

**Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski**



mgr Anna Piotrowska

**Modulacyjny wpływ witaminy D na
działanie reaktywnych form tlenu w
keratynocytach**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Promotor: dr hab. Michał A. Żmijewski,
prof. nadzw. GUMed**

**Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Zbigniew Kmiec

Gdańsk 2014

Składam najserdeczniejsze podziękowania

Mojemu Promotorowi,

Panu Profesorowi Michałowi Żmijewskiemu

Za przekazaną mi wiedzę, ogromną życzliwość
i wsparcie na każdym etapie realizacji niniejszej pracy

Panu Profesorowi Zbigniewowi Kmiecowski,

Kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii GUMed

Za umożliwienie mi prowadzenia pracy naukowej
i czuwanie nad jej realizacją

Panu Doktorowi Tomaszowi Ślebiodzie

Za wiedzę przekazaną mi w zakresie cytometrii przepływownej

Moim Kolegom z zespołu badawczego,

Justynie Wierzbickiej i Jakubowi Antoniewiczowi

Za to, że zawsze mogłam na Nich polegać

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Histologii GUMed

za życzliwość i wspaniałą atmosferę pracy naukowo-badawczej

Pragnę podziękować moim Rodzicom
oraz
Mojemu Mężowi,
bez którego wsparcia praca ta nigdy by nie powstała,
a także **moim kochanym Dzieciom, Paulince i Krzysiu.**

Praca współfinansowana przez:

Ministerstwo Szkolnictwa Wyższego i Nauki

Numer projektu: N405 623238 (MAZ)

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	12
1.1. Witamina D ₃	12
1.1.1. Produkcja i metabolizm witaminy D ₃	12
1.1.2. Alternatywny szlak metaboliczny 7-DHC prowadzący do powstawania nowych analogów witaminy D ₃	15
1.1.3. Mechanizm działania witaminy D ₃	16
1.1.4. Funkcje witaminy D ₃	17
1.1.5. Niedobór witaminy D ₃	21
1.2. Stres oksydacyjny	25
1.2.1. Reaktywne formy tlenu	26
1.2.2. Mechanizmy obrony przed RFT	28
1.2.2.1. Dysmutaza ponadtlenkowa SOD	28
1.2.2.2. Katalaza	29
1.2.2.3. Peroksydaza glutationowa	30
1.2.2.4. Antyoksydanty niskocząsteczkowe	31
1.3. Witamina D ₃ a reaktywne formy tlenu	31
2. CEL PRACY	34
3. MATERIAŁY	35
3.1. Linie komórkowe	35
3.2. Analogi witaminy D	35
3.3. Odczynniki chemiczne	37
3.4. Bufory i roztwory	39
3.5. Zestawy komercyjne	39
3.6. Materiały jednorazowego użytku	40

3.7.	Aparatura.....	40
3.8.	Programy komputerowe i bazy danych.....	41
4.	METODY	42
4.1.	Pasażowanie komórek.....	42
4.2.	Krioprezewacja.....	42
4.3.	Test żywotności komórek SRB.....	43
4.4.	Analiza cyklu komórkowego	44
4.5.	Ocena apoptozy testem PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I.....	45
4.6.	Analiza zmiany potencjału błony mitochondrialnej.....	46
4.7.	Pomiar poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu metodą cytometrii przepływowej.....	47
4.8.	Analiza zmiatania wolnego rodnika DPPH'.....	48
4.9.	Badanie poziomu mRNA wybranych genów.....	49
4.9.1.	Izolacja RNA	49
4.9.2.	Określenie stężenia i czystości RNA	50
4.9.3.	Odwrotna transkrypcja (synteza cDNA).....	50
4.9.4.	Projektowanie starterów.....	51
4.9.5.	PCR w czasie rzeczywistym	53
4.10.	Analiza statystyczna.....	54
5.	WYNIKI	55
5.1.	Ocena żywotności komórek linii HaCaT testem SRB	55
5.1.1.	Ocena wpływu analogów witaminy D na żywotność keratynocytów linii HaCaT	55
5.1.2.	Ocena wpływu nadtlenu wodoru na żywotność karatynocytów linii HaCaT	57
5.1.3.	Ocena łącznego wpływu nadtlenu wodoru i analogów witaminy D na żywotność keratynocytów linii HaCaT	57
5.1.4.	Ocena wpływu cisplatyny oraz łącznego wpływu cisplatyny i 1,25(OH) ₂ D ₃ na żywotność keratynocytów linii HaCaT	60

5.2.	Ocena cyklu komórkowego.....	62
5.2.1.	Ocena wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na przebieg cyklu komórkowego keratynocytów linii HaCaT ...	63
5.2.2.	Ocena wpływu nadtlenu wodoru na cykl komórkowy keratynocytów linii HaCaT	64
5.2.3.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zmiany w cyklu komórkowym	66
5.2.4.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zmiany w cyklu komórkowym	75
5.2.5.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie cisplatyny. Zmiany w cyklu komórkowym.....	78
5.2.6.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HPEKp z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zmiany w cyklu komórkowym	87
5.3.	Ocena apoptozy keratynocytów linii HaCaT testem PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I.....	89
5.4.	Analiza zmian potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$	94
5.4.1.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zmiana potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$	97
5.4.2.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zmiana potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$	100
5.4.3.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wrażliwość komórek na działanie cisplatyny. Zmiana potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$	102
5.4.4.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie cisplatyny. Zmiana potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$	104
5.5.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Indukcja stresu oksydacyjnego	106
5.6.	Analiza wymiatania wolnego rodnika DPPH'	109
5.7.	Profil ekspresji genów.....	111
5.7.1.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Profil ekspresji genów aktywowanych przez RFT	111
5.7.2.	Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Profil ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D	116
5.7.3.	Ocena wpływu 48 godzinnej inkubacji keratynocytów linii HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Profil ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D	123

6.	DYSKUSJA	125
6.1.	Witamina D jako antyoksydant w komórkach linii HaCaT	126
6.2.	Witamina D jako prooksydant w komórkach HaCaT	129
6.3.	Witamina D jako modulator RFT w komórkach HaCaT	130
6.4.	Podsumowanie i wnioski.....	138
7.	STRESZCZENIE.....	140
	ABSTRACT.....	142
	PIŚMIENNICTWO	144
	SPIS TABEL	161
	SPIS SCHEMATÓW.....	161
	SPIS RYCIN.....	162

WYKAZ SKRÓTÓW

7-AAD	7-aminoaktynomycyna
7-DHC	7 – dehydrocholesterol
7-DHP	7 – dehydropregnenolon
Ann-V	Anneksyna V
Bak	proapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2
Bax	proapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2
Bcl-2	antyapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2.
BMI	wskaźnik masy ciała (z ang. body mass index)
CAT	katalaza, enzym rozkładający nadtlenek wodoru do tlenu cząsteczkowego i wody
CCCP	karbonylocyjanek-3-chlorofenylo-hydrazonu, protonofor
cFBS	plodowa surowica bydlęca, oczyszczona przy pomocy węgla aktywnego w celu usunięcia związków sterydowych (z ang. charcoal stripped fetal bovine serum)
cGMP	3',5'-cykliczny guanozynomonofosforan
cGPx	klasyczna wewnątrzkomórkowa forma peroksydazy glutationowej (z ang. classic glutathione peroxide)
CYP3A4	25–hydroksylaza cholekalcyferolu
CYP24A1	24 – hydroksylaza 1,25 – dihydroksyvitaminy D ₃
CYP27B1	1 α – hydroksylaza 25 – hydroksyvitaminy D ₃
CaR	receptor wapniowy (z ang. calcium sensing receptor)
Cdc2	zależna od cyklin kinaza białkowa 1 (z ang. cyclin-dependent kinase 1; CDK1; cell division cycle protein 2 homolog)
CDKN1A	gen kodujący białko p21, czyli inhibitor 1 kinaz zależnych od cyklin (z ang. cyclin – dependent kinase inhibitor 1)
Cu,ZnSOD	cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa, zawierająca miedź i cynk w centrum aktywnym
DAG	diacyloglicerol
DBP	białko wiążące witaminę D (z ang. vitamin D binding protein)
DCF	dichlorofluoresceina

EC₅₀	stężenie związku wywołujące połowę maksymalnej efektywności (z ang. half maximal effective concentration)
EC-SOD	pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (z ang. extracellular superoxide dismutase)
ERK1/2	kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym (z ang. extracellular signal regulated kinases)
ERp57	białko retikulum endoplazmatycznego, alternatywny receptor witaminy D ₃ (z ang. endoplasmic reticulum stress protein 57)
FBS	surowica płodowa bydlęca (z ang. fetal bovine serum)
G6PD	dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (z ang. glucose-6-phosphate dehydrogenase)
GADD45A	gen kodujący białko p27 (z ang. growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 alpha)
GI-GPx	żołądkowo-jelitowa peroksydaza glutationowa (z ang. gastrointestinal glutathione peroxidase)
GPx	peroksydaza glutationowa (z ang. glutathione peroxidase)
GSH	glutation
H₂DCFDA	2',7'-dwoetan dichlorofluoresceiny
IP₃	trifosforan inozytolu
JC-1	jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolo-karbo- cyjaninowy
MARRSBP	białko błonowe wiążące sterydy, alternatywny receptor witaminy D ₃ (z ang. membrane – associated rapid response steroid – binding protein)
MDA	dialdehyd malonowy (z ang. malondialdehyde)
MnSOD	dysmutaza ponadtlenkowa macierzy mitochondrialnej, zawierająca mangan w centrum aktywnym
Myt1	kinaza białkowa, fosforyzująca Cdc2
NOD	szczep myszy reprezentujący myszy model cukrzycy (z ang. non obese diabetic)
NOS	syntazy tlenu azotu (z ang. nitric oxide synthase)

PDIA3	białkowa izomeraza disiarczkowa, alternatywny receptor witaminy D ₃ (z ang. protein disulfide isomerase family, member 3)
pGPx	osoczowa forma peroksydazy glutationowej (z ang. plasma glutathione peroxidase)
PHGPx	peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków fosfolipidów (z ang. phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase)
P/S	antybiotyki penicylina/streptomycyna
RANKL	ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (z ang. receptor activator nuclear factor- κ B ligand)
RAS	układ renina – angiotensyna (z ang. renin – angiotensin system)
RFT	reaktywne formy tlenu
RXR	receptor kwasu 9-cis-retinowego (z ang. retinoid X receptor)
SD	odchylenie standardowe (z ang. standard deviation)
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa (z ang. superoxide dismutase)
SRB	sulfrodamina B
TCA	kwas trójchlorooctowy
UCP	rodzina białek rozprzegających fosforylację oksydacyjną, zlokalizowanych w błonie wewnętrznej mitochondriom (z ang. uncoupling proteins)
VDR	receptor dla witaminy D (z ang. vitamin D receptor)
VDRE	elementy odpowiadające na działanie witaminy D (z ang. vitamin D-responsive elements)
Wee1	kinaza białkowa należąca do rodziny kinaz serynowo-treoninowych, odpowiadająca za blokowanie przejścia z fazy G2 do M cyklu komórkowego poprzez fosforylację Cdc2

1. WSTĘP

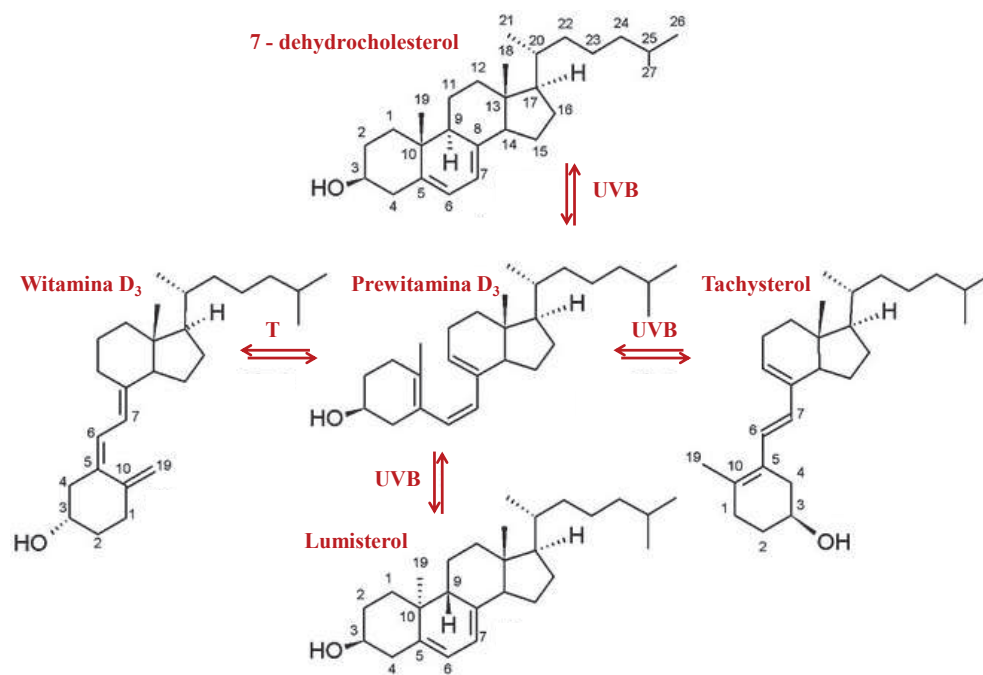
1.1. Witamina D₃

Witamina D jest steroidowym związkiem organicznym, najpowszechniej kojarzonym z utrzymaniem właściwej funkcji kośćca. Warto jednak zauważyć, że jej fizjologiczna rola daleko wykracza poza utrzymanie właściwej gospodarki wapniowo – fosforanowej, co opisane zostało w kolejnych rozdziałach.

1.1.1. Produkcja i metabolizm witaminy D₃

Witamina D₃ jest prohormonem produkowanym w skórze, a dokładniej w warstwie podstawnej naskórka z 7-dehydrocholesterolu (7-DHC), pod wpływem promieniowania ultrafioletowego (Ryc. 1); (1). Synteza ta pokrywa 90% dziennego zapotrzebowania na witaminę D₃, pozostałe 10% dziennej dawki witaminy D₃ powinno być dostarczane w pożywieniu (2).

Proces fotolizy 7-DHC pod wpływem promieniowania UVB (290 – 320 nm) zachodzi dwuetapowo. Najpierw tworzy się produkt pośredni – prewitamina D₃ (3), która ulega powolnej izomeryzacji pod wpływem temperatury do witaminy D₃, lumisterolu i tachysterolu (4). Przedłużona ekspozycja na promieniowanie UVB prowadzi do akumulacji lumisterolu, podczas gdy prewitamina D₃ oraz tachysterol po osiągnięciu swojego maksymalnego poziomu nie gromadzą się w wyniku dalszej ekspozycji na promieniowanie UVB (4). Lumisterol z kolei może ulegać przekształceniu do prewitaminy D₃ gdy jej poziom ulega obniżeniu. Taki mechanizm produkcji witaminy D₃ zapobiega powstawaniu toksycznych jej ilości w wyniku przedłużonej ekspozycji skóry na światło słoneczne (5).

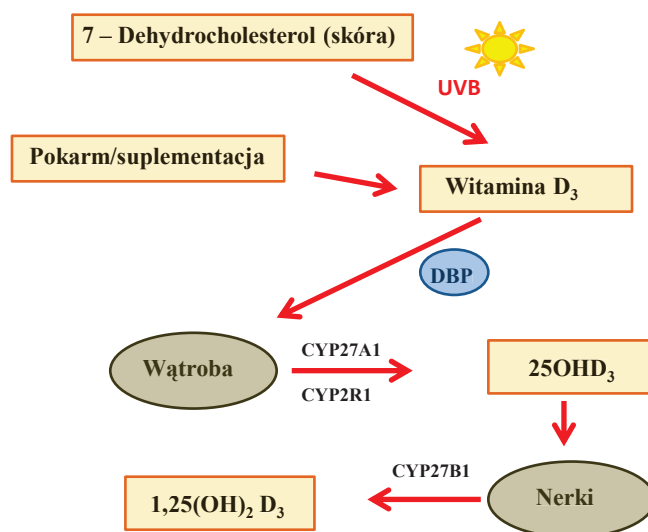


Ryc. 1. Schemat produkcji witaminy D₃ w skórze z 7 – dehydrocholesterolu pod wpływem promieniowania UVB.

Witamina D₃, znana też jako cholekalcyferol, posiada niewielką aktywność biologiczną i wymaga dalszej aktywacji (Ryc. 2). W tym celu ulega ona translokacji przez białko DBP obecne w surowicy krwi (DBP - białko wiążące witaminę D) ze skóry do krwiobiegu (3). Aktywny hormon, czyli 1,25(OH)₂D₃, kalcytriol, powstaje w wyniku dwóch następujących po sobie hydroksylacji. Pierwsza hydroksylacja, w pozycji C-25, przeprowadzana jest przez mitochondrialną i mikrosomalną hydroksylazę (odpowiednio: CYP27A1, CYP2R1) w komórkach wątroby (6). W wyniku tego procesu powstaje forma 25OHD₃, która jest głównym metabolitem witaminy D₃ obecnym we krwi, dlatego też to właśnie jej poziom oznacza się w badaniach laboratoryjnych w celu odzwierciedlenia osobniczego statusu witaminy D₃ (7). Do następnej hydroksylacji dochodzi w nerkach dzięki aktywności mitochondrialnej 1 α -hydroksylazy 25-hydroksykalcyferolu (CYP27B1), czego wynikiem jest powstanie w pełni aktywnej biologicznie formy, 1,25(OH)₂D₃, która transportowana przez krew dociera do różnych tkanek (6).

Co ciekawe, skóra jest jak dotąd jedynym znanym organem wyposażonym w kompletny system do syntezy i metabolizmu witaminy D₃, włączając w to zarówno 25-hydroksylazę oraz 1 α -hydroksylazę, jak i receptor witaminy D (VDR) (8, 9).

Poziom witaminy D we krwi podlega ścisłej regulacji poprzez jej dezaktywację, która zachodzi pod wpływem hydroksylacji w pozycji C-24 (CYP24A1). Reakcji tej podlegają zarówno 1,25(OH)₂D₃, jak i 25OHD₃, a powstające produkty (24,25(OH)₂D₃ oraz 1,24,25(OH)₃D₃) wykazują jedynie niewielkie powinowactwo do receptora witaminy D, a więc niewielką aktywność biologiczną (10). Finalnie, w wyniku serii kolejnych reakcji katalizowanych przez CYP24A1, 1,25(OH)₂D₃ przekształcany jest do rozpuszczalnego w wodzie kwasu kalcytrionowego i w tej formie wydalany jest z moczem (11).



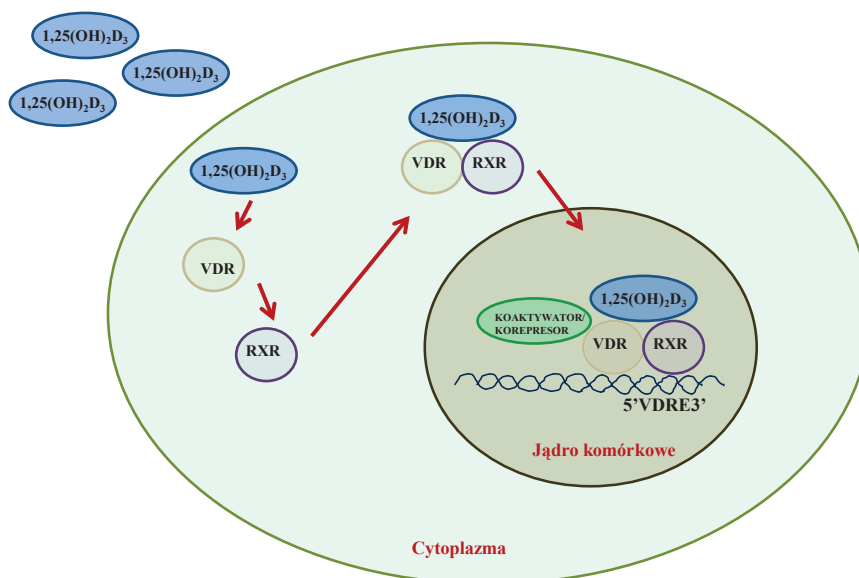
Ryc. 2. Klasyczna droga aktywacji cholekalcyferolu poprzez następujące po sobie etapy hydroksylacji, w wyniku których powstaje hormon w pełni aktywny biologicznie – 1,25(OH)₂D₃, kalcytriol.

1.1.2. Alternatywny szlak metaboliczny 7-DHC prowadzący do powstawania nowych analogów witaminy D₃

Praca badawcza zespołów profesora Andrzeja Słomińskiego i profesora Roberta Tuckey w ostatnich latach zaowocowała odkryciem nowego szlaku metabolicznego dla prekursora witaminy D, 7-dehydrocholesterolu (12). Kluczową rolę odgrywa tu cytochrom P450scc (CYP11A1), a więc enzym rozpoczynający szlak syntezy hormonów sterydowych (12-14). Obecność alternatywnego szlaku metabolicznego umożliwia powstawanie nowych związków o strukturze 5-7 dienów, a każdy z nich jest potencjalnym prekursorem dla analogów witaminy D (15-17). W wyniku wielostopniowej reakcji katalizowanej przez CYP11A1, 7-DHC jest przekształcany do 7-DHP (7-dehydropregnenolon), co wymaga hydroksylacji 7-DHC w pozycji C-20 i C-22, a następnie cięcia łańcucha bocznego (13). 7-DHP z kolei może ulegać dalszej modyfikacji przez enzymy klasycznego metabolizmu związków sterydowych, takich jak 17 α -hydroksylaza czy 17,20-liaza, w wyniku czego powstają nowe związki sterydowe, 5,7-dieny, ze zmodyfikowanymi łańcuchami bocznymi (18). Warto podkreślić, że nie tylko 7-DHC, ale również ergosterol, witamina D₂ czy wreszcie sama witamina D₃, mogą być metabolizowane przez cytochrom P450scc, co prowadzi do powstawania nowej grupy hydroksylowanych pochodnych o potencjalnym znaczeniu fizjologicznym (14, 19-21). Wykazano na przykład, że produkt hydroksylacji witaminy D₃ w pozycji C-20, 20-hydroksywitamina D₃ (20OHD₃), może być hydroksylowany przez CYP11A1 do 20,23-dihydroksywitaminy D₃ (20, 22). Zauważyć należy, że metabolizm 5-7-dienów jak i pochodnych witaminy D przez CYP11A1 potwierdzono zarówno w warunkach *in vitro* (23), jak i *in vivo* (24). Niezmiernie istotne jest również, że nowe pochodne witaminy D wykazują aktywność biologiczną, a ponadto w mniejszym stopniu wpływają na gospodarkę wapniową, stąd też obecnie trwają badania mające na celu określenie ich roli jako potencjalnych czynników przeciwbiałaczkowych (25) oraz przeciwczerśniakowych (26). Niemniej jednak dalsze badania są niezbędne, aby w pełni poznać fizjologiczną rolę nowych metabolitów 7-DHC oraz witaminy D oraz ich ewentualne zastosowania terapeutyczne (27).

1.1.3. Mechanizm działania witaminy D₃

Klasyczny model działania aktywnej formy witaminy D₃, 1,25(OH)₂D₃, zależy od oddziaływania z receptorem witaminy D – VDR (Ryc. 3); (28, 29). VDR jest czynnikiem transkrypcyjnym, wpływającym na ekspresję setek genów, których rejony promotorowe wyposażone są w specyficzną sekwencję – VDRE (z ang. vitamin D response elements) (30, 31). Podobnie jak w przypadku innych receptorów wewnątrzkomórkowych, do wiązania się 1,25(OH)₂D₃ do VDR dochodzi na terenie cytoplazmy komórek. Następnie VDR tworzy heterodimer z receptorem kwasu 9-cis-retinowego RXR (z ang. retinoid X receptor) i cały kompleks wraz z witaminą D ulega traslokacji do jądra komórkowego (28, 29). To właśnie heterodimer VDR – RXR ze związanym ligandem posiada zdolność rozpoznawania elementów VDRE w rejonach promotorowych licznych genów, a inicjacja transkrypcji dodatkowo podlega regulacji poprzez szereg koaktywatorów lub korepresorów transkrypcji (32, 33). Należy podkreślić, że VDR może regulować ekspresję blisko 200 genów (34). Receptor VDR występuje w wielu różnych rodzajach komórek, włączając w to keratynocyty (35), osteoblasty (36), komórki mięśniowe (37) czy komórki przytarczyc (38).



