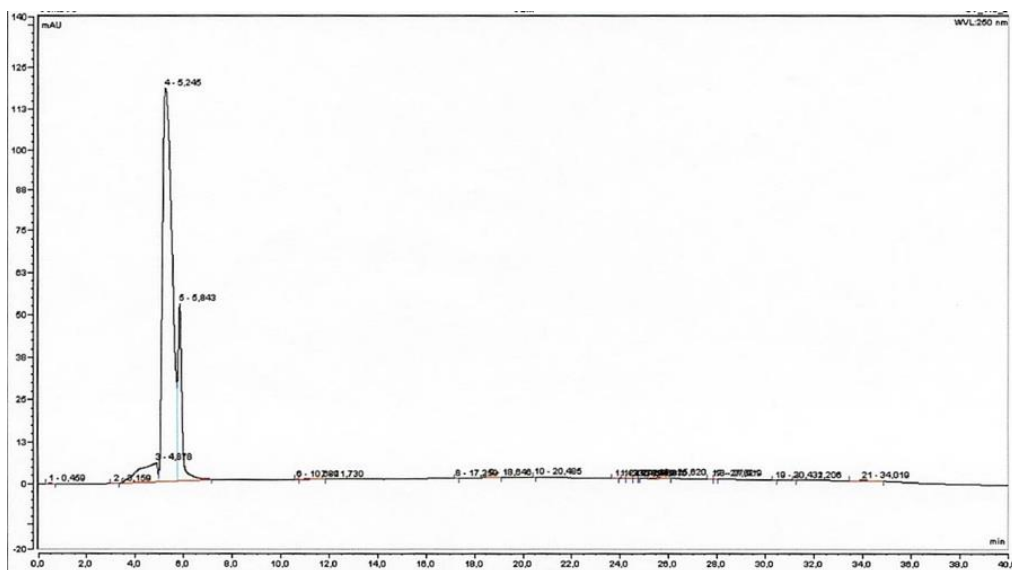


^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) 175.97, 175.56, 163.51, 155.54, 151.41, 148.65, 140.41, 138.00, 130.20, 129.82, 129.61, 127.26, 127.15, 122.45, 96.32, 81.47, 68.73, 45.87, 44.68, 44.43, 41.60, 39.06, 22.06, 18.64, 18.59

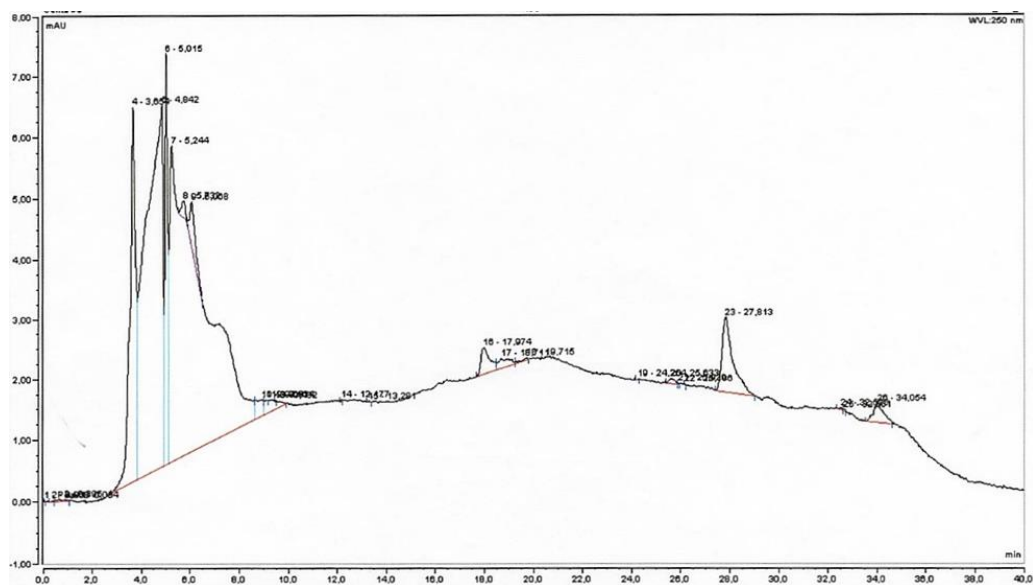
Chromatogramy HPLC:



Rysunek 25. *Chromatogram HPLC koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w stosunku substratów 1:2. Układ eluentów: MeOH:H₂O 7:3. Długość fali 250 nm.*



Rysunek 26. **Chromatogram HPLC gemcytabiny.** Układ eluentów: MeOH:H₂O 7:3. Długość fali 250 nm.



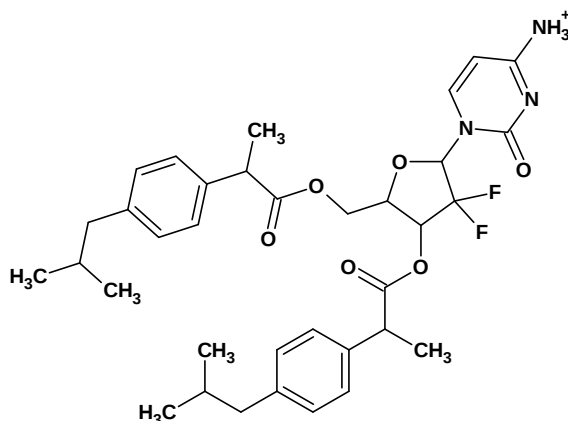
Rysunek 27. **Chromatogram HPLC ibuprofenu.** Układ eluentów: MeOH:H₂O 7:3. Długość fali 250 nm.

5.2.9. Synteza gemcytabiny i ibuprofenu w polu mikrofalowym w stosunku molowym 1:2

Sprzężanie gemcytabiny z ibuprofenem przeprowadzono w układzie DCC/DMAP z użyciem pola mikrofalowego. Otrzymano bezbarwny, kleisty koniugat gemcytabiny z dwiema cząsteczkami ibuprofenu w formie estrów. W widmie ¹H-NMR zaobserwowano charakterystyczne sygnały gemcytabiny oraz ibuprofenu, jak opisano w punkcie 6.2.8. W widmie ¹³C-NMR zaobserwowano dwa sygnały karbonyłowe w δ175 ppm,

charakterystyczne dla wiązań estrowych. Analiza widma HPLC wykazała obecność dwóch pików, prawdopodobnie pochodzących od estrowego koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu podwójnie podstawionego w pozycjach C-3' oraz C-5'.

Wzór: $C_{35}H_{44}F_2N_3O_6^+$



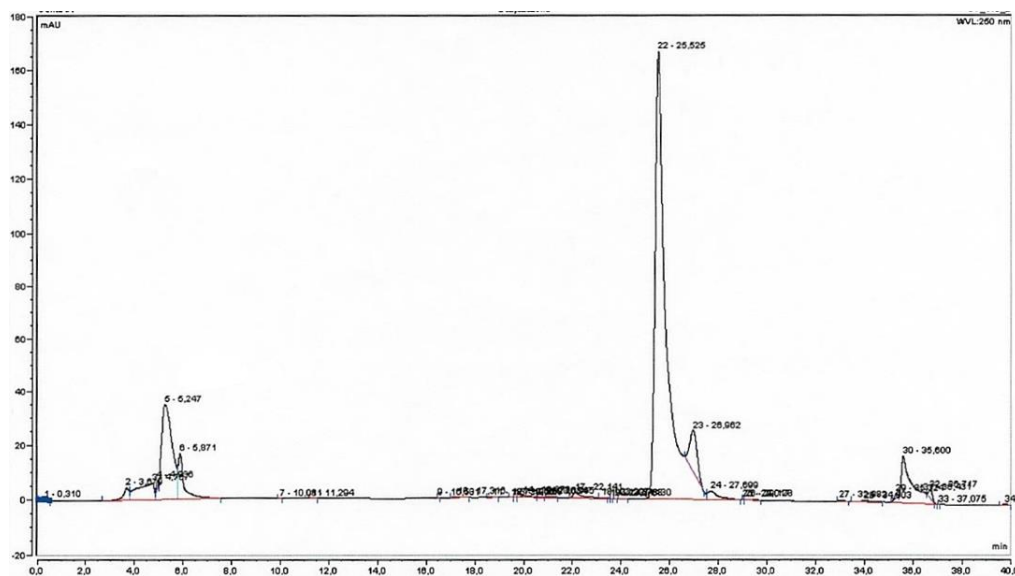
Masa molowa: 640,74 g/mol

Widma NMR:

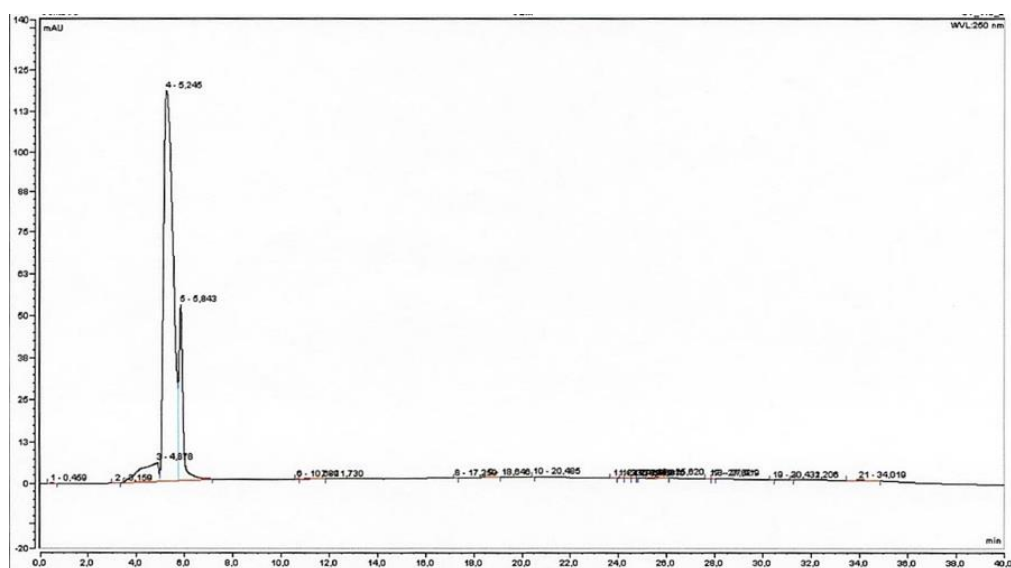
1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) 12.262 (s), 11.195 (s), 8.267 (s), 8.254 (s), 7.271 (m), 7.257 (m), 7.210 (m), 7.107 (m), 7.091 (m), 6.342 (m), 6.312 (m), 6.150 (m), 5.342 (d), 4.179 (m), 4.176 (m), 4.167 (m), 4.156 (m), 4.137 (m), 3.895 (m), 3.852 (m), 3.841 (m), 3.781 (sept), 3.641 (m), 2.497 (m), 2.391 (m), 1.791 (m), 1.762 (m), 1.497 (m), 1.397 (m), 1.370 (d), 1.331 (d)

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) 175.97, 175.56, 163.51, 155.54, 151.41, 148.65, 140.41, 138.00, 130.20, 129.82, 129.61, 127.26, 127.15, 122.45, 96.32, 81.47, 68.73, 45.87, 44.68, 44.43, 41.60, 39.06, 22.06, 18.64, 18.59

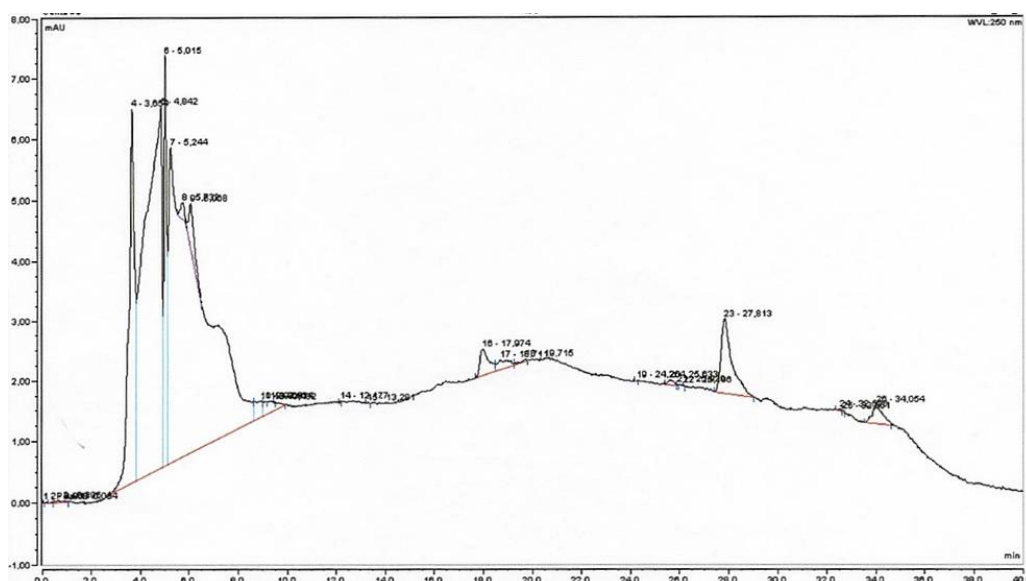
Chromatogramy HPLC:



Rysunek 28. *Chromatogram HPLC koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w stosunku substratów 1:2 otrzymanego z zastosowaniem pola mikrofalowego. Układ eluentów: MeOH:H₂O 7:3. Długość fali 250 nm.*



Rysunek 29. *Chromatogram HPLC gemcytabiny. Układ eluentów: MeOH:H₂O 7:3. Długość fali 250 nm.*



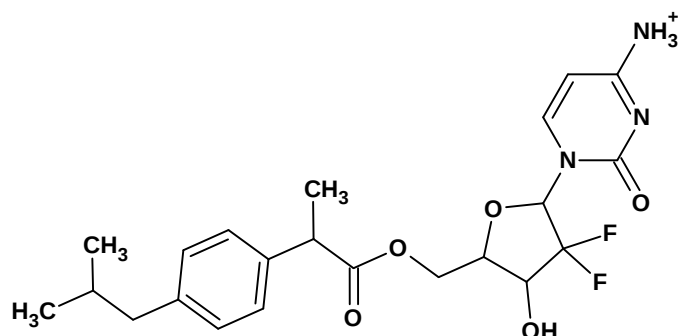
Rysunek 30. *Chromatogram HPLC ibuprofenu*. Układ eluentów: MeOH:H₂O 7:3. Długość fali 250 nm.

5.2.10. Synteza koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w polu mikrofalowym w stosunku molowym substratów 1:1

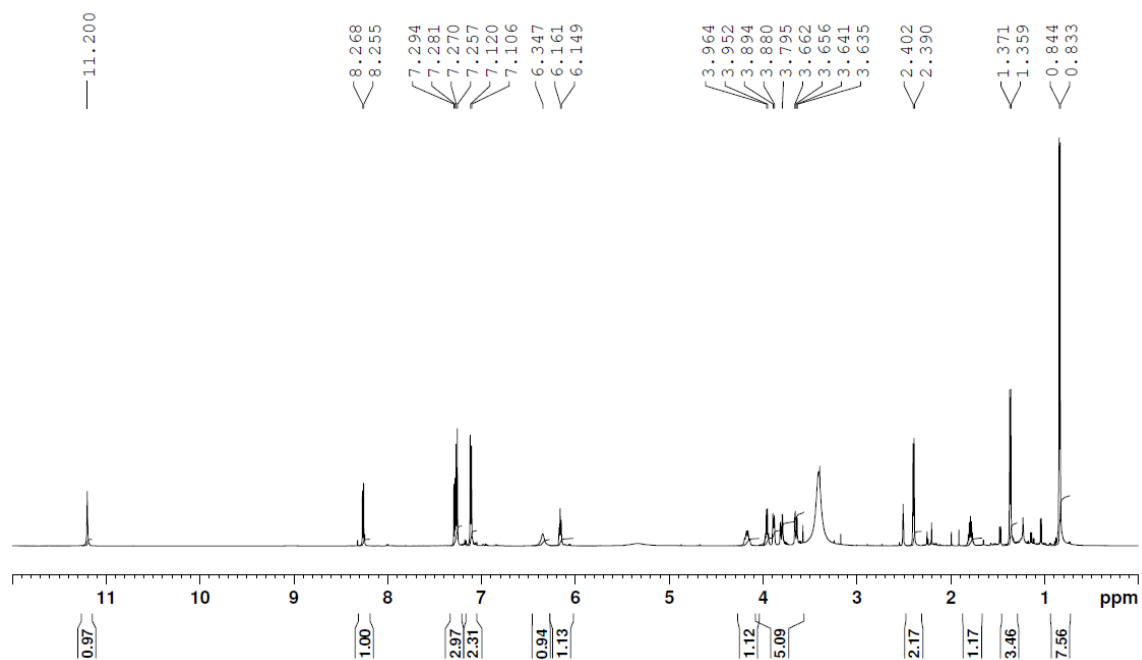
Sprzęganie gemcytabiny z ibuprofenem przeprowadzono w układzie DCC/DMAP z użyciem mikrofali. Otrzymano jasnożółty, oleisty produkt. W widmie ¹³C-NMR można zaobserwować sygnały odpowiadające grupie estrowej (δ 175.6 ppm), a także między innymi dla szkieletu cytozyny (δ 150–165 ppm) oraz grupy aromatycznej ibuprofenu (δ 126–140 ppm). Obecność pojedynczego sygnału węgla karbonylowego oraz układ przesunięć pierścienia rybozy wskazują, że głównym składnikiem jest monoester gemcytabiny z ibuprofenem (najprawdopodobniej estryfikacja grupy –OH przy C-5' w szkielecie cukrowym). Niewielkie sygnały w obszarach 3.6–4.0 ppm i 1.3–1.0 ppm mogą wskazywać na obecność śladowych współproduktów (diester oraz reszkowe substraty), co jest zgodne z obserwacją TLC dla mieszaniny poreakcyjnej. W widmach brak sygnałów odpowiadających DCU (brak szerokiej „kopuły” cykloheksylowej 1.0–2.0 ppm w ¹H-NMR i brak karbonylu mocznikowego ~158–160 ppm w ¹³C-NMR).

