

JOLANTA SACZKO

**Ocena skuteczności reakcji
fotodynamicznej na modelu komórkowym
raka jasnokomórkowego jajnika opornego
na chemio- i radioterapię**



WROCŁAW 2011

Rozprawa na stopień doktora habilitowanego

Praca wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej
Akademii Medycznej we Wrocławiu

Kierownik Katedry i Zakładu
prof. dr hab. Andrzej Gamian

Recenzja wydawnicza
prof. dr hab. Teresa Banaś

Opracowanie redakcyjne
mgr Bożena Zmitrowicz-Grobelna

1/2011

ISBN 978-83-7055-563-4

© Wydawca: Akademia Medyczna we Wrocławiu

Nakład: 80 egz.
Druk: ARGi

SPIS TREŚCI

1. Wstęp – Terapia fotodynamiczna	5
1.1. Rozwój badań – rys historyczny.....	5
1.2. Mechanizm działania terapii fotodynamicznej	7
1.2.1. Fotoczułacz	9
1.2.2. Efekty antynowotworowego działania PDT i odpowiedź komórek nowotworowych	11
1.3. Udział reaktywnych form tlenu i azotu w niszczeniu komórek nowotworowych	15
1.3.1. Peroksydacja lipidów	17
1.3.2. Degradacja białek	19
1.3.3. Śmierć komórek indukowana PDT	20
1.3.4. Mechanizmy modulujące odpowiedzi komórek nowotworowych obronne przed działaniem wolnych rodników wywołanych terapią fotodynamiczną.....	22
1.4. Zastosowanie PDT w leczeniu nowotworów ginekologicznych	26
1.5. Rak jajnika – wiadomości ogólne	28
1.5.1. Klasyfikacja i typy morfologiczne raka jajnika	29
1.5.2. Etiologia raka jajnika	31
1.5.2.1. Etiopatologia	31
1.5.2.2. Genetyczne podłoże raka jajnika	31
1.5.2.3. Geny supresorowe	32
1.5.2.4. Onkogeny	32
1.5.2.5. Geny mutatorowe	33
1.5.3. Dziedziczne predyspozycje występowania raka jajnika.....	33
1.6. Stosowane metody leczenia i oporność wielolekowa raka jajnika	34
2. Założenia i cel pracy.....	38
3. Materiał i metody.....	40
3.1. Hodowle komórkowe	40
3.2. Badania fotodynamiczne klasyczne i modyfikowane 2-metoksy-estradiolem (2-Me)	41
3.3. Umieszczenie fotoczułacza w komórkach	41
3.3.1. Mikroskop fluorescencyjny	41
3.3.2. Mikroskop konfokalny.....	42
3.4. Morfologia komórek	42
3.5. Ocena przeżywalności komórek	43
3.6. Peroksydacja lipidów	43

3.7. Uszkodzenie białek w komórkach	44
3.7.1 Grupy tiolowe	44
3.7.2 Grupy karbonylowe	45
3.8. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej	46
3.9. Metody oznaczania apoptozy	47
3.9.1. Analiza rodzaju śmierci komórek w teście kometowym	47
3.10. Ekspresja białek	51
4. Wyniki	54
4.1. Umieszczenie fotouczulacza.....	54
4.1.2 Kolokalizacja fotouczulacza z mitochondrium	54
4.1.3 Kolokalizacja z retikulum endoplazmatycznym (ER)	54
4.2. Morfologia komórek	54
4.3. Przeżywalność komórek	55
4.4. Peroksydacja lipidów	56
4.5. Uszkodzenie białek	56
4.6. Ocena aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i ekspresji mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej	58
4.7. Śmierć komórek nowotworowych	59
4.8. Analiza ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych	61
5. Badania statystyczne	90
6. Dyskusja	91
7. Wnioski	109
8. Piśmiennictwo.....	110
9. Streszczenie	134
10. Summary.....	138

1. WSTĘP – TERAPIA FOTODYNAMICZNA

1.1. Rozwój badań – rys historyczny

Fotochemiczne uczulanie tkanek było znane od dawna. Pierwsze próby tego sposobu leczenia zostały opisane przez Heradota uznano go za „ojca helioterapii” w starożytnej Grecji. Fototerapia została rozpowszechniona przez Nielsa Fiensena pod koniec dziewiętnastego wieku. Odkrył on, że światło o czerwonej barwie może być wykorzystywane do leczenia ospy. Wykorzystywał także światło ultrafioletowe w leczeniu gruźlicy [67, 147, 203]. Raab w 1900 r. opisał wpływ barwników akrydynowych na przeżywalność kolonii pantofelków. Stwierdził, że kolonie pantofelków w roztworze barwnika akrydynowego giną pod wpływem działania słońca, natomiast brak intensywnego światła słonecznego (burza) nie wpływał na przeżywalność kolonii pierwotniaków. Szybko zatem uświadomił sobie, że istotą toksycznego działania barwników akrydynowych jest obecność światła. Niels Fiensen w 1903 r. zastosował terapię fotodynamiczną (PDT) w celu niszczenia nowotworów skóry stosując eozynę jako fotouczulacz, co skłoniło von Tappeinra i Jesionka do rozpoczęcia terapii nowotworów skóry za pomocą eozyny i światła białego. Obserwowane przy tym zjawiska zostały opisane jako „efekt fotodynamiczny” i dały początek współczesnej terapii fotodynamicznej [1, 67, 203]. W połowie XIX wieku odkryto hematoporfiryny. Stwierdzono, że mają one zdolność wybiórczej akumulacji w guzach nowotworowych powodując przy tym ich charakterystyczną fluorescencję, indukowaną przez światło czerwone.

Zastosowanie metody fotodynamicznej w wykrywaniu nowotworów zostało zainicjowane przez badania Lipson i Schwarz, którzy jako pierwsi zaobserwowali fluorescencję w obrębie nowotworowo zmienionej tkanki po wstrzyknięciu nieoczyszczonego preparatu hematoporfiryny. Dzięki tym właściwościom stało się możliwe odróżnienie tkanki nowotworowej od zdrowej [187, 188, 323]. Obecnie hematoporfiryny są najczęściej stosowanymi fotouczulaczami, co wynika z ich właściwości. Otrzymuje się je w reakcji chemicznego rozkładu hemoglobiny, podczas której dochodzi do wydzielania i demetalizacji

czerwonego barwnika krwi – hemu. Są łatwo metabolizowane przez organizm i nietoksyczne [26]. W celu uzyskania doskonalszych preparatów ułatwiających umiejscowienie guza dodatkowo traktowano hematoporfirynę kwasem octowym i kwasem siarkowym otrzymując mieszaninę porfiryń, którą nazwano pochodną hematoporfiryny (HpD). W toku dalszych badań ustalono, że przy odpowiednim dobraniu dawki światła i fotouczulacza, guzy fluoryzujące w świetle czerwonym ulegają destrukcji. Metoda ta, zatem daje możliwość nie tylko lokalizacji nowotworu, ale także jego niszczenia i to w sposób wybiórczy, bez uszkodzenia zdrowych tkanek. Lipson podjął pierwszą próbę leczenia raka piersi wstrzykując HpD i naświetlając miejsca nowotworowo zmienione. Uzyskane efekty były jednym z pierwszych dowodów, że HpD wzbudzone światłem indukuje niszczenie tkanki nowotworowej [1, 188]. Przełomu w terapii fotodynamicznej dokonał Thomas Dougherty i wsp., którzy odkryli, że HpD w połączeniu z czerwonym światłem hamuje w znacznym stopniu wzrost guza sutka u myszy i powoduje jego częściową martwicę [67, 69, 70, 71]. Nadzieje związane z nową metodą spowodowały gwałtowny rozwój badań w tym kierunku. Powstała nowa gałąź wiedzy, wykorzystująca doświadczenia lekarzy, biologów, chemików, producentów laserów i źródeł światła zmiennego.

Badania zjawisk fotodynamicznych mają ponad stuletnią tradycję, ale zastosowanie ich w diagnostyce i terapii antynowotorowej można określić jako nowe i wprowadzane w praktyce klinicznej przez niewiele ośrodków w Polsce i za granicą. Pomimo wielu prac, które potwierdzają efektywne działanie terapii fotodynamicznej (PDT) w leczeniu chorób nowotworowych, wymaga ona ciągle jeszcze optymalizacji i zgłębiania mechanizmów leżących u podstaw jej selektywnego działania na komórki nowotworowe. Obecnie można ją uznać za jedną z najnowocześniejszych i najmniej inwazyjnych metod leczenia nowotworów. Powoli znajduje należne sobie miejsce wśród innych metod antynowotorowych w odpowiedzi na wciąż rosnące potrzeby kliniczne i społeczne. Wzrastająca liczba podstawowych i przedklinicznych badań nad mechanizmami indukowanymi PDT, pozwala na tworzenie schematów leczenia, gwarantujących jej lepszą efektywność, uwzględniającą rodzaj guza, jego umiejscowienie anatomiczne, typ histologiczny, stopień unaczynienia i wielkość [5, 131]. PDT znalazła również zastosowanie w leczeniu schorzeń nienowotworowych, w szczególności łuszczycy, miażdżycy, chorób infekcyjnych [159, 208, 249].

1.2. Mechanizm działania terapii fotodynamicznej

Terapia fotodynamiczna wymaga trzech podstawowych składników: fotouczulacza, który wiąże się selektywnie z tkankami nowotworowymi, tlenu oraz źródła światła emitującego fale odpowiednie dla absorpcji stosowanego barwnika. Fotouczulacze mogą być dostarczane do organizmu przez iniekcję lub bezpośrednio przez skórę [153]. Biodystrybucja związku fotoczułego jest ściśle związana ze sposobem jego podania. Światło laserowe aktywuje fotouczulacz. Warunkiem zainicjowania reakcji fotochemicznej jest korelacja pasma emisji źródła światła z pasmem absorpcji barwnika [67, 72, 105]. Przez wiele reakcji chemicznych określanych mianem efektu fotodynamicznego, dochodzi do wytworzenia reaktywnych form tlenu w miejscu działania PDT, co prowadzi do indukcji stresu oksydacyjnego, przejawiającego się zaburzeniem równowagi pro- i antyoksydacyjnej. Stres oksydacyjny wywołany działaniem terapii fotodynamicznej aktywuje w komórkach nowotworowych wiele szlaków metabolicznych, które mogą indukować reakcję obronną. Dochodzi do ekspresji białek szoku cieplnego i czynników transkrypcji takich, jak NF- κ B i AP-1, które wpływają na ekspresję różnych cytokin, białek adhezyjnych swoistych kostymulatorów i ważnych immunologicznie genów [156, 196].

Po wzbudzeniu światłem fotouczulacz przechodzi ze stanu podstawowego do stanu singletowego. Następnie po przejściu we wzbudzony stan trypletowy może reagować z tlenem występującym w podstawowym stanie trypletowym w procesie przeniesienia energii [20, 44, 105]. W stanie trypletowym może ulegać dwóm typom reakcji. Pierwszy typ zachodzi z udziałem wolnych rodników, które reagują z tlenem tworząc utlenione produkty. W II typie reakcji fotouczulacz w stanie trypletowym może przenosić swoją energię bezpośrednio na tlen i tworzyć tlen singletowy [105, 233, 248, 306]. Typy reakcji (I i II) są indukowane jednocześnie, a stosunek pomiędzy nimi zależy od wielu czynników (rodzaj stosowanego fotouczulacza, stężenie substratu, stężenie tlenu) [263, 300]. Czas połowicznej przemiany tlenu singletowego w układzie biologicznym wynosi $<0,04 \mu\text{s}$, zatem promień jego działania wynosi $0,02 \mu\text{m}$ [202]. Powstałe pochodne tlenowe są toksyczne dla komórek nowotworowych [25, 67, 72, 123]. Istnieje jeszcze trzeci typ reakcji niezależny od obecności tlenu rozpuszczonego w tkance. Fotouczulacz będący w singletowym stanie wzbudzenia re-

aguje bezpośrednio z biomolekułami, co prowadzi do powstania różnych fotoadduktów [43]. Każdy z osobna element terapii, choć toksyczny, nie jest zabójczy dla komórek nowotworowych, ale w połączeniu prowadzą one do ich zniszczenia. Terapia fotodynamiczna w przeciwieństwie do chemio- i radioterapii charakteryzuje się wysoką selektywnością. Fotouczulacze gromadzą się selektywnie i w większym stężeniu w komórkach nowotworowych. Światłem laserowym naświetla się jedynie miejsca zmienione nowotworowo z niewielkim tylko marginesem tkanki zdrowej [39, 45]. Biologiczna odpowiedź na terapię jest uruchamiana tylko w tych komórkach, które zostały poddane PDT [45, 67, 203]. Fotouczulanie nie zachodzi w niedotlenionych komórkach. Badania *in vivo* wykazały, że indukcja niedotlenienia tkanki przez ucisk naczyń krwionośnych, znosi efekt PDT [67]. Z drugiej strony, tak jak każda metoda lecznicza, PDT ma swoje ograniczenia. Są one głównie związane z rozległością procesu nowotworowego, umiejscowieniem i szybkością jego wzrostu. Początkowo osiągnano najlepsze efekty lecznicze stosując PDT jedynie do leczenia nowotworów położonych powierzchniowo lub tuż pod powierzchnią. Było to spowodowane tym, że światło laserowe traci swoją moc i nie w pełni aktywuje fotouczulacz w głębszych warstwach tkanek nowotworowych. Problem ten rozwiązano, stosując cienkie światłowody, za pomocą których można poddać działaniu PDT także nowotwory położone głębiej. Rozmiary guza powinny umożliwić penetrację światła na całej jego objętości. Rozsiane guzy nie dyskwalifikują jednak pacjenta do terapii, chociaż bez wątpienia powodują, że jest trudniejsza. Związki światłoczułe podawane w terapii mogą wywoływać uczulenie na światło, któremu towarzyszą objawy podobne, jak w porfirach. Powikłania te można usuwać stosując odpowiedni rodzaj fotouczulacza. Uprzednio PDT znajdowała zastosowanie w leczeniu stanów przedrakowych oraz wczesnych zmian nowotworowych. Znalazła również zastosowanie w leczeniu pacjentów, u których wyczerpano już inne znane metody terapeutyczne. W bardziej zaawansowanych stadiach nowotworu jest stosowana głównie jako metoda paliatywna, która w odróżnieniu od innych jest najmniej inwazyjna i pozwala na prawidłowe funkcjonowanie zdrowych narządów. Obecnie terapia ta stosowana jest do leczenia zmian nowotworowych płuc, przełyku, krtani, jamy ustnej i języka, wczesnych powierzchniowych postaci raka żołądka, nowotworów skóry, narządów płciowych oraz niektórych guzów mózgu [36, 43, 193, 197, 210]. Bardzo

dobrze wyniki leczenia niektórych typów nowotworów z zastosowaniem terapii fotodynamicznej sprawiają, że jest to jedna z najbardziej obiecujących metod leczenia, które pojawiły się w onkologii w ciągu ostatnich lat [98]. Obiecujące wydaje się kojarzenie terapii fotodynamicznej z innymi metodami leczenia nowotworów (chemioterapia, radioterapia, immunoterapia i elektrochemioterapia).

1.2.1. Fotouczulacze

Istotny w terapii jest dobór fotouczulacza i źródło światła. Substancje światłoczułe są aktywowane przez światło o określonej długości fali, zgodnej z ich pasmem absorpcji. Fotosensybilizatory, które mogłyby znaleźć zastosowanie w PDT powinny charakteryzować się określonymi właściwościami:

- niewielka toksyczność,
- możliwość selektywnego kumulowania się w tkance nowotworowej,
- brak indukowania efektów fototoksycznych (cytotoksyczności i mutagenności) w zdrowych tkankach,
- wykazywanie maksymalnie intensywnych pasm absorpcji w tzw. „oknach terapeutycznych tkanki”,
- uwalnianie pod wpływem reakcji indukowanej światłem dużej ilości tlenu singletowego lub rodnikowych form utleniających,
- brak efektów ubocznych i działania mutagennego.

Wymagania stawiane fotouczulaczom są bardzo duże i generalnie żaden ze stosowanych do tej pory nie spełnia jednocześnie wszystkich parametrów fizykochemicznych, farmakologicznych i fotofizycznych. Do najczęściej stosowanych fotouczulaczy należą pochodne porfirynowe i chlorynowe [106, 107, 129, 189]. Właściwości fototoksyczne i cytotoksyczne fotouczulaczy zależą od ich struktury chemicznej, własności fizykochemicznych, selektywności, zdolności wnikania i zatrzymywania w tkance nowotworowej [6]. Podstawowym warunkiem działania fotouczulacza jest wystarczająca jego ilość, umiejscowiona w tkance nowotworowej. Fotouczulacz jest pobierany zarówno przez tkanki prawidłowe, jak i hiperproliferujące, ale fotosensybilizatory są lepiej gromadzone przez tkanki nowotworowe niż prawidłowe. Przyczyna tej selektywnej akumulacji nie została jeszcze do końca wyjaśniona. Dożylnie podany fotouczulacz dociera do tkanki nowotwo-

rowej dzięki białkom osocza krwi. Można przypuszczać, że leki fotouczulające, wiążące się z lipoproteinami o małej gęstości (LDL), są łatwiej wychwytywane przez intensywnie dzielące się komórki mające więcej receptorów dla LDL i wykorzystujące lipidy do budowy błon. Łatwiejsze gromadzenie się fotouczulaczy w obrębie guza mogą ułatwiać takie wskaźniki tkanki nowotworowej, jak niskie pH i brak krążenia limfatycznego, powodujący wzrost ciśnienia onkotycznego. Ważnym czynnikiem wielu złośliwych nowotworów, mającym wpływ na preferencyjne pochłanianie dwuanionowych pochodnych porfiryń może być niskie pH. Po pokonaniu fizjologicznej bariery, jaką jest błona komórkowa, przy niskim pH ~ 6,8, związki porfiryńowe występują w postaci mono- i dianionów, co blokuje ich wyjście z komórki [105, 203, 294]. Duża heterogenność tkanek nowotworowych oraz ich różnorodna struktura monoferyczna decyduje o indywidualnym doborze fotouczulaczy do rodzaju nowotworu. Dany fotouczulacz nie będzie w takim samym stopniu skuteczny dla wszystkich typów nowotworów [6, 45]. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja fotouczulacza jest zależna od jego właściwości fizykochemicznych, takich jak lipofilność i masa cząsteczkowa, od warunków środowiska w tkance nowotworowej (pH wewnątrz komórki), natury nośnika i czasu inkubacji [106, 143].

Fotouczulacze hydrofobowe łatwiej oddziałują z lipidami, dlatego częściej lokalizują się w strukturach błoniastych komórki [207, 234]. Fotouczulacze hydrofilowe, które są rozpuszczalne w wodzie, trudno przechodzą przez dwuwarstwę lipidową i kumulują się w wodnych przedziałach komórki. Wśród nich możemy wyróżnić kationowe, które po rozpuszczeniu w wodzie tworzą jony dodatnie oraz anionowe, które w roztworach wodnych tworzą jony obdarzone jednym lub wieloma ładunkami ujemnymi. Fotouczulacze amfifilowe zawierają w swojej strukturze jednocześnie fragment hydrofobowy i hydrofilowy. Te ostatnie są reprezentowane przez pochodne porfiryńowe, które wydają się mieć największe znaczenie w zastosowaniu klinicznym, ponieważ mogą się one akumulować zarówno w strukturach lipidowych komórki, jak i hydrofilowych. Pochodne porfiryńowe mające różne łańcuchy boczne, rozłożone niesymetrycznie wokół pierścienia makrocyclicznego tworzą dużą grupę fotosensybilizatorów amfifilowych. Najbardziej oddalony od podstawników bocznych fragment cząsteczki (makropierścień), wykazuje właściwości hydrofobowe, natomiast podstawniki, które posiadają grupy polarne wykazują właściwości hydro-

filowe. W zależności od sposobu zmodyfikowania pierścienia porfiryнового przez podstawniki boczne pochodne porfiryнового mogą należeć do trzech wyżej wymienionych grup fotouczulaczy [105, 106, 143]. Największe znaczenie w badaniach przedklinicznych i klinicznych zdobył Photofrin Ph^{*} (Porfimer sodu – częściowo oczyszczona pochodna hematoporfiryny (HpD), wyizolowane dimery i wyższe oligomery hematoporfiryny), który zastosowano w leczeniu raka szyjki macicy, pęcherza moczowego, przełyku, żołądka, guzów mózgu oraz płuc. Jest fotouczulaczem wzorcowym, na nim rozpoczęto badania jakościowe i ilościowe. Jest niewątpliwie efektywnym fotouczulaczem w bardzo wielu przypadkach. Jego cechy i właściwości stały się podstawą do poszukiwania i syntezy fotouczulaczy nowej generacji. Dodatkową zaletą i przewagą nad nowymi fotouczulaczami jest jego dostępność na rynku farmaceutycznym. Fotosensybilizatory nowej generacji, mimo że mogą być bardziej efektywne i mieć zminimalizowane efekty fotouczulania nie są obecnie stosowane w praktyce klinicznej, ponieważ nie syntetyzuje się ich w wystarczających ilościach [67, 203].

1.2.2. Efekty antynowotworowego działania PDT i odpowiedź komórek nowotworowych

Możemy wyróżnić trzy główne drogi, przez które PDT niszczy tkankę nowotworową. Reaktywne formy tlenu generowane PDT mogą bezpośrednio niszczyć komórki nowotworowe, mogą niszczyć naczynia odżywiające nowotwór albo wywoływać antynowotworową odpowiedź immunologiczną. Te mechanizmy wzajemnie na siebie wpływają, nie jest jednak ustalone, który z nich odgrywa najistotniejszą rolę w destrukcji tkanki nowotworowej na drodze PDT.

Bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych

W warunkach *in vivo* mechanizm działania terapii fotodynamicznej prowadzi do redukcji dużej liczby komórek na drodze bezpośredniej destrukcji. Mechanizm ten nie zawsze pozwala na całkowite usunięcie komórek nowotworowych. Wynika to przede wszystkim z niejednorodnej dystrybucji fotouczulaczy w obrębie tkanki nowotworowej, co jest spowodowane m.in. nieregularnym unaczynieniem guza. Zależy także od rozległości zmian nowotworowych. W badaniach wykazano, że zarówno akumulacja dożylnie podawanego fotouczula-

cza, jak liczba zabitych komórek nowotworowych zmniejsza się w zależności od odległości komórek nowotworowych i ich unaczynienia od miejsca, w którym naświetlano tkankę guza [162]. Innym czynnikiem ograniczającym jest dostępność tlenu. Niedobór tlenu może być spowodowany fotochemiczną konsumpcją tlenu podczas reakcji fotodynamicznej, albo efektem działania terapii fotodynamicznej bezpośrednio na unaczynienie guza. Może mieć na to wpływ także sama konstrukcja unaczynienia tkanki nowotworowej, której nieregularny układ prowadzi do indukcji hypoksji w tkance. Brak tlenu może ograniczać długoterminową odpowiedź nowotworu. Należy, zatem zmniejszyć przepływ światła, żeby zmniejszyć zużycie tlenu i działać światłem w dawkach oddzielonych czasowo w celu ponownego dotlenienia tkanki [67].

Wpływ terapii fotodynamicznej na naczynia

W warunkach fizjologicznych liczba i wielkość naczyń włosowatych, które przenikają tkanki nie zwiększa się. Wynika to z właściwości wyściełających je komórek śródbłonna, które się nie dzielą. Wyjątek stanowią rozrastające się naczynia w jajniku po owulacji, w błonie śluzowej macicy po menstruacji lub po uszkodzeniu tkanki w procesie angiogenezy. Proces neoangiogenezy, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych towarzyszy nie tylko procesom fizjologicznym, jak: gojenie się ran, cykl menstruacyjny u kobiet czy zmiany w obrębie jajnika po owulacji, ale także w istotny sposób sprzyja rozwojowi stanów patologicznych, jak np. retinopatia cukrzycowa, chroniczne zapalenie. Nowotworzenie jest jednym z najbardziej zależnych od angiogenezy procesów patologicznych. Tworzenie naczyń krwionośnych w obrębie guza jest niezbędne do jego rozwoju, ponieważ wraz z krwią dostarczane są do komórek nowotworowych składniki odżywcze i tlen. Właśne unaczynienie pozwala także na przemieszczanie się fragmentów tkanki nowotworowej do innych narządów i tworzenie wtórnych ognisk nowotworowych w bardzo odległych miejscach. Aktywność procesu neoangiogenezy zależy od równowagi pomiędzy jej aktywatorami i inhibitorami [271].

Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za przeciwnowotworowe działanie PDT jest niszczenie naczyń krwionośnych. Wykorzystanie terapii fotodynamicznej do niszczenia unaczynienia guza jest jedną z obiecujących metod walki z nowotworami. Liczne badania

przewodzone na przełomie ostatnich lat wykazały, że PDT wpływa na rozpad unaczynienia guza i wynikające z tego ostre niedotlenienie tkanki nowotworowej [6, 45, 168].

Nato Oku i wsp. [224] zastosowali z powodzeniem terapię fotodynamiczną z wykorzystaniem BPD-MA (benzo-porfiryna, nazwa handlowa vereroporfin) do niszczenia naczyń guza. Inne badania prowadzone na modelu włókniakomięsaka mysiego wykazały, że terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem Photofrinu powoduje zamykanie naczyń, ograniczając dopływ tlenu do tkanki nowotworowej [122]. Bezpośrednie niszczenie komórek śródbłónka z towarzyszącym kurczeniem naczyń prowadzi do zwiększonej przepuszczalności naczyń, co przejawia się powstawaniem obrzęku, agregacją płytek, uwolnieniem tromboksanu, formowaniem skrzepu, a to w konsekwencji wywołuje kaskadę reakcji, prowadzących do powstania zastoju wewnątrznaczyniowego i rozwoju nekrozy w obrębie guza [84, 136, 167, 168, 172]. PDT poza tym hamuje uwalnianie NO z komórek śródbłónka, co wpływa na dalsze obkurczanie się naczyń [95].

Odpowiedź immunologiczna

Antynowotworowy efekt działania PDT przejawia się nie tylko bezpośrednim niszczeniem tkanki nowotworowej, ale także jej wpływem na procesy zapalne i antynowotworową odpowiedź immunologiczną. Każdy z tych mechanizmów może wywierać wpływ na pozostałe, tworząc dość skomplikowaną sieć wzajemnych zależności. Ich suma zwiększa szansę na utrzymanie długotrwałego działania przeciwnowotworowego, indukowanego przez PDT. Obecnie wiadomo, że PDT wpływa na odpowiedź immunologiczną przez wywoływanie antynowotworowego stanu zapalnego i generowanie odpowiedzi immunologicznej [45]. Różnice w naturze i intensywności reakcji zapalnej między tkanką prawidłową a nowotworową mogłyby zostać wykorzystane do zwiększenia selektywnego działania PDT na komórki nowotworowe. Naświetlenie guza prowadzi do zniszczenia części komórek nowotworowych, które rozpadają się i podobnie, jak mechaniczne uszkodzenie tkanek, wywołują nieswoisty proces zapalny.

W procesie zapalnym pośredniczy wiele czynników, do których należą m.in.: substancje naczyniowe, składniki kaskad dopełniacza, białka ostrej fazy, proteiny, peroksydazy, RFT, cytokiny, czynniki wzrostu i inne immunoregulatory. Wykazano, że mediatory ostrej fazy

interleukina 6 i 1 (IL-6, IL-1) mogą regulować odpowiedź komórek nowotworowych na PDT [99, 100]. Podczas przebiegu procesu zapalnego uwalniane są liczne mediatory, przyciągające do siebie komórki układu odpornościowego. Aktywacja układu dopełniacza i generowanie kompleksu ataku błonowego w komórkach śródbłonka, atakowanego przez PDT guza prowadzi do upośledzenia w dopływie krwi [217, 218]. Aktywacja układu dopełniacza jest wykorzystywana do wzmacniania antynowotworowego działania PDT. Traktowanie komórek nowotworowych dodatkowo zymosanem – aktywatorem neutrofilii i makrofażów przeciwdziała wznowie komórek nowotworowych poddanych wcześniej terapii fotodynamicznej [165]. Podczas działania PDT oprócz inicjowania niszczenia naczyń oraz niedotlenienia tkanki nowotworowej wywołaną agregacją płytek i aktywacją układu dopełniacza zachodzą inne zjawiska, istotne dla wywoływania wczesnego stanu zapalnego. Rozwój nieswoistej odpowiedzi immunologicznej jest niezbędny do aktywacji rozwijających się niezwykle skutecznych swoistych mechanizmów obronnych. Łącznikiem pomiędzy tymi dwoma mechanizmami mogą być komórki prezentujące antygen – głównie komórki dendrytyczne. Komórki te pochłaniają, a następnie prezentują limfocytom T antygeny, także antygeny z rozpadłych komórek nowotworowych znajdujące się w ich otoczeniu. Komórki dendrytyczne ulegają silnemu pobudzeniu pod wpływem białek szoku cieplnego. Działanie terapii fotodynamicznej indukuje aktywację białek szoku cieplnego. Dodatkowo fotoooksydacyjna degradacja lipidów błon i generowanie metabolitów kwasu arachidonowego wzmacnia działanie mediatorów stanu zapalnego wywołując natychmiastową reakcję zapalną [169]. Wykazano, że ten naturalny mechanizm obronny komórek nowotworowych można wykorzystać do pobudzenia skutecznej odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym, pozostałym przy życiu po terapii fotodynamicznej, a także poddać kontroli komórki, którym udało się rozprzestrzenić po organizmie i tworzyć przerzuty. Wkrótce po terapii fotodynamicznej, podawano doguzowo komórki dendrytyczne izolowane ze szpiku i hodowane w warunkach laboratoryjnych. Taka łączona terapia okazała się skuteczna w indukowaniu ogólnoustrojowej odporności, wykraczającej zasięgiem swojego działania poza naświetlany guz [139, 217, 218].

1.3. Udział reaktywnych form tlenu i azotu w niszczeniu komórek nowotworowych

Antynowotworowy mechanizm działania PDT jest oparty głównie na generowaniu podczas reakcji fotoutleniania reaktywnych form tlenu (RFT) [6, 45, 72, 105, 239]. Powstają także w warunkach fizjologicznych jest to jednak ściśle kontrolowane przez wiele enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów obronnych. Brak równowagi pomiędzy generacją RFT a zdolnościami antyoksydacyjnymi organizmu określa się mianem stresu oksydacyjnego. Reaktywne formy tlenu wywołują uszkodzenia na poziomie błony komórkowej i błon organelli wewnątrzkomórkowych głównie mitochondrium, aparatu Golgiego, retikulum endoplazmatycznego i lizosomów. Głównym celem ich ataku są biocząsteczki. RFT modyfikują cząsteczki białek (utlenianie, agregacja, denaturacja, fosforylacja, defosforylacja), lipidów (utlenianie), wywołują zmiany w strukturze DNA, co przejawia się wzrostem mutacji i innych efektów cytotoksycznych [10, 185, 186, 300]. Zaburzenia te wpływają na przebieg szlaków metabolicznych, co może generować odmienne reakcje komórek nowotworowych: reakcję obronną z udziałem mechanizmów antyoksydacyjnych, eliminację uszkodzonej komórki na drodze apoptozy, nekrozy albo autolizy lub indukować odpowiedź immunologiczną [45, 217, 218, 300].

Reaktywne formy tlenu są produktami wzbudzenia lub redukcji tlenu cząsteczkowego. Do RFT zalicza się rodniki tlenowe, które mają niesparowane elektrony na atomie tlenu, np. rodnik wodorotlenowy, oraz pochodne tlenowe, które nie mają niesparowanych elektronów, np.: ponadtlenek wodoru. Są one bardziej aktywne niż tlen w stanie podstawowym. Wolne rodniki tlenowe powstają podczas reakcji metabolicznych w naszym organizmie lub pod wpływem oddziaływania czynników środowiska zewnętrznego. Lipidy błon, białka i DNA są związkami szczególnie narażonymi na reakcje z RFT. Odpowiedź komórek na działanie RFT zależy od ich stężenia w komórkach i typu komórek. W stężeniu fizjologicznym RFT mogą regulować transdukcję sygnału przez błony i ekspresję genów. Duże stężenie może powodować transformację nowotworową lub śmierć komórki. Jednocześnie wiadomo, że oddziaływanie RFT na komórki prawidłowe i nowotworowe może być różne. Kiedy RFT atakują komórki prawidłowe, mogą wpływać na niszczenie DNA i wywoływać proces transformacji nowotwo-

rowej. RFT produkowane w nadmiarze w komórkach nowotworowych, np. pod wpływem PDT, prowadzą do usunięcia tych komórek w warunkach stresu oksydacyjnego [59, 117, 190].

Drugą grupą związków, posiadających niesparowane elektrony i/lub, charakteryzujące się dużą reaktywnością chemiczną są reaktywne formy azotu (RFA). Głównym RFA jest tlenek azotu (NO), powstający z konwersji argininy do cytruliny. Reakcję tą katalizuje specyficzna rodzina enzymów (syntazy tlenu azotu). Cząsteczka tlenu azotu posiada na ostatniej powłoce elektronowej niesparowany elektron, co pozwala jej na aktywne reagowanie z innymi cząsteczkami. Charakteryzuje ją krótki okres półtrwania i mała specyficzność tkankowa. Cechy te decydują o biologicznych efektach działania NO [30]. Liczne badania prowadzone w ostatnich latach wykazały bardzo ważną rolę tej małej cząsteczki w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Wpływ tlenu azotu na procesy progresji i hamowania karcinogenezy ma charakter dualistyczny i nie jest do końca określony. Tlenek azotu w sposób wielokierunkowy wpływa na wiele reakcji metabolicznych, które mogą regulować przebieg procesu nowotworowego i tworzenia przerzutów. Wiadomo, że NO z jednej strony może hamować wzrost nowotworu, a drugiej może mieć ogromny wpływ na jego rozwój. Ta cząsteczka reguluje m.in. kurczliwość naczyń krwionośnych, agregację płytek krwi, procesy neurotransmisji i komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że w małych stężeniach NO ma działanie proangiogenne i pronowotworowe, podczas gdy duże stężenie NO wpływa hamująco na wzrost tkanki nowotworowej [4].

Pod wpływem terapii fotodynamicznej dochodzi do wzrostu ekspresji syntazy tlenu azotu. Niektórzy autorzy sugerują, że NO jest inicjatorem zmian w komórkach nowotworowych, prowadzących do ich śmierci na drodze apoptozy. NO regulując pracę mikronaczyń, które odżywiają guz, może doprowadzić do powstawania zakrzepów i obumierania komórek nowotworowych [117]. Wiadomo również, że NO i jego pochodne pośredniczą w uszkodzeniu DNA na wczesnym etapie karcynogenezy pomimo obecności antyoksydantów, oraz indukują neoangiogenezę i hamują odpowiedź immunologiczną [21, 177]. NO jako substancja aktywna w istotny sposób reguluje ekspresję genów związanych ze śmiercią komórki lub jej przeżyciem, do których zaliczamy gen *p53*, geny rodzin *bcl-2* oraz *Fas* [4, 299].

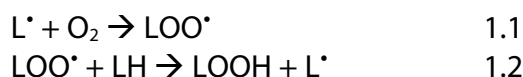
Pomimo intensywnej badań prowadzonych nad udziałem tlenu azotu w niszczeniu komórek nowotworowych pod wpływem terapii fotodynamicznej, jego rola nie jest do końca określona. Liczne badania dowodzą, że synteza endogennego NO jest istotnym wyznacznikiem odpowiedzi komórek nowotworowych na PDT [102, 114, 164]. Obserwowano wzrost NO pod wpływem PDT w badaniach *in vitro*. Stres oksydacyjny indukowany PDT wpływa na szlaki przekazywania sygnału w komórkach, prowadząc do aktywacji jądrowych czynników transkrypcyjnych, co może mieć wpływ na regulację genów kodujących NOS. Zostało również stwierdzone, że tlenek azotu hamuje peroksydację lipidów wywołaną działaniem PDT [11, 215]. Komórki nowotworowe w odpowiedzi na stan zapalny generowany PDT syntetyzują duże ilości NO, co może hamować wzrost tkanki nowotworowej [102, 164]. Uszkodzenie komórek śródbłonna naczyń, odżywiających guz i jedyne źródła endogennego NO, pod wpływem PDT, może doprowadzić do obniżenia stężenia NO [164]. Z powyższych rozważań wynika, że stężenie tlenu azotu, a zarazem aktywność i ekspresja enzymów odpowiedzialnych za jego syntezę znacząco wpływa na efektywność i lecznicze działanie PDT.

1.3.1. Peroksydacja lipidów

W warunkach stresu oksydacyjnego, układ antyoksydacyjny nie zapewnia całkowitej eliminacji RFT, co może prowadzić do różnej odpowiedzi komórki. Jednocześnie z aktywacją wielu szlaków metabolicznych RFT uruchamiają procesy utleniania [20, 110]. Głównymi reakcjami oksydacyjnymi zachodzącymi w błonie są reakcje peroksydacji lipidów, które przebiegają przez stadia wolnorodnikowe i mają najistotniejsze znaczenie w procesie generowania zaburzeń w komórce [260].

Peroksydacja lipidów jest wolnorodnikowym procesem utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych lub lipidów, w którym powstają nadtlenki tych związków [20, 260]. Reakcje te zachodzą w obrębie fosfolipidów błon komórkowych. Proces utleniania lipidów przebiega w trzech etapach: inicjacji, propagacji i terminacji. Inicjacja polega na oderwaniu się atomu wodoru od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego lub reszty tego kwasu będącej składnikiem fosfolipidów, które są głównym komponentem budulcowym

błon komórkowych. Nienasycone kwasy tłuszczowe, umiejscowione w błonach komórkowych, łatwo reagują z wolnymi rodnikami [20, 149, 318]). Reakcje peroksydacji mogą być zapoczątkowane przez rodnik hydroksylowy (OH^{\bullet}), nadtlenkowy (LOO^{\bullet} alkoksyłowy (LO^{\bullet}) lub alkiłowy (L^{\bullet}) [269]. Reakcję tę może zapoczątkować tlenek i dwutlenek azotu oraz dwutlenki siarki i podchloryn [20]. W reakcji propagacji wolne rodniki alkiłowe reagują z tlenem i tworzą wolne rodniki nadtlenkowe (reakcja 1.1), które mogą odrywać atomy wodoru od kolejnych cząsteczek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (reakcja 1.2). W reakcji tej wolny rodnik nie ginie, tylko reaguje z następną cząsteczką kwasu tłuszczowego.

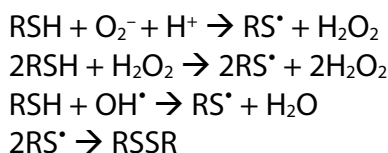


Ten ciąg reakcji powtarza się wielokrotnie do momentu reakcji terminacji. Reakcja terminacji zachodzi pomiędzy dwoma wolnymi rodnikami alkiłowymi, nadtlenowymi lub dwoma różnymi, które występują w układzie. W obrębie błon biologicznych produktami są dime-ry fosfolipidów. Wolne rodniki powstające w czasie reakcji utleniania lipidów mogą też reagować z białkami błon. W wyniku tych reakcji powstają wolne rodniki białek, które uczestniczą w reakcjach terminacji. Końcowym produktem peroksydacji lipidów mogą być aldehydy i hydroksyaldehydy, które powstają w wyniku rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do kilkunasto-węglowych fragmen-tów [20, 260]. Produkty peroksydacji lipidów są związkami cytoto-k-sycznymi, działają mutagennie i kancerogennie [214]. Związki te mo-dyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych, zwiększając prze-puszczalność błon dla jonów H^+ i innych polarnych substancji. Mogą także hamować aktywność niektórych enzymów błonowych i białek transportujących [110].

Reakcje oksydacyjne, które zachodzą w błonie komórkowej odgrywają szczególną rolę, ponieważ prowadzą do osłabienia inte-rakcji pomiędzy białkami i lipidami, modyfikacji i fragmentacji białek błonowych oraz utraty zaburzenia integralności błony. Wszystkie te zjawiska mogą wywoływać śmierć komórek nowotworowych [197, 260].

1.3.2. Degradacja białek

W wyniku działania reaktywnych form tlenu z organellami komórkowymi może dochodzić także do zmian w strukturze białek [20, 282]. Oksydacyjne uszkodzenia białek, polegające na modyfikacji reszt aminokwasowych, grup prostetycznych, agregacji lub fragmentacji cząsteczki, prowadzą do utraty ich aktywności biologicznej. Gromadzenie w komórkach utlenionych produktów białkowych może wpływać na upośledzenie funkcji komórki i w konsekwencji doprowadzić nawet do jej śmierci [239, 242]. Podczas stresu oksydacyjnego dochodzi m.in. do utleniania grup -SH bezpośrednio przez RFT. Produktem tych reakcji są rodniki tiolowe S*, które ulegają dimeryzacji do disulfidów. Przebieg reakcji przedstawiono na schemacie poniżej [20, 242].



Oksydacyjne uszkodzenie grup -SH prowadzi do utraty aktywności biologicznej białek upośledzając pełnione przez nie funkcje transportujące i enzymatyczne. Utlenianie grup tiolowych białek błonowych jest szczególnie niebezpieczne, ponieważ wpływa na dezintegrację błony i zaburzenia w jej przepuszczalności [187, 282]. Grupy tiolowe białek pozostają w oksydacyjnej równowadze z grupami tiolowymi glutationu (GSH), którego główną funkcją jest utrzymywanie -SH białek w stanie zredukowanym. Glutation jest uważany za najważniejszy komórkowy „bufor tiolowy” [14]. Miarą stopnia oksydacyjnego uszkodzenia białek jest spadek stężenia grup tiolowych lub wzrost grup karbonylowych. Szczególnie łatwo wchodzą w te reakcje takie aminokwasy, jak: prolina (Pro), arginina (Arg), lizyna (Lys) i treonina (Thr). Ostatnio wykazano, że oznaczanie grup karbonylowych w łańcuchach bocznych białek jest lepszą i czulszą metodą oznaczania oksydacyjnego uszkodzenia białek niż oznaczanie grup tiolowych [60, 291]. Pochodne karbonylowe białek powstają jednak nie tylko podczas utleniania łańcuchów bocznych aminokwasów w cząsteczce białka, ale także podczas rozpadu białek na drodze α -amidacji albo karbonylacji glutaminianu, co w konsekwencji prowadzi do powstania peptydów, których N-terminalny koniec jest blokowany przez α -ketoacylo po-

chodne. Dodatkowo grupy karbonylowe mogą być tworzone w reakcji aminokwasów z produktami peroksydacji lipidów, reaktywnymi grupami karbonyłowymi ketoamin i ketoaldehydów generowanych w procesie glikacji białek [60]. Wzrost zawartości grup karbonylowych w białkach jest lepszym markerem stresu oksydacyjnego niż peroksydacja lipidów. Utlenione cząsteczki białka są stabilnymi związkami i dłużej krążą we krwi w porównaniu do innych markerów stresu oksydacyjnego takich, jak: aldehyd malonowy, czy utleniony glutation [268, 317].