Ryc. 3. Klasyczny mechanizm działania witaminy D₃.

Oprócz opisanego powyżej klasycznego mechanizmu działania witaminy D₃ istnieje również droga odpowiedzi natychmiastowej, związanej ze zmianą wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych oraz z regulacją wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych poprzez aktywację wybranych kinaz i fosfataz. Aktywacja szlaku odpowiedzi natychmiastowej następuje w wyniku oddziaływania aktywnego metabolitu witaminy D₃ z błonowym receptorem alternatywnym 1,25(OH)₂D₃ – MARRSBP (z ang. membrane-associated rapid response steroid-binding protein), znanym też jako białkowa izomeraza disiarczkowa PDIA3 (z ang. protein disulfide isomerase family, member 3) lub białko retikulum endoplazmatycznego ERp57 (z ang. endoplasmic reticulum stress protein 57) (39). Receptor ten sprzężony jest z białkiem G i aktywuje fosfolipazę C, doprowadzając do produkcji trifosforanuinozytolu (IP₃) i diacyloglicerolu (DAG). Powstające przekaźniki drugiego rzędu doprowadzają do gwałtownego uwolnienia jonów wapniowych do cytoplazmy komórki (40). Efektem finalnym oddziaływania 1,25(OH)₂D₃ przez błonowy receptor jest aktywacja szlaku ERK1/2 (41).

1.1.4. Funkcje witaminy D₃

Najważniejszą rolą witaminy D₃, jednocześnie najszerzej poznaną, jest utrzymanie właściwej gospodarki wapniowo – fosforanowej. Celem działania witaminy D₃ jest podnoszenie stężenia wapnia w surowicy krwi do poziomu zapewniającego właściwą mineralizację kośćca (1). Odbywa się to dzięki różnorodnym działaniom regulowanym przez witaminę D₃. Po pierwsze, jest ona jedynym do tej pory poznany hormonem aktywującym białka zaangażowane w aktywną absorpcję wapnia w jelicie (1). Stymuluje także wchłanianie fosforanów w jelitach (1). Jednakże nawet jeśli wapń nie jest dostępny w diecie, bądź też jego ilość dostarczana w pokarmie jest niewystarczająca, uruchamiany zostaje kolejny mechanizm angażujący witaminę D₃, mający na celu utrzymanie właściwego stężenia wapnia w surowicy krwi. Mianowicie wydzielany przez gruczoł przytarczyczny parathormon stymuluje produkcję hormonalnej formy witaminy D₃, która z kolei doprowadza do mobilizowania wapnia zdeponowanego w kościach i uwalniania go do krwi (42). Wynika to z faktu, że 1,25(OH)₂D₃ stymuluje osteoblasty do produkcji ligandu RANKL (z ang. receptor

activator nuclear factor- κ B ligand), który z kolei aktywuje proces osteoklastogenezy i aktywuje osteoklasty do przeprowadzania resorpcji kości (43). Oprócz tego, witamina D₃ promuje zależną od parathormonu zwrotną resorpcję wapnia w kanalikach dystalnych nerek (44, 45).

W świetle stwierdzenia, iż witamina D₃ przede wszystkim służy jako „strażnik” prawidłowego stężenia wapnia w surowicy krwi, paradoksalnym wydaje się fakt, że działanie 1,25(OH)₂D₃ kluczowe jest w procesie mineralizacji kości. Od ponad 100 lat wiadomym jest jednak, że niedobór witaminy D₃ u dzieci jest przyczyną krzywicy, u dorosłych natomiast powoduje osteomalację (42). Wszystkie trzy główne typy komórek kości, tj. osteoblasty, osteoklasty i osteocyty, wykazują ekspresję zarówno VDR, jak również CYP27B1, czyli 1 α -hydroksylazy 25-hydroksywitaminy D₃ (42). Dzięki ekspresji CYP27B1 komórki kości są zdolne do produkcji aktywnej formy witaminy D₃ z obecnego w krwiobiegu głównego metabolitu, czyli 25 – hydroksywitaminy D₃, która następnie może oddziaływać parakrynowo. Mutacje w genie kodującym 1 α -hydroksylazę 25-hydroksywitaminy D₃ objawiają się zależną od witaminy D₃ krzywicą typu I, która jest schorzeniem autosomalnym recesywnym, charakteryzującym się bardzo wczesnym pojawianiem się objawów choroby z towarzyszącą hipokalcemią (46). Witamina D₃ posiada zdolność utrzymywania homeostazy wapniowej zależną od środowiskowej dostępności wapnia (42). W sytuacji, gdy ilość wapnia dostarczanego w diecie jest wystarczająca, co ma swoje odzwierciedlenie we właściwym stężeniu wapnia w surowicy krwi, komórki kości, a szczególnie osteoblasty, przekształcają 25-hydroksyvitaminę D₃ do 1,25(OH)₂D₃, który wspiera depozycję wapnia w kościach (42). W sytuacji odwrotnej, kiedy stężenie wapnia obecnego w surowicy krwi jest niskie, witamina D₃ stymuluje resorpcję wapnia z kości i hamuje ich mineralizację (42). W warunkach *in vitro* pokazano, że przeprowadzana przez osteoblasty mineralizacja macierzy kostnej wzmacnia się pod wpływem działania 25-hydroksywitaminy D₃ (47). Z drugiej strony, witamina D₃ jest również zaangażowana w supresję resorpcyjnej aktywności osteoklastów poprzez modyfikowanie ich zdolności migracyjnych oraz adhezji powierzchniowej (48).

Funkcja witaminy D₃ nie ogranicza się jedynie do regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej. Stwierdzenie to poparte jest chociażby obserwacją, iż receptor VDR obecny jest nie tylko w enterocytach czy osteoblastach, ale występuje również w

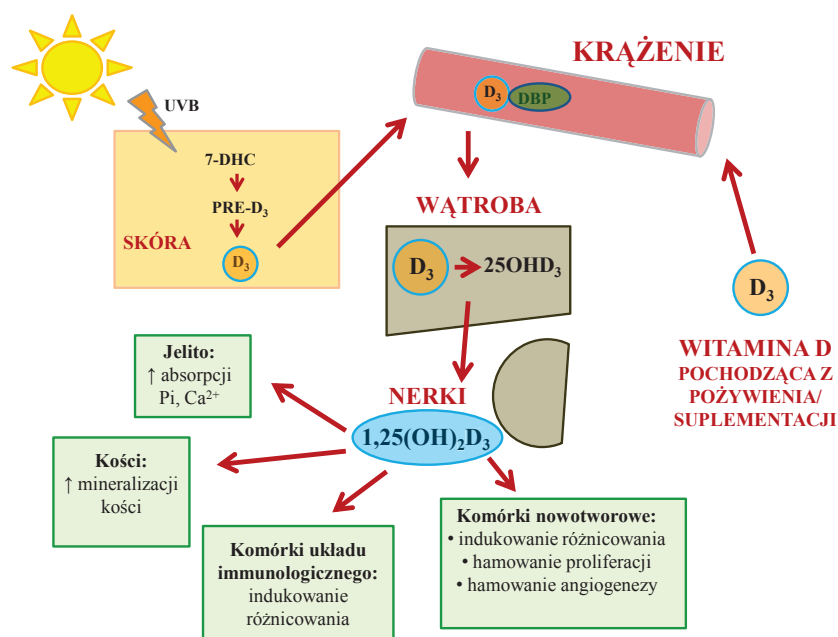
komórkach gruczołu przytarczycznego, keratynocytach, promielocytach czy komórkach jajnika (1). Na przykład wykazano, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ odgrywa kluczową rolę w procesie różnicowania promielocytów do monocytów (49). Powstająca w naskórku witamina D uczestniczy wraz z wapniem w procesie odnowy bariery naskórkowej (50, 51). W keratynocytach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nasila ekspresję specyficznych białek, odpowiedzialnych za proces różnicowania się komórek naskórka, zarazem hamując proliferację komórek (4). Wykazano, że keratynocyty są zdolne do produkcji znaczących ilości $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ z 25-hydroksywitaminy D_3 pod regulacyjnym wpływem egzogennej $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Co istotne, produkcja biologicznie aktywnej formy witaminy D_3 oraz ekspresja jej receptora w poszczególnych warstwach naskórka zależy od stopnia zróżnicowania keratynocytów. Sugeruje to obecność mechanizmu sprzężenia zwrotnego – gdyż w obu przypadkach dochodzi do hamowania w późniejszych etapach różnicowania (52). Wykazano również, że w warunkach *in vivo* wapń formuje gradient w naskórku, w którym najmniejsze stężenie występuje w warstwie podstawnej, największe zaś w warstwie ziarnistej (53). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podwyższa wewnątrzkomórkowy poziom wapnia poprzez stabilizowanie mRNA komórkowego receptora wapnia CaR (z ang. calcium sensing receptor) (54) oraz indukowanie fosfolipazy C, a w konsekwencji trifosforanu inozytolu, który inicjuje otwarcie wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych (55). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nasila ekspresję inwolukryny, transglutaminazy, lorykryny oraz filagryny i wzmacnia indukowane wapniem różnicowanie keratynocytów zarówno na poziomie ekspresji genów, jak i stabilności mRNA (56). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nasila również formowanie warstwy rogowej (57). Zatem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wraz z wapniem oddziałują na wielu płaszczyznach, regulując w ten sposób proces wzrostu i różnicowania się keratynocytów.

Zaobserwowano również, że suplementacja witaminą D_3 poprawia wydajność tkanki mięśniowej i zmniejsza podatność na upadki u osób starszych z niedoborami witaminy D_3 (58). Wykazano, że blisko 90% pacjentów cierpiących na bóle mięśniowo – kostne w istocie ma niedobór witaminy D_3 (59). Wiadomym jest także, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podwyższa ekspresję VDR w miogennych liniach komórkowych (58). Odnotowano także, iż suplementacja biologicznie aktywną formą witaminy D_3 w warunkach *in vitro* podwyższa ekspresję łańcucha ciężkiego miozyny w zróżnicowanych mioblastach mysiej linii mięśni szkieletowych C2C12, co sugeruje, że

właściwe stężenie witaminy D₃ może wywierać efekt anaboliczny na zróżnicowaną tkankę mięśniową poprzecznie prążkowaną (60).

Wiele badań sugeruje również neuroprotekcijną rolę witaminy D₃. Kilka lat temu Eyles i współpracownicy donieśli, że receptor witaminy D₃ oraz 1 α -hydroksylaza 25-hydroksywitaminy D₃, czyli enzym odpowiedzialny za ostateczną aktywację witaminy D₃, obecne są w mózgu, głównie w podwzgórzu i neuronach dopaminergicznych istoty czarnej (61). Zaobserwowano również, że wyższe stężenia witaminy D₃ w surowicy krwi korelują z lepszymi wynikami testów neuropsychiatrycznych pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona, zwłaszcza zaś z płynnością wypowiedzi i pamięcią (62).

Olbrzymi i zróżnicowany potencjał witaminy D₃ nie ogranicza się jedynie do oddziaływania na zdrowe komórki naszego organizmu. 1,25(OH)₂D₃ może również wywierać efekt antyproliferacyjny na komórki nowotworowe poprzez regulację cyklu komórkowego. Wynika to z faktu, że niektóre z elementów maszyneryi regulującej cykl komórkowy, takie jak *CDKN1A* czy *GADD45A* (kodują odpowiednio p21 i p27), posiadają funkcjonalne elementy VDRE, tym samym stają się bezpośrednim transkrypcyjnym celem kompleksu VDR-RXR-1,25(OH)₂D₃ (63). Wykazano, że kompleksy VDR - 1,25(OH)₂D₃ aktywują transkrypcję *CDKN1A* i w konsekwencji powodują zatrzymanie cyklu komórkowego w ludzkiej mielomonocytarnej linii U937 (63). Przeciwnowotworowe właściwości witaminy D₃ przynajmniej po części wynikają również ze zdolności do indukcji apoptozy. 1,25(OH)₂D₃ posiada zdolność regulowania kluczowych mediatorów apoptozy. Wykazano, że 1,25(OH)₂D₃ podwyższa ekspresję proapoptotycznych białek BAK i BAX w przypadku raka prostaty i gruczolakoraka (64). Co więcej, 1,25(OH)₂D₃ hamuje również angiogenezę, która uznawana jest za proces nieodłącznie towarzyszący metastazie nowotworów, w tym czerniaka (27). Podsumowując, aktywna forma witaminy D pełni szereg istotnych funkcji w organizmie, z których najważniejsze przedstawiono na Ryc. 4.



Ryc. 4. Główne efekty wywierane przez biologicznie aktywną formę witaminy D_3 w różnych tkankach docelowych (63).

1.1.5. Niedobór witaminy D_3

Jak opisano powyżej, witamina D_3 pełni szereg różnorodnych funkcji w naszym organizmie, stąd też konsekwencje jej niedoboru mogą być ogólnoustrojowe. Niestety, niedobór witaminy D jest powszechny w wielu populacjach na całym świecie (7). W Stanach Zjednoczonych niemal jedna trzecia populacji wykazuje niedobór witaminy D_3 , mimo iż żywność wzbogacana w witaminę D jest tam szczególnie szeroko dostępna (65). Niedobór witaminy D odnotowywany jest również na terenie Europy, Chin, Kanady i innych krajów o podobnym klimacie, charakteryzujących się relatywnie niewielkim stopniem nasłonecznienia przez większą część roku (66, 67). Poza niedostateczną ekspozycją na światło słoneczne również takie uwarunkowania jak ciemna karnacja, otyłość ($BMI > 30$), zaburzenia wchłaniania czy zaawansowany wiek uznawane są za czynniki ryzyka niedoboru witaminy D (68, 69).

Tabela 1. Status osobniczy witaminy D₃ wyznaczany na podstawie stężenia jej głównego metabolitu, 25OHD₃ w surowicy krwi (69).

Stężenie 25 – hydroksywitaminy D₃ w surowicy krwi	Status witaminy D₃
< 20 ng/ml (< 50 nM)	Niedobór
20 – 30 ng/ml (50 – 75 nM)	Status suboptymalny
30 – 50 ng/ml (75 – 125 nM)	Rekomendowane stężenie docelowe

Zgodnie z ostatnio opublikowanymi zaleceniami multidyscyplinarnego zespołu naukowców, stężenie 25-hydroksywitaminy D₃ w surowicy powinno wynosić od 30 do 50 ng/ml, aby zapewnić optymalne oddziaływanie witaminy D₃ na tkanki docelowe (Tab. 1) (69). Niedobór witaminy D₃ jest natomiast definiowany jako stężenie 25-hydroksywitaminy D₃ w surowicy niższe niż 20 ng/ml, zaś zakres stężeń 25-hydroksywitaminy D₃ 20 – 30 ng/ml rozumiany jest jako poziom suboptymalny o widocznym, pozytywnym wpływie na organizm (69). Zespół ten opracował również rekomendowane dawki dziennego spożycia witaminy D, które przedstawiono w Tabeli 2 (69).

Niedobór witaminy D₃ skutkuje wzmożoną sekrecją parathormonu, co z kolei skutkuje znaczącym spadkiem wchłaniania wapnia w jelitach i jednocześnie nasiloną resorpcją kości (68, 70). Dodatkowo parathormon podwyższa metabolizm 25-hydroksywitaminy D₃ do 1,25(OH)₂D₃, co prowadzi do zaostrzenia niedoboru witaminy D₃ i w konsekwencji do wtórnej nadczynności przytarczyc (71). Doprowadza to do nasilonego wydalania fosforanów z moczem, co następnie odzwierciedla się w obniżonym stężeniu fosforanów w surowicy krwi (71). Niedostateczne zaś stężenie wapnia i fosforanów w surowicy krwi wpływa za defekty w mineralizacji macierzy kostnej, prowadząc do rozwoju krzywicy u dzieci oraz bolesnej osteomalacji u dorosłych (68, 70, 71).

Tabela 2. Rekomendowane dawki dziennego spożycia witaminy D (69).

Charakterystyka populacji	Rekomendowane dawki dziennego spożycia witaminy D
Noworodki i niemowlęta (0 – 12 miesięcy)	400 IU (10,0 µg) 0 – 6 miesięcy 400 – 600 IU (10,0 – 15,0 µg) 6 – 12 miesięcy , w zależności od zawartości witaminy D w diecie
Dorośli i młodzież (1 – 18 lat)	600 – 1000 IU (15,0 – 25,0 µg) od sierpnia do kwietnia, bądź przez cały rok w przypadku niewystarczającej syntezy skórnej
Dorośli (18 – 65 lat)	800 – 2000 IU (20,0 – 50,0 µg) od sierpnia do kwietnia, bądź przez cały rok w przypadku niewystarczającej syntezy skórnej
Osoby starsze (> 65 roku życia)	800 – 2000 IU (20,0 – 50,0 µg) przez cały rok
Kobiety w ciąży/ matki karmiące	1500 – 2000 IU (37,5 – 50,0 µg)

Rola witaminy D nie ogranicza się jedynie do układu kostnego. Już w 1981 roku Scragg zaobserwował, że śmiertelność z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego odwrotnie koreluje z intensywnością promieniowania UVB (72). W kolejnych latach obserwacja ta została doprecyzowana, gdyż okazało się, że to właśnie niedobór witaminy D jest powiązany ze zwiększoną częstością epizodów sercowo-naczyniowych powiązanych z wyższym ciśnieniem krwi (73-75). Wykazano, że wysoki poziom parathormonu, który wskazuje na niedobór witaminy D, jest powiązany z przerostem mięśnia sercowego i podwyższonym ciśnieniem krwi (76). Potencjalny mechanizm obserwowanego zjawiska opiera się na spostrzeżeniu, że poziom witaminy D₃ odwrotnie koreluje z aktywnością systemu renina – angiotensyna – aldosteron (75, 77). Niedawno Forman opisał, że nawet wśród pacjentów normotensyjnych niższe stężenie 25-hydroksywitaminy D₃ w surowicy krwi związane było z istotnie wyższym stężeniem angiotensyny II w krwiobiegu, która jest pośrednim wskaźnikiem aktywności RAS (z ang. renin – angiotensin system) w nerkach (77). To odkrycie popiera koncepcję,

zgodnie z którą niedobór witaminy D₃ może skutkować podwyższeniem aktywności RAS u ludzi (77).

Niski poziom witaminy D₃ jest również uznawany za czynnik ryzyka rozwoju miażdżycy (78). Miażdżycą jest chorobą przewlekłą, charakteryzującą się pogrubieniem ściany tętnic w wyniku akumulacji wapnia i lipidów z towarzyszącą lokalną odpowiedzią zapalną (78). Wykazano, że 1,25(OH)₂D₃ zapobiega formowaniu komórek piankowatych (z ang. foam cells) (79). Ponadto, lokalna produkcja 1,25(OH)₂D₃ może również w sposób parakrynowy regulować aktywację komórek śródbłonna oraz ekspresję TNF- α , gdyż wiadomym jest, że komórki śródbłonna wykazują ekspresję 1 α -hydroksylazy (78, 80). Rzeczywiście, pokazano, że suplementacja witaminą D₃ wywiera efekt przeciwmiażdżycowy poprzez podwyższanie poziomu przeciwzapalnej cytokiny IL-10 w surowicy krwi oraz stabilizowanie poziomu TNF- α (81).

Niedobór witaminy D₃ jest również łączony z zaburzeniami metabolizmu glukozy i podwyższonym ryzykiem rozwoju cukrzycy (75). Ponieważ zarówno VDR, jak również 1 α -hydroksylaza, ulegają ekspresji w komórkach β trzustki, regulacyjny wpływ witaminy D₃ na insulinę jest obecnie badany (75). Co więcej, wiadomo również, że VDR obecny jest we wszystkich insulino-zależnych tkankach (82). Dlatego też niedobór witaminy D₃ łączony jest z nietolerancją glukozy oraz z cukrzycą typu II. Rozważane jest bezpośrednie oddziaływanie witaminy D przez aktywację VDR, albo też pośrednie poprzez negatywny efekt niedoboru witaminy D₃ na poziom wapnia w surowicy krwi (82). Jak wiadomo, wapń z kolei niezbędny jest do syntezy insuliny i jej sekrecji (75). Warto również zauważyć w tym miejscu, że niedobór witaminy D₃ powiązany jest z podwyższeniem aktywności RAS, jak to opisano powyżej. Zwiększona aktywność RAS z kolei upośledza funkcjonowanie komórek β trzustki oraz wrażliwość tkanek obwodowych na insulinę (83). Zaobserwowano także korelację pomiędzy niedoborem witaminy D₃ i występowaniem cukrzycy typu I (84), co może być związane z tym, że hormonalna forma witaminy D₃ działa jako immunomodulator, obniżający produkcję cytokin i proliferację limfocytów, które przyczyniają się do niszczenia komórek β trzustki (7). Giuletta pokazał, że niedobór witaminy D₃ na wczesnych etapach życia myszy typu NOD (z ang. non obese diabetic), które reprezentują mysi model cukrzycy o podłożu autoimmunologicznym, prowadzi do szybszego rozwoju choroby o bardziej agresywnym charakterze (85).

Zaobserwowano również, że poziom witaminy D₃ wpływa na wyniki leczenia szeregu nowotworów, włączając w to nowotwory piersi, okrężnicy, płuc oraz chłoniaki (86). Co więcej, wśród pacjentów z rozpoznanym rakiem trzustki w stadium III oraz IV zaobserwowano znaczącą korelację pomiędzy niedoborem witaminy D i słabszą odpowiedzią na leczenie (87). Z analiz prospektywnych wynika również, że wyższy poziom 25-hydroksywitaminy D₃ poprzedzający diagnozę raka okrężnicy związany był z wydłużeniem całkowitego przeżycia pacjentów (88). Podobną korelację odnotowano wśród pacjentów cierpiących na raka prostaty (89). Niski poziom witaminy D₃ oznaczany w czasie diagnozowania wczesnego raka piersi związany jest z podwyższonym ryzykiem nawrotu choroby i śmierci u pacjentów (90).

Na zakończenie warto również wspomnieć, że niedobór witaminy D₃ jest również łączony ze zwiększoną zapadalnością na innego rodzaju schorzenia, takie jak schizofrenia czy depresja (66), a także stwardnienie rozsiane (91, 92). Potencjalna rola witaminy D₃ jest również sugerowana w reumatoidalnym zapaleniu stawów, zapaleniach jelit i toczeniu rumieniowatym (7).

1.2. Stres oksydacyjny

Tlen jest niewątpliwie pierwiastkiem niezbędnym do życia organizmów aerobowych. Bezwzględne zapotrzebowanie na tlen niejako przesłania fakt, że może być on w istocie toksyczny i mutagenny, zaś organizmy aerobowe przetrwały jedynie dzięki wykształceniu obrony antyoksydacyjnej (93), gdyż oddychanie tlenowe nieodłącznie związane jest z produkcją znacznych ilości reaktywnych form tlenu (RFT) (94-97).

Stres oksydacyjny definiowany jest jako rezultat nadprodukcji reaktywnych form tlenu lub też wynik nieskutecznej przed nimi obrony (95, 97). Innymi słowy jest to stan przesunięcia równowagi reakcji utleniania – redukcji w stronę utleniania (97, 98). Powstające reaktywne formy tlenu wchodzi w reakcję ze składnikami organicznymi komórki, skutki zaś takich reakcji mogą być groźne dla organizmu (93). W obronie przed RFT na poziomie komórkowym dochodzi do nasilenia aktywności enzymów odpowiedzialnych za ich neutralizację (94, 95, 97). Ponadto komórki dysponują

również nieenzymatycznymi mechanizmami obrony przed RFT, bazującymi na przeciwutleniaczach endogennych (94, 95, 97).