Wzór: $C_{22}H_{28}F_2N_3O_5^+$

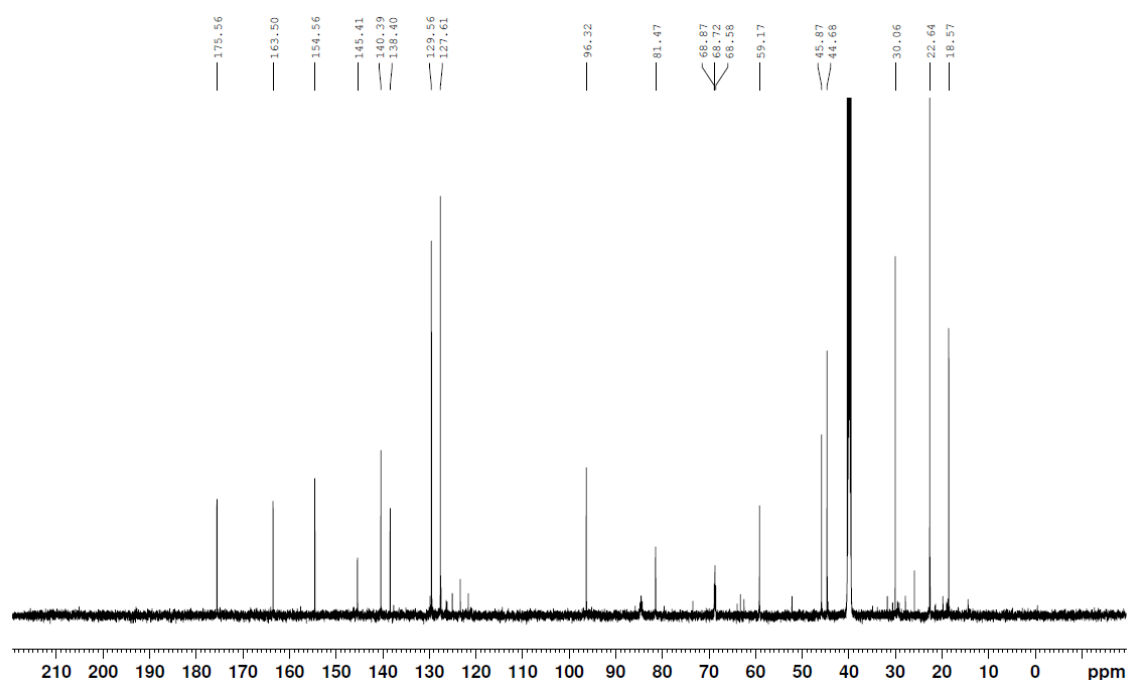
Masa molowa: 452,47 g/mol



Widma NMR:



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.20 (s), 8.26–8.25 (m), 7.29–7.10 (m), 6.34–6.14 (m), 3.96–3.65 (m), 2.40–2.39 (m), 1.37–0.83 (m).



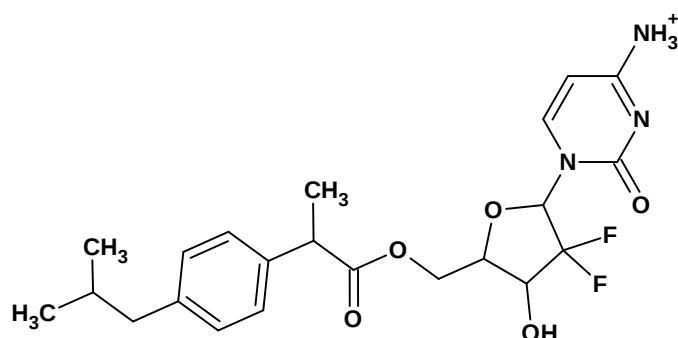
^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 175.46, 163.50, 154.56, 150.41, 138.09, 129.56, 127.61, 96.32, 81.47, 68.97, 68.72, 59.17, 45.68, 44.16, 39.06, 22.64, 18.57.

5.2.11. Synteza koniugatu gemcytabiny z chlorkiem kwasowym ibuprofenu

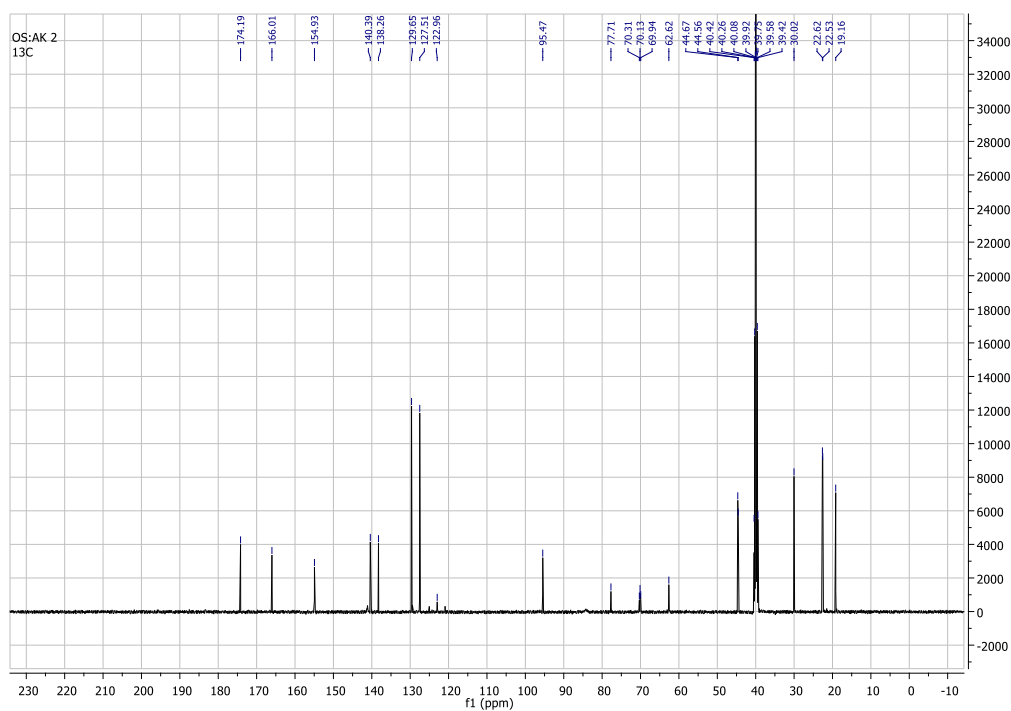
Syntezę koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu wykonano z zastosowaniem chlorku ibuprofenu. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej typu Flash, wykonano chromatografię cienkowarstwową zebranych frakcji. Na jej podstawie wyselekcjonowano próbki do analiz fizykochemicznych. W widmie ^{13}C NMR jednej z analizowanych frakcji uwidoczniono wyraźny sygnał karbonylowy w zakresie około δ 175 ppm, charakterystyczny dla grupy estrowej, co potwierdza skuteczne sprzężenie ibuprofenu z gemcytabiną. W obszarze δ 125–140 ppm obserwuje się sygnały grup aromatycznych ibuprofenu. Nie zaobserwowano sygnałów w zakresie δ 178–180 ppm odpowiadających grupie karbonylowej kwasu karboksylowego, co może wskazywać na brak wolnego ibuprofenu w próbce. Obecność pojedynczego sygnału karbonylowego grupy estrowej wskazuje, że głównym otrzymanym związkiem prawdopodobnie jest monoester gemcytabiny z ibuprofenem.

Wzór: $C_{22}H_{28}F_2N_3O_5^+$

Masa molowa: 452,47 g/mol



Widmo ^{13}C -NMR:



^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.46, 163.50, 154.56, 150.41, 138.94, 138.09, 129.56, 127.61, 96.32, 81.47, 68.97, 68.72, 59.17, 45.68, 44.16, 39.06, 22.64, 18.57.

Otrzymane koniugaty, w etapie dalszych eksperymentów oraz oczyszczania, zostaną poddane badaniom biologicznym z wykorzystaniem komórek nowotworowych trzustki.

6. Dyskusja

Gemcytabina jest jednym z najczęściej stosowanych leków w terapii nowotworów trzustki, jednak jej skuteczność jest ograniczona przez szybki metabolizm, niską biodostępność w tkance nowotworowej oraz rozwijającą się chemiooporność. Z drugiej strony NLPZ, takie jak kwas acetylosalicylowy, ibuprofen, czy flurbiprofen, wykazują (poza działaniem przeciwzapalnym i przeciwbólowym) właściwości przeciwnowotworowe, związane zarówno z hamowaniem aktywności cyklooksygenaz (COX-1, COX-2), jak i z mechanizmami COX-niezależnymi, obejmującymi modulację szlaku NF- κ B, czy zdolność do wywoływania apoptozy. Wykazane w badaniach biologicznych synergistyczne działanie gemcytabiny i NLPZ wobec komórek nowotworowych trzustki stanowi silną podstawę do projektowania i syntezy koniugatów łączących obie te grupy związków.

Przeprowadzone badania *in vitro* dostarczyły istotnych danych dotyczących potencjalnych możliwości zastosowania gemcytabiny w połączeniu z NLPZ w terapii przeciwnowotworowej raka trzustki. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno kombinacje związków, jak i zastosowanie dodatkowo mezenchymalnych komórek macierzystych i ich metabolitów, prowadzą do nasilonego efektu cytotoksycznego wobec badanych linii komórkowych nowotworu trzustki (PANC-1, AsPC-1 i BxPC-3), przewyższając działanie samej gemcytabiny.

W testach żywotności zaobserwowano, że kombinacja gemcytabiny z NLPZ (ASA, IBU oraz FLU) powodowała zmniejszenie przeżycia komórek nowotworowych w porównaniu do zastosowania samej gemcytabiny. Analiza wartości IC_{50} uzyskanych po 48 godzinach ekspozycji na leki ujawniła, że wszystkie trzy zastosowane NLPZ zwiększają wrażliwość komórek nowotworowych na działanie gemcytabiny, jednak efekt ten był zróżnicowany w zależności od linii komórkowej. Szczególnie wyraźny wpływ obserwowano dla połączenia gemcytabiny i flurbiprofenu. Można wnioskować, że strukturalne różnice pomiędzy poszczególnymi NLPZ mogą przekładać się na ich potencjał do synergistycznego działania z GEM. Warto podkreślić, że efekt cytotoksyczny korelował ze zwiększonym odsetkiem komórek apoptotycznych, co wykazano w analizie z zastosowaniem Aneksyny V i 7-AAD. Kombinacje lekowe nie tylko nasilały apoptozę,

ale także wpływały na cykl komórkowy, co potwierdza hipotezę o ich wzajemnie uzupełniającym się mechanizmie działania.

Porównując trzy wybrane NLPZ można zauważyć, że ASA i FLU wykazują największą skuteczność w PANC-1, gdzie obie kombinacje obniżały IC_{50} ponad dwukrotnie względem GEM. W linii AsPC-1 najkorzystniejszy efekt osiągnięto dla połączenia GEM+FLU, a nieco słabszy dla GEM+IBU. W komórkach BxPC-3 na szczególną uwagę zasługuje połączenie GEM+FLU, gdzie synergizm działania leków był najsilniejszy ze wszystkich kombinacji. Z kolei IBU był mniej skuteczny niż ASA i FLU w połączeniu z GEM, choć i w tym przypadku obserwowano istotne obniżenie IC_{50} .

Kolejnym aspektem badań była rola BM-MSC jako potencjalnych nośników oraz modulatorów działania leków przeciwnowotworowych. Uzyskane wyniki wskazują, że BM-MSC zachowują wysoką oporność na działanie gemcytabiny i NLPZ, co czyni je atrakcyjnymi kandydatami do wykorzystania w systemach dostarczania leków. MSC są znane z aktywnego wydzielania EV, w tym egzosomów i ciałek apoptotycznych, które odgrywają kluczową rolę w komunikacji międzykomórkowej. Mikropęcherzyki te powstają w procesie wewnątrzkomórkowego pączkowania błon i są uwalniane do środowiska zewnątrzkomórkowego, transportując bioaktywne molekuly, takie jak RNA (mRNA, miRNA, lncRNA), białka, lipidy oraz metabolity. Dzięki tej zdolności mikropęcherzyki MSC mogą wpływać na zachodzące procesy biologiczne w komórkach docelowych, między innymi na mechanizmy regeneracji, stanu zapalnego, immunomodulacji, a także apoptozy i proliferacji komórek nowotworowych. Ze względu na swoje naturalne właściwości biokompatybilne i tropizm do tkanek uszkodzonych lub nowotworowych, mogą być wykorzystane do precyzyjnego dostarczania leków, genów terapeutycznych lub inhibitorów specyficznych szlaków molekularnych. Biorąc pod uwagę właściwości EV, postanowiono zbadać wpływ pożywki kondycjonowanej z nad BM-MSC traktowanych GEM i GEM+ASA/GEM+IBU/GEM+FLU na wybrane linie PCC w teście cytotoksyczności. Badanie to miało na celu ocenę, czy mikropęcherzyki wydzielane przez BM-MSC zawarte w pożywce kondycjonowanej oraz metabolity stosowanych leków, mogą pośredniczyć w ich działaniu przeciwnowotworowym. Wyniki eksperymentów wskazują, że CM-GEM może wpływać na żywotność komórek nowotworowych trzustki oraz indukować mechanizmy apoptotyczne i nekrotyczne nawet przy stosunkowo niskich

stężeniach leków. Co ciekawe, dodatek NLPZ do CM-GEM nie wzmacniał istotnie efektu toksycznego w teście MTS.

Wiele kontrowersji budzi zdolność metabolitów gemcytabiny do wykazywania działania przeciwnowotworowego. Uważa się, że za przeciwnowotworowe działanie gemcytabiny odpowiedzialne są powstające wewnątrzkomórkowo difosforan gemcytabiny (dFdCDP) i trifosforan (dFdCTP). Większa część gemcytabiny jest przekształcana w nieaktywną 2',2'-difluoro-2'-deoksyurydynę (dFdU) w wyniku deaminacji, co może limitować jej działanie. Jednak w komórce dFdU może być również fosforylowany do form aktywnych monofosforanu (dFdUMP), difosforanu (dFdUDP) i trifosforanu (dFdUTP). Dane *in vitro* wskazują, że nukleotydy dFdU mogą również przyczyniać się do działania przeciwnowotworowego, jednak wciąż zbyt mało wiadomo na ten temat [183,184].

Analiza żywotności komórek linii AsPC-1 po traktowaniu CM wykazała ich zwiększoną proliferację, co potwierdza właściwości promujące wzrost komórek nowotworowych przez BM-MSC. Istnieją doniesienia o zdolności BM-MSC do wydzielania cytokin i czynników wzrostu, które mogą wspierać przeżywalność i proliferację komórek nowotworowych [185,186], jednak obecność GEM ogranicza te właściwości, co umożliwia potencjalne zastosowanie BM-MSC jako transportera leków przeciwnowotworowych. Badania apoptozy i nekrozy po zastosowaniu CM-GEM lub CM-GEM+FLU dodatkowo wykazały wyraźny wzrost odsetka komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych w komórkach linii PANC-1, AsPC-1 oraz BxPC-3, co potwierdza tezę, że pożywka kondycjonowana otrzymana w wyniku działania GEM na komórki BM-MSC może wywoływać efekt cytotoksyczny bezpośrednio w komórkach nowotworowych trzustki. Warto podkreślić, że dodatek FLU w tym przypadku również nie wzmocnił efektu apoptotycznego, co wskazuje na dominujący wpływ GEM w wywoływaniu śmierci komórkowej.

Całość eksperymentu poszerzono o dodatkowe badania kokultury BM-MSC z komórkami nowotworowymi trzustki. Wykazano, że traktowane BM-MSC mają zdolność do hamowania wzrostu tych linii komórkowych, szczególnie w stosunku 1:2 (BM-MSC:PCC). Jest to zgodne z hipotezą, że BM-MSC poddane działaniu leków przeciwnowotworowych mogą służyć jako potencjalne wektory terapeutyczne wspierające cytotoksyczność [187]. Natomiast BM-MSC nietraktowane lekami wykazywały

właściwości promujące wzrost komórek nowotworowych, szczególnie linii AsPC-3, co ponownie potwierdza ich dualistyczne właściwości [188].

Porównując wybrane linie PCC w odpowiedzi na traktowanie kombinacją GEM i FLU wykazano różnice w aktywacji szlaków apoptotycznych. Stwierdzono zwiększoną ekspresję białek odpowiedzialnych za uruchomienie szlaków apoptozy po zastosowaniu kombinacji GEM+FLU. W linii komórkowej PANC-1 najsilniejszy efekt apoptotyczny zaobserwowano po zastosowaniu GEM+FLU w dawce 10 μ M+2000 μ M, o czym świadczy silna aktywacja kaspazy-3 oraz degradacja PARP1. Nie wykazano ekspresji FAS po podaniu kombinacji leków. Komórki linii AsPC-1 i BxPC-3 reagowały odmiennie na traktowanie związkami. W linii AsPC-1 odpowiedź apoptotyczna jest słabsza, a ekspresja białek kaspazy-3 i FAS mniej intensywna, co może wskazywać na większą oporność tej linii. W komórkach BxPC-3 obserwuje się wyraźną aktywację apoptozy. Zauważono zwiększoną ekspresję kaspazy-3 oraz degradację PARP1 po zastosowaniu GEM+FLU, jednak nie wykazano ekspresji p-Ser-GSK3 β . Może to wskazywać na różnice w regulacji szlaków apoptotycznych, niezależnie od GSK3 β . Takie różnice w odpowiedzi na działanie leków mogą odzwierciedlać obecność swoistych mechanizmów oporności, a skuteczność terapii może być uzależniona od rodzaju nowotworu trzustki.