Reakcje RFT z białkami prowadzą nie tylko do utleniania białek, ale także do powstawania w białkach grup redukujących w wyniku uszkodzenia aminokwasów aromatycznych. Grupy te mogą redukować cytochrom c i metale [239].

1.3.3. Śmierć komórek indukowana PDT

Wiadomo, że czynniki działające toksycznie na komórki, do których należy zaliczyć RFT, mogą uszkadzać je w trwały sposób, prowadząc do ich śmierci. Odpowiedni dobór elementów składowych terapii (stężenie fotouczulacza, czas inkubacji z fotouczulaczem, dawka i moc promieniowania, stężenie tlenu w komórce) pozwala na modyfikację efektów takiej terapii. Daje to możliwość kierowania komórek nowotworowych na drogę apoptozy, której w przeciwieństwie do nekrozy nie towarzyszy silny i nieobojętny dla organizmu odczyn zapalny. Najlepiej poznaną postacią programowanej śmierci komórki jest apoptoza, niezbędna do prawidłowego przebiegu wielu procesów fizjologicznych, odgrywająca też olbrzymią rolę w procesach patologicznych. Za nieapoptotyczne rodzaje śmierci komórki uznano nekrozę i autofagię [38, 154, 155]. Apoptozę i autofagię zaliczano do „programowanych”. Nekroza natomiast była dotychczas uważana za proces pasywny [223, 247]. Ostatnio wyróżnia się trzy typy programowanej śmierci komórki różniące się przebiegiem, rozwojem i zmianami morfologicznymi: apoptozę, autofagię i nekrozę. Pierwszy typ programowanej śmierci komórki to apoptoza. Proces ten przebiega zawsze według określonego schematu, wymaga aktywacji wielu genów, ekspresji określonych białek oraz nakładu energii. Możemy wyróżnić zewnętrzny szlak apoptotyczny zależny od receptorów śmierci, wewnętrzny mitochondrialny i stosunkowo niedawno odkryty szlak indukowany stresem, w który zaangażowane jest retikulum endoplazmatyczne (ER) [211]. Drugi typ

programowanej śmierci komórki to autofagia. Jest to mniej selektywny mechanizm, niż proteoliza zależna od ubikwityny, kierujący białka o długim okresie półtrwania oraz inne komponenty organelli do lizosomów, gdzie ulegają degradacji [34, 223]. Trzeci typ to nekroza przejawiająca się gwałtownym obrzękiem komórki i utratą integralności błony komórkowej, co powoduje rozpad komórki z uwolnieniem jej całej zawartości do przestrzeni międzykomórkowej. Rozlane składniki komórkowe wywołują odczyn zapalny [75]. Długi czas nekroza była opisywana jako bierny i niezorganizowany, gwałtowny proces śmierci komórek. Ostatnio udowodniono, że jest to aktywny proces będący częścią szlaku metabolicznego wywołanego transdukcją sygnału przez błony. Przykładowo TNF i receptor Fas w licznych liniach komórkowych zapoczątkowują proces nekrozy przez aktywację białka oddziaływającego z receptorem 1 (RIP1 – *receptor interacting protein*) w warunkach inhibicji kaspaz. Poza tym RIP1 jest kluczowym elementem aktywacji nekrozy zależnej od JNK w warunkach stresu oksydacyjnego [302, 303, 316]. Związki fotoaktywne, wykorzystywane w PDT, które lokalizują się w mitochondriach lub retikulum endoplazmatycznym wpływają na indukcję apoptozy przez ustalone szlaki metaboliczne indukowane m.in. zaburzeniem równowagi pro- i antyoksydacyjnej. Fotosensibilizatory, które preferencyjnie kumulują się w błonie komórkowej lub w lizosomach mogą opóźnić proces apoptozy albo ją blokować wprowadzając komórkę na drogę nekrozy, co zostało opisane przez Kessel [151] i potwierdzone w badaniach Oleinick [225]. Doniesienia ostatnich kilku lat wskazują, że mechanizm prowadzący do śmierci komórek nowotworowych inicjowany działaniem PDT może odbywać się na drodze apoptozy, nekrozy lub autofagii. Ten ostatni proces jest prawdopodobnie włączany wtedy, kiedy dochodzi do defektu w aparacie genetycznym odpowiedzialnym za syntezę białek pro- i antyapoptotycznych [38, 156].

Z jednej strony stwierdzono, że PDT bezpośrednio lub pośrednio indukuje zmiany w przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej, co potwierdza wzrost w cytoplazmie cytochromu c i wzrost ekspresji kaspaz, z drugiej strony skłonność do otwierania kanałów w wewnętrznej błonie mitochondrialnej może wpływać na indukowanie różnych typów śmierci komórki, co wciąż nie jest do końca wyjaśnione [170]. Liczne badania wskazują, że rodzaj śmierci indukowany działaniem terapii fotodynamicznej zależy od typu komórek i rodzaju

fotouczulacza, a szczególnie jego wewnątrzkomórkowego umiejscowienia. Stwierdzono, że ekspozycja odmiennych fenotypowo i genotypowo typów komórek na światło z zastosowaniem różnych związków fotoczułych wpływa na wzrost ekspresji Fas i liganda Fas w badaniach *in vivo* i *in vitro* [48, 320].

W wyniku oksydacyjnego uszkodzenia ER indukowanego działaniem PDT dochodzi do poważnego zaburzenia homeostazy tego organellum, co prawdopodobnie uruchamia mitochondrialny szlak apoptotyczny [3, 6, 225]. Różne fotouczulacze, łączące się błoną komórkową ER pobudzają gwałtowny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia bezpośrednio po fotoaktywacji. Wykazano w licznych badaniach, że wzrost wolnego wapnia wywołuje śmierć komórek na drodze wewnątrzkomórkowej albo jest aktywatorem szlaków włączających przeżycie komórek [45]. Fotooksydacyjny mechanizm wywoływania śmierci zależnej od ER przez aktywację kaspazy 12 nie jest do końca wyjaśniony i zbadany [39]. Z ostatnich badań wynika, że terapia fotodynamiczna może wywoływać autofagię komórek nowotworowych. Nie powinno to być niespodzianką zważywszy na fakt, że podczas działania PDT dochodzi do niekontrolowanego wzrostu RFT, czego konsekwencją jest oksydacyjne uszkodzenie organelli komórkowych i powstawanie ogromnych agregatów białkowych, które nie mogą być usunięte przez proteolizę zależną od ubikwityny [37, 38]. Wywołanie nekrozy terapią fotodynamiczną zależy od dawki, rodzaju fotouczulaczy i ich umiejscowienia [39].

1.3.4. Mechanizmy modulujące odpowiedzi komórek nowotworowych obronne przed działaniem wolnych rodników wywołanych reakcją fotodynamiczną

Innymi czynnikami, które w istotny sposób mogą modulować reakcje komórek na działania fotodynamiczne może być obecność i aktywność enzymatycznych i nieenzymatycznych antyutleniaczy, białek szoku termicznego, mediatorów procesów zapalnych i czynników aktywujących komórki układu immunologicznego. W komórkach poddanych badaniom fotodynamicznym funkcjonują wszystkie mechanizmy, które w warunkach fizjologicznych chronią je przed uszkadzającym działaniem RFT.

Komórki wytworzyły różne mechanizmy obronne chroniące ich integralność przed działaniem wolnych rodników tlenowych i azotowych. W warunkach równowagi, dzięki działaniu enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów, nadmiar RFT jest usuwany, a uszkodzenia są naprawiane [16].

Obrona antyoksydacyjna składa się z wielu elementów ułożonych w kilka poziomów. Pierwszą linią obrony są białka zawierające metale przejściowe (ferrytyna, transferyna, ceruloplazmina, metalotioneina), które zapobiegają powstawaniu RFT. Do drugiej linii obrony należą antyoksydanty niskocząsteczkowe (α -tokoferol, β -karoten, witamina C, glutation) i enzymy antyoksydacyjne (dysmutaza ponadtlenkowa – SOD, peroksydaza glutationowa – GSH-Px, katalaza – CT) inaktywujące RFT na różnym poziomie ich powstawania. Trzecią linią obrony są systemy naprawcze cząsteczek uszkodzonych przez RFT (białka szoku cieplnego – białka opiekuńcze i proteazy) [73].

Dysmutaza ponadtlenkowa

Jednym z kluczowych enzymów antyoksydacyjnych jest dysmutaza ponadtlenkowa. Dysmutaza ponadtlenkowa – oksydoreduktaza ponadtlenkowa, wydaje się pełnić istotną rolę w defensywie antyoksydacyjnej, ponieważ katalizuje reakcje przekształcenia pierwszego wolnego rodnika, który powstaje na drodze jednoelektronowej redukcji tlenu i daje początek łańcuchowej reakcji tworzenia kolejnych wolnych rodników, w tym jednego z najgroźniejszych, jakim jest rodnik hydroksylowy OH^{\cdot} . W obecności tego enzymu anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\cdot-}$ jest przekształcany w cząsteczkę tlenu i nadtlenek wodoru H_2O_2 , który jest następnie usuwany przez katalazę i peroksydazę glutationową. Dysmutaza ponadtlenkowa jest zlokalizowana zewnątrz- i wewnątrzkomórkowo. Występuje u ssaków w postaci trzech izoenzymów: cytoplazmatycznego, który zawiera miedź i cynk (Cu, ZnSOD, SOD1), mitochondrialnego, w którym zamiast Cu i Zn wbudowany jest atom manganu (MnSOD, SOD-2) oraz zewnątrzkomórkowego (ang. *extracellular superoxide dismutase* – EC-SOD, SOD-3), w którym także jest miedź i cynk. Forma zewnątrzkomórkowa rozkłada anionorodnik ponadtlenkowy w przestrzeni międzykomórkowej, dzięki czemu chroni powierzchnię naczyń przed działaniem tego rodnika tlenowego [20, 217]. Enzymy te zapewniają bezpośrednią ochronę przed szkodliwym działaniem anionorodnika ponadtlenkowego, a pośrednio rodnika hy-

droksylogowego i nadtlenoazotynu. Wpływają na ochronę tlenu azotu, głównie w krążeniu naczyniowym i w komórkach śródbłonna. Utrzymują stężenie nadtlenu wodoru na fizjologicznym, niezbędnym do pełnienia przez ten związek funkcji cząsteczki sygnałowej [90]. SOD-1 jest umiejscowiona w cytoplazmie, ale również w jądrze komórkowym. Nadekspresja enzymu chroni naczynia krwionośne przed uszkodzeniami wywołanymi LDL oraz przed aktywacją kaspaz [113]. Obniżenie aktywności powoduje stres oksydacyjny i prowadzi do progresji nowotworów [273, 290].

SOD-2 jest obecna głównie w macierzy mitochondrialnej i jest pierwszą barierą chroniącą komórkę przed nadmiarem anionorodnika ponadtlenkowego. Aktywność MnSOD waha się w granicach 2–12% całkowitej aktywności SOD, to jej „knockout”, czyli wyłączenie genu, jest letalny dla myszy [80, 134]. SOD-3 występuje w postaci niezwiązanej w osoczu krwi, limfie i innych płynach pozakomórkowych oraz związanej z glikozoaminoglikanami. SOD-3 utrzymuje odpowiednie stężenie tlenu azotu w naczyniach krwionośnych przez neutralizację nadmiaru anionorodnika ponadtlenkowego [326]. Wykryto, że brak tego enzymu w centralnym układzie nerwowym u myszy powoduje zaburzenia w kaskadzie sygnałów związanych z procesami uczenia [182].

W świetle funkcji, jakie pełni SOD w komórkach wydaje się, że odgrywa ona znaczącą rolę w patogenezie procesu nowotworowego [92, 222, 325]. Wyniki licznych badań wskazują, że zmiany aktywności i ekspresji obu izoform wewnątrzkomórkowych są obecne w wielu typach nowotworów i na różnych etapach zaawansowania choroby nowotworowej. Udział poszczególnych izoenzymów SOD w rozwoju zmian nowotworowych może być zróżnicowany [140, 276]. Chociaż większość badań potwierdza dominującą rolę tlenu singletowego w indukcji cytotoksycznego efektu PDT, to jednak istnieje także znacząca liczba obserwacji o istotnej roli innych RFT, w tym anionorodnika ponadtlenkowego. Wykazano, że anionorodnik ponadtlenkowy powstający pod wpływem PDT z udziałem photofrinu (Ph) lub amidu 5-aminolewulinowego (ALA), indukuje zniszczenia komórek nowotworowych na poziomie lipidów, białek i DNA [94, 261, 261]. Dysmutaza ponadtlenkowa, która jest kluczowym antyoksydantem wpływa na obniżenie efektywności PDT, co zostało potwierdzone w jedynie nielicznych badaniach [101, 164]. Zablokowanie SOD prowadzi do wzrostu skuteczności PDT. Dobrze poznanym inhibitorem SOD jest

2-metoksyestradiol (2-Me). Jest on naturalną pochodną estrogenów i powstaje na drodze kolejnych reakcji hydroksylacji i przeniesienia grupy metylowej z 17 β -estradiolu. Jego działanie jest niezależne od ekspresji i aktywności receptora estrogenowego, wykazano natomiast jego słabe powinowactwo do tego receptora [199, 301]. Odkryto obecność 2-Me we krwi i w moczu [328]. Liczne badania dowodzą, że 2-Me oprócz tego, że jest inhibitorem SOD znalazł zastosowanie jako wybiórczy związek przeciwnowotworowy. Jego antynowotworowe działanie jest niezależne od receptora estrogenowego. Selektywne działanie 2-Me na komórki nowotworowe jest wielokierunkowe. Wpływa m.in. hamująco na polimeryzację mikrotubul zatrzymując proliferację komórek, hamuje procesy angiogenezy i wzrostu guzów nowotworowych [176, 179, 205, 206, 281].

Wykorzystanie chemioterapeutycznego działania 2-Me w połączeniu z jego hamującym wpływem na aktywność dysmutazy nadkwasotlenkowej może w połączeniu z terapią fotodynamiczną zwiększyć antynowotworowe działanie i pozwolić na wprowadzenie do badań klinicznych terapii kombinowanej. Dodatkowym powodem zastosowania takiego leczenia jest to, że u podłoża działania tych terapii na komórki nowotworowe leżą te same mechanizmy. Chemioterapia z 2-Me i terapia fotodynamiczna zabija komórki nowotworowe powodując niekontrolowany wzrost RFT i wywołując stres oksydacyjny [45, 133].

S-transferaza glutationowa pi

Uszkodzenie komórek pod wpływem terapii fotodynamicznej indukują mechanizmy naprawcze, do których należą białka regulujące stężenie glukozy oraz białka szoku cieplnego, które pomagają w ponownej naprawie struktur komórkowych. Obok tych związków, istotną rolę w ochronie komórek przed produktami utleniania odgrywają S-transferazy glutationowe (GST, E.C.3.1.2.7). Wyróżnia się trzy główne grupy GST: cytosolowe, mitochondrialne i mikrosomalne. Wśród cytosolowych wyodrębniono wiele klas: α , β , δ , ϵ , μ , ω [220]. Stanowią one rodzinę wielofunkcyjnych białek, działających jako ważne enzymy detoksykacyjne, wewnątrzkomórkowe białka wiążące i transportujące. Uczestniczą w biotransformacji ksenobiotyków, metabolizmie leków. Katalizują reakcję sprzęgania glutationu z różnymi związkami elektrofilowymi. Jest to grupa enzymów drugiej fazy metabolizmu, która przeciwdziała powstawaniu guzów nowotworowych. Enzymy te odgrywają

kluczową rolę w detoksykacji i redukcji RFT. Ich ochronne działanie polega m.in. na sprzęganiu reaktywnych, aldehydowych produktów peroksydacji lipidów, szczególnie hydroksyalkenali [20, 89, 292].

Izoenzymy GST biorą udział nie tylko w metabolizmie różnych ksenobiotyków, ale również endogennych związków, dlatego charakteryzuje je różna dystrybucja i zmienna ekspresja w określonych tkankach. W związku z tym zróżnicowaniem mogą być ważnym indykato-rem diagnostycznym i prognostycznym wielu chorób. W prawidłowych komórkach GST jest zlokalizowana w cytoplazmie. GST klasy pi są grupą izoenzymów szczególnie związaną z transformacją nowotworową. Wykazano podwyższoną ekspresję tej transferazy glutationowej o lokalizacji jądrowej w różnych typach nowotworów i stadiach przednowotworowych, zmiany aktywności w stanach oporności na leki przeciwnowotworowe, jak i zmianę ekspresji w onkogenezie [141, 146], jest jednym z markerów nowotworowych w raku jajnika, szyjki macicy, jądra, jelita grubego [124].

1.4. Zastosowanie PDT w leczeniu nowotworów ginekologicznych

Pierwsze kliniczne próby zastosowania metody fotodynamicznej w diagnostyce i leczeniu nowotworów były poprzedzone ponad dwudziestoletnim okresem badań podstawowych i przedklinicznych. Znalazła ona również swoje zastosowanie w leczeniu i diagnozowaniu nowotworów i stanów przedrakowych w onkologii ginekologicznej. Pierwsze doniesienia o zastosowaniu metody fotodynamicznej w ginekologii ukazały się ponad 30 lat temu [108]. Początkowo próby stosowania PDT w ginekologii onkologicznej obejmowały leczenie nawrotów miejscowych nowotworów ginekologicznych, po leczeniu konwencjonalnym oraz przerzutów innych nowotworów zlokalizowanych w narządach rodnych [53, 54]. Powszechnie wykorzystuje się PDT do leczenia zmian ginekologicznych w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Japonii. Dotychczasowe próby kliniczne zastosowania PDT w ginekologii były prowadzone w trzech kierunkach: leczenia wznów miejscowych pierwotnych nowotworów kobiecych narządów płciowych oraz zlokalizowanych ognisk przerzutowych nowotworów pochodzących z innych narządów, wykrywania i leczenia zmian przednowotworo-

wych i zmian wczesnoinwazyjnych sromu i szyjki macicy oraz leczenia śródtrzewnowego wysiewów raka jajnika napromieniowaniem śródoperacyjnym [53]. W badaniach na nowotworowych liniach komórkowych raka szyjki macicy i rakach jajnika wykazano toksyczność terapii fotodynamicznej z kwasem aminolewulinowym (ALA). Nie stwierdzono żadnych różnic w podatności na terapię pomiędzy komórkami wrażliwymi a opornymi na wybrane cytostatyki. We wszystkich badanych przypadkach skuteczność terapii zależała od czasu inkubacji i ilości zakumulowanego fotouczulacza [254]. W badaniach na liniach komórkowych wykazano głównie jej skuteczność na komórkach raka szyjki macicy, raka sromu i endometrium [28, 227, 297]. Korel w 1995 roku zaobserwował silną fluorescencję fotouczulanych tkanek dysplastycznych pobranych ze sromu, pochwy i szyjki macicy w porównaniu ze zdrową tkanką [166]. W wielu badaniach stwierdzono selektywną lokalizację fotouczulacza w endometrium po instylacji jamy macicy roztworem pochodnej benzoporfiryny [82, 90, 315]. Badacze japońscy uważają, że PDT jest najlepszą metodą leczenia wczesnego raka szyjki macicy oraz zmian dysplastycznych u młodych kobiet, dla których zachowanie płodności jest bardzo istotne. Muroya wykazał skuteczność PDT w przypadkach raka szyjki macicy, w stopniu Ia i Ib1 u 255 kobiet. Po zastosowanej terapii 36 pacjentek zaszło w ciążę. U żadnej z tych pacjentek nie zaobserwowano zrostów ani zwężeń w obrębie kanału szyjki [209].

W Polsce niewiele jest doniesień o zastosowaniu PDT w leczeniu ginekologicznych zmian nowotworowych i przednowotworowych. Lecząco w Polsce PDT z zastosowaniem 20% maści 5 ALA jako fotouczulacza podawanego miejscowo. PDT wykonano u 19 pacjentek z dysplazją części pochwowej szyjki macicy potwierdzonej histopatologicznie. Ostatecznej ocenie poddano 12 pacjentek, u których stwierdzono całkowitą remisję [227, 232]. Są ośrodki w Polsce, które stosowały metodę fotodynamiczną do leczenia i diagnostyki nabłonkowych schorzeń sromu, zwłaszcza zmian o typie liszaja twardzinowego sromu, a także w diagnostyce raka szyjki macicy [27, 226, 228]. W badaniach *in vitro* opisano skuteczność działania terapii fotodynamicznej na liniach komórkowych raka jajnika o różnym stopniu zaawansowania. Zaliczono PDT do obiecujących alternatywnych metod leczenia nowotworów jajnika [5, 266]. Jednak stosowanie tej terapii na rakach jajnika, a szczególnie na raku jasnokomórkowym, ciągle jeszcze należy do rzadkości.

Wydaje się, że szczególne znaczenie ma włączenie terapii fotodynamicznej do leczenia raków jajnika, które należą do najbardziej inwazyjnych i najgorzej rokujących spośród nowotworów narządów rodnych. Podejmowane są próby stosowania PDT w zaawansowanej postaci raka jajnika, często jednak dotyczy to pacjentek, u których zastosowano wcześniej konwencjonalne leczenie chirurgiczne i chemioterapię. Wynika to z tego, że guzy jajnika rzadko są rozpoznawane we wczesnych stadiach zaawansowania choroby [5, 169, 245].

Na uwagę zasługuje fakt, że diagnostyka i terapia fotodynamiczna jest znacznie rzadziej stosowana i mniej zaawansowana w onkologii ginekologicznej niż w innych dziedzinach onkologii. Przeprowadzone badania *in vitro* i na modelach zwierzęcych w przypadku nowotworów ginekologicznych pozwalają uznać tę metodę za obiecującą i godną szerszego wdrożenia do badań klinicznych. Wydaje się jednak, że badania podstawowe wymagają gruntownego zrozumienia mechanizmu działania PDT, co ułatwi należyte przygotowanie tej metody pod względem metodycznym do badań klinicznych.

1.5. Rak jajnika – wiadomości ogólne

Rak jajnika pozostaje nadal najczęstszą przyczyną zgonu wśród nowotworów żeńskich narządów płciowych. Prowadzone badania statystyczne wykazują stały wzrost zachorowań na raka jajnika. Śmiertelność z powodu raka jajnika w ciągu ostatnich dwudziestu lat utrzymuje się na stałym poziomie [76]. Mimo wprowadzania leków nowej generacji i dużego zainteresowania metodami wykrywania raka jajnika we wczesnym etapie rozwoju całkowita 5-letnia przeżywalność ciągle pozostaje na tym samym poziomie i wynosi 20–30% [76, 252].

W zależności od regionu geograficznego: najniższą zachorowalność odnotowuje się w Chile i Japonii, dużo wyższą w krajach Europy Zachodniej i USA [33, 145]. Polska należy do krajów o wysokiej zachorowalności na raka jajnika, a standaryzowany współczynnik zachorowalności ciągle rośnie. Rak jajnika jest do dzisiaj jedną z najtrudniejszych do diagnozowania i leczenia chorób współczesnej onkologii ginekologicznej. Pomimo znacznego postępu w medycynie, leczenie raka jajnika ciągle budzi kontrowersje i nie przynosi pożądanych efek-

tów. Jedną z podstawowych przyczyn jest bezobjawowy przebieg wczesnych etapów rozwoju i wykrywanie choroby w późnym stopniu zaawansowania, a także brak precyzyjnych, przesiewowych metod diagnostycznych [298].

Proces karcenogenezy jajnika jest złożony i wieloczynnikowy. Nowotwory jajnika charakteryzują się ponadto dużą heterogennością histologiczną i zróżnicowaną biologią, która nie pozwala na ujednoczenie i jasne sprecyzowanie wiedzy dotyczącej jego rozwoju [120]. Badania na rakach jajnika są prowadzone w celu lepszego poznania patomechanizmu, zrozumienia biologii tego nowotworu oraz w celu poszukiwania nowych markerów wczesnego wykrywania, a przede wszystkim w celu opracowania efektywniejszych metod leczenia.

1.5.1. Klasyfikacja i typy morfologiczne raka jajnika

Maksymalnie 60% z pośród wszystkich raków jajnika i od 80-90% złośliwych nowotworów jajnika jest pochodzenia nabłonkowego. Większość guzów nabłonkowych powstaje z nabłonka powierzchniowego jajnika. Nabłonek jest zbudowany z komórek o różnych kształtach i charakteryzuje się dużą podatnością na zmiany formy komórek i na uleganie metaplastji. Typ histologiczny może być zdefiniowany od początku powstawania, jeżeli rozwija się ze zmienionego nabłonka pokrywowego lub kształtuje się w miarę rozwoju nowotworu, jeśli komórki nabłonkowe ulegają przemianie dopiero w obrębie guza. Główne typy histologiczne tych nowotworów określane są zgodnie z typem komórki budującej nabłonkowy fragment guza. W przypadku nowotworów, w obrębie których można wyróżnić dwa lub więcej typów komórek guz zalicza się do grupy określonej dominującą zawartością danych komórek albo, jeżeli nie ma komórek dominujących klasyfikuje się jako typ mieszany. Charakter zawartości w przestrzeniach torbielowych nie powinien decydować o ostatecznym rozpoznaniu gruczolakotorbielaka, chociaż w większości przypadków wygląd zawartości sugeruje typ komórek wyściełających torbiel.

Okolo 46% wśród wszystkich nowotworów nabłonkowych stanowią nowotwory surowicze. Zwykle mają charakter brodawkowy składający się z występujących na przemian komórek walcowatych z rzęskami lub kostkowych przypominających nabłonek jajowodu. Komórki są odporne na diastazę, posiadają mucykarmino pozytywny

glikokaliks z jasnym, wewnątrzkomórkowym śluzem, 36,5% nowotworów nabłonkowych to nowotwory śluzowe. Ich charakterystyczną cechą jest to, że zbudowane są z komórek walcowatych, wąskich i wysokich o jasnej cytoplazmie zawierającej zmienne ilości śluzu, który tworzy mniejszą lub większą wakuolę pod jądrem lub w innych partiach komórki. Jądra komórkowe są małe i położone u podstawy komórek. Guzy te ze względu na budowę komórek często określane są jako endocervicoma. Około 3% torbielaków zawiera komórki srebrochłonne i komórki Panetha, charakterystyczne dla nabłonka jelitowego.

Guzy endometrialne to grupa nowotworów łagodnych i złośliwych. Elementy nabłonkowe i podścieliska przypominają strukturę endometrium. Charakteryzują się budową cewkowatą z komórkami kolumnowymi i wydłużonymi, jądrami. Guzy mezonefroidalne jajnika mają najczęściej postać torbielaków z mniejszymi lub większymi partiami litymi lub drobnotorbielakowatymi. Mikroskopowo można wyróżnić dwa typy komórek: hufnalowe ze skąpą cytoplazmą, dużym okrągłym jądrem, które wpukła się do światła cewy czy torbieli i komórki jasne, które są większe, posiadają jasną wypłukaną cytoplazmę zawierającą glikogen, rzadziej nieco lipidów, oraz kwasochłonne hialinowe krople. Jądra komórkowe komórek jasnych są okrągłe, dość duże, położone ekscentrycznie. Rak mezonefroidalny jest jednym z najrzadziej spotykanych spośród pierwotnych raków jajnika. Niemniej jednak zarówno wiek chorych, jak i inne cechy kliniczne nie różnią tego typu nowotworu od innych złośliwych guzów nabłonkowych. Ich przebieg kliniczny wskazuje, że pod względem złośliwości zajmują wśród pierwotnych raków jajnika drugie miejsce po raku surowicznym.

Łagodne i graniczne guzy jasnokomórkowe jajnika są stosunkowo rzadkie. Złośliwe określane, według WHO jako adenocarcinoma, adenocarcinofibroma i cystadenocarcinofibroma, stanowią około 3% nowotworów nabłonkowych jajnika. W obrazie histologicznym nowotwory te są zbliżone do raka jasnokomórkowego nerki.

Przedmiotem przedstawionych w rozprawie badań był dość rzadko spotykany typ histologiczny raka jajnika – rak jasnokomórkowy. Ustalona i dobrze scharakteryzowana linia komórkowa raka jasnokomórkowego jajnika OVBH-1 z cichą mutacją genu p53 stanowiła wartościowy model do prowadzonych przez nas badań oceny skuteczności standardowej terapii fotodynamicznej i terapii modyfikowanej 2-metoksyestradiolem.

1.5.2. Etiologia raka jajnika

1.5.2.1. Etiopatologia

Etiopatologia raka jajnika nie została dotychczas wyjaśniona. Badania doprowadziły do opracowania wielu teorii i hipotez, określających czynniki zwiększonego ryzyka jego występowania [29, 56, 81, 313]. Nowotwór ten występuje w każdym wieku zarówno w okresie dzieciństwa, jak i w wieku starszym, jednak powyżej 75 roku życia należy do rzadkości. Rak jajnika najczęściej atakuje kobiety pomiędzy 40 a 70 rokiem życia, a szczyt zachorowalności przypada na 50-60 rok życia. Zwiększone ryzyko transformacji nowotworowej nabłonka jajnika wydaje się dotyczyć kobiet z prawidłowym, nieprzerywanym jajczkowaniem. Z obserwacji wynika, że zachorowalność na raka jajnika jest częstsza wśród nieródek oraz kobiet, które rzadko zachodziły w ciążę [252]. Do innych czynników epidemiologicznych można zaliczyć osobnicze lub rodzinne skłonności do dziedziczenia raka jajnika, bezpłodność, okres występowania menopauzy, otyłość oraz inne czynniki środowiskowe [29, 56, 81]. Istotną rolę w etiopatogenezie raka jajnika odgrywają czynniki wzrostu i cytokiny. Badania zawartości receptorów hormonalnych głównie receptorów estrogenowych i progesteronowych w badaniach *in vitro* wykazały, że rak ten jest hormonalnie i endokrynnie zależny [183, 204, 246].

W wielu przypadkach istotną przyczyną raka jajnika są mutacje genów zaangażowanych w procesy proliferacji komórek, ich apoptozy oraz naprawy uszkodzeń cząsteczek DNA. Karcynogeneza jest procesem wieloetapowym, który poprzedza inicjacja transformacji na poziomie pojedynczej komórki. Efektem końcowym jest rozregulowanie aparatu genetycznego i mechanizmów homeostazy. Często progresja nowotworowa przebiega na drodze akumulacji wielu błędów genetycznych. Szybki rozwój biologii molekularnej, biologii nowotworów, immunologii, wirusologii i innych pokrewnych dziedzin nauki pomógł w zdefiniowaniu molekularnego podłoża tworzenia nowotworów jajnika, a także umożliwił identyfikację genów i ich produktów [22, 173].

1.5.2.2. Genetyczne podłoże raka jajnika

W badaniach raka jajnika zidentyfikowano kilka różnych typów genów, których mutacje są odpowiedzialne za jego progresję. Należą do nich geny supresorowe, onkogeny oraz geny mutatorowe (naprawcze) [308].

1.5.2.3. Geny supresorowe

Z rodziny genów supresorowych szczególne miejsce u podstaw karcinogenezy w komórkach jajnika zajmują takie geny, jak: *TP53*, *p27*, *Rb*, *PTEN*, *p16*, *BRCA 1* i ich białkowe produkty [272, 274]. Geny te są strażnikami cyklu komórkowego i chronią komórki przed wejściem w fazę nieprawidłowych podziałów. Mutacje w obrębie tych genów prowadzą do nadmiernej, niekontrolowanej proliferacji, a tym samym do rozwoju klonu komórek nowotworowych. Powszechnie obserwowane zmiany genetyczne w nowotworach jajnika dotyczą głównie genów: *p53* (50-70% w zaawansowanych stadiach raka jajnika i 16-44% we wczesnych), *TP53* (50%), *p27* (30-50%) [22, 161, 178, 237, 272], rzadziej spotykane dotyczą genów *RB*, *PTEN* i *p16*. Badane przez nas komórki charakteryzowały się cichą mutacją genu *p53*.

1.5.2.4. Onkogeny

Protoonkogeny stanowiące około 0,1% wszystkich genów w prawidłowych komórkach, pełnią podstawową funkcję w regulacji procesów wzrostu, różnicowania i dojrzewania [273]. Aktywacja protoonkogeny i zmiana jego funkcji w onkogeną zachodzi najczęściej na skutek mutacji zmieniającej strukturę lub powodującej nadprodukcję kodowanego białka. Białka kodowane przez protoonkogeny pełnią najczęściej rolę czynników wzrostu lub receptorów inicjujących przekazywanie sygnałów wzrostowych do komórki, są zaangażowane w wewnątrzkomórkowe systemy przenoszenia i modyfikacji informacji oraz są białkami jądrowymi regulującymi transkrypcję genów [65, 175]. Do najczęściej spotykanych onkogenów w rakach jajnika należą *Her2/neu* (*erbB2*, *erbB1*), które kodują białka podobne do receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR), pełniące rolę w przekazywaniu istotnych dla proliferacji sygnałów do komórki ze środowiska zewnętrznego, *c-int2* kodujący czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), *c-fms*, którego białkowym produktem jest receptor czynnika wzrostu kolonii makrofagów (M-CSFr). Innym protoonkogenem jest *MET* (80), który koduje receptor wzrostu hepatocytów oraz onkogeny kodujące białka zaangażowane w przekazywanie sygnałów w komórce - *K-ras* i czynniki transkrypcji - *c-myc* [308].

1.5.2.5. Geny mutatorowe

Produkty białkowe tych genów są odpowiedzialne za rozpoznawanie uszkodzeń DNA i aktywację enzymów naprawczych usuwających ewentualne błędy powstałe podczas replikacji DNA zachowując komplementarny układ par zasad nukleotydowych [112, 230]. Biorą one udział w naprawie nieprawidłowo sparowanych zasad DNA oraz zasad niesparowanych powstających na skutek insercji lub delecji. Sekwencje mikrosatelitarne są szczególnie podatne na błędy w replikacji. Zaburzenia wykryte w ich obrębie są markerem zahamowania czynności genów mutatorowych i nazywane mikrosatelitarną niestabilnością [289]. Znanych jest 7 genów naprawczych DNA: 3 ludzkie homologiczne geny *MutS* *Esherichia coli* – *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6* oraz cztery homologiczne geny *MutL* – *hMLH1*, *hPMS2*, *hMLH3f* [47]. Inaktywację tych genów stwierdzono w różnych typach nowotworów ludzkich. W powszechnie występujących typach, zaburzenia w funkcjonowaniu mechanizmu naprawy poreplikacyjnej najczęściej są związane z uszkodzeniem genu *hMLH1* w badanych tkankach oraz w badaniach na liniach komórkowych [240]. Mutacje genów mutatorowych są także obserwowane w rakach jajnika [51, 112, 253]. Brak ekspresji genów mutatorowych w złośliwych i łagodnych nowotworach jajnika może wskazywać na mutację w genie mutatorowym związaną z rozwojem niestabilności mikrosatelitarnej albo na możliwość występowania hipermetylacji genu [41, 50, 135, 284]. Obecność niestabilności mikrosatelitarnej występuje w niewielkim odsetku raków jajnika lub w bardzo dużym (do 53%) [158, 279, 280]. Występowanie niestabilności mikrosatelitarnej może być związane z określonym typem histologicznym tego nowotworu [41].

1.5.3. Dziedziczne predyspozycje występowania raka jajnika

Liczne dane wskazują na dziedziczną predyspozycję występowania nowotworów. Co najmniej 10% nowotworów takich, jak rak jajnika, sutka i jelita grubego może powstawać w wyniku dziedzicznego defektu genetycznego w pojedynczych genach [308]. Ryzyko wystąpienia raka u spokrewnionych członków takich rodzin szacuje się w granicach 30-40%.

Dziedziczne predyspozycje do rozwoju raka jajnika często współwystępują w połączeniu ze wzrostem ryzyka powstawania raka gruczołu sutkowego. Najbardziej odpowiedzialne za występowanie tej zależności są geny *BRCA1* i *BRCA2* [29, 277].

Dziedziczne mutacje w obrębie genów *BRCA1* i *BRCA2* prowadzą do trzech zespołów rodzinnego występowania nowotworów. Pierwszy z nich to zespół dziedzicznego występowania raka jajnika, drugi to zespół dziedzicznego występowania raka jajnika i raka sutka oraz trzeci (zespół Lurch II) to zespół dziedzicznego występowania raka jajnika, raka niepolipowatego jelita grubego i raka endometrium. Stwierdzono, że w zespole Lurcha dodatkowo dochodzi do defektu na poziomie genów mutatorowych: *hMLH1* i *hMSH2* [48, 277]. Stwierdzenie mutacji w obrębie genów *BRCA* powoduje zwiększenie ryzyka zachorowania na raka jajnika od 15-40%. Istnieją inne rzadziej występujące zaburzenia genetyczne zwiększające ryzyko zachorowania na te nowotwory, jak mutacje genów *p53* (zespół Li i Fraumeni) *PTEN* (choroba Cowdena), *STK 11/LKB1* (zespół Peutz-Jeghers) [312].

1.6. Stosowane metody leczenia i oporność wielolekowa raka jajnika

Stały postęp wiedzy w naukach podstawowych wiąże się nierozwalnie z rozszerzeniem możliwości klinicyстів w ulepszeniu diagnozowania i stosowania nowych metod i schematów leczenia w onkologii ginekologicznej. Charakterystycznym postępowaniem w leczeniu nowotworów jajnika jest leczenie kojarzone, które polega na łączeniu chirurgii z chemioterapią oraz radioterapią. Współczesne metody leczenia raka jajnika zależą od stopnia zaawansowania choroby. Podstawową metodą leczenia we wszystkich stopniach zaawansowania nadal jednak pozostaje zabieg operacyjny, który pozwala na usunięcie lub zmniejszenie guza. Chemioterapia jest włączana do leczenia, albo przedoperacyjnego w celu zmniejszenia tkanki zmienionej nowotworowo, albo po zabiegu chirurgicznym. Chemioterapię stosuje się ogólnie i dootrzewnowo w dawkach standardowych i jako tzw. chemioterapię wysokodawkową. Obecnie standardowo stosuje się w pierwszym rzucie połączenie leków z grupy platyn i taksoidów. Postęp stosowanych technik chirurgicznych i stosowanej chemioterapii

nie wpływa znacząco na przedłużenie przeżycia chorych na raka jajnika, mimo że rak jajnika jest uważany za jeden z najbardziej chemio-wrażliwych nowotworów. Stosowane schematy chemioterapii kojarzonej pozwalają na uzyskanie remisji u prawie 80% chorych. U większości chorych dochodzi, niestety, do nawrotu, a 5 lat przeżywa około 25% [192, 327]. Nawroty raka jajnika są nieuleczalne i prowadzą w większości przypadków do zgonu w czasie nie dłuższym niż 5 lat od chwili rozpoznania. Nie ustalono do tej pory standardów w leczeniu nawrotów choroby.

Złe rokowanie w przebiegu raka jajnika może być uwarunkowane działaniem wielu mechanizmów. Należy do nich późne rozpoznanie nowotworu ze względu na wczesny, bezobjawowy przebieg. Bardzo istotnym mechanizmem jest przede wszystkim oporność na cytostatyki, która prowadzi do braku lub osłabionego efektu leczenia. Oporność nowotworu na cytostatyki może być pierwotną cechą genetyczną komórek lub nabytą, wytwarzaną w odpowiedzi na podawany cytostatyk. Za obniżoną wrażliwość na chemioterapię są odpowiedzialne głównie mechanizmy komórkowe: zaburzenie transportu leków przez ograniczenie wnikania leku do komórek lub w wyniku ich aktywnego usuwania z komórki. Występuje też zaburzenie metabolizmu przez przyśpieszenie procesów detoksacyjnych lub przez inaktywację związków farmakologicznych, blokowanie apoptozy, zaburzenia procesów związanych ze zmianami struktury DNA, nieprawidłowe działanie białek odpowiedzialnych za naprawę DNA, zwiększona ekspresja onkogenów [103, 104, 296].

Szczególne znaczenie odgrywa współwystępowanie różnych mechanizmów oporności w heterogennej populacji komórek nowotworowych jajnika, w której zastosowanie chemioterapii prowadzi do eliminacji komórek wrażliwych i przetrwanie komórek opornych [201]. Jedną z głównych przyczyn oporności wielolekowej komórek nowotworowych jest aktywne wypompowywanie cytostatyków z komórek przez błonę komórkową do środowiska zewnętrznego. Proces ten jest możliwy dzięki wielolekowym transporterom (ang. *multidrug transporters*).

Do odpowiedzialnych za oporność wielolekową należy wiele białek, z których najlepiej poznane są białka z rodziny ABC. Ich ekspresja w błonie komórek nowotworowych opornych na cytostatyki jest znacznie podwyższona [103, 104, 200]. Wspólną, charakterystyczną cechą białek ABC jest specyficzna domena odpowiedzialna za wiązanie

i hydrolizę ATP [61, 62, 324]. Wśród białek z rodziny ABC, których nadekspresję obserwowano w rakach jajnika są: ABCB1 (p-glikoproteina), ABCC1 (MRP1) i ABCG2 (BRCP). Wykazano także nadekspresję w rakach jajnika, innego niezależnego od ATP transportera błonowego (LRP). Częstość występowania nadekspresji poszczególnych białek w komórkach raka jajnika jest różna, ale może odgrywać istotną rolę w wywoływaniu oporności wielolekowej raka jajnika [15, 112, 138].