Stres oksydacyjny uznawany jest obecnie za istotny czynnik patogenezy wielu schorzeń, takich jak nowotwory, choroby układu sercowo – naczyniowego, czy schorzenia neurodegeneracyjne, jak chociażby choroba Alzheimera (94, 99). Ponadto RFT przyczyniają się również do procesu starzenia się organizmu, u podłoża którego leży akumulacja uszkodzeń cząsteczek budujących komórki (100, 101).

1.2.1. Reaktywne formy tlenu

Tlen obecny w powietrzu to cząsteczki w stanie trypletowym, $^3\text{O}_2$, który jest dla tlenu stanem podstawowym (94, 97, 102). Tlen reaguje ze związkami organicznymi pobierając od nich elektrony, sam zaś ulega redukcji (94). Do całkowitej redukcji cząsteczki tlenu wymagane jest przyłączenie do niej czterech elektronów i czterech protonów, co prowadzi do powstania dwóch cząsteczek wody, związku niereaktywnego wobec składników komórki (94):



Tlen cząsteczkowy jest stosunkowo mało reaktywny (94, 97), bardziej reaktywne formy przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka głównych reaktywnych form tlenu.

	Reaktywna forma tlenu	Charakterystyka	Literatura
1	Tlen singletowy, $^1\text{O}_2$	Powstaje w wyniku wzbudzenia cząsteczek tlenu, np. w wyniku zaabsorbowania kwantu promieniowania ultrafioletowego	(94, 97)
2	Anionorodnik ponadtlenkowy, $\text{O}_2^{\cdot-}$	Powstaje w komórkach podczas redukcji tlenu w łańcuchu oddechowym w mitochondriach, a także w reakcji utleniania ksantyny przy udziale oksydazy ksantynowej lub też w czasie syntezy tlenu azotu	(94, 103)
3	Rodnik wodoronadtlenkowy, $\text{HO}_2^{\cdot}$	Uprotonowana forma anionorodnika ponadtlenkowego, może atakować kwasy tłuszczowe oraz inicjować peroksydację lipidów. Łatwiej niż anionorodnik ponadtlenkowy reaguje z substancjami naładowanymi ujemnie, łatwiej też przenika przez błony komórkowe. Może też przebywać w lipidowym wnętrzu błony, która stanowi rodzaj rozpuszczalnika organicznego, stabilizującego ten rodnik	(94)
4	Nadtlenek wodoru, H_2O_2	Reaktywna forma tlenu nieposiadająca charakteru rodnikowego. Powstaje przez przyłączenie elektronu do anionorodnika ponadtlenkowego; może również powstawać jako produkt dwuelektronowej redukcji cząsteczki tlenu w wyniku działania oksydazy ksantynowej. W komórce głównym źródłem nadtlenu wodoru są peroksysony. Związek ten z łatwością przenika przez błony, może więc pojawiać się w komórce w przedziałach odległych od swojego miejsca powstawania, jednak obecność katalazy, enzymu rozkładającego nadtlenek wodoru, zapobiega uwalnianiu znaczniejszych jego ilości do cytoplazmy. Enzymem rozkładającym nadtlenek wodoru oprócz katalazy jest także peroksydaza glutationowa. Nadtlenek wodoru w pH bliskim obojętnemu utlenia głównie grupy tiolowe, imidazolowe, fenolowe, a także tioestrowe.	(94, 103)
5	Rodnik hydroksylowy, $^{\cdot}\text{OH}$	Najbardziej aktywny utleniacz spotykany w układach biologicznych, reaguje z mnóstwem substancji w sposób mało specyficzny, odpowiadając m. in. za uszkodzenia DNA	(94, 102)
6	Ozon, O_3	W roztworach wodnych ulega rozpadowi do nadtlenu wodoru z wytworzeniem rodników $^{\cdot}\text{OH}$ oraz $\text{HO}_2^{\cdot}$, dlatego też skutki wdychania ozonu dotyczą nie tylko płuc, ale również innych tkanek, m. in. serca, mózgu czy wątroby.	(94, 104-106)
7	Tlenek azotu, $\text{NO}^{\cdot}$	Powstaje z aminokwasu argininy w reakcji katalizowanej przez grupę enzymów nazywanych syntazami tlenu azotu (NOS). Reaguje głównie z białkami, zwłaszcza posiadającymi centra żelazowo-siarkowe, grupy hemowe lub też jony metali przejściowych; funkcjonuje też jako cząsteczka sygnałowa, głównie w neuronach i układzie immunologicznym. Może oddziaływać auto- bądź parakrynowo, przenikając przez błony komórkowe	(94, 107-109)

1.2.2. Mechanizmy obrony przed RFT

System antyoksydacyjny, przeciwdziałający toksycznym efektom wywieranym przez reaktywne formy tlenu, sklasyfikować można następująco:

1. mechanizmy pierwszej linii obrony, niedopuszczające do wchodzenia reaktywnych form tlenu w reakcje z biologicznie istotnymi związkami,
2. mechanizmy odpowiedzialne za terminację łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych, stanowiące drugą linię obrony,
3. mechanizmy usuwające negatywne skutki reakcji RFT z biocząsteczkami (94).

Do mechanizmów pierwszej linii obrony zalicza się enzymy rozkładające reaktywne formy tlenu. Najważniejsze enzymy zaliczane do tej grupy to dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza oraz peroksydaza glutationowa (GPx) (94).

1.2.2.1. Dysmutaza ponadtlenkowa SOD

Dysmutaza ponadtlenkowa SOD jest metaloenzymem uznawanym za fundamentalny element mechanizmów obronnych przed toksycznym działaniem nadtlenu (103). U ssaków wyróżnia się trzy rodzaje dysmutaz ponadtlenkowych:

1. cytoplazmatyczną formę dysmutazy ponadtlenkowej wewnątrzkomórkowej, zawierającą w centrum aktywnym miedź i cynk, Cu,ZnSOD, określaną także jako SOD1; białko to występuje w postaci homodimeru; atom miedzi odgrywa rolę katalityczną, zaś cynk stabilizuje strukturę trzeciorzędową białka (94, 110); Gen kodujący SOD1 zlokalizowany jest na 21 chromosomie, białko to poza cytozolem występować może także na terenie jądra komórkowego lub w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (111). Zaobserwowano, że nadekspresja genu *sod-1* u *Drosophila melanogaster* wydłuża życie (112), u myszy natomiast odgrywa rolę ochronną przed uszkodzeniami tkanki mózgowej powstającymi w wyniku niedokrwienia (113). Mutacje genu *SOD1* u ludzi

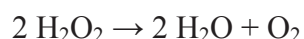
- związane są ze wzrostem stresu oksydacyjnego i powiązane są z chorobami neurodegeneracyjnymi, np. stwardnieniem zanikowym bocznym (114, 115);
2. mitochondrialną formę, zawierającą mangan i występującą w macierzy mitochondrialnej w formie tetrameru, określaną jako MnSOD lub SOD2 (94); Gen kodujący SOD2 zlokalizowany jest na chromosomie 6. Knockout *Sod2* u myszy skutkuje kardiomiopatią i neurodegeneracją (111). Brak SOD2 związany jest z podwyższonym poziomem anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach, co doprowadza do inhibicji I i II kompleksu łańcucha oddechowego (116).
 3. postać pozakomórkową dysmutazy ponadtlenkowej, EC-SOD (SOD3), która jest białkiem zawierającym miedź i cynk, posiadającym reszty sacharydowe. Białko to występuje jako tetramer, głównie w formie związanej z wielocukrami glikokaliksu obecnego na zewnętrznej powierzchni błon komórkowych (94). Gen kodujący SOD3 występuje na chromosomie 4. Enzym ten odpowiedzialny jest za ochronę komórek oraz macierzy pozakomórkowej przed szkodliwymi efektami wywoływanymi przez anionorodnik ponadtlenkowy produkowany przez aktywowane neutrofile (111). Zaobserwowano, że mutacja w genie *SOD3* związana jest z podwyższonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych (117).

Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego (94):



1.2.2.2. Katalaza

Katalaza jest hemoproteina występującą w peroksysomach. Enzym ten w dwustopniowej reakcji katalizuje rozkład nadtlenu wodoru do tlenu cząsteczkowego i wody (94, 118, 119):

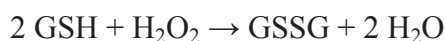


U ludzi enzym ten występuje w formie homotetrameru (118). Miejsce aktywne enzymu dostępne jest niemal wyłącznie dla głównego substratu, którym jest nadtlenek wodoru, ponieważ hem znajduje się w głębi wąskiego, hydrofobowego kanału (119).

Inhibicja aktywności katalazy związana jest z hamowaniem β -oksydacji kwasów tłuszczowych, która przebiega w peroksysomach (120). Z kolei nadekspresja genu *Cat* w modelu mysim prowadzi do wydłużenia średniej długości życia transgenicznych zwierząt (121).

1.2.2.3. Peroksydaza glutationowa

Peroksydaza glutationowa jest kolejnym, oprócz katalazy, enzymem rozkładającym nadtlenek wodoru, redukującym go do wody i tlenu z udziałem zredukowanego glutationu (94, 122, 123):



Oprócz tego peroksydaza glutationowa utlenia także nadtlenki organiczne, np. nadtlenki lipidów (94). Enzym ten funkcjonuje zatem zarówno w pierwszej linii obrony, niedopuszczając do kontaktu RFT ze składnikami komórki, jak i w drugiej linii obrony, terminując reakcje wolnorodnikowe (94). Z peroksydazą glutationową współdziała reduktaza glutationowa, odtwarzająca zredukowany glutation poprzez utlenianie NADPH (94). Wszystkie rodzaje peroksydazy glutationowej zawierają w centrum aktywnym selenocysteinę, która w przeciwieństwie do cysteiny zamiast atomu siarki zawiera selen (94). U ludzi występują cztery różne formy tego enzymu:

1. Wewnątrzkomórkowa klasyczna forma peroksydazy glutationowej, cGPx (GPx-1) (z ang. classic), która występuje w wielu typach komórek w formie homotetrameru (94). Enzym ten może występować na terenie cytoplazmy, w mitochondriach lub też w peroksysomach (122).
2. Peroksydaza żołądkowo-jelitowa (z ang. gastrointestinal), GI-GPx, obecna przede wszystkim w ścianie przewodu pokarmowego, stanowi obronę przed nadtlenkami i ksenobiotykami trafiającymi do przewodu pokarmowego (94).
3. Forma osoczowa, pGPx (z ang. plasma), występująca w płynach pozakomórkowych oraz w tkankach takich jak łożysko czy nerki, chroniąca przestrzeń pozakomórkową (94).
4. Peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków fosfolipidów, PHGPx (z ang. phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase), która w przeciwieństwie

do pozostałych typów występuje w formie monomerycznej (94). Enzym ten ochrania błony komórkowe przed peroksydacją fosfolipidów (94). W dużych ilościach forma ta występuje w mitochondriach plemników (94).

Aktywność GPx może być hamowana przez związki powstające w warunkach fizjologicznych, np. tlenek azotu lub też przez produkty peroksydacji lipidów (124).

1.2.2.4. Antyoksydanty niskocząsteczkowe

W walce z reaktywnymi formami tlenu istotną rolę oprócz enzymów pełnią także związki niskocząsteczkowe, zwane antyoksydantami niskocząsteczkowymi lub zmiataczami wolnych rodników (94). Związki te, z uwagi na niższą w porównaniu z enzymami specyficzność reakcji, są bardziej uniwersalne (94).

Do najważniejszych przeciwutleniaczy hydrofilowych zalicza się wspomniany już powyżej zredukowany glutation oraz askorbinian (94). Wykazano również, że także melatonina, hormon produkowany przez szyszynkę, wykazuje właściwości antyoksydacyjne, hamując peroksydację lipidów, a ponadto posiada wyjątkową możliwość ochrony zarówno środowiska hydrofilowego, jak i hydrofobowego, np. błon komórkowych (125, 126). Właściwości antyoksydacyjne przypisuje się także melaninom, barwnikom powstającym w wyniku utleniania i polimeryzacji tyrozyny (94). Najważniejszym przeciwutleniaczem hydrofobowym jest z kolei α -tokoferol, czyli witamina E (94).

1.3. Witamina D₃ a reaktywne formy tlenu

Dane literaturowe nie definiują w sposób jednoznaczny witaminy D, jako czynnika powiązanego ze stresem oksydacyjnym. Jedne doniesienia przypisują witaminie D właściwości antyoksydacyjne, podczas gdy inne charakteryzują ją zgoła odmiennie. Należy podkreślić, że promieniowanie UV jest również silnym induktorem powstawania RFT, co przyczynia się do uszkodzenia białek, błon lipidowych oraz DNA prowadzących do śmierci komórki lub transformacji nowotworowej. Uważa się, że

promieniowanie UV jest jednym z głównych czynników wywołującym nowotwory skóry, w tym czerniaki (127). Dlatego też wydaje się, że istotne jest zbadanie roli witaminy D oraz jej naskórkowej produkcji w powstawaniu i usuwaniu RFT.

Wykazano na przykład, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ działa jako prooksydant w ludzkich komórkach linii raka piersi MCF-7, wpływając na wzrost całkowitego potencjału redoks komórek, co może przekładać się na funkcjonowanie enzymów wrażliwych na zmiany tego potencjału, a także czynników transkrypcyjnych regulujących przebieg cyklu komórkowego, różnicowanie czy proces apoptozy (128). Inny zespół badawczy z wykorzystaniem tej samej linii komórek raka piersi wykazał, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ istotnie zmniejszał poziom mRNA genu kodującego SOD1, a także ilość białka oraz jego aktywność (129). W badaniach tych wykazano także, że preinkubacja komórek MCF-7 z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ uwrażliwiała je na cytotoksyczne działanie cytostatyku doksorubicyny, które w głównej mierze polega na generowaniu reaktywnych form tlenu (129). W komórkach kości analogi witaminy D prowadzą do indukcji stresu oksydacyjnego poprzez indukcję ekspresji lipooksygenazy, czemu towarzyszy ryzyko utleniania lipidów (130).

Z drugiej strony wykazano, że hormonalna forma witaminy D_3 wywiera efekt antyoksydacyjny w nienowotworowych ludzkich komórkach nabłonkowych prostaty linii BPH-1 oraz RWPE-1 (131). W badaniach tych zaobserwowano, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ indukuje ekspresję genu kodującego jeden z kluczowych enzymów antyoksydacyjnych, dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD). Ponieważ sekwencje VDRE wykryto w genie kodującym G6PD, regulacja jego ekspresji przez VDR związany ze swoim ligandem jest możliwa (131). Jednocześnie zjawiska tego nie zaobserwowano w nowotworowych liniach komórek nabłonka prostaty CWR22R oraz DU 145 (131). W szczurzym modelu cukrzycy indukowanej alloxanem administrowanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zarówno prewencyjne, jak i terapeutyczne, istotnie wpływało na podwyższenie aktywności SOD, CAT oraz GPx w odniesieniu do zwierząt chorych (132). Wykazano także, iż podawanie hormonalnej formy witaminy D_3 pacjentom cierpiącym na cukrzycę typu II obniża markery stresu oksydacyjnego, takie jak dialdehyd malonowy (MDA) (133). Odnotowano także, że suplementowanie 800 IU witaminy D_3 przez 6 miesięcy wpływa na zmniejszenie oksydacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach zdrowego nabłonka okrężnicy u pacjentów ze sporadycznymi przypadkami gruczolaków w

wywiadzie, co potwierdzono immunohistochemicznym barwieniem biopsji 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyną (134).

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej przykłady, potwierdzające zarówno prooksydacyjny, jak i antyoksydacyjny charakter witaminy D, zagadnienie to zostanie szerzej omówione w Dyskusji.

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było zbadanie potencjalnego wpływu witaminy D na wrażliwość keratynocytów na reaktywne formy tlenu (RFT), włączając w to leki przeciwnowotworowe, których mechanizm działania opiera się, między innymi, na indukowaniu produkcji RFT. Realizacja tego celu obejmowała:

- Określenie pro- lub antyoksydacyjnych właściwości witaminy D oraz jej analogów;
- Zbadanie wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z analogami witaminy D na wzrost oraz indukcję śmierci komórkowej wywoływanej przez nadtlenek wodoru, bądź cisplatynę;
- Zbadanie potencjalnych mechanizmów współdziałania analogów witaminy D z nadtlenkiem wodoru w procesie zahamowania wzrostu keratynocytów.

3. MATERIAŁY

3.1. Linie komórkowe

W badaniach wykorzystano linię HaCaT, spontanicznie transformowaną linię ludzkich keratynocytów oraz linię HPEKp, progenitorowych ludzkich epidermalnych keratynocytów.

Linię HaCaT otrzymano dzięki uprzejmości profesora Andrzeja Słomińskiego (Department of Pathology, The University of Tennessee, Memphis, USA) i hodowano w pożywce DMEM wzbogaconej 10% surowicą (z ang. FBS, fetal bovine serum) i 1% roztworem antybiotyków: penicyliny i streptomycyny (P/S). W czasie doświadczeń z witaminą D oraz jej analogami stosowano płodową surowicę bydlęcą oczyszczoną przy pomocy węgla aktywnego (ang. charcoal stripped serum), w celu usunięcia związków sterydowych w tym witaminy D, które mogłyby wpływać na wyniki doświadczeń.

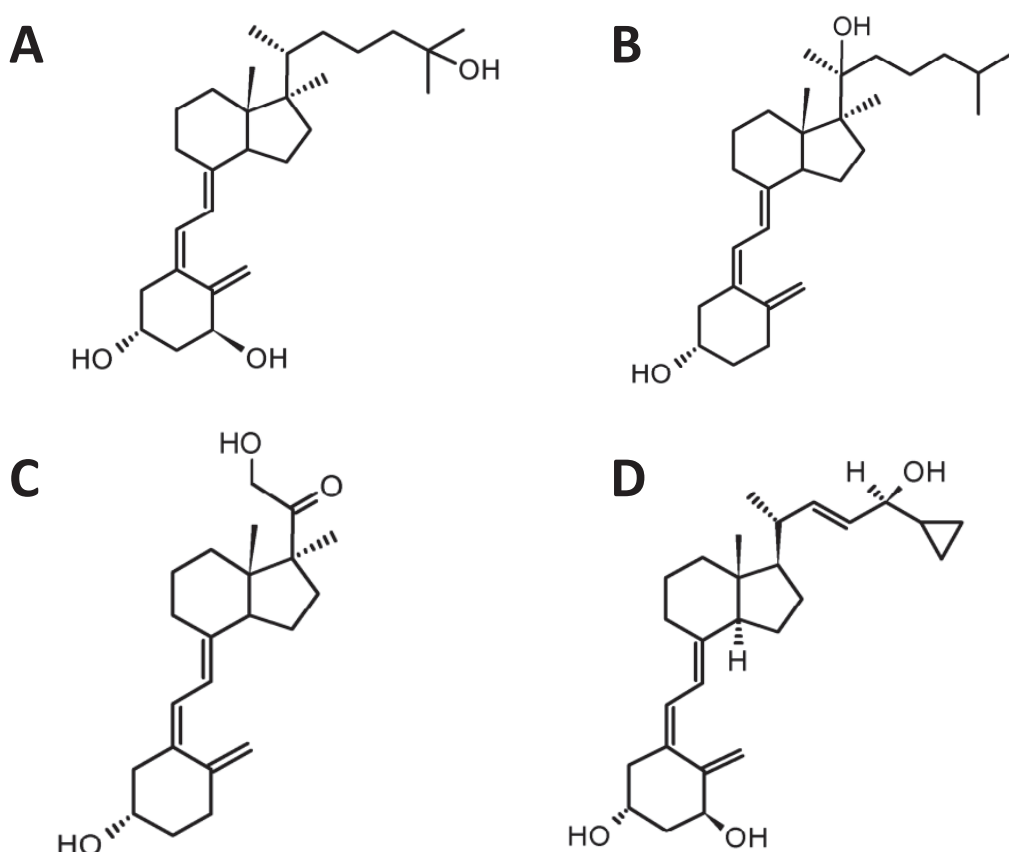
Komórki linii HPEKp zakupiono wraz z przeznaczoną do nich pożywką z firmy CELLnTEC (Szwajcaria). Pożywkę przed użyciem wzbogacano roztworem antybiotyków: penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100 µg/ml) i amfoterycyny B (250 ng/ml). W nawiasach podano stężenie końcowe.

Obie linie komórkowe hodowano w temperaturze 37 °C przy 5% stężeniu CO₂. Doświadczenia przeprowadzano w warunkach sterylnych, w komorze laminarnej oraz inkubatorach znajdujących się w pracowni hodowli komórkowej posiadającej drugą klasę bezpieczeństwa.

3.2. Analogi witaminy D

1,25(OH)₂D₃ zakupiono z firmy Sigma-Aldrich (Polska). 20OHD₃ uzyskano dzięki uprzejmości prof. Roberta Tuckey'a (The University of Western Australia, Perth, Australia). 21OHpD (21 - hydroksypregnakalcyferol) zsyntetyzowany został według procedury opisanej przez prof. Żmijewskiego (17) w firmie ProChimia Surfaces Sp. z o.o. (Polska). Kalcypotriol zakupiono z Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie bądź otrzymano dzięki uprzejmości prof. Andrzeja Kutnera (Instytut Farmaceutyczny w

Warszawie). Przed eksperymentami analogi witaminy D rozpuszczano w 99,8% alkoholu etylowym. Następnie ich dokładne stężenie określano na podstawie wyników pomiaru absorpcji przy 265 nm z uwzględnieniem molowego współczynnika absorpcji równego 18200. Stężenie związków było dobierane tak, by końcowe stężenie etanolu w próbce (po odpowiednim rozcieńczeniu w pożywce) nie miało wpływu na żywotność testowanych komórek (poniżej 2%).



Ryc. 5. Wzory strukturalne analogów witaminy D: 1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHPD (C) oraz calcipotriolu (D).

3.3. Odczynniki chemiczne

Alkohol etylowy (Avantor Performance Materials Poland S.A. (dawniej POCH S.A.), Polska)

Alkohol izopropanowy (Avantor Performance Materials Poland S.A. (dawniej POCH S.A.), Polska)

Antybiotyki Penicylina/Streptomycyna (Sigma-Aldrich, Poznań) dla linii HaCaT oraz #CnT-10 (Penicylina/Streptomycyna/Amfoterycyna B) dla linii HPEKp (CELLnTEC, Szwajcaria)

BHT - butylowany hydroksytoluen (Sigma-Aldrich, Poznań)

CCCP - karbonylocyjanek-3-chlorofenilo-hydrazonu (Sigma-Aldrich, Poznań)

Chloroform (Avantor Performance Materials Poland S.A. (dawniej POCH S.A.), Polska)

Cisplatyna (Sigma-Aldrich, Poznań)

DMSO - dimetylosulfotlenek (Sigma-Aldrich, Poznań)

dNTPs 10 mM mix (Thermo Scientific Fermentas, Litwa)

DPPH[•] - 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (Sigma-Aldrich, Poznań)

FACS Flow (Becton Dickinson, St. Zjedn.)