Analiza odpowiedzi komórek PCC na działanie pożywki kondycjonowanej (CM), zawierającej metabolity gemcytabiny (CM-GEM) oraz metabolity gemcytabiny i flurbiprofenu (CM-GEM+FLU) ujawniła kolejne różnice w aktywacji szlaków apoptotycznych. W linii BxPC-3 efekt cytotoksyczny CM-GEM oraz CM-GEM+FLU jest najbardziej intensywny. W komórkach PANC-1 apoptoza jest słabsza po zastosowaniu CM oraz CM-GEM i CM-GEM+FLU, natomiast w linii AsPC-1 można zaobserwować większy wpływ kaspazy-3, w porównaniu z zastosowaniem samych leków. Z kolei, szlak FAS jest silnie tłumiony w obecności GEM+FLU, co może wskazywać na zaawansowany etap apoptozy, w którym FAS ulega degradacji lub zmniejszoną aktywność szlaku zależnego od FAS. Można wnioskować, że zewnętrzny szlak apoptozy zależny od receptorów śmierci nie odgrywa dominującej roli w odpowiedzi tych komórek na leczenie [189]. Interesujące wyniki zaobserwowano w ekspresji p-Ser-GSK3, która zanika w komórkach PANC-1 wraz ze wzrostem stężenia FLU (porównywalnie z zastosowaniem samych leków), co może być wskaźnikiem aktywacji GSK3 β i związanego z tym wpływu na przeżycie komórek.

W komórkach linii BxPC-3 ekspresja p-Ser-GSK3 β pozostawała stabilna w przypadku zastosowania samych leków, jednak po traktowaniu CM-GEM/CM-GEM+FLU widać wzrost fosforylacji i tym samym zablokowanie funkcji GSK3 β , co może towarzyszyć apoptozie.

GSK-3 β ulega silnej ekspresji w wielu nowotworach, jest zaangażowany w regulację proliferacji, apoptozy i chemiooporności. Dotychczasowe wyniki badań wskazywały na odmienną rolę GSK-3 β , zarówno przeciwnowotworową, jak i promującą rozwój nowotworu, co wzbudza wątpliwości co do korzyści ze stosowania leków celowanych na GSK-3 β . Rola GSK-3 β w komórkach nowotworowych jako proonkogenne lub supresorowe białko jest przedmiotem wielu sporów. Obecnie można stwierdzić, że naukowcy są zgodni w twierdzeniu, że GSK3- β jest pronowotworowym białkiem i dobrym kandydatem do zastosowania leczenia celowanego nowotworów poprzez jego inhibicję, szczególnie nowotworów trzustki [190].

Pierwszą część uzyskanych wyników opisanych w niniejszej pracy przedstawiono w artykule dotyczącym wpływu połączenia gemcytabiny i flurbiprofenu z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych na potencjał cytotoksyczny oraz zdolność do indukcji apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych trzustki [191]. Pozostałe wyniki badań zostaną zaprezentowane w kolejnych publikacjach.

Strategia koniugacji dwóch leków w jeden związek chemiczny niesie za sobą szereg potencjalnych korzyści. Po pierwsze, umożliwia jednoczesne dostarczanie do komórki nowotworowej zarówno nukleozydowego analogu działającego cytotoksycznie (gemcytabiny), jak i modulatora mikrośrodowiska nowotworu, co sprzyja uzyskaniu synergistycznego efektu biologicznego. Po drugie, utworzenie koniugatu może działać na zasadzie proleku – formy mniej aktywnej po podaniu ogólnoustrojowym, ulegającej aktywacji dopiero w komórkach docelowych, co pozwala ograniczyć toksyczność systemową. Po trzecie, modyfikacja właściwości fizykochemicznych cząsteczki może poprawić jej przenikanie przez błony komórkowe, wydłużyć czas retencji w komórkach nowotworowych oraz wpłynąć pozytywnie na farmakokinetykę. Ponadto, synteza jednego koniugatu zamiast podawania mieszaniny dwóch leków upraszcza profil farmakokinetyczny oraz zapewnia jednoczesne i bardziej przewidywalne stężenie w miejscu docelowym. Co więcej, wykorzystanie komórek lub nanonośników (np. MSC,

liposomów, nanocząstek) jako systemów dostarczania leków, może być bardziej efektywne w przypadku stabilnego koniugatu niż mieszaniny dwóch różnych terapeutyków [192,193]. Najbardziej praktycznymi sposobami uzyskania koniugatów gemcytabiny z NLPZ są syntezy prowadzące do powstania wiązań estrowych oraz amidowych. Każde z tych rozwiązań posiada specyficzne zalety, ale wiąże się również z określonymi wyzwaniem.

Związki estrowe są prostsze w syntezie i charakteryzują się zwiększoną lipofilnością, co może sprzyjać lepszemu przenikaniu do komórek nowotworowych. Wiązanie estrowe jest podatne na hydrolizę enzymatyczną, co umożliwia traktowanie takich koniugatów jak proleków [45]. Dzięki obecności esteraz w komórkach nowotworowych i w mikrośrodowisku guza, możliwe jest stosunkowo szybkie i kontrolowane uwalnianie aktywnych składników, np. gemcytabiny i NLPZ. Jednocześnie, istotnym ograniczeniem koniugatów estrowych jest ich niestabilność. Hydroliza estrów zachodzi nie tylko w środowisku nowotworowym, ale również w osoczu krwi, co prowadzi do przedwczesnego rozpadu i uwalniania wolnych leków, niwecząc część zalet związanych z ideą proleku [194]. Estrowe pochodne bywają także wrażliwe na wilgoć i mogą ulegać częściowej degradacji już na etapie oczyszczania oraz podczas przechowywania, co komplikuje prace laboratoryjne. Z tego powodu estrowe koniugaty wymagają szczegółowych badań stabilności oraz optymalizacji warunków syntezy i formulacji.

Alternatywą są koniugaty amidowe, które charakteryzują się znacznie większą stabilnością chemiczną i metaboliczną niż estry. Wiązanie amidowe jest odporne na hydrolizę w osoczu, co oznacza dłuższą trwałość koniugatu w krwiobiegu i lepszą farmakokinetkę [195]. W konsekwencji, amidowe pochodne gemcytabiny i NLPZ mogą potencjalnie pozwolić na uzyskanie stabilnego związku o przedłużonym działaniu i bardziej przewidywalnym profilu farmakodynamicznym. Co więcej, koniugaty amidowe można funkcjonalizować za pomocą linkerów takich jak sekwencje peptydowe, które pozwalają na kontrolowane, specyficzne uwalnianie aktywnych składników w warunkach obecnych w nowotworze (np. w odpowiedzi na pH, obecność enzymów, czynniki redukujące) [58,196]. Jednak zastosowanie koniugatów amidowych jest bardziej problematyczne z powodu trudniejszego uwalniania aktywnych składników. Jeśli amid jest zbyt stabilny, koniugat może nie rozpaść się w komórkach i nie wykazywać oczekiwanej aktywności biologicznej. Inną trudnością jest możliwość utraty aktywności

gemcytabiny, jeśli modyfikacja dotyczy grupy niezbędnej do jej aktywacji metabolicznej (np. fosforylacji przez kinazy).

Koniugaty gemcytabiny z NLPZ – zarówno estrowe, jak i amidowe – mają potencjał, by stać się nową klasą proleków o podwójnej aktywności przeciwnowotworowej. Ich największym atutem jest możliwość połączenia efektu cytotoksycznego gemcytabiny z modulacją mikrośrodowiska guza i działaniem proapoptotycznym NLPZ. W praktyce może to prowadzić do zwiększonej cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych, redukcji chemiooporności, zmniejszenia procesów zapalnych i angiogenezy, a także do poprawy odpowiedzi immunologicznej organizmu wobec guza. Jednocześnie synteza i zastosowanie takich koniugatów niosą za sobą pewne wyzwania. W przypadku estrów należy rozwiązać problem niestabilności i przedwczesnej hydrolizy, natomiast w przypadku amidów – trudności z uwalnianiem aktywnych składników. Oba typy koniugatów wymagają dogłębnej charakteryzacji fizykochemicznej, badań stabilności w warunkach fizjologicznych oraz testów biologicznych *in vitro* i *in vivo* w porównaniu do zastosowania czystej gemcytabiny.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że otrzymywanie chlorków kwasowych wybranych NLPZ (aspiryny, ibuprofenu, flurbiprofenu, ketoprofenu i naproksenu) z wykorzystaniem chlorku tionylu w polu mikrofalowym stanowi efektywną metodę aktywacji grupy karboksylowej. Zastosowane warunki reakcji pozwoliły ograniczyć czas syntezy i degradację substratów, a uzyskane wysokie wydajności (81–90%) oraz czyste widma NMR potwierdziły skuteczność procedury. Zaobserwowano nietrwałość chlorków w kontakcie z wilgocią, a więc jest konieczne szybkie wykorzystanie ich w dalszych reakcjach (estryfikacja, amidacja), co jest zgodne z literaturowymi doniesieniami o labilności chlorków kwasowych.

Ze względów praktycznych i ekonomicznych, w pierwszym etapie badań jako modelowy nukleozyd wykorzystano cytydynę, która jest znacznie tańszym i łatwiej dostępnym substratem niż gemcytabina. Pozwoliło to na opracowanie i przetestowanie warunków reakcji sprzęgania z NLPZ przy jednoczesnym ograniczeniu kosztów eksperymentów. Uzyskane doświadczenia z cytydyną stanowiły punkt wyjścia do dalszych

syntez z udziałem gemcytabiny, których celem było otrzymanie koniugatów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

Na podstawie wyników pierwszych prób sprzęgania cytydyny z NLPZ można stwierdzić, że koniugacja z kwasem acetylosalicylowym jest możliwa, jednak zachodzi z umiarkowaną wydajnością (41–52%) oraz problemami z czystością produktów. Zarówno metoda z wykorzystaniem chlorku acetylosalicylowego w obecności pirydyny, jak i podejścia z DCC/HOSu i DCC/DMAP prowadziły do powstawania produktów o zróżnicowanej czystości – od krystalicznych ciał stałych po lepkie mieszaniny, w których obserwowano obecność produktów ubocznych, m.in. DCU. Występowały bardzo duże trudności z oczyszczaniem związków. Widma NMR potwierdziły estryfikację cytydyny w pozycji C-5', jednak ich interpretacja była utrudniona z powodu obecności sygnałów pochodzących od produktów ubocznych. W przypadku prób z naproksenem, ketoprofenem i flurbiprofenem syntezy kończyły się bardzo niskimi wydajnościami i/lub degradacją produktów.

W dalszym etapie badań skupiono się na sprzęganiu gemcytabiny z NLPZ lub chlorkami kwasowymi NLPZ. Ze względu na obecność dwóch reaktywnych grup hydroksylowych w pozycji C-3' i C-5' w pierścieniu rybozy, otrzymano zarówno mono-, jak i diestrowe pochodne. Zastosowanie metod aktywacji karboksylu z wykorzystaniem DCC/DMAP prowadziło do powstawania mieszaniny obejmującej wolną gemcytabinę, monoestrowe oraz diestrowe produkty. Analizy TLC konsekwentnie wskazywały na obecność kilku plamek o zbliżonej polarności, a widma NMR potwierdzały nakładające się sygnały odpowiadające różnym stopniom estryfikacji. W widmach ^{13}C -NMR obserwowano sygnały estrowych grup karbonylowych w zakresie δ 175–176 ppm, charakterystyczne zarówno dla monoestrów, jak i diestrów. Jednocześnie brak sygnałów odpowiadających wolnym grupom karboksylowym NLPZ potwierdzał efektywne zajście reakcji estryfikacji. Otrzymane mieszaniny produktów były trudne do rozdzielenia klasycznymi metodami chromatograficznymi ze względu na zbliżoną polarność koniugatów. Produkty reakcji często miały formę oleistych, trudno krystalizujących substancji, co dodatkowo komplikowało ich pełną charakterystykę.

W procesie syntezy gemcytabiny z użyciem chlorku kwasowego ibuprofenu otrzymano monoestrowy koniugat gemcytabiny. W widmie ^{13}C -NMR zaobserwowano

obecność pojedynczego sygnału karbonylowego pochodzącego z grupy estrowej oraz brak sygnałów dla wolnych grup karboksylowych. Choć uzyskane produkty charakteryzowały się umiarkowaną wydajnością i problemami z izolacją czystych frakcji, to widma NMR i analiza TLC wskazują na otrzymanie oczekiwanych koniugatów estrowych.

W dalszych planach badawczych przewidywana jest izolacja czystych pochodnych i przeprowadzenie dalszych badań biologicznych otrzymanych koniugatów, zarówno z wykorzystaniem BM-MSD jako nośników, jak i w bezpośrednim podaniu.

7. Wnioski

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na wyciągnięcie kilku istotnych wniosków:

1. Przeprowadzone badania *in vitro* dostarczyły nowych danych dotyczących potencjalnych możliwości zastosowania gemcytabiny w połączeniu z NLPZ (kwasu acetylosalicylowego, ibuprofenu oraz flurbiprofenu) w terapii przeciwnowotworowej raka trzustki.
2. Kombinacje związków zastosowanych samodzielnie w formulacjach, jak i zastosowanie dodatkowo mezenchymalnych komórek macierzystych i ich metabolitów, prowadzą do nasilonego efektu cytotoksycznego wobec badanych linii komórkowych nowotworu trzustki, przewyższając działanie samej gemcytabiny.
3. W testach żywotności, badaniach apoptozy i nekrozy oraz cyklu komórkowego zaobserwowano, że wszystkie trzy zastosowane NLPZ zwiększają wrażliwość komórek nowotworowych na działanie gemcytabiny, jednak efekt ten był zróżnicowany w zależności od linii komórkowej.
4. Najbardziej intensywny efekt cytotoksyczny zaobserwowano dla połączenia gemcytabiny i flurbiprofenu, co może wskazywać na wpływ strukturalnych różnic pomiędzy poszczególnymi NLPZ na ich potencjał oraz mechanizm działania z gemcytabiną.

5. Komórki BM-MSC zachowują wysoką oporność na działanie gemcytabiny i NLPZ, co czyni je atrakcyjnymi kandydatami do wykorzystania w systemach dostarczania leków.
6. Zastosowanie CM-GEM może wpływać na zmniejszenie żywotności komórek nowotworowych trzustki oraz indukować mechanizmy apoptotyczne i nekrotyczne, jednak nie zaobserwowanego istotnego wpływu dodatku NLPZ na te właściwości.
7. Zastosowanie CM istotnie wpływało na wzrost komórek nowotworowych linii AsPC-1, co potwierdza właściwości promujące wzrost komórek nowotworowych przez BM-MSC zależne od linii komórkowej, jednak obecność GEM ogranicza ten efekt.
8. Badania kokultury BM-MSC oraz PCC wykazały, że BM-MSC poddane działaniu leków przeciwnowotworowych mogą służyć jako potencjalne wektory terapeutyczne wspierające cytotoksyczność leków.
9. Wykazano różnice w aktywacji szlaków apoptozy w wybranych liniach PCC w badaniach Western blottingu. Różnice te mogą wskazywać na specyficzne mechanizmy oporności oraz na odmienną skuteczność potencjalnej terapii w różnych typach nowotworów trzustki.
10. Koniugaty gemcytabiny z NLPZ mają potencjał, by stać się nową klasą proleków o podwójnej aktywności przeciwnowotworowej. Ich największym atutem jest możliwość połączenia efektu cytotoksycznego gemcytabiny z modulacją mikrośrodowiska nowotworu i działaniem proapoptotycznym NLPZ.
11. Otrzymywanie chlorków kwasowych wybranych NLPZ z wykorzystaniem chlorku tionylu w polu mikrofalowym stanowi efektywną metodę aktywacji grupy karboksylowej. Otrzymane produkty można wykorzystać w reakcjach sprzęgania w kolejnych etapach syntezy.
12. W reakcjach estryfikacji cytydyny z kwasem acetylosalicylowym z zastosowaniem DCC/HOSu oraz DCC/DMPAP, a także cytydyny z ibuprofenem przy użyciu EDC/HOBt, możliwe jest uzyskanie nowych koniugatów. W trakcie syntezy powstaje wiele produktów ubocznych.
13. Zastosowanie metod aktywacji karboksylu z wykorzystaniem DCC w reakcjach gemcytabiny z NLPZ prowadziło do powstawania mieszaniny produktów, obejmującej wolną gemcytabinę oraz monoestrowe oraz diestrowe pochodne.

14. Zastosowanie chlorków kwasowych ibuprofenu oraz pola mikrofalowego pozwala uzyskać większą selektywność reakcji w kierunku monoestrowego produktu oraz wydajność, ponadto wpisuje się w kanony zielonej chemii.
15. Otrzymane mieszaniny produktów były trudne do rozdzielenia klasycznymi metodami chromatograficznymi ze względu na zbliżoną polarność koniugatów, co istotnie utrudniało izolację czystych związków. Zastosowano chromatograficzne metody oczyszczania typu Flash z wykorzystaniem kolumny RediSep GOLD C18.