Jedną z przyczyn powstawania oporności na leki są zmiany genetyczne w ekspresji onkogenów i genów supresorowych, które hamują procesy apoptozy [17, 18, 307]. Istotną rolę w wytwarzaniu oporności na prawdopodobnie wszystkie cytostatyki, a w szczególności na cisplatynę jest brak prawidłowego białka p53. Produkt genu *TP53* odgrywa kluczową rolę w rozwoju nowotworów umiejscowionych w różnych narządach, także w raku jajnika [77]. Białko p53 pełni istotną rolę w regulacji procesu apoptozy jako czynnik transkrypcyjny, modulujący ekspresję genów kodujących białka uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego oraz w procesie apoptozy, np. w regulacji Fas, Bax, receptorów śmierci [216]. W wyniku stresu oksydacyjnego następuje fosforylacja i stabilizacja tego białka [267]. Białko to pełni istotną rolę w zatrzymaniu cyklu komórkowego w celu naprawy DNA lub skierowaniu komórki na drogę apoptozy w odpowiedzi na jej nieodwracalne uszkodzenia. p53 działa regulująco na białka proapoptotyczne z rodziny Bcl2 (Bax, Bak, Noxa), może też hamować niektóre ważne geny procesu apoptozy (kodujące Bcl2, Bax, CD95). Wpływa także na regulację zajścia dalszych etapów apoptozy na poziomie Apaf-1 i kaspaz [191]. Mutacje genu *p53* występują w około 50% nowotworów i należą do jednych z najczęstszych zmian genetycznych, stwierdzonych w różnych typach nowotworów, w tym także w raku jajnika [24]. Ten defekt genetyczny w istotny sposób wpływa na hamowanie procesu apoptozy, zależnego od białka p53 [23, 309].

Poznanie mechanizmów oporności wielolekowej u chorych na raka jajnika z pewnością pozwoli na uzyskanie lepszych wyników leczenia tego nowotworu. „Złotym środkiem” byłoby jednak zastosowanie metody, która – niezależnie od oporności na leki – byłaby skuteczna i mało inwazyjna. W obecnie wprowadzanych metodach leczenia raka jajnika wyraźnie zaznaczają się tendencje ograniczające rolę i rozległość chirurgii na korzyść wprowadzania innych, mniej inwazyjnych form [5, 174]. Można zaliczyć do nich metody wynikające z roz-

woju wiedzy genetycznej. Jedną z nowszych metod terapeutycznych jest zastosowanie terapii celowanej, czyli modulatorów przekazywania sygnałów odpowiedzialnych za regulację proliferacji i różnicowania komórek. Jednym z przykładów jest stosowanie przeciwciał monoklonalnych, które są zdolne do uruchomienia odpowiedzi immunologicznej w mechanizmie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał lub od dopełniacza. Śmierć komórek nowotworowych może być wywoływana przez blokowanie ekspresji zewnątrzkomórkowych białek istotnych fenotypowo. Przeciwciała monoklonalne mogą również wpływać na reakcje ligand–receptor, blokując receptory komórkowe dla czynników wzrostu. Pierwsze próby dotyczyły blokowania HER2 za pomocą monoklonalnego przeciwciała Trastuzumab. Należy jednak podkreślić, że najlepsze efekty terapeutyczne uzyskano dla nowotworów mających dużą ekspresję tego receptora. Kliniczna wartość stosowania tego przeciwciała w raku jajnika jest limitowana ze względu na małą ekspresję HER2 i mały współczynnik obiektywnych odpowiedzi [31, 283, 304]. Jednym z celów terapii antynowotworowych jest hamowanie procesów angiogenezy guzów, w której również jest wykorzystywana terapia celowana [35, 91]. Dotychczas przeprowadzono stosunkowo niewiele badań klinicznych z zastosowaniem terapii celowanej w raku jajnika. Badane do tej pory przeciwciała antynowotworowe u chorych na raka jajnika wykazują pewną aktywność. Częściej obserwuje się jednak przedłużone okresy stabilizacji choroby niż odpowiedzi na leczenie. Leki stosowane w terapii celowanej działają bardziej cytostatycznie niż cytotoksycznie [141].

W świetle tych badań stosunkowo obiecującą i skuteczną metodą walki z nowotworami jajnika wydaje się być terapia fotodynamiczna. Przeprowadzone badania *in vitro* i na modelach zwierzęcych w przypadku nowotworów ginekologicznych, także nowotworów jajnika pozwalają uznać tę metodę za obiecującą i godną szerszego wprowadzenia do badań klinicznych.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W związku z małą skutecznością tradycyjnych metod leczenia nowotworów jajnika, poszukuje się wciąż nowych, bardziej efektywnych. Jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za brak sukcesów chemioterapii raka jajnika jest pierwotna i wtórna oporność komórek nowotworowych na stosowane cytostatyki, na którą wpływa także w dużym stopniu wysoka heterogenność biologiczna, immunologiczna i genetyczna nowotworów jajnika. Rak jajnika, szczególnie typ jasnokomórkowy jest jednym z nowotworów najbardziej opornych na chemię i radioterapię.

Wykorzystanie zjawisk fotodynamicznych w medycynie przyniosło w ostatnich latach obiecujące wyniki. Dotyczy to także zastosowania terapii fotodynamicznej w diagnozowaniu i leczeniu nowotworów ginekologicznych. Duże nadzieje terapeutyczne wiąże się również z wykorzystaniem metod łączenia PDT z innymi, już obecnie stosowanymi. PDT jest dynamicznie rozwijającą się metodą leczenia zmian nowotworowych, ale zastosowanie jej w diagnostyce i terapii antynowotorowej można określić jeszcze jako pionierskie i wprowadzane w praktyce klinicznej przez nieliczne ośrodki za granicą i w Polsce. Pomimo że wyniki jej skuteczności są bardzo obiecujące nie można jej jeszcze do tej pory uznać za rewolucjonizującą medycynę metodę leczenia nowotworów, ponieważ jest to metoda, nad którą wciąż prowadzone są prace badawcze. Szczególne zainteresowanie skupia się na opracowaniu schematów leczenia z zastosowaniem terapii fotodynamicznej lub terapii kombinowanej, np.: PDT + chemioterapia, lub PDT + immunoterapia. Jest to ciągle otwarty temat, ponieważ komórki nowotworowe ze względu na różne właściwości fenotypowe i genotypowe, a także pochodzenie wykazują zróżnicowaną oporność na zastosowane leczenie i indywidualną odpowiedź na działanie stosowanych schematów leczenia. Istotne jest opracowanie indywidualnych warunków terapii fotodynamicznej dla różnych komórek nowotworowych.

Celem naszej pracy była dlatego ocena skuteczności samej PDT i PDT modyfikowanej przez inhibitora dysmutazy ponadtlenkowej

w komórkach linii raka jasnokomórkowego jajnika opornego na chemo- i radioterapię, a zarazem opracowanie podstaw do zastosowania tej metody terapeutycznej w leczeniu raka jasnokomórkowego jajnika.

Realizacji wyżej wymienionego celu dokonano przez:

1. Zbadanie lokalizacji fotouczulacza w komórkach nowotworowych i stopnia kolokalizacji fotouczulacza z mitochondrium i retikulum endoplazmatycznym (ER) (określenie miejsca początkowego uszkodzenia komórek).
2. Ocenę cytotoksyczności po przeprowadzonych badaniach fotodynamicznych (Ph-PDT) i badaniach fotodynamicznych zmodyfikowanych (Ph-2-Me-PDT).
3. Analizę markerów stresu oksydacyjnego w komórkach: aktywność i ekspresję dysmutazy ponadtlenkowej, stopień peroksydacji lipidów, uszkodzenie oksydacyjne białek (oznaczenie grup tiolowych i grup karbonylowych białek).
4. Wpływ reakcji fotodynamicznych i reakcji fotodynamicznych zmodyfikowanych na indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych (metoda kometowa i TUNEL).
5. Zmiany w ekspresji białka supresorowego p53 i jego formy z ufosforylowanymi resztami aminokwasów w dwóch miejscach (Ser 20, Ser 392) oraz białka Bax, M30, Bcl-2 po Ph-PDT i Ph-2-Me-PDT.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Hodowle komórkowe

Do badań wykorzystano dwie linie komórkowe: linię raka jasnokomórkowego jajnika OvBH-1 otrzymanego z Akademii Medycznej we Wrocławiu (Patent nr 189880) i ludzką linię gruczolakoraka gruczołu sutkowego: MCF-7. Linia o nazwie OvBH-1 została wyprowadzona i ustalona z komórek płynu surowiczego od 54-letniej kobiety z histopatologicznym rozpoznaniem raka jasnokomórkowego jajnika. Komórki OvBH-1 charakteryzują się określonymi cechami morfologicznymi i genetycznymi należącymi do rzadkiego typu histologicznego raka jajnika. Do tej pory nie otrzymano *in vitro* komórek raka jasnokomórkowego jajnika o takim fenotypie i genotypie. Komórki te wykazują nadekspresję białka p53 i onkoproteiny c-erbB2 i charakteryzuje je oporność na radio- i chemioterapię [16]. Porównawczo do badań użyto linię parentalną gruczolakoraka gruczołu sutkowego MCF-7 wyprowadzoną i ustaloną od 69-letniej kobiety (zakupione z banku Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu). Komórki te charakteryzują się występowaniem dzikiej formy białka p53 i wrażliwością na chemioterapię. Komórki MCF-7 są jedną z najlepiej scharakteryzowanych na poziomie molekularnym i immunofenotypowym ludzką linią komórkową. Linia ta może być uznana również za modelową w badaniach fotodynamicznych.

Obie linie komórkowe hodowano w plastikowych butelkach hodowlanych (25 cm², Falcon), w płynie hodowlanym DMEM (ang. Dulbecco Modified Eagle Medium) (Sigma) z dodatkiem 2 mM glutaminy i 10% surowicy płodowej cielęcej FBS (ang. Fetal Bovine Serum, South American origin) oraz 50 U/ml, 50 µg/ml streptomycyny. Komórki inkubowano w temp. 37°C w obecności 5% CO₂. Medium hodowlane zmieniano trzy razy w tygodniu. Po osiągnięciu pełnej monowarstwy komórki odklecano od podłoża, stosując 0,25% roztwór trypsyny z EDTA (Sigma) i przygotowywano do dalszych badań.

3.2. Badania fotodynamiczne klasyczne i modyfikowane 2-metoksyestradiolem (2-Me)

Medium hodowlane zastępowano płynem hodowlanym, który zawierał określone stężenie fotouczulacza. Fotouczulaczem wykorzystywanym do badań fotodynamicznych był Photofrin® (Ph, otrzymano od prof. Bonnetta z Uniwersytetu w Londynie). Wyjściowy roztwór fotouczulacza przygotowywano w buforze fosforanowym (PBS-150 mM chlorek sodu, 150 mM fosforan sodu, pH 7,2, 25°C) w środowisku lekko zakwaszonym stężonym roztworem NaOH (20%). Roztwór wyjściowy fotouczulacza przechowywano w temp. 20°C, w ciemności nie dłużej jednak niż 6 tygodni. Komórki inkubowano w płynie z Ph (20 µg/ml) w ciemności przez 18 godz. Po inkubacji z fotosensybilizatorem zmieniano płyn hodowlany na świeży i naświetlano komórki. Jako źródła światła użyto lampę halogenową (Optel, Opole 250 W) z filtrem czerwonym, który przepuszczał światło o długości fali $\lambda = 630 \pm 20$ nm. Moc dostarczanego promieniowania wynosiła 120 mW/cm². Ostateczną dawkę energii promieniowania obliczono według wzoru $E = P \times t$ (E – energia promieniowania [J]; P – moc ciągła promieniowania [W]; t – czas emisji promieniowania [s] (Graczyk 1999) i wynosiła 21,6 J/cm², którą uzyskiwano przy czasie naświetlania 6 min. W przypadku reakcji fotodynamicznej w obecności 2-metoksyestra-diolu (2-Me) *in vitro* postępowano tak samo, tylko komórki inkubowano przez 18 godz. z fotouczulaczem i 2-Me o stężeniu 50 mM.

3.3. Umiejscowienie fotouczulacza w komórkach

3.3.1. Mikroskop fluorescencyjny

Zakładano mikrohodowle komórkowe na mikroskopowych szkiełkach nakrywkowych (Roth). Komórki hodowano 24 godz. W celu wizualizacji fotouczulacza komórki linii OvBH-1 inkubowano 1, 3 i 4 godz. na szkiełkach mikroskopowych w jego obecności (stężenie 30 µg/ml). Po inkubacji komórki utrwalano w 4% paraformaldehydzie przygotowanym na PBS (pH = 7,2) i płukano trzy razy w buforze fosforanowym. Takie same badania wykonano na linii MCF-7. Do wizualizacji fotouczulacza wykorzystywano filtr o długości fali wzbudzenia

$\lambda = 300\div 400$ nm. i długości fali emisji $\lambda = 400\div 800$ nm. Obrazy mikroskopowe analizowano w programie Cell[^]F (Olimpus Soft Imaging Solutions GmbH).

3.3.2. Mikroskop konfokalny

W mikroskopie konfokalnym LSM 510 (Carl Zeiss GmbH) analizowano lokalizację Ph, a także jego kolokalizację z błonami mitochondrium i retikulum endoplazmatycznym. W tym celu komórki OvBH-1 i MCF-7 hodowano na szkiełkach nakrywkowych przez około 18 godz. Następnie komórki inkubowano z Ph przez 4 godz. Przed utwaleniem komórki inkubowano przyżyciowo z ERTrackerTMGreen w celu wybarwienia reticulum endoplazmatycznego. Komórki następnie utrwalono w 4% paraformaldehydzie. Przed analizą w mikroskopie konfokalnym komórki płukano trzy razy w PBS i utrwalano w 4% paraformaldehydzie (pH = 7,2) i inkubowano 15 min z MitoTracker Green 90 nM (Molecular Probes, OR, USA), w celu wybarwienia mitochondriów. Przed oceną w obrazie mikroskopowym komórki przepłukiwano PBS. Fotouczulacz wzbudzano laserem helowo – neonowym o długości fali $\lambda = 405$ nm, natomiast MitoTracker Green i ERTrackerTM Green wzbudzano laserem argonowo-jonowym o długości fali $\lambda = 488$ nm. Długość fali emisji wynosiła odpowiednio 505-530 nm dla fotouczulacza i 560 dla MitoTracker Green i ERTrackerTM Green. Obrazy były analizowane w programie KS400 (Carl Zeiss GmbH).

3.4. Morfologia komórek

W celu określenia morfologii komórek OvBH-1 i MCF-7 przed i po przeprowadzonych doświadczeniach (patrz rozdział 3.2) komórki hodowano na szkiełkach podstawowych, następnie utrwalano w zimnym acetonie przez 10 min. Komórki barwiono standardową metodą histologiczną hematoksyliną i eozyną (H+E). Morfologie komórek oceniano w mikroskopie świetlnym BHS Olympus (Olympus Optical Co. Ltd. Tokio, Japonia).

3.5. Ocena przeżywalności komórek

Przeżywalność komórek oznaczano metodą kolorymetryczną badając ich aktywność metaboliczną z zastosowaniem testu redukcji soli tetrazolowej w mitochondriach komórek. Kluczowym składnikiem testu jest bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenyłu (MTT) odczynnik jest gotowy do użycia po rozpuszczeniu w PBS. Podczas inkubacji z komórkami MTT przenika przez błonę komórkową, mitochondrialna dehydrogenaza z żywych komórek rozcina pierścień tetrazolowy obecny w MTT. Tworzą się nierozpuszczalne w środowisku wodnym purpurowe kryształy formazanu, które rozpuszczają się w izopropanolu dając purpurowe zabarwienie. Zmiana koloru jest mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 570$ nm. Zmiana ilości tworzonego formazanu jest wskaźnikiem wzrostu lub zmniejszenia liczby komórek, czyli cytotoksyczności w badanej próbie. Absorbancja jest proporcjonalna do liczby żywych komórek. Próby przygotowywano według procedury załączonej do zestawu *In vitro* Toxicology Assay Kit MTT Based (TOX-1, Sigma). Cytotoksyczność komórek po badaniach oznaczano na płytkach 96-dołkowych (Nunc, Nunclon™Surface).

Opis procedury:

- płukanie 2× w PBS,
- zawieszenie komórek w 90 μ l PBS,
- dodanie 10 μ l MTT o stężeniu końcowym 0,5 mg/ml,
- inkubacja 2 godz. w 37°C,
- dodanie 100 μ l izopropanolu w 0,1 N HCL, dokładne wymieszanie,
- inkubacja 30 min w temp. pokojowej,
- pomiar absorbancji na czytniku mikroplętek Multiscan MS (Labsystem) przy długości fali $\lambda = 570$ nm. Wyniki podano jako procent kontroli (kontrolę stanowiły komórki niepoddane żadnemu działaniu fotodynamicznemu).

3.6. Peroksydacja lipidów

Pomiar peroksydacji lipidów oparto na oznaczeniu stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w reakcji z kwasem tiobarbiturowym (TBA, Fluka). Stosowano metodę wg Rice-Evans zmodyfikowaną przez

nasz zespół z Katedry i Zakładu Biochemii Lekarskiej AM we Wrocławiu do pomiaru stopnia peroksydacji lipidów w komórkach z hodowli *in vitro* [20]. Komórki linii OvBH-1 i MCF-7 po osiągnięciu pełnej monowarstwy poddano badaniom.

Opis procedury

1. komórki odklejano od podłoża 0,25% trypsyną z EDTA (Sigma) i płukano dwukrotnie buforem fosforanowym (PBS),
2. komórki zawieszano w 200 μ l tego buforu,
3. do 200 μ l zawiesiny komórkowej w PBS (około 5 mln komórek) dodawano 200 μ l 15% kwas trichlorooctowy (Roth) w 0,25 M roztworze HCL oraz 200 μ l 0,37% roztworu TBA w 0,25 M roztworze HCL. Próbką kontrolną było 200 μ l wody,
4. próby badane po wymieszaniu inkubowano 20 min w bloku grzewczym (Termoblock TB-941 U) w temp. 90°C,
5. schłodzone po inkubacji próby wirowano 5 min przy obrotach 5000 rpm,
6. absorbancję supernatantu mierzono przy długości fali $\lambda = 535$ nm względem próby kontrolnej na spektrofotometrze JASCO V-530 UV/Vis (Medson s.c) z oprogramowaniem,
7. stężenie MDA liczone na podstawie milimolowego współczynnika absorpcji $\epsilon = 156 \text{ mM}^{-1} \text{ 1cm}^{-1}$.

3.7. Uszkodzenie białek w komórkach

Stopień uszkodzenia białek po poddaniu komórek badaniom oceniano oznaczając zawartość grup tiolowych białek -SH oraz grup karbonylowych C=O.

3.7.1 Grupy tiolowe

Oznaczenie zawartości grup tiolowych w białkach wykonano wg metody Ellmana zmodyfikowanej do oceny grup tiolowych białek w komórkach z hodowli (zgłoszenie patentowe nr P383246 Kulbacka J., Saczko J. 2007) [20]. Metoda ta jest oparta na reakcji kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego) (odczynnika Ellmana DTNB) z grupami -SH białek. Podczas reakcji uwalnia się anion 5-tio-2-nitrobenzoesowy.

Opis procedury

1. komórki poddane *in vitro* procedurze fotodynamicznej klasycznej i zmodyfikowanej 2-Me odklejano od podłoża 0,25% trypsyną z EDTA (Sigma) i płukano dwukrotnie buforem fosforanowym (PBS),
2. do 200 μ l zawiesiny komórek (5 mln komórek) dodano 200 μ l 10% roztworu SDS w 10 mM buforze fosforanowym o pH = 8,0, 200 μ l 0,04% roztworu DTNB (Fluca) w 10 mM buforze fosforanowym pH = 8,0, 1,6 10 mM buforu fosforanowego o pH = 8,0,
3. badane próby inkubowano 1 godz. w łaźni wodnej (STI, Osta Electronics) w temp. 37°C,
4. absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 412$ nm na spektrofotometrze JASCO V-530 UV/Vis (Medson s.c),
5. stężenie grup -SH w badanych próbach wyznaczono na podstawie milimolowego współczynnika absorbancji anionu kwasu tio-2-nitrobenzoesowego, który powstaje podczas reakcji i wynosi $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.7.2 Grupy karbonylowe

Metoda oznaczania grup karbonylowych białek oparta jest na ich reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną. W wyniku tej reakcji powstają 2,4-dinitrofenylohydrazony, które mają charakterystyczne żółte zabarwienie wg Levine 1990 i Rice-Evans 1991 [20]. Komórki, w których oznaczano grupy karbonylowe hodowano w opisanych warunkach.

Opis procedury:

1. komórki poddane procedurze fotodynamicznej klasycznej oraz zmodyfikowanej 2-Me odklejano od podłoża 0,25% trypsyną z EDTA (Sigma) i płukano dwukrotnie buforem fosforanowym (PBS),
2. komórki poddano lizie w 80 μ l buforu o składzie: 50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA z dodatkiem 20 μ l Tritonu X-100, następnie dodawano 20 μ l stężonego roztworu inhibitorów proteaz (Roche Diagnostic),
3. próby po wymieszaniu wirowano przez 20 min w 4°C przy przyspieszeniu 10 000 g,
4. z każdej próby pobierano po 20 μ l na próbę kontrolną i 20 μ l na próbę badaną,

5. do obu prób dodawano równą objętość roztworu 10% kwasu trójchlorooctowego w celu wytrącenia białka.
6. próby wirowano i zlewano supernatant,
7. do próby kontrolnej dodawano 1 ml 2 M roztworu HCL, a do próby badanej 1 ml 0,2% roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny w HCL,
8. Obie próby inkubowano w łaźni wodnej (STI, Osta Electronics) przez 60 min w temp. 37°C,
9. w obu próbach rozpuszczano białko, dodając po 600 mg chlorowodoru guanidyny,
10. nadmiar dinitrofenylohydrazyny usuwano przepuszczając próbki przez kolumnę z Sephadeksem,
11. po doprowadzeniu do jednakowego stężenia białka w próbach mierzono absorbancję próby badanej względem próby kontrolnej przy długości fali $\lambda = 370$ nm na spektrofotometrze JASCO V-530 UV/Vis (Medson s.c),
12. zawartość grup karbonylowych obliczano na podstawie milimolowego współczynnika absorpcji powstałego hydrazonu, równego 21,01 mmol⁻¹.

3.8. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oznaczano pośrednią metodą spektrofotometryczną. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu ksantyny i oksydazy ksantynowej (XOD) do wytworzenia anionorodnika ponadtlenkowego (O₂^{-•}). Powstający O₂^{-•} reaguje z chlorkiem 2-(4-jodofenolo)-3(4-nitrofenolo)-5-fenylotetrazoliny (INT), tworząc czerwony barwnik formazonowy. SOD katalizuje reakcję dysproporcjonowania O₂^{-•}. Produktami tej reakcji są: H₂O₂ i O₂. Miarą aktywności SOD jest stopień hamowania reakcji tworzenia barwnika formazonowego.

Do pomiaru całkowitej aktywności SOD użyto zestawu Ransod (RANDOX).

Opis procedury wg protokołu firmy RANDOX:

1. komórki po PDT i PDT z 2-Me *in vitro* trypsynizowano (0,25% trypsyną z EDTA) (Sigma) i płukano dwukrotnie w PBS,

2. komórki zawieszano w 50 mM buforze fosforanowym pH = 7, który zawierał mieszaninę inhibitorów proteaz
3. tak przygotowane próby zamrażano w -80°C ,
4. lizat komórkowy dodawano do mieszaniny substratów preinkubowanej wcześniej, w temp. 37°C ,
5. próby badane mieszano i dodawano oksydazy ksantynowej (pkt. 4-5 wg protokołu firmy RANDOX),
6. mierzono absorbancję w temp. 37°C na spektrofotometrze JASCO V-530 UV/Vis (Medson s.c),
7. przed każdym pomiarem wykreślano krzywą wzorcową ze standardów SOD z zestawu Ransod (RANDOX).

Oznaczanie stężenia białka:

W celu przeliczenia aktywności SOD z odczytanych pomiarów oznaczano stężenie białka.

Stężenie białka w lizatach komórkowych mierzono metodą Bradforda na płytce 96-dołkowej (Nunc, Nunclon™Surface) przez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 595 \text{ nm}$ na czytniku mikroplitek Multiscan MS (Labsystem) [32].

3.9. Metody oznaczania apoptozy

3.9.1. Analiza rodzaju śmierci komórek w teście kometowym

Test kometowy (ang. *comet assay*) jest morfologiczną metodą wykrywania uszkodzeń DNA, także tych charakterystycznych dla procesu apoptozy. W tej metodzie wykorzystuje się zdolność pociętych fragmentów DNA do migracji z jądra komórkowego pod wpływem pola elektrycznego. Niepocięte fragmenty DNA migrują wolniej i pozostają uwięzione w jądrze komórkowym. Metoda opiera się na elektroforezie pojedynczych komórek, która pozwala na ocenę uszkodzeń DNA. W zależności od ustalonych warunków elektroforezy można wykazać różne formy uszkodzenia DNA. Warunki alkaliczne ($\text{pH} > 13$) pozwalają na wykrywanie pęknięć pojedynczych nici DNA, podwójnych pęknięć łańcucha DNA oraz miejsc naprawy DNA. Fragmenty DNA obdarzone ładunkiem ujemnym wędrują w polu elektrycznym do bieguna dodatniego, co daje obraz charakterystyczny dla komety, w której

można wyróżnić głowę i ogon. W jądrze apoptotycznym małe fragmenty DNA zostają przesunięte z głowy (miejsce, w którym pierwotnie znajdowało się jądro) do ogona w 90%. Jądra z nieuszkodzonym DNA wykazują, brak lub minimalną migrację, dając obraz samej głowy albo głowy z nieznacznie zaznaczonym ogonem. Komety z komórek nekrotycznych, które charakteryzują się obecnością DNA o różnej długości, mają ogon zawsze wyraźnie połączony z głową. Komety z komórek o uszkodzeniu "niezdefiniowanym" (proces zniszczenia DNA nie został zakończony) posiadają głowę i niewielki ogon. W warunkach neutralnych (pH = 7) możliwa jest tylko identyfikacja podwójnych pęknięć łańcucha DNA, charakterystycznych dla fragmentacji DNA typowej dla apoptozy. Komórki hodowano na płytkach 12-dołkowych, następnie poddano badaniom, trypsynowano i zawieszano w 2 ml medium.

Opis procedury (metoda kometowa neutralna):

1. komórki w zawieszynie w ilości, co najmniej 2×10^4 wirowano (6 min \times 200 g), płukano w zimnym PBS (bez jonów wapnia i magnezu), ponownie wirowano, zbierano supernatant, osad komórkowy zawieszano w PBS tak, aby otrzymać gęstość komórek $5\text{--}6 \times 10^5$ komórek/ml,
2. do 90 μ l agarozy o niskim punkcie topnienia w temp. 37°C dodawano 30 μ l zawiesziny komórek w PBS, mieszano, 100 μ l mieszaniny nakładano na szkiełko podstawowe wcześniej pokryte 90–100 μ l 0,5% agarozy o normalnym punkcie topnienia i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym,
3. po zestaleniu się żelu (ok. 1 min na metalowej płytce chłodzonej na lodzie) zdejmowano szkiełka nakrywkowe i zanurzano szkiełka podstawowe z komórkami w roztworze lizującym o pH = 10,0 (100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 1% Triton X – 100) na 1 godz. w temp. 0–4°C,
4. po lizie szkiełka z żelem płukano w buforze do elektroforezy TBE (Takara),
5. warunki elektroforezy: napięcie 1,0 V/cm, natężenie 490 mA, czas 20 min, temp. 0–4°C,
6. po elektroforezie szkiełka płukano w H₂O, 2 \times 5 min,
7. szkiełka suszono w temp. pok. przez całą noc,

8. szkiełka umieszczano w roztworze utrwalającym (150 g kwasu trójchlorooctowego, 50 g siarczanu cynku, 50 g glicerolu w 1L H₂O) na 10 min,
9. szkiełka płukano w H₂O, 1 × 1 min,
10. żel suszono 1 godz. w temp. 40–50°C lub przez całą noc w temp. pokojowej,
11. szkiełka umieszczano w roztworze barwiącym¹ na 10–20 min. Barwienie powtarzano raz albo dwa w świeżym roztworze barwiącym przez 5–10 min, do momentu otrzymania szarobrazowego koloru na szkiełkach,
12. płukano w H₂O, 1 × 1 min,
13. reakcję barwienia zatrzymywano w 1% kwasie octowym przez 5 min,
14. płukano w H₂O 1 × 1 min
15. preparaty suszono w cieplarni w temp. pokojowej.

Komety liczone w mikroskopie świetlnym firmy Olympus BH-2 (Olympus Optical Co. LTD. Tokio, Japonia). Zawsze liczone po 100–500 komórek i obliczano procent poszczególnych rodzajów komet.

Komety oceniano według oryginalnej metody opracowanej według Collinsa [52]. Ocenie podlega długość ogona, rozmiar głowy, intensywność świecenia głowy oraz ogona. W tab. 3.1 przedstawiono szczegółowo kryteria tej oceny. Komórki apoptotyczne zalicza się do kategorii 3 i 4.

Opis procedury (metoda alkaliczna):

Metoda alkaliczna różni się od metody neutralnej w trzech zasadniczych punktach:

- roztworem do elektroforezy (bufor alkaliczny – 300 mM NaOH, 1 mM EDTA),
- czasem trwania elektroforezy (30 min),
- po elektroforezie szkiełka trzeba płukać w buforze neutralizującym (0,4 Tris, pH = 7,5).

¹ Roztwór barwiący przygotowano bezpośrednio przed użyciem: 68 ml roztworu A (100 mg azotanu amonowego, 100 mg azotanu srebra, 500 mg kwasu wolframowokrzemowego, 250 µl formaldehydu – min 37% w 0,5 l H₂O) i 32 ml roztworu B (12,5 g węglanu sodu w 0,4 l H₂O).

TUNEL

Opracowana w latach 90. metoda detekcji apoptozy *in situ* na skrawkach parafinowych również stosowana do komórek z hodowli (TUNEL) bazuje na scharakteryzowanej biochemicznie międzynukleosomalnej fragmentacji DNA przez endonukleazy specyficzne dla apoptozy. W metodzie tej wykorzystuje się enzym końcową transferazę (TdT), która ma zdolność do budowywania w miejscach pęknięcia nici DNA znakowanych nukleotydów, np. znakowany dioksygeniną UTP (dUTP), dostarczanych w mieszaninie reakcyjnej. Po przeprowadzonych doświadczeniach umiejscowienie wolnych grup 3'OH pękniętych nici DNA przeprowadzono na komórkach używając zestawu ApopTag (In situ Apoptosis Detection Kit-Peroxidase firmy Oncor-Gaithers-burg, USA).

Opis procedury wg protokołu firmy Oncor

Przed utrwaleniem preparaty odpłukiwano od zawartej w płynie hodowlanym surowicy w PBS.

1. komórki na szkiełkach 8-dołkowych (Diagnostic Microscope Slides, Erie Scientific Company) utrwalono w 4% paraformaldehydzie w PBS,
2. płukanie 3 × 5 min w PBS,
3. trawienie komórek proteinazą K (20 mg/ml) przez 5 min w temp. pokojowej,
4. płukanie w PBS 4 × po 2 min,
5. blokowanie endogennej peroksydazy 2% H₂O₂ w PBS przez 5 min w temp. pokojowej,
6. płukanie w PBS 2 × 5 min,
7. inkubacja w buforze preinkubacyjnym – 15 min w temp. pokojowej,
8. inkubacja w mieszaninie reakcyjnej (TdT i znakowanych digoksygeniną UTP) 60 min w komorze wilgotnej w temp. 37°C,
9. płukanie w buforze płuczącym 30 min w temp. pokojowej,
10. płukanie w PBS 3 × 5 min,
11. inkubacja z przeciwciałami anty-dioksygenina znakowanymi peroksydazą – 30 min w komorze wilgotnej w temp. pokojowej,
12. płukanie w PBS 3 × 5 min,
13. wizualizacja peroksydazy diaminobenzdyną (DAB). Mieszanina 0,05% DAB z 0,02% H₂O₂ przez 15 min w temp. pokojowej,

14. płukanie w wodzie destylowanej 3 × 1 min i 1 × 5 min,
15. odwadnianie w 100% butanolu 3 × 30 s,
16. prześwietlanie w ksylenie 3 × 2 min,
17. zamykanie preparatów balsamem kanadyjskim.

3.10. Ekspresja białek

Przeciwciała

Do oceny ekspresji wybranych białek użyto następujące przeciwciała: anty-p53 klon DO-7, anty-ufosforylowana forma p53 (fosfo-p53 - Ser 392 i Ser 20) anty Bcl-2 klon bcl/100/DS (Novocastra, Newcastle, UK), anty-Bax klon I-19, anty-cytokeratyna 18, klon M30 (M30 CyttoDEATH) (Boehringer Mannheim, Germany), anty-MnSOD (SOD-2 (FL-222): sc-30080. Ekspresję wybranych białek oceniano stosując immunocytochemiczną metodę ABC. MnSOD oceniano jeszcze metodą western blot.

Opis procedury metoda ABC

Komórki hodowano na szkiełkach ośmiodołkowych (Diagnostic Microscope Slides, Erie Scientific Company). Przed utwaleniem preparaty odpłukiwano od zawartej w płynie hodowlanym surowicy w PBS. Preparaty utrwalano w 4% paraformaldehydzie w PBS lub w zimnym acetonie w zależności od rodzaju użytego przeciwciała i protokołu zalecanego przez firmę.

1. płukanie 3 × 3 min w PBS,
2. blokowanie aktywności endogennej peroksydazy 30 min w 1% H₂O₂,
3. płukanie w PBS z 1% Tritonem X-100 3 × 5 min,
4. inkubacja 20 min ze specyficznymi przeciwciałami przez 24 godz. w temp. 4°C,
5. płukanie w PBS z 1% Tritonem X-100 3 × 5 min,
6. inkubacja 20 min z biotynylowanymi przeciwciałami z zestawu LSAB[®]2 (DACO),
7. płukanie w PBS z 1% Tritonem X-100 3 × 5 min,
8. inkubacja 20 min ze streptawidyną połączoną z peroksydazą chrzanową z zestawu LSAB[®]2 (DACO),
9. płukanie w PBS z 1% Tritonem X-100 3 × 5 min,

10. wizualizacja peroksydazy diaminobenzzydynam (DAB, Sigma),
11. płukanie w wodzie destylowanej 10 min,
12. odwadnianie we wzrastającym szeregu alkoholowym,
13. prześwietlanie w ksylenie 3×5 min,
14. zamykanie preparatów syntetycznym medium do zamykania szkiełek podstawowych (DPX, Archem).

Ocena ekspresji białek

Reakcje immunocytochemiczną oceniano dwoma niezależnymi metodami półilościowymi z użyciem mikroskopu Olympus BX51. Liczono procent komórek z pozytywną reakcją w przypadkowo wybranym obszarze, biorąc pod uwagę od 100-300 komórek. Intensywność reakcji immunocytochemicznej oceniano wg ustalonych parametrów:

- - brak zabarwienia
- + - słabe zabarwienie
- ++ - średnie zabarwienie
- +++ - silne zabarwienie

Western Blot

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Elektroforezę prowadzono wg Laemmli (Laemmli, 1970) w 10% żelu rozdzielającym i 4,5% żelu zagęszczającym w 0,1% SDS, używając aparatu do elektroforezy Minigel Twin (Biometria). Próbki białek zawieszano w buforze do rozcieńczania próbek (20 mM Tris-HCl pH 6,8 z 1 mM MgSO₄, dodawano bufor redukujący (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 zawierający 20% glicerol, 1% SDS, 0.005% błękit bromofenolowy, 10% β-merkaptotanol) w stosunku 1:5, po czym ogrzewano przez 5 min w 100°C. Tak przygotowane próbki rozdzielano przez 1 godz. przy napięciu 200 V. Rozdzielone w żelu białka barwiono 0,025% Coomassie Brilliant Blue R-250 w 25% metanolu i 10% lodowego kwasu octowego) przez 30 min. W celu uwidocznienia prążków białkowych żel odbarwiano w mieszaninie 7,5% kwasu octowego i 5% metanolu.

Test immunoblotingu

Po rozdziale w żelu poliakrylamidowym białka przenoszono na błonę Immobilon P. Transfer prowadzono w buforze do transferu (10 mM Tris-HCl pH 8,3 zawierającym 150 mM glicynę i 20% metanol)

przez 60 min, przy natężeniu 100 mA. Po transferze, membranę płukano 3-krotnie wodą w celu usunięcia śladów buforu i barwiono w 0,005% Ponceau S w 3% kwasie trójchlorooctowym, aby ocenić jakość rozdziału białek i wydajność ich przenoszenia na membranę. Tło odpłukiwano wodą dejonizowaną. Błony z przeniesionymi białkami inkubowano w temp. 37°C w ciągu 1 godz. z poliklonalnymi króliczymi przeciwciałami MnSOD (SOD-2 (FL-222): Sc 30080 (Santa Cruz) w TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,0 z 50 mM NaCl, 0,05% Tween-20) zawierającym 1% BSA. Po odpłukaniu TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,0 z 50 mM NaCl) niezwiązanych przeciwciał, błonę inkubowano w temp. 37°C przez 1 godz. ze sprzężonymi z peroksydazą poliklonalnymi przeciwciałami kozimi anti-IgG królicze, rozcieńczonymi w TBS-T 1:5000. Po odpłukaniu nadmiaru przeciwciał buforem TBS, wywoływano reakcję barwną substratem dla peroksydazy (12 mg 4-chloro-1-naftolu rozpuszczonego w mieszaninie 4 ml metanolu, 20 µl H₂O₂, 20 ml TBS).

Tabela 3.1. Kryteria oceny komet według metody Collinsa [Collins 2002]

Kategoria	Cechy			
	Rozmiar głowy komety	Rozmiar ogona komety	Intensywność świecenia głowy	Intensywność świecenia ogona
0	normalny rozmiar jądra	brak	100%	brak
1	j.w.	mniejszy niż normalny rozmiar jądra	> 75%	< 25%
2	j.w.	1–2 wielkości normalnego rozmiaru jądra	50–75%	25–50%
3	większy niż połowa normalnego rozmiaru jądra	2–3 wielkości normalnego rozmiaru jądra	25–50%	50–70%
4	mniejszy niż połowa normalnego rozmiaru jądra	> 3 wielkości normalnego rozmiaru jądra	< 25%	> 75%

4. WYNIKI

4.1. Umieszczenie fotouczulacza

Wewnątrzkomórkową lokalizację Photofrinu w komórkach nowotworowych OvBH-1 i MCF-7 po 4 godz. inkubacji przedstawiono na (ryc. 4.1 i 4.2). Dystrybucja Ph w komórkach była zróżnicowana i zależna od czasu inkubacji z fotouczulaczem w obu liniach komórkowych. Po 1 godz. inkubacji Ph lokalizował się w pobliżu błony komórkowej. Po 3 godz. inkubacji fotouczulacz był rozmieszczony równomiernie w całej cytoplazmie. Maksymalną koncentrację Ph obserwowano po 4 godz. inkubacji, a najbardziej intensywny sygnał był widoczny wokół otoczki jądrowej. (ryc. 4.1).

4.1.2. Kolokalizacja fotouczulacza z mitochondrium

W komórkach OvBH-1 photofrin lokalizował się w mitochondriach (ryc. 4.2.C). Obserwowano większą akumulację barwnika w mitochondrium komórek raka jasnokomórkowego jajnika. W komórkach MCF-7 kolokalizacja Ph z mitochondrium była śladowa (ryc. 4.3.C).

4.1.3. Kolokalizacja z retikulum endoplazmatycznym (ER)

Photofrin w komórkach OvBH-1 wykazywał niewielką kolokalizację z ER w porównaniu do komórek MCF-7, w których wyraźnie widać, że fotouczulacz akumuluje się w ER (ryc. 4.4.C, 4.5.C).

4.2. Morfologia komórek

Komórki OvBH-1 i MCF-7 analizowano morfologicznie przed i po przeprowadzonych doświadczeniach. Już po 3 godz. klasycznej Ph-PDT w około 20% komórek OvBH-1 obserwowano wyraźne zmiany morfologiczne przejawiające się wakuolizacją. Po klasycznej PDT liczba

komórek z licznymi wakuolami w cytoplazmie wzrasta po 6 godz. do 60%. Zmiany morfologiczne przejawiają się także w zróżnicowanej liczbie i kształcie jąder komórkowych. Nie są to jednak zmiany charakterystyczne dla komórek apoptotycznych, podczas gdy w komórkach MCF-7 3 godz. po naświetlaniu widoczne są zmiany morfologiczne charakterystyczne dla komórek apoptotycznych, takie jak obkurczenie komórek, kondensacja chromatyny i ciała apoptotyczne. Po 3 i 6 godz. zastosowania procedury zmodyfikowanej 2-Me zarówno w komórkach OvBH-1, jak i MCF-7 obserwowano zmiany morfologiczne komórek charakterystyczne dla apoptozy (tab. 4.1, ryc. 4.6, 4.8). Więcej komórek apoptotycznych było w obrazie mikroskopowym komórek OvBH-1 w porównaniu z komórkami MCF-7.

Największy procent komórek apoptotycznych był 6 godz. po naświetlaniu w komórkach OvBH-1 (30-60%), w komórkach MCF-7 procent komórek apoptotycznych po tym samym czasie wynosił 30%. Bezpośrednio po zastosowaniu Ph-2Me-PDT nie obserwowano komórek apoptotycznych, podobnie jak w preparatach kontrolnych (komórki nietraktowane, komórki inkubowane tylko z Ph i komórki inkubowane tylko z 2-Me (ryc. 4.7, 4.9).

4.3. Przeżywalność komórek

Przeżywalność komórek OvBH-1 i MCF-7 była mierzona testem MTT 24 i 48 godz. po zastosowanych procedurach klasycznych i modyfikowanych 2-metoksyestradiolem. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli, którą stanowiły komórki niepoddane żadnemu działaniu. Jako kontrole oceniono przeżywalność komórek inkubowanych tylko z Ph (20 µg/ml) bez naświetlania i tylko z 2-Me (50 µM).