FBS inaktywowana bydlęca surowica płodowa, także charcoal stripped (Sigma-Aldrich, Poznań)

Fenozol (A&A Biotechnology, Polska)

HEPES – kwas N-(2-hydroksyetylo)-piperazyno-N'-etanosulfonowy (Sigma-Aldrich, Poznań)

H₂DCFDA – 2',7'- dwuoctan dichlorofluoresceiny (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warszawa)

JC-1 – jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbo-cyjaninowy (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warszawa)

Jodek propidyny (Sigma-Aldrich, Poznań)

Kwas octowy (Avantor Performance Materials Poland S.A. (dawniej POCH S.A.), Polska)

Kwas trójchlorooctowy (Sigma-Aldrich, Poznań)

MTT (bromek 3-(4,5-dimetylo-1,3-tiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-2H-tetrazolowy; Sigma-Aldrich, Poznań)

Oligo (dT)18 (Sigma-Aldrich, Poznań)

PBS tabletki (Lab Empire, Rzeszów)

Pożywki hodowlane DMEM (Sigma-Aldrich, Poznań), pożywka do linii HPEKp (CELLnTEC, Szwajcaria)

RiboLockTM RNase inhibitor (Thermo Scientific Fermentas, Litwa)

Rybonukleaza A (Sigma-Aldrich, Poznań)

Sodu chlorek (NaCl, Avantor Performance Materials Poland S.A. (dawniej POCH S.A.), Polska)

SRB (sulfrodamina B, Sigma-Aldrich, Poznań)

Startery do PCR (Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Polska oraz Sigma-Aldrich, Poznań)

Tris (Serva, Niemcy)

TrypLETM Select 1X (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warszawa)

Trypsyna (Sigma-Aldrich, Poznań)

Woda wolna od nukleaz (A&A Biotechnology, Polska)

Wapnia chlorek (CaCl₂, Avantor Performance Materials Poland S.A. (dawniej POCH S.A.), Polska)

3.4. Bufory i roztwory

Bufor fosforanowy PBS pH 7,4 przygotowywano z komercyjnie dostępnych tabletek bazując na opisie producenta, a następnie jałowiono w autoklawie.

Roztwór SRB:

SRB 0,4 g

1 % kwas octowy 100 ml

Bufor wiążący do barwienia jodkiem propidyny, pH 7,4:

500 µl 1M HEPES

0,41 g NaCl

0,0138 g CaCl₂

Woda destylowana do 50 ml

3.5. Zestawy komercyjne

Zestaw do detekcji apoptozy (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen, St. Zjedn.)

Zestaw do izolacji RNA (Total RNA, A&A Biotechnology, Polska)

Zestaw do odwrotnej transkrypcji (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific Fermentas, Litwa)

Mieszanina reagentów do reakcji qPCR (Real Time 2 x PCR Master Mix SYBR Set B, A&A Biotechnology, Polska)

3.6. Materiały jednorazowego użytku

Butelki do hodowli komórkowej (50 ml, 75 ml) (Sarstedt, Niemcy lub TPP, Szwajcaria)

Folia do 96 – dołkowych płytek do reakcji PCR (BIOplastics, Holandia)

Końcówki do pipet (Sarstedt, Niemcy lub Medlab, Polska)

Krioprobówki (Sarstedt, Niemcy)

Pipety serologiczne (Sarstedt, Niemcy lub TPP, Szwajcaria)

Pipety transferowe (Sarstedt, Niemcy)

Płytki do hodowli komórkowej (Sarstedt, Niemcy lub TPP, Szwajcaria)

Płytki wielodołkowe (6, 96) do hodowli komórkowej (Becton Dickinson, St. Zjedn. lub TPP, Szwajcaria)

Probówki cytometryczne (Becton Dickinson, St. Zjedn.)

Probówki typu eppendorf (1,5 i 2 ml) (Sarstedt, Niemcy lub Medlab, Polska)

Probówki typu Falcon (15 ml i 50 ml) (Sarstedt, Niemcy lub TPP, Szwajcaria)

Skrobaki jednorazowego użytku do hodowli przylegających (Sarstedt, Niemcy)

96 – dołkowe płytki do reakcji PCR (Sarstedt, Niemcy lub Bio – Rad, St. Zjedn.)

3.7. Aparatura

Cytometr przepływowy FACS Calibur (Becton Dickinson, St. Zjedn.)

Czytnik płytek EPOCH (BioTek, St. Zjedn.)

Inkubator CO₂ NU-5510E (NuAire, St. Zjedn.)

Komora DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (BioSan, Łotwa)

Komora Laminarna (Class II BSC, Esco, Singapur)

Mikroskop fluorescencyjny AxioVert 200 dzięki uprzejmości prof. Jacka Bigdy, kierownika Zakładu Biologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii (Carl Zeiss, Niemcy)

Mikrowirówka MiniSpin plus (Eppendorf, Niemcy)

Odwrócony mikroskop świetlny Olympus CKX41 (Olympus Polska sp. z o.o., Warszawa)

Pipeta wielokanałowa (Eppendorf, Niemcy)

Pipety jednokanałowe (Eppendorf, Niemcy)

Termoblok (Thermo-shaker, TS-100C, BioSan, Łotwa)

Termocykler MJ Mini 48-Well (Bio – Rad, St. Zjedn.)

Termocykler StepOne Real-Time PCR Systems (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warszawa)

Wirówka 5804 R (Eppendorf, Niemcy)

3.8. Programy komputerowe i bazy danych

CellQuest Pro™ Software (BD Biosciences, St. Zjedn.)

GNU Image Manipulation program (GIMP, St. Zjedn.)

GraphPad Prism (GraphPad Software, St. Zjedn.)

ImageJ v1.42q (W.S. Rasband, U. S. National Institutes of Health, St. Zjedn.)

Microsoft Office Excel (Microsoft, St. Zjedn.)

Primer Quest (Integrated Device Technology, St. Zjedn.)

Program StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warszawa)

4. METODY

4.1. Pasażowanie komórek

Komórki pasażowano 2 – 3 razy w tygodniu stosując się do następującej procedury:

- usuwano starą pożywkę hodowlaną,
- przemywano komórki PBS,
- dodawano trypsynę w ilości 1,5 ml/ 75 ml butelkę hodowlaną w przypadku linii HaCaT lub TrypLETM 1X w przypadku linii HPEKp w ilości 1ml/ 75 ml butelkę hodowlaną,
- inkubowano w 37 °C: komórki linii HaCaT 10 – 15 minut, zaś komórki linii HPEKp 3 - 5 minut,
- do butelki hodowlanej dodawano 5 ml odpowiedniej pożywki, następnie zawartość przenoszono do 15 ml probówki typu Falcon i wirowano 5 minut z szybkością 1500 obrotów na minutę,
- osad komórkowy zawieszano w 5 ml świeżej pożywki, następnie stosując rozcieńczenie 1 : 5 przenoszono komórki do butelki uzupełniając świeżą pożywką do 13 ml / 75 ml butelkę hodowlaną.

4.2. Krioprezerwacja

Osad komórkowy uzyskany w czasie pasażowania komórek zawieszano w 5 - 10 ml stosownej pożywki. Następnie komórki zliczano stosując komorę Fuchsa - Rosenthala. Około 2 milionów komórek zawieszano w mieszaninie do mrożenia (dla linii HaCaT: 10% DMSO, 50% FBS, 40 % DMEM, zaś dla linii HPEKp dostępna komercyjnie mieszanina firmy CELLnTEC, (CnT-CRYO-50). Stopniowo obniżano temperaturę komórek co 24 godziny (- 20 °C, - 80 °C, ciekły azot).

4.3. Test żywotności komórek SRB

Test kolorymetryczny SRB bazuje na oddziaływaniu elektrostatycznym barwnika anionowego sulfrodaminy B (SRB, Sigma – Aldrich, Poznań) z białkami, pozwalając na zobrazowanie ich ilości, tym samym pośrednio wskazując tempo proliferacji komórkowej.

W celu przeprowadzenia doświadczenia, około 8 tysięcy komórek zawieszano w 100 μ l pożywki z dodatkiem 10% cFBS i 1% P/S i umieszczano w wewnętrznych 60 dołkach płytek 96 – dołkowych. Dołki skrajne wypełniano PBS, aby zapobiec parowaniu pożywki z pozostałych dołków. Płytki inkubowano w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂ przez 24 godziny. Następnie usuwano pożywkę i dodawano seryjnie rozcieńczony związek w 100 μ l pożywki z dodatkiem 10% FBS charcoal i 1% P/S w zakresie stężeń 0,1 pM – 1 μ M w przypadku analogów witaminy D, 0,0256 – 5 mM w przypadku H₂O₂ oraz 0,00384 – 300 μ M w przypadku cisplatyny, bądź dodając jednocześnie analogi witaminy D w stężeniu 10 nM i H₂O₂ / cisplatynę we wspomnianym powyżej zakresie stężeń. Jako kontrolę stosowano samą pożywkę oraz pożywkę z odpowiednio dobranym stężeniem alkoholu etylowego. Stężenie to odpowiadało najwyższemu stężeniu etanolu w próbach z analogami witaminy D. Po 24 godzinach hodowli w temperaturze 37 °C oraz atmosferze 5% CO₂ dodawano 100 μ l 20% TCA do każdego dołka i inkubowano 1 godzinę w temperaturze 4 °C. Następnie usuwano pożywkę z TCA i pięciokrotnie płukano komórki wodą destylowaną. W kolejnym etapie komórki osuszano, dodawano 100 μ l 0,4% roztworu SRB po czym inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Po usunięciu roztworu SRB komórki płukano pięciokrotnie 1% roztworem kwasu octowego. Po ponownym osuszeniu komórek i dodaniu do każdego dołka 150 μ l 10 mM Tris o pH = 10,5 płytki inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. W ostatnim etapie w czytniku płytek mierzono absorbancję roztworów przy długości fali 570 nm. Dane przedstawiono jako wartości normalizowane w odniesieniu do kontroli, przyjmując dla niej wartość 1,0.

4.4. Analiza cyklu komórkowego

Analizę cyklu komórkowego przeprowadzano z użyciem cytometrii przepływowej barwiąc komórki jodkiem propidyny, barwnikiem fluorescencyjnym interkalującym z DNA badanych komórek. Do prób dodawano również rybonukleazę, w celu usunięcia RNA, którego obecność mogłaby wpływać na wyniki pomiarów. Testy przeprowadzano na płytkach 6 – dołkowych. Każda próba wykonana była w trzykrotnym powtórzeniu.

W celu przeprowadzenia doświadczenia, komórki posiewano w ilości 150 – 200 tysięcy na dołek w 2 ml odpowiedniej pożywki i hodowano w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂ przez 24 godziny. Następnie komórki inkubowano z analogami witaminy D, nadtlenkiem wodoru lub cisplatyną, zawieszonymi w świeżej pożywce, przez 24 lub 48 godzin, bądź też po 24 godzinnej preinkubacji z analogami witaminy D wymieniano pożywkę i przez kolejne 24 - 48 godzin komórki inkubowano z nadtlenkiem wodoru lub cisplatyną. Kontrolę stanowiły komórki niepoddawane działaniu związków. Po upływie określonego czasu inkubacji pożywkę z określonych dołków zbierano do odpowiednio opisanych probówek cytometrycznych. W tym celu komórki przemywano PBS, a następnie trypsynizowano w przypadku linii HaCaT (400 µl trypsyny/ dołek) lub poddawano działaniu TrypLE™ Select 1X (200 µl/ dołek) w przypadku komórek HPEKp. Po odklejeniu komórek przenoszono je do odpowiednich probówek cytometrycznych z zebraną uprzednio pożywką i wirowano 10 minut z prędkością 2600 obrotów na minutę. Osad komórkowy płukano dwukrotnie PBS, za każdym razem wirując komórki 10 minut z prędkością 2600 obrotów na minutę. Osad komórkowy zawieszano w 3 ml schłodzonego 70% etanolu, intensywnie worteksowano i przechowywano 24 godziny w 4 °C. Następnie probówki cytometryczne ponownie worteksowano i wirowano 6 minut z prędkością 2500 obrotów na minutę. Po wirowaniu alkohol usuwano, a osad komórkowy zawieszano w 500 µl buforu wiążącego (skład opisano w rozdziale Materiały), po czym dodawano 25 µl roztworu jodku propidyny (do stężenia końcowego 50 µg/ml) i 10 µl rybonukleazy (do stężenia końcowego 80 µg/ml). Próby delikatnie mieszano i inkubowano 30 minut w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie próby poddawano analizie cytometrycznej, zbierając 20000 komórek.

4.5. Ocena apoptozy testem PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I

Indukcję programowanej śmierci komórkowej analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej bazując na komercyjnie dostępnym zestawie (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen, St. Zjedn.). Zestaw ten wykorzystuje zjawisko utraty asymetryczności błony komórkowej na wczesnych etapach procesu apoptozy, co związane jest z translokacją fosfatydyloseryny na zewnętrzną stronę błony komórkowej, gdzie jest rozpoznawana przez Anneksynę V, skoniugowaną z fluorochromem fikoerytryną (PE). Komórki dodatkowo barwiono 7-aminoaktynomycyną (7-AAD) dołączoną do zestawu, która wnika do komórek z uszkodzoną błoną komórkową. Dzięki tej metodzie możliwe jest rozróżnienie trzech populacji komórek: żywych komórek niebarwiących się żadnym odczynnikiem (Ann-V-/7-AAD-), populacji komórek znajdujących się na wczesnych etapach procesu apoptozy (Ann-V+/7-AAD-) oraz populacji wykazującej zmiany towarzyszące późnym etapom apoptozy bądź procesowi nekrozy (Ann-V+/7-AAD+).

Testy przeprowadzano na płytkach 6 – dołkowych. Każda próba wykonana była w trzykrotnym powtórzeniu.

W celu przeprowadzenia doświadczenia, komórki posiewano w ilości 150 – 200 tysięcy na dołek w 2 ml pożywki DMEM z 10% cFBS i 1% P/S i hodowano w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂ przez 24 godziny. Następnie komórki inkubowano z analogami witaminy D lub nadttlenkiem wodoru przez 24 godziny, bądź też po 24 godzinnej preinkubacji z analogami witaminy D wymieniano pożywkę i przez kolejne 24 godziny komórki poddawano działaniu nadttlenku wodoru. Po określonym w doświadczeniu czasie inkubacji do odpowiednio opisanych probówek cytometrycznych zbierano pożywkę z poszczególnych prób, komórki zaś przemywano PBS i trypsynizowano. Komórki po trypsynizacji przenoszono do uprzednio przypisanych im probówek cytometrycznych z zebraną wcześniej pożywką i wirowano przez 5 minut z prędkością 1500 obrotów na minutę. Osad komórkowy płukano dwukrotnie PBS, za każdym razem wirując 5 minut z prędkością 1500 obrotów na minutę. Następnie osad komórkowy zawieszano w 100 µl buforu wiążącego dołączonego do zestawu i bawiono dodając 5 µl anneksyny V/fikoerytryny i 5 µl 7-aminoaktynomycyny. Próby delikatnie mieszano i inkubowano 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Następnie

niezwłocznie przystępowano do analizy cytometrycznej, wykonując standardową kompensację w oparciu o próby niebarwione, barwione jedynie aneksyną V/ fikoerytryną lub 7-aminoaktynomycyną. Analizie cytometrycznej poddawano co najmniej 10000 komórek z każdej próby.

4.6. Analiza zmiany potencjału błony mitochondrialnej

Do detekcji zmian potencjału elektrochemicznego wewnętrznej błony mitochondrialnej zastosowano barwnik JC-1 (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warszawa), a potencjalne zmiany tego potencjału analizowano przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej. Barwnik JC-1 w zdrowych komórkach gromadzi się w macierzy mitochondrialnej, formując agregaty. Rozproszenie potencjału elektrochemicznego doprowadza do pojawienia się monomerów JC-1 w cytoplazmie. Towarzyszy temu przesunięcie fluorescencji z czerwonej (agregaty JC-1) na zieloną (monomery JC-1). Aby mieć pewność, że obserwowane zmiany fluorescencji JC-1 rzeczywiście wynikają ze zmiany potencjału błony mitochondrialnej konieczne jest zastosowanie kontroli poddanej działaniu protonofora CCCP (Sigma – Aldrich, Poznań).

W celu przeprowadzenia doświadczenia, komórki hodowano w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂ przez 24 godziny na płytkach 6 – dołkowych, posiewając 150 – 200 tysięcy na dołek w 2 ml pożywki DMEM z 10% cFBS i 1% P/S. Następnie komórki inkubowano z analogami witaminy D przez 24 godziny, nadtlenkiem wodoru 1 lub 3 godziny albo z cisplatyną przez 3 godziny. Aby zbadać wpływ analogów witaminy D na działanie RFT po 24 godzinnej preinkubacji z analogami witaminy D wymieniano pożywkę a następnie przez kolejne 1 – 3 godziny komórki inkubowano w obecności nadtlenku wodoru lub cisplatyny. Każdy układ doświadczalny wykonano w trzykrotnym powtórzeniu. Po upływie określonego czasu inkubacji, komórki przemywano PBS i trypsynizowano. Następnie komórki zbierano do odpowiednio opisanych probówek cytometrycznych i wirowano 5 minut z prędkością 1500 obrotów na minutę. Osad komórkowy płukano dwukrotnie PBS. Komórki zawieszano w 1 ml ogrzanego do temperatury pokojowej PBS. Kontrolę negatywną stanowiły komórki

niepoddawane stymulacji, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane roztworem CCCP (50 mM roztwór w DMSO, stężenie końcowe w próbie 50 μ M). Próby barwiono roztworem JC-1 (2 mM roztwór w DMSO, stężenie końcowe w próbie 2 μ M), rozpoczynając od kontroli pozytywnej, którą barwiono z pięciominutowym wyprzedzeniem. Następnie próby inkubowano 15 minut w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂. Zawieszinę komórek wirowano 5 minut z prędkością 1500 obrotów na minutę i zawieszano w 500 μ l PBS. Wybarwione komórki niezwłocznie poddawano analizie cytometrycznej, wykorzystując próby traktowane CCCP do standardowej kompensacji. Analizie cytometrycznej poddawano co najmniej 10000 komórek z każdej próby.

Oprócz analizy cytometrycznej wykonywano również obserwację mikroskopową z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego AxioVert 200. Bezpośrednio po odpowiednim czasie inkubacji komórek z badanymi związkami komórki barwiono przez 15 minut roztworem JC-1 (stężenie końcowe w próbie 2 μ M) w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂. Następnie wymieniano pożywkę na świeżą i wykonywano obserwację mikroskopową wraz z archiwizacją obrazu.

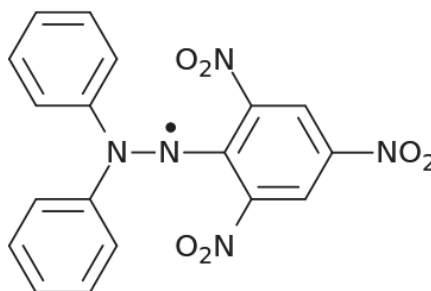
4.7. Pomiar poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu metodą cytometrii przepływowej

Aby oszacować produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach zastosowano jedną z najszerzej stosowanych metod – barwienie H₂DCFDA (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warszawa), a następnie komórki poddawano analizie cytometrycznej. H₂DCFDA jest związkiem, który przenika do wnętrza komórek. Po cięciu przez endogenne esterazy we wnętrzu komórek powstaje H₂DCF, który po utlenieniu ulega przekształceniu do silnie fluorescencyjnego produktu – DCF. Akumulacja DCF w komórkach może być następnie mierzona jako wzrost intensywności fluorescencji z użyciem cytometru przepływowego.

W celu przeprowadzenia doświadczenia, komórki posiewano na płytki 6 – dołkowe w ilości 180 – 200 tysięcy na dołek w 2 ml pożywki DMEM z 10% cFBS i 1% P/S i hodowano w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂ przez 24 godziny.

Następnie do odpowiednich dołków dodawano $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM na 24 godziny albo H_2O_2 w stężeniu 1mM na 1 lub 24 godziny. Stosowano również układ, w którym komórki po 24 godzinnej preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM po wymianie pożywki poddawane były działaniu H_2O_2 w stężeniu 1mM przez 1 lub 24 godziny. Po upływie stosownego czasu inkubacji pożywkę usuwano i do dołków dodawano pożywkę zawierającą H_2DCFDA w stężeniu 10 μM . Komórki inkubowano 30 minut w temperaturze 37 °C. Następnie komórki przemywano PBS i trypsynizowano. Oddzielone w ten sposób od podłoża komórki przenoszono do probówek cytometrycznych i wirowano 5 minut z prędkością 1500 obrotów na minutę. Osad komórkowy płukano PBS i zawieszano w 1 ml PBS. Analizie cytometrycznej poddawano co najmniej 10000 komórek z każdej próby.

4.8. Analiza zmiatania wolnego rodnika $\text{DPPH}^\bullet$



Ryc. 6. Wzór strukturalny wolnego rodnika $\text{DPPH}^\bullet$.

Potencjał antyoksydacyjny 7 – dehydrocholesterolu oraz analogów witaminy D badano w oparciu o ich zdolność do zmiatania $\text{DPPH}^\bullet$ (Sigma – Aldrich, Poznań), który jest wolnym rodnikiem z niesparowanym elektronem walencyjnym na jednym z atomów azotu (Ryc. 6). Bazując na danych publikacyjnych przetestowano 25, 50 i 100 μM stężenia $\text{DPPH}^\bullet$. Ostatecznie do doświadczeń wybrano $\text{DPPH}^\bullet$ w stężeniu 50 μM . Jako kontrolę pozytywną stosowano roztwór 0,0625% i 0,125% BHT (Sigma - Aldrich, Poznań), który jest standardowym antyoksydantem. Roztwory $\text{DPPH}^\bullet$, BHT oraz badanych związków przygotowywano w 96% etanolu.

Test przeprowadzano na płytkach 96 – dołkowych. Wszystkie próby wykonano w dwóch powtórzeniach, doświadczenie zaś powtarzano trzykrotnie. 7-dehydrocholesterol badano w zakresie stężeń 3,125 – 100 μM , zaś $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oraz analogi witaminy D w stężeniach 0,01 – 1000 nM. Roztwór DPPH $\cdot$ przygotowywano i dodawano do odpowiednich dołków bezpośrednio przed rozpoczęciem pomiaru spektrofotometrycznego.

W czytniku płytek wykonywano pomiar spektrofotometryczny co 2 minuty przy długości fali 517 nm. Pomiary prowadzono przez 60 minut.

4.9. Badanie poziomu mRNA wybranych genów

4.9.1. Izolacja RNA

W celu wyizolowania RNA komórki hodowano na 10 centymetrowych szalkach Petriego. Po uzyskaniu konfluencji 50 – 70% komórki inkubowano z analogami witaminy D lub nadtlenkiem wodoru przez 24 godziny, bądź też po 24 godzinnej preinkubacji z analogami witaminy D wymieniano pożywkę i przez kolejne 24 godziny komórki poddawano działaniu nadtlenku wodoru.

Po upływie wymaganego czasu inkubacji komórki przemywano PBS i odrywano od podłoża za pomocą jednorazowych skrobaków, zawieszając je w 800 μl fenozolu. Mieszaninę inkubowano 5 minut w 50 $^{\circ}\text{C}$. Następnie do mieszaniny dodawano 200 μl chloroformu, delikatnie mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej 3 minuty. Po tym czasie zawiesinę komórek wirowano 10 minut z prędkością 12000 obrotów na minutę. Górną frakcję nanoszono na minikolumnę z zestawu do izolacji RNA i dalej postępowano zgodnie ze wskazówkami producenta (A&A Biotechnology, Polska). Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze - 80 $^{\circ}\text{C}$.

4.9.2. Określenie stężenia i czystości RNA

W celu określenia stężenia i czystości wyizolowanego RNA posługiwano się czytnikiem płytek EPOCH. Uzyskane mRNA uznawano za odpowiednie do dalszej analizy jeśli wartość stosunku absorbancji przy długościach fali OD_{260nm} i OD_{280nm} była w granicach 1,9 – 2,1.

4.9.3. Odwrotna transkrypcja (synteza cDNA)

Odwrotną transkrypcję przeprowadzano używając zestawu komercyjnego RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific Fermentas, Litwa), bazując na instrukcji producenta. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono przez 60 minut w temperaturze 42 °C, następnie enzymy inaktywowano termicznie 5 minutową inkubacją w temperaturze 70 °C.

Uzyskany cDNA przechowywany był w temperaturze – 20 °C.

Charakterystykę mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 4.

Tabela 4. Skład 1 x stężonego roztworu do odwrotnej transkrypcji

5 x stężony bufor do odwrotnej transkrypcji	4 µl
RiboLock™ RNase inhibitor (20 u/µl)	1 µl
10 mM mix dNTPs	2 µl
M-MuLV odwrotna transkryptaza (200 u/µl)	1 µl
Startery (losowe heksamery, (dT)₁₈)	1 µl
RNA	x µl (1 µg)
Woda destylowana	do 20 µl

4.9.4. Projektowanie starterów

Startery stosowane do powielania fragmentów ludzkich genów związanych z metabolizmem i aktywnością witaminy D oraz ze stresem oksydacyjnym zaprojektowano stosując program Primer Quest (Integrated Device Technology, St. Zjedn.) (Tabela 5).