8. Literatura

1. Hu, J.-X.; Zhao, C.-F.; Chen, W.-B.; Liu, Q.-C.; Li, Q.-W.; Lin, Y.-Y.; Gao, F. Pancreatic Cancer: A Review of Epidemiology, Trend, and Risk Factors. *World J Gastroenterol* **2021**, *27*, 4298–4321, doi:10.3748/wjg.v27.i27.4298.
2. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**, *68*, 394–424, doi:10.3322/caac.21492.
3. Mizrahi, J.D.; Surana, R.; Valle, J.W.; Shroff, R.T. Pancreatic Cancer. *Lancet* **2020**, *395*, 2008–2020, doi:10.1016/S0140-6736(20)30974-0.
4. Brown, T.J.; Reiss, K.A.; O'Hara, M.H. Advancements in Systemic Therapy for Pancreatic Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **2023**, e397082, doi:10.1200/EDBK_397082.
5. Principe, D.R.; Underwood, P.W.; Korc, M.; Trevino, J.G.; Munshi, H.G.; Rana, A. The Current Treatment Paradigm for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Barriers to Therapeutic Efficacy. *Front Oncol* **2021**, *11*, 688377, doi:10.3389/fonc.2021.688377.
6. Weniger, M.; Honselmann, K.; Liss, A. The Extracellular Matrix and Pancreatic Cancer: A Complex Relationship. *Cancers* **2018**, *10*, 316, doi:10.3390/cancers10090316.
7. Apte, M.V.; Wilson, J.S.; Lugea, A.; Pandol, S.J. A Starring Role for Stellate Cells in the Pancreatic Cancer Microenvironment. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 1210–1219, doi:10.1053/j.gastro.2012.11.037.
8. Mekapogu, A.R.; Pothula, S.P.; Pirola, R.C.; Wilson, J.S.; Apte, M.V. Multifunctional Role of Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Cancer. *Ann Pancreat Cancer* **2019**, *2*, 10–10, doi:10.21037/apc.2019.05.02.
9. Ferrara, B.; Pignatelli, C.; Cossutta, M.; Citro, A.; Courty, J.; Piemonti, L. The Extracellular Matrix in Pancreatic Cancer: Description of a Complex Network and Promising Therapeutic Options. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 4442, doi:10.3390/cancers13174442.
10. Olaoba, O.T.; Adelusi, T.I.; Yang, M.; Maidens, T.; Kimchi, E.T.; Staveley-O'Carroll, K.F.; Li, G. Driver Mutations in Pancreatic Cancer and Opportunities for Targeted Therapy. *Cancers* **2024**, *16*, 1808, doi:10.3390/cancers16101808.
11. Hu, H.; Ye, Z.; Qin, Y.; Xu, X.; Yu, X.; Zhuo, Q.; Ji, S. Mutations in Key Driver Genes of Pancreatic Cancer: Molecularly Targeted Therapies and Other Clinical

- Implications. *Acta Pharmacol Sin* **2021**, *42*, 1725–1741, doi:10.1038/s41401-020-00584-2.
12. Hayashi, H.; Higashi, T.; Miyata, T.; Yamashita, Y.; Baba, H. Recent Advances in Precision Medicine for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Gastroenterol Surg* **2021**, *5*, 457–466, doi:10.1002/ags3.12436.
 13. Rueff, J.; Rodrigues, A.S. Cancer Drug Resistance: A Brief Overview from a Genetic Viewpoint. In *Cancer Drug Resistance: Overviews and Methods*; Rueff, J., Rodrigues, A.S., Eds.; Springer: New York, NY, 2016; pp. 1–18 ISBN 978-1-4939-3347-1.
 14. Szakács, G.; Paterson, J.K.; Ludwig, J.A.; Booth-Gentle, C.; Gottesman, M.M. Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 219–234, doi:10.1038/nrd1984.
 15. Wang, Z.; Li, Y.; Ahmad, A.; Banerjee, S.; Azmi, A.S.; Kong, D.; Sarkar, F.H. Pancreatic Cancer: Understanding and Overcoming Chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2011**, *8*, 27–33, doi:10.1038/nrgastro.2010.188.
 16. Xie, J.; Weiskirchen, R. What Does the “AKT” Stand for in the Name “AKT Kinase”? Some Historical Comments. *Front Oncol* **2020**, *10*, 1329, doi:10.3389/fonc.2020.01329.
 17. Ni, M.; Wang, Y.; Wu, W.; Xia, C.; Zhang, Y.; Xu, J.; Xu, T.; Li, J. Novel Insights on Notch Signaling Pathways in Liver Fibrosis. *European Journal of Pharmacology* **2018**, *826*, 66–74, doi:10.1016/j.ejphar.2018.02.051.
 18. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF- κ B Signaling in Inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2017**, *2*, 17023, doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
 19. Carballo, G.B.; Honorato, J.R.; de Lopes, G.P.F.; Spohr, T.C.L. de S. e A Highlight on Sonic Hedgehog Pathway. *Cell Communication and Signaling* **2018**, *16*, 11, doi:10.1186/s12964-018-0220-7.
 20. Yang, J.; Antin, P.; Berx, G.; Blanpain, C.; Brabletz, T.; Bronner, M.; Campbell, K.; Cano, A.; Casanova, J.; Christofori, G.; et al. Guidelines and Definitions for Research on Epithelial–Mesenchymal Transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21*, 341–352, doi:10.1038/s41580-020-0237-9.
 21. Amrutkar, M.; Gladhaug, I.P. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers (Basel)* **2017**, *9*, 157, doi:10.3390/cancers9110157.
 22. Nielsen, M.F.B.; Mortensen, M.B.; Detlefsen, S. Key Players in Pancreatic Cancer–Stroma Interaction: Cancer-Associated Fibroblasts, Endothelial and Inflammatory Cells. *World J Gastroenterol* **2016**, *22*, 2678–2700, doi:10.3748/wjg.v22.i9.2678.

23. von Ahrens, D.; Bhagat, T.D.; Nagrath, D.; Maitra, A.; Verma, A. The Role of Stromal Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Cancer. *J Hematol Oncol* **2017**, *10*, 76, doi:10.1186/s13045-017-0448-5.
24. Tjomsland, V.; Pomianowska, E.; Aasrum, M.; Sandnes, D.; Verbeke, C.S.; Gladhaug, I.P. Profile of MMP and TIMP Expression in Human Pancreatic Stellate Cells: Regulation by IL-1 α and TGF β and Implications for Migration of Pancreatic Cancer Cells. *Neoplasia* **2016**, *18*, 447–456, doi:10.1016/j.neo.2016.06.003.
25. Mengie Ayele, T.; Tilahun Muche, Z.; Behaile Teklemariam, A.; Bogale Kassie, A.; Chekol Abebe, E. Role of JAK2/STAT3 Signaling Pathway in the Tumorigenesis, Chemotherapy Resistance, and Treatment of Solid Tumors: A Systemic Review. *J Inflamm Res* **2022**, *15*, 1349–1364, doi:10.2147/JIR.S353489.
26. Sm, W.; L, S.; J, A.; Kn, D.; Mu, K.; K, G.; D, R.; A, C.; C, D.; D, J.; et al. Loss of P53 Function Activates JAK2-STAT3 Signaling to Promote Pancreatic Tumor Growth, Stroma Modification, and Gemcitabine Resistance in Mice and Is Associated With Patient Survival. *Gastroenterology* **2016**, *151*, doi:10.1053/j.gastro.2016.03.010.
27. Sherman, M.H.; Yu, R.T.; Engle, D.D.; Ding, N.; Atkins, A.R.; Tiriach, H.; Collisson, E.A.; Connor, F.; Van Dyke, T.; Kozlov, S.; et al. Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy. *Cell* **2014**, *159*, 80–93, doi:10.1016/j.cell.2014.08.007.
28. Chauhan, V.P.; Martin, J.D.; Liu, H.; Lacorre, D.A.; Jain, S.R.; Kozin, S.V.; Stylianopoulos, T.; Mousa, A.S.; Han, X.; Adstamongkonkul, P.; et al. Angiotensin Inhibition Enhances Drug Delivery and Potentiates Chemotherapy by Decompressing Tumour Blood Vessels. *Nat Commun* **2013**, *4*, 2516, doi:10.1038/ncomms3516.
29. Jacobetz, M.A.; Chan, D.S.; Neesse, A.; Bapiro, T.E.; Cook, N.; Frese, K.K.; Feig, C.; Nakagawa, T.; Caldwell, M.E.; Zecchini, H.I.; et al. Hyaluronan Impairs Vascular Function and Drug Delivery in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Gut* **2013**, *62*, 112–120, doi:10.1136/gutjnl-2012-302529.
30. Provenzano, P.P.; Cuevas, C.; Chang, A.E.; Goel, V.K.; Von Hoff, D.D.; Hingorani, S.R. Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 418–429, doi:10.1016/j.ccr.2012.01.007.
31. Stromnes, I.M.; Schmitt, T.M.; Hulbert, A.; Brockenbrough, J.S.; Nguyen, H.; Cuevas, C.; Dotson, A.M.; Tan, X.; Hotes, J.L.; Greenberg, P.D.; et al. T Cells Engineered against a Native Antigen Can Surmount Immunologic and Physical Barriers to Treat Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 638–652, doi:10.1016/j.ccell.2015.09.022.
32. Mini, E.; Nobili, S.; Caciagli, B.; Landini, I.; Mazzei, T. Cellular Pharmacology of Gemcitabine. *Annals of Oncology* **2006**, *17*, v7–v12, doi:10.1093/annonc/mdj941.

33. Young, J.D.; Yao, S.Y.M.; Baldwin, J.M.; Cass, C.E.; Baldwin, S.A. The Human Concentrative and Equilibrative Nucleoside Transporter Families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* **2013**, *34*, 529–547, doi:10.1016/j.mam.2012.05.007.
34. Mackey, J.R.; Mani, R.S.; Selner, M.; Mowles, D.; Young, J.D.; Belt, J.A.; Crawford, C.R.; Cass, C.E. Functional Nucleoside Transporters Are Required for Gemcitabine Influx and Manifestation of Toxicity in Cancer Cell Lines. *Cancer Res* **1998**, *58*, 4349–4357.
35. Fujita, H.; Ohuchida, K.; Mizumoto, K.; Itaba, S.; Ito, T.; Nakata, K.; Yu, J.; Kayashima, T.; Souzaki, R.; Tajiri, T.; et al. Gene Expression Levels as Predictive Markers of Outcome in Pancreatic Cancer after Gemcitabine-Based Adjuvant Chemotherapy. *Neoplasia* **2010**, *12*, 807–817, doi:10.1593/neo.10458.
36. Shipley, L.A.; Brown, T.J.; Cornpropst, J.D.; Hamilton, M.; Daniels, W.D.; Culp, H.W. Metabolism and Disposition of Gemcitabine, and Oncolytic Deoxycytidine Analog, in Mice, Rats, and Dogs. *Drug Metab Dispos* **1992**, *20*, 849–855.
37. Heinemann, V.; Xu, Y.Z.; Chubb, S.; Sen, A.; Hertel, L.W.; Grindey, G.B.; Plunkett, W. Cellular Elimination of 2',2'-Difluorodeoxycytidine 5'-Triphosphate: A Mechanism of Self-Potentiation. *Cancer Res* **1992**, *52*, 533–539.
38. Moysan, E.; Bastiat, G.; Benoit, J.-P. Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: A Review of Several Promising Chemical Modifications. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 430–444, doi:10.1021/mp300370t.
39. Toschi, L.; Finocchiaro, G.; Bartolini, S.; Gioia, V.; Cappuzzo, F. Role of Gemcitabine in Cancer Therapy. *Future Oncology* **2005**, *1*, 7–17, doi:10.1517/14796694.1.1.7.
40. Abet, V.; Filace, F.; Recio, J.; Alvarez-Builla, J.; Burgos, C. Prodrug Approach: An Overview of Recent Cases. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *127*, 810–827, doi:10.1016/j.ejmech.2016.10.061.
41. Pereira, M.; Vale, N. Two Possible Strategies for Drug Modification of Gemcitabine and Future Contributions to Personalized Medicine. *Molecules* **2022**, *27*, 291, doi:10.3390/molecules27010291.
42. Singh, A. A Review on Gemcitabine Modification. *Materials Today: Proceedings* **2020**, S2214785320368103, doi:10.1016/j.matpr.2020.09.118.
43. Mero, A.; Clementi, C.; Veronese, F.M.; Pasut, G. Covalent Conjugation of Poly(Ethylene Glycol) to Proteins and Peptides: Strategies and Methods. In *Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods*; Mark, S.S., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp. 95–129 ISBN 978-1-61779-151-2.
44. Koolen, S.L.W.; Witteveen, P.O.; Jansen, R.S.; Langenberg, M.H.G.; Kronemeijer, R.H.; Nol, A.; Garcia-Ribas, I.; Callies, S.; Benhadji, K.A.; Slapak, C.A.; et al. Phase I Study of Oral Gemcitabine Prodrug (LY2334737) Alone and in Combination with

- Erlotinib in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 6071–6082, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0353.
45. Pratt, S.E.; Durland-Busbice, S.; Shepard, R.L.; Heinz-Taheny, K.; Iversen, P.W.; Dantzig, A.H. Human Carboxylesterase-2 Hydrolyzes the Prodrug of Gemcitabine (LY2334737) and Confers Prodrug Sensitivity to Cancer Cells. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 1159–1168, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1184.
 46. Aggarwal, S.; Yadav, S.; Gupta, S. EGFR Targeted PLGA Nanoparticles Using Gemcitabine for Treatment of Pancreatic Cancer. *J Biomed Nanotechnol* **2011**, *7*, 137–138, doi:10.1166/jbn.2011.1238.
 47. Yang, F.; Jin, C.; Yang, D.; Jiang, Y.; Li, J.; Di, Y.; Hu, J.; Wang, C.; Ni, Q.; Fu, D. Magnetic Functionalised Carbon Nanotubes as Drug Vehicles for Cancer Lymph Node Metastasis Treatment. *Eur J Cancer* **2011**, *47*, 1873–1882, doi:10.1016/j.ejca.2011.03.018.
 48. Ventura, C.A.; Cannavà, C.; Stancanelli, R.; Paolino, D.; Cosco, D.; La Mantia, A.; Pignatello, R.; Tommasini, S. Gemcitabine-Loaded Chitosan Microspheres. Characterization and Biological in Vitro Evaluation. *Biomed Microdevices* **2011**, *13*, 799–807, doi:10.1007/s10544-011-9550-6.
 49. Jantscheff, P.; Ziroli, V.; Esser, N.; Graeser, R.; Kluth, J.; Sukolinskaya, A.; Taylor, L.A.; Unger, C.; Massing, U. Anti-Metastatic Effects of Liposomal Gemcitabine in a Human Orthotopic LNCaP Prostate Cancer Xenograft Model. *Clin Exp Metastasis* **2009**, *26*, 981–992, doi:10.1007/s10585-009-9288-1.
 50. Immordino, M.L.; Brusa, P.; Rocco, F.; Arpicco, S.; Ceruti, M.; Cattel, L. Preparation, Characterization, Cytotoxicity and Pharmacokinetics of Liposomes Containing Lipophilic Gemcitabine Prodrugs. *Journal of Controlled Release* **2004**, *100*, 331–346, doi:10.1016/j.jconrel.2004.09.001.
 51. Reddy, L.H.; Renoir, J.-M.; Marsaud, V.; Lepetre-Mouelhi, S.; Desmaële, D.; Couvreur, P. Anticancer Efficacy of Squalenoyl Gemcitabine Nanomedicine on 60 Human Tumor Cell Panel and on Experimental Tumor. *Mol Pharm* **2009**, *6*, 1526–1535, doi:10.1021/mp900099e.
 52. Venugopal, B.; Awada, A.; Evans, T.R.J.; Dueland, S.; Hendlisz, A.; Rasch, W.; Hernes, K.; Hagen, S.; Aamdal, S. A First-in-Human Phase I and Pharmacokinetic Study of CP-4126 (CO-101), a Nucleoside Analogue, in Patients with Advanced Solid Tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* **2015**, *76*, 785–792, doi:10.1007/s00280-015-2846-0.
 53. Adema, A.D.; Laan, A.C.; Myhren, F.; Fichtner, I.; Verheul, H.M.; Sandvold, M.L.; Peters, G.J. Cell Cycle Effects of Fatty Acid Derivatives of Cytarabine, CP-4055, and of Gemcitabine, CP-4126, as Basis for the Interaction with Oxaliplatin and Docetaxel. *Int J Oncol* **2010**, *36*, 285–294.