Dla obu zastosowanych reakcji fotodynamicznych indeks cytotoksyczności 50% (IC₅₀) wynosił mniej niż 50% zarówno dla komórek OvBH-1 i MCF-7. (wykr. 4.1; 4.2)

W komórkach OvBH-1 poddanych Ph-PDT spadek przeżywalności po 24 i 48 godz. był na podobnym poziomie i wynosił odpowiednio 21,78±9,34 i 20,02± (p=0,007096). W komórkach tych po zastosowaniu Ph-PDT-2-Me zaobserwowano znaczące obniżenie przeżywalności do 11,22±6,51% po 24 godz. i 3,34±0,836% po 48 godz. (p=0,027048). Inkubacja komórek OvBH-1 z samym fotouczulaczem (20 µg) bez na-

światlania nie wpłynęła na przeżywalność komórek po 24 i 48 godz. Komórki OvBH-1 inkubowane tylko z 2-Me (50 μ M) miały IC_{50} powyżej 50% dla obu czasów (wykr. 4.1). Komórki MCF-7 wykazały większą wrażliwość na zastosowane procedury fotodynamiczne klasyczne i modyfikowane w porównaniu do komórek OvBH-1. Największy spadek przeżywalności bo ok. 13% obserwowano po 48 godz. w komórkach MCF-7 po zastosowaniu zmodyfikowanych 2-Me badań fotodynamicznych ($p=0,011789$) (wykr. 4.2).

4.4. Peroksydacja lipidów

Miarą stopnia peroksydacji lipidów było stężenie MDA. Z przeprowadzonych badań wynika, że w obu zastosowanych badaniach fotodynamicznych stężenie MDA znacząco wzrasta zarówno w komórkach OvBH-1, jak i MCF-7 (wykr. 4.3, 4.4). W komórkach OvBH-1 największy wzrost w doświadczeniach obserwowano z Ph-2-Me-PDT, po 3 i 6 godz. po naświetlaniu. Wynosił on odpowiednio 0,64 μ mol/l i 0,91 μ mol/l (gdzie $p=0,000167$ i $p=0,000012$) (wykr. 4.3). Po standardowej procedurze fotodynamicznej stopień utlenienia lipidów wzrasta bezpośrednio po reakcji fotodynamicznej (0,56 μ mol/l, $p=0,000582$) i po 6 godz. (0,55 μ mol/l, $p=0,000635$). Najniższy był po 3 godz. (0,49 μ mol/l, $p=0,001736$) podobnie, jak bezpośrednio po reakcji z 2-Me (0,52 μ mol/l, $p=0,001072$) (wykr. 4.3). W komórkach MCF-7 największy wzrost peroksydacji lipidów odnotowano 3 godz. po klasycznej reakcji fotodynamicznej i podobnie po modyfikowanej 2-Me (wykr. 4.4). Uzyskano statystycznie istotny wzrost peroksydacji lipidów we wszystkich doświadczeniach o różnym czasie naświetlenia, czasie inkubacji z fotouczulaczem, różnych dawkach fotouczulacza.

4.5. Uszkodzenie białek

Uszkodzenie białek badano określając stężenie grup karbonylowych oraz stopień utlenienia grup tiolowych.

Stężenie grup tiolowych

Degradację grup tiolowych obserwowano we wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach zarówno w linii OvBH-1 i MCF-7 w porównaniu do komórek kontrolnych (wykr. 4.5, 4.6). Najwyższy stopień utlenienia grup -SH białek błonowych i cytoplazmatycznych zaobserwowano w linii OvBH-1 po 3 godz. inkubacji po Ph-PDT (8,74 nmol/l, $p=0,00998$) i Ph-2-Me-PDT (15,27 nmol/l, $p=0,006897$), a w linii MCF-7 po 3 godz. inkubacji po Ph-PDT (6,54 nmol/l, $p=0,000646$) i po 6 godz. inkubacji po Ph-2-Me-PDT (3,68 nmol/l, $p=0,000392$). Najniższy spadek stężenia grup -SH wykazały komórki OvBH-1 bezpośrednio po Ph-PDT (31,46 nmol/l, $p=0,040384$) i 6 godz. inkubacji po zastosowaniu procedury fotodynamicznej modyfikowanej 2-Me (31,73 nmol/l, 0,021576) (wykr. 4.5). Komórki MCF-7 najniższe stężenie grup tiolowych wykazywały natomiast bezpośrednio po procedurach fotodynamicznych klasycznych (11,33 nmol/l, $p=0,001889$) oraz modyfikowanych (15,84 nmol/l, $p=0,007629$). Po 6 godz. inkubacji po Ph-PDT i Ph-2-Me-PDT w komórkach OvBH-1 stężenie grup tiolowych wynosiło odpowiednio 23,71 nmol/l i 31,73 nmol/l (gdzie $p=0,021576$ i $p=0,02245$) (wykr. 4.6) Badania statystyczne wykazały istotne statystycznie obniżenie stężenia grup -SH we wszystkich przeprowadzonych eksperymentach i były istotne statystycznie dla obu linii komórkowych.

Stężenie grup karbonylowych

Wzrost stężenia grup karbonylowych po klasycznej reakcji fotodynamicznej w porównaniu do komórek kontrolnych obserwowano w komórkach obu linii (wykr. 4.7;4.8). W komórkach OvBH-1 podwyższenie stężenia grup karbonylowych było podobne we wszystkich stosowanych warunkach doświadczenia Najwyższy jednak wzrost stężenia grup karbonylowych komórki OvBH-1 wykazały po 3 godz. inkubacji po Ph-2Me-PDT (52,47 nmol/l, $p=0,035073$). Najniższy wzrost stężenia grup karbonylowych stwierdzono bezpośrednio po procedurach fotodynamicznych niemodyfikowanych (49,43 nmol/l, $p=0,000038$) (wykr. 4.7). Wzrost zawartości grup karbonylowych wykazano także w kontrolnych komórkach OvBH-1 inkubowanych z Ph (44,90 nmol/l) lub z 2-Me (48,96 nmol/l) bez naświetlania gdzie $p=0,027492$. W komórkach MCF-7 najwyższy wzrost stężenia grup karbonylowych obserwowano jedynie po 6 godz. inkubacji przy stosowaniu procedury fotodynamicznej modyfikowanej 2-Me (71,48 nmol/l, $p=0,000037$). Najniższe

stężenie grup karbonylowych było natomiast bezpośrednio po Ph-PDT (57,52 nmol/l, $p=0,000436$) (wykr. 4.8).

4.6. Ocena aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i ekspresji mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej

Aktywność SOD

W badaniach zastosowano 2-metoksyestradiol, który jest naturalnym inhibitorem SOD, dlatego przy oznaczaniu aktywności tego enzymu wybrano dodatkowo jeszcze jedno niższe stężenie tego związku (10 μM), obok stosowanego w doświadczeniach (50 μM). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej była podwyższona w komórkach MCF-7 (wykr. 4.10) w stosunku do komórek kontrolnych bezpośrednio po zastosowaniu standardowej reakcji fotodynamicznej oraz po 3 i 6 godz. inkubacji po naświetleniu. W komórkach OvBh-1 obserwowano podobną aktywność SOD, jak w komórkach kontrolnych (wykr. 4.9). Najwyższy wzrost aktywności SOD obserwowano 3 godz. po naświetlaniu w komórkach OvBH-1 (3,55 U/mg białka, $p=0,002097$) oraz w MCF-7 – (4,77 U/mg białka, $p=0,003298$) (wykr. 4.9, 4.10). Po zastosowaniu procedur fotodynamicznych modyfikowanych 2-Me w komórkach MCF-7 stężenie aktywności SOD bezpośrednio i 3 godz. po naświetlaniu spadło i utrzymywało się na poziomie wartości kontrolnych lub niewiele poniżej tych wartości (wykr. 4.10). W komórkach OvBH-1 aktywność SOD bezpośrednio po naświetleniu wzrosła przy zastosowaniu stężenia 10 μM 2-Me, natomiast przy stężeniu 50 μM obserwowano obniżoną aktywność tego enzymu. Najniższą aktywność SOD wykazywały komórki obu linii po 6 godz. inkubacji po Ph-PDT-2-Me w przypadku obu zastosowanych stężeń. Wynosiła ona odpowiednio dla linii OvBH-1-2, 78 U/mg białka przy stężenia 10 μM i 0, 39 U/mg białka przy stężeniu 50 μM . Podobnie w komórkach MCF-7 przy stężeniu 10 μM aktywność SOD przyjęła wartość 2,78U/mg ($p=0,0055$), a przy stężeniu 50 μM 2,79 U/mg białka ($p=0,007866$) (wykr. 4.9, 4.10).

Ekspresja mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej

Immunocytochemiczna metoda ABC

Obie linie komórkowe wykazywały zróżnicowaną ekspresję MnSOD w zastosowanych parametrach doświadczenia. W komórkach

kontrolnych OvBH-1 i MCF-7, które nie zostały poddane procedurom fotodynamicznym procent komórek pozytywnie zabarwionych wynosił odpowiednio 15 i 8 (tab. 4.2, 4.3) po zastosowaniu Ph-PDT. Ekspresja dysmutazy manganowej była zróżnicowana w obu liniach komórkowych i zależna od zastosowanych warunków doświadczeń. W komórkach OvBH-1 obserwowano znaczny wzrost ekspresji MnSOD już bezpośrednio po Ph-PDT (tab. 4.2). Procent komórek pozytywnie zabarwiony wzrastał odpowiednio do czasu inkubacji po naświetlaniu. Po 6 godz. wynosił 99,2 (tab. 4.2). Po zastosowaniu procedur fotodynamicznych modyfikowanych 2-Me ekspresja MnSOD w komórkach OvBH-1 była niższa, ale również procent komórek pozytywnie zabarwionych wzrastał wraz z czasem inkubacji po naświetlaniu. Najwyższą ekspresję tego enzymu zanotowano 3 godz. po naświetlaniu (tab. 4.2, ryc. 4.10). W komórkach MCF-7 ekspresja MnSOD była niższa zarówno po zastosowaniu Ph-PDT i Ph-Me-PDT w porównaniu do komórek OvBH-1. Największa ekspresja MnSOD była 6 godz. po naświetlaniu przy Ph-PDT (41%) (tab. 4.3, ryc. 4.11).

Western blot

Analiza ekspresji MnSOD metodą western blot wykazała najwyższy poziom ekspresji mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach kontrolnych w obu liniach komórkowych. W komórkach OvBH-1 poziom ekspresji MnSOD był najwyższy 6 godz. po Ph-PDT (ryc. 4.12). Po Ph-2-Me-PDT zanotowano znaczący spadek ekspresji tego białka po 3 godz. (ryc. 4.13). W komórkach MCF-7 ekspresja MnSOD była na podobnym poziomie po wszystkich czasach po Ph-PDT, natomiast po Ph-2-Me-PDT była wyraźnie niższa (ryc. 4.14, 4.15).

4.7. Śmierć komórek nowotworowych

Alkaliczna metoda kometowa

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń umieszczono na wykresach (wykr. 4.11-14). Po zastosowaniu standardowych procedur fotodynamicznych komórki OvBH-1 w przeciwieństwie do komórek MCF-7 umierały na drodze nekrozy, w liczbie od 75-95.4% w zależności od czasu inkubacji po naświetlaniu. Procent komórek apoptotycznych w przypadku linii komórkowej OvBH-1 był niewielki, 6,8–7,7% (wykr.

4.11). Komórki MCF-7 umierały natomiast głównie na drodze apoptozy. Procent komórek apoptotycznych był największy 3 godz. po naświetlaniu i wynosił 92,5% (wykr. 4.13).

Po zastosowaniu procedur fotodynamicznych modyfikowanych 2-Me komórki OvBH-1 umierały przede wszystkim na drodze apoptozy. Największy procent komórek apoptotycznych zaobserwowano 6 godz. po naświetlaniu (98,5%), a najniższy bezpośrednio po naświetlaniu (70%) (wykr. 4.12). W komórkach MCF-7 obserwowano wzrost liczby komórek apoptotycznych 3 godz. po zastosowaniu Ph-2Me-PDT (75,81%). Po 6 godz. najwięcej komórek wykazywało formę uszkodzenia pośredniego (wykr. 4.14).

Neutralna metoda kometowa

Metoda kometowa, przeprowadzona w neutralnych warunkach, daje możliwość wykazania tylko podwójnych pęknięć łańcucha DNA, charakterystycznych dla fragmentacji materiału genetycznego zachodzącego podczas apoptozy [231]. W metodzie alkalicznej następuje denaturacja i separacja nici podwójnej helisy DNA podczas rozwijania DNA, natomiast podczas rozwijania DNA w elektroforezie metodą neutralną nie następuje denaturacja DNA. Pęknięcia pojedynczej nici DNA, obserwowane jako komety w metodzie alkalicznej, podczas neutralnej elektroforezy nie dają obrazu komety, ponieważ każda uszkodzona nić jest wciąż zasocjowana z nieuszkodzoną i są oceniane jako komety kategorii 0. Komórki mające uszkodzenia apoptotyczne dają po elektroforezie neutralnej obraz komety zaliczanej do kategorii 3 i 4. W przedstawionej pracy zastosowano uproszczoną ocenę, łącząc kategorie 1 i 2, przedstawiające DNA komórek o uszkodzeniach pośrednich, oraz typy 3 i 4, przedstawiające fragmentacje genomu w komórkach apoptotycznych. Jądra natomiast kategorii 0 pochodzą zarówno od komórek nieuszkodzonych, jak również od komórek nekrotycznych, w których nastąpiło przypadkowe, jednoniciowe cięcie genomu [231, 319]. Wyniki neutralnej metody kometowej umieszczono na wykresach (wykr. 4.15-18). W komórkach OvBH-1 obserwowano największy procent komórek o uszkodzeniu pośrednim po 3 i 6 godz. Wynosił on odpowiednio 70 i 77,3%. Najwięcej komórek apoptotycznych było 3 godz. po zastosowaniu Ph-PDT (wykr. 4.15). Komórki MCF-7 umierały głównie na drodze apoptozy. Największy procent komórek apoptotycznych obserwowano 3 godz. po zastosowaniu Ph-PDT

(97,5%) (wykr. 4.17). Po zastosowaniu procedur fotodynamicznych modyfikowanych 2-Me w komórkach OvBH-1 obserwowano głównie apoptozę bezpośrednio oraz po 3 i 6 godz. po naświetlaniu. Największy procent komórek apoptotycznych był po 6 godz. i wynosił 98,5% (wykr. 4.16). W komórkach MCF-7 z wykorzystaniem reakcji fotodynamicznych modyfikowanych 2-Me największy procent komórek apoptotycznych był 3 godz. po naświetlaniu. Stosunkowo duży procent komórek apoptotycznych obserwowano bezpośrednio po naświetlaniu (wykr. 4.18).

Ocena śmierci komórek metodą TUNEL

Analizowano procent pozytywnie zabarwionych jąder komórkowych. Oceniano liczbę wybarwionych jąder. W komórkach kontrolnych OvBH-1 i MCF-7 obserwowano mniej niż 5% pozytywnie wybarwionych (tab. 4.4.A i B). Bezpośrednio po reakcji obserwowano 10% jąder pozytywnie zabarwionych (tab. 4.4.A, ryc. 4.16). Największy procent komórek o pozytywnie wybarwionych jądrach wykazywały komórki OvBH-1 3 godz. po naświetlaniu po zastosowaniu standardowych procedur fotodynamicznych (tab. 4.4.A). Po przeprowadzeniu reakcji Ph-2Me-PDT procent jąder apoptotycznych był natomiast wysoki po 3 i 6 godz. inkubacji po naświetlaniu (tab. 4.4.A, ryc. 4.17, 4.18). Komórki MCF-7 miały największy procent jąder pozytywnie wybarwionych po 6 godz. inkubacji po naświetlaniu (Ph-PDT), bezpośrednio po reakcji procent jąder apoptotycznych wynosił 50 (tab. 4.4.B, ryc. 4.19). Po 3 godz. po naświetlaniu % jąder pozytywnie wybarwionych wynosił 62 (tab. 4.4.B, ryc. 4.20).

Zastosowanie reakcji fotodynamicznych modyfikowanych wpłynęło na wzrost jąder reagujących we wszystkich czasach inkubacji. Najwięcej komórek apoptotycznych było w komórkach raka gruczołu sutkowego 6 godz. po naświetlaniu (tab. 4.4.B, ryc. 4.21).

4.8. Analiza ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych

Wyniki obrazujące ekspresję białka supresorowego p53 i białek pro- i antyapoptotycznych przed i po Ph-PDT oraz Ph-2-Me-PDT przedstawiono w tabelach 4.5.A i B. Białko p53 w komórkach OvBH-1 było zlokalizowane w jądrze i wyrażone na poziomie 90% przed reakcją fo-

todynamiczną i 95% bezpośrednio, 3 i 6 godz. po klasycznej reakcji fotodynamicznej. W komórkach kontrolnych MCF-7 ekspresja białka p53 była na poziomie 0 przed reakcją, a po klasycznej PDT wynosiła odpowiednio 30% bezpośrednio po, 50% po 3 godz. (ryc. 4.22 i 4.23) i 60% po 6 godz. Białko to w komórkach MCF-7 było umiejscowione w cytoplazmie z niewielkim rozproszeniem w jądrze komórkowym. Po klasycznej reakcji fotodynamicznej nie stwierdzono ekspresji ufosforylowanej formy białka p53 w pozycji Ser 20 i 392 (tab. 4.A), natomiast w komórkach OvBH-1 poddanych reakcji fotodynamicznej modyfikowanej 2-Me wzrost ekspresji ufosforylowanej formy białka p53, szczególnie w pozycji Ser 20 nastąpił już natychmiast po zastosowanej procedurze (tab. 4.5.B). Najwyższą ekspresję tej formy p53 odnotowano 3 godz. po Ph-2-Me-PDT (ryc. 4.26) (20-40%). Ufosforylowaną formę białka w pozycji Ser 382 obserwowano 3 i 6 godz. po Ph-2-Me-PDT i w obu przypadkach wynosił on 20% (tab. 4.5.B i ryc. 4.24). W komórkach natomiast MCF-7 wzrost ekspresji ufosforylowanej formy p53 w pozycji Ser 20 był bezpośrednio i 6 godz. po reakcji, a w pozycji Ser 392 6 godz. po Ph-2-Me-PDT i wynosił 30% (tab. 4.5.B i ryc. 4.25). Nie obserwowano znaczących różnic w ekspresji białek Bcl-2 i Bax po wszystkich stosowanych warunkach PDT. Dotyczy to również cytokeratyny C18 jej epitopu M30 (tab. 4.5.B, ryc. 4.28-30).

Umiejscowienie fotouczulacza i znaczników komórkowych

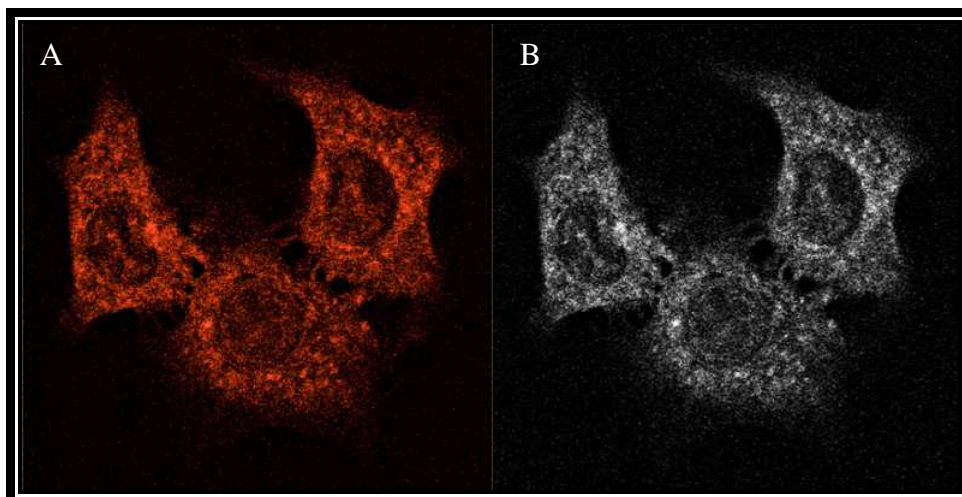


Figura 4.1. Komórki MCF-7: A i B) umiejscowienie Ph

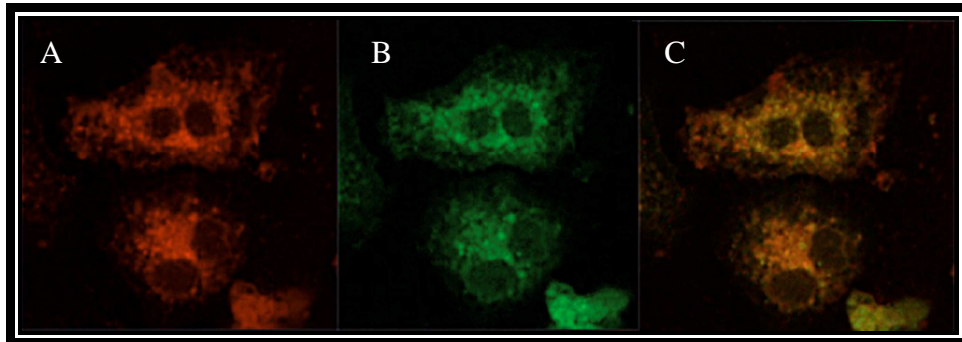


Figura 4.2. Komórki OvBH-1: A) umiejscowienie Ph; B) umiejscowienie Mitotracker Green; C) Kolokalizacja - nałożenie obrazów A i B

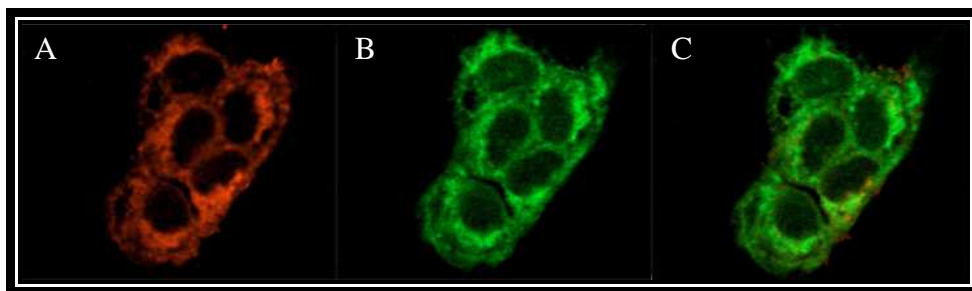


Figura 4.3. Komórki MCF-7: A) umiejscowienie Ph; B) umiejscowienie Mitotracker Green; C) Kolokalizacja - nałożenie obrazów A i B

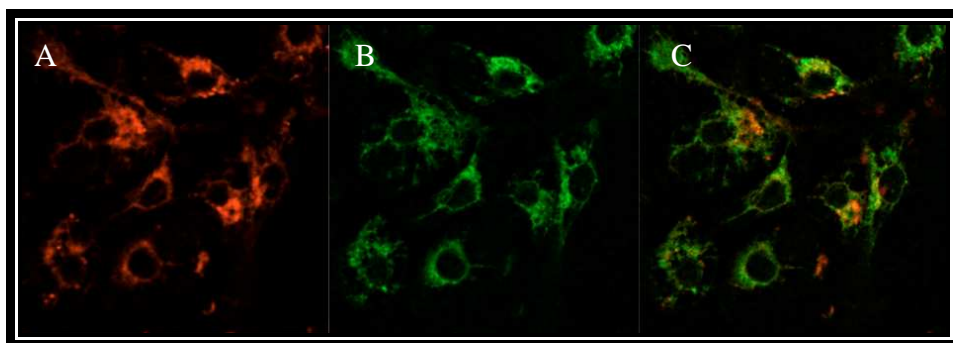


Figura 4.4. Komórki OvBH-1: A) umiejscowienie Ph; B) umiejscowienie retikulum endoplazmatyczne; C) Kolokalizacja - nałożenie obrazów A i B

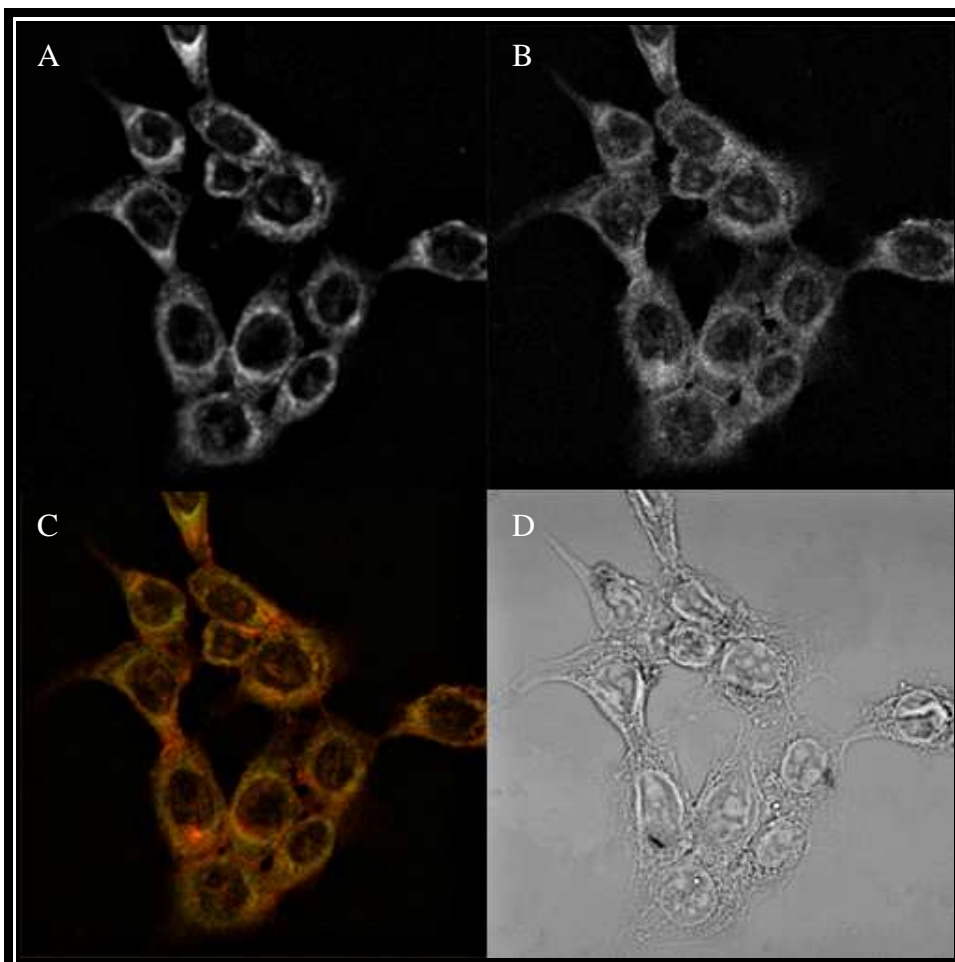


Figura 4.5. Komórki MCF-7: A) umiejscowienie Ph; B) umiejscowienie retikulum endoplazmatyczne; C) Kolokalizacja - nałożenie obrazów A i B; D) obraz komórek w świetle przechodzącym

Morfologia komórek

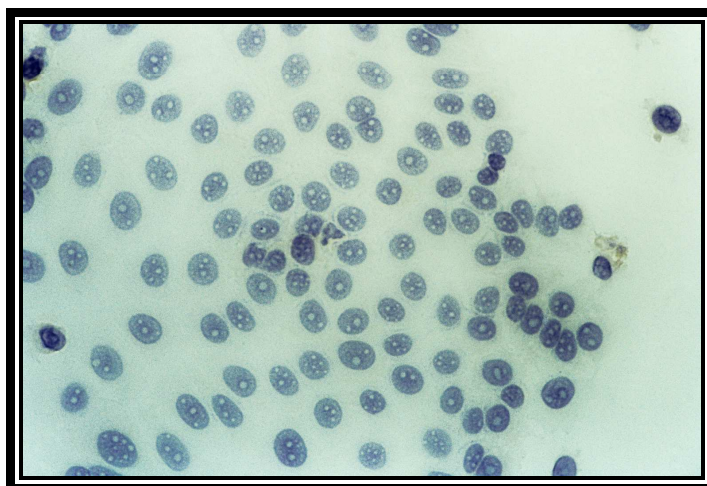


Figura 4.6. Obraz morfologiczny komórek OvBH-1 po Ph-PDT, barwienie H+E, powiększenie 400x

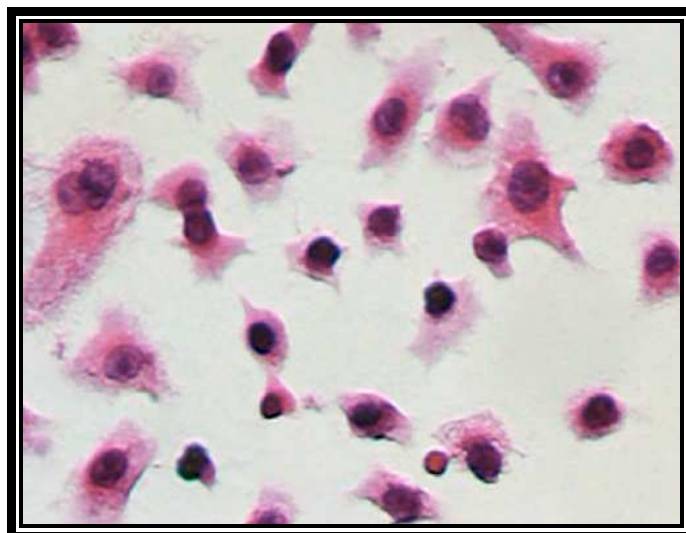


Figura 4.7. Obraz morfologiczny komórek OvBH-1 po Ph-2-Me-PDT, barwienie H+E, powiększenie 400x

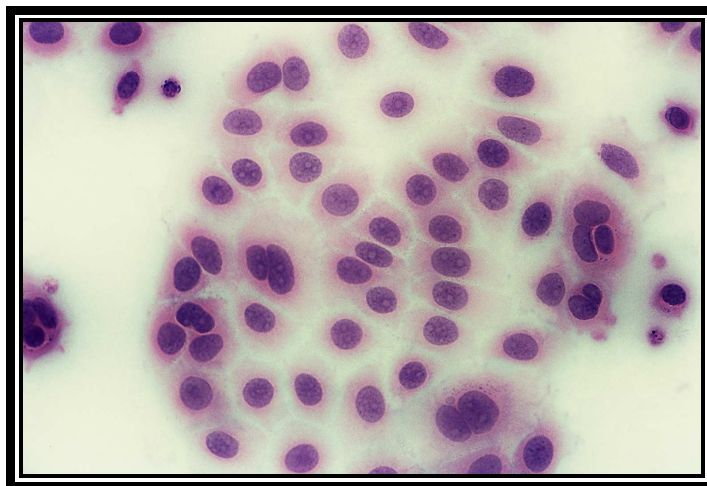


Figura 4.8. Obraz morfologiczny komórek MCF-7 po Ph-PDT, barwienie H+E, powiększenie 400x

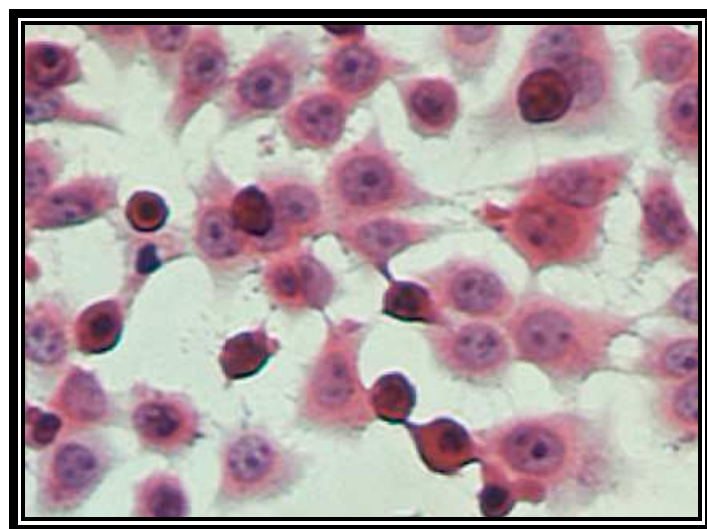


Figura 4.9. Obraz morfologiczny komórek MCF-7 po Ph-2-Me-PDT, barwienie H+E, powiększenie 400x

Immunocytochemia, metoda ABC - ekspresja MnSOD



Figura 4.10. Immunocytochemiczna obecność MnSOD w komórkach OvBH-1, po Ph-2-Me-PDT (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM), 3 godz. po naświetleniu, powiększenie 400 \times

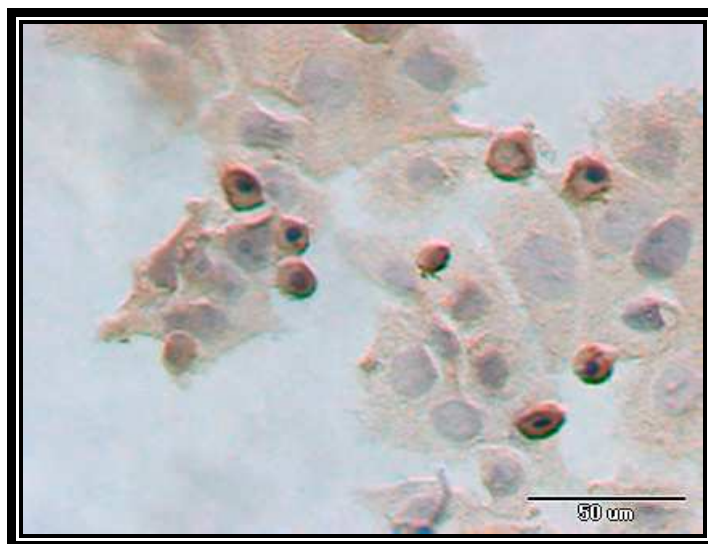


Figura 4.11. Immunocytochemiczna obecność MnSOD w komórkach MCF-7, (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM) 6 godz. po naświetleniu, powiększenie 400 \times

Western blotting – ekspresja białka MnSOD (96kDa)

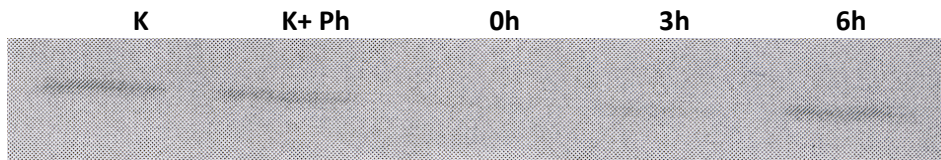


Figura 4.12. Ekspresja MnSOD w komórkach OvBH-1 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph 3 i 6 godz. oraz bezpośrednio po naświetleniu), (K - kontrola; K+Ph - kontrola inkubacja z Ph-20 µg bez naświetlania)

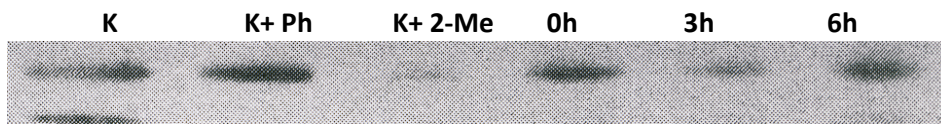


Figura 4.13. Ekspresja MnSOD w komórkach OvBH-1 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph i 2-Me 3 i 6 godz. oraz bezpośrednio po naświetleniu), (K - kontrola; kontrola inkubacja z Ph-20 µg; K+2-Me - kontrola z 2-Me 50 µM)

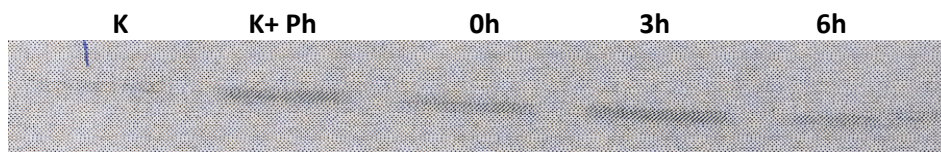


Figura 4.14. Ekspresja MnSOD w komórkach MCF-7 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph 3 i 6 godz. oraz bezpośrednio po naświetleniu), (K - kontrola; K+Ph - kontrola inkubacja z Ph-20 µg bez naświetlania)

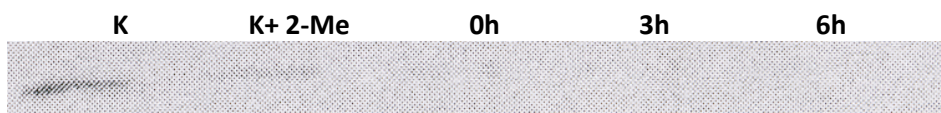


Figura 4.15. Ekspresja MnSOD w komórkach MCF-7 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph i 2-Me 3 i 6 godz. oraz bezpośrednio po naświetleniu), (K - kontrola; kontrola inkubacja z Ph-20 µg; K+2-Me - kontrola z 2-Me 50 µM).