Tabela 5. Sekwencje starterów projektowanych w celu powielania fragmentów genów ludzkich związanych z metabolizmem i aktywnością witaminy D oraz ze stresem oksydacyjnym wraz z uwzględnieniem długości fragmentów oraz temperaturą ich topnienia. VDR – receptor witaminy D, PDIA3 – izomeraza dwusiarczkowa, CYP27B1 – 1- α -hydroksylaza, CYP3A4 – 25-hydroksylaza, CYP24A1 – 24-hydroksylaza, SOD1 i 2 – dysmutaza ponadtlenkowa, CAT – katalaza, gen kontrolny: RPL37A. () długość produktu reakcji PCR w parach zasad.*

	Sekwencja	Nazwa genu	Temp. t. (°C)	pz*
1	CCAGTTCGTGTGAATGATGG	VDR F	59,96	384
	GTCGTCCATGGTGAAGGA	VDR R	57,83	
2	TGTTTGCATTTGCTCAGA	CYP27B1 F	54,63	227
	CCGGGAGAGCTCATACAG	CYP27B1 R	56,79	
3	GCAGCCTAGTGCAGATTT	CYP24A1 F	53,97	335
	ATTCACCCAGAACTGTTG	CYP24A1 R	51,3	
4	AAGGCACCACCCACCTATGATACT	CYP3A4 F	67,3	197
	TACTTTGGGTACGGTGAAGAGCA	CYP3A4 R	70,5	
5	CTCCGACGTGCTAGAACTCA	PDIA3 F	63,2	204
	CAGGTGTTAGTGTGGCAGT	PDIA3 R	60,3	
6	TTCTGATGGCGGACTTTACC	RPL37A F	63,9	143
	CACTTGCTCTTTCTGTGGCA	RPL37A R	64,2	
7	CCACACCTTCACTGGTCCAT	SOD1 F	65,0	109
	CTAGCGAGTTATGGCGACG	SOD1 R	63,5	
8	TAGGGCTGAGGTTTGTCCAG	SOD2 F	64,1	181
	CACCGAGGAGAAGTACCAGG	SOD2 R	63,6	
9	ACGGGGCCCTACTGTAATAA	CAT F	62,0	110
	AGATGCAGCACTGGAAGGAG	CAT R	64,6	

4.9.5. PCR w czasie rzeczywistym

Do ilościowej analizy ekspresji genów stosowano komercyjnie dostępne zestawy PCR Master Mix SYBR Green (A&A Biotechnology, Polska). Najczęściej stosowany skład ilościowy reagentów reakcji PCR umieszczono w Tabeli 6, natomiast profil czasowo – temperaturowy w Tabeli 7. Aby ocenić specyficzność reakcji wyznaczono krzywą topnienia po 40 cyklach PCR.

Tabela 6. Skład 1 x stężonego roztworu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Starter F (10 mM)	0,3 µl
Starter R (10 mM)	0,3 µl
PCR Master Mix SYBR Green	10 µl
Matryca cDNA	1 µl
Woda wolna od nukleaz	8,4 µl

Tabela 7. Najczęściej stosowany profil czasowo – temperaturowy reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (sekundy)
1	95	15
2	55 – 62	20
3	72	20
4	80	10

4.10. Analiza statystyczna

Test One – Way ANOVA (GraphPad Prism) zastosowano dla testów proliferacyjnych. W teście SRB wyznaczano potencjał badanego związku poprzez określenie EC_{50} , czyli stężenia badanego związku, przy którym obserwowane jest 50% maksymalnie wywoływanego efektu.

Wyniki zaprezentowano jako średnią zmiennych (z 3 niezależnych pomiarów) uwzględniając odchylenie standardowe, a za istotne statystycznie przyjęto wartości dla których $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Wyniki badań cytometrycznych oraz ilościowej oceny ekspresji genów opracowano stosując rozkład t – Studenta (Microsoft Excel).

Wyniki zaprezentowano jako średnią zmiennych (3 – 6 powtórzeń) uwzględniając odchylenie standardowe, a za istotne statystycznie przyjęto wartości dla których $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Poziom ekspresji badanych genów mierzony metodą PCR w czasie rzeczywistym porównywano wykorzystując metodę $\Delta\Delta$ -Ct normalizowaną względem genu referencyjnego RPL37A kodującego rybosomalne białko L37a (2 – 3 powtórzenia). Jako kontrolę negatywną stosowano próby, w których cDNA zastąpiono wodą.

5. WYNIKI

5.1. Ocena żywotności komórek linii HaCaT testem SRB

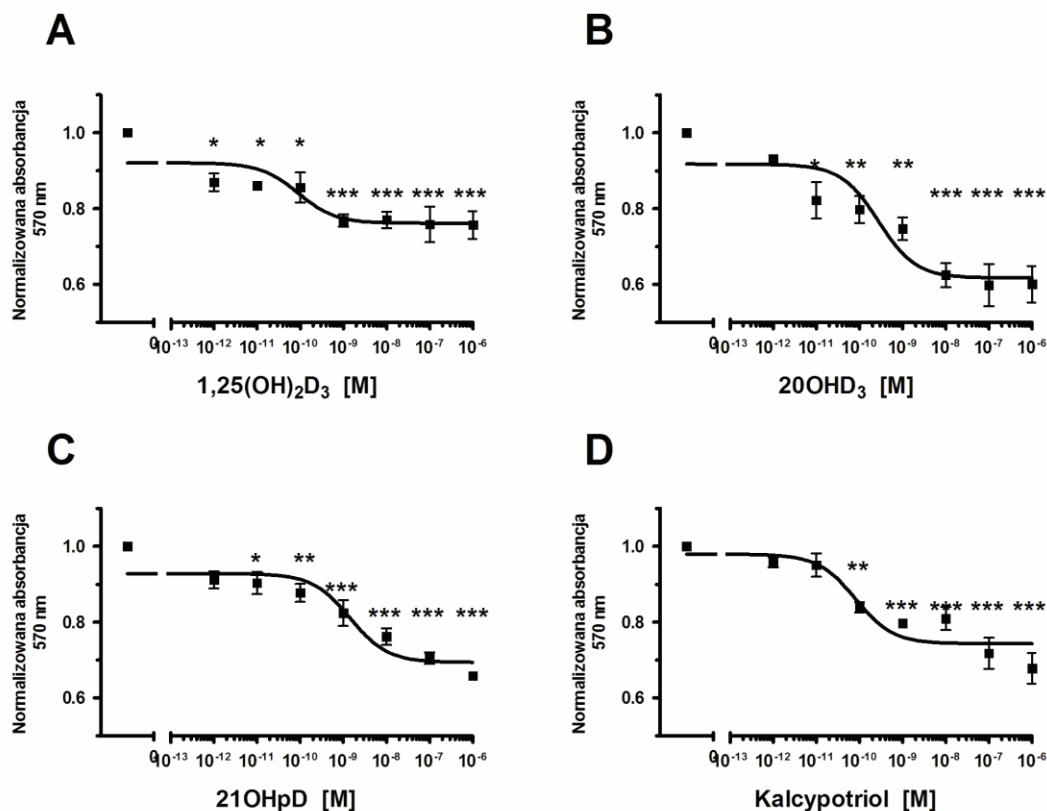
W celu określenia zakresu stężeń badanych związków wywierających efekt cytotoksyczny przeprowadzono ocenę żywotności komórek z zastosowaniem kolorymetrycznego testu SRB. Metoda ta bazuje na elektrostatycznym wiązaniu białka z anionowym barwnikiem sulforodaminą B. Finalny pomiar spektrofotometryczny pozwala określić ilość białka, która jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek.

5.1.1. Ocena wpływu analogów witaminy D na żywotność keratynocytów linii HaCaT

Badania z zastosowaniem testu SRB wykazały, że linia HaCaT charakteryzuje się wysoką wrażliwością na zastosowane analogi witaminy D (*Rycina 7*). Wzrost komórek podczas 24 godzinnej inkubacji hamowany był już w niskich, bo pikomolowych, stężeniach zastosowanych związków. Najsilniejsze działanie wywierał kalcypotriol oraz $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, najsłabsze zaś analog 21OHpD. W Tabeli 8 przedstawiono obliczone dla testowanych związków wartości Ec_{50} , czyli stężenie związku wywołujące połowę maksymalnej efektywności.

Tabela 8. Porównanie wartości Ec_{50} wyznaczonych dla analogów witaminy D.

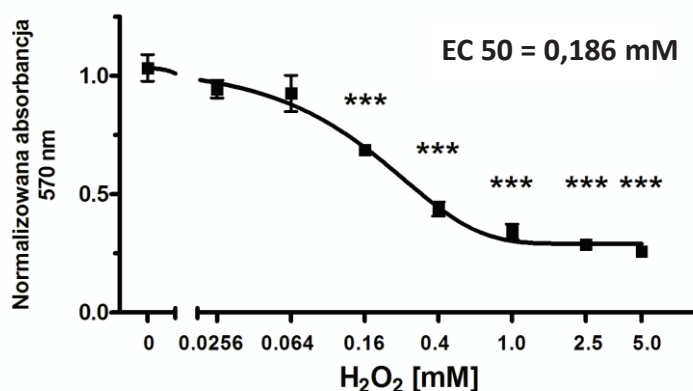
Stosowane związki	Ec_{50} [M]
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	$8,91 \times 10^{-11}$
20OHD_3	$2,74 \times 10^{-10}$
21OHpD	$1,44 \times 10^{-9}$
Kalcypotriol	$8,13 \times 10^{-11}$



Ryc. 7. Porównanie wpływu 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) i kalcypotriolu (D) na żywotność linii komórkowej HaCaT z zastosowaniem testu SRB. Komórki inkubowano ze związkami w stężeniach od 0,1 pM do 1 μM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce oraz pożywce z etanolem w ilości odpowiadającej zawartości etanolu w próbce o najwyższym stężeniu analogów witaminy D. Do analizy istotności statystycznej użyto testu One – Way ANOVA (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów $\pm$ SD, normalizowane względem kontroli.

5.1.2. Ocena wpływu nadtlenu wodoru na żywotność karatynocytów linii HaCaT

W kolejnym etapie badań ponownie stosując test SRB przetestowano wrażliwość linii HaCaT na działanie modelowej reaktywnej formy tlenu – nadtlenu wodoru w czasie 24 godzinnej inkubacji. Stwierdzono, że wzrost komórek istotnie hamowany był przy stężeniu 0,16 mM, zaś wartość EC_{50} wynosiła 0,186 mM.



Ryc. 8. Wpływ nadtlenu wodoru na żywotność linii komórkowej HaCaT określony z zastosowaniem testu SRB. Komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniach w zakresie 0,0256 - 5 mM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce. Do analizy istotności statystycznej użyto test *One – Way ANOVA* (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów $\pm$ SD, normalizowane względem kontroli.

5.1.3. Ocena łącznego wpływu nadtlenu wodoru i analogów witaminy D na żywotność keratynocytów linii HaCaT

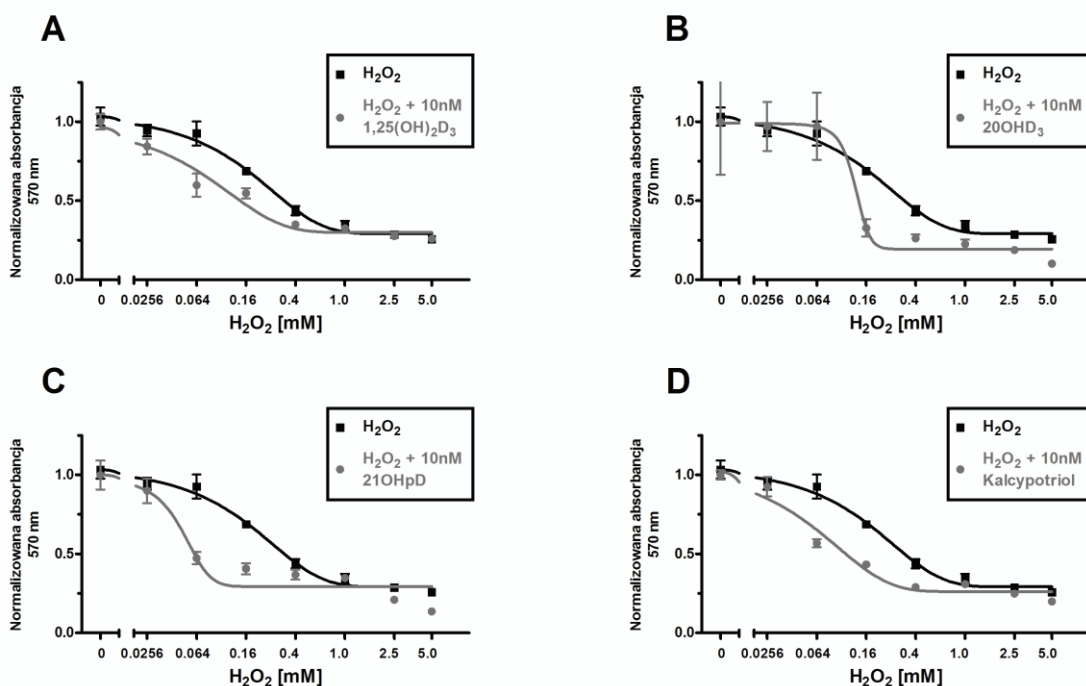
Po wyznaczeniu efektywnych dawek analogów witaminy D oraz nadtlenu wodoru hamujących wzrost komórek linii HaCaT w czasie 24 godzinnej inkubacji

postanowiono podjąć próbę scharakteryzowania efektu łącznego, to znaczy wpływu wywieranego na żywotność komórek przez nadtlenek wodoru oraz analogi witaminy D stosowane jednocześnie podczas 24 godzinnej inkubacji.

Badania żywotności komórek z wykorzystaniem testu SRB wykazały, że poddawanie komórek linii HaCaT jednoczesnemu działaniu H_2O_2 i analogów witaminy D w stężeniu 10 nM przez 24 godziny w sposób znaczący uwrażliwiało je na cytotoksyczne działanie nadtlenku wodoru (Ryc. 9). Wartości EC_{50} obliczone dla nadtlenku wodoru stosowanego jednocześnie z $1,25(OH)_2D_3$, 21OHpD i kalcypotriolem w stężeniu 10 nM były w przybliżeniu 2 – 3 krotnie niższe w porównaniu z wartością EC_{50} wyznaczoną dla samego H_2O_2 (Tab. 9). Jedynie w przypadku analogu 20OHD₃ różnica ta była mniejsza – stężenie związku wywołujące połowę maksymalnej efektywności wyznaczone dla nadtlenku wodoru stosowanego jednocześnie z tym analogiem było 1,5 krotnie niższe od wartości EC_{50} wyznaczonej dla samego H_2O_2 (Tab. 9).

Tabela 9. Porównanie wartości EC_{50} wyznaczonych dla nadtlenku wodoru oraz nadtlenku wodoru stosowanego jednocześnie z analogami witaminy D w stężeniu 10 nM.

Stosowane związki	EC_{50} [mM]
H_2O_2	0,186
$H_2O_2 + 10 \text{ nM } 1,25(OH)_2D_3$	0,07242
$H_2O_2 + 10 \text{ nM } 20OHD_3$	0,1196
$H_2O_2 + 10 \text{ nM } 21OHpD$	0,04946
$H_2O_2 + 10 \text{ nM kalcypotriol}$	0,06289

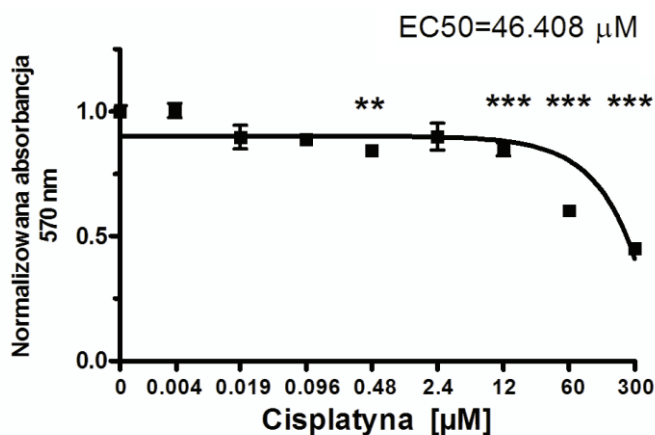


Ryc. 9. Porównanie wpływu nadtlenu wodoru lub nadtlenu wodoru podawanego jednocześnie z analogami witaminy D: 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHPD (C) i kalcypotriolem (D) na żywotność linii komórkowej HaCaT z zastosowaniem testu SRB. Komórki inkubowano z nadtlakiem wodoru w stężeniach od 0,0256 – 5 mM bądź z analogami witaminy D w stężeniu 10 nM łączonymi z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,0256 – 5 mM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce oraz pożywce z etanolem w ilości odpowiadającej zawartości etanolu w próbce o najwyższym stężeniu analogów witaminy D. W celu wyeksponowania różnic dla paneli A, B, C i D zastosowano ten sam wykres działania nadtlenu wodoru pochodzący z Ryc. 8. Do analizy istotności statystycznej użyto test *One – Way ANOVA* (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów ± SD, normalizowane względem kontroli.

5.1.4. Ocena wpływu cisplatyny oraz łącznego wpływu cisplatyny i 1,25(OH)₂D₃ na żywotność keratynocytów linii HaCaT

W kolejnym etapie doświadczeń z użyciem testu SRB zbadano wrażliwość komórek linii HaCaT na cisplatynę (Ryc. 10), która jest jednym z najbardziej skutecznych i najszerzej stosowanych cytostatyków (135). Dane literaturowe wykazują, że ekspozycja komórek na cisplatynę indukuje powstawanie reaktywnych form, które w znaczącym stopniu przyczyniają się do wywoływania śmierci komórkowej poprzez wzmocnienie efektu cytotoksycznego wywieranego przez powstawanie uszkodzeń w DNA (136), dlatego też do wybranych dalszych doświadczeń wytypowano ten właśnie związek.

Stwierdzono, że wzrost komórek w czasie 24 godzinnej inkubacji z cisplatyną istotnie hamowany był przy stężeniu równym 0,48 µM, zaś wartość EC₅₀ dla tego związku wynosiła 46,408 µM.

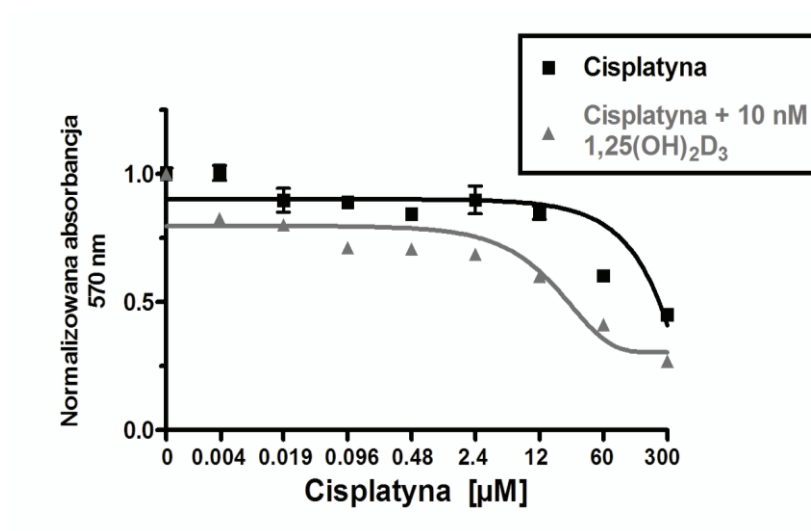


Ryc. 10. Wpływ cisplatyny na żywotność linii komórkowej HaCaT określony z zastosowaniem testu SRB. Komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniach od 0,00384 do 300 µM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce. Do analizy istotności statystycznej użyto testu One – Way ANOVA (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów $\pm$ SD, normalizowane względem kontroli.

Zbadano również cytotoksyczny wpływ na komórki linii HaCaT wywierany przez cisplatynę stosowaną jednocześnie z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM (Ryc. 11). Zaobserwowano niemal trzykrotne obniżenie wartości EC_{50} (Tab. 10) w porównaniu z wartością EC_{50} wyznaczoną dla samej cisplatyny. Odnotowano zatem wzmocnienie cytotoksycznego efektu wywieranego przez cisplatynę poprzez 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Tabela 10. Porównanie wartości EC_{50} wyznaczonych dla cisplatyny oraz cisplatyny stosowanej jednocześnie z 10 nM kalcytriolem.

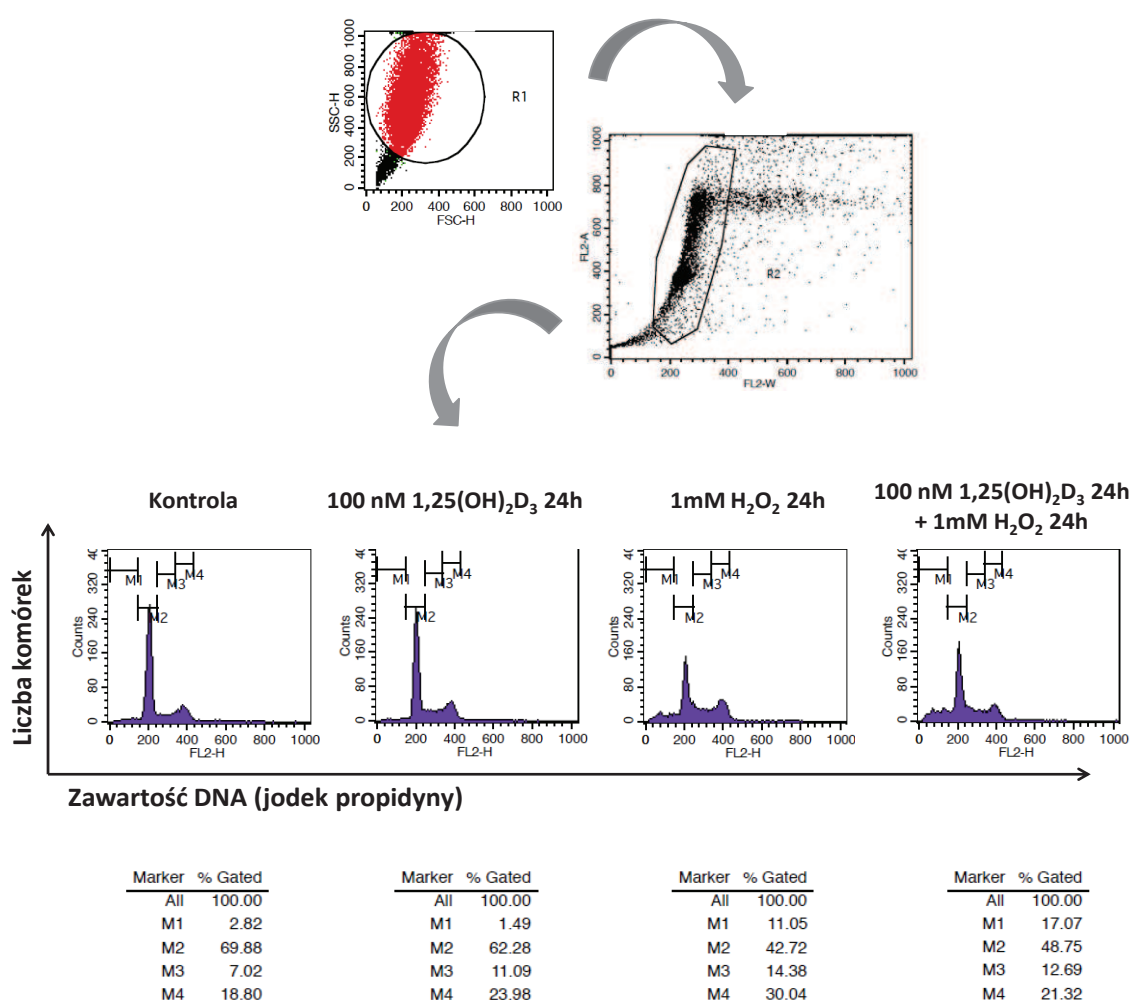
Stosowane związki	EC_{50} [μM]
Cisplatyna	46,408
10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + cisplatyna	17,062



Ryc. 11. Porównanie wpływu cisplatyny lub cisplatyny stosowanej równocześnie z $1,25\text{OH}_2\text{D}_3$ na żywotność linii komórkowej HaCaT z zastosowaniem testu SRB. Komórki inkubowano z cisplatyną w stężeniach od 0,00384 do 300 μM bądź $1,25\text{OH}_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM z cisplatyną w stężeniach od 0,00384 do 300 μM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce. Do analizy istotności statystycznej użyto test One – Way ANOVA (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów $\pm$ SD normalizowane względem kontroli.

