

Słowa kluczowe: terapia fotodynamiczna, protoporfiryna, oporność, metabolizm hemu, reaktywne formy tlenu, antyoksydanty, cytoszkielet, naprawa DNA, endonukleaza apurynowa/apirymidynowa

Terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*, PDT) jest jedną z najmniej toksycznych metod walki z rakiem, w której fotouczulacz (ang. *photosensitizer*, PS) podany pacjentowi akumuluje się w tkance guza, aby następnie pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali i intensywności oraz tlenu powodować liczne uszkodzenia prowadzące ostatecznie do zniszczenia komórek nowotworowych. W wyniku PDT dochodzi do zapoczątkowania ostrej lokalnej reakcji zapalnej, która bierze udział w usuwaniu martwych komórek, przywróceniu normalnej homeostazy tkanek, a czasami i w rozwinięciu odporności ogólnoustrojowej. PDT stanowi cenną alternatywę dla leczenia chirurgicznego stanów przedrakowych VIN (ang. *vulvar intraepithelial neoplasia*) i nowotworów sromu, gdyż pozwala na leczenie wieloogniskowej choroby przy minimalnym niszczeniu tkanek, zachowaniu anatomii sromu i doskonałych efektach kosmetycznych. Jednak nie u wszystkich pacjentek poddanych PDT następuje całkowita regresja. Część komórek może przeżyć terapię i zmienić swój fenotyp, prowadząc do pojawienia się oporności. W obronę przed cytotoksycznym efektem PDT mogą być zaangażowane ogólne mechanizmy oporności na leki (ang. *multidrug resistance*, MDR), prowadzące do usuwania fotouczulacza z komórek, ale także zmiany w tempie syntezy i degradacji PS, czy zwiększona aktywność mechanizmów antyoksydacyjnych, nadekspresja białek opiekuńczych. Badania nad mechanizmami oporności w raku sromu są słabo opisane. Poznanie tych mechanizmów może w przyszłości umożliwić stworzenie terapii skojarzonej o większej skuteczności leczenia. *Celem tej pracy było poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów nabywania oporności na terapię fotodynamiczną z użyciem kwasu 5-aminolewulinowego w nowotworach sromu, a także wykorzystanie tej wiedzy w poszukiwaniu nowych metod uwrażliwiania komórek opornych na leczenie PDT.* W tym celu, z linii komórek ludzkiego raka sromu A-431 i CAL-39 wrażliwych na PDT, wyizolowałam linie odporne, a następnie scharakteryzowałam je pod kątem zmian nabytych wraz z opornością. Uzyskane wyniki sugerują, że oporność na PDT w komórkach raka sromu może być skutkiem obniżonej zdolności do akumulacji fotouczulacza, zmian w zdolności niwelowania reaktywnych form tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species*, ROS) oraz ich ilości, a także zmian w cytoszkiecie, które mogą wiązać się ze zwiększoną zdolnością przeżycia komórek. Uzyskane dane wskazują, że mechanizmy prowadzące do oporności w badanych liniach komórkowych mogą być