Ocena apoptozy metodą TUNEL



Figura 4.16. Apoptoza w komórkach OvBH1 inkubowanych 18 godz. z Ph-20 μg , bezpośrednio po Ph-PDT, powiększenie 600 \times



Figura 4.17. Apoptoza w komórkach OvBH-1 inkubowanych 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM , 3 godz. po Ph-2-Me-PDT, powiększenie 600 \times



Figura 4.18. Apoptoza w komórkach OvBH-1 inkubowanych 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM , 6 godz. po Ph-2Me-PDT, powiększenie 600 \times



Figura 4.19. Apoptoza w komórkach MCF-7 inkubowanych 18 godz. z Ph-20 μg , bezpośrednio po Ph-PDT, powiększenie 600 \times

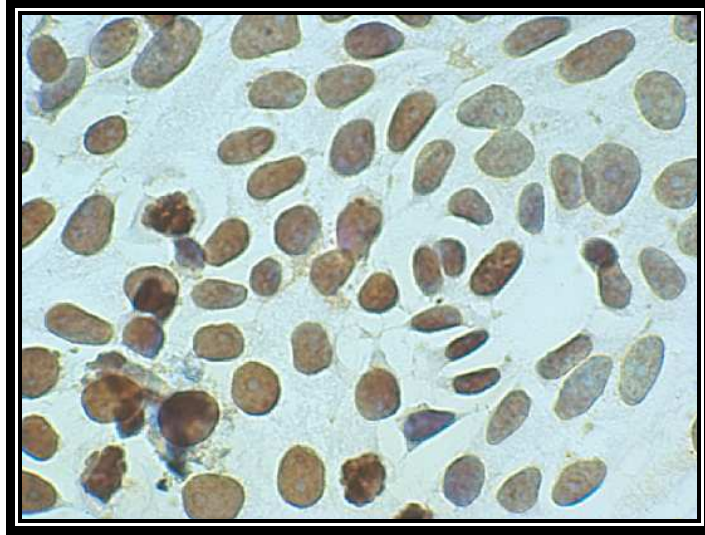


Figura 4.20. Apoptoza w komórkach MCF-7 inkubowanych 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM , 3 godz. po Ph-2-Me-PDT, powiększenie 600 \times

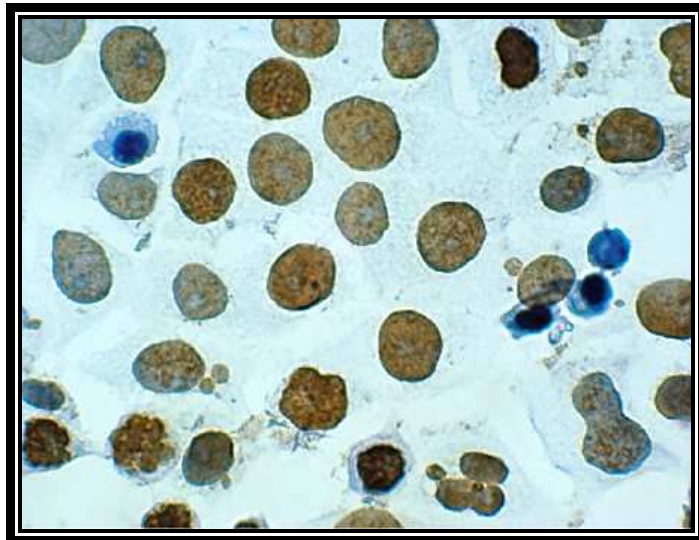


Figura 4.21. Apoptoza w komórkach MCF-7 inkubowanych 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM , 6 godz. po Ph-2-Me-PDT, powiększenie 600 \times

Ekspresja p53 i p53 ufosforylowane w pozycji Ser20 i Ser392

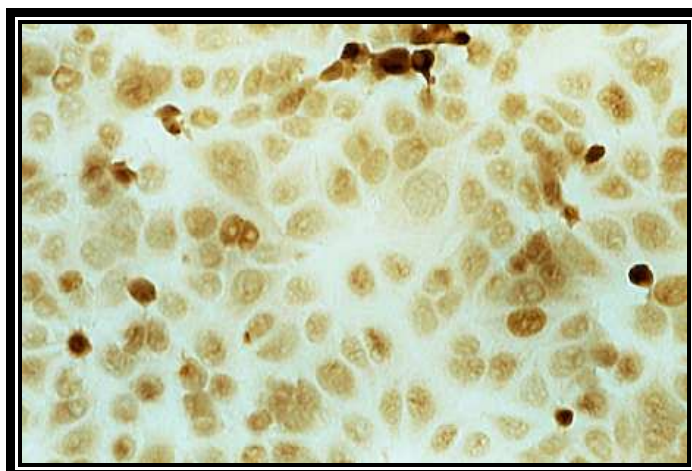


Figura 4.22. Immunocytochemiczna obecność białka p53 w komórkach OVBH-1 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μ g), 3 godz. po Ph-PDT, powiększenie 400x



Figura 4.23. Jądrowo-cytoplazmatyczna obecność białka p53 w komórkach MCF-7 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μ g) 3 godz. po Ph-PDT, powiększenie 400x

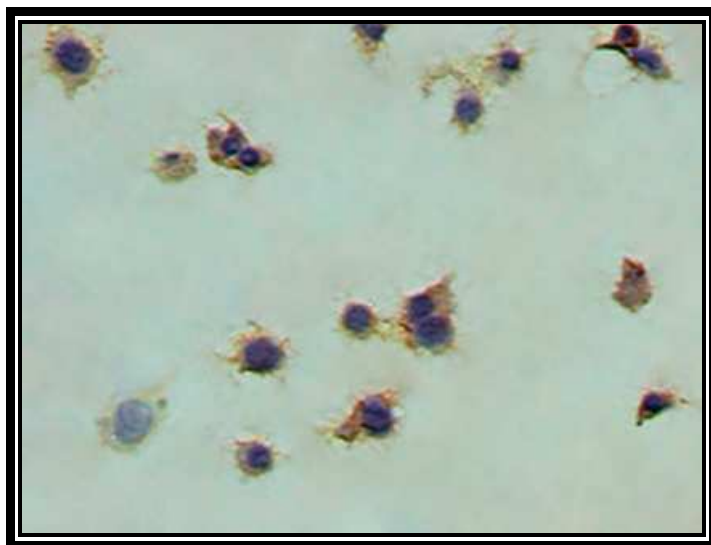


Figura 4.24. Umiejscowienie cytoplazmatyczne białka p53 ufosforylowanego w pozycji Ser 392 w komórkach OvBH-1 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM) 6 godz. po Ph-2-Me-PDT, powiększenie 400 \times

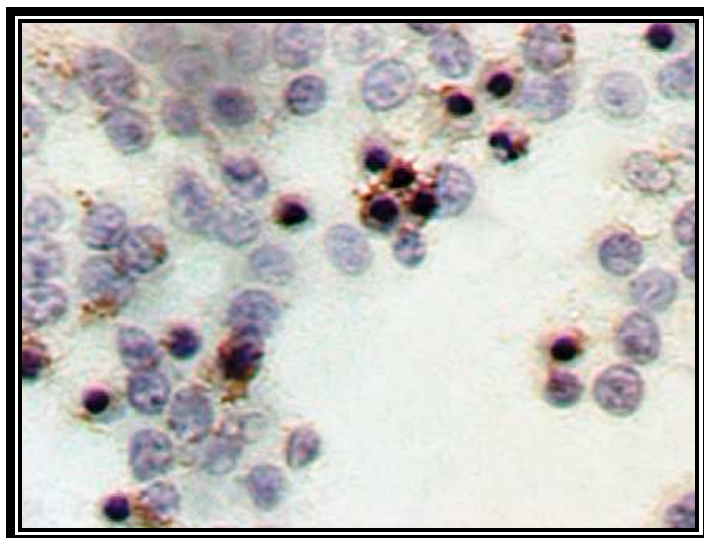


Figura 4.25. Umiejscowienie cytoplazmatyczne białka p53 ufosforylowanego w pozycji Ser 392 w komórkach MCF-7 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM) 6 godz. po Ph-2-Me-PDT, powiększenie 400 \times

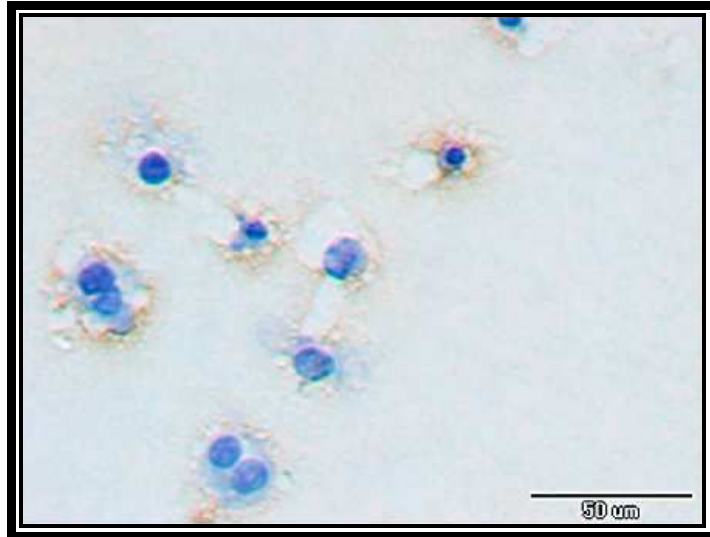


Figura 4.26. Umiejscowienie cytoplazmatyczne białka p53 ufosforylowanego w pozycji Ser 20, w komórkach OvBH-1 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM) 3 godz. po Ph-2-Me-PDT, powiększenie 400 \times

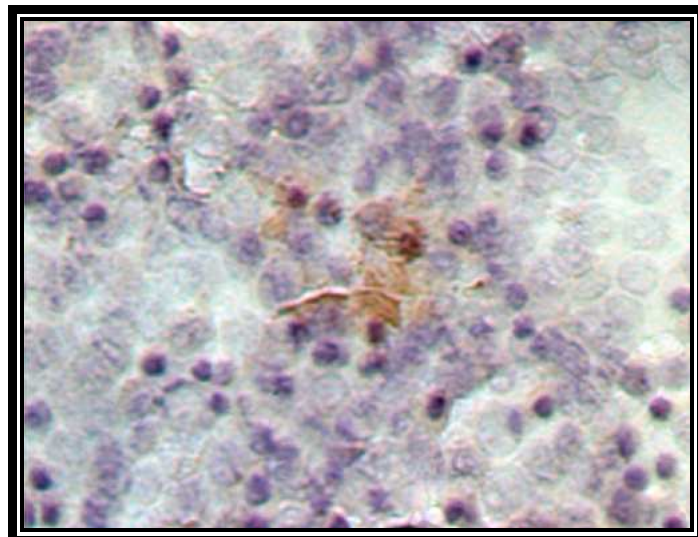


Figura 4.27. Ogniskowe umiejscowienie cytoplazmatyczne białka p53 ufosforylowanego w pozycji Ser 20 w komórkach MCF-7, (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μg i 2-Me-50 μM) 6 godz. po Ph-2-Me-PDT, powiększenie 400 \times

Ekspresja białek pro- i antyapoptotycznych bax i M30



Figura 4.28. Cytoplazmatyczne umiejscowienie białka Bax w komórkach OvBH-1 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. -20 μg i 2-Me-50 μM), 6 godz. po Ph-2-Me-PDT, powiększenie 600x

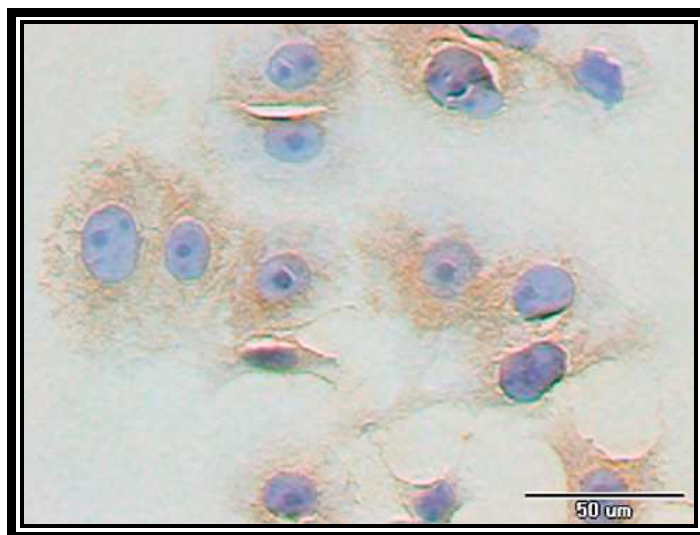


Figura 4.29. Cytoplazmatyczne umiejscowienie białka Bax w komórkach MCF-7 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μg) 6 godz. po Ph-PDT, powiększenie 600x

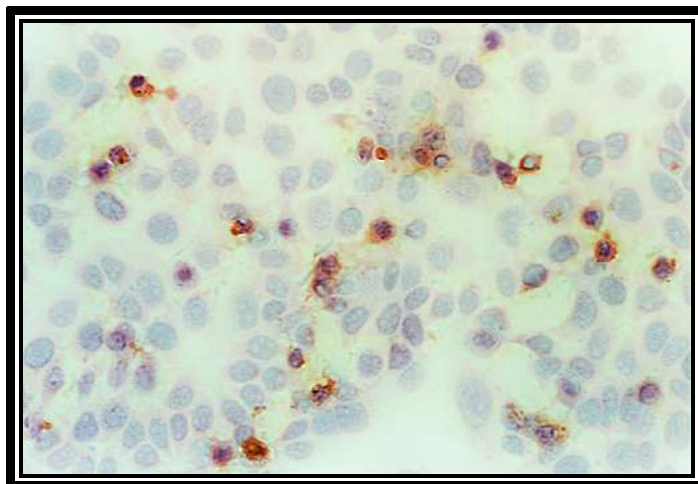
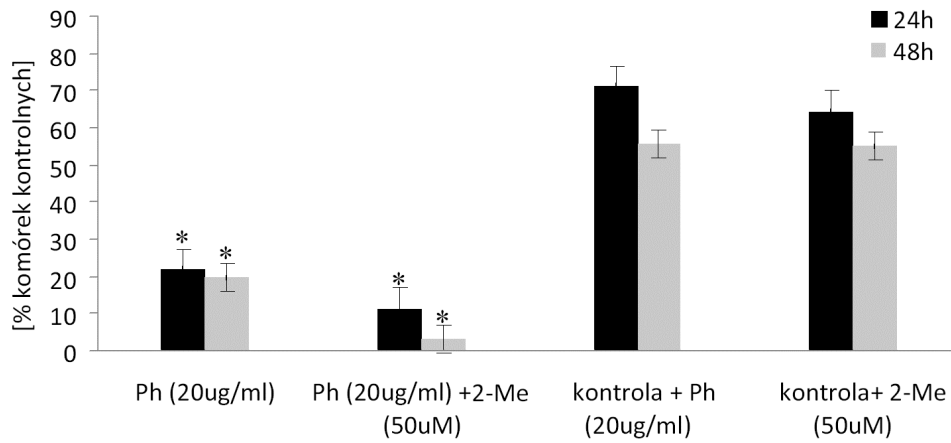
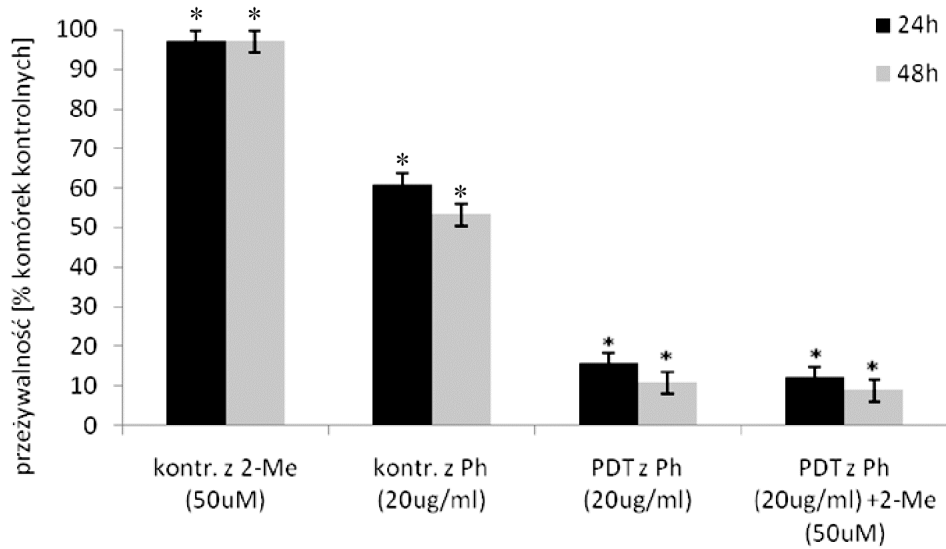


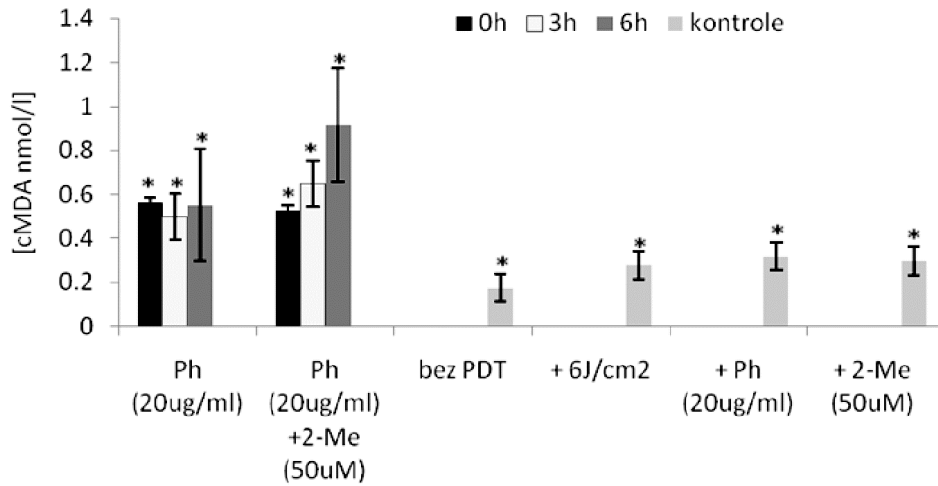
Figura 4.30. Jądrowo-cytoplazmatyczne umiejscowienie białka M30 w komórkach MCF-7 (warunki doświadczenia: inkubacja 18 godz. z Ph-20 μg) 3 godz. po Ph-PDT, powiększenie 400 \times



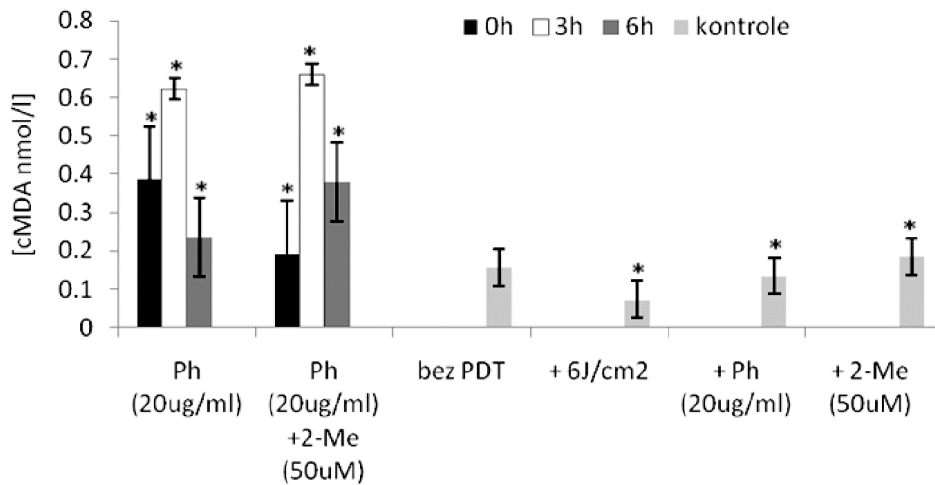
Wykres 4.1. Test cytotoxyczności (MTT) w komórkach OvBH-1 po 24 i 48 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganej 2-metoksyestradiolem



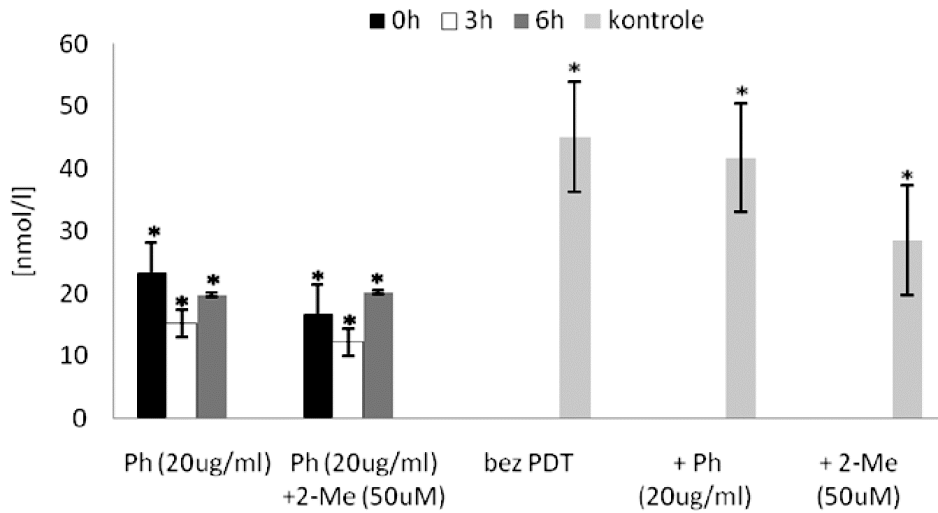
Wykres 4.2. Test cytotoxyczności (MTT) w komórkach MCF-7 24 i 48 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganej 2-metoksyestradiolem



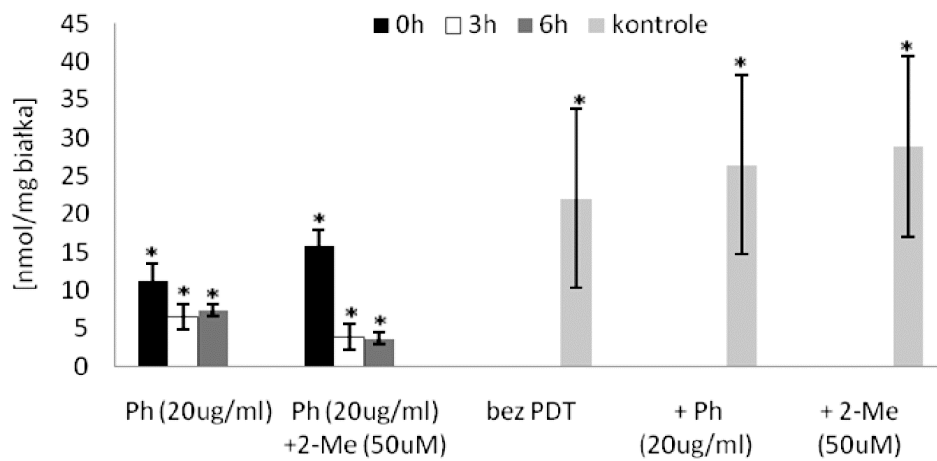
Wykres 4.3. Ocena stężenia produktu peroksydacji lipidów – dwualdehydu malonowego (MDA) w komórkach OvBH-1 bezpośrednio, 3 i 6 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganej 2-metoksyestradiolem



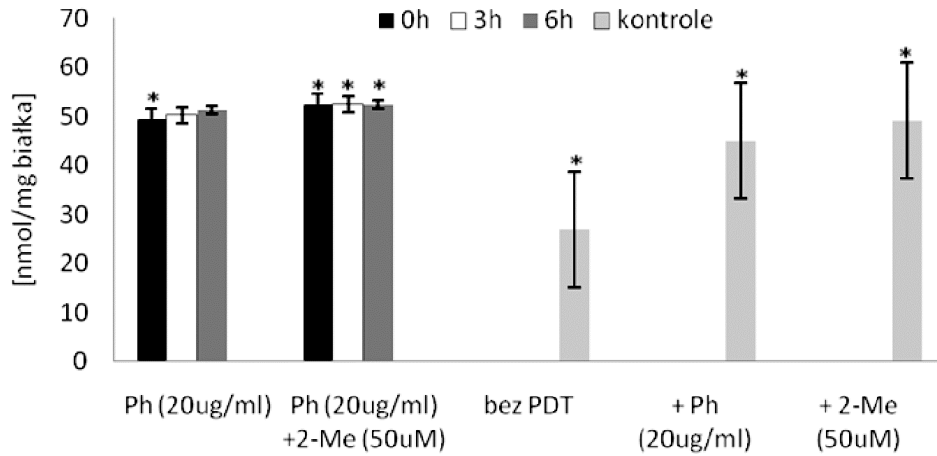
Wykres 4.4. Ocena stężenia produktu peroksydacji lipidów – dwualdehydu malonowego (MDA) w komórkach MCF-7 bezpośrednio, 3 i 6 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganej 2-metoksyestradiolem



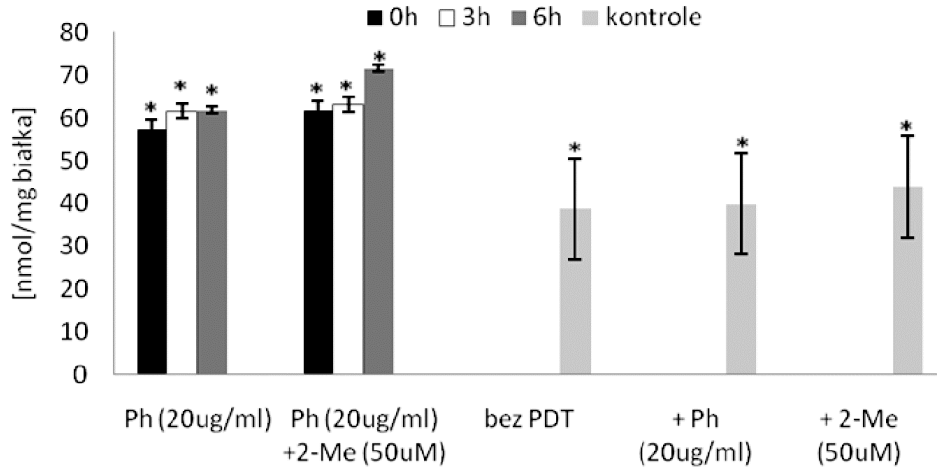
Wykres 4.5. Ocena stężenia grup tiolowych w komórkach OvBH-1 bezpośrednio, 3 i 6 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganej 2-metoksy-estradiolem



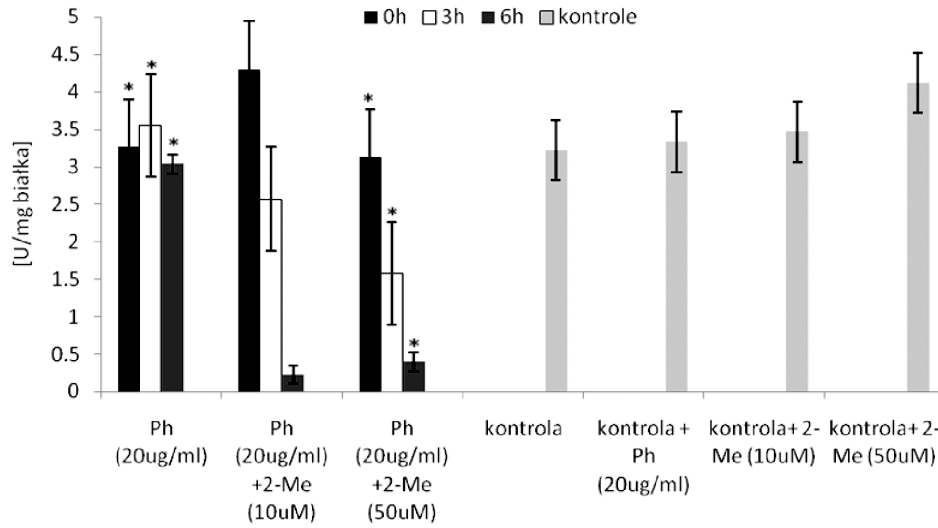
Wykres 4.6. Ocena stężenia grup tiolowych w komórkach MCF-7 bezpośrednio, 3 i 6 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganej 2-metoksy-estradiolem



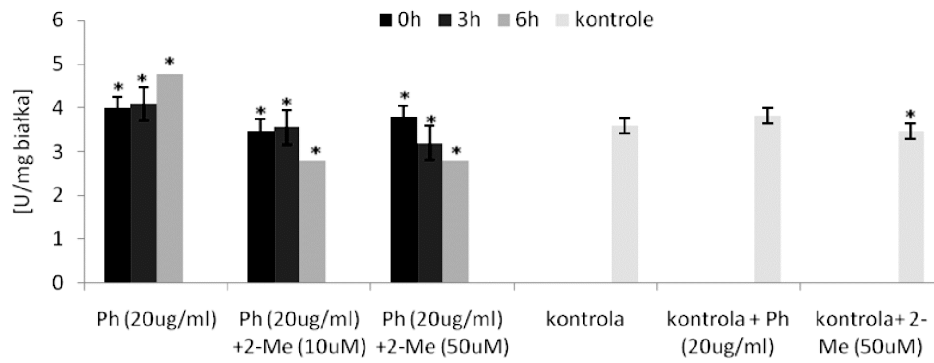
Wykres 4.7. Ocena stężenia grup karbonylowych w komórkach OvBH-1 bezpośrednio, 3 i 6 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganiej 2-metoksyestradiolem



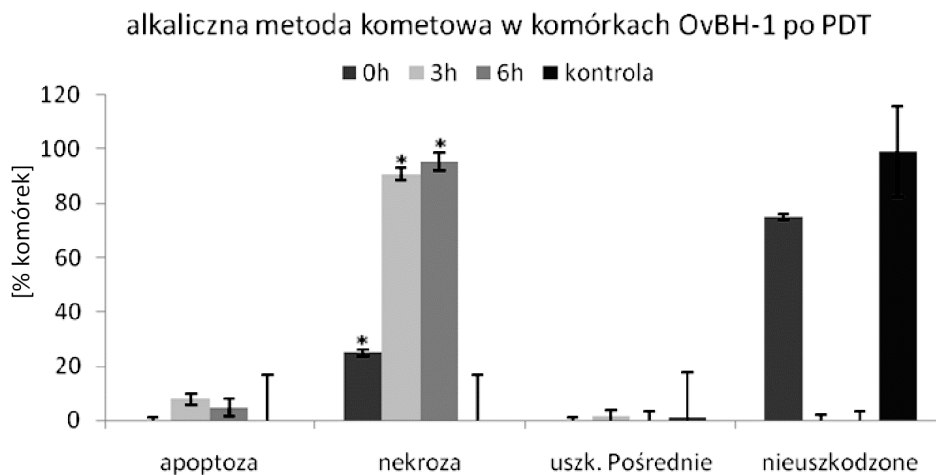
Wykres 4.8. Ocena stężenia grup karbonylowych w komórkach MCF-7 bezpośrednio, 3 i 6 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganiej 2-metoksyestradiolem



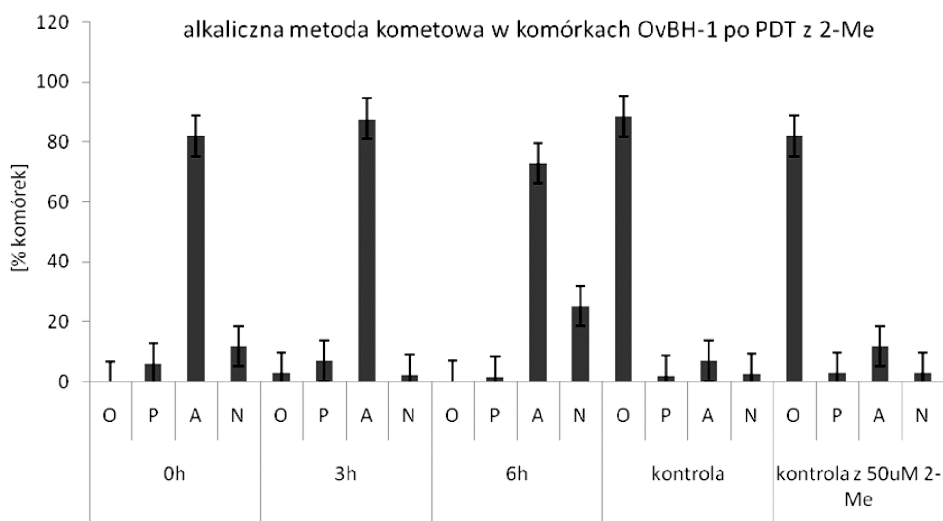
Wykres 4.9. Aktywność SOD w komórkach OvBH-1 bezpośrednio, 3 i 6 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganiej 2-metoksyestradiolem



Wykres 4.10. Aktywność SOD w komórkach MCF-7 bezpośrednio, 3 i 6 godz. po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganiej 2-metoksyestradiolem

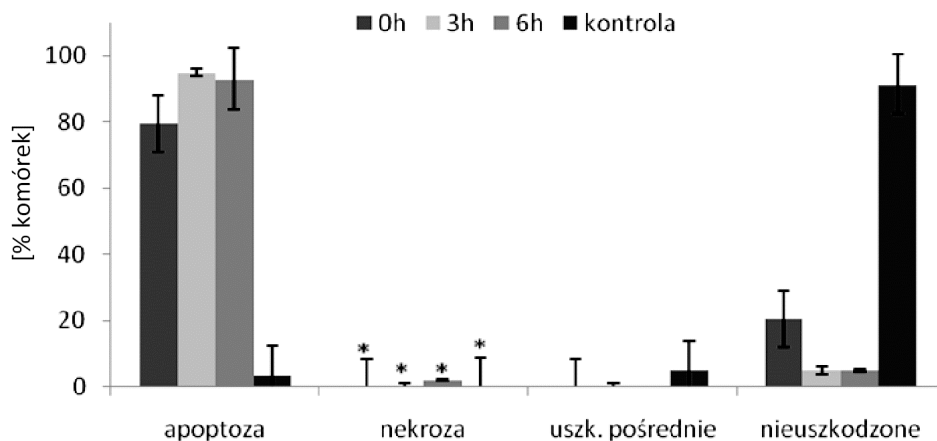


Wykres 4.11. Ocena apoptozy alkaliczną metodą kometową w komórkach OvBH-1 po standardowej reakcji fotodynamicznej



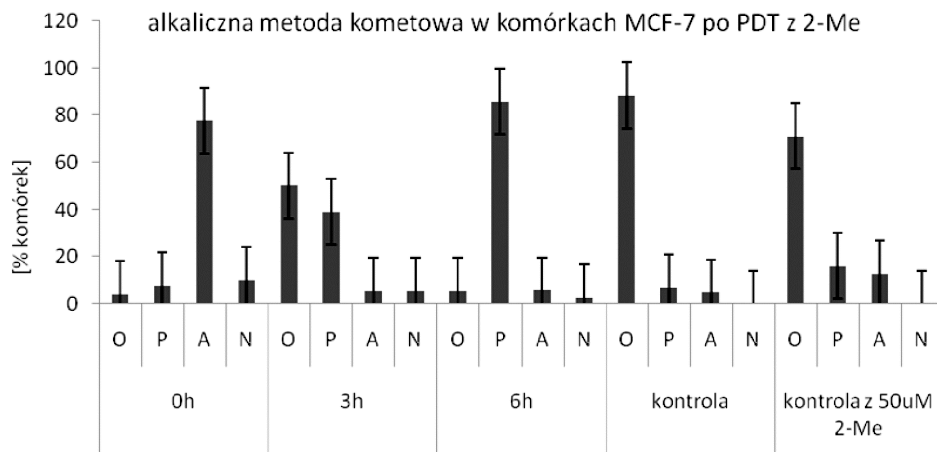
Wykres 4.12. Ocena apoptozy alkaliczną metodą kometową w komórkach OvBH-1 po reakcji fotodynamicznej wspomaganiej 2-metoksyestradiolem (O - nieuszkodzone; P - uszkodzone pośrednie; A - apoptoza; N - nekroza)

alkaliczna metoda kometowa w komórkach MCF-7 po PDT

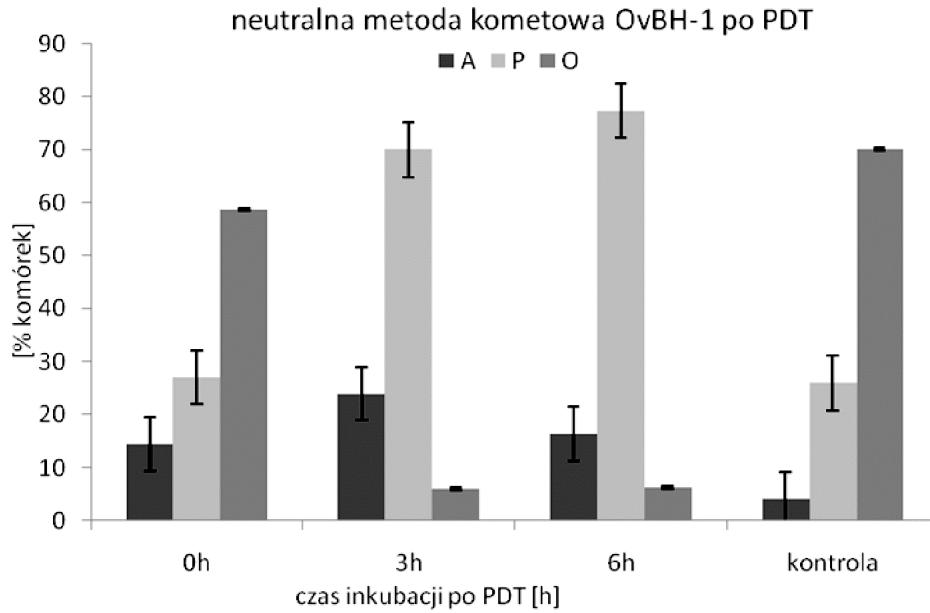


Wykres 4.13. Ocena apoptozy alkaliczną metodą kometową w komórkach MCF-7 po standardowej reakcji fotodynamicznej

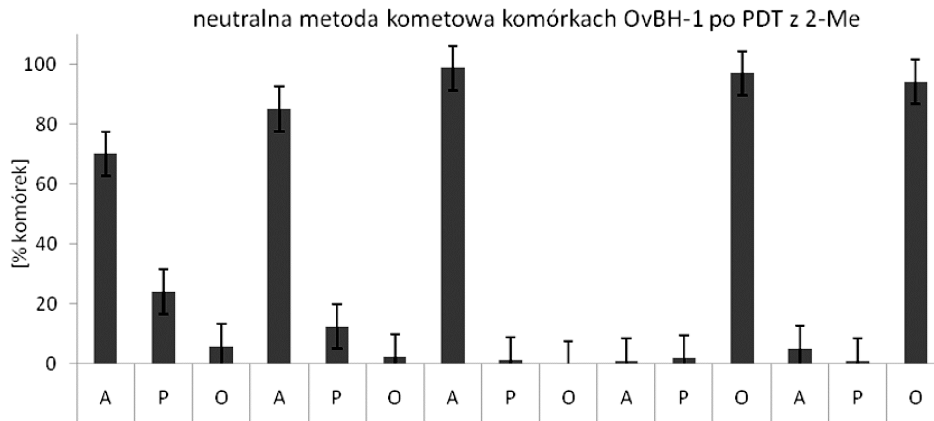
alkaliczna metoda kometowa w komórkach MCF-7 po PDT z 2-Me



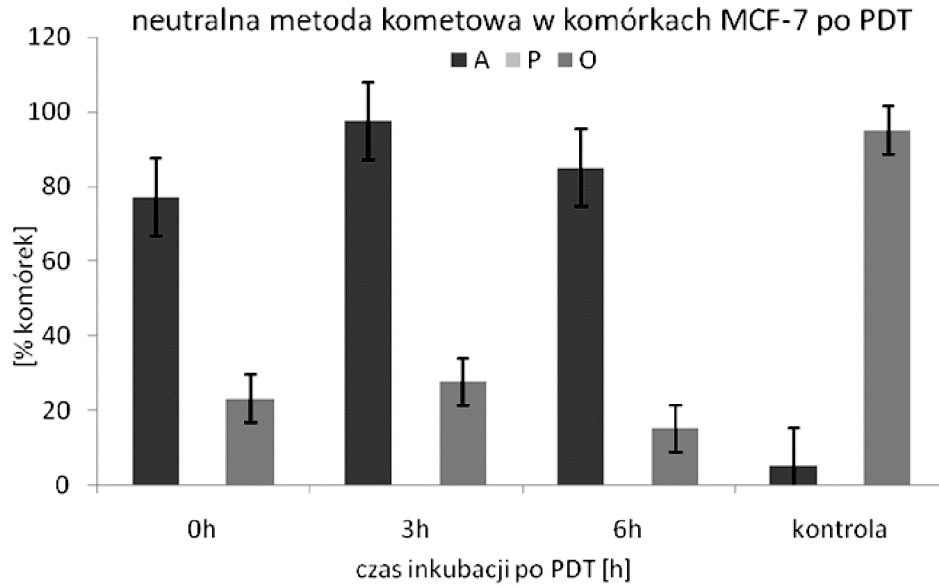
Wykres 4.14. Ocena apoptozy alkaliczną metodą kometową w komórkach MCF-7 po reakcji fotodynamicznej wspomaganiej 2-metoksyestradiolem (O - nieuszkodzone; P - uszkodzone pośrednie; A - apoptoza; N - nekroza)



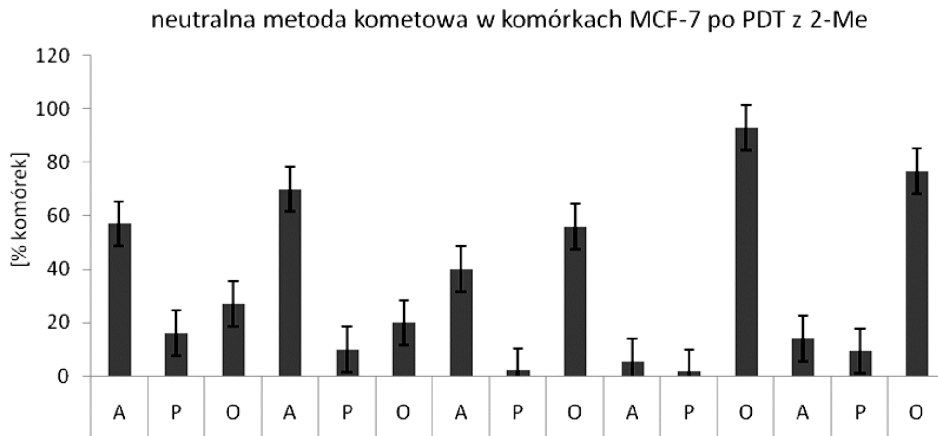
Wykres 4.15. Ocena apoptozy neutralną metodą kometową w komórkach OvBH-1 po standardowej reakcji fotodynamicznej



Wykres 4.16. Ocena apoptozy neutralną metodą kometową w komórkach OvBH-1 po reakcji fotodynamicznej wspomaganiej 2-metoksyestradiolem (O - nieuszkodzone; P - uszkodzone pośrednie; A - apoptoza)



Wykres 4.17. Ocena apoptozy neutralną metodą kometową w komórkach MCF-7 po standardowej fotodynamicznej



Wykres 4.18. Ocena apoptozy neutralną metodą kometową w komórkach MCF-7 po reakcji fotodynamicznej wspomaganiej 2-metoksyestradiolem (O - nieuszkodzone; P - uszkodzone pośrednie; A - apoptoza)

Tabela 4.1. Analiza zmian morfologicznych w komórkach OvBH-1 i MCF-7 przed i po reakcji fotodynamicznej z Photofrinem i 2-metoksyestradiolem

A. Po Ph-PDT

Cechy morfologiczne komórki	Przed terapią		Po PDT					
			0 godz.		3 godz.		6 godz.	
	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7
Rozmiar	+++	++	++	+ / ++	++	+ / ++	++	+ / ++
Kształt	++	++	- / ++	++	- / ++	- / ++	-	-
Apoptoza:	-	10	0	10-20	10	15	10	30-40

Legenda: rozmiar: + mały, ++ średni, +++ duży;
 kształt: - nieregularny, + owalny, ++ okrągły,
 komórki o cechach apoptotycznych w %

B. Po Ph-2-Me-PDT

Cechy morfologiczne komórki	Przed terapią		Po Ph-2-Me-PDT					
			0 godz.		3 godz.		6 godz.	
	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7
Rozmiar	+++	++	++	+ / ++	++	- / +	++	+ / ++
Kształt	++	++	++	++	- / ++	- / ++	-	-
Apoptoza:	-	10	0	10	30-40	25	50-60	45

Legenda: rozmiar: + mały, ++ średni, +++ duży;
 kształt: - nieregularny, + owalny, ++ okrągły,
 komórki o cechach apoptotycznych w %

Tabela 4.2. Ekspresja białka MnSOD w komórkach OvBH-1 po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganej 2-Me.

	Ph-PDT		Ph-PDTmodyfikowana 2-Me	
	Intensywność reakcji	% komórek pozytywnie zabarwionych	Intensywność reakcji	% komórek pozytywnie zabarwionych
Kontrola	-/+	15	-	8
Kontrola z Ph	-/+	15	-/+	8
Kontrola z 2-Me			+	20
bezpośrednio po naświetlaniu	++/+++	80	-/+	36
3 godz. po naświetlaniu	++/+++	95	+	45
6 godz. po naświetlaniu	+++	99,2	++	42

Tabela 4.3. Ekspresja białka MnSOD w komórkach MCF-7 po standardowej reakcji fotodynamicznej i wspomaganej 2-Me.