54. Ali, S.M.; Khan, A.R.; Ahmad, M.U.; Chen, P.; Sheikh, S.; Ahmad, I. Synthesis and Biological Evaluation of Gemcitabine-Lipid Conjugate (NEO6002). *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 2571–2574, doi:10.1016/j.bmcl.2005.03.046.
55. Chen, P.; Chien, P.-Y.; Khan, A.R.; Sheikh, S.; Ali, S.M.; Ahmad, M.U.; Ahmad, I. In-Vitro and in-Vivo Anti-Cancer Activity of a Novel Gemcitabine-Cardiolipin Conjugate. *Anticancer Drugs* **2006**, *17*, 53–61, doi:10.1097/01.cad.0000185182.80227.48.
56. Chien, P.-Y.; Khan, A.R.; Miller, B.; Sheikh, S.; Ali, S.M.; Ahmad, M.U.; Ahmad, I. A Novel Gemcitabine-Cardiolipin Conjugate Induced Cytotoxicity in Cancer Cells through an Equilibrative Nucleoside Transporter-Independent Pathway. *Cancer Res* **2005**, *65*, 1197–1197.
57. Tsume, Y.; Borrás Bermejo, B.; Amidon, G.L. The Dipeptide Monoester Prodrugs of Floxuridine and Gemcitabine—Feasibility of Orally Administrable Nucleoside Analogs. *Pharmaceuticals* **2014**, *7*, 169–191, doi:10.3390/ph7020169.
58. Hong, S.; Fang, Z.; Jung, H.-Y.; Yoon, J.-H.; Hong, S.-S.; Maeng, H.-J. Synthesis of Gemcitabine-Threonine Amide Prodrug Effective on Pancreatic Cancer Cells with Improved Pharmacokinetic Properties. *Molecules* **2018**, *23*, 2608, doi:10.3390/molecules23102608.
59. Tsume, Y.; Incecayir, T.; Song, X.; Hilfinger, J.M.; Amidon, G.L. The Development of Orally Administrable Gemcitabine Prodrugs with D-Enantiomer Amino Acids: Enhanced Membrane Permeability and Enzymatic Stability. *Eur J Pharm Biopharm* **2014**, *86*, 514–523, doi:10.1016/j.ejpb.2013.12.009.
60. Mollaei, M.; Abbasi, A.; Hassan, Z.M.; Pakravan, N. The Intrinsic and Extrinsic Elements Regulating Inflammation. *Life Sciences* **2020**, *260*, 118258, doi:10.1016/j.lfs.2020.118258.
61. Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases in Organs. *Oncotarget* **2017**, *9*, 7204–7218, doi:10.18632/oncotarget.23208.
62. Murphy, P.M. 10 - Chemokines and Chemokine Receptors. In *Clinical Immunology (Fifth Edition)*; Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Schroeder, H.W., Frew, A.J., Weyand, C.M., Eds.; Elsevier: London, 2019; pp. 157-170.e1 ISBN 978-0-7020-6896-6.
63. Tvaroška, I.; Selvaraj, C.; Koča, J. Selectins—The Two Dr. Jekyll and Mr. Hyde Faces of Adhesion Molecules—A Review. *Molecules* **2020**, *25*, 2835, doi:10.3390/molecules25122835.
64. Zappavigna, S.; Cossu, A.M.; Grimaldi, A.; Bocchetti, M.; Ferraro, G.A.; Nicoletti, G.F.; Filosa, R.; Caraglia, M. Anti-Inflammatory Drugs as Anticancer Agents. *IJMS* **2020**, *21*, 2605, doi:10.3390/ijms21072605.

65. Headland, S.E.; Norling, L.V. The Resolution of Inflammation: Principles and Challenges. *Seminars in Immunology* **2015**, *27*, 149–160, doi:10.1016/j.smim.2015.03.014.
66. Sugimoto, M.A.; Sousa, L.P.; Pinho, V.; Perretti, M.; Teixeira, M.M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol* **2016**, *7*, 160, doi:10.3389/fimmu.2016.00160.
67. Wong, R.S.Y. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion. *Advances in Pharmacological Sciences* **2019**, *2019*, 3418975, doi:10.1155/2019/3418975.
68. Ruder, E.H.; Laiyemo, A.O.; Graubard, B.I.; Hollenbeck, A.R.; Schatzkin, A.; Cross, A.J. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Colorectal Cancer Risk in a Large, Prospective Cohort. *Am J Gastroenterol* **2011**, *106*, 1340–1350, doi:10.1038/ajg.2011.38.
69. Friis, S.; Riis, A.H.; Erichsen, R.; Baron, J.A.; Sørensen, H.T. Low-Dose Aspirin or Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use and Colorectal Cancer Risk. *Ann Intern Med* **2015**, *163*, 347–355, doi:10.7326/M15-0039.
70. Sandler, R.S.; Halabi, S.; Baron, J.A.; Budinger, S.; Paskett, E.; Keresztes, R.; Petrelli, N.; Pipas, J.M.; Karp, D.D.; Loprinzi, C.L.; et al. A Randomized Trial of Aspirin to Prevent Colorectal Adenomas in Patients with Previous Colorectal Cancer. *N Engl J Med* **2003**, *348*, 883–890, doi:10.1056/NEJMoa021633.
71. Baron, J.A.; Cole, B.F.; Sandler, R.S.; Haile, R.W.; Ahnen, D.; Bresalier, R.; McKeown-Eyssen, G.; Summers, R.W.; Rothstein, R.; Burke, C.A.; et al. A Randomized Trial of Aspirin to Prevent Colorectal Adenomas. *N Engl J Med* **2003**, *348*, 891–899, doi:10.1056/NEJMoa021735.
72. Pathi, S.; Jutooru, I.; Chadalapaka, G.; Nair, V.; Lee, S.-O.; Safe, S. Aspirin Inhibits Colon Cancer Cell and Tumor Growth and Downregulates Specificity Protein (Sp) Transcription Factors. *PLoS One* **2012**, *7*, e48208, doi:10.1371/journal.pone.0048208.
73. Yao, M.; Zhou, W.; Sangha, S.; Albert, A.; Chang, A.J.; Liu, T.C.; Wolfe, M.M. Effects of Nonselective Cyclooxygenase Inhibition with Low-Dose Ibuprofen on Tumor Growth, Angiogenesis, Metastasis, and Survival in a Mouse Model of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 1618–1628, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1696.
74. Petrick, J.L.; Sahasrabudhe, V.V.; Chan, A.T.; Alavanja, M.C.; Beane-Freeman, L.E.; Buring, J.E.; Chen, J.; Chong, D.Q.; Freedman, N.D.; Fuchs, C.S.; et al. NSAID Use and Risk of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma: The Liver Cancer Pooling Project. *Cancer Prev Res (Phila)* **2015**, *8*, 1156–1162, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0126.

75. Abdelmalak, J.; Tan, N.; Con, D.; Eslick, G.; Majeed, A.; Kemp, W.; Roberts, S.K. The Effect of Aspirin Use on Incident Hepatocellular Carcinoma—An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)* **2023**, *15*, 3518, doi:10.3390/cancers15133518.
76. Khalaf, N.; Yuan, C.; Hamada, T.; Cao, Y.; Babic, A.; Morales-Oyarvide, V.; Kraft, P.; Ng, K.; Giovannucci, E.; Ogino, S.; et al. Regular Use of Aspirin or Non-Aspirin Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Is Not Associated With Risk of Incident Pancreatic Cancer in Two Large Cohort Studies. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 1380–1390.e5, doi:10.1053/j.gastro.2017.12.001.
77. Thakkar, A.; Chenreddy, S.; Wang, J.; Prabhu, S. Evaluation of Ibuprofen Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Its Combination Regimens for Pancreatic Cancer Chemoprevention. *International Journal of Oncology* **2015**, *46*, 1827–1834, doi:10.3892/ijo.2015.2879.
78. Prizment, A.E.; Folsom, A.R.; Anderson, K.E. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Risk for Ovarian and Endometrial Cancers in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2010**, *19*, 435–442, doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0976.
79. Trabert, B.; Ness, R.B.; Lo-Ciganic, W.-H.; Murphy, M.A.; Goode, E.L.; Poole, E.M.; Brinton, L.A.; Webb, P.M.; Nagle, C.M.; Jordan, S.J.; et al. Aspirin, Nonaspirin Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug, and Acetaminophen Use and Risk of Invasive Epithelial Ovarian Cancer: A Pooled Analysis in the Ovarian Cancer Association Consortium. *J Natl Cancer Inst* **2014**, *106*, djt431, doi:10.1093/jnci/djt431.
80. Baandrup, L.; Kjaer, S.K.; Olsen, J.H.; Dehlendorff, C.; Friis, S. Low-Dose Aspirin Use and the Risk of Ovarian Cancer in Denmark. *Ann Oncol* **2015**, *26*, 787–792, doi:10.1093/annonc/mdu578.
81. Harris, R.E.; Chlebowski, R.T.; Jackson, R.D.; Frid, D.J.; Ascenseo, J.L.; Anderson, G.; Loar, A.; Rodabough, R.J.; White, E.; McTiernan, A.; et al. Breast Cancer and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Prospective Results from the Women's Health Initiative. *Cancer Res* **2003**, *63*, 6096–6101.
82. Kim, S.; Shore, D.L.; Wilson, L.E.; Sanniez, E.I.; Kim, J.H.; Taylor, J.A.; Sandler, D.P. Lifetime Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Breast Cancer Risk: Results from a Prospective Study of Women with a Sister with Breast Cancer. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 960, doi:10.1186/s12885-015-1979-1.
83. Dierssen-Sotos, T.; Gómez-Acebo, I.; de Pedro, M.; Pérez-Gómez, B.; Servitja, S.; Moreno, V.; Amiano, P.; Fernandez-Villa, T.; Barricarte, A.; Tardon, A.; et al. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Risk of Breast Cancer: The Spanish Multi-Case-Control (MCC) Study. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 660, doi:10.1186/s12885-016-2692-4.
84. Vidal, A.C.; Howard, L.E.; Moreira, D.M.; Castro-Santamaria, R.; Andriole, G.L.; Freedland, S.J. Aspirin, NSAIDs, and Risk of Prostate Cancer: Results from the

- REDUCE Study. *Clin Cancer Res* **2015**, 21, 756–762, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2235.
85. Doat, S.; C  n  e, S.; Tr  tarre, B.; Rebillard, X.; Lamy, P.-J.; Bringer, J.-P.; Iborra, F.; Murez, T.; Sanchez, M.; Menegaux, F. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Prostate Cancer Risk: Results from the EPICAP Study. *Cancer Med* **2017**, 6, 2461–2470, doi:10.1002/cam4.1186.
 86. Shebl, F.M.; Sakoda, L.C.; Black, A.; Koshiol, J.; Andriole, G.L.; Grubb, R.; Church, T.R.; Chia, D.; Zhou, C.; Chu, L.W.; et al. Aspirin but Not Ibuprofen Use Is Associated with Reduced Risk of Prostate Cancer: A PLCO Study. *Br J Cancer* **2012**, 107, 207–214, doi:10.1038/bjc.2012.227.
 87. Yang, N.; Liang, Y.; Yang, P.; Jiang, L. Flurbiprofen Inhibits Cell Proliferation in Thyroid Cancer through Interrupting HIP1R-Induced Endocytosis of PTEN. *Eur J Med Res* **2022**, 27, 29, doi:10.1186/s40001-022-00658-3.
 88. Clouser, M.C.; Roe, D.J.; Foote, J.A.; Harris, R.B. Effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Non-Melanoma Skin Cancer Incidence in the SKICAP-AK Trial. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **2009**, 18, 276–283, doi:10.1002/pds.1718.
 89. Shi, J.; Leng, W.; Zhao, L.; Xu, C.; Wang, J.; Chen, X.; Wang, Y.; Peng, X. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Using and Risk of Head and Neck Cancer: A Dose-Response Meta Analysis of Prospective Cohort Studies. *Oncotarget* **2017**, 8, 99066–99074, doi:10.18632/oncotarget.21524.
 90. Rakoff-Nahoum, S. Why Cancer and Inflammation? *Yale J Biol Med*, **2006**, 79, 3-4, 123-30.
 91. Hu, H.; Han, T.; Zhuo, M.; Wu, L.; Yuan, C.; Wu, L.; Lei, W.; Jiao, F.; Wang, L.-W. Elevated COX-2 Expression Promotes Angiogenesis Through EGFR/P38-MAPK/Sp1-Dependent Signalling in Pancreatic Cancer. *Sci Rep* **2017**, 7, 470, doi:10.1038/s41598-017-00288-4.
 92. Hashemi Goradel, N.; Najafi, M.; Salehi, E.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Cyclooxygenase-2 in Cancer: A Review. *J Cell Physiol* **2019**, 234, 5683–5699, doi:10.1002/jcp.27411.
 93. Finetti, F.; Travelli, C.; Ercoli, J.; Colombo, G.; Buoso, E.; Trabalzini, L. Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology (Basel)* **2020**, 9, doi:10.3390/biology9120434.
 94. Ulrich, C.M.; Bigler, J.; Potter, J.D. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs for Cancer Prevention: Promise, Perils and Pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer* **2006**, 6, 130–140, doi:10.1038/nrc1801.
 95. Stark, L.A.; Din, F.V.; Zwacka, R.M.; Dunlop, M.G. Aspirin-Induced Activation of the NF-kappaB Signaling Pathway: A Novel Mechanism for Aspirin-Mediated Apoptosis in Colon Cancer Cells. *FASEB J* **2001**, 15, 1273–1275.

96. Dikshit, P.; Chatterjee, M.; Goswami, A.; Mishra, A.; Jana, N.R. Aspirin Induces Apoptosis through the Inhibition of Proteasome Function. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 29228–29235, doi:10.1074/jbc.M602629200.
97. Gu, Q.; Wang, J.D.; Xia, H.H.X.; Lin, M.C.M.; He, H.; Zou, B.; Tu, S.P.; Yang, Y.; Liu, X.G.; Lam, S.K.; et al. Activation of the Caspase-8/Bid and Bax Pathways in Aspirin-Induced Apoptosis in Gastric Cancer. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 541–546, doi:10.1093/carcin/bgh345.
98. Harris, R.E.; Chlebowski, R.T.; Jackson, R.D.; Frid, D.J.; Ascenseo, J.L.; Anderson, G.; Loar, A.; Rodabough, R.J.; White, E.; McTiernan, A. Breast Cancer and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Prospective Results from the Women's Health Initiative1. *Cancer Res* **2003**, *63*, 6096–6101.
99. Flossmann, E.; Rothwell, P.M.; British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial Effect of Aspirin on Long-Term Risk of Colorectal Cancer: Consistent Evidence from Randomised and Observational Studies. *Lancet* **2007**, *369*, 1603–1613, doi:10.1016/S0140-6736(07)60747-8.
100. Bardia, A.; Ebbert, J.O.; Vierkant, R.A.; Limburg, P.J.; Anderson, K.; Wang, A.H.; Olson, J.E.; Vachon, C.M.; Cerhan, J.R. Association of Aspirin and Nonaspirin Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with Cancer Incidence and Mortality. *J Natl Cancer Inst* **2007**, *99*, 881–889, doi:10.1093/jnci/djk200.
101. de Groot, D.J.A.; de Vries, E.G.E.; Groen, H.J.M.; de Jong, S. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs to Potentiate Chemotherapy Effects: From Lab to Clinic. *Crit Rev Oncol Hematol* **2007**, *61*, 52–69, doi:10.1016/j.critrevonc.2006.07.001.
102. Maeng, H.J.; Song, J.-H.; Kim, G.-T.; Song, Y.-J.; Lee, K.; Kim, J.-Y.; Park, T.-S. Celecoxib-Mediated Activation of Endoplasmic Reticulum Stress Induces de Novo Ceramide Biosynthesis and Apoptosis in Hepatoma HepG2 Cells Mobilization. *BMB Rep* **2017**, *50*, 144–149, doi:10.5483/bmbrep.2017.50.3.197.
103. Sakoguchi-Okada, N.; Takahashi-Yanaga, F.; Fukada, K.; Shiraishi, F.; Taba, Y.; Miwa, Y.; Morimoto, S.; Iida, M.; Sasaguri, T. Celecoxib Inhibits the Expression of Survivin via the Suppression of Promoter Activity in Human Colon Cancer Cells. *Biochemical Pharmacology* **2007**, *73*, 1318–1329, doi:10.1016/j.bcp.2006.12.033.
104. Sabichi, A.L.; Lee, J.J.; Grossman, H.B.; Liu, S.; Richmond, E.; Czerniak, B.A.; De la Cerda, J.; Eagle, C.; Viner, J.L.; Palmer, J.L.; et al. A Randomized Controlled Trial of Celecoxib to Prevent Recurrence of Nonmuscle-Invasive Bladder Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* **2011**, *4*, 1580–1589, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0036.
105. Fabi, A.; Metro, G.; Papaldo, P.; Mottotese, M.; Melucci, E.; Carlini, P.; Sperduti, I.; Russillo, M.; Gelibter, A.; Ferretti, G.; et al. Impact of Celecoxib on Capecitabine Tolerability and Activity in Pretreated Metastatic Breast Cancer: Results of a Phase II Study with Biomarker Evaluation. *Cancer Chemother Pharmacol* **2008**, *62*, 717–725, doi:10.1007/s00280-007-0650-1.