różnorodne. Mniejsza akumulacja protoporfiryny IX (ang. *protoporphyrin IX*, PpIX) w komórkach opornych linii A-431 może wynikać ze zwiększonego tempa syntezy hemu i wykorzystywania go w biogenezie hemoprotein. Natomiast w komórkach opornych CAL-39 mniejsza akumulacja PpIX może być wynikiem wolniejszego tempa syntezy PpIX. Komórki odporne linii A-431 mają też obniżoną zawartość RFT, w tym $^1\text{O}_2$, $\text{HO}^\bullet/\text{ONOO}^-$ oraz skuteczniej niwelują RFT ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{HO}^\bullet/\text{ONOO}^-$) po PDT, co może być związane zarówno ze zwiększoną ilością nieenzymatycznych antyoksydantów jak i aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, w tym niwelującą $\text{O}_2^{\bullet-}$ dysmutazą ponadtlenkową (ang. *superoxide dismutase*, SOD). Co ciekawe, komórki odporne linii CAL-39 chociaż charakteryzowały się brakiem zmian w ogólnej puli RFT, to wykazały jednak obniżenie zawartości $\text{O}_2^{\bullet-}$, jednej z głównych RFT powstających po PDT. Obniżenie to może być wynikiem osłabienia oddychania mitochondrialnego i efektu Warburga. Jednocześnie komórki te mają podwyższony poziom $\text{HO}^\bullet/\text{ONOO}^-$, co może być spowodowane podwyższonym poziomem H_2O_2 i przekładać się na ich większą wrażliwość na inne środki utleniające, w tym H_2O_2 . W linii odpornej CAL-39 po PDT także nie dochodziło do znaczącego wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{HO}^\bullet/\text{ONOO}^-$). Wydaje się, że komórki te mogą skuteczniej niwelować $^1\text{O}_2$ i $\text{O}_2^{\bullet-}$ dzięki podwyższonej zawartości askorbinianu oraz enzymu uczestniczącego w redukcji jego utlenionej formy z udziałem glutationu – GSTO1. W przeciwieństwie do komórek opornych A-431, zwiększona aktywność SOD jest wysoce wątpliwa ze względu na tworzenie H_2O_2 w reakcji dysmutacji $\text{O}_2^{\bullet-}$ oraz braku podwyższonego poziomu $\text{HO}^\bullet/\text{ONOO}^-$ po PDT. Obie linie komórkowe wykazały też liczne zmiany w cytoszkielecie. Komórki odporne A-431 charakteryzowały się zwiększoną adhezją oraz podwyższoną ilością mikrotubul i E-kadheryny. Zarówno adhezja do macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM) jak i sąsiadujących komórek może prowadzić do aktywacji szlaków przeżycia, a oddziaływania międzykomórkowe tworzone przez E-kadherynę zostały uprzednio powiązane z chemoopornością. Również większa liczba mikrotubul w komórkach opornych oraz ich wysoka stabilność po PDT może chronić komórki przed śmiercią spowodowaną stresem oksydacyjnym i uszkodzeniem cytoszkieletu. Natomiast zmiany w cytoszkielecie komórek opornych linii CAL-39 wraz z osłabioną adhezją i zwiększonym tempem migracji sugerują nabycie oporności przez przejście epitelialno-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT). Komórki te wykazały obniżenie ilości β -tubuliny oraz licznych białek uczestniczących w adhezji, w tym E-kadheryny. Jednocześnie w tej linii komórkowej wraz z nabyciem oporności mogło dojść do zmian w izotypach β -tubuliny obniżających podatność na uszkodzenia oksydacyjne. Co ciekawe, obie linie komórkowe po PDT wykazały wzrost aktywności

apurynowej/apirymidynowej endonukleazy 1 (ang. *apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*, APE1). Enzym ten uczestniczy w naprawie przez wycinanie zasad (ang. *base excision repair*, BER) i może być niezbędny do naprawy DNA po PDT. Można więc przypuszczać, że w komórkach opornych linii CAL-39 jego zwiększona aktywność w porównaniu do komórek rodzicielskich może przyczyniać się do nabycia oporności. W moich badaniach wykazałam też, że hamowanie aktywności endonukleazowej APE1 skutecznie uwrażliwia na PDT odporne komórki obu linii. Trzeba jednak pamiętać, że lepsza odpowiedź na terapię może wynikać też z innych powodów, niż z obniżenia zdolności naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Hamowanie aktywności APE1 może wpływać na zmiany w poziomie ekspresji różnych genów, w tym prowadzących do zmian w cytoszkieletcie, czy metabolizmie hemu. Podsumowując, choć mechanizmy oporności na PDT w komórkach raka sromu mogą być różnorodne, hamowanie funkcji naprawy DNA białka APE1 może korzystnie wpływać na skuteczność terapii fotodynamicznej.