	Ph-PDT		Ph-PDTmodyfikowana 2-Me	
	Intensywność reakcji	% komórek pozytywnie zabarwionych	Intensywność reakcji	% komórek pozytywnie zabarwionych
Kontrola	-/+	< 5	-	< 5
Kontrola z Ph	+	27	+	27
Kontrola z 2-Me			-/+	23
bezpośrednio po naświetlaniu	++	33	++	27
3 godz. po naświetlaniu	+ /+++	40	+	24
6 godz. po naświetlaniu	+ /+++	41	+	31,1

Tabela 4.4. Ocena apoptozy metodą TUNEL w komórkach A) OvBH-1 i B) MCF-7

A) OvBH-1

OvBH-1	Ph-PDT	Ph-2-Me-PDT
	% jąder pozytywnie zabarwionych	% jąder pozytywnie zabarwionych
kontrola	< 5	< 5
bezpośrednio po naświetlaniu	10	25
3 godz. po naświetlaniu	35	48
6 godz. po naświetlaniu	29	70

B) MCF-7

MCF-7	Ph-PDT	Ph-2-Me-PDT
	% jąder pozytywnie zabarwionych	% jąder pozytywnie zabarwionych
kontrola	< 5	< 5
bezpośrednio po naświetlaniu	50	70
3 godz. po naświetlaniu	62	73
6 godz. po naświetlaniu	85	98

Tabela 4.5. Ekspresja białek pro- i antyapoptotycznych w komórkach raka jasnokomórkowego jajnika (OvBH-1) i komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego MCF-7 przed i po Ph-PDT (A), Ph-2-Me-PDT (B)

A) Ph-PDT

Białko	Przed PDT (% komórek)		Ph-PDT (% komórek pozytywnych)					
			bezpośrednio		3 godz.		6 godz.	
	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7
p53	90	0	95	30	95	50	95	60
p53 ser 20	0	Poj. kom, cyt	0	0	20	0	0	0
p53 ser 392	0	Poj. kom. jądro	0	0	0	10	0	30
Bax	0	> 5	20	> 5	10	> 5	10	0
Bcl-2	10	60	10	10	10	0	10	10
M30	0	0	> 5	30	10	10	> 5	40

B) Ph-2Me-PDT

Białko	bezpośrednio		3 godz.		6 godz.	
	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7	OvBH-1	MCF-7
p53	< 5	0	95	50	95	60
p53 ser 20	20	5-10	20-40	0	5	10
p53 ser 392	0	5	20	5	20	30
Bax	0	0	> 5	10	> 5	10
Bcl-2	0	0	10	0	10	10
M30	30	0	10	10	> 5	40

5. BADANIA STATYSTYCZNE

Do oceny zgodności rozkładu uzyskanych wyników badań z rozkładem normalnym. Istotność różnic badanych zmiennych o rozkładzie normalnym oceniono testem t dla prób niezależnych względem wyników dla próby kontrolnej niepoddawanej reakcji fotodynamicznej. Wyniki analizowano według odpowiedniej dawki PDT (czasu inkubacji po terapii bezpośrednio, 3 i 6 godz.). Wyniki istotne statystycznie oznaczono gwiazdkami na wykresach oraz umieszczono w rozdziale 4.

W szacowaniu statystycznym za poziom istotności przyjmowano każdorazowo wartości $p < 0,05$. Do analiz statystycznych zastosowano komercyjne oprogramowanie STATISTICA 9.

6. DYSKUSJA

Choroby nowotworowe są w Polsce zasadniczą przyczyną przedwczesnych zgonów. Rak jajnika jest odpowiedzialny za większą liczbę zgonów w porównaniu z innymi nowotworami złośliwymi żeńskiego układu rozrodczego. Z przeprowadzonych badań statystycznych wynika, że u około 70-80% kobiet chorych na raka jajnika diagnozuje się go dopiero w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego. Najczęściej nie ma wczesnych objawów. Niekorzystne rokowanie w przebiegu tej choroby może być uwarunkowane działaniem wielu mechanizmów. Można do nich zaliczyć m.in. takie, jak: zmniejszona wrażliwość na cytostatyki, występowanie zaburzeń genetycznych w obrębie chromosomów (6q, 17p i 17q), niektórych onkogenów i genów supresorowych (*c-myc*, *ras*, *MDM2*, *p210 BCR-abl*, *Her-2/neu*, *p53*), białek anty- i proapoptycznych (Bcl-2, BAX, p53) i białek biorących udział w procesie replikacji DNA (topoizomerazy) (Megliorino 2005). Poznanie mechanizmów eliminacji komórek nowotworowych oraz zbadanie czynników hamujących apoptozę w komórkach nowotworowych jest podstawowym, a zarazem bardzo ważnym warunkiem powodzenia stosowanych metod leczniczych [19, 244, 198]. Duże nadzieje w walce z komórkami nowotworowymi budzi terapia fotodynamiczna. Wybiórcze oddziaływanie terapii fotodynamicznej na komórki otwiera możliwość precyzyjnego eliminowania z organizmu komórek o zmienionym patologicznie genotypie i fenotypie. Metoda ta, chociaż prosta w założeniach, jest jednak jeszcze bardzo rzadko stosowana. Wynika to głównie z ciągle małej wiedzy na temat mechanizmów leżących u podłoża tej strategii przeciwnowotworowej, a tym samym możliwości jej modyfikacji w zależności od stosowanych parametrów.

Od kilku lat są prowadzone badania mające na celu spotęgowanie przeciwnowotworowego działania PDT przez łączenie tej metody, np. z chemioterapeutykami, związkami aktywującymi odpowiedź immunologiczną oraz przez ułatwiony transport fotouczulaczy w liposomach lub nanokapsułach [128, 235, 329]. W prezentowanej pracy ocenialiśmy działanie reakcji fotodynamicznych klasycznych i zmodyfi-

kowanych na komórki jasnokomórkowego raka jajnika OvBH-1. Komórki tej linii charakteryzują się nadekspresją białka p53 i c-erbB-2 [16], co niewątpliwie miało wpływ na małą efektywność standardowych terapii stosowanych w leczeniu tego nowotworu. Pacjentka, od której zmiany nowotworowej wyprowadzono badaną linię, zmarła pół roku po zastosowaniu klasycznej chemioterapii cisplatyną. Można przypuszczać zatem, że komórki OvBH-1 są odporne na chemioterapię, czego przyczyną jest nadekspresja białka p53 [16, 18]. W prawidłowych komórkach stężenie białka p53 jest niskie gdyż jest ono gwałtownie degradowane na drodze ubikwitynacji [7].

Prace oceniające wpływ metod fotodynamicznych na nowotwory ginekologiczne, w tym także raka jajnika, w warunkach *in vitro*, koncentrują się obecnie na ocenie efektywności różnych fotosensybilizatorów oraz komórkowej odpowiedzi na stosowane procedury [245, 255, 278, 292]. Coraz częściej pojawiają się prace, w których prowadzone są próby potęgowania przeciwnowotworowego działania PDT, a także ukierunkowanego jej działania. Zmierzają one do niszczenia komórek nowotworowych na drodze apoptozy, a nie nekrozy, czy zatrzymanie procesu neoangiogenezy [40, 88].

Opierając się na doniesieniach literaturowych postanowiliśmy dokonać porównawczej oceny efektywności i skuteczności działania klasycznych reakcji fotodynamicznych i modyfikowanych 2-metoksyestradiolem na komórkach ludzkich linii raka jasnokomórkowego jajnika (OvBH-1) z nadekspresją białka p53. Wykazano, że 2-metoksyestradiol hamuje aktywność i ekspresję dysmutazy ponadtlenkowej, założyliśmy więc, że związek ten może być idealnym kandydatem do wzmacniania skuteczności antynowotworowej innych terapii, których działanie polega na generowaniu RFT. Do metod tych oczywiście można zaliczyć terapię fotodynamiczną [101, 148, 176, 205, 311]. Z doniesień piśmiennictwa wiadomo, że 2-Me nie wpływa na procesy Oks-Red w komórkach prawidłowych (Hileman 2004). W naszej pracy wykorzystaliśmy do wzmocnienia efektu reakcji fotodynamicznej wiedzę dotyczącą zależności pomiędzy aktywnością kluczowego enzymu antyoksydacyjnego (SOD), rodzajem zmian nowotworowych oraz przyjętymi warunkami metody fotodynamicznej.

Wcześniej prowadzone przez nas badania na linii OvBH-1, które zostały opublikowane i są częścią prezentowanej rozprawy, wykazały cytotoksyczny wpływ klasycznych procedur fotodynamicznych na ba-

dane komórki. Test kometowy oraz badanie apoptozy na cytometrze przepływowym wykazały, że komórki te umierały głównie na drodze nekrozy, a nie apoptozy [19]. Jako linię kontrolną wykorzystano linię gruczolakoraka gruczołu sutkowego MCF-7 z prawidłową ekspresją białka p53. Wpływ reakcji fotodynamicznych na komórki prawidłowe o małej ekspresji p53 oceniano w wielu publikacjach. Wiadomo też, że kumulują one fotouczulacz w znacznie mniejszym stopniu, niż komórki nowotworowe. Nie były więc przedmiotem naszych badań. Do doświadczeń wybrano fotouczulacz z grupy hematoporfiryn-Photofrin II (skład zbliżony do HpD), który należy do grupy fotouczulaczy pierwszej generacji i chociaż jego zastosowanie może wywoływać niewielkie skutki uboczne (nadwrażliwość na promieniowanie słoneczne), odegrał on bez wątpienia największą rolę w badaniach podstawowych, przedklinicznych i klinicznych. Jego właściwości stały się wzorcowe i porównywalne z innymi związkami fotoczułymi o podobnej budowie i cechach [45, 184]. Istotnym czynnikiem wpływającym na skuteczność i efektywność PDT jest umiejscowienie fotouczulaczy w komórce. Pochodne hematoporfiryn, w tym także Ph selektywnie akumulują się w komórkach nowotworowych [45, 58, 118, 184, 251, 258]. W przedstawionej rozprawie oceniono lokalizację photofrinu w badanej linii OvBH-1 i linii kontrolnej oraz kolokalizację tego fotouczulacza z mitochondrium i retikulum endoplazmatycznym komórek. Jest wiele prac, w których badano lokalizację Ph i innych fotouczulaczy w różnych komórkach nowotworowych i prawidłowych [57, 184, 258, 310]. Ze względu na zróżnicowany metabolizm komórek nowotworowych i ich ogromną heterogenność ten sam fotouczulacz może szybciej lub wolniej wnikać do komórek nowotworowych. Z naszych badań wynika, że dystrybucja photofrinu w komórkach OvBH-1 i MCF-7 jest zróżnicowana i zależy od czasu inkubacji z fotouczulaczem. Maksymalną koncentrację Ph obserwowano w obu typach komórek po 4 godz. inkubacji, przy czym najbardziej intensywny sygnał był widoczny wokół otoczki jądrowej. Dalsza inkubacja z fotouczulaczem nie wykazała różnic w jego lokalizacji komórkowej. Taki rodzaj akumulacji fotouczulacza może sugerować jego wnikanie do struktur błoniastych cytoplazmy, szczególnie tych położonych w okolicy otoczki jądrowej (ER gładkie i szorstkie, aparat Golgiego, mitochondrium). Photofrin w różnych typach komórek nowotworowych charakteryzowała zróżnicowana akumulacja. W przeważającej części doniesień najwyższa jego koncentracja

cja była obserwowana w okolicy otoczki jądrowej, co potwierdziły także wyniki prezentowanej pracy. Na umiejscowienie fotosensybilizatora miał wpływ czas inkubacji i typ komórek nowotworowych [57, 150, 184, 258]. Stwierdzono również, że Photofrin z mniejszą intensywnością umiejscawiał się w komórkach opornych na dokсорubicynę niż we wrażliwych [57, 171]. Pojedyncze doniesienia dowodzą, że Ph jest substratem białka PgP. Badania te wymagają jednak dalszych potwierdzeń [57, 171]. Podobne wyniki, do opisanych powyżej, uzyskano badając akumulację hemoporfiny (HMME) w komórkach ludzkiej linii komórkowej raka jajnika SKOV3. Wykazano największe natężenie fluorescencji po 3 godz. inkubacji z fotouczulaczem. Hemoporfina ma 4 szczyty (maksima) absorpcyjne. Jeden z nich wynosi podobnie, jak dla Ph około 620 nm. Ta długość jest idealna dla reakcji fotodynamicznych, jak również optymalna dla nowotworów położonych wewnątrzotrzewnowo, do których należy rak jajnika [278]. Pogue i wsp. badali lokalizację fotouczulaczy z grupy chloryn: etiopurpuryny cyny (SnET_2) i octaetylobenzochloryny cyny (SnOEBC) w komórkach raka jajnika (OVCAR5). Oba barwniki wykazały intensywną fluorescencję w lizosomach. W przypadku SnOEBC obserwowano natomiast słabe natężenie fluorescencji w mitochondriach [241]. Związki fotoczule, które lokalizują się w mitochondriach albo w retikulum endoplazmatycznym mogą indukować wewnątrzpochodny szlak apoptotyczny. Przeciwnie, fotouczulacze mające większe powinowactwo do lizosomów wpływają na aktywację procesu nekrozy w komórkach nowotworowych [152].

Akumulacja fotouczulacza wokół otoczki jądrowej zainspirowała nas do przeprowadzenia obserwacji, w jakim stopniu Ph umiejscawia się w błonach mitochondrium i retikulum endoplazmatycznym. Wybór organelli był podyktowany ich rolą w procesie apoptozy. Mitochondrium jest głównym organellum inicjującym śmierć komórek na drodze apoptozy w tzw. szlaku wewnątrzpochodnym. Z danych literaturowych wynika, że mitochondria są głównym celem ataku RFT, które są indukowane reakcjami fotodynamicznymi w komórkach nowotworowych. Obniżenie potencjału błonowego, masowy wypływ cytochromu c oraz nadmierne uwalnianie ATP jest odpowiedzią mitochondrium na stres oksydacyjny indukowany reakcją fotodynamiczną [6, 45, 68, 127]. Przerwanie ciągłości błony wewnętrznej mitochondrium i zaburzenia aktywności metabolicznej jest głównym wynikiem działania reakcji fotodynamicznych [127]. Z naszych badań wynika, że Ph

silnie ko lokalizuje z mitochondrium w komórkach OvBH-1, w przeciwieństwie do komórek MCF-7, w których nie obserwowano kolokalizacji z tym organellom. Photofrin w komórkach OvBH-1 wykazywał niewielką kolokalizację z ER w porównaniu do komórek MCF-7, w których wyraźnie widać, że fotouczulacz akumuluje się w ER. Retikulum endoplazmatyczne jest organellum, które kontroluje wiele procesów w komórce, m.in. jest głównym wewnętrznym magazynem jonów Ca^{2+} , które są mediatorami sygnałów, regulują tworzenie ATP i kontrolują proces apoptozy [238, 305]. ER jest miejscem, gdzie białka są syntetyzowane, ulegają potranslacyjnej modyfikacji, mogą ulegać enzymatycznej glikacji i kierowane są w odpowiednie miejsca. Umieszczenie zmienionych patologicznie białek, nieprawidłowa enzymatyczna glikozylacja białek, zaburzenie równowagi wapniowej oraz upośledzenie ubikwitynacji białek może wywołać szybką odpowiedź tych organelli zwaną stresem ER. Konsekwencją tego stresu jest uruchomienie wielu wewnątrzkomórkowych reakcji obronnych, mających na celu degradację zakumulowanych związków. Jeżeli te mechanizmy zawiodą, to jest uruchamiany mechanizm śmierci komórkowej na drodze apoptozy [219, 314]. Reakcje fotodynamiczne indukują stres w retikulum endoplazmatycznym. Prowadzą do zaburzenia gospodarki wapniowej w komórce oraz nagromadzenia białek zmienionych oksydacyjnie [38, 219, 288]. W komórkach raka HeLa i C-26 monitorowano różne czynniki indukujące stres w ER [288]. Opisano wewnątrzkomórkowy mechanizm śmierci apoptotycznej, który rozpoczyna się aktywacją kaspazy 12 [270].

Stężenie fotouczulacza ustalono na podstawie literatury i wcześniejszych, opublikowanych badań, które zostały włączone i stanowią część prezentowanej rozprawy habilitacyjnej [19]. W prezentowanej pracy oceniano skuteczność reakcji fotodynamicznej standardowej i modyfikowanej na komórki raka jajnika w warunkach *in vitro*. Szczególną uwagę poświęcono roli PDT w zahamowaniu proliferacji komórek i ograniczeniu ich liczby w hodowli [101, 109, 278, 292]. Zabiegi te prowadzą do destrukcji komórek, co zwiększa szanse zastosowania terapii fotodynamicznej *in vivo* [8]. Wyniki prezentowanej pracy wykazały znaczący spadek przeżywalności komórek OvBH-1 i MCF-7 po zastosowaniu reakcji fotodynamicznych z inhibitorem SOD, 2-metoksyestradiolem. Największą cytotoksyczność obserwowano 48 godz. po zastosowanej procedurze. We wcześniej prowadzonych przez nas ba-

daniach oceny cytotoxycywności klasycznej PDT po krótszych czasach inkubacji 3 i 6 godz. nie zanotowano znaczącej redukcji w aktywności mitochondrialnej w komórkach raka jasnokomórkowego jajnika, co wskazywałoby na jej oporność. Podłożem tej oporności są zmiany w genotypie tych komórek. Istotny jednak spadek aktywności obserwowano w komórkach MCF-7 już po krótszych czasach po Ph-PDT [19]. Do tej pory ukazała się tylko jedna praca, w której oceniano cytotoxycywność metody fotodynamicznej modyfikowanej dwoma inhibitorami SOD: 2-metoksyestradiolem I (2MEOE₁) i 2-metoksyestradiolem II (2MEOE₂). Badania prowadzono *in vitro* na trzech rakowych mysich liniach komórkowych (C-26, LLC, MDC), pięciu ludzkich (PANC-1, HPAF-II, HPAC, T24) oraz *in vivo* na mysich modelach zwierzęcych. Przeprowadzone eksperymenty ujawniły cytotoxycywność 2-MEOE₂ we wszystkich badanych układach. Natomiast 2-MEOE₁ okazał się skuteczny tylko w przypadku niektórych linii komórkowych. Wykazano także, że 2-MEOE₂ wpływał nie tylko na zmniejszenie guza, ale także na przedłużenie życia zwierząt [101]. Zahamowanie aktywności i ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej przez jej inhibitory osłabia naturalną eliminację RFT, co podnosi skuteczność terapii fotodynamicznej.

Generowanie dużych ilości RFT w komórkach jest bezpośrednim efektem działania i zastosowania PDT. Indukowane reakcjami fotodynamicznymi wolne rodniki zapoczątkowują kaskadę procesów utleniających składniki komórki. Z danych literaturowych wynika, że najbardziej odpowiedzialny za cytotoxycywność PDT jest tlen singletowy. Jest jednak wiele doniesień, w których główną rolę odgrywa anionorodnik ponadtlenkowy [93, 101]. Anionorodnik ponadtlenkowy jest usuwany na drodze enzymatycznej przez jeden z głównych enzymów antyoksydacyjnych-dysmutazę ponadtlenkową. Głównym miejscem generowania anionorodnika ponadtlenkowego jest łańcuch mitochondrialny, dlatego mitochondrialny izoenzym dysmutazy ponadtlenkowej zawierający mangan (MnSOD) wydaje się pełnić kluczową rolę w utrzymaniu równowagi pro- i antyoksydacyjnej. Wzrost stężenia anionorodnika ponadtlenkowego podczas stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych, indukowanego wewnętrznymi czynnikami wpływa na zaburzenie tej równowagi.

Komórki nowotworowe ze względu na intensywny i odmienny od komórek prawidłowych metabolizm, zaburzenia w przekazywaniu sygnałów onkogennych oraz działanie cytokin szybciej inicjują we-

wnątrzkomórkowy stres oksydacyjny [126, 195, 213, 236]. W związku z tym są też bardziej wrażliwe na działanie enzymów antyoksydacyjnych. Obserwowano wzrost ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej i innych enzymów antyoksydacyjnych w hodowlach komórkowych ludzkiej białaczki i raka jajnika [126, 132]. Zarządzanie systemem enzymów antyoksydacyjnych w połączeniu z ich inhibitorami, do których należy m.in. 2-metoksyestradiol prowadzi do nagromadzenia niekontrolowanego stężenia anionorodnika ponadtlenkowego, co ostatecznie może prowadzić do apoptozy w komórkach nowotworowych [126]. Wysoka ekspresja SOD jest połączona z negatywną odpowiedzią komórek nowotworowych na terapie antynowotworowe, szczególnie PDT [212, 321]. W naszych badaniach obserwowaliśmy dużą aktywność całkowitą SOD w komórkach OvBH-1 poddanych reakcjom inkubowanych z Ph i 2-Me niezależnie w porównaniu z komórkami po Ph-PDT i Ph-2-Me-PDT. Ekspresja mitochondrialnej MnSOD była lekko podwyższona jedynie w kontrolnych komórkach OvBH-1.

W prezentowanej pracy zanotowano spadek aktywności całkowitej SOD po 3 i 6 godz. po reakcjach fotodynamicznych z zastosowaniem inhibitora dysmutazy, natomiast 3 godz. po Ph-PDT bez inhibitora stwierdzono wzrost aktywności SOD. Należy zwrócić uwagę, że w komórkach OvBH-1 spadek aktywności był zdecydowanie większy niż w komórkach MCF-7 dla obu stężeń zastosowanego inhibitora 10 i 50 μ M. Interesujący wydaje się fakt, że w komórkach inkubowanych tylko z 2-metoksyestradiolem nie wykazano spadku aktywności SOD i utrzymywał się on na takim poziomie, jak w komórkach kontrolnych niepoddanych procedurom fotodynamicznym. Można to wytłumaczyć badaniami Huang i wsp., którzy analizowali mechanizm wybiórczego, cytotoksycznego działania 2-Me na komórki ludzkiej białaczki w porównaniu z prawidłowymi limfocytami. Badali ekspresję mRNA 5 godz. po inkubacji z 2-Me. Obserwowali nadekspresję CuZnSOD. W dalszych badaniach wykazali, że mechanizmem odpowiedzialnym za indukcję ekspresji SOD mRNA jest inhibicja aktywności białka enzymatycznego CuZnSOD przez 2-Me. Wykazali również, że inhibicja ekspresji i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej jest zależne od czasu inkubacji i stężenia 2-Me w komórkach ludzkiej białaczki [133]. Można przypuszczać, że 18-godz. czas inkubacji z 2-Me był za krótki, a stężenie 50 μ M za małe, żeby wywołać zmiany w komórkach OvBH-1 i MCF-7. Pojedyncze zastosowanie 2-Me wpływa w sposób ograniczony przeciwnowotwo-

rowo, może być jednak podstawą hipotezy, która postuluje, że wysokie stężenie RFT, który prowadzi do rozregulowania systemu antyoksydacyjnego może indukować ciężki stres oksydacyjny wystarczający na zniszczenie tkanki nowotworowej. Wymagałoby to dalszych badań, które nie były tematem prezentowanej pracy. Gołąb i wsp badali aktywność MnSOD i CuSOD po zastosowaniu dwóch inhibitorów SOD 2MEOE₁ i 2MEOE₂. W przeciwieństwie do naszych badań wykazali istotny spadek aktywności MnSOD, a nie CuZnSOD pod wpływem inhibitorów na wybranych liniach komórkowych i modelach mysich. Hamowanie aktywności i ekspresji CuZnSOD nie wpływało na potęgowanie antynowotworowego działania PDT [101]. Przedstawione przez nas badania oraz badania Huang były sprzeczne z badaniami Gołąb i wsp. Sugerujemy, że może to być spowodowane zróżnicowanym działaniem 2-Me na komórki nowotworowe, zależnym od typu tych komórek. Huang i wsp. w swoich badaniach udowodnili wpływ 2-Me na akumulację p53 w komórkach nowotworowych. W połączeniu z reakcjami fotodynamicznymi indukującymi wzrost RFT w komórkach 2-metoksyestradiol może potęgować wrażliwość komórek OvBH-1 z mutacją genu p53 na działania fotodynamiczne, co potwierdzają wyniki naszej pracy. Wcześniejsze doniesienia wskazują na podwyższony poziom ekspresji MnSOD w rakach jajnika w porównaniu z fragmentami tkanek prawidłowych, indukowany samoistnym stresem oksydacyjnym, wynikającym z odmiennego metabolizmu komórek nowotworowych [132].

Zahamowanie ekspresji MnSOD prowadzi do akumulacji RFT, co przejawia się proliferacją komórek nowotworowych *in vitro* i wzrostem guza *in vivo* [132]. W prezentowanej pracy obserwowaliśmy największy wzrost ekspresji MnSOD w komórkach OvBH-1 po Ph-PDT. Komórki kontrolne wykazywały ekspresję MnSOD na poziomie 15%, po Ph-2Me-PDT natomiast zanotowaliśmy obniżony procent komórek pozytywnie zabarwionych na MnSOD we wszystkich czasach po naświetleniu. W komórkach MCF-7 procent komórek pozytywnie zabarwionych na MnSOD wynosił mniej niż 5. Podobnie natomiast, jak w komórkach OvBH-1, w komórkach MCF-7 po Ph-PDT obserwowano wzrost ekspresji MnSOD po wszystkich czasach po naświetleniu, jednak nie tak znaczny jak w komórkach raka jajnika. Podobnie po reakcji fotodynamicznej obserwowano mniejszy procent komórek pozytywnie zabarwionych, najmniejszy 3 godz. po Ph-2-Me PDT. Uzyskane przez nas

wyniki, dotyczące poziomu MnSOD były odmienne od wyników Hu [132]. Obniżony stężenie MnSOD wpływało na efektywniejsze cytotoksyczne działanie PDT na komórki raka jajnika. Dolgachev i wsp. badali rolę MnSOD w indukcji apoptozy i gromadzenia ceramidów po reakcji fotodynamicznej z zastosowaniem ftalocjaniny Pc4 w komórkach ludzkiego chłoniaka. W komórkach Jurkat, które charakteryzowała nadekspresja dzikiej formy MnSOD obserwowano hamowanie procesu apoptozy wywołanej Pc4-PDT, ale nie wykazano wpływu na wzrost stężenia ceramidów w tych komórkach. W komórkach Jurkat z nadekspresją zmutowanej formy MnSOD zachodziła aktywacja syntezy ceramidów po Pc4-PDT. Podobnie wykazano, że w komórkach pozbawionych MnSOD dochodzi do indukcji apoptozy i akumulacji ceramidów. Badania Dolgacheva potwierdzają, że procesy indukowane reakcjami fotodynamicznymi są zależne od RFT [66]. Tłumaczy to efektywniejsze cytotoksyczne działanie Ph-PDT z zastosowaniem inhibitora SOD. Zahamowanie tego enzymu prowadzi do niekontrolowanego wzrostu anionorodnika ponadtlenkowego w badanych komórkach. Ocena immunocytochemiczna ekspresji MnSOD w komórkach OvBH-1 i MCF-7 znalazła potwierdzenie w analizie wykonanej w naszej pracy ekspresji tego białka antyoksydacyjnego metodą western blot.

Prowadzone do tej pory badania sugerują, że głównym celem ataku reakcji fotodynamicznych w komórkach nowotworowych są dwa główne składniki błon komórkowych: lipidy i białka [96, 171, 257]. Wolnorodnikowy proces utleniania obecnych w lipidach nienasyconych kwasów tłuszczowych indukowany działaniem światła na fotouczulacz obecny w komórkach, zapoczątkowuje kaskadę reakcji, w których z pierwotnych produktów peroksydacji lipidów powstają związki, charakteryzujące się stabilnością w porównaniu z rodnikami. Związki te mogą zatem dyfundować w komórce na znaczne odległości i pełnić rolę tzw. wtórnych przekaźników uszkodzeń wolnorodnikowych. Wśród tych związków największą grupę stanowią aldehydy [96, 97, 194, 322]. Większość prac wskazuje dlatego, że aldehyd malonowy jest głównym końcowym produktem peroksydacji lipidów i jest używany do oceny stresu oksydacyjnego [97, 171, 269]. Opierając się na tych informacjach postanowiliśmy w naszej pracy oznaczyć stężenie dialdehydu malonowego, produktu końcowej degradacji utlenionych lipidów, wykorzystując jego reakcję z kwasem tiobarbiturowym wg Rice-Evans [20]. Otrzymane wyniki wskazują na wzrost ilości MDA po

Ph-PDT i Ph-2Me-PDT w komórkach OvBH-1 i MCF-7. Znaczące podwyższenie stężenia MDA obserwujemy w komórkach raka jajnika 6 godz. po naświetlaniu w przypadku reakcji fotodynamicznej modyfikowanej 2-Me. W komórkach MCF-7 największy wzrost stężenia MDA odnotowaliśmy 3 godz. po Ph-2Me-PDT. W przypadku komórek OvBH-1 stężenie MDA rośnie wprost proporcjonalnie do czasu inkubacji z 2-Me po naświetlaniu. W komórkach MCF-7 nie zaobserwowano takiej korelacji. Końcowe produkty peroksydacji, do których należy m.in. oceniany przez nas dialdehyd malonowy wykazują wysokie toksyczne i mutagenne działanie. Nagromadzenie tego produktu może uszkadzać DNA komórek nowotworowych i potęgować działanie PDT.

Badania z zastosowaniem PDT na innych liniach komórkowych potwierdzają nasze wyniki wpływu reakcji fotodynamicznych z zastosowaniem różnych fotouczulaczy na wzrost peroksydacji lipidów [171]. Wcześniej badaliśmy stężenie peroksydacji lipidów w ludzkich komórkach raka szyjki macicy (HeLa). Zanotowaliśmy najwyższy wzrost stężenia MDA w komórkach HeLa 3 godz. po reakcji fotodynamicznej z zastosowaniem HpD. Zaskakujące było obniżenie stężenia dialdehydu malonowego 18 godz. po HpD-PDT poniżej stężenia kontrolnego [259]. Podobne wyniki otrzymał Filip i wsp. stosując kwas 5 aminolewulinowy (5-ALA) w badaniach przedklinicznych na szczurach. Trzy godziny po 5-ALA-PDT stężenie było najwyższe, a po 24 godz. najniższe. Stężenie MDA było skorelowane ze zmianami histologicznymi w obrębie guza [83]. Podobne wyniki otrzymała również Cacuci i wsp. [42]. W przeprowadzonych wcześniej badaniach na komórkach raka płuc (A549) także odnotowano wzrost stężenia aldehydu malonowego w komórkach po Ph-PDT [257]. Obserwowane zmiany potwierdzają, że generowane podczas reakcji fotodynamicznej rodniki LO^{\bullet} i LOO^{\bullet} inicjują łańcuch reakcji oksydacyjnej peroksydacji lipidów (LPO). Zniszczenie powodowane przez utlenianie lipidów może rozprzestrzeniać się na błony wewnątrz komórki przez transport LOOH [97]. Odmienne wyniki otrzymał zespół Shevchuka, który badał stężenie MDA w mysich komórkach nowotworowych jamy brzusznej (EAC) z zastosowaniem HpD. Obserwowali oni niewielki wzrost MDA, gwałtowny spadek GSH, natomiast duży wzrost koniugowanych dienów. Wykazano nawet zahamowanie peroksydacji lipidów, przy nasilonym zniszczeniu białek komórkowych. Tłumaczono to zjawisko tym, że błony fosfolipidowe komórek EAC zawierają dużą ilość kwasów nasyconych [269].

W prezentowanej pracy ocenialiśmy po raz pierwszy także stężenie aldehydu malonowego po przeprowadzeniu reakcji fotodynamicznej modyfikowanej 2-metoksyestradiolem. Zastosowanie inhibitora dysmutazy ponadtlenkowej wpływa na istotny wzrost peroksydacji lipidów, co jest dowodem na podwyższenie efektywności PDT w komórkach OvBH-1.

Wydaje się, że procesy peroksydacji lipidów mają ogromne znaczenie w niszczeniu komórek nowotworowych w reakcjach fotodynamicznych, ponieważ indukują kaskadę procesów tworzących wtórne produkty utleniania lipidów i coraz większych uszkodzeń struktur komórkowych. Jakkolwiek niektórzy autorzy przypisują większe znaczenie fotodynamicznemu uszkodzeniu białek w zaburzeniu funkcjonowania komórek nowotworowych, co może także wynikać z przeważającej zawartości białek w komórkach [216, 269]. Wiadomo jednak, że procesy peroksydacji lipidów, jak i procesy oksydacyjnego uszkodzenia białek pod wpływem PDT zachodzą w komórkach nowotworowych równocześnie. Stopień zniszczenia lipidów i białek zależy głównie od warunków stosowanej terapii, a także składu chemicznego komórki nowotworowej i jej metabolizmu [269]. Oddziaływanie RFT z białkami prowadzi do zmiany ich struktury, utraty ich funkcji biologicznych i wzrostu degradacji białek w komórce [219]. W większości przypadków reakcje RFT z białkami prowadzą do nieodwracalnych uszkodzeń tych makrocząsteczek. Istnieją jednak również dowody na odwracalność zmian patologicznych w strukturze białek przez dekarbonylację [46]. Wśród różnych oksydacyjnych modyfikacji białek jednym z wczesnych markerów jest powstawanie grup karbonylowych [243, 291]. W prezentowanej pracy obserwowaliśmy wzrost stężenia grup karbonylowych białek zarówno po Ph-PDT, jak i po Ph-2-Me-PDT. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w stężeniu tych grup dla obu procedur fotodynamicznych. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że w komórkach MCF-7 najwyższe stężenie grup karbonylowych odnotowano 6 godz. po Ph-2-Me-PDT. W komórkach raka jajnika także zanotowano niewielki wzrost po wszystkich czasach naświetlania po Ph-2-Me-PDT. Znaczną akumulację grup karbonylowych obserwowano w mysich komórkach raka jelita grubego C-26 i ludzkich komórkach raka szyjki macicy po reakcjach fotodynamicznych indukowanych photofrinem. W badaniach na modelu komórkowym raka szyjki macicy potwierdzono proces karbonylacji białek i ich dalszą ubikwitynację w komórkach trakto-

wanych PDT [288]. Badania Tsaytler i wsp. wykazały, że utlenianie protein głównie prowadzi do karbonylacji białek i utleniania grup tiolowych. Badali oni indukowane PDT utlenianie białek używając proteomiki oraz selektywnej biotenylicacji i identyfikacji zmodyfikowanych białek za pomocą spektrometrii masowej. Spośród wszystkich białek około 314 było zmienionych pod wpływem reakcji fotodynamicznych na drodze oksydacyjnego utleniania [295]. Pomimo że powstawanie grup karbonylowych jest wczesnym markerem oksydacyjnych modyfikacji białek, to liczne badania dowodzą, że ocena stężenia utlenionych grup $-SH$ jest równie dobrym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego w komórce, indukowanego reakcjami fotodynamicznymi [12, 171, 257, 259]. Badania prowadzone przez nasz zespół z Katedry i Zakładu Biochemii Lekarskiej AM we Wrocławiu wykazały wyraźny spadek grup tiolowych, indukowany reakcjami fotodynamicznymi w różnych ludzkich liniach nowotworowych [171, 237, 259]. W prezentowanej pracy obserwowaliśmy znaczący spadek stężenia grup tiolowych zarówno po klasycznej reakcji fotodynamicznej, jak również modyfikowanej 2-Me. Należy jednak podkreślić, że reakcja fotodynamiczna kombinowana z 2-Me wpływała w istotny sposób na spadek stężenia grup $-SH$, szczególnie 3 godz. po terapii w komórkach OvBH-1 oraz 3 i 6 godz. po reakcji fotodynamicznej w komórkach MCF-7. Do tej pory nie badano takich markerów stresu oksydacyjnego, jak: stopień peroksydacji lipidów, stężenie grup karbonylowych i grup $-SH$ białek po reakcji fotodynamicznej, modyfikowanej 2-Me. Nie badano również wpływu samej 2-Me na wcześniej opisane markery stresu oksydacyjnego.

Analizując wcześniej otrzymane wyniki dotyczące wyraźnego spadku przeżywalności komórek OvBH-1 z nadekspresją białka p53 po zastosowaniu reakcji fotodynamicznej modyfikowanej 2-Me postanowiliśmy porównać wrażliwość tych komórek na apoptozę po zastosowaniu klasycznych reakcji fotodynamicznych i modyfikowanych 2-Me. W pracy określono procent komórek apoptotycznych wykorzystując przesiewową metodę kometową neutralną i alkaliczną oraz TUNEL. Nasze badania wykazały, że komórki OvBH-1 umierały na drodze nekrozy po klasycznej reakcji fotodynamicznej w przeciwieństwie do komórek MCF-7, w których wyraźnie przeważał procent jąder apoptotycznych. Wyniki te pokrywały się w przypadku obu metod badawczych. Zaskakujące były wyniki otrzymane po zastosowaniu procedury fotodynamicznej modyfikowanej 2-Me. Komórki OvBH-1 umierały na

drodze apoptozy. Obserwacje te potwierdzono także w prostej ocenie morfologicznej tych komórek (barwienie H+E).

Wiele spośród stosowanych fotouczulaczy, w tym również Ph umiejscawia się w mitochondrium, w organellach komórkowych, które odgrywają kluczową rolę w wewnątrzpochoicznym szlaku apoptotycznym. W tym przypadku terapia fotodynamiczna szybko indukuje proces apoptozy w komórkach nowotworowych, co wykazano w badaniach *in vivo* i *in vitro* [6]. Komórki nowotworowe mogą także umierać na drodze nekrozy, jest to jednak związane najczęściej spoza mitochondrialną lokalizacją fotouczulacza, podwyższonymi parametrami PDT, niedoborem glukozy [6, 64, 157, 221]. Wydaje się, że duży wpływ na rodzaj śmierci indukowanej PDT ma genotyp komórki nowotworowej, co potwierdzono wynikami naszej pracy. Terapia fotodynamiczna aktywuje dwa główne szlaki apoptotyczne wewnętrzny mitochondrialny i zewnętrzny, indukowany cytokinami [6, 217, 229]. W tej pracy przebadano poziom ekspresji głównych białek regulujących proces apoptozy po klasycznej reakcji fotodynamicznej i reakcji modyfikowanej 2-Me. Należą do nich białka z rodziny Bcl-2, białko p53 (forma ufosforylowana i nieufosforylowana), M30.

Białko p53 jest jednym z najważniejszych regulatorów cyklu komórkowego, zwanym także „strażnikiem genomu”. Jest białkiem konstytutywnie obecnym w prawidłowych komórkach. Pełni funkcję detektora uszkodzeń DNA indukowanego różnymi czynnikami oraz posiada możliwość uruchomienia mechanizmów związanych z wejściem komórki na drogę apoptozy. Komórki, które mają zmutowany gen p53 lub jego brak nie wykazują tych właściwości lub są one znacznie upośledzone.

Większość komórek nowotworowych, w tym także nowotwory jajnika wykazuje mutacje genu p53 i nadekspresję produktu tego genu. Badana przez nas linia raka jasnokomórkowego jajnika charakteryzuje się nadekspresją białka p53. Rola p53, jaką pełni on w regulacji śmierci komórek nowotworowych indukowanej reakcjami fotodynamicznymi, jest badana w dwóch aspektach. Jeden z nich dotyczy porównania odpowiedzi komórek nowotworowych na PDT w zależności od tego czy wykazują one ekspresję białka p53 czy charakteryzuje je brak tej ekspresji. Wykazano w wielu pracach, że terapia fotodynamiczna z zastosowaniem różnych fotouczulaczy wpływa na rozregulowanie ekspresji białka p53 [6, 86, 121, 293]. Rola białka p53 w kierowa-

niu komórek nowotworowych na drogę apoptozy pod wpływem PDT nie jest do końca wyjaśniona i ciągle budzi kontrowersje. Można przypuszczać, że jest to zależne od wielu mechanizmów i czynników, które je uruchamiają. Niektórzy autorzy twierdzą, że skierowanie komórek nowotworowych na drogę apoptozy pod wpływem reakcji fotodynamicznych jest niezależna od białka p53 [6]. Z naszych badań wynika, że apoptoza indukowana reakcją fotodynamiczną może być zależna od białka p53. Komórki OvBH-1, które charakteryzuje nadekspresja białka p53 nie umierają na drodze apoptozy pod wpływem klasycznej reakcji fotodynamicznej, dopiero modyfikacja reakcji 2-Me kieruje te komórki na drogę apoptozy. Nie można w bezpośredni sposób stwierdzić, że brak apoptozy w komórkach OvBH-1 po klasycznej reakcji fotodynamicznej jest spowodowany blokiem ekspresji dzikiej formy białka p53. We wcześniejszych pracach opisano cichą mutację genu *TP53* w kodonie 224, w eksonie 6 w komórkach raka jasnokomórkowego jajnika [18]. Postawiona hipoteza, że w komórkach OvBH-1 nie ma ekspresji dzikiej formy białka p53 została potwierdzona metodą western blot i immunocytochemicznie używając przeciwciała przeciwko p53. W związku z przedstawionymi badaniami możemy postulować, że brak apoptozy w komórkach OvBH-1 po zastosowaniu reakcji fotodynamicznej jest spowodowany brakiem stabilnej formy białka p53. Wybrane przez nas komórki kontrolne charakteryzujące się ekspresją dzikiej formy tego białka supresorowego odpowiadają apoptozą na zastosowaną reakcję fotodynamiczną. Nasze badania potwierdzają wcześniej otrzymane wyniki Tonga i wsp., którzy porównywali wrażliwość na terapię fotodynamiczną z zastosowaniem Ph prawidłowych fibroblastów, które miały dziką formę białka p53 z komórkami LFS, w których wykryto tylko formę zmutowaną. Te drugie komórki były zdecydowanie bardziej odporne na indukowanie apoptozy przez Ph-PDT [293]. Fisher i wsp. badali wrażliwość komórek na proces apoptozy indukowany PDT w zależności od ekspresji genu i białka p53. Rolę p53 w apoptozie indukowanej PDT wykazano przez akumulację białka p53 w komórkach i jej wpływ na zaburzenie regulacji innych białek kontrolujących cykl komórkowy. Komórki HL60 z dziką formą p53 charakteryzowały się większą wrażliwością na działanie PDT niż komórki HL60 ze zmutowaną formą tego genu. Podobne wyniki uzyskano na komórkach raka jelita grubego [85, 86, 87].