106. Herrera, F.G.; Chan, P.; Doll, C.; Milosevic, M.; Oza, A.; Syed, A.; Pintilie, M.; Levin, W.; Manchul, L.; Fyles, A. A Prospective Phase I-II Trial of the Cyclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib in Patients with Carcinoma of the Cervix with Biomarker Assessment of the Tumor Microenvironment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2007**, *67*, 97–103, doi:10.1016/j.ijrobp.2006.08.024.
107. Mostafa, T.M.; Alm El-Din, M.A.; Rashdan, A.R. Celecoxib as an Adjuvant to Chemotherapy for Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Saudi Med J* **2022**, *43*, 37–44, doi:10.15537/smj.2022.43.1.20210574.
108. Mao, J.T.; Roth, M.D.; Fishbein, M.C.; Aberle, D.R.; Zhang, Z.-F.; Rao, J.Y.; Tashkin, D.P.; Goodglick, L.; Holmes, E.C.; Cameron, R.B.; et al. Lung Cancer Chemoprevention with Celecoxib in Former Smokers. *Cancer Prev Res (Phila)* **2011**, *4*, 984–993, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0078.
109. Ponthan, F.; Wickström, M.; Gleissman, H.; Fuskevåg, O.M.; Segerström, L.; Sveinbjörnsson, B.; Redfern, C.P.F.; Eksborg, S.; Kogner, P.; Johnsen, J.I. Celecoxib Prevents Neuroblastoma Tumor Development and Potentiates the Effect of Chemotherapeutic Drugs in Vitro and in Vivo. *Clin Cancer Res* **2007**, *13*, 1036–1044, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1908.
110. Pruthi, R.S.; Derksen, J.E.; Moore, D.; Carson, C.C.; Grigson, G.; Watkins, C.; Wallen, E. Phase II Trial of Celecoxib in Prostate-Specific Antigen Recurrent Prostate Cancer after Definitive Radiation Therapy or Radical Prostatectomy. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 2172–2177, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2067.
111. Murray, M.Y.; Rushworth, S.A.; Zaitseva, L.; Bowles, K.M.; MacEwan, D.J. Attenuation of Dexamethasone-Induced Cell Death in Multiple Myeloma Is Mediated by miR-125b Expression. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 2144–2153, doi:10.4161/cc.25251.
112. Wang, H.; Wang, Y.; Rayburn, E.R.; Hill, D.L.; Rinehart, J.J.; Zhang, R. Dexamethasone as a Chemosensitizer for Breast Cancer Chemotherapy: Potentiation of the Antitumor Activity of Adriamycin, Modulation of Cytokine Expression, and Pharmacokinetics. *Int J Oncol* **2007**, *30*, 947–953.
113. Yu, H.C.; Luo, Y.X.; Peng, H.; Kang, L.; Huang, M.J.; Wang, J.P. Avoiding Perioperative Dexamethasone May Improve the Outcome of Patients with Rectal Cancer. *Eur J Surg Oncol* **2015**, *41*, 667–673, doi:10.1016/j.ejso.2015.01.034.
114. Rajkumar, S.V.; Blood, E.; Vesole, D.; Fonseca, R.; Greipp, P.R.; Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Clinical Trial of Thalidomide plus Dexamethasone Compared with Dexamethasone Alone in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Clinical Trial Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* **2006**, *24*, 431–436, doi:10.1200/JCO.2005.03.0221.
115. Wang, X.; Ye, X.; Zhang, Y.; Ji, F. Flurbiprofen Suppresses the Inflammation, Proliferation, Invasion and Migration of Colorectal Cancer Cells via COX2. *Oncology Letters* **2020**, *20*, 1–1, doi:10.3892/ol.2020.11993.

116. Cerviño, R.H.; Gómez, N.; Sahores, A.; Gouts, A.; González, B.; Shayo, C.; Davio, C.; Yaneff, A. Flurbiprofen Inhibits cAMP Transport by MRP4/ABCC4 Increasing the Potency of Gemcitabine Treatment in PDAC Cell Models. *Int J Biol Macromol* **2024**, *280*, 136386, doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.136386.
117. Zhu, Y.; Gong, Y.; Wang, Y.; Jiang, Z.; Yao, Y.; Miao, X.; Wang, S.; Zhang, Y.; Cao, J. Flurbiprofen Axetil Is Involved in Basal-like Breast Cancer Metastasis via Suppressing the MEK/ERK Signaling Pathway. *Cell Biol Int* **2025**, *49*, 68–78, doi:10.1002/cbin.12251.
118. Greenspan, E.J.; Madigan, J.P.; Boardman, L.A.; Rosenberg, D.W. Ibuprofen Inhibits Activation of Nuclear β -Catenin in Human Colon Adenomas and Induces the Phosphorylation of GSK-3 β . *Cancer Prev Res (Phila)* **2011**, *4*, 161–171, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0021.
119. Saini, M.K.; Sanyal, S.N. Piroxicam and C-Phycocyanin Prevent Colon Carcinogenesis by Inhibition of Membrane Fluidity and Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling While up-Regulating Ligand Dependent Transcription Factor PPAR γ . *Biomed Pharmacother* **2014**, *68*, 537–550, doi:10.1016/j.biopha.2014.03.007.
120. Rai, N.; Sarkar, M.; Raha, S. Piroxicam, a Traditional Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID) Causes Apoptosis by ROS Mediated Akt Activation. *Pharmacological Reports* **2015**, *67*, 1215–1223, doi:10.1016/j.pharep.2015.05.012.
121. Earnest, D.L.; Hixson, L.J.; Alberts, D.S. Piroxicam and Other Cyclooxygenase Inhibitors: Potential for Cancer Chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* **1992**, *16I*, 156–166, doi:10.1002/jcb.240501330.
122. Mladenova, D.; Pangon, L.; Currey, N.; Ng, I.; Musgrove, E.A.; Grey, S.T.; Kohonen-Corish, M.R.J. Sulindac Activates NF- κ B Signaling in Colon Cancer Cells. *Cell Commun Signal* **2013**, *11*, 73, doi:10.1186/1478-811X-11-73.
123. Hossain, F.; Ucar, D.A.; Monticone, G.; Ran, Y.; Majumder, S.; Larter, K.; Luu, H.; Wyczechowska, D.; Heidari, S.; Xu, K.; et al. Sulindac Sulfide as a Non-Immune Suppressive γ -Secretase Modulator to Target Triple-Negative Breast Cancer. *Front Immunol* **2023**, *14*, 1244159, doi:10.3389/fimmu.2023.1244159.
124. Yip-Schneider, M.T.; Sweeney, C.J.; Jung, S.H.; Crowell, P.L.; Marshall, M.S. Cell Cycle Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Enhanced Growth Inhibition in Combination with Gemcitabine in Pancreatic Carcinoma Cells. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *298*, 976–985.
125. Thiruchenthooran, V.; Sánchez-López, E.; Gliszczynska, A. Perspectives of the Application of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Cancer Therapy: Attempts to Overcome Their Unfavorable Side Effects. *Cancers* **2023**, *15*, 475, doi:10.3390/cancers15020475.

126. Bindu, S.; Mazumder, S.; Bandyopadhyay, U. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Organ Damage: A Current Perspective. *Biochemical Pharmacology* **2020**, *180*, 114147, doi:10.1016/j.bcp.2020.114147.
127. Kowalski, M.L.; Makowska, J.S. Seven Steps to the Diagnosis of NSAIDs Hypersensitivity: How to Apply a New Classification in Real Practice? *Allergy Asthma Immunol Res* **2015**, *7*, 312–320, doi:10.4168/aa.2015.7.4.312.
128. Montinari, M.R.; Minelli, S.; De Caterina, R. The First 3500 years of Aspirin History from Its Roots - A Concise Summary. *Vascul Pharmacol* **2019**, *113*, 1–8, doi:10.1016/j.vph.2018.10.008.
129. Tacconelli, S.; Bruno, A.; Grande, R.; Ballerini, P.; Patrignani, P. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cardiovascular Safety – Translating Pharmacological Data into Clinical Readouts. *Expert Opinion on Drug Safety* **2017**, *16*, 791–807, doi:10.1080/14740338.2017.1338272.
130. Ou, Y.; Zhu, W. bo; Li, Y.; Qiu, P.; Huang, Y.; Xie, J.; He, S.; Zheng, X.; Leng, T.; Xu, D.; et al. Aspirin Inhibits Proliferation of Gemcitabine-Resistant Human Pancreatic Cancer Cells and Augments Gemcitabine-Induced Cytotoxicity. *Acta Pharmacol Sin* **2010**, *31*, 73–80, doi:10.1038/aps.2009.172.
131. Zhou, H.; Yun, X.; Shu, Y.; Xu, K. Aspirin Increases the Efficacy of Gemcitabine in Pancreatic Cancer by Modulating the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway and Reversing Epithelial-mesenchymal Transition. *Oncol Lett* **2023**, *25*, 101, doi:10.3892/ol.2023.13687.
132. Zhu, X.; Li, Y.; Qin, L.; Yu, Z.; Wu, X.; Liu, Z.; Zheng, Y. Gemcitabine and Celecoxib Synergistically Promote Long-Lasting Antitumor Efficacy of Pd-1 Antibody by Triggering Immunogenic Cell Death 2021.
133. Gridelli, C.; Gallo, C.; Ceribelli, A.; Gebbia, V.; Gamucci, T.; Ciardiello, F.; Carozza, F.; Favaretto, A.; Daniele, B.; Galetta, D.; et al. Factorial Phase III Randomised Trial of Rofecoxib and Prolonged Constant Infusion of Gemcitabine in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: The GEmcitabine-COxib in NSCLC (GECO) Study. *The Lancet Oncology* **2007**, *8*, 500–512, doi:10.1016/S1470-2045(07)70146-8.
134. HILOVSKÁ, L.; JENDŽELOVSKÝ, R.; FEDOROČKO, P. Potency of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Chemotherapy. *Mol Clin Oncol* **2015**, *3*, 3–12, doi:10.3892/mco.2014.446.
135. Atlıhan, İ.; Koçyiğit Sevinç, S.; Orun, O.; Yılmaz, Ö.; Güniz Küçükgülzel, Ş.; Mega Tiber, P. Effect of Flurbiprofen Derivative (SGK597) on Cell Proliferation and Apoptosis of Breast Cancer Cell Lines. *İstanbul Journal of Pharmacy* **2022**, *52*, 265–270, doi:10.26650/IstanbulJPharm.2022.1094112.
136. Hmood, K.S.; Kubba, A.A.R.M.; Al-bayati, R.I.; Saleh, A.M. Synthesis, and Anti-Tumor Evaluation of Some New Flurbiprofen Derivatives Against MCF-7 and WRL-68 Cell Lines. *Indonesian Journal of Pharmacy* **2021**, 17–34, doi:10.22146/ijp.730.

137. Zhu, X.-F.; Williams, H.J.; Scott, A.I. Aqueous Trifluoroacetic Acid—an Efficient Reagent for Exclusively Cleaving the 5'-End of 3',5'-TIPDS Protected Ribonucleosides. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 9541–9545, doi:10.1016/S0040-4039(00)01685-3.
138. Stephenson, A.A.; Cao, S.; Taggart, D.J.; Vyavahare, V.P.; Suo, Z. Design, Synthesis, and Evaluation of Liver-Specific Gemcitabine Prodrugs for Potential Treatment of Hepatitis C Virus Infection and Hepatocellular Carcinoma. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *213*, 113135, doi:10.1016/j.ejmech.2020.113135.
139. Hermanson, G.T. Chapter 4 - Zero-Length Crosslinkers. In *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*; Hermanson, G.T., Ed.; Academic Press: Boston, 2013; pp. 259–273 ISBN 978-0-12-382239-0.
140. Yammine, P.; El Safadi, A.; Kassab, R.; El-Nakat, H.; Obeid, P.J.; Nasr, Z.; Tannous, T.; Sari-Chmayssem, N.; Mansour, A.; Chmayssem, A. Types of Crosslinkers and Their Applications in Biomaterials and Biomembranes. *Chemistry* **2025**, *7*, 61, doi:10.3390/chemistry7020061.
141. Shaheed, D.Q.; Kareem, A.; Mubarak, H.; Abbas, H.K.; Dakhil, M.A.; Husssein, A.H. Design and synthesis of diclofenac and indomethacin - conjugates with gemcitabine as a possible mutual prodrugs.; 2015.
142. Zhang, L.; Jia, G.; Li, Z.; Sun, S.; Chen, Y.; Zhao, J.; Wang, X.; Xu, W.; Jing, F.; Jiang, Y.; et al. Design, Synthesis, and Anti-Cancer Evaluation of the Novel Conjugate of Gemcitabine's ProTide Prodrug Based on CD13. *Bioorganic Chemistry* **2025**, *157*, 108293, doi:10.1016/j.bioorg.2025.108293.
143. Chagastelles, P.C.; Nardi, N.B. Biology of Stem Cells: An Overview. *Kidney Int Suppl* **2011**, *1*, 63–67, doi:10.1038/kisup.2011.15.
144. Seaberg, R.M.; van der Kooy, D. Stem and Progenitor Cells: The Premature Desertion of Rigorous Definitions. *Trends Neurosci* **2003**, *26*, 125–131, doi:10.1016/S0166-2236(03)00031-6.
145. Pittenger, M.F.; Discher, D.E.; Péault, B.M.; Phinney, D.G.; Hare, J.M.; Caplan, A.I. Mesenchymal Stem Cell Perspective: Cell Biology to Clinical Progress. *npj Regen Med* **2019**, *4*, 22, doi:10.1038/s41536-019-0083-6.
146. Gartner, L.P.; Hiatt, J.L.; Strum, J.M. (Judy M. *Cell Biology and Histology*; Baltimore, MD : Lippincott Williams & Wilkins, 2007; ISBN 978-0-7817-8577-8.
147. Maiti, S.K.; Kumar, S.; Srivastava, L.; Ninu, A.R.; Kumar, N. Isolation, Proliferation and Morphological Characteristics of Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSC) from Different Animal Species. *Trends in biomaterials & artificial organs* **2013**.
148. Uccelli, A.; Moretta, L.; Pistoia, V. Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease. *Nat Rev Immunol* **2008**, *8*, 726–736, doi:10.1038/nri2395.

149. Friedenstein, A.J.; Gorskaja, J.F.; Kulagina, N.N. Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs. *Exp Hematol* **1976**, *4*, 267–274.
150. Lv, F.-J.; Tuan, R.S.; Cheung, K.M.C.; Leung, V.Y.L. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1408–1419, doi:10.1002/stem.1681.
151. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317, doi:10.1080/14653240600855905.
152. Nery, A.A.; Nascimento, I.C.; Glaser, T.; Bassaneze, V.; Krieger, J.E.; Ulrich, H. Human Mesenchymal Stem Cells: From Immunophenotyping by Flow Cytometry to Clinical Applications. *Cytometry A* **2013**, *83*, 48–61, doi:10.1002/cyto.a.22205.
153. Najar, M.; Raicevic, G.; Fayyad-Kazan, H.; Bron, D.; Tounougou, M.; Lagneaux, L. Mesenchymal Stromal Cells and Immunomodulation: A Gathering of Regulatory Immune Cells. *Cytotherapy* **2016**, *18*, 160–171, doi:10.1016/j.jcyt.2015.10.011.
154. Hadryś, A.; Sochanik, A.; McFadden, G.; Jazowiecka-Rakus, J. Mesenchymal Stem Cells as Carriers for Systemic Delivery of Oncolytic Viruses. *European Journal of Pharmacology* **2020**, *874*, 172991, doi:10.1016/j.ejphar.2020.172991.
155. Rojewski, M.T.; Weber, B.M.; Schrezenmeier, H. Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. *Transfus Med Hemother* **2008**, *35*, 168–184, doi:10.1159/000129013.
156. Müller, L.; Tunger, A.; Wobus, M.; von Bonin, M.; Towers, R.; Bornhäuser, M.; Dazzi, F.; Wehner, R.; Schmitz, M. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.637725.
157. Menard, C.; Pacelli, L.; Bassi, G.; Dulong, J.; Bifari, F.; Bezier, I.; Zanoncello, J.; Ricciardi, M.; Latour, M.; Bourin, P.; et al. Clinical-Grade Mesenchymal Stromal Cells Produced under Various Good Manufacturing Practice Processes Differ in Their Immunomodulatory Properties: Standardization of Immune Quality Controls. *Stem Cells Dev* **2013**, *22*, 1789–1801, doi:10.1089/scd.2012.0594.
158. Nold, P.; Hackstein, H.; Riedlinger, T.; Kasper, C.; Neumann, A.; Mernberger, M.; Fölsch, C.; Schmitt, J.; Fuchs-Winkelmann, S.; Barckhausen, C.; et al. Immunosuppressive Capabilities of Mesenchymal Stromal Cells Are Maintained under Hypoxic Growth Conditions and after Gamma Irradiation. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 152–162, doi:10.1016/j.jcyt.2014.10.004.
159. Hazrati, A.; Malekpour, K.; Khorramdelazad, H.; Rajaei, S.; Hashemi, S.M. Therapeutic and Immunomodulatory Potentials of Mesenchymal Stromal/Stem Cells

- and Immune Checkpoints Related Molecules. *Biomarker Research* **2024**, *12*, 35, doi:10.1186/s40364-024-00580-2.
160. Waterman, R.S.; Tomchuck, S.L.; Henkle, S.L.; Betancourt, A.M. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS One* **2010**, *5*, e10088, doi:10.1371/journal.pone.0010088.
 161. Chen, B.; Chen, Z.; He, M.; Zhang, L.; Yang, L.; Wei, L. Recent Advances in the Role of Mesenchymal Stem Cells as Modulators in Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol* **2024**, *15*, 1525380, doi:10.3389/fimmu.2024.1525380.
 162. Yang, G.; Fan, X.; Liu, Y.; Jie, P.; Mazhar, M.; Liu, Y.; Dechsupa, N.; Wang, L. Immunomodulatory Mechanisms and Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep* **2023**, *19*, 1214–1231, doi:10.1007/s12015-023-10539-9.
 163. Mittal, S.K.; Cho, W.; Elbasiony, E.; Guan, Y.; Foulsham, W.; Chauhan, S.K. Mesenchymal Stem Cells Augment Regulatory T Cell Function via CD80-Mediated Interactions and Promote Allograft Survival. *Am J Transplant* **2022**, *22*, 1564–1577, doi:10.1111/ajt.17001.
 164. Lohan, P.; Treacy, O.; Griffin, M.D.; Ritter, T.; Ryan, A.E. Anti-Donor Immune Responses Elicited by Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and Their Extracellular Vesicles: Are We Still Learning? *Front Immunol* **2017**, *8*, 1626, doi:10.3389/fimmu.2017.01626.
 165. Eliopoulos, N.; Stagg, J.; Lejeune, L.; Pommey, S.; Galipeau, J. Allogeneic Marrow Stromal Cells Are Immune Rejected by MHC Class I– and Class II–Mismatched Recipient Mice. *Blood* **2005**, *106*, 4057–4065, doi:10.1182/blood-2005-03-1004.
 166. Commissioner, O. of the FDA Approves First Mesenchymal Stromal Cell Therapy to Treat Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease Available online: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-mesenchymal-stromal-cell-therapy-treat-steroid-refractory-acute-graft-versus-host> (accessed on 23 September 2025).
 167. Vicinanza, C.; Lombardi, E.; Ros, F.D.; Marangon, M.; Durante, C.; Mazzucato, M.; Agostini, F. Modified Mesenchymal Stem Cells in Cancer Therapy: A Smart Weapon Requiring Upgrades for Wider Clinical Applications. *WJSC* **2022**, *14*, 54–75, doi:10.4252/wjsc.v14.i1.54.
 168. Nicodemou, A.; Bernátová, S.; Čeháková, M.; Danišovič, L. Emerging Roles of Mesenchymal Stem/Stromal-Cell-Derived Extracellular Vesicles in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1453, doi:10.3390/pharmaceutics15051453.
 169. Lan, T.; Luo, M.; Wei, X. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Cancer Therapy. *Journal of Hematology & Oncology* **2021**, *14*, 195, doi:10.1186/s13045-021-01208-w.