5.2. Ocena cyklu komórkowego

Analizę dystrybucji komórek w poszczególnych fazach cyklu mitotycznego wykonano za pomocą cytometrycznej oceny komórek wybarwionych jodkiem propidyny (PI), z wykorzystaniem oprogramowania CellQuest Pro™. Ryc. 12 przedstawia reprezentacyjny wynik analizy cytometrycznej barwionych jodkiem propidyny komórek, pozostałe wyniki przedstawiono w formie wykresów słupkowych w odpowiednich podrozdziałach.

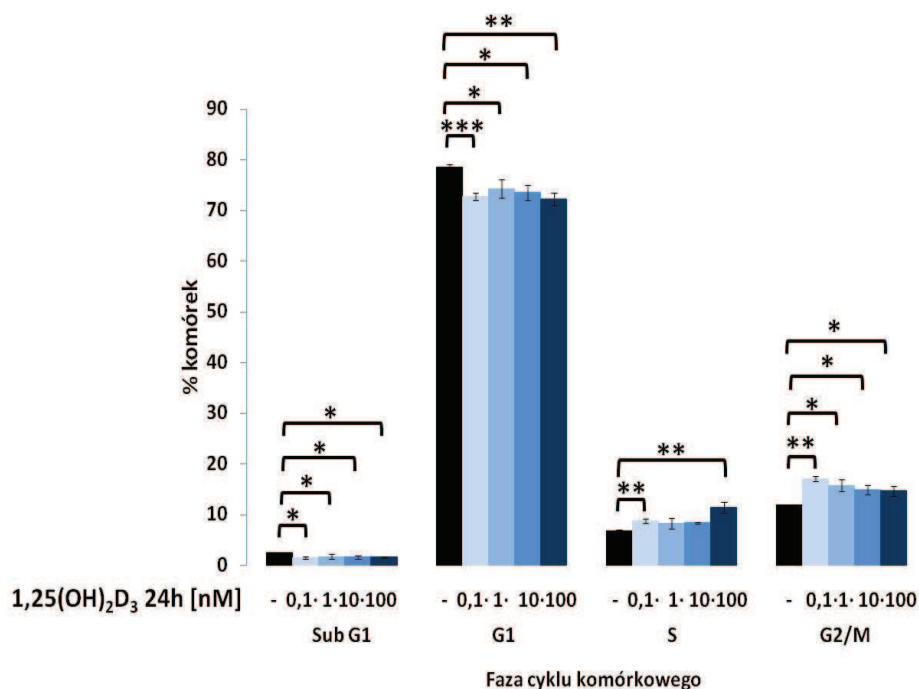


Ryc. 12. Reprezentacyjny wynik analizy cytometrycznej cyklu komórkowego po barwieniu komórek linii HaCaT jodkiem propidyny. Komórki poddawano działaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM lub H₂O₂ w stężeniu 1 mM przez 24 godziny. Alternatywnie stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM, po której komórki poddawano działaniu H₂O₂ w stężeniu 1 mM.

5.2.1. Ocena wpływu 1,25(OH)₂D₃ na przebieg cyklu komórkowego keratynocytów linii HaCaT

W pierwszym etapie badań oszacowano wpływ inkubacji keratynocytów linii HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ na ich dystrybucję w cyklu komórkowym. Zastosowano 24 godziną inkubację komórek z 1,25(OH)₂D₃ w zakresie stężeń 0,1 – 100 nM, ponieważ te właśnie stężenia wykazywały efekt cytotoksyczny w stosunku do badanych komórek, co wykazano uprzednio charakteryzując żywotność komórek testem SRB (Wyniki, 5.1.1). Podkreślić należy, że wymienione stężenia odpowiadają zakresowi fizjologicznych stężeń 25OHD₃ w surowicy krwi (69).

Wykazano, że 1,25(OH)₂D₃ zastosowany w stężeniach 0,1 – 100 nM zmniejszał odsetek komórek fazy G0/G1 w granicach 4 – 6% (wynik istotny statystycznie dla całego zakresu stężeń 1,25(OH)₂D₃) oraz frakcji SubG1 ($p < 0,05$) o 0,7 – 0,9% w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 13). Jednocześnie odnotowano zmiany odsetka komórek w fazie S pod wpływem 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 0,1 i 100 nM – frakcja ta uległa zwiększeniu o około 2 i 4,6% w porównaniu z kontrolą ($p < 0,01$). Podobną tendencję zaobserwowano dla pozostałych stężeń 1,25(OH)₂D₃ – 1 i 10 nM, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie. Zaobserwowano również istotny statystycznie wzrost odsetka komórek znajdujących się we frakcji G2/M pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniach 0,1 - 100 nM w stosunku do grupy kontrolnej. Wzrost ten wynosił około 2,7 – 5,1% w porównaniu z kontrolą i był odwrotnie proporcjonalny do zastosowanego stężenia 1,25(OH)₂D₃.



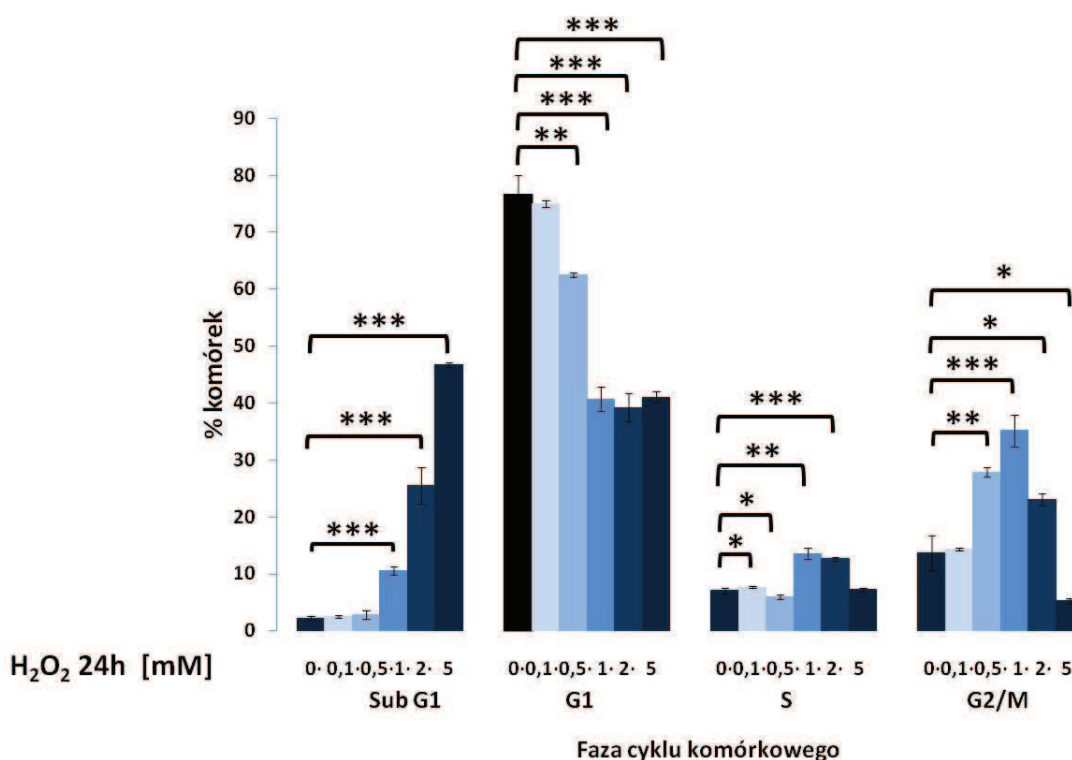
Ryc. 13. Wpływ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w zakresie stężeń 0,1 – 100 nM przez 24 godziny, następnie zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.2. Ocena wpływu nadtlenu wodoru na cykl komórkowy keratynocytów linii HaCaT

W kolejnym etapie badań określono wpływ inkubacji komórek linii HaCaT z nadtlakiem wodoru na ich dystrybucję w cyklu komórkowym. Zastosowano 24 godziną inkubację komórek z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 5 mM. Wyniki przedstawiono w formie wykresu słupkowego na Ryc. 14.

Zaobserwowano, że 24 godzinna inkubacja komórek HaCaT z H_2O_2 zastosowanym w zakresie stężeń 0,5 – 5 mM powodowała zmniejszenie odsetka komórek fazy G0/G1 w granicach 14 – 40% w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,01$ dla H_2O_2 w stężeniu 0,5 mM oraz $p < 0,001$ dla H_2O_2 w stężeniach 1 – 5 mM). Zauważono również, że odsetek komórek frakcji G0/G1 malał także pod wpływem 24

godzinnej inkubacji z H_2O_2 w stężeniu 0,1 mM, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie. Obserwowanym zmianom towarzyszyły proporcjonalne zmiany odsetka komórek fazy S, G2/M oraz frakcji SubG1. Odnotowano wzrost odsetka komórek fazy S pod wpływem 24 godzinnego działania nadtlenu wodoru w stężeniach 0,1 mM ($p<0,05$), 1 mM ($p<0,01$) oraz 2 mM ($p<0,001$), odpowiednio o 0,6%, 6,5% i 5,6% w porównaniu z grupą kontrolną. Oprócz tego odnotowano również istotny statystycznie wzrost odsetka komórek fazy G2/M pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru w stężeniach 0,5 – 2 mM. Wzrost ten był najwyższy w przypadku zastosowania nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM i wynosił około 21% ($p<0,001$).

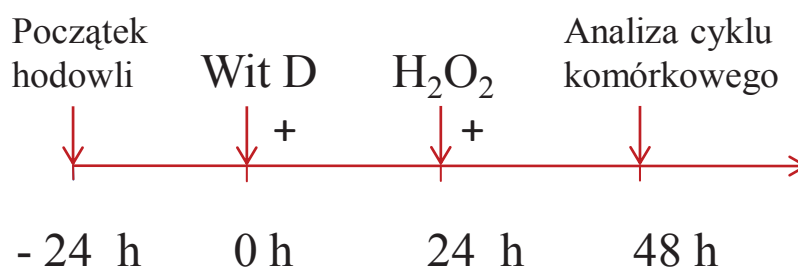


Ryc. 14. Wpływ nadtlenu wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 5 mM przez 24 godziny, następnie zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Obserwowano również, że wraz ze wzrostem stężenia zastosowanego nadtlenu wodoru wzrastał odsetek komórek frakcji SubG1. Istotny statystycznie wzrost odsetka komórek frakcji SubG1 w granicach 8 – 44 % obserwowano w przypadku 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z nadtlaniem wodoru w stężeniach 1 – 5 mM ($p < 0,001$). Obserwowany wzrost odsetka komórek znajdujących się we frakcji SubG1 po 24 godzinnej inkubacji z nadtlaniem wodoru w stężeniach 1 mM i 5 mM, tłumaczy spadek odsetka komórek frakcji G2/M i S.

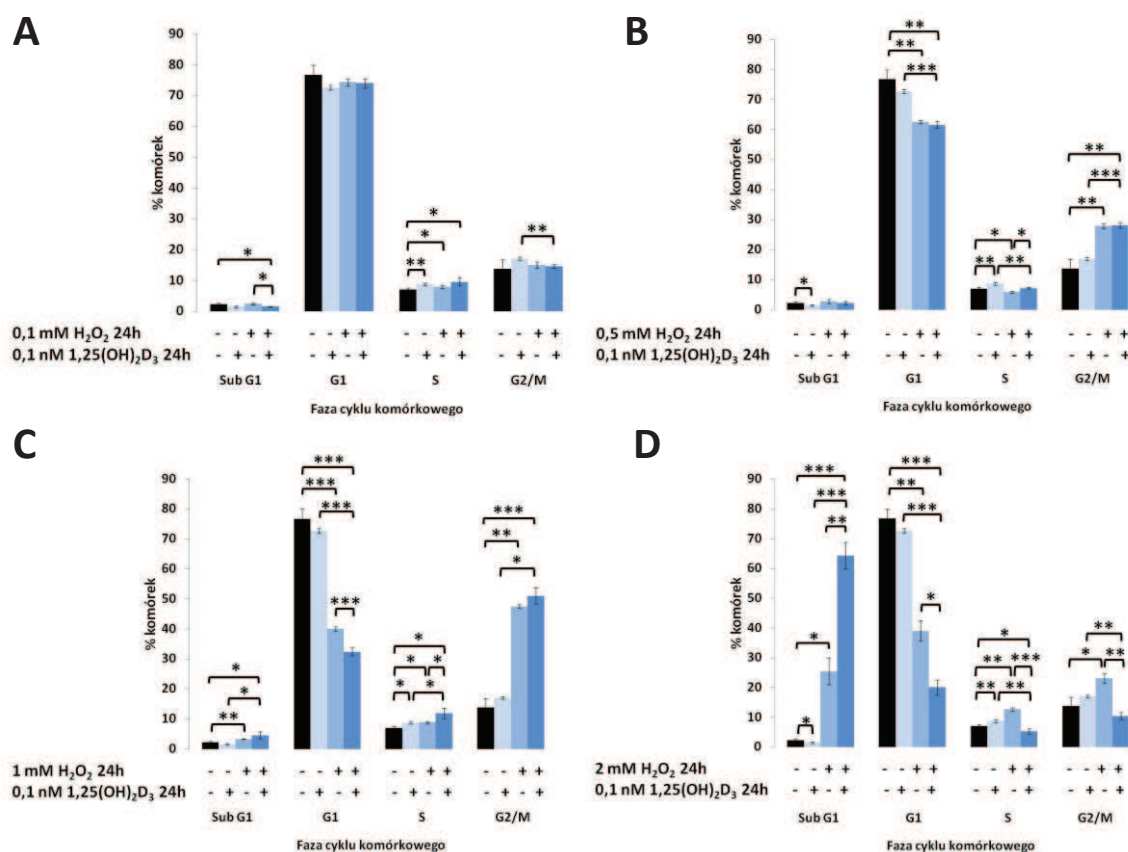
5.2.3. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zmiany w cyklu komórkowym

W celu ustalenia wpływu preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na dystrybucję komórek w cyklu komórkowym pod wpływem działania nadtlenu wodoru zastosowano 24 godzinną inkubację komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w zakresie stężeń 0,1 - 100 nM, po której komórki poddawano 24 godzinnemu działaniu nadtlenu wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM. Schemat 1 ilustruje plan doświadczeń. Wyniki przedstawiono w formie wykresów słupkowych na Ryc. 15 – 18.



Schemat 1. Plan doświadczeń.

W pierwszej kolejności zbadano wpływ 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 0,1 nM na ich dystrybucję w cyklu komórkowym pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z nadtlaniem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM (Ryc. 15).



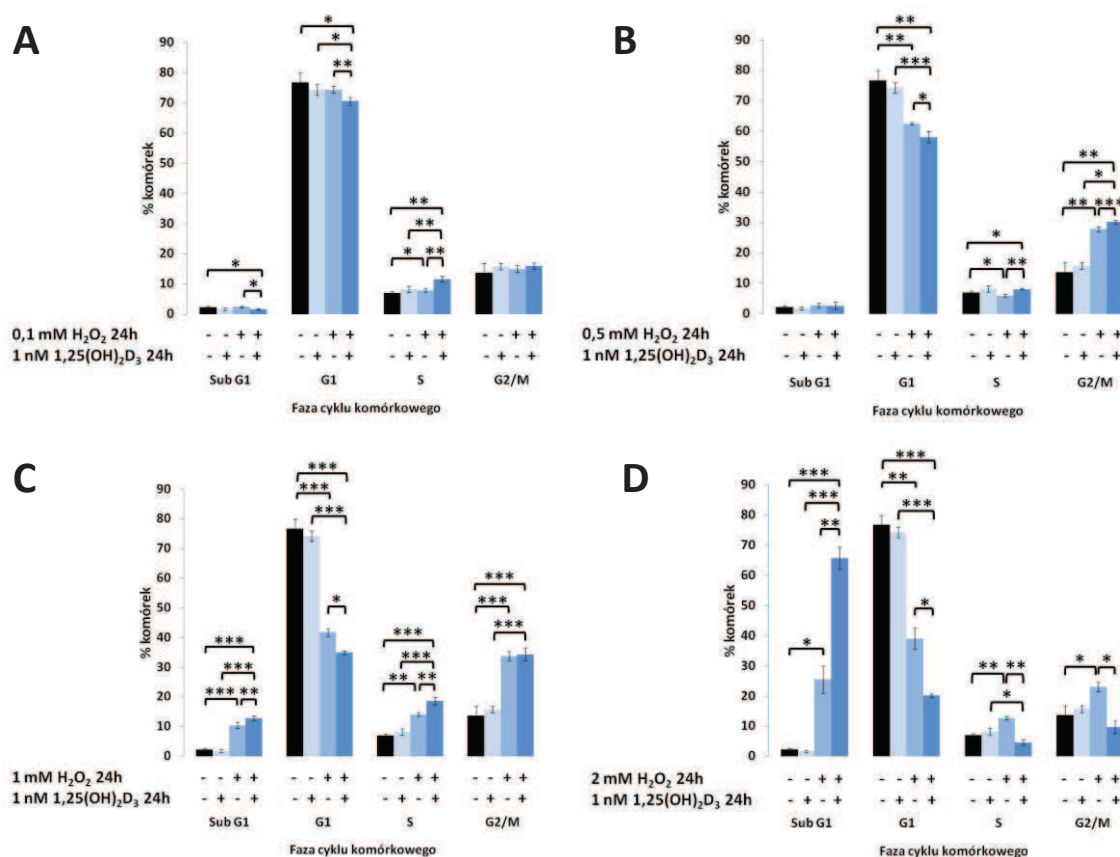
Ryc. 15. Porównanie wpływu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 0,1 nM oraz nadtlenu wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 0,1 nM bądź z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 0,1 nM, a następnie komórki poddawano działaniu 0,1 – 2 mM nadtlenu wodoru przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

Nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 0,1 nM na ich dystrybucję w cyklu komórkowym pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z nadtlakiem wodoru w stężeniach 0,1 mM i 0,5 mM (Ryc. 15, panele A i B). Natomiast 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 0,1 nM powodowała około 3%

wzrost odsetka komórek HaCaT w fazie S pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM ($p < 0,01$) w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu nadtlaku wodoru (Ryc. 15, panel C). Jednocześnie obserwowano istotny statystycznie spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 ($p < 0,001$) w próbach, w których działanie nadtlaku wodoru w stężeniu 1 mM poprzedzała 24 godzinna inkubacja komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 0,1 nM.

Podobną tendencję, tj. wzmocnienie efektu wywieranego przez nadtlak wodoru na dystrybucję komórek HaCaT w cyklu komórkowym poprzez zastosowanie 24 godzinnej preinkubacji komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 0,1 nM, w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu nadtlaku wodoru, zaobserwowano w przypadku inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru w stężeniu 2 mM (Ryc. 15, panel D). Odnotowano istotny statystycznie, blisko 19%, spadek odsetka komórek fazy G0/G1 w przypadku komórek poddawanych preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 0,1 nM ($p < 0,05$) oraz około 7% spadek odsetka komórek w fazie S ($p < 0,001$) w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu nadtlaku wodoru, czemu towarzyszył wyraźny, bo blisko 39%, wzrost odsetka komórek frakcji SubG1 ($p < 0,01$).

Zaobserwowano zatem, że cytotoksyczna aktywność nadtlaku wodoru stosowanego przez 24 godziny w stężeniach 1 i 2 mM, mająca swoje odzwierciedlenie we wzroście odsetka komórek frakcji S, bądź SubG1, była wzmacniana poprzez zastosowanie 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 0,1 nM. W związku z tym postanowiono zbadać wpływ 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 1 nM na ich dystrybucję w cyklu komórkowym pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM. Wyniki przedstawiono na Ryc. 16.



Ryc. 16. Porównanie wpływu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 1 nM i nadtlenu wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 1 nM bądź z nadtlenkiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 1 nM, a następnie komórki poddawano działaniu 0,1 – 2 mM nadtlenu wodoru przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów ± SD. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001.

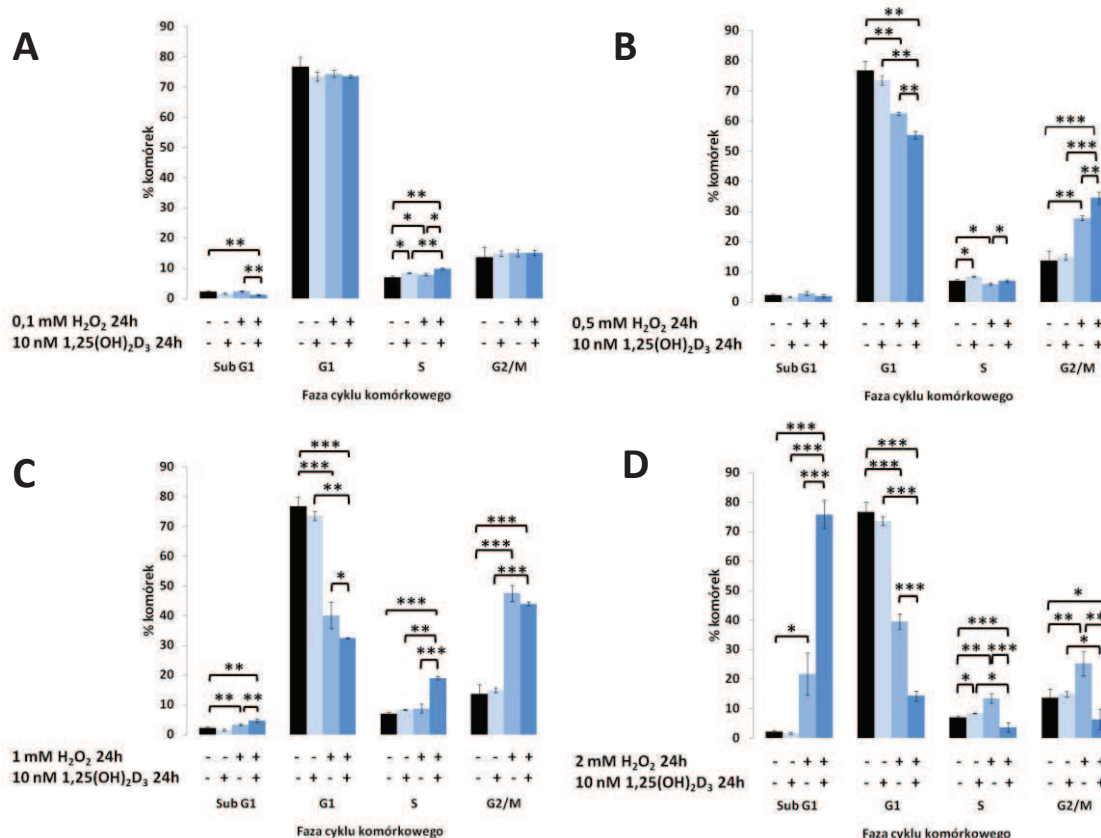
Zaobserwowano, że zastosowanie 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w wyższym stężeniu wzmacniało działanie nadtlenu wodoru w całym zakresie stosowanych stężeń. Obserwowano istotny statystycznie spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 w granicach 3,8 – 18%, proporcjonalnie do zastosowanego stężenia nadtlenu wodoru w próbach, w których działanie nadtlenu wodoru w

zakresie stężeń 0,1 - 2 mM poprzedzała 24 godzinna inkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 1 nM ($p<0,05$) (Ryc. 16, panele A – D). Jednocześnie odnotowano, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 1 nM powodowała wzrost odsetka komórek w fazie S pod wpływem inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru w stężeniu 0,1 mM i 1 mM odpowiednio o około 3% i 4% ($p<0,01$) i 2% wzrost odsetka komórek w fazie G2/M pod wpływem stymulacji komórek nadtlakiem wodoru w stężeniu 0,5 mM ($p<0,05$). Wykazano również, że odsetek komórek frakcji SubG1 istotnie wzrastał o około 2,4% pod wpływem działania nadtlaku wodoru stosowanego w stężeniu 1 mM w próbach poddawanych uprzednio 24 godzinnej inkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 1 nM.