W innych badaniach także wykazano zależność apoptozy indukowanej terapią fotodynamiczną od białka p53 i wykazano jego istotną rolę w tym procesie [121]. Są jednak prace, z których wynika, że proces apoptozy indukowany PDT w komórkach nowotworowych jest niezależny od białka p53 [2, 6, 137]. Funkcja białka p53 w komórce jest zależna od jego aktywności biologicznej. Wiadomo, że w warunkach fizjologicznych białko to występuje w komórce w małej ilości. Bardzo często obecność prawidłowego białka p53 w komórkach nowotworowych jest niewystarczająca do indukcji apoptozy w tych komórkach pod wpływem stosowanych chemioterapeutyków. Można przypuszczać zatem, że do skutecznego działania tego białka jest niezbędna jego aktywacja, która może zachodzić pod wpływem wielu czynników uszkadzających DNA. Należą do nich m.in. leki stosowane w chemioterapii, a także reakcje fotodynamiczne. W odpowiedzi na ich działanie białko p53 ulega aktywacji przez liczne modyfikacje, wśród których istotną rolę zajmuje proces fosforylacji tego białka. Wykazano, że jego fosforylacja w istotny sposób może wpływać na stabilizację funkcji p53 w komórce, niezależnie od tego, czy występuje on w formie dzikiej czy obserwujemy jego nadekspresję w komórkach nowotworowych. Białko p53 może ulegać fosforylacji zarówno w C i N-terminalnej domenie. Najczęściej fosforylacji ulega seryna. Wyniki naszych badań potwierdzają te przypuszczenia. W komórkach OvBH-1 po reakcji modyfikowanej 2-Me wykazano ekspresję ufosforylowanej formy białka p53 w domenie C-terminalnej seryny 20 i N-terminalnej seryny 392. W komórkach MCF-7 ekspresja ufosforylowanej formy p53 była po obu typach reakcji fotodynamicznych. Najczęściej obserwowano komórki z ufosforylowanym białkiem p53 seryny 392 w N-terminalnym końcu. Z danych literaturowych wynika, że fosforylacja białka p53 jest kinazo zależna. Z badań przedstawionych w tej pracy wynika, że zastosowanie reakcji fotodynamicznej modyfikowanej 2-Me uruchamia nieznane mechanizmy prowadzące do fosforylacji białka p53 w komórkach raka jajnika i stabilizuje jego funkcję. Trzy godziny po zastosowaniu Ph-2-Me-PDT wykrywamy 20-40% komórek z ekspresją ufosforylowanej formy białka p53 w C-terminalnym końcu seryny 20. W badaniach ostatnich lat wykazano, że fosforylacja białka p53 w pozycji seryna 15 i 20 była niezbędna do indukcji apoptozy w komórkach raka jajnika, na których zastosowano chemioterapię cisplatyną. Można wnioskować, że

jest to jeden z mechanizmów, który uruchamia proces apoptozy w komórkach OvBH-1 po zastosowaniu Ph-2-Me-PDT.

W prezentowanej pracy oznaczono immunocytochemicznie ekspresję białek z rodziny Bcl-2. Białka należące do tej rodziny mogą działać pro- i antyapoptotycznie. Do białek antyapoptotycznych należy m.in. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, natomiast do proapoptotycznych należy Bax, Bak, Bad [55].

To czy komórka wejdzie na drogę apoptozy zależy od wzajemnego stosunku tych białek. Białka te mogą być regulowane w wyniku posttranslacyjnej modyfikacji, co sugeruje, że są one zależne od środowiska, w jakim znajduje się komórka [247]. Im mniejsza wartość stosunku Bcl-2 do Bax, tym większe prawdopodobieństwo uformowania kanałów w błonie mitochondrialnej i aktywacja procesu apoptozy [130, 256]. W wielu różnych kombinacjach reakcji fotodynamicznych (różne fotocuczulacze, zróżnicowane źródła światła i dawki naświetlania), w których komórki nowotworowe były transfekowane genem bcl-2 obserwowano oporność komórek na apoptozę indukowaną PDT [44]. W przeciwieństwie do tych doniesień wykazano także, że nadekspresja białka Bcl-2 nie wpływała na proces apoptozy indukowany PDT [160]. Nieliczne badania dowodzą, że wzrost ilości białka Bcl-2 wpływa na nasilenie procesu apoptozy, a wzrost Bax obniża poziom tego zjawiska [79, 286]. Zaobserwowano, że PDT bezpośrednio wpływa na białko Bcl-2, prowadząc do utraty jego antyapoptotycznej funkcji.

Podsumowując można stwierdzić, że PDT prowadzi do zaburzenia równowagi pomiędzy białkami pro- i antyapoptotycznymi z rodziny Bcl-2. Zwiększa to wrażliwość komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną PDT [217]. W naszych badaniach nie wykazano istotnych zmian w stężeniu białek z rodziny Bcl-2. Zaobserwowano także, że ekspresja białka Bax zależna od p53 w tych komórkach nie zmienia się w istotny sposób pod wpływem Ph-PDT. Obserwowano pewne fluktuacje pomiędzy białkami Bcl-2 a Bax w różnych warunkach reakcji fotodynamicznej. Można się zastanowić, czy wybrane czasy po zastosowanych reakcjach są optymalne do oceny ekspresji tych białek. Proces apoptozy ma zróżnicowany przebieg, zależny od wielu czynników. Z licznych badań wynika, że apoptoza może jednocześnie przebiegać szlakiem zewnętrznym i wewnętrznym. Szlaki te mogą przebiegać jednocześnie i wzajemnie się krzyżować.

Wyniki prezentowanej pracy potwierdzają skuteczność reakcji fotodynamicznych z zastosowaniem Photofrinu na ograniczenie przeżywalności komórek raka jasnokomórkowego jajnika z nadekspresją białka p53. Wszystkie obserwowane przez nas zjawiska są efektem działania reaktywnych form tlenu, zachodzące po naświetleniu komórek, które zgromadziły podany fotouczulacz. Modyfikacja klasycznej reakcji fotodynamicznej 2-metoksyestradiolem w istotny sposób wpływa na zwiększenie ograniczenia przeżywalności i zahamowanie proliferacji komórek raka jasnokomórkowego jajnika. Pozwala też na aktywację reakcji metabolicznych, które prowadzą do apoptozy. Jest to niezmiernie istotne z punktu widzenia klinicznego. Rak jasnokomórkowy jajnika cechuje w porównaniu z innymi typami histologicznymi tego nowotworu większa agresywność biologiczna i złe rokowania kliniczne [287]. Tylko w nielicznych badaniach klinicznych badano odpowiedź komórek raka jasnokomórkowego jajnika na chemioterapię z zastosowaniem cisplatyny. Pacjenci, u których zdiagnozowano ten typ histologiczny nowotworu mają niewielki wskaźnik pozytywnej odpowiedzi na terapię cisplatyną, podczas gdy u pacjentów z typem surowicznym raka jajnika wskaźnik ten jest wysoki. Należy podkreślić, że pacjentka, od której ta linia została wyprowadzona otrzymała 4 cykle chemioterapii cisplatyną i zmarła 6 miesięcy po zabiegu chirurgicznym. Wyniki tej pracy można uznać za ważne, ponieważ większość badań podstawowych i klinicznych, dotyczących wpływu PDT na raka jajnika przeprowadzano na surowicznym typie histologicznym tego nowotworu. Efekt działania PDT był pozytywny *in vitro*, jak i *in vivo* [63, 74, 115, 278]. Wyniki prezentowanej pracy mogą być podstawą do opracowania nowych, skutecznych metod skierowanych przeciwko komórkom raka jasnokomórkowego jajnika. Otwiera to nowe możliwości walki z tym nowotworem. Z przedstawionych w pracy rezultatów wynika, że podłoże metaboliczne procesu fotodynamicznego jest bardzo złożone i zależy od bardzo wielu czynników. Pozwala to na modyfikacje poszczególnych etapów zachodzących podczas tego złożonego procesu i na uzyskanie korzystnych wyników, poprawiających skuteczność terapii. Uzyskane wyniki wskazują, że Photofrin spełnia swoje zadanie w procesie fotodynamicznym, jaki zachodzi w komórkach raka jasnokomórkowego jajnika. Modyfikacja tego procesu 2-metoksyestradiolem potęguje działanie klasycznej reakcji, a także pozwala na eliminację komórek nowotworowych na drodze apoptozy, a nie nekrozy. Na-

leży jednak podkreślić, że nawet najbardziej solidnie przeprowadzona ocena wyników badań na modelu *in vitro* może zmienić się w warunkach *in vivo*. *In vitro* oceniamy pojedyncze komórki nowotworowe rosnące w płynie hodowlanym i ich odpowiedź na reakcję fotodynamiczną. W warunkach *in vivo* analizujemy odpowiedź tkanki guza nowotworowego, który znajduje się w otoczeniu innych komórek, zdrowych oraz tych, które towarzyszą mu i są odpowiedzialne za jego rozwój. Guz nowotworowy podlega kontroli układu odpornościowego, ma własne naczynia krwionośne i limfatyczne, które są odpowiedzialne za jego odżywienie. Przeważnie *in vivo* nie dochodzi do równomiernego rozdziału substancji odżywczych, część tkanki nowotworowej może być niewystarczająco dotleniona, co nie jest obojętne w przypadku działania PDT. Dodatkowo jeszcze wielokierunkowość działania samej terapii (unaczynienie, układ immunologiczny, niszczenie tkanki guza) klasycznej czy zmodyfikowanej ma ogromny wpływ na jej efekt końcowy. Przed zastosowaniem PDT w praktyce klinicznej są potrzebne dalsze badania, które w autorytatywny sposób potwierdzą, że zastosowanie tej terapii podniesie wskaźnik przeżywalności pacjentów, u których stwierdzono ten typ histologiczny nowotworu.

7. WNIOSKI

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach realizacji celu pracy, doprowadziły do sformułowania następujących wniosków:

1. Klasyczna reakcja fotodynamiczna z zastosowaniem Photofrinu, przy dobraniu optymalnych warunków może być skuteczną metodą w usuwaniu komórek raka jasnokomórkowego jajnika.
2. Photofrin jest sprawdzonym fotouczulaczem, który może być stosowany z pozytywnym skutkiem do reakcji fotodynamicznych komórek raka jasnokomórkowego jajnika.
3. Komórki OvBH-1 po zastosowaniu klasycznej reakcji fotodynamicznej z zastosowaniem optymalnych warunków reakcji umierają na drodze nekrozy.
4. Modyfikacja klasycznej reakcji fotodynamicznej 2-metoksyestradiolem w istotny sposób podwyższa efektywność reakcji, zwiększa proces usuwania i hamuje proliferację komórek raka jasnokomórkowego jajnika.
5. 2-metoksyestradiol w ustalonych przez nas schematach doświadczenia był skutecznym inhibitorem dysmutazy nadtlenkowej, jednego z kluczowych enzymów odpowiedzialnych za eliminację anionorodnika nadtlenkowego.
6. W połączeniu z klasyczną PDT 2-metoksyestradiol w pośredni sposób wpływa na stabilizację białka p53 przez jego fosforylację (wyjaśnienie mechanizmu tego zjawiska wymaga dalszych badań).
7. Komórki raka jasnokomórkowego jajnika poddane zmodyfikowanej reakcji fotodynamicznej umierają na drodze apoptozy, która jest preferowanym sposobem eliminacji komórek nowotworowych.

8. PIŚMIENICTWO

1. Ackroyd R., Kelty C., Brown N., Reed M.: The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 2001; 74(5): 656-669.
2. Agarwal M.L., Clay M., Harvey E.J., Evans H.H., Antunez A.R., Oleinick N.L.: Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 1991; 51: 5993-5996.
3. Agostinis P., Buytaert E., Breysens H., Hendriccx N.: Regulatory pathways in photodynamic therapy induces apoptosis, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3: 721-729.
4. Alexandrova R., Mileva M., Zvetkova E.: Nitric oxide and cancer. *Exp. Pathol. Parasitol.* 2001; 4: 13-18.
5. Allison R., Cuenca R., Downie G., Randall M., Bagnato V., Sibata C.: PD/PDT for gynecological disease: A clinical review. *Photodiagn. Photodyn. Therapy* 2005; 2, 51-63.
6. Almeida R.D., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B.: Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1704: 59-86.
7. Apella E., Anderson C.W.: Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268: 2764-2772.
8. Assencio M., Delemer M., Farine M.O., Jouve E., Collinet P., Mordon S.: Evaluation of ALA-PDT of ovarian cancer in the Fisher 344 rat tumor model. *Photodiagn. Photodyn. Therapy.* 2007; 4: 254-260.
9. Athar M., Mukhtar H., Elmets C.A., Zaim M.T., Lloyd J.R., Bickers D.R.: In situ evidence for the involvement of superoxide anions in cutaneous porphyrin photosensitization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 151: 1054-1059.
10. Bailey M.S., Lander A., Darley-Usmar V.: Mitochondrial proteomics in free radical research. *Free Rad. Biol. Med.* 2005; 38: 531-549.
11. Bakan E., Taysi S., Polat M.F., Dalga S., Umudum Z., Bakan N., Metehan G.: Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. *Jpn J. Clin. Oncol.* 2002; 32: 162-166.
12. Balcerczyk A., Bartosz G.: Thiols are main determinants of total antioxidant capacity of cellular homogenates. *Free Radic. Res.* 2003; 37: 537-541.

13. Balch C., Huang T.H.M., Brown R., Nephew K.P.: The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *Am. J. Obstet Gynecol.* 2004; 191: 1552-1572.
14. Bannaceur-Griscelli A., Bosq J., Kościelny S., Turhan A., Brousse N., Hermie O., Ribrag V.: High level of glutathione γ -L-transferase π expression in mantle cell lymphomas. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 3029-3034.
15. Bar J., Grylewski P., Popiela A.: Ekspresja P-glikoproteiny w nabłonkowych rakach jajnika. *Nowotwory* 1999; 49: 392-397.
16. Bar J.K., Harłodzińska A.: Morphological and phenotypic characterization of a new established ovarian carcinoma cell line (OvBH-1). *Anticancer Res.* 2000; 20: 2975-2980.
17. Bar J.K., Harłodzińska A., Popiela A., Noga L.: Expression and mutation of p53 in tumor effusion cells of patients with ovarian carcinoma: responses to cisplatin-based chemotherapy. *Tumor Biology* 2001; 22: 83-91.
18. Bar J.K., Harłodzińska A., Kartarius S., Montenaar M., Wyrodek E., Rodriguez Parktina J.M., Kochman M., Ożyhar A.: Temperature-sensitive ovarian carcinoma cell Line (OvBH-1). *Jpn J. Cancer Res.* 2002; 93: 976-985.
19. Bar J.K., Saczko J., Ziółkowski P., Chwiłkowska A., Słomska I., Drag-Zalesińska M., Wysocka T., Duś D.: Photofrin II-based photosensitization of human ovarian clear-cell carcinoma cell line (OvBH-1). *Pharmacol. Rep.* 2007; 59, (1) 1; 150-160.
20. Bartosz G.: Strategia ataku. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
21. Beckman J.S.: Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrate. *Chem. Res. Toxicol.* 1996; 9: 836-844.
22. Bellamy C.O.: p53 and apoptosis. *Br. Med. Bull.* 1997; 53: 522-538.
23. Benchimol S.: P53-An examination of sibling support in apoptosis control. *Cancer Cell* 2004; 3-4.
24. Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., Dietze A., Pramickaite L., Bonsted A., Engesaeter Boento M.P., Hurteau J., Rodriguez G.C.: The biology of ovarian cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 1993; 5: 900-912.
25. Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., Dietze A., Prasmickaite L., Bonsted A., Engesaeter B.O., Angell-Petersen E., Warloe T., Frandsen N., Hogset A.: Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications, *J. Microsc.* 2005; 218 (2): 133-147.
26. Berns N.W.: Hematoporphyrin derivative photoradiation therapy. *Las. Surg. Medic.* 1984; 2: 1-4.
27. Biniszkiwicz T., Olejek A., Drebkowski A.: Photodynamic diagnosis in uterine cervix cancer. *Polish J. Med. Phys. Eng.* 2000; 6: 119-124.
28. Biniszkiwicz T., Drębowski A., Urban A., Sieroń A., Olejek A.: Zastosowanie metody fotodynamicznej w ginekologii. *Gin. Pol.* 2001; 10: 829-837.

29. Bjorge T., Lie A.K., Hovig E., Gislefoss R.E., Hansen S., Jellum E., Langseth H., Nusted K., Trope C.G., Derum A.: BRCA1 mutations in ovarian cancer and borderline tumours in Norway: a nested case-control study. *Br. J. Cancer* 2004; 91: 1829-1834.
30. Bognan C.H., Rölinghoff M., Diefenbach A.: Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin Immunol.* 2000; 12: 64-76.
31. Bookman M.A., Darcy K.M., Clarke-Peterson D., Boothby R.A., Horowitz I.R.: Evaluation of monoclonal humanized antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncologic Group. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 283-290.
32. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing, the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.* 1997; 272: 248-254.
33. Brewster W.R.: Temporal trends in ovarian cancer: incidence and mortality across Europe. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2; 2005; 286-287.
34. Brocker L.E., Krut F.A., Giaccone G.: Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 3155-3162.
35. Brown M.R., Blanchette J.O., Kochn E.C.: Angiogenesis in ovarian cancer. *Baillieres. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2000; 14: 901-918.
36. Brown S.B., Brown E.A., Walker I.: The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Onkol.* 2004; 5: 497-508.
37. Buytaert E., Callewaert C., Hendrickx N., Scorrano L., Hartman D., Missiaen L., Vandenheede J.R., Heirman I., Grooten J., Agostinis P.: Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *The FASEB Journal.* 2006; 20: 756-758.
38. Buytaert E., Galleweert G., Vandenheede J.R., Agostinis P.: Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 2006; 2: 238-240.
39. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P.: Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1776: 86-107.
40. Byrne A.T., O'Connor A.E., Hall M., Murtagh J., O'Neill K., Curran K.M., Mongrain K., Rousseau J.A., Lecomte R., McGee S., Callanan J.J., O'Shea D.F., Gallagher W.M.: Vascular-targeted photodynamic therapy with BF₂-chelated Tetraaryl-Azadipyromethyne agents: a multi-modality molecular imaging approach to therapeutic assessment. *Brit. J. Cancer.* 2009; 101: 1565-1573.

41. Cai K.Q., Albarracin C., Rosen D., Zhong R., Zheng W., Luthra R., Broaddus R., Liu J.: Microsatelity instability and alteration of the expression of hMLH1 and hMSH2 in ovarian clear cell carcinoma. *Hum. Pathol.* 2005; 35: 552-559.
42. Cacuci M., Filip A., Mureson A., Fratila S., Mocami T., Decee N.: Experimental study of increasing oxidative stress in PDT using chiroxy. *TMJ* 2009; 59: 322-328.
43. Capella M.A., Capella L.S.: A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. *J. Biomed. Science* 2003; 10 (4): 361-366.
44. Carthy C.M., Granville D.J., Jiang H., Levy J.G., Rudin C.M., Thompson C.B., McManus B.M., Hunt D.W.: Early release of mitochondrial cytochrome c and expression of mitochondrial epitope 7A6 with a porhilyn-derived photosensitizer: Bcl-2 and Bcl-xL overexpression do not prevent early mitochondrial events but still depress caspase activity. *Lab. Invest.* 1999; 79: 953-965.
45. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.: Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiag. Photodyn. Ter.* 2005; 2: 1-23.
46. Cattaruzza M., Hecker M.: Protein carbonylation and decarbonylation: a new twist complex response of vascular cells to oxidative stress. *Circ. Res.* 2008; 102: 273-274.
47. Chauhan D.P., Yang Q., Carethers J.M., Marra G., Chang C.L., Chamberlain S.M., Boland C.R.: Antisense inhibition of hMLH1 is not sufficient for loss of DNA mismatch repair function in the HCT116 + chromosome 3 cell line. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 3827-3831.
48. Chen B., Roskams Y., Agostinis P., de Witte P.A.: Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the mice RIF-1 mouse tumor model. *Int. J. Cancer* 2002; 98: 284-290.
49. Chiaffarino F., Parazzini F., Negri E., Benzi G., Scarfone G., Franceschi S., Vecchia S.: Time since Last Birth and the Risk of Ovarian Cancer Gynecologic. *Oncology* 2001; 81: 233-236.
50. Chiaravalli A.M., Furlan D., Facco C., Tibiletti M.G., Dionigi A., Casati B., Albarello L., Riva C., Capella C.: Immunohistochemical pattern of hMSH2/hMLH1 in familial and sporadic colorectal, gastric, endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences. *Virchows Arch.* 2001; 438: 39-48.
51. Collela G., Vikhanskaya F., Codegani A.M., Bonazzi C., Incalci M.D., Brogini M.: hMLH1 and hMSH2 expression and BAX frameshift mutations in ovarian cancer cell lines and tumors. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 691-694.
52. Collins A.R.: Comet assay-principles, applications, and limitations. *Meth. Mol. Biol.* 2002; 203: 163-177.

53. Corti L., Mazzarotto R., Belfontali S., De Luca C., Baiocchi C., Boso C., Calzavara F.: Photodynamic therapy in gynaecological neoplastic diseases. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1996; 36: 2: 193-197.
54. Corti L., Boso C.: Photodynamic Therapy in Recurring Gynecologic Cancer. *Photomedicine in Gynecology and Reproduction.* Basel, Karger 2000; 278-284.
55. Cory S., Huang D.C., Adams J.M.: The Bcl₂ family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 2003; 22: 8590-8607.
56. Cramer D., Welch W.: Determinants of ovarian cancer risk. Inferences regarding pathogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1983; 71: 717-721.
57. Croce A.C., Supino R., Lanza K.S., Locatelli D., Baglioni P., Bottiroli G.: Photosensitizer accumulation in spontaneous multidrug resistant cell: a comparative study with Rhodamine 123, Rose Bengal acetate and Photofrin®. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2001; 1: 71-78.
58. Croce A.C., Supino R., Lanza K.S., Locatelli D., Baglioni P., Bottiroli G.: Photosensitizer accumulation spontaneous multidrug resistance cells: a comparative study with Rodamine 123, Rose Bengal acetate and Photofrin. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002; 1: 71-77.
59. Das U.: A radical approach to cancer. *Med. Sci. Monitor* 2002; 8: 79-92.
60. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R.: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chimica Acta.* 2003.
61. Dean M., Hamon Y., Chimini G.: The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid. Res.* 2001; 42: 1007-1017.
62. Dean M., Fojo T., Bates S., Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5: 275-286.
63. Del Carmen M.G., Rizvi I., Chang Y., Moor A.C., Oliva E., Sherwood M., Pogue B., Hasan T.: Synergism of epidermal growth factor receptor-targeted immunotherapy with photodynamic treatment of ovarian cancer *in vivo*. *J. Nat. Cancer Inst.* 2005; 20: 1516-1524.
64. Dellinger M.: Apoptosis or necrosis following photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem. Photobiol.* 1996; 64:182-187.
65. Diamandis E.P.: Oncogenes and tumor suppressor genes: new biochemical tests. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1992; 29: 269-305.
66. Dolgachev V., Oberley L.W., Huang T.T., Kranik J.M., Tainisky M.A., Hanada K., Separovic D.: A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 332: 411-417.
67. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K.: Photodynamic therapy for cancer, *Nature* 2003; 5: 380-387.

68. Don A.S., Hogg P.J.: Mitochondria as cancer drug targets. *Trens. Mol. Med.* 2004; 10: 372-378.
69. Dougherty T.J.: Activated dyes as anti-tumor agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974; 52: 1333-1336.
70. Dougherty T.J., Grindey G.B., Fiel R., Weishaupt K.R., Boyle D.G.: Photoradiation therapy II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.* 1975; 55: 115.
71. Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weishaupt K.R., Boyle D., Mittleman A.: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 1978; 38: 2628-2635.
72. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbely M., Moan J., Peng Q.: Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90: 889-905.
73. Dröge W.: Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 47-95.
74. Duska L.R., Hamblin M.R., Miller J.L., Hasan T.: Combination of photoimmunotherapy and cisplatin: effects on human ovarian cancer ex vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 18: 1557-1563.
75. Edinger A.L., Thompson C.B.: Death by design apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004; 16: 663-669.
76. Edmondson R.J., Monaghan J.M.: The epidemiology of ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2001; 11: 423-429.
77. El-Deiry W.S.: The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* 2003; 22: 7486-7495.
78. Eljamel M.S.: Brain PDD and PDT unlocking the mystery of malignant gliomas, *Photodiag. Photodyn. Therapy* 2004; 1: 303-310.
79. Fannjiang Y., Kim C.H., Haganir R.L.: BAK alters neuronal excitability and can switch from anti-to pro-death function during postnatal development. *Dev. Cell.* 2003; 4: 575-585.
80. Faraci F.M., Didion S.P.: Vascular Protection: Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1367-1373.
81. Fathalla M.: Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia. *Lancet.* 1971, 2: 163.
82. Fehr M.K., Madsen S.J., Svaasand L.O., Tromberg B.J., Eusebio J., Berns M.W., Tadir Y.: Intrauterine light delivery for photodynamic therapy of the human endometrium. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 3067-3072.
83. Filip A., Clichici S., Muresan A.: Effects of PDT with 5-aminolevulinic acid and Cytosin on Walker carcinoma. *Exp. Oncol.* 2008; 30 (3): 1-2.
84. Fingar V.H., Taber S.W., Haydon P.S., Harrison L.T., Kempf S.J., Wieman T.J.: Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a

- view and comparison of effectclinical and clinical models at the University of Louisville. *In vivo* 2000; 14: 93-100.
85. Fisher A.M.R., Danenberg K., Banerjee D., Bertino R., Danenberg P., Gomer C.J.: Increased photosensitivity in HL 60 cells expressing wild-type p53. *J. Photochem. Photobiol.* 1997; 66: 265-270.
 86. Fisher A.M.R., Rucker S., Wong S., Gomer C.J.: Differential photosensitivity in wide-type and mutant p53 hman colon carcinoma cell lines. *J. Photochem. Photobiol.* 1998; 42: 104-107.
 87. Fisher A.M.R., Ferrario A., Rucker N., Zhang S., Gomer C.J.: Photodynamic therapy sensitivity is not altered in human cells after abrogation of p53 function . *Cancer Res.* 1999; 59: 331-335.
 88. Furre I.E., Shahzidi S., Luksiene Z., Moller M.T.N., Borgen E., Morgan J., Tkacz-Stachowska K., Nesland J.M., Peng Q.: Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 11051-11060.
 89. Gallagher E.P., Gardner J.L., Barber D.S.: Several glutathione-S transferase isozymes that protect against injury are expressed in human liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71: 1619-1628.
 90. Gannon M.J., Johnson N., Roberts D.J., Holroyd J.A., Vernon D.I., Brown S.B., Lilford R.J.: Photosensitization of the endometrium with topical 5-aminolevulinic acid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995; 173:1826-1828.
 91. Gasparini G., Longo R., Fanelli M., Beverly A.: Skojarzenie terapii antyangiogenowej z innymi strategiami leczenia nowotworów: wyniki, wyzwania i pytania, na które oczekujemy odpowiedzi. *J. Clin. Oncol. Wyd. Polskie.* 2005; 3: 428-447.
 92. Gate L., Paul J., Nguyen Ba G., Tew K.D., Tapiero H.: Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed. Pharmacother.* 1999; 53:169-180.
 93. Gilaberte Y., Saenz-Santamaria M.C., Carapeto F.J., Pereboom D., Alda J.O.: Intracellular production of superoxide anion in photodynamic therapy with ALA. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 1995; 5: 166-167.
 94. Gilaberte Y., Pereboom D., Carapeto F.J., Alda J.O.: Flow cytometry study of the role of superoxide anion and hydrogen peroxide in cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1997; 13: 43-49.
 95. Gilissen M.J., van de Merbel-de Wit L.E., Star W.M., Koster J.F., Sluiter W.: Effect of photodynamic therapy on the endothelium dependent relaxation of isolated rat aortas. *Cancer Res.* 1993; 53: 2548-2552.
 96. Girotti A.W.: Mechanisms of lipid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1985; 1: 87-95.

97. Girotti A.W.: Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2001; 63: 103-113.
98. Gold M. H.: Photodynamic therapy update. *Journal of Drugs of Dermatology.* 2007; 6 (11): 1141-1148.
99. Gollnick S.O., Kabingu E., Kousis P.C., Henderson B.W.: Stimulation of the host immune response by photodynamic therapy (PDT). *Proceedings of SPIE, Laser Interaction with tissue and cells XV*, 2004; 5319: 60-70.
100. Gollnick S.O., Liu X., Owczarczak B., Musser D.A., Henderson B.W.: Altered expression of interleukin 6 and 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res.* 1997; 57: 3904-3909.
101. Gołąb J., Nowis D., Skrzycki M., Czeczot H., Barańczyk-Kuźma A., Wilczyński G.M., Makowski M., Mróz P., Kozar K., Kamiński R., Jalili A., Kopec M., Grzela T., Jakóbisiak M.: Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-Methoksyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2003; 3: 407-414.
102. Gomes E.R., Almada R.D., Carvalho A.P., Duarte C.B.: Nitric oxide modulates tumor cell death induced by photodynamic therapy through a cGMP-dependent mechanism. *Photochem. Photobiol.* 2002; 76: 423-430.
103. Gottesman M.M.: Mechanisms of cancer drug resistance. *Ann. Rev. Med.* 2002; 53: 615-627.
104. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E.: Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 48-58.
105. Graczyk A.: Biochemiczne i biofizyczne podstawy fotodynamicznej metody wykrywania i leczenia nowotworów. Graczykowska A.: Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów. Dom wydawniczy Bellona, Warszawa 1999.
106. Graczyk A.: Fotosensybilizatory używane do diagnostyki i terapii nowotworów metodą fotodynamiczną. *Terapia* 2001; 8, 2: 110.
107. Granville D.J., McManus B.M., Hunt D.W.C.: Photodynamic therapy: shedding light on biochemical pathways regulating porphyrin-mediated cell death. *Histol. Histopathol.* 2001, 16: 309-317.
108. Gray M.J., Lipson R.L, Maeck J.V.S., Parker L., Romeyn D.: Use of hemato-porphyrin derivative in detection and management of cervical cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1967; 99: 766-771.
109. Griffiths S.J., Heelis P.F., Haylett A.K., Moore J.V.: Photodynamic therapy of ovarian tumours and normal cells using 5,10,15,20-tetra-(3-carboxymethoxyphenol)-chlorin. *Cancer Letters.* 1998; 1: 177-184.
110. Griffiths H.R, Moller L., Bartosz G., Bast A., Bertoni-Freddari C., Collins A., Cooke M., Coolen S., Haenen G., Hoberg A.M., Loft S., Lunec J., Olinski R.,

- Parry J., Pompella A., Poulsen H.E., Verhagen H., Astley S.B.: Chap 3; Biomarkers. In *Molecular Aspects of Medicine* 2002; 23: 101-208.
111. Gross S.S., Wolin M.S.: Nitric Oxide: Pathophysiological Mechanisms. *Ann. Rev. Physiol.* 1995; 57: 737-769.
112. Grylewski P., Bar J.K., Rabczyński J., Gabryś M.: Ekspresja białka hMLH1 w nowotworach jajnika. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2002; 1: 333-339.
113. Guo ZM., Van Remmen H., Yang H., Chen XL., Mele J., Vijg J., Epstein CJ., Ho YS., Richardson A.: Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1131-1138.
114. Gupta S., Ahmed N., Mukhtar H.: Involvement of nitric oxide during photalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 1998; 58: 1785-1788.
115. Hahn S.M., Put M.E., Shin D.B., Richter E., Menon C., Smith D., Glastein E. et al.: Photofrin uptake in the tumor and normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy for patients with intraperitoneal photodynamic therapy. *Clin. Cancer Ther. Res.* 2006; 15: 5464-5470.
116. Halliwell B., Gutteridge J.M.: The definition and measurement of antioxidants in biological systems *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18: 125-126.
117. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: *Free radicals in biology and medicine* Oxford, UK: Clarendon 2001.
118. Hamblin M.R., Newman E.L.: Photosensitizer targeting in photodynamic therapy I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 1994; 26: 45-56.
119. Hamblin M.R., Mróz P., Jakóbsiak M., Gołąb J.: Proteasome Inhibition Potentiates Antitumor Effects of Photodynamic Therapy in Mice through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response. *Cancer Res.* 2009; 69: 4235-4243.
120. Harłodzińska A., Bar J.K., Sobańska E., Goluda M.: P53, cerb-2 and p21ras expression in tumor effusion cells of patients with histopathology different ovarian neoplasms. *Anticancer Res.* 1997; 17: 3545-3552.
121. Heinzelmann-Schwarz V., Rene A.F., Walt H.H., Haller U., Fink D.: Role of p53 and ATM in photodynamic therapy-induced apoptosis. *Las. Surg. Med.* 2003; 33: 182-189.
122. Henderson B.W., Waldow S.M., Mang T.S., Potter W.R., Malone P.B., Dougherty T.J.: Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Res.* 1985; 45: 572-576.
123. Henderson B.W., Dougherty T.J.: How does photodynamic work? *Photochem. Photobiol.* 1992; 55: 145-157.

124. Henderson C.J., Smith A.G., Ure J., Brown K., Bacon E.J., Wolf C.R.: Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 5275-5280.
125. Heizelman-Schwarz V., Fedier A., Hornung R., Walt H., Haller U., Fink D.: Role of p53 and ATM in photodynamic therapy-induced apoptosis. *Las. Sur. Med.* 2003; 182-189.
126. Hileman E.O., Liu J., Albitar M., Keating M.J., Huang P.: Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biological basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004; 53: 209-219.
127. Hilf R.: Mitochondria are target of photodynamic therapy. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007; 39: 85-89.
128. Hongrapipat J., Kopeckova P., Prakongpan S., Kopecek J.: Combination chemotherapy and photodynamic therapy with fragment targeted HPMA Copolymer conjugates In human ovarian carcinoma cells. *Mol. Pharmaceutics* 2008; 5: 696-709.
129. Honigsmann H.: Photodynamic therapy-moving under the right light. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2004; 2: 981-982.
130. Horodyjewska A., Pasternak K.: Apoptotyczna śmierć komórki. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2005; 14: 545-554.
131. Hoskins. In: Barakat R.R., Markman M.R., editors. *Principles and practice of gynecologic oncology*, vol 1, 4th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; 1131.
132. Hu Y., Rosen D.G., Zhou Y., Feng L., Yang G., Liu J., Huang P.: Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 39485-39492.
133. Huang P., Feng L., Oldham E.A., Keating M.J., Plunkett W.: Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, 2000; 407: 390-395.
134. Huang T.T., Carlson E.J., Kozy H.M., Mantha S., Goodman S.I., Ursell P.C., Epstein C.J.: Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 1101-1100.
135. Ichikawa Y., Lemon S.J., Wang S., Franklin B., Watson P., Knezetic J.A., Bewtra Ch., Lynch H.T.: Microsatellite Instability and Expression of MLH1 and MSH2 in Normal and Malignant Endometrial and Ovarian Epithelium in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Family Members. *Cancer Gen. Cytogen.* 1999; 112: 2-8.
136. Ichikawa K., Takeuchi Y., Yonezawa S., Hikita T., Kurohane K., Namba Y., Oko N.: Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) using Visudyne causes effective suppression of tumor growth. *Cancer Lett.* 2004; 205: 39-48.

137. Inanami O., Yoshito A., Takahashi K., Hiraoka W., Kuwabara M.: Effects of BAPTA-AM and forskolin on apoptosis and cytochrome c release in photosensitized Chinese hamster V79 cells. *Photochem. Photobiol.* 1999; 70: 650-655.
138. Izquierdo M.A., van der Zee A., Vermorken J.B., van der Vaik P., Belien J.A.M., Giaccone G., Scheffer G.L., Flens M.J., Pinedo H.M., Kenemans P., Meijer C.J.L.M., de Vries E.G.E., Scheper R.J.: Drug resistance-associated marker LRP for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995; 87: 1230-1237.
139. Jalili A., Makowski M., Świtaj T., Nowis D., Wilczyński G.M., Wilczek E., Chorąży-Massalska M., Radzikowska A., Maśliński M., Biały Ł., Sieńko J., Sieroń A., Adamek M., Basak G., Mróz P., Krasnodębski W., Jakóbiśiak M., Gołąb J.: Effective Photoimmunotherapy of Murine Colon Carcinoma Induced by the Combination of Photodynamic Ther. *Dendr. Cells. Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 4498-4508.
140. Jansen A.M., Bosman C.B., van Duijn W., Oostendorp-van De Ruit M.M., Kubben F.J., Griffioen G., Lamers C.B., Van Krieken J.H., van de Velde C.J., Verspaget H.W.: Superoxide dismutase in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 3183-3192.
141. Jhaveri M., Morrow C.S.: Contribution of proximal promoter elements to the regulation of basal and differential glutathione S-transferase Pi gene expression in human breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 9:179-190.
142. Juzeniene A., Nielson K.P., Moan J.: Biophysical aspects of photodynamic therapy. *J. Environ. Patrol. Toxicol. Oncol.* 2006; 155: 73-82.
143. Juzeniene A., Juzenas P., Ma L.W., Iani V., Moan J.: Topical application of 5-aminolaevulinic acid, metyl 5-aminolaevuli nate and hexyl 5-aminolaevulinate on normal human skin. *Br. J. Dermatol.* 2006; 155: 791-799.
144. Kaczmarek-Borowska B., Trelińska-Nowosad T., Karolewski K., Jóźwik P.: Leczenie celowane w raku jajnika – na jakim etapie jesteście? *Współcz. Onkol.* 2007; 11: 492-497.
145. Kamangar F., Dores G.M., Anderson W.F.: Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 2137-2150.
146. Kargas C.H., Walter Z.: Znaczenie polimorfizmów genów transferaz glutationowych człowieka. *Post. Bioch.* 2003; 49: 85-95.
147. Kato H.: History of photodynamic therapy – past, present and future, *Gan To Kagaku Ryoho* 1996; 23: 8-15.

148. Kato S., Sadarangani A., Lange S., Villalon M., Branes J., Brosnes J.J., Owen G.I., Cuello M.: The oestrogen metabolite 2-metoksyestradiol alone or in combination with tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediates apoptosis in cancerous but not healthy cells of the human endometrium. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14: 351-368.
149. Kelly E.E., Buettner G.R., Burns C.P.: Production of lipid-derived free radicals in L1210 murine leukemia cells is an early oxidative event in the photodynamic action of Photofrin®. *Photochem. Photobiol.* 1997; 65: 576-580.
150. Kessel D., Erickson C.: Porphyrin photosensitization of multidrugresistance cell types. *Photochem. Photobiol.* 1992; 55: 397-399.
151. Kessel D., Luo Y., Deng Y., Chang C.K.: The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1997; 65: 422-426.
152. Kessel D., Luo Y.: Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1998; 42: 89-95.
153. Kessel D.: Photodynamic therapy: from beginning. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2004; 1: 3-7.
154. Kessel D., Vicente G.H., Reiners J.J.: Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Las. Surg. Med.* 2006; 38: 482-488.
155. Kessel D., Reiners J.J.: Initiation of apoptosis and autophagy by the Bcl-2 antagonist Ha14-1, *Cancer Letters.* 2007; 8: 294-299.
156. Kick G., Messer G., Goetz A., Plewig G., Kind P.: Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF-kappaB DNA binding. *Cancer Res.* 1995; 55: 2373-2379.
157. Kiesslich T., Plaetzer K., Oberdanner C.B., Berlanda J., Obermair F.J., Krammer B.: Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction. *FEBS Letters* 2005; 579: 185-190.
158. King B.L., Carcangiu M.L., Carter D.: Microsatellite instability in ovarian neoplasms. *Br. J. Cancer* 1995; 72: 376-382.
159. Kinsella J.T., Colussi V.C., Oleinick N.L., Sibata C.H.: Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2001; 2:917-927.
160. Klein S.D., Walt H., Rocha S., Ghafourifar P., Pruschy M., Winterhalter K.H., Richter C.: Overexpression of Bcl-2 enhances sensitivity of L929 cells to a lipophilic cationic photosensitizer. *Cell Death. Differ.* 2001; 8: 204-206.
161. Kmet L.M., Cook L.S., Magliocco A.M.: A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. 2002; 2: 389-404.

162. Korbelik M., Krosł G.: Accumulation of benzoporphyrin derivative in malignant and host cell populations of the murine RIF tumor. *Cancer Lett*, 1995; 97: 249-254.
163. Korbelik M.: Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J. Clin. Las. Med. Surg.* 1996; 14: 329-334.
164. Korbelik M., Parkins C.S., Shibuya H., Cecic I., Stratford M.R.L., Chaplin D.J.: Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. *Br. J. Cancer* 2000; 1835-1843.
165. Korbelik M., Sun J., Cecic I., Serrano K.: Ajuvant treatment for complement activation increases the effectiveness of photodynamic therapy of solid tumors. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3: 812-816.
166. Korell M., Untch M., Abels C., Dellian M., Kirschstein M., Baumgartner R., Beyer W., Goetz A.E.: Use of photodynamic laser therapy in gynecology. *Gyn. Geburtshilfliche Rundsch.* 1995; 35: 90-97.
167. Kosuke S., Oku N.: Cancer anti-angiogenic therapy. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27: 599-605.
168. Krammer B.: Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer. Res.* 2001; 21: 4271-4277.
169. Krimbacher E., Zeimet A.G., Marth C., Kostron H.: Photodynamic therapy for recurrent gynecologic malignancy: a raport on 4 cases. *Gyn. Obstet.* 1999; 262: 193-197.
170. Kroemer G., Gallzii L., Brenner C.: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 99-163.
171. Kulbacka J., Chwiłkowska A., Bar J., Poła A., Banaś T., Gamian A., Saczko J.: Oxidative alterations induced in vitro by the photodynamic reaction in doxorubicin-sensitive (LoVo) and -resistant (LoVoDX) colon adenocarcinoma cells. *Exp. Biol. Med.* 2010; 235: 98-110.
172. Kurohane K., Tominaga A., Sato K., North J.R., Namba Y., Oku N.: Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels. *Cancer Lett.* 2001; 167: 49-56.
173. Kusakari T., Kariya M., Mandai M., Tsurata Y., Hamid A.A., Fukuhara K., Nanbu K., Takakura K., Fujii S.: C-erb-2 or mutant Ha-ras induced malignant transformation of immortalized human ovariian surface epithelial cells in vitro. *Br. J. Cancer* 2003; 89: 2293-2298.
174. Kwietniewski M., Juzeniene A., Głosnicka R., Moon J.: Immunotherapy: a way to improve the therapeutic outcome of photodynamic therapy *Photochem. Photobiol. Scien.* 2008; 71011-1017.
175. Lairmore T.C., Norton J.A.: Advances in molecular genetics. *Am. J. Surg.* 1997; 173: 37-41.
176. Lakhani N.J., Sarkar M., Venitz J., Figg W.D.: 2-Methoksyestradiol, a promising anticancer agent. *Pharmacother.* 2003; 23: 165-172.