170. Kholodenko, I.V.; Kholodenko, R.V.; Majouga, A.G.; Yarygin, K.N. Apoptotic MSCs and MSC-Derived Apoptotic Bodies as New Therapeutic Tools. *Current Issues in Molecular Biology* **2022**, *44*, 5153, doi:10.3390/cimb44110351.
171. Bonomi, A.; Sordi, V.; Dugnani, E.; Ceserani, V.; Dossena, M.; Coccè, V.; Cavicchini, L.; Ciusani, E.; Bondiolotti, G.; Piovani, G.; et al. Gemcitabine-Releasing Mesenchymal Stromal Cells Inhibit in Vitro Proliferation of Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 1687–1695, doi:10.1016/j.jcyt.2015.09.005.
172. Tang, Z.-G.; Chen, T.-M.; Lu, Y.; Wang, Z.; Wang, X.-C.; Kong, Y. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Loaded with Gemcitabine Inhibit Pancreatic Cancer Cell Proliferation by Enhancing Apoptosis. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* **2024**, *16*, 4006–4013, doi:10.4251/wjgo.v16.i9.4006.
173. Klimova, D.; Jakubchova, J.; Altanerova, U.; Nicodemou, A.; Styk, J.; Szemes, T.; Repiska, V.; Altaner, C. Extracellular Vesicles Derived from Dental Mesenchymal Stem/Stromal Cells with Gemcitabine as a Cargo Have an Inhibitory Effect on the Growth of Pancreatic Carcinoma Cell Lines in Vitro. *Mol Cell Probes* **2023**, *67*, 101894, doi:10.1016/j.mcp.2023.101894.
174. Caplan, H.; Olson, S.D.; Kumar, A.; George, M.; Prabhakara, K.S.; Wenzel, P.; Bedi, S.; Toledano-Furman, N.E.; Triolo, F.; Kamhieh-Milz, J.; et al. Mesenchymal Stromal Cell Therapeutic Delivery: Translational Challenges to Clinical Application. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.01645.
175. Matsuzaka, Y.; Yashiro, R. Current Strategies and Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 707, doi:10.3390/ph17060707.
176. Wuchter, P.; Bieback, K.; Schrezenmeier, H.; Bornhäuser, M.; Müller, L.P.; Bönig, H.; Wagner, W.; Meisel, R.; Pavel, P.; Tonn, T.; et al. Standardization of Good Manufacturing Practice-Compliant Production of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stromal Cells for Immunotherapeutic Applications. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 128–139, doi:10.1016/j.jcyt.2014.04.002.
177. van Griensven, M.; Balmayor, E.R. Extracellular Vesicles Are Key Players in Mesenchymal Stem Cells' Dual Potential to Regenerate and Modulate the Immune System. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2024**, *207*, 115203, doi:10.1016/j.addr.2024.115203.
178. Liang, W.; Han, B.; Hai, Y.; Sun, D.; Yin, P. Mechanism of Action of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in the Intervertebral Disc Degeneration Treatment and Bone Repair and Regeneration. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.833840.
179. Panda, B.; Sharma, Y.; Gupta, S.; Mohanty, S. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as an Emerging Paradigm for Regenerative Therapy and Nano-Medicine: A Comprehensive Review. *Life (Basel)* **2021**, *11*, 784, doi:10.3390/life11080784.

180. Yadav, S.; Maity, P.; Kapat, K. The Opportunities and Challenges of Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes in Theranostics and Regenerative Medicine. *Cells* **2024**, *13*, 1956, doi:10.3390/cells13231956.
181. Brzuska, G.; Pastuch-Gawolek, G.; Krawczyk, M.; Szewczyk, B.; Krol, E. Anti-Tick-Borne Encephalitis Virus Activity of Novel Uridine Glycoconjugates Containing Amide or/and 1,2,3-Triazole Moiety in the Linker Structure. *Pharmaceuticals (Basel)* **2020**, *13*, 460, doi:10.3390/ph13120460.
182. Zhen, L.; Dai, L.; Wen, X.; Yao, L.; Jin, X.; Yang, X.-W.; Zhao, W.; Yu, S.-Q.; Yuan, H.; Wang, G.; et al. Discovery of Novel Nucleotide Prodrugs with Improved Potency Against HCV Variants Carrying NS5B S282T Mutation. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6077–6088, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00262.
183. Derissen, E.J.B.; Huitema, A.D.R.; Rosing, H.; Schellens, J.H.M.; Beijnen, J.H. Intracellular Pharmacokinetics of Gemcitabine, Its Deaminated Metabolite 2',2'-difluorodeoxyuridine and Their Nucleotides. *Br J Clin Pharmacol* **2018**, *84*, 1279–1289, doi:10.1111/bcp.13557.
184. Hodge, L.S.; Taub, M.E.; Tracy, T.S. Effect of Its Deaminated Metabolite, 2',2'-Difluorodeoxyuridine, on the Transport and Toxicity of Gemcitabine in HeLa Cells. *Biochem Pharmacol* **2011**, *81*, 950–956, doi:10.1016/j.bcp.2011.01.016.
185. Liang, W.; Chen, X.; Zhang, S.; Fang, J.; Chen, M.; Xu, Y.; Chen, X. Mesenchymal Stem Cells as a Double-Edged Sword in Tumor Growth: Focusing on MSC-Derived Cytokines. *Cell Mol Biol Lett* **2021**, *26*, 3, doi:10.1186/s11658-020-00246-5.
186. Krueger, T.E.G.; Thorek, D.L.J.; Denmeade, S.R.; Isaacs, J.T.; Brennen, W.N. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise. *STEM CELLS Translational Medicine* **2018**, *7*, 651–663, doi:10.1002/sctm.18-0024.
187. Babajani, A.; Soltani, P.; Jamshidi, E.; Farjoo, M.H.; Niknejad, H. Recent Advances on Drug-Loaded Mesenchymal Stem Cells With Anti-Neoplastic Agents for Targeted Treatment of Cancer. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 748, doi:10.3389/fbioe.2020.00748.
188. Slama, Y.; Ah-Pine, F.; Khettab, M.; Arcambal, A.; Begue, M.; Dutheil, F.; Gasque, P. The Dual Role of Mesenchymal Stem Cells in Cancer Pathophysiology: Pro-Tumorigenic Effects versus Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, 13511, doi:10.3390/ijms241713511.
189. Kornmann, M.; Ishiwata, T.; Kleeff, J.; Begger, H.G.; Korc, M. Fas and Fas-Ligand Expression in Human Pancreatic Cancer. *Ann Surg* **2000**, *231*, 368–379.
190. Elmadbouh, O.H.M.; Pandol, S.J.; Edderkaoui, M. Glycogen Synthase Kinase 3 β : A True Foe in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 14133, doi:10.3390/ijms232214133.

191. Kawulok, A.; Borzdziłowska, P.; Głowala-Kosińska, M.; Fidyk, W.; Smagur, A.; Łasut-Szyska, B.; Gdowicz-Kłosok, A.; Mitrus, I.; Wilkiewicz, M.; Chwieduk, A.; et al. Gemcitabine and Flurbiprofen Enhance Cytotoxic Effects on Cancer Cell Lines Mediated by Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* **2025**, *26*, 6212, doi:10.3390/ijms26136212.
192. Han, H.; Li, S.; Zhong, Y.; Huang, Y.; Wang, K.; Jin, Q.; Ji, J.; Yao, K. Emerging Pro-Drug and Nano-Drug Strategies for Gemcitabine-Based Cancer Therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2022**, *17*, 35–52, doi:10.1016/j.ajps.2021.06.001.
193. Pandit, B.; Royzen, M. Recent Development of Prodrugs of Gemcitabine. *Genes* **2022**, *13*, 466, doi:10.3390/genes13030466.
194. Thompson, B.R.; Shi, J.; Zhu, H.-J.; Smith, D.E. Pharmacokinetics of Gemcitabine and Its Amino Acid Ester Prodrug Following Intravenous and Oral Administrations in Mice. *Biochem Pharmacol* **2020**, *180*, 114127, doi:10.1016/j.bcp.2020.114127.
195. Wang, M.; Qu, K.; Zhao, P.; Yin, X.; Meng, Y.; Herdewijn, P.; Liu, C.; Zhang, L.; Xia, X. Synthesis and Anticancer Evaluation of Acetylated-Lysine Conjugated Gemcitabine Prodrugs. *RSC Med Chem* *14*, 1572–1580, doi:10.1039/d3md00190c.
196. Kaliya, K.; Bhardwaj, N.; Ruchika; Saneja, A. Synthesis of a Gemcitabine Prodrug and Its Encapsulation into Polymeric Nanoparticles for Improved Therapeutic Efficacy. *ChemMedChem* **2025**, *20*, e202400532, doi:10.1002/cmdc.202400532.

9. SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Struktura macierzy zewnątrzkomórkowej nowotworu trzustki	9
Rysunek 2. Metabolizm i aktywacja wewnątrzkomórkowa gemcytabiny.....	15
Rysunek 3. Klasyfikacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych ze względu na ich strukturę.....	24
Rysunek 4. Schemat modyfikacji gemcytabiny z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi	27
Rysunek 5. Synteza chlorku kwasowego kwasu acetylosalicylowego za pomocą chlorku tionylu	28
Rysunek 6. Synteza 4-(N)-podstawionej pochodnej gemcytabiny z NLPZ z zastosowaniem TIPDSiCl ₂	29
Rysunek 7. Synteza 5-C'-podstawionej pochodnej gemcytabiny z przykładowym NLPZ (ibuprofenem) w reakcji Steglicha.....	31
Rysunek 8. Synteza 4-(N)-podstawionej pochodnej gemcytabiny z przykładowym NLPZ (ibuprofenem) przy użyciu środka sprzęgającego EDCI oraz HOBt.....	33
Rysunek 9. Multipotencjalność MSC.	37
Rysunek 10. Komórki BM-MSC wyizolowane ze szpiku kostnego obserwowane 48 godzinach hodowli.....	77
Rysunek 11. Wykresy z cytometrii przepływowej przedstawiające charakterystykę immunofenotypową komórek BM-MSC.	78
Rysunek 12. Żywotność BM-MSC poddanych działaniu ASA/IBU/FLU, GEM lub kombinacją leków GEM+ASA/IBU/FLU w równych stężeniach w zakresie 0,01μM - 100μM.....	80
Rysunek 13. Prolifерacja komórek linii PANC-1, AsPC-1 oraz BxPC-3 po 24 i 48 godzinach.	82
Rysunek 14. Żywotność komórek linii PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 po 24 i 48 godzinach	83
Rysunek 15. Cykl komórkowy komórek PCC.....	87
Rysunek 16. Zdjęcia komórek PCC po 24 godzinach	88
Rysunek 17. Apoptoza i nekroza komórek PCC oraz BM-MSC po 24h i 48h	90

Rysunek 18. Żywotność komórek PCC poddanych działaniu pożywek kondycjonowanych znad BM-MSC	92
Rysunek 19. Apoptoza i nekroza komórek nowotworowych trzustki po 72-godzinny traktowaniu CM.	94
Rysunek 20. Kokultura PCC i BM-MSC po poddaniu BM-MSC działaniu GEM (10 μ M) oraz GEM + FLU (10 μ M + 10 μ M).....	96
Rysunek 21. Ekspresja CASP3, P-Ser-GSK3 α i β , FAS oraz HSC70	99
Rysunek 22. Ekspresja CASP3, P-Ser-GSK3 α i β , FAS oraz HSC70	99
Rysunek 23. Schematyczny rozdział koniugatów cytydyny lub gemcytabiny z NLPZ na płytce TLC	110
Rysunek 24. Widmo spektrometrii mas estrowego koniugatu gemcytabiny ibuprofenu.	112
Rysunek 25. Chromatogram HPLC koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w stosunku substratów 1:2	114
Rysunek 26. Chromatogram HPLC gemcytabiny	115
Rysunek 27. Chromatogram HPLC ibuprofenu.....	115
Rysunek 28. Chromatogram HPLC koniugatu gemcytabiny i ibuprofenu w stosunku substratów 1:2.	117
Rysunek 29. Chromatogram HPLC gemcytabiny	117
Rysunek 30. Chromatogram HPLC ibuprofenu.....	118

10. SPIS TABEL

Tabela 1. Działanie profilaktyczne i przeciwnowotworowe wybranych leków przeciwzapalnych.....	22
Tabela 2. Klasyfikacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych ze względu na ich selektywność względem COX-1 i COX-2	24
Tabela 3. Wybrane środki sprzęgające i ich katalizatory oraz produkty uboczne.....	34
Tabela 4. Charakterystyka markerów powierzchniowych obecnych na komórkach ADSC oraz BM-MSC.....	40
Tabela 5. Wartości IC ₅₀ obliczone dla komórek PCC oraz BM-MSC.....	84

11. DANE BIBLIOMETRYCZNE

W ramach prowadzonych przeze mnie badań opublikowanych zostało siedem artykułów w czasopismach międzynarodowych o łącznym współczynniku wpływu Impact Factor 32,6 oraz punktacji MNiSW 830 oraz jeden rozdział w monografii. Jestem autorem patentu pt. „Symetryczne tioamidy kwasu tereftalowego oraz sposoby ich otrzymywania”.

Byłam kierownikiem projektu grantowego ufundowanego przez Polski Bank Komórek Macierzystych S.A. pod tytułem „Ocena przydatności mezenchymalnych komórek macierzystych jako nośnika nowych pochodnych gemcytabiny” oraz wykonawcą w trzech projektach grantowych Narodowego Centrum Nauki. Ponadto, jestem zaangażowana w badania kliniczne III fazy kilku firm farmaceutycznych w zakresie badań nad terapią wykorzystującą chimeryczny receptor antygenowy CAR-T w chorobach hematologicznych oraz wykorzystania mezenchymalnych komórek macierzystych do leczenia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD), a także w innych projektach badawczych związanych z analizą parametrów biologicznych materiału przeszczepowego i ich wpływem na powodzenie wszczepu. Wyniki swojej pracy badawczej prezentowałam na wielu zjazdach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym, w formie plakatów i wystąpień ustnych. W ramach tych konferencji dwukrotnie zdobyłam pierwszą nagrodę za najlepsze doniesienie badawcze.

Od 2016 roku współpracuję z Narodowym Instytutem Onkologii im. Marii Skłodowskiej Curie – Państwowym Instytutem Badawczym w Gliwicach, początkowo w ramach wolontariatu, a aktualnie jako biotechnolog w Banku Komórek Krwiotwórczych w Klinice Transplantacji Szpiku i Onkohematologii.