Zaobserwowano również, że pod wpływem 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 1 nM istotnie malał odsetek komórek w fazie S oraz G2/M poddawanych 24 godzinnemu działaniu nadtlaku wodoru w stężeniu 2 mM ($p<0,01$ i $p<0,05$ odpowiednio). Odnotowano natomiast 40% wzrost odsetka komórek frakcji SubG1 ($p<0,01$).

Zatem zwiększenie stężenia stosowanego w czasie preinkubacji $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ z 0,1 nM do 1 nM, sprawiło że wzmocniona została cytotoksyczna aktywność nadtlaku wodoru w pełnym zakresie stosowanych stężeń.

W kolejnych doświadczeniach zastosowano $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM w czasie 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT, poprzedzającej 24 godzinne działanie nadtlaku wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM. Wyniki przedstawiono na Ryc. 17.

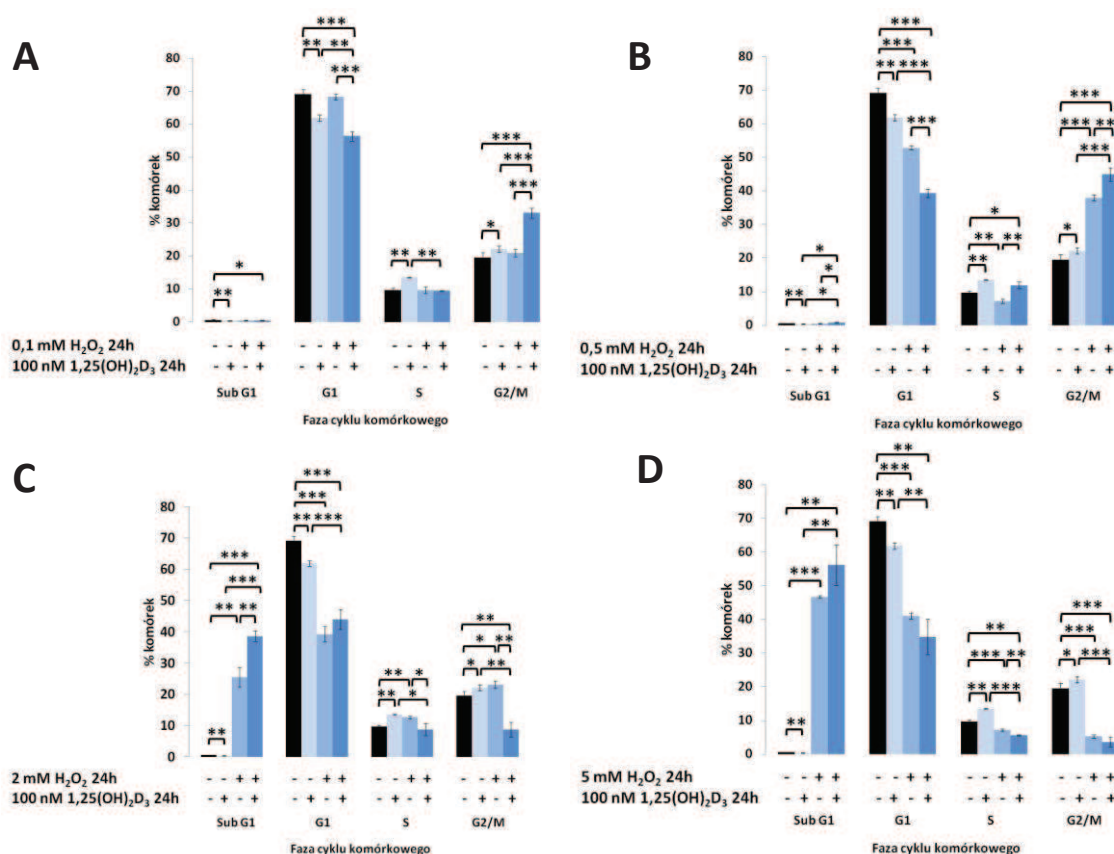


Ryc. 17. Porównanie wpływu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM i nadtlenu wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM bądź z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM, a następnie komórki poddawano działaniu 0,1 – 2 mM nadtlenu wodoru przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zaobserwowano, że poddawanie komórek HaCaT 24 godzinnemu działaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM, po którym następowała inkubacja komórek z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM, wzmacniało obserwowany wpływ działania nadtlenu wodoru na dystrybucję komórek HaCaT w cyklu komórkowym. Obserwowano istotne statystycznie zmniejszenie odsetka komórek w fazie G0/G1 w granicach 7 – 25% w przypadku komórek inkubowanych z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu

10 nM i następnie poddawanych działaniu nadtlenu wodoru w zakresie stężeń 0,5 – 2 mM ($p < 0,01$ dla nadtlenu wodoru w stężeniu 0,5 mM, $p < 0,05$ dla nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM oraz $p < 0,001$ dla nadtlenu wodoru w stężeniu 2 mM) w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu nadtlenu wodoru w analogicznych stężeniach. Tym samym efekt wywierany przez nadtlenek wodoru stosowany w stężeniu 2 mM podczas 24 godzinnej inkubacji został silniej wzmocniony w przypadku 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM w porównaniu z 24 godzinną preinkubacją komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 1 nM (25% różnicy w porównaniu z 18% odpowiednio). Jednocześnie zmniejszeniu odsetka komórek fazy G0/G1 towarzyszył wzrost odsetka komórek innych faz cyklu. W przypadku 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z nadtlakiem wodoru w stężeniu 0,1 mM zastosowanie preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM powodowało zwiększenie odsetka komórek fazy S o niemal 2% ($p < 0,05$) w porównaniu z komórkami poddawanymi działaniu jedynie nadtlenu wodoru. Działanie nadtlenu wodoru w wyższych stężeniach, tj. 0,5 – 2 mM, wzmacniane było poprzez 24 godzinną preinkubację komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM w innych fazach cyklu komórkowego, co uwidaczniało się w zwiększeniu odsetka komórek w fazie G2/M o około 7% w przypadku nadtlenu wodoru w stężeniu 0,5 mM ($p < 0,01$), bądź komórek frakcji SubG1 o około 4% w przypadku nadtlenu wodoru stosowanego w stężeniu 1mM ($p < 0,01$) lub nawet 54% w przypadku nadtlenu wodoru stosowanego w stężeniu 2mM ($p < 0,001$).

Następnie zbadano również wpływ 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM na ich dystrybucję w cyklu komórkowym pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 5 mM. Wyniki przedstawiono na Ryc. 18.



Ryc. 18. Porównanie wpływu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM i nadtlenku wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM bądź z nadtlenkiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 5 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 100 nM 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM, a następnie komórki poddawano działaniu 0,1 – 5 mM nadtlenku wodoru przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zaobserwowano, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM wpływała na istotne statystycznie zmniejszenie odsetka komórek fazy G0/G1 pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlenkiem wodoru w stężeniach 0,1 i 0,5 mM odpowiednio o około 12% i 13,5% ($p < 0,001$), czemu

towarzyszył wzrost odsetka komórek fazy G2/M, w stosunku do prób poddawanych jedynie działaniu nadtlenu wodoru stosowanego w analogicznych stężeniach. Zależności tej nie zaobserwowano w przypadku nadtlenu wodoru stosowanego w stężeniach 2 i 5 mM. Zastosowanie 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM wywoływało wręcz odmienny skutek wobec wpływu wywieranego w czasie 24 godzinnej inkubacji przez nadtlenek wodoru w stężeniu 2 mM – zaobserwowano wzrost odsetka komórek fazy G0/G1 w porównaniu z próbami inkubowanymi wyłącznie z nadtlaniem wodoru w tym samym stężeniu. Efekt ten nie był jednak znamieny statystycznie. Jednocześnie we wspomnianych warunkach doświadczalnych obserwowano zwiększenie odsetka komórek frakcji SubG1 o około 13% ($p < 0,01$), czemu towarzyszyło zmniejszenie odsetka komórek w fazie S ($p < 0,05$) oraz G2/M ($p < 0,01$).

Przeprowadzone doświadczenia oraz analiza dystrybucji komórek w cyklu komórkowym wykazały, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ istotnie wpływała na dystrybucję komórek w cyklu komórkowym pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru. Zastosowanie preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ już w stężeniu 0,1 nM uwalniało komórki na działanie nadtlenu wodoru w stężeniach 1 mM i 2 mM, powodując zwiększenie odsetka komórek fazy S w pierwszym przypadku oraz zwiększenie frakcji SubG1 w przypadku inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniu 2 mM (Ryc. 15, panele C i D). Zwiększenie stężenia $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ do 1 nM stosowanego w czasie 24 godzinnej preinkubacji komórek powodowało zmniejszenie odsetka komórek fazy G0/G1 pod wpływem nadtlenu wodoru stosowanego w czasie 24 godzin w pełnym zakresie stężeń, tj. 0,1 – 2 mM w porównaniu z próbami inkubowanymi jedynie z nadtlaniem wodoru (Ryc. 16, panele A – D). Ponadto zastosowanie preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 1 nM powodowało zwiększenie odsetka komórek w fazie S w wyniku 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniu 1 mM (Ryc. 16, panel C) oraz zwiększenie frakcji SubG1 pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniach 1 mM i 2 mM (Ryc. 16, panele C i D) w porównaniu z próbami poddawanymi wyłącznie działaniu nadtlenu wodoru. Podobny efekt obserwowano stosując 24 godzinną preinkubację z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM (Ryc. 17, panele A – D), z tym że wzrost odsetka komórek frakcji SubG1 pod wpływem nadtlenu

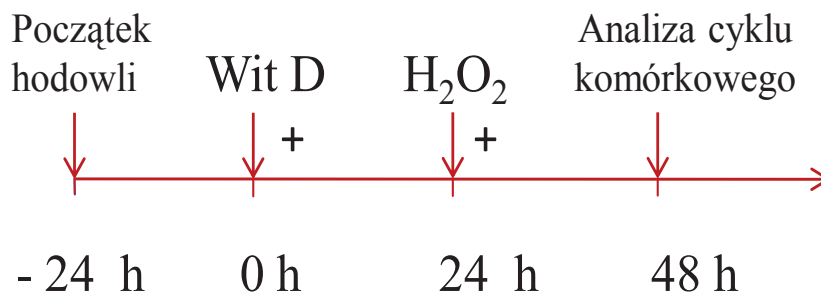
wodoru w stężeniu 2 mM w tym samym czasie inkubacji był większy niż w przypadku 24 godzinnej preinkubacji komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 1 nM w porównaniu z próbami inkubowanymi jedynie z nadtlaniem wodoru.

24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM powodowała zmniejszenie odsetka komórek w fazie G0/G1 pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniach 0,1 mM i 0,5 mM oraz proporcjonalny wzrost odsetka komórek fazy G2/M w porównaniu z próbami poddawanymi działaniu jedynie nadtlenu wodoru (Ryc. 18, panele A i B). Podobnie jak w przypadku niższych stężeń $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stosowanego w czasie 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT, zastosowanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM powodowało wzrost odsetka komórek frakcji SubG1 pod wpływem inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniu 2 mM (Ryc. 18, panel C) w porównaniu z próbami poddawanymi wyłącznie działaniu nadtlenu wodoru w analogicznym stężeniu. Zaobserwowano również, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM powodowała zwiększenie odsetka komórek fazy G0/G1 po 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniu 2 mM w porównaniu z komórkami inkubowanymi wyłącznie z nadtlaniem wodoru. Efekt ten nie był jednak istotny statystycznie.

Do dalszych badań nad wpływem 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D na dystrybucję komórek w cyklu komórkowym pod wpływem inkubacji z nadtlaniem wodoru wybrano 100 nM stężenie analogów witaminy oraz 1 mM stężenie nadtlenu wodoru, stosowanego w czasie 24 godzinnej inkubacji.

5.2.4. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zmiany w cyklu komórkowym

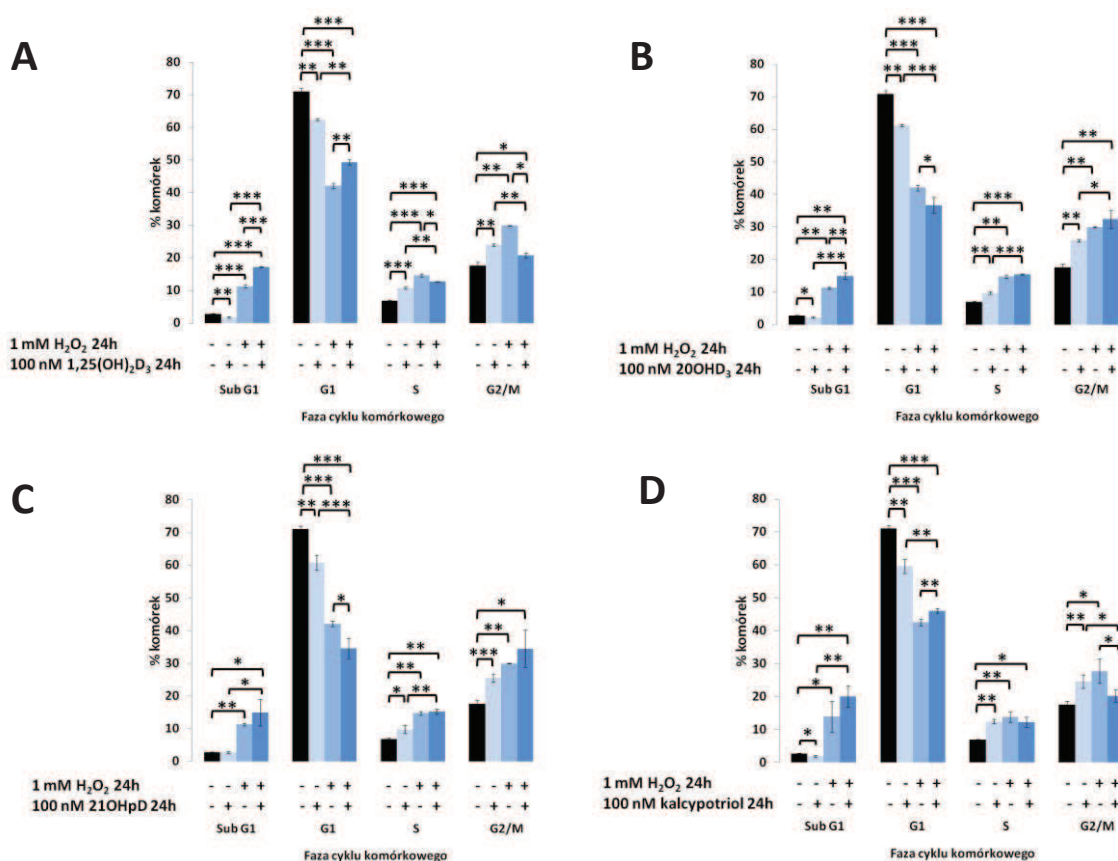
Doświadczenia wykonywano według standardowego schematu: 24 godzinna preinkubacja z analogami witaminy D, po której komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru przez kolejne 24 godzinny (Schemat 2).



Schemat 2. Plan doświadczeń.

Wykazano, że poddawanie komórek HaCaT 24-godzinnej preinkubacji z dwoma analogami witaminy D – 1,25(OH)₂D₃ lub kalcypotriolem, stosowanymi w stężeniu 100 nM, wpływało na zwiększenie odsetka komórek w fazie G0/G1 pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z nadtlaniem wodoru, odpowiednio o około 7% oraz około 3,5% w porównaniu z próbami inkubowanymi wyłącznie z nadtlaniem wodoru ($p < 0,01$); (Ryc. 19, panele A i D). Wzrostowi temu towarzyszył proporcjonalny spadek odsetka komórek fazy G2/M ($p < 0,05$ w obu przypadkach). Odwrotny skutek wywierała natomiast 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z analogami 20OHD₃ oraz 21OHpD, stosowanymi w stężeniu 100 nM, na wpływ 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniu 1 mM (Ryc. 19, panele B i C). Zaobserwowano mianowicie obniżenie odsetka komórek fazy G0/G1 odpowiednio o 5% i 7,5% w porównaniu z próbami traktowanymi jedynie nadtlaniem wodoru ($p < 0,05$).

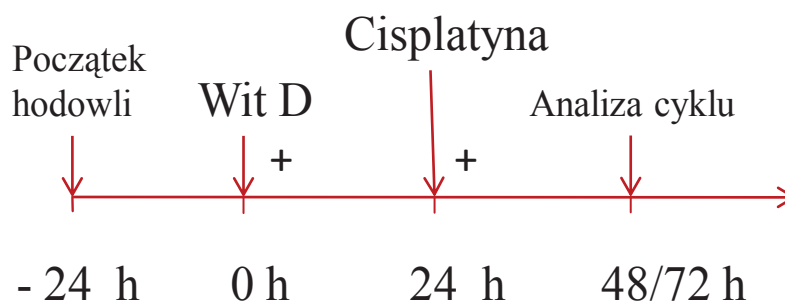
Należy zauważyć, że w przypadku wszystkich stosowanych analogów witaminy D zaobserwowano wzrost odsetka komórek frakcji SubG1 pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z nadtlaniem wodoru w stężeniu 1 mM, w przypadku gdy była ona poprzedzona 24 godzinną preinkubacją komórek z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM ($p < 0,001$ dla 1,25(OH)₂D₃, $p < 0,01$ dla 20OHD₃), choć dla 21OHpD oraz dla kalcypotriolu efekt ten nie był istotny statystycznie (Ryc. 19, panele A – D).



Ryc. 19. Porównanie wpływu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM (1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) i kalcypotriol (D)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.5. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie cisplatyny. Zmiany w cyklu komórkowym

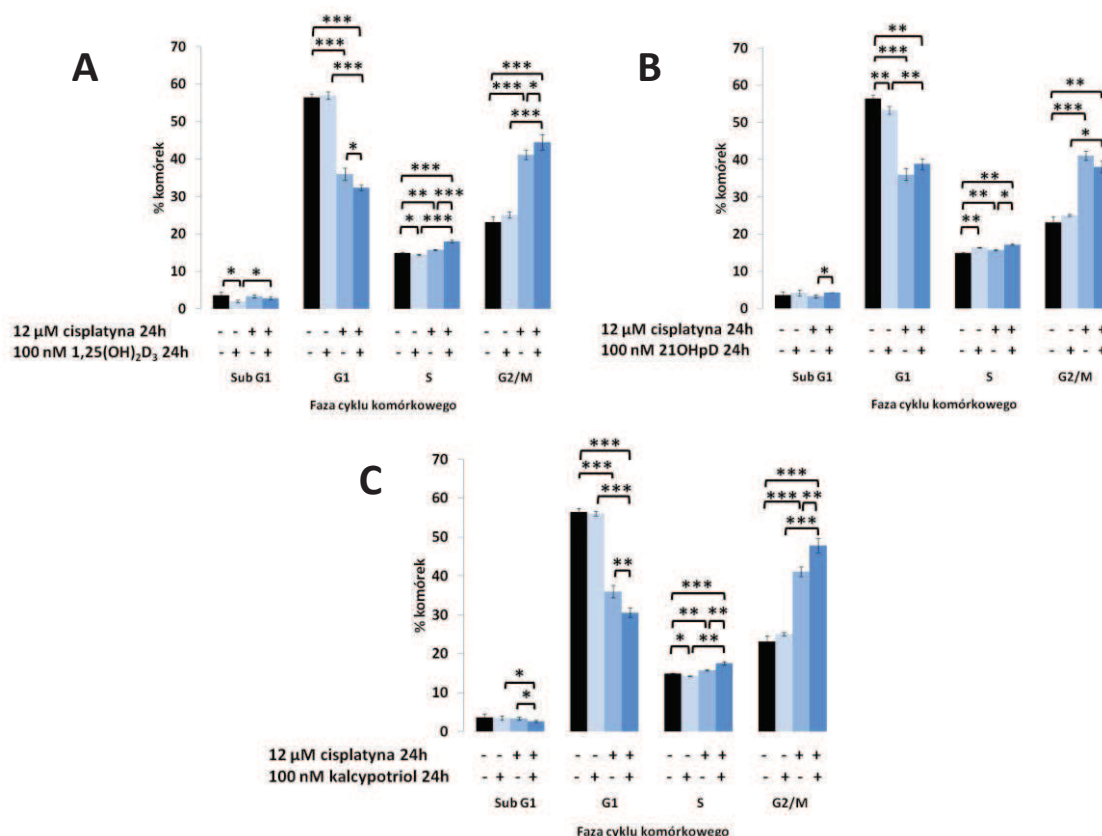
W kolejnych doświadczeniach nadtlenuk wodoru zastąpiono cisplatyną w celu określenia czy preinkubacja komórek HaCaT z analogami witaminy D stosowanymi w stężeniu 100 nM wzmacnia działanie tego cytostatyku, jak to wykazano dla nadtlenuk wodoru (Wyniki, 5.2.4). Doświadczenia wykonywano według standardowego schematu: 24 godzinna preinkubacja z analogami witaminy D, po której komórki poddawano działaniu cisplatyny przez kolejne 24 lub 48 godzin (Schemat 3).



Schemat 3. Plan doświadczeń.

Następnie oceniano wpływ działania cisplatyny na przebieg cyklu komórkowego przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej. Do doświadczeń wybrano trzy analogi – 1,25(OH)₂D₃, 21OHpD oraz kalcyptriol. Wyniki przedstawiono w formie wykresów słupkowych na Ryc. 20, panele A – C.

Zaobserwowano, że 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM zastosowany w czasie 24 godzinnej preinkubacji powodował zmniejszenie odsetka komórek fazy G0/G1 o około 4% pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z cisplatyną w stężeniu 12 μM w porównaniu z próbami poddawanych wyłącznie działaniu cisplatyny w analogicznym stężeniu ($p < 0,05$). Zmianie tej towarzyszył proporcjonalny wzrost odsetka komórek fazy S oraz G2/M ($p < 0,001$ i $p < 0,05$, odpowiednio); (Ryc. 20, panel A).