177. Lala P.K., Orucevic A.: Role of nitric oxide in tumor progression: Lessons from experimental tumors. *Cancer Met. Rev.* 1998; 17: 91-106.
178. Lane D. P., Lu X., Hupp T., Hall P.A.: The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1994; 345: 277-280.
179. LaVallee T.M., Zhan X.H., Herbstritt C.J., Kough E.C., Green S.J., Pribluda V.S.: 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Research.* 2002; 62: 3691-3697.
180. LaVallee T.M., Zhan X.H., Johnson M.S., Herbstritt C.J., Swartz G., Williams M.S., Hembrough W.A., Green S.J., Pribluda V.S.: 2-Methoxyestradiol up-regulates death receptor 5 and induces apoptosis through activation of the extrinsic pathway. *Cancer Research.* 2003; 63: 468-475.
181. Lenartowicz E., Wudarczyk J., Dębska G.: Regulacja stopnia oksydoredukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych. *Post. Bioch.* 1996; 42: 154-161.
182. Levin E.D., Christopher N.C., Crapo J.D.: Memory decline of aging reduced by extracellular superoxide dismutase overexpression. *Behav. Genet.* 2005; 35: 447-453.
183. Li A.J., Baldwin R.L., Karlan B.Y.: Estrogen and progesterone receptors subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003; 22-27.
184. Liang H., Shin D.S., Lee Y.E., Nguyen D.C., Kasravi S., Do T., Aurasteh P., Berns M.W.: Subcellular phototoxicity of Photofrin-II and Lutetium Texaphyrin in cells in vitro. *Las. Med. Sci.* 2000; 15: 109-122.
185. Liczmański A.E.: Toksyczność tlenu I. Uszkodzenia żywych komórek. *Post. Bioch.* 1988a; 34: 273-292.
186. Liczmański A.E.: Toksyczność tlenu II. Mechanizmy obronne. *Post. Bioch.* 1988b; 34: 298-310.
187. Lipson R.L., Blades E.J.: The photodynamic properties of a particular hemathoporphyrin derivative. *Arch. Dermatol.* 1960; 82: 508-516.
188. Lipson R.L., Blades E.J., Olsen A.M.: The use of an derivative of hemathoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Inst.* 1961; 26: 1-11.
189. Luksiene Z.; Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina* 2003; 39 (12): 1137-50.
190. Łuszczewski A., Matyska-Piekarska E., Trefer J., Wawel I., Łącki J.: Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologicznych. *Reumatologia* 2007; 5: 284-289.
191. MacLachlan T.K., El-Deiry W.S.: Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99, 9492-9497.

192. Madry R.: Chemioterapia raka jajnika. W: Ginekologia Onkologiczna. Markowska J. (red.). Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner Wrocław 2006; 894-909.
193. Marmur E.S., Schmults C.D., Goldberg D.J.: A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol. Surg.* 2004; 30 (2 Pt 2): 264-271.
194. Marnett L.J.: Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 2002; 181: 219-222.
195. Martin K.R., Barrett J.C.: Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signalling versus high-dose toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 2002; 21: 71-75.
196. Matruole J.V., Bonizzi G., Morliere P.: Pyropheophorbide-a methyl ester-mediated photosensitisation activates transcription factor NF-kappaB through the interleukin-1 receptor dependent signaling pat. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (5): 2988-3000.
197. Maziak D.E., Markman B.R., MacKay J.A., Evans W.K.: Photodynamic therapy in nonsmall cell lung cancer: a systematic review. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 77 (4): 1484-1491.
198. Meglioriano R., Shi F., Peng X., Wang X., Chan E.K.L., Tan E.M.: Autoimmune response to anti-apoptotic protein survivin and its association with antibodies to p53 and c-myc in cancer detection. *Cancer Det. Prev.* 2005; 29: 241-248.
199. Merriam G.R., MacLusky N.J., Picard M.K., Naftolin F.: Comparative properties of the catechol estrogens, I: methylation by catechol-O-methyltransferase and binding to cytosol estrogen receptors. *Steroids.* 1980; 36: 1-11.
200. Michalak K., Hendrich A.B.: Rola lipidów błony komórkowej w zjawisku oporności wielolekowej i jego modulacji. *Post. Bioch.* 2002; 48: 208-219.
201. Miedzińska-Maciejewska M., Wcisło G.: Mechanizmy oporności wielolekowej w raku jajnika. *Przegl. Lek.* 2002; 59: 854-858.
202. Moan J., Berg K.: The photodegradation of porphyrins in cell can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 1991; 53: 549-553.
203. Moan J., Peng Q.: An outline of the hundred-year history of PDT. *Anti-cancer Res.* 2003; 23: 3591-3600.
204. Modugno F., Moslehi R., Ness R.B., Nelson D.B., Bell S., Kant J.A., Wheeler J.E., Fishman D., Karlen B., Risch J., Cramer D.W., Dube M., Narod S.A.: Reproductive factors and ovarian cancer risk in Jewish BRCA1 and BRCA2 mutation carriers (United States). *Cancer Cause Control.* 2003; 214: 439-446.
205. Mooberry S.: Mechanism of action of 2-metoksyestradiol: new developments. *Drug Res.* 2003; 6: 355-361.

206. Mooberry S.L.: New insights into 2-methoxyestradiol, a promising antiangiogenic and antitumor agent. *Cur. Opp. Oncol.* 2003; 15: 425-430.
207. Moor A.: Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2000; 57: 1-13.
208. Mostowy A., Misiak A., Bilska-Urban A., Sierot A.: Nowe możliwości zastosowania metody fotodynamicznej w leczeniu chorób infekcyjnych. New approaches to antimicrobial photodynamic therapy. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2007; 61: 439-442.
209. Muroya T., Suehiro Y., Umayahara K., Akiya T., Iwabuchi H., Sakunaga H., Sakamoto M., Sugishita T., Tenjin Y.: Photodynamic therapy (PDT) for early cervical cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1996; Jan. 23 (1): 47-56.
210. Muschter R.: Photodynamic therapy: a new approach to prostate cancer. *Curr. Urol. Rep.* 2003; 4 (3): 221-228.
211. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J.: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98-103.
212. Nakano T., Oka K., Taniguchi N.: Manganese superoxide dismutase expression correlates with p53 status and local recurrence of cervical carcinoma treated with radiation therapy. *Cancer Res.* 1996; 56: 2771-2775.
213. Nicco C., Laurent A., Chereau C., Weill B., Batteux F.: Differential modulation of normal and tumour cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed. Pharmacother.* 2005; 59: 169-174.
214. Nidernhofer L.J., Daniels J.S., Rouzer C.A., Greene R.E., Marnett L.J.: Malonaldehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 31426-31433.
215. Niziołek M., Korytowski W., Girotti A.W.: Nitric oxide inhibition of free radical-mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells. *Free Rad. Biol. Med.* 2003; 8: 997-1005.
216. Nowak R., Taraasiuk J.: Hamowanie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków przeciwnowotworowych. *Post. Bioch.* 2004; 50: 330-343.
217. Nowis D., Makowski M., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Gołąb J.: Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Bioch. Pol.* 2005; 52: 339-352.
218. Nowis D., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Jakóbisiak M., Gołąb J.: The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiag. Photod. Therapy.* 2005; 2: 283-298.
219. Nowis D., Szokalska A., Makowski M., Winiarska M., Gołąb J.: Improvement of antitumor activity of photodynamic therapy through inhibition of cytoprotective mechanism in tumor cells. *Photodynamic therapy:*

- Back to the Future, edited by David H Kessel, Proc of SPIE 2009; SPIE; 7380: 73804F:1-10.
220. Oakley A.J.: Gluthatione transferases: new functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005; 15: 716-723.
 221. Oberdanner C.B., Kiesslich T., Krammer B., Plaetzer K.: Glucose is required to maintain high ATP-levels for the energy-utilizing steps during PDT-induced apoptosis. *Photochem. Photobiol.* 2002; 76: 695-703.
 222. Oberley L.W., Buettner G.R.: Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res.* 1979; 39: 1141-1149.
 223. Okada H., Mak T.W.: Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 592-603.
 224. Oku N., Asai T., Kurohane K., Watanabe K., Kuromi K., Namba Y., Ogino K., Taki T.: Cancer antineovascular therapy. *Cell Mol. Biol. Lett.* 2002; 7: 247-248.
 225. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I.: The role of apoptosis in response of photodynamic therapy: what, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002; 1: 1-21.
 226. Olejek A., Biniszkiwicz T., Urban A.: Photodynamic diagnosis of epithelial vulvar diseases. 2000; 6: 153-157.
 227. Olejek A., Rembielak-Stawecka B., Kozak-Darmas I., Biniszkiwicz T., Sieroń A.: Diagnostyka i terapia fotodynamiczna w ginekologii-aktualny stan wiedzy. *Gin. Pol.* 2004, 75: 229-234.
 228. Olejek A., Kozak- Darmas I., Biniszkiwicz T., Kellas-Slecza S., Sieroń A.: Photodynamic therapy in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gin. Pol.* 2008; 79: 276-280.
 229. Olivio M., Al.-Seyed M.: Apoptosis signaling mechanisms in human cancer cells induced by Caphostin-PDT. *Int. J. Oncol.* 2007; 30: 537-548.
 230. Orth K., Hung J., Gazdar A., Bowcock A., Mathis J.M., Sambrook J.: Genetic instability in human ovarian cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91(20): 9495-9499.
 231. Page M.T., Quintana P.J.E., Ligutti J.A., Sabbadini R.A.: Cell death in cultured adult rat cardiomyocytes: use of the comet assay to distinguish apoptosis from necrosis. *Basic Appl. Myol.* 2000; 10(4): 159-170.
 232. Pałczyński B., Bwire Ekonjo G., Gryboś M.: Miejscowe zastosowanie kwasu aminolewulinowego w leczeniu dysplazji szyjki macicy metodą fotodynamiczną. *Acta Bio-Opt. Inf. Med.* 2002; 8: 115-127.
 233. Pass H.I.: Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85: 443-456.
 234. Patito I.A., Rothmann C., Malik Z.: Nuclear transport of photosensitizers during photosensitization and oxidative stress. *Biol. Cell* 2001; 93: 285-291.

235. Peng C.L., Lai P.S., Lin F.H., Wu S.Y.H., Shieh M.J.: Dual chemotherapy and photodynamic therapy in an HT-29 human colon cancer xenograft model using SN-38-loaded chlorin-core star block copolymer micelles. *Biomaterials* 2009; 3614-3625.
236. Pelicano H., Carney D., Huang P.: ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updates*. 2004; 7: 97-110.
237. Peller S.: Clinical implications of p53: effect on prognosis, tumor progression and chemotherapy response. *Semin. Cancer Biol.* 1998; 8: 379-387.
238. Pinton P., Giorgi C., Siverio R., Zecchini E., Rizzuto R.: Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 2008; 27: 6407-6418.
239. Plaetzer K., Kiesslich T., Verwanger T., Krammer B.: The modes of cell death induced by PDT: an overview. *Med. Las. Appl.* 2003; 18: 7-19.
240. Plevovova A., Sedlakova E., Zapletalova J., Krepelova A., Skypalova P., Kolar Z.: Expression of the hMLH1 and hMSH2 proteins in normal tissues relationship to cancer predisposition in hereditary non-polyposis colon cancer. *Virchows Arch.* 2005; 446:112-119.
241. Pogue B.W., Ortal B., Chen N., Redmond R.W., Hasan T.: A photobiological and photophysical-based study of phototoxicity of two chlorins. *Cancer Res.* 2001; 61: 717-724.
242. Ponczek M.B., Wachowicz B.: Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Post. Bioch.* 2005; 51: 140-145.
243. Ponczek M. B., Nowak P., Wachowicz B.: The effects of nitronium ion on nitration, carbonylation and coagulation of human fibrinogen. *Gen. Physiol. Biophys.* 2008; 27, 55-58.
244. Psyrris A., Kountourakis P., Yu Z., Papadimitriou C., Markakis S., Camp R. L., Economopoulos T. & Dimopoulos M.A. Analysis of p53 protein expression levels on ovarian cancer tissue microarray using automated quantitative analysis elucidates prognostic patient subsets. *An. Oncol.* 2007; 18: 709-715.
245. Qiang Y-G., Zhang X-P., Li J., Huang Z.: Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. *Chin. Med. J.* 2006; 119: 845-857.
246. Rao B.R., Slotman B.J.: Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer. *Endocr. Rev.* 1991; 12: 14-26.
247. Ricci M.S., Zong W.X.: Chemioterapeutic approaches for targeting cell death pathways, *Oncologist.* 2006; 11: 303-313.
248. Richelli F.: Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1995; 29:109-118.

249. Richter B.D., Chowdhary R.K., Ratkay L., Jain A.K., Canaan A.J., Meadows H., Obochi M., Waterfield D., Levy J.G.: Nononcologic potentials for photodynamic therapy. *Proc. SPIE* 2078; 1994; 293-304.
250. Rinkenberger J.L., Korsmayer S.J.: Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Gen. Dev.* 1997; 7589-596.
251. Robertson C.A., Hawkins E.D., Abrahamse H.: Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 2009; 96: 1-8.
252. Roche M., Seiden M.V.: Platinum-based therapies in ovarian cancer. *Hospital Pharm. Europe.* 2004; 17: 55-57.
253. Rosen D.G., Cai KQ., Luthra R., Liu J.: Immunohistochemical staining of hMLH1 and hMSH2 reflects microsatellite instability status in ovarian carcinoma. *Mod. Path.* 2006; 19: 1414-1420.
254. Rossi F.M., Campbell D.L., Pottier R.H., Kennedy J.C., Dickson E.F.: In vitro studies on the potential use of 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy for gynaecological tumours. *Br. J. Cancer* 1996; 74: 881-887.
255. Runnels J.M., Chen B., Ortel B., Kato D., Hasan T.: BPD-MA-mediated in ovarian cancer cells. *Br. J. Cancer* 1999; 80: 946-953.
256. Rupniewska Z., Bojarska-Junak A.: Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2. *Post. Hig. Med. Doś.* 2004; 58: 538-547.
257. Saczko J., Kulbacka J., Chwiłkowska A., Ługowski M., Banaś T.: Levels of lipid peroxidation in A549 cells after PDT in vitro. *Ann. Acad. Med. Białost.* 2004; Vol. 49, 1: 82-84.
258. Saczko J., Kulbacka J., Chwiłkowska A., Pola A., Ługowski M., Marcinkowska A., Malarska A., Banas T.: Cytosolic superoxide dismutase activity after photodynamic therapy, intracellular distribution of Photofrin II and hypericin, and P-glycoprotein localization in human colon adenocarcinoma. *Fol. Histochem. Cytobiol.* 2007; 45: 93-97.
259. Saczko J., Skrzypek W., Chwiłkowska A., Choromańska A., Poła A., Gamin A., Kulbacka J.: Photo-oxidative action in cervix carcinoma cells induced by HpD – mediated photodynamic therapy. *Exp.Oncol.* 2009; 31 (4): 195-199.
260. Sakharov D.V., Elstak E.D.R., Chernyak B., Wirtz K.W.A.: Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY^{581/591}. *FEBS Letters.* 2005; 579: 1255-1260.
261. Salet C., Moreno G.: Photosensitization of mitochondria. Molecular and cellular aspects. *Photochem. Photobiol. B.* 1995; 5: 133-150.
262. Salet C., Moreno G., Ricchelli F.: Effects of Photofrin photodynamic action on mitochondrial respiration and superoxide radical generation. *Free Rad. Res.* 1997; 26: 201-208.

263. Schafer F.Q., Qian S.Y., Buettner G.R.: Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 2000; 46: 657-662.
264. Schaffer M., Schaffer P.M. et al.: Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model. *J. Photochem. Photobiol.* 2002; 66, 3: 157-164.
265. Schaffer M., Ertl-Wagner B., Schaffer P. M., Kulka U., Jori G., Duhmke E., Hofstetter A.: The Application of Photofrin II® as a Sensitizing Agent for Ionizing Radiation-A New Approach in Tumor Therapy? *Current. Med. Chem.* 2005; 12, 10: 1209-1215 (7).
266. Schmidt S., Wagner V.: PDT for Cyto-reduction in Cases of Ovarian Cancer. Wyss P, Tadir Y, Tromberg BJ, Haller U (eds): *Photomedicine in Gynecology and Reproduction*. Basel, Karger. 2000; 296-301.
267. Sellers W.R., Fisher D.E.: Apoptosis and cancer drug targeting. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 1655-1661.
268. Shacter E.: Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug. Metab. Rev.* 2000; 32: 307-326.
269. Shevchuk I.N., Chekulayev V.A., Checulayeva L.V.: The role of lipid peroxidation and protein degradation in the photodestruction of Ehrlich ascites carcinoma cells sensitized by hemathoporphirin derivative. *Exp. Oncol.* 2002; 24: 216-224.
270. Shiarishi H., Okamoto H., Yoshimura A., Yoshida H.: ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J. Cell Sci.* 2006; 119: 3958-3966.
271. Shimizu K., Oku N.: Cancer anti-angiogenic therapy. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27: 599-605.
272. Shuijier M., Berns M.J.J.: TP53 and ovarian cancer. *Hum. Mut.* 2003; 21: 285-291.
273. Sikora E.: Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórek. Rola protoonkogenów, onkogenów i antyonkogenów. *Post. Bioch.* 1993; 39: 212-220.
274. Sith S., Richards W.E., Caito K., Hanjani P., Markamn M., DeGeest K., Gallion H.H.: BRCA1 germline mutations and polymorphisms in a clinic-based series of ovarian cancer cases: a gynecologic oncology group study. *Gyn. Oncol.* 2001; 83: 586-592.
275. Skrzycki M., Czeczot H.: Ekspresja genów dysmutazy ponadtlenkowej w stanie stresu oksydacyjnego. *Post. Biol. Kom.* 2004; 31: 81-9.
276. Skrzydlewska E., Kozusko B., Sułkowska M., Bogdan Z., Kozłowski M., Smarska J., Puchalski Z., Sułkowski S., Skrzydłowski Z.: Antioxidant potential in esophageal, stomach and colorectal cancers. *Hepatogastroenterology.* 2003; 50: 126-131.
277. Smith S., Richards W.E., Caito K., Hanjani P., Markman M., DeGeest K., Gallion A.H.: BRCA1 Germline Mutations and Polymorphisms in a Clinic-

- Based Series of Ovarian Cancer Cases Gynecologic. Oncology 2001; 83, 586-592.
278. Song K., Kong B., Qu X., Li L., Yang Q.: Phototoxicity of hemoporphin to ovarian cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 337: 127-132.
 279. Sood A.K., Buller R.E.: Genomic instability in ovarian cancer. *Oncogene* 1996; 13: 2499-2505.
 280. Sood A.K., Holmes R., Hendrix M.J.: Development of international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 4371-4374.
 281. Stable-Perez C.: 2-metoksyestradiol and paclitaxal have similar effects on the cell cycle and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 2006; 231: 49-64.
 282. Stadtman E.R., Levine R.L.: Protein oxidation. *An. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 899: 191-208.
 283. Steffensen K.D., Waldstroms M., Jeppesen U., Jakobsen E., Brandslund I., Jakobsen A.: The prognostic importance of cyclooxygenase 2 and HER2 expression in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2007; 17: 798-807.
 284. Strathdee G., MacKean M.J., Illand M., Brown R.: A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene.* 1999; 18: 2335-2341.
 285. Strathdee G., Vass J.K., Oien K.A., Siddiqui N., Curto-Garcia J., Brown R.: Demethylation of the MCJ gene in stage III/IV epithelial ovarian cancer and response to chemotherapy. *Gyn. Oncol.* 2005; 97: 898-903.
 286. Subramanin T., Chinnadurai G.: Pro-apoptotic activity of transiently expressed BCL-2 occurs independent of BAX and BAK. *J. Cell Biochem.* 2003; 89: 1102-1114.
 287. Sugiyama T., Kamura T., Kigawa J., Terakawa N., Kikuchi Y., Kita T., Suzuki M., Sato I., Taguchi K.: Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer* 2000; 88: 2584-2589.
 288. Szokalska A., Makowski M., Nowis D., Wilczyński G. M., Janowska S., Agostinis P., Verfaillie T., Bugajski M., Gietka J., Issat T., Głodkowska E., Mrówka P., Stokłosa T., Hamblin M. R., Mróz P., Jakóbisiak M., Gołąb J.: Proteasome Inhibition Potentiates Antitumor Effects of Photodynamic Therapy in Mice through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response. *Cancer Res.* 2009; 69: 4235-4243.
 289. Śmigiel R., Stembalska A., Stal A., Jonkisz A., Trusewicz A., Dobosz T., Grzebieniak Z., Szaśiadek M.: The microsatellite instability in patients with colon cancer treated in Lower Silesia. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2006; 15: 29-36.
 290. Tanaka K., Kogava K., Nishihori Y., Kuribayashi K., Nakamura K., Muramatsu H., Koike K., Sakamaki S., Niitsu Y.: Suppression of intracellular Cu-Zn

- SOD results in enhanced motility and metastasis of Meth A sarcoma cells. *Int. J. Cancer* 1997; 73: 187-192.
291. Tetik S., Uras F., Yardimci T.: Protein oxidation: Basic view on characterization, detection and consequences. *Adv. Mol. Med.* 2007, 3: 63-67.
 292. Tijerina M., Kopeckova P., Kopecek J.: Mechanisms of cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells exposed to free Mce₆ conjugates. *Photochem. Photobiol.* 2003, 77: 645-652.
 293. Tong Z., Singh G., Rainbow A.J. The role of the p53 tumor suppressor in the response of human cells to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 2000; 2: 201-210.
 294. Trytek M., Makarska M., Polska K., Radzki S., Fiedurek J.: Porfiryty i ftalocjiny. Cz. I. Właściwości i niektóre zastosowania. *Biotechnologia* 2005; 4: 109-127.
 295. Tsyalter P.A., O'Flaherty M.C., Sakharov D.V., Krijgsveld J., Egmond M.R.: Immediate protein targets of photodynamic treatment in carcinoma cells. *J. Proteome Res.* 2008; 7: 3868-3878.
 296. Ullah M.f.: Cancer multidrug resistance (MDR): A major impediment to effective chemotherapy. *As. Pac. J. Cancer Prevent.* 2008; 9: 1-6.
 297. Untch M., Korell M., Kirschstein M., Hep H.: Synergistischer Effekt von Delta-Aminolävulin säure und photodynamischer Lasertherapie anhand eines *In vitro*-Modells mit dem ATP-Tumorchemosensitivitätstest. *Gynäk. Geburtsh. Rundsch.* 1995; 35, 85-89.
 298. Urban A., Miszczyk L.: Rak jajnika – diagnostyczny i terapeutyczny problem ginekologii onkologicznej. *Współcz. Onkol.* 2003; 7: 294-300.
 299. Vacala M., Kahlos K., Lakari E., Pääkkö P., Kinnula V., Soini Y.: Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in situ and invasive breast carcinoma. *Clinic. Cancer Res.* 2000; 6: 2408-2416.
 300. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2006; 160: 1-40.
 301. Van Aswegen C.H., Purdy R.H., Wittliff J.L.: Binding of 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol to estrogen receptors from human breast cancers. *J. Ster. Bioch.* 1989; 32 485-492.
 302. Vanden Berghe T., Kalai M., Van Loo G., Declercq W., Vandenabeele P.: Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 5622-5629.
 303. Vanden Berghe T., van Loo G., Saelens X., van Gurp M., Brouckaert G., Kalai M., Declercq W., Vandenabeele P.: Differential signaling to apoptotic and necrotic cell death by Fas-associated death domain protein FADD. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 7925-7933.
 304. Verri E., Guglielmini P., Puntoni M., Perdelli L., Papadia A., Rubagotti A., Ragni N., Boccardo F.: HER2/neu oncoprotein overexpression in epithe-

- lial ovarian cancer: evaluation of its relevance and prognostic significance. Clinical study. *Oncology* 2005; 68: 154-161.
305. Voeltz G.K., Rolles M.M., Rapoport T.A.: Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 2002, 3: 944-950.
306. Vrouenraets M.B., et al.: Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Res.* 2003; 23: 505-522.
307. Wafik S., El-Deiry. Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. *Curr. Opin. Oncol.* 1997; 9: 79-86.
308. Wang N.: Cytogenetics and Molecular Genetics of Ovarian Cancer *American Journal of Medical Genetics. (Semin. Med. Genet.).* 2002; 115:157-163.
309. Węsierska-Gądek J., Schmid G.: The subcellular distribution of the p53 tumour suppressor, and organismal ageing. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2005; 10: 439-453.
310. Wilson B.C., Olivio M., Singh G.: Subcellular localization of Photofrin® and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1997; 65: 166-176.
311. Wood L., Leese M.P., Mouzakiti A., Purohit A., Potter B.V.L., Reed M.J., Packham G.: Apoptosis 2004; 9: 323-332.
312. Woster R., Weber BL., Brest and ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 2339-2347.
313. Wronkowski Z., Zwierko M.: Epidemiologia nowotworów narządu rodnego [w:] *Onkologia Ginekologiczna.* Markowska J. (red.). Urban&Partner, Wrocław 2002; 3-37.
314. Wu J., Kaufman R.J.: From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death. Differ.* 2006; 13: 374-384.
315. Wyss-Desserich M.T., Sun C.H., Wyss P., Kurlawalla C.S., Haller U., Berns M.W., Tadir Y.: Accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in normal and neoplastic human endometrial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; Jul 25; 224 (3): 819-824.
316. Xu Y., Huang S., Liu Z.G., Han J.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *J. Biol. Chem.* 2006; 31: 8788-8795.
317. Yagc R., Ersöz I., Erdurmus M., Gürel A., Duman S.: Protein carbonyl levels in the aqueous humour and serum of patients with pseudoexfoliation syndrome *Eye.* 2008; 22: 128-131.
318. Yang Y., Sharma R., Sharma A., Awasthi S., Awasthi Y.C.: Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim. Polon.* 2003; 50: 319-336.

319. Yasuhara S., Zhu Y., Matsui T., Tipirneni N., Yasuhara Y., Kaneki M., Resenzweig A., Martyn J.A.J.: Comparison of Comet Assay, Electron Microscopy, and Flow Cytometry for Detection of Apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* 2003; 51 (7): 837-885.
320. Yokata T., Ikeda H., Inokuchi T., Sano K., Koji T.: Enhancement of cell death in NR-S1 tumor by photodynamic therapy: possible involvement of Fas and Fas ligand system. *Las. Surg. Med.* 2000; 26: 449-460.
321. Yumin H., Rosen D.G., Zhou Y., Feng L., Yang G., Huang P.: Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer. Role in cancer proliferation and response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2005; 47: 39485-39482.
322. Zajdel A., Latocha M., Wilczok A.: The effect of photodynamic treatment on the levels of aldehydic lipid peroxidation products in human tumor cells. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2008; 17: 599-605.
323. Zawirska B.: Nowe metody lokalizacji i leczenia złośliwych nowotworów przy użyciu pochodnych hematoporfiryny i fotoradiacji. *Post. Hig. Med. Doś.* 1987; 41: 579-596.
324. Zelcer N., Saeki T., Reid G., Beijnen J.H., Borst P.: Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 46400-46407.
325. Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J.: Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZnSOD (sod1), MnSOD (sod2), and EC-SOD (sod3) gene structures, evaluation, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33: 337-349.
326. Zhang Y., Zhao W., Zhang H.J., Domann F.E., Oberley L.W.: Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res.* 2002; 62: 1205-1212.
327. Zhang L., Conejo-Garcia J.R., Katsaros D., Gimotty P.A., Matorras M., Regnani G., Makrigiannakis A., Gray H., Shlienger K., Liebman M.N., Rubin S.C., Coukos G.: Intratumoral T cells recure and survival in epithelial. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 203-213.
328. Zhu B.T., Conney A.H.: Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. 1998; 19: 1-27.
329. Zielińska K., Wilk K.A., Seweryn E., Pietkiewicz J., Saczko J.: Studies on biocompatible nanocapsules formed from microemulsion templated processes *Mater.Sci.Pol.* 2008; 26: 443-450. 1st Polish Conference on Nanotechnology NANO 2007. Wrocław 2007; 26-28.

9. STRESZCZENIE

Rak jajnika pozostaje nadal najczęstszą przyczyną zgonu wśród nowotworów żeńskich narządów płciowych. Śmiertelność z powodu raka jajnika w ciągu ostatnich dwudziestu lat cały czas utrzymuje się na stałym poziomie. Mimo wprowadzania leków nowej generacji i dużego zainteresowania metodami wykrywania raka jajnika we wczesnym etapie rozwoju całkowita 5-letnia przeżywalność ciągle pozostaje na tym samym poziomie i wynosi 20-30%. Złe rokowanie w przebiegu raka jajnika może być uwarunkowane działaniem wielu mechanizmów. Istotna jest oporność na cytostatyki, która prowadzi do braku lub osłabionego efektu leczenia. Za obniżoną wrażliwość na chemioterapię głównie są odpowiedzialne mechanizmy komórkowe: zaburzenie transportu leków przez ograniczenie wnikania leku do komórek lub w wyniku ich aktywnego usuwania z komórki. W badaniach raka jajnika zidentyfikowano także kilka różnych typów genów, których mutacje są odpowiedzialne za jego rozwój. Należą do nich geny supresorowe, onkogeny oraz geny mutatorowe.

Typowe postępowanie w leczeniu nowotworów jajnika jest leczeniem kojarzonym, które polega na łączeniu chirurgii z chemioterapią oraz radioterapią. Niestety, postęp stosowanych technik chirurgicznych i chemioterapii nie wpływa znacząco na przedłużenie przeżycia chorych na raka jajnika. Najlepszym rozwiązaniem byłoby obecnie opracowanie i zastosowanie takiej metody, która niezależnie od zjawiska oporności na leki byłaby skuteczna i mało inwazyjna. W świetle ostatnio prowadzonych badań, dosyć obiecującą i skuteczną metodą walki z nowotworami jajnika wydaje się być terapia fotodynamiczna (PDT). Przeprowadzone badania *in vitro* oraz na modelach zwierzęcych w przypadku nowotworów narządów płciowych, także nowotworów jajnika, pozwalają uznać tę metodę leczenia za efektywną i mało inwazyjną. PDT umożliwia ukierunkowane i wybiórcze eliminowanie komórek nowotworowych z organizmu. Niezbędnym elementem tej metody jest obecność w komórce fotouczulacza, tlenu i światła. Efektem współdziałania tych elementów jest aktywacja reakcji wolnorodniko-

wych, zaburzenie równowagi pro- i antyoksydacyjnej, co w efekcie prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy. Reakcjom tym podlegają także komórki naczyń krwionośnych, odżywiających tkankę guza. Fotouczulacz umiejscawia się wybiórczo w komórkach nowotworowych. Podwyższony poziom reaktywnych form tlenu aktywuje także układ immunologiczny. Skuteczność reakcji fotodynamicznej zależy od właściwości i stężenia fotouczulacza, dawki promieniowania, stopnia utleniania tkanki i w dużym stopniu od wrażliwości samych komórek. Wzrost reaktywnych form tlenu aktywowany PDT prowadzi do zaburzenia równowagi pro- i antyoksydacyjnej. Niepożądaną konsekwencją tego jest uruchomienie głównych enzymów antyoksydacyjnych, których działanie osłabia pożądany efekt reakcji fotodynamicznej. W ostatnich latach jednym z kierunków potęgowania przeciwnowotworowego działania PDT jest jej modyfikacja, m.in. przez łączenie ze związkami, które są swoistymi inhibitorami kluczowych enzymów antyoksydacyjnych.

Celem pracy była ocena skuteczności klasycznej reakcji fotodynamicznej (Ph-PDT) z wykorzystaniem Photofrinu (Ph), jako fotouczulacza oraz reakcji modyfikowanej z 2-metoksyestradiolem (Ph-2-Me-PDT) na komórkach linii jasnokomórkowego raka jajnika, opornego na chemio- i radioterapię (OvBH-1), z cichą mutacją genu *p53*. Jako linię kontrolną użyto komórki gruczolakoraka gruczołu sutkowego (MCF-7) z prawidłową funkcją genu *p53*. W ramach realizacji postawionego celu zaplanowano zbadanie:

- 1) umiejscowienia fotouczulacza w komórkach nowotworowych w mikroskopie fluorescencyjnym i stopnia kolokalizacji fotouczulacza z mitochondrium i retikulum endoplazmatycznym (ER) (określenie miejsca początkowego uszkodzenia komórek) w mikroskopie konfokalnym,

- 2) oceny cytotoksyczności po przeprowadzonych badaniach (Ph-PDT) i badaniach (Ph-2-Me-PDT) testem MTT po 24 i 48 godz. hodowli,

- 3) oceny markerów stresu oksydacyjnego w komórkach: aktywności i ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej metodą spektrofotometryczną, immunocytochemiczną ABC i western blot,

- 4) stopnia peroksydacji lipidów metodą polegającą na oznaczeniu stężenia dialdehydu malonowego (MDA) w reakcji z kwasem tio-barbiturowym,

5) uszkodzenia oksydacyjnego białek przez pomiar zawartości grup tiolowych białek –SH oraz grup karbonylowych C=O. Oceniono także wpływ reakcji fotodynamicznych i reakcji fotodynamicznych zmodyfikowanych na indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych (metoda kometowa i TUNEL), zmiany w ekspresji białka supresorowego p53 i jego formy z ufosforylowanymi resztami aminokwasów w dwóch miejscach (Ser 20, Ser 392) oraz białka Bax, M30, Bcl-2 po Ph-PDT i Ph-2-Me-PDT metodą immunocytochemiczną ABC.

Przeprowadzone badania wykazały, że:

Dystrybucja Ph w komórkach była zróżnicowana i zależna od czasu inkubacji z fotouczulaczem w obu liniach komórkowych. Maksymalną koncentrację Ph obserwowano po 4 godzinach inkubacji a najbardziej intensywny sygnał był widoczny wokół otoczki jądrowej.

Obserwowano większą niż w komórkach MCF-7 akumulację barwnika w mitochondrium komórek raka jasnokomórkowego jajnika. W komórkach MCF-7 kolokalizacja Ph z mitochondrium była śladowa.

Photofrin w komórkach OvBH-1 wykazywał niewielką kolokalizację z ER w porównaniu do komórek MCF-7, w których wyraźnie wiadać, że fotouczulacz akumuluje się w ER.

Po Ph-PDT w około 20% komórek OvBH-1 obserwowano wyraźne zmiany morfologiczne przejawiające się wakuolizacją, ale nie były to typowe zmiany dla komórek apoptotycznych. Dopiero po zastosowaniu procedury modyfikowanej 2-Me w komórkach OvBH-1 obserwowano zmiany morfologiczne komórek charakterystyczne dla apoptozy.

W komórkach OvBH-1 poddanych Ph-PDT spadek przeżywalności po 24 i 48 godz. kształtował się na podobnym poziomie. W komórkach tych po zastosowaniu Ph-PDT-2-Me zaobserwowano znaczące obniżenie przeżywalności po 24 i 48 godz. W przeciwieństwie do standardowej terapii.

Z przeprowadzonych badań wynika, że w obu zastosowanych badaniach fotodynamicznych poziom MDA znacząco wzrasta zarówno w komórkach OvBH-1, jak i MCF-7, co świadczy o utlenieniu lipidów. W komórkach OvBH-1 największy wzrost w doświadczeniach obserwowano po Ph-2-Me-PDT 3 i 6 godz. po naświetlaniu. W przypadku oceny uszkodzenia białek zaobserwowano wzrost stężenia grup karbonylowych białek i spadek ilości grup tiolowych. Zastosowanie

Ph-2-Me-PDT potęgowało obniżenie stężenia grup tiolowych i wzrost liczby grup karbonylowych.

Zaobserwowano zmiany w aktywności i ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej po obu zastosowanych procedurach. Zastosowanie jednak modyfikowanej 2-metoksyestradiolem reakcji fotodynamicznej wpływało w istotny sposób na obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i obniżenie ekspresji jego mitochondrialnej izoformy.

Komórki OvBH-1 umierały na drodze nekrozy po zastosowaniu klasycznej reakcji fotodynamicznej. Zastosowanie reakcji fotodynamicznej kombinowanej z 2-metoksyestradiolem aktywowało apoptozę w komórkach raka jasnokomórkowego jajnika. Zastosowanie Ph-2-Me-PDT wpływało również na fosforylację białka p53 w pozycji seryna 20 i 392, czego konsekwencją była jego stabilizacja.

Uzyskane wyniki wskazują, że Photofrin spełnia swoje zadanie w procesie fotodynamicznym, jaki zachodzi w komórkach raka jasnokomórkowego jajnika. Modyfikacja tego procesu 2-metoksyestradiolem potęguje działanie klasycznej reakcji a także pozwala na eliminację komórek nowotworowych na drodze apoptozy, a nie nekrozy. Prezentowana praca jest fundamentem do przeprowadzenia dalszych badań przedklinicznych i klinicznych oraz ewentualnego wprowadzenia modyfikacji w leczeniu raka jasnokomórkowego jajnika.

10. SUMMARY

Ovarian carcinoma is still the most often death reason among female reproductive organs. During last 20 years mortality caused by ovarian carcinoma remains on the same level. Currently there are introduced drugs of new generation and high interest is focused on methods applied for detection ovarian cancer in early stage. However the complete recovery during 5 years remains still on the same level 20-30%. Poor prognosis during course of ovarian cancer can be conditioned of acting of few mechanisms. The crucial factor is resistance to cytostatics, which causes lack or weakened effect of treatment. For decreased sensitivity to chemotherapy are mainly responsible cellular mechanisms involved in disorders of drug transport and limited drug diffusion inside or active removal outside cell. There are identified few different types of genes in ovarian cancers, that mutations are responsible for cancer progression. There are suppressor genes, oncogenes and mutator genes.

Typical procedure in ovarian cancer is combination treatment that joins surgery, chemotherapy and radiotherapy. The best solution would be development and application of such a method that would be effective and less invasive. During last studies photodynamic therapy (PDT) seems to be promising and effective technique to cure ovarian cancers. PDT enables targeted and selective exclusion of cancerous cells from organism. The necessary aspect in cell is the presence of photosensitizer, oxygen and light. The effect of cooperation of these three factors is activation of free radicals reactions, distribution of pro- and antioxidative balance what finally leads to cell death (apoptosis or necrosis). In these reactions are also involved cells of vessels tumor feeding tissue. Photosensitizer localizes selectively in malignant cells. The immunological system is also activated/stimulated by higher level of reactive oxygen species. The effectiveness of PDT depends on the concentrations and features of photosensitizer, the irradiation dose, the degree of tissue oxygenation and cells sensitivity. The increase of free radicals caused by PDT leads to impairment of pro- and antioxi-

tive balance. The redundant consequence of this event is activation of antioxidant enzymes, which action undermines the effect of photodynamic reaction.

During last year's, PDT modifications are the one of the directions of anticancer exponentiation activity of PDT. It is connected with combining PDT with compounds that are specific inhibitors of crucial antioxidant enzymes.

The aim of this was determination of effectiveness of standard photodynamic therapy (Ph-PDT) with Photofrin (Ph) and PDT modified by 2-Methoxyestradiol (Ph-2-Me-PDT) in human ovarian clear carcinoma cell line resistant to chemo- and radiotherapy (OvBH-1) with mutation of p53 gene. As a reference cell line human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) with proper function of p53 gene were used.

We have planned the following investigations:

1) Determination of the initial cell damage by assessing a localization of photosensitizer in tumor cells determined by fluorescent microscopy and colocalization of photosensitizer with mitochondrial and ER (endoplasmatic reticulum) fluorescent markers by confocal microscopy;

2) Estimation of cytotoxicity post 24 and 48 hours after applied treatments Ph-PDT and Ph-2-Me-PDT by MTT assay;

3) Determination of oxidative stress markers in cells: activity and expression of superoxide dismutase (spectrophotometric method, immunocytochemistry ABC and western blott);

4) The level of lipid peroxidation by method based on thiobarbituric acid method for the estimation of the malonyl dialdehyde (MDA);

5) the protein damage determined by estimation of concentration –SH (thiol groups) level and C=O (carbonyl groups) level.

6) There were also determined the influence of photodynamic reactions and modified PDT reactions on apoptosis induction in malignant cells (comet assay and TUNEL method). We have also estimated by immunocytochemical method changes in expression of suppressor protein p53 and its phosphorylated form with amino acids residues Ser 20 and Ser 392, Bax protein, M30, Bcl-2 after Ph-PDT and Ph-2-Me-PDT.

The study showed that:

Intracellular Ph distribution was variable and dependent on the time incubation in both cell lines. The maximal Ph concentration was observed after 4 hours incubation and the most intensive signal aro-

und the nuclear envelope was visible. We detected stronger accumulation of dye in mitochondria OvBH-1 then in MCF-7 cells. In MCF-7 cells the colocalization of Ph with mitochondrial marker was vestigial. Photofrin in OvBH-1 was little colocalized with ER in comparison to MCF-7, where ER accumulation of photosensitizer was clearly visible.

After Ph-PDT procedure clear morphological changes like vacuolization (but not typical for apoptotic cells) in about 20 % of OvBH-1 cells were observed. Only after application of combined procedure with 2-Me in OvBH-1 cells morphological changes characteristic for apoptosis were detected.

The decrease of cells viability after 24h and 48h was on the similar level. The significant decrease of the cells viability after 24 and 48 h was observed in cells where Ph-PDT-2-Me was applied, as compared to standard PDT.

The study shows that the MDA level increase significantly in both applied photodynamic examinations and in both cell lines, what indicates the oxidation of lipids. In OvBH-1 cells the highest increase after Ph-2-Me-PDT application with 3 and 6 hours was observed. In case of protein damage the increase of carbonyl groups and decrease of thiol groups was detected. The application of Ph-2-Me-PDT enhanced the lower the concentration of thiols and increase of carbonyls.

The changes in activity and expression of SOD were also noticed. However the usage of modified therapy influences significantly on the decrease of the enzyme activity and expression of its mitochondrial isoform. OvBH-1 cells died underwent necrosis after classical photodynamic reaction. The appliance of PDT combined with 2-Me caused activation of apoptosis in ovarian clear carcinoma cells. It also influenced on phosphorylation of p53 protein in position serine 20 and 392 what caused the stabilization of this protein.

The obtained results indicate that Photofrin fulfills its function task in the photodynamical process which undergoes in human clear ovarian carcinoma cells. The modification of this process by 2-Methoxyestradiol enhances efficiency of standard PDT. What is important, it also eliminates cancer cells by apoptosis rather than necrosis. The current study is fundamental for further clinical and preclinical research. Our results are essential in eventual application of this modified method in clear ovarian carcinoma treatment.