Publikacje naukowe

1. **Kawulok, A.**, Borzdiłowska, P., Głowala-Kosińska, M., Fidyk, W., Smagur, A., Łasut-Szyska, B., Gdowicz-Kłosok, A., Mitrus, I., Wilkiewicz, M., Chwieduk, A., Burdalska, D., Korfanty, J., Giebel, S., Rojkiewicz, M., Bak, A., Kozik, V. Gemcitabine and Flurbiprofen Enhance Cytotoxic Effects on Cancer Cell Lines Mediated by Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 6212. <https://doi.org/10.3390/ijms26136212>. **IF: 4,9, MNiSW: 140**

2. **Kawulok A.**, Kwandrans D., Kozik V. “Nowe pochodne gemcytabiny z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi jako alternatywa celowanego leczenia nowotworu trzustki”. Rozdział w monografii „Interdyscyplinarne Badania Młodych Naukowców”. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, 2024. ISBN 978-83-7880-983-8
3. Zięba A., Kozik V., Suwińska K., **Kawulok A.**, Pluta T., Jampilek J., Bąk A. Synthesis and Structure of 5-Methyl-9-(trifluoromethyl)-12H-quinolo[3,4-b][1,4]benzothiazinium Chloride as Anticancer Agent. *Molecules*, 12 September 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules29184337>, **IF: 4,6, MNiSW: 140**
4. Chwieduk A., Smagur A., Głowala-Kosińska M., Borzdziłowska P., Fidyk W., Mitrus I., Wilkiewicz M., **Hadryś A.**, Cortez A.J., Giebel S. Circulating subpopulations of non-cytotoxic ILCs in diffuse large B-cell lymphoma. *Annals of Hematology*, 2024. <https://doi.org/10.1007/s00277-024-05831-8>, **IF: 3,1, MNiSW: 70**
5. Jazowiecka-Rakus, J., Sochanik, A., **Hadryś, A.**, Fidyk, W., Chmielik, E., Rahman, M.M., McFadden, G. Combination of LIGHT (TNFSF14)-Armed Myxoma Virus Pre-Loaded into ADSCs and Gemcitabine in the Treatment of Experimental Orthotopic Murine Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* 2022, 14 (8), 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14082022>. **IF: 6,6, MNiSW: 140**
6. Jazowiecka-Rakus, J., **Hadryś, A.**, Rahman, M.M., McFadden, G. Fidyk, W., Chmielik, E., Paździor, M., Grajek, M., Kozik, V., Sochanik, A. Myxoma Virus Expressing LIGHT (TNFSF14) Pre-Loaded into Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Is Effective Treatment for Murine Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers* 13; 5 February 2021; no. 6: 1394. <https://doi.org/10.3390/cancers13061394>. **IF: 6,1, MNiSW: 140**
7. Jazowiecka-Rakus, J., Sochanik, A., Rusin, A., **Hadryś, A.**, Fidyk, W., Villa, N., Rahman, M.M., Chmielik, E., Franco, L.S., McFadden, G. Myxoma Virus-Loaded Mesenchymal Stem Cells in Experimental Oncolytic Therapy of Murine Pulmonary Melanoma. *Molecular Therapy: Oncolytics (MTO)*. 25 September 2020; Volume 18; Pages 335-350. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.07.0>. **IF: 4,11, MNiSW: 100**
8. **Hadryś, A.**, Sochanik, A., McFadden, G. Jazowiecka-Rakus, J. Mesenchymal stem cells as carriers for systemic delivery of oncolytic viruses. *European Journal of Pharmacology (EJP)*. 5 May 2020; Volume 874; 172991. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172991>. **IF: 3,17, MNiSW: 100**

Patenty

Patent nr 247380 pt. „Symetryczne tioamidy kwasu tereftalowego oraz sposoby ich otrzymywania”

Granty

1. Kierownik projektu pod tytułem „Ocena przydatności mezenchymalnych komórek macierzystych jako nośnika nowych pochodnych gemcytabiny”. PO-2204-101. Laureat Programu grantowego sponsorowanego przez Polski Bank Komórek Macierzystych S.A. Nazwa Programu: ExCELLent Grant. 2022-2024
2. Wykonawca w grantie Narodowego Centrum Nauki pt. „Pod presją immunosupresji. Mechanizmy zaniku oraz regeneracji rzadkich subpopulacji limfocytów T w modelu alogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych przy pełnej oraz połowicznej zgodności w układzie HLA. 2017/27/B/NZ6/00002. 2021-2023
3. Wykonawca w grantie Narodowego Centrum Nauki pt. „Ocena układu terapeutycznego: zrekombinowany onkolityczny wirus myksomatozy i mezenchymalne komórki macierzyste w doświadczalnej terapii nowotworów”. 2016/22/M/NZ6/00418. 2017-2021
4. Wykonawca w grantie International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology – Collaborative Research Programme pt. "Mesenchymal stem cells and myxoma virus in oncolytic melanoma therapy". CRP/16/013. 2017-2019

Staże naukowe, szkolenia i certyfikaty

1. Staż na Uniwersytecie Jagiellońskim w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych w Krakowie. Opiekun: dr Krzysztof Rakus.
2. Staż BIOSTART oraz wolontariat w NIO-PIB w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów. Opiekunowie: dr hab. Aleksandra Rusin oraz dr Joanna Jazowiecka-Rakus.
3. Certyfikat ukończenia Praktycznego Kursu Reprogramowania Komórek (produkowania indukowanych komórek macierzystych, iPSC); Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice.
4. Szkolenie The Frontier of Immune Monitoring; Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
5. Opiekun naukowy pracy licencjackiej oraz pracy inżynierskiej realizowanej na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach.
6. Opiekun naukowy dwóch prac magisterskich realizowanych na Politechnice Śląskiej w Gliwicach we współpracy z NIO-PIB.
7. Ukończenie szkolenia dla osób wykonujących procedury w hodowli zwierząt *in vivo*.
8. Ukończenie szkolenia dla osób uczestniczących, wykonujących, planujących doświadczenia na zwierzętach oraz uśmiercających i sprawujących opiekę nad zwierzętami wykorzystywanymi w doświadczeniach.
9. Ukończenie szkolenia Dobrej Praktyki Klinicznej (Good Clinical Practice).
10. Ukończenie szkolenia na asystenta badań klinicznych (Clinical Trial Assistant).
11. Zdobywanie I nagrody i możliwość publikacji badań w International Journal of Molecular Sciences za najlepsze doniesienie badawcze na VII Śląskich Spotkaniach Naukowych (29-30.05.2020) pt. „Przydatność mezenchymalnych komórek

macierzystych jako nośnika wirusa myksomatozy w onkolitycznej wiroterapii w mysim raku trzustki.”

12. Zdobyć I nagrody za najlepsze wystąpienie konferencyjne na zjeździe InterTechDoc 2024 (20-21.05.2024) pt. „Nowe pochodne gemcytabiny z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi jako alternatywa celowanego leczenia nowotworu trzustki”.

Konferencje naukowe

Konferencje międzynarodowe:

14-17.04.2024 50th Annual Meeting of the EBMT. Glasgow, Scotland

Prezentacja plakatu

Iwona Mitrus, Marcin Wilkiewicz, **Agata Kawulok**, Wojciech Fidyk, Małgorzata Sobczyk-Kruszelnicka, Sebastian Giebel. *“The impact of transportation time on stem hematopoietic cell viability after cryopreservation”*.

23–26.04.2023. 49th Annual Meeting of the EBMT. Paris, France.

Prezentacja plakatu

Iwona Mitrus, Marcin Wilkiewicz, Wojciech Fidyk, **Agata Hadryś**, Agnieszka Ciomber, Andrzej Smagur, Paulina Borzdziałowska, Agata Chwieduk, Magdalena Głowala-Kosińska, Sebastian Giebel. *“Preclinical evaluation of different solutions for washing out DMSO from peripheral blood stem cell grafts after thawing”*.

19-21.10.2023. The 8th Congress on Controversies in Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies (COSTEM), Berlin, Germany.

Prezentacja plakatu

Agata Chwieduk, Andrzej Smagur, Magdalena Głowala-Kosińska, Paulina Borzdziałowska, Wojciech Fidyk, Iwona Mitrus, Marcin Wilkiewicz, **Agata Hadryś**, Alexander Cortez, Sebastian Giebel. *“Circulating innate lymphoid cell subpopulations in different advancement of nodal and extranodal DLBCL”*

18-19.11.2022; XXVIth Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland.

Prezentacja plakatów

Agata Hadryś, Marlena Paździor, Aleksandra Świetlicka, Andrzej Bąk, Violetta Kozik. *“Novel cytidine derivatives with non-steroidal anti-inflammatory drugs for pancreatic cancer treatment”*

Magdalena Głowala-Kosińska, Paulina Borzdziałowska, Agata Chwieduk, Wojciech Fidyk, Andrzej Smagur, Iwona Mitrus, **Agata Hadryś**, Marcin Wilkiewicz, Małgorzata Sobczyk-

Kruszelnicka, Sebastian Giebel. *"T cell regeneration after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation from fully matched vs haploidentical donors"*

20.10.2022; IV International Conference - Bioreactors in the fight for clean air, Ekoinwentyka, Grzybów, Poland

Prezentacja plakatu

Agata Hadryś, Marlena Paździor, Aleksandra Świetlicka, Andrzej Bąk, Violetta Kozik. „New derivatives of cytidine with non-steroidal anti-inflammatory drugs for pancreatic cancer treatment”

11-14.09.2022; Chemistry towards Biology 10 Instruct, Bratislava, Slovakia.

Prezentacja plakatów

Marlena Paździor, Aleksandra Świetlicka, **Agata Hadryś**, Andrzej Bąk, Violetta Kozik. *"Graphene oxide derivatives as potential drug nanocarriers"*

Aleksandra Świetlicka, Marlena Paździor, **Agata Hadryś**, Violetta Kozik, Andrzej Bąk. *"Diamides and dithioamides as compounds with potential bioactivity"*

15-16.09.2021; The 6th Warsaw Conference on Perspective of Molecular Oncology: Molecular Immunology of Cancer, Poland;

Prezentacja plakatu

Jazowiecka-Rakus J., **Hadryś A.**, Rahman MM., McFadden G., Fidyk W., Chmielik E., Paździor M., Grajek M., Kozik V., Sochanik A. *"Myxoma virus expressing LIGHT (TNFSF14) pre-loaded into adipose-derived mesenchymal stem cells is effective treatment for murine pancreatic adenocarcinoma"*

27.07.2021; III International Conference - Bioreactors in the fight for clean air (III Międzynarodowa Konferencja - Bioreaktory w walce o czyste powietrze), Poland;

Prezentacja plakatu

Hadryś A., Sochanik A., Fidyk W., Grajek M., Paździor M., Rahman M.M., McFadden G., Kozik V., Jazowiecka-Rakus J. *"A novel strategy for treating pancreatic cancer: a disease with many environmental risk factors"*

05-09.07.2021; XXIII International Poxvirus, Asfarvirus, and Iridovirus Conference, Philadelphia, Pennsylvania, USA;

Prezentacja plakatu

Jazowiecka-Rakus J., **Hadryś A.**, Rahman MM., McFadden G., Fidyk W., Chmielik E., Paździor M., Grajek M., Kozik V., Sochanik A. *"Myxoma virus expressing LIGHT"*

(TNFSF14) pre-loaded into adipose-derived mesenchymal stem cells is effective treatment for murine pancreatic adenocarcinoma"

20-21.11.2020; XXIVth Gliwice Scientific Meetings; Gliwice, Poland;

Prezentacja ustna

Hadryś A., Sochanik A., Fidyk W., Grajek M., Paździor M., Rahman M.M., McFadden G., Kozik V., Jazowiecka-Rakus J. *"Effectiveness of Light-encoding oncolytic myxoma virus-loaded ADSCs to destroy murine pancreatic cancer cells"*

Paździor M., Kozik V., Świetlicka A., Bąk A., Środa A., **Hadryś A.**, Jazowiecka-Rakus J., Sochanik A. *„Cytotoxicity of drug-loaded exosome carriers for melanoma cell cultures"*

23-24.09.2020; The 5th Warsaw Conference on Perspective of Molecular Oncology: Molecular Immunology of Cancer;

Prezentacja ustna

Jazowiecka-Rakus J., Sochanik A., Rusin A., **Hadryś A.**, Fidyk W., Villa N., Rahman MM., Chmielik E., Franco LS., McFadden G. *"Myxoma virus-loaded mesenchymal stem cells in experimental oncolytic therapy of murine pulmonary melanoma"*

22-23.11.2019; XXIII^d Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland;

Prezentacja plakatów

Hadryś A., Sochanik A., Kramer-Marek G., Fidyk W., Rahman MM., McFadden G., Jazowiecka-Rakus J. *"Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a carriers of oncolytic myxoma virus therapy of murine pancreatic cancer"*

Jazowiecka-Rakus J., Sochanik A., Rusin A., Fidyk W., Ciomber A., **Hadryś A.**, Rahman MM., Villa N., Franco LS., McFadden G. *„Myxoma virus-loaded mesenchymal stem cells in experimental oncolytic therapy of murine pulmonary melanoma"*

9-12.10.2019; 12th International Oncolytic Virus Conference, Rochester, Minnesota, USA;

Prezentacja plakatów

Sochanik A., **Hadryś A.**, Kramer-Marek G., Fidyk W., Rahman MM., McFadden G., Jazowiecka-Rakus J. *"Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as carrier of oncolytic myxoma virus for pancreatic cancer therapy"*

Jazowiecka-Rakus J., Sochanik A., Rusin A., Fidyk W., Ciomber A., **Hadryś A.**, Rahman MM., Villa N., Franco LS., McFadden G. *"Myxoma virus-loaded mesenchymal stem cells in experimental oncolytic therapy of murine pulmonary melanoma"*.

12-15.03.2019; 11th International Conference of Contemporary Oncology, Poznan, Poland;

Prezentacja plakatu

Jazowiecka-Rakus J., Sochanik A., Rusin A., Fidyk W., Ciomber A., **Hadryś A.**, McFadden. *"Oncolytic myxoma virus shielded by mesenchymal stem cells destroys melanoma tumors"*

16-17.11.2018; XXIInd Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland;

Prezentacja plakatu

Jazowiecka-Rakus J., Sochanik A., Rusin A., Fidyk W., Ciomber A., **Hadryś A.**, Rahman MM., McFadden G. *"Oncolytic myxoma virus shielded by mesenchymal stem cells destroys melanoma tumors"*

17-18.11.2017; XXIst Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland;

Prezentacja plakatu

Jazowiecka-Rakus J., Sochanik A., Rusin A., Fidyk W., Ciomber A., **Hadryś A.**, Ciepla J., McFadden G. *"Mesenchymal stem cells transfer oncolytic myxoma virus into melanoma cells"*

Konferencje krajowe

22-26.09.2025 67. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Wrocław, Polska

Prezentacja ustna

Kozik, V., **Kawulok, A.**, Borzdiłowska, P., Głowala-Kosińska, M., Fidyk, W., Smagur, A., Łasut-Szyska, B., Gdowicz-Kłosok, A., Mitrus, I., Wilkiewicz, M., Chwieduk, A., Burdalska, D., Korfanty, J., Giebel, S., Rojkiewicz, M., Bak, A. „*Mezynchymalne komórki macierzyste jako nośniki gemcytabiny oraz NLPZ i ich działanie na komórki nowotworowe*”

16-19.09.2024. 66. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Poznań, Polska

Prezentacja ustna

Kozik, V., **Kawulok, A.**, Bąk A., Kowalska-Szojda, K., Kwandrans, D. „*Nowe pochodne gemcytabiny jako alternatywa celowanego leczenia nowotworu trzustki*”

20-21.05.2024. InterTechDoc 2024. Ustroń, Polska

Prezentacja ustna

Kawulok, A., Kwandrans, D., Kozik, V. „*Nowe pochodne gemcytabiny z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi jako alternatywa celowanego leczenia nowotworu trzustki*”

21-22.05.2021; VIIIth Silesia Scientific Meetings, Gliwice, Poland;

Prezentacja ustna

Paździor M., Sochanik A., Jazowiecka-Rakus J., Świetlicka A., **Hadryś A.**, Kozik V. „*Exosomes with WP760 in malignant melanoma therapy researches*” („Egzosomy z WP760 w badaniach nad terapią czerniaka złośliwego”)

21.04.2021; Computational Oncology and Personalized Medicine, Gliwice, Poland;

Prezentacja ustna

Hadryś A., Sochanik A., Fidyk W., Grajek M., Paździor M., Rahman MM, McFadden G., Kozik V., Jazowiecka-Rakus J. "Myxoma virus and mesenchymal stem cells - a new experimental strategy for the pancreatic cancer treatment" („Wirus myksomatozy i mezenchymalne komórki macierzyste – nowa eksperymentalna strategia leczenia nowotworu trzustki”)

Paździor M., Sochanik A., **Hadryś A.**, Jazowiecka-Rakus J. „Cytotoxicity of a bisanthracycline WP760 carried in exosomal carriers for the cells culture of malignant melanoma” („Cytotoksyczność bisantracykliny WP760 przenoszonej w nośnikach egzosomalowych dla hodowli komórek czerniaka złośliwego”)

29-30.05.2020; VIIth Silesia Scientific Meetings, Gliwice, Poland;

Prezentacja ustna

Hadryś A., Sochanik A., Kramer-Marek G., Fidyk W., Grajek M., Rahman MM, McFadden G., Kozik V., Jazowiecka-Rakus J. "Usefulness of mesenchymal stem cells as a carrier of myxoma virus in oncolytic virotherapy in murine pancreatic cancer" („Przydatność mezenchymalnych komórek macierzystych jako nośnika wirusa myksomatozy w onkolitycznej wirusoterapii mysiego nowotworu trzustki”)

28-31.05.2015; IVth Polish Conference of Young Scientists „Arthropod 2015”, Katowice, Poland;

Prezentacja plakatu

Karcz J., Kalandyk-Kołodziejczyk M., Kanturski M., **Hadryś A.**, Kempny M., Wasilewska M. “The use of various microscopic techniques in morphological studies of polish cochineal and aphids (Hemiptera, Sternorrhyncha)” („Zastosowanie różnych technik mikroskopowych w badaniach morfologicznych czerwców i mszyc (Hemiptera, Sternorrhyncha)”)

11.1.1. Osiągnięcia naukowe, edukacyjne i popularyzujące naukę

1. Wykłady dla Akademickiego Koła Harcerskiego Politechniki Śląskiej pt. „Szczepionki – największy wynalazek ludzkości”

2. Współprowadzenie warsztatów dla młodzieży szkolnej na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach. Projekt pt. „Kreatywny odkrywca” realizowany we współpracy z Miastem Katowice, Gminą Pszczyna, Gminą Ornontowice oraz Zespołem Szkół i Przedszkoli nr 3 w Tychach, współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój, Oś priorytetowa: III. Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju. Działanie: 3.1 Kompetencje w szkolnictwie wyższym.
3. Organizacja V Śląskich Spotkań Naukowych, Bobolice, Polska.
4. Działalność w Biotechnologicznym Kole Naukowym; współorganizacja wydarzeń naukowych i popularnonaukowych na Politechnice Śląskiej w Gliwicach, m.in. kampanii BioBus wśród dzieci w wieku szkolnym w śląskich szkołach.
5. Czynny uczestnik cotygodniowych seminariów organizowanych w NIO-PIB. Wygłoszone prezentacje pt. *„Nowe pochodne gemcytabiny w skojarzeniu z onkolitycznym wirusem myksomatozy w eksperymentalnej terapii raka trzustki”* oraz *„Mezenchymalne komórki macierzyste jako nośnik wirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej”*.
6. Aktywny członek Akademickiego Chóru Politechniki Śląskiej.