Ryc. 20. Porównanie wpływu 12 μM cisplatyny i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM (1,25(OH)₂D₃ (A), 21OHpD (B), calcipotriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z cisplatyną w stężeniu 12 μM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu 12 μM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

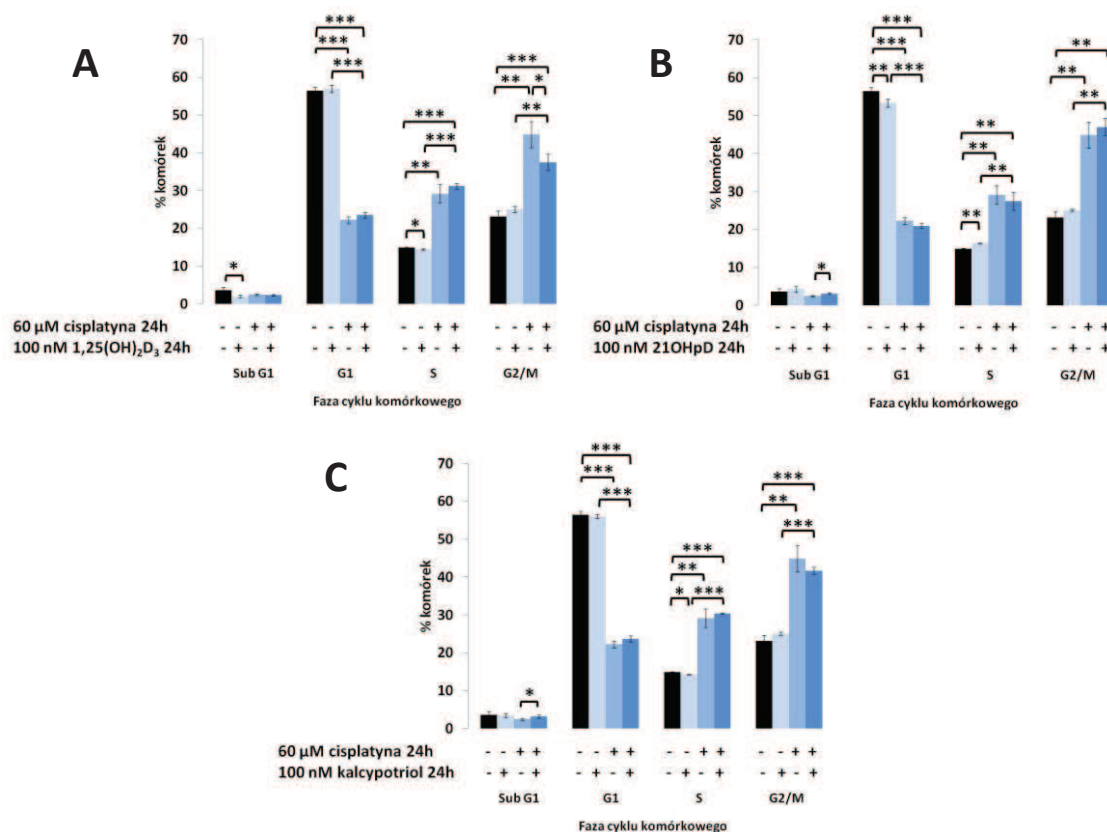
Podobną zależność zaobserwowano dla innego analogu witaminy D – calcipotriolu. 24 godzinna preinkubacja komórek z calcipotriolem w stężeniu 100 nM powodowała zmniejszenie odseteka komórek fazy G0/G1 o około 5% pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z cisplatyną w stężeniu 12 μM w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu cisplatyny ($p < 0,01$). Zmianie tej także

towarzyszył proporcjonalny wzrost odsetka komórek fazy S oraz G2/M ($p<0,01$); (Ryc. 20, panel C).

Nie odnotowano natomiast istotnego statystycznie wpływu analogu 21OHpD stosowanego w stężeniu 100 nM w czasie 24 godzinnej stymulacji komórek HaCaT na zmianę w dystrybucji komórek w cyklu komórkowym pod wpływem 24 godzinnego działania cisplatyny w stężeniu 12 μM w odniesieniu do prób traktowanych przez 24 godziny samą cisplatyną (Ryc. 20, panel B).

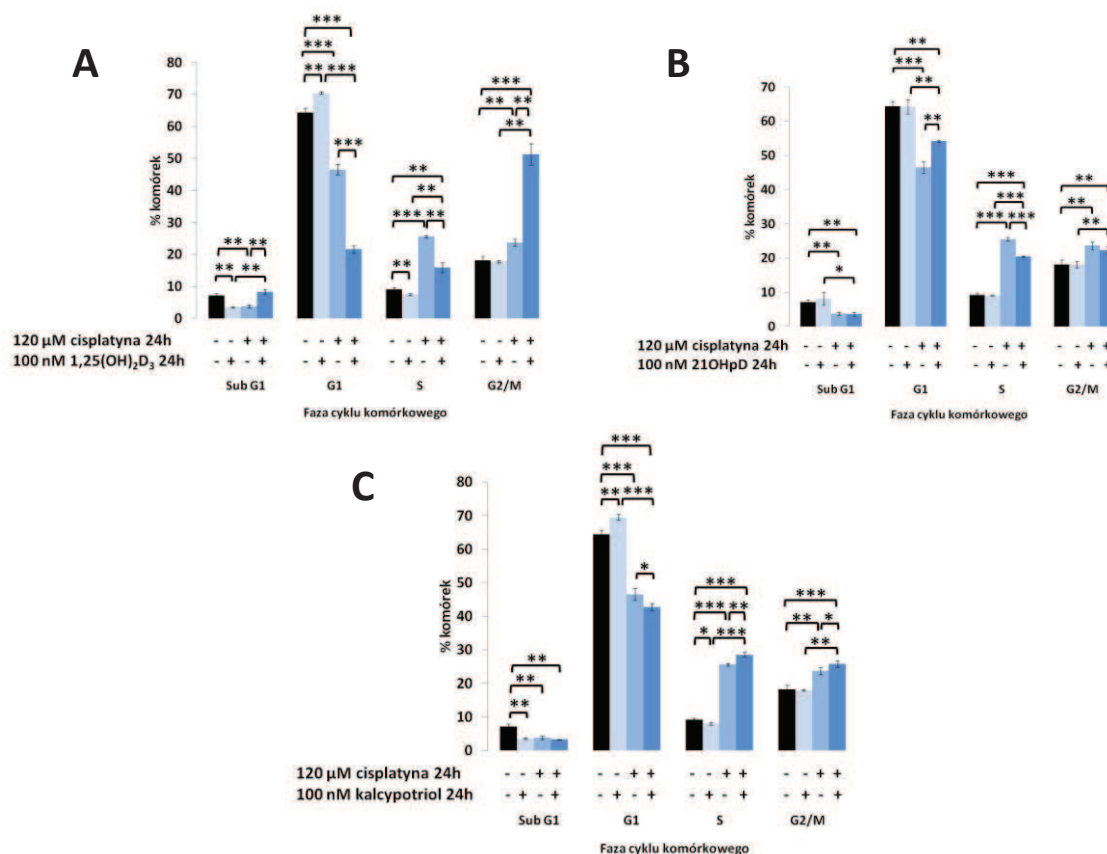
W kolejnych doświadczeniach postanowiono zwiększyć stężenie stosowanej cisplatyny do 60 μM , zachowując jednocześnie ten sam czas inkubacji komórek, tj. 24 godziny, postępując zgodnie z planem doświadczeń zaprezentowanym na Schemacie 3.

Nie odnotowano istotnego statystycznie wpływu 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z 1,25(OH) $_2$ D $_3$, 21OHpD oraz kalcypotriolu stosowanymi w stężeniu 100 nM na dystrybucję komórek w cyklu komórkowym pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z cisplatyną w stężeniu 60 μM (Ryc. 21, panele A – C). Zaobserwowano natomiast istotny statystycznie wzrost odsetka komórek fazy S oraz G2/M pod wpływem 24 godzinnego działania cisplatyny w stężeniu 60 μM w porównaniu z kontrolą ($p<0,01$); (Ryc. 21, panele A – C).



Ryc. 21. Porównanie wpływu 60 μM cisplatyny i 100 nM związków witaminy D (1,25(OH)₂D₃ (A), 21OHpD (B), calcipotriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z cisplatyną w stężeniu 60 μM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu 60 μM przez kolejne 24 godziny (Schemat 3). Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów ± SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001.

Z uwagi na niewielki wpływ preinkubacji z pochodnymi witaminy D na działanie cisplatyny postanowiono zwiększyć stężenie cisplatyny do 120 μM, zachowując jednocześnie 24 godzinny czas inkubacji.



Ryc. 22. Porównanie wpływu cisplatyny w stężeniu $120 \mu\text{M}$ i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (A), 21OHpD (B), kalcyptriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z cisplatyną w stężeniu $120 \mu\text{M}$ przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu $120 \mu\text{M}$ przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm \text{SD}$. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

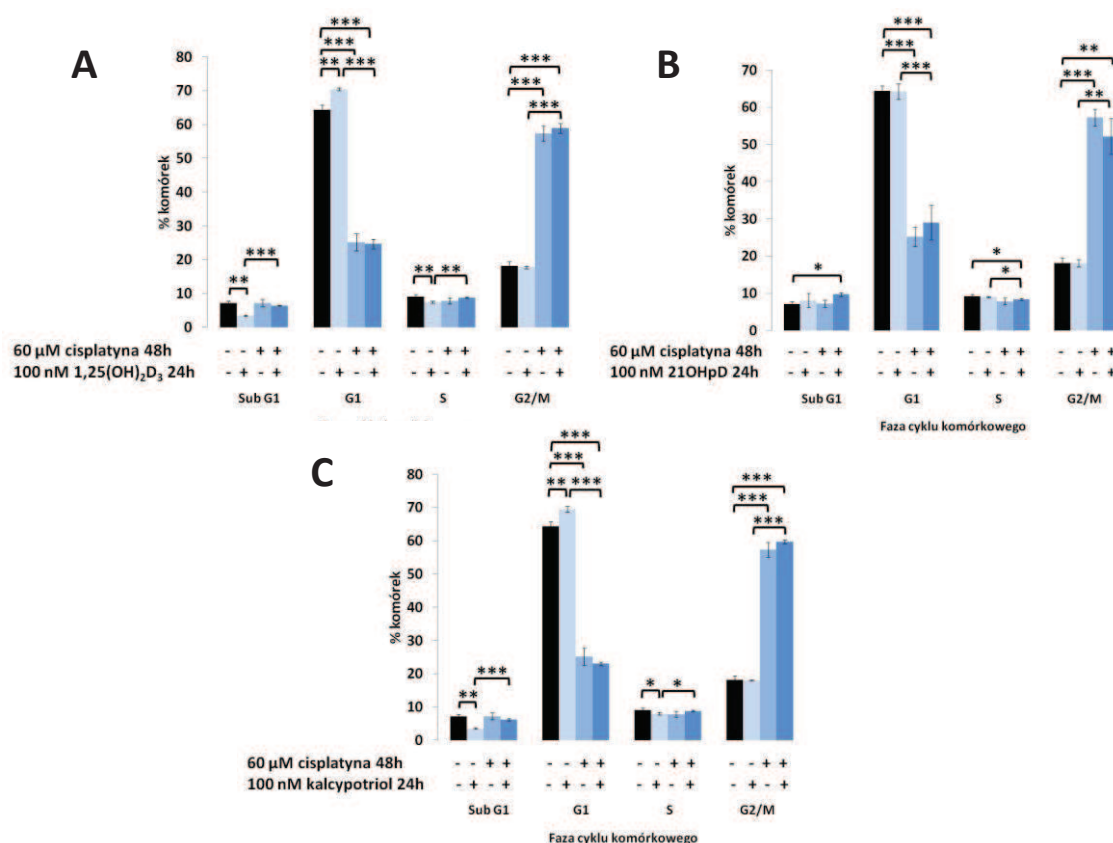
Zastosowanie 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z cisplatyną w stężeniu $120 \mu\text{M}$ powodowało wyraźny wzrost odsetka komórek fazy S ($p < 0,001$) oraz fazy G2/M ($p < 0,01$); (Ryc. 22, panele A – C).

Zaobserwowano również, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM w sposób istotny statystycznie wpływała na zmianę dystrybucji komórek w cyklu komórkowym pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z cisplatyną w stężeniu 120 μM w porównaniu z próbami poddawanymi wyłącznie działaniu cisplatyny w tym samym stężeniu (Ryc. 22, panel A). W tych warunkach obserwowano istotny statystycznie blisko 25% spadek odsetka komórek fazy G0/G1 ($p < 0,001$), czemu towarzyszył proporcjonalny wzrost odsetka komórek fazy G2/M.

Obniżenie odsetka komórek fazy G0/G1 obserwowano również pod wpływem 24 godzinnego działania cisplatyny w stężeniu 120 μM poprzedzonego 24 godzinną preinkubacją komórek HaCaT z kalcypotriolem stosowanym w stężeniu 100 nM w porównaniu z próbami poddawanymi wyłącznie działaniu cisplatyny ($p < 0,05$); (Ryc. 22, panel C). Towarzyszył temu wzrost odsetka komórek fazy S ($p < 0,01$) oraz fazy G2/M ($p < 0,05$).

Odmienne efekty zaobserwowano natomiast w przypadku 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z 21OHpD w stężeniu 100 nM, po której następowała 24 godzinna inkubacja z cisplatyną stosowaną w stężeniu 120 μM (Ryc. 22, panel B). Preinkubacja komórek z 21OHpD w stężeniu 100 nM wpływała na istotne statystycznie zwiększenie odsetka komórek fazy G0/G1 o około 7% w porównaniu z próbami traktowanymi wyłącznie cisplatyną ($p < 0,01$). Towarzyszył temu proporcjonalny spadek odsetka komórek fazy S oraz G2/M.

W kolejnych doświadczeniach wydłużono czas ekspozycji komórek HaCaT na cisplatynę do 48 godzin. Wyniki przedstawiono na Ryc. 23 i 24.



Ryc. 23. Porównanie wpływu cisplatyny w stężeniu 60 μM i analogów witaminy D w stężeniu 60 μM (1,25(OH)₂D₃ (A), 21OHpD (B), kalcyptriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM przez 24 godziny bądź z cisplatyną w stężeniu 60 μM przez 48 godzin lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu 60 μM przez kolejne 48 godzin. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów ± SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

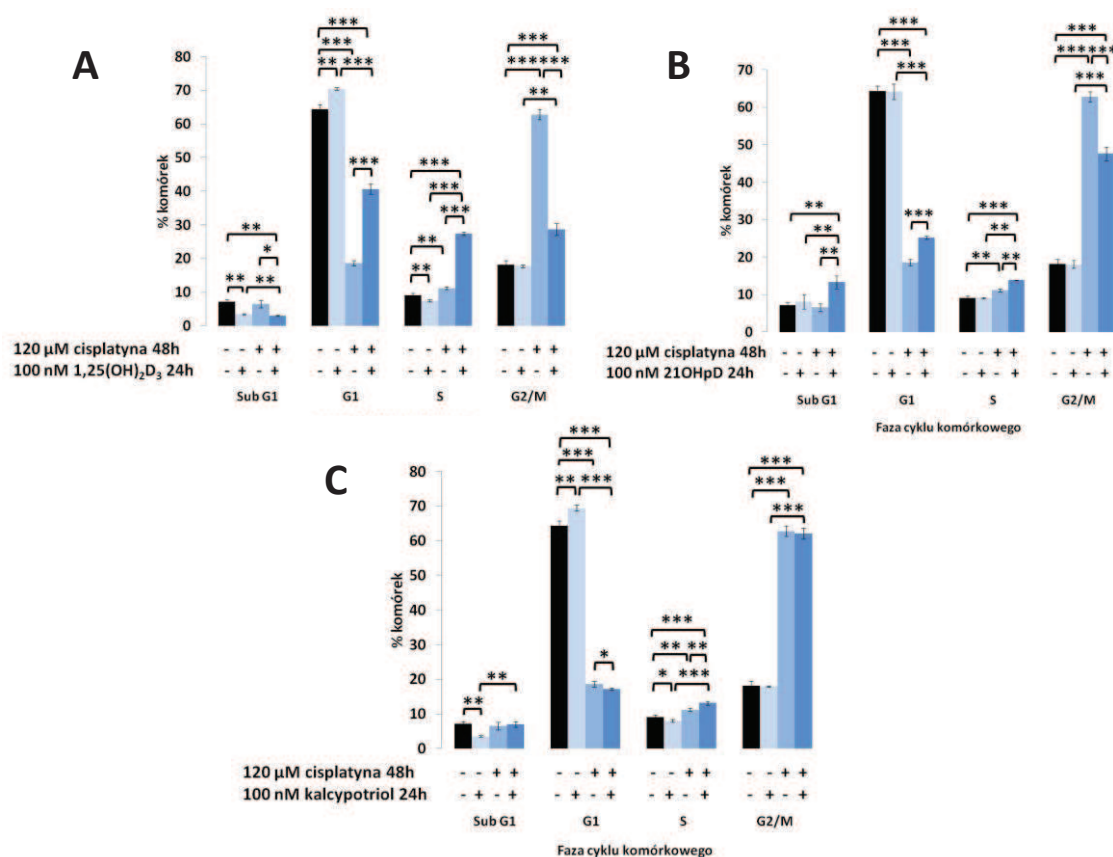
Nie odnotowano wpływu preinkubacji keratynocytów z analogami witaminy D na zmianę dystrybucji komórek w cyklu komórkowym pod wpływem wydłużonej, 48 godzinnej, inkubacji z cisplatyną w stężeniu 60 μM w porównaniu z próbami poddawanymi 48 godzinnemu działaniu samej cisplatyny (Ryc. 23, panele A – C).

Jednocześnie odnotowano istotny statystycznie wzrost odsetka komórek G2/M pod wpływem 48 godzinnego działania cisplatyny w stężeniu 60 μM w porównaniu z kontrolą ($p < 0,001$); (Ryc. 23, panele A – C).

W kolejnych doświadczeniach zwiększono stężenie cisplatyny do 120 μM , zachowując 48 godzinny czas inkubacji.

Zastosowanie 48 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z samą cisplatyną w stężeniu 120 μM powodowało wyraźny wzrost odsetka komórek fazy G2/M ($p < 0,001$); (Ryc. 24, panele A – C). Natomiast w doświadczeniach, w których wykonano 24 godzinną preinkubację komórek HaCaT z 1,25(OH) $_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM zaobserwowano zwiększenie odsetka komórek fazy G0/G1 o około 22% pod wpływem 48 godzinnej inkubacji komórek z cisplatyną w stężeniu 120 μM w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu cisplatyny ($p < 0,001$); (Ryc. 24, panel A). Towarzyszył temu także wzrost odsetka komórek fazy S ($p < 0,001$). Obserwowano również istotne statystycznie obniżenie odsetka komórek frakcji SubG1 w próbach, w których działanie cisplatyny poprzedzała 24 godzinna preinkubacja komórek z 1,25(OH) $_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM ($p < 0,05$). Co ciekawe, 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z analogiem 21OHpD w stężeniu 100 nM powodowała zwiększenie odsetka komórek fazy G0/G1 o około 6,5% pod wpływem 48 godzinnej inkubacji komórek z cisplatyną w stężeniu 120 μM w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu cisplatyny ($p < 0,001$); (Ryc. 24, panel B). Jednocześnie odnotowano niewielki wzrost odsetka komórek w fazie S o około 3% ($p < 0,01$). Zaobserwowano również istotny statystycznie wzrost odsetka komórek frakcji SubG1 niemal o 7% pod wpływem 48 godzinnego działania cisplatyny w stężeniu 120 μM w przypadku, gdy jej działanie poprzedzała 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z analogiem 21OHpD w stężeniu 100 nM ($p < 0,01$).

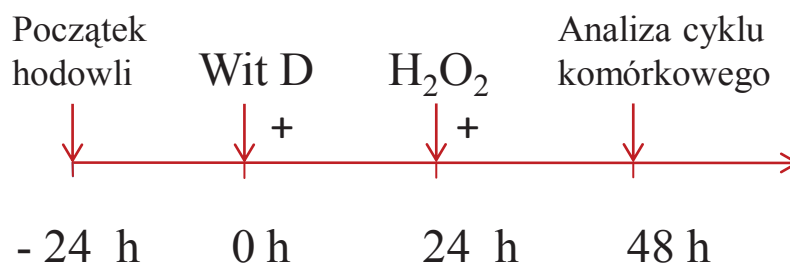
W przypadku 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z kalcypotriolem w stężeniu 100 nM zaobserwowano istotny statystycznie około 1,5% spadek odsetka komórek fazy G0/G1 pod wpływem 48 godzinnej ekspozycji komórek na cisplatynę w stężeniu 120 μM w porównaniu z próbami inkubowanymi wyłącznie z cisplatyną ($p < 0,05$); (Ryc. 24, panel C). Towarzyszył temu proporcjonalny wzrost odsetka komórek w fazie S ($p < 0,01$).



Ryc. 24. Porównanie wpływu cisplatyny w stężeniu 120 μM i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM (1,25(OH)₂D₃ (A), 21OHpD (B), kalcypotriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM przez 24 godziny bądź z cisplatyną w stężeniu 120 μM przez 48 godzin lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu przez kolejne 48 godzin. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów ± SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.6. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HPEKp z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zmiany w cyklu komórkowym

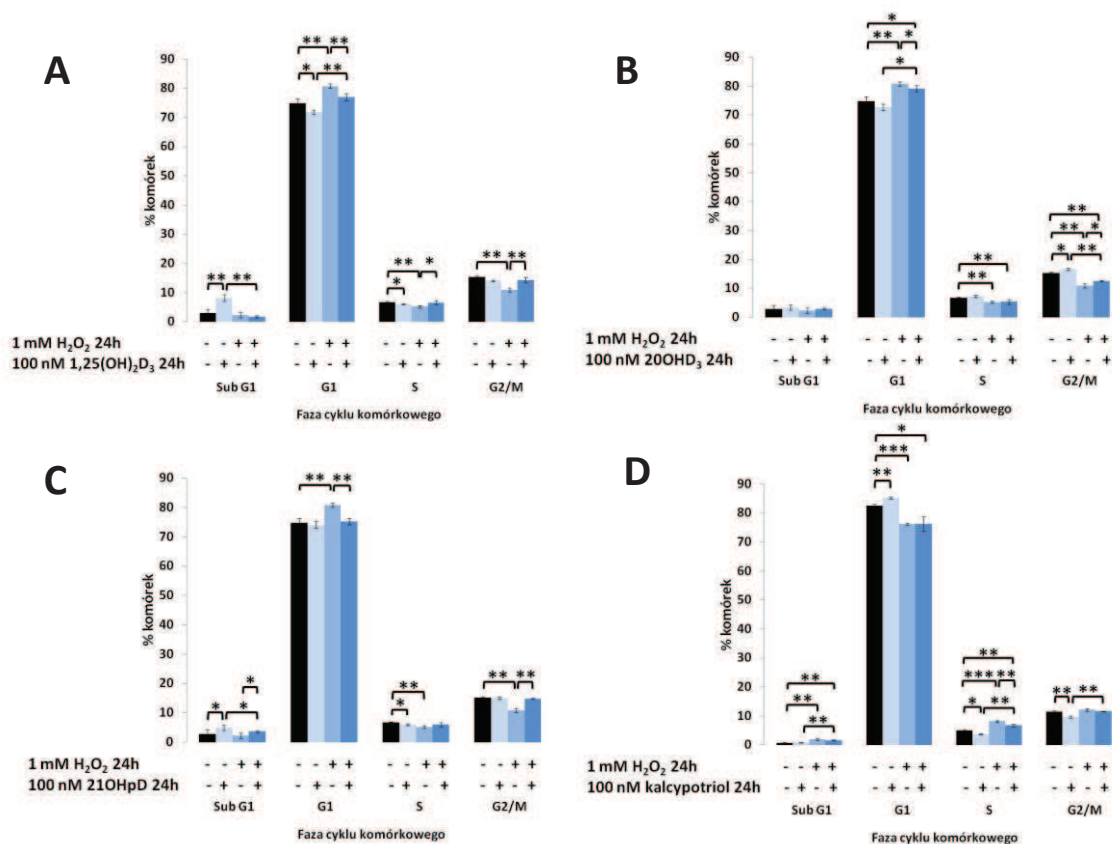
Linia HaCaT jest unieśmiertelnioną linią komórkową keratynocytów, co może mieć bezpośredni wpływ na wyniki doświadczeń. Dlatego też postanowiono zbadać również wpływ preinkubacji pierwotnych keratynocytów linii HPEKp z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. W tym celu keratynocyty linii HPEKp inkubowano 24 godziny z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM, a następnie poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny, zgodnie ze Schematem 4. W analogicznym układzie doświadczalnym wykazano wzmocnienie efektu działania nadtlenu wodoru w przypadku komórek linii HaCaT, co odzwierciedlało się między innymi wzrostem odsetka komórek frakcji SubG1 (Wyniki, 5.2.4; Ryc. 19, panele A – D). Wyniki przedstawiono na Ryc. 25.



Schemat 4. Plan doświadczeń.

Nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu 24 godzinnej preinkubacji komórek HPEKp z analogami witaminy D 1,25(OH)₂D₃, 20OHD₃, 21OHpD oraz kalcypotriolem, stosowanymi w stężeniu 100 nM, wzmacniającego efekt 24 godzinnego działania nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM (Ryc. 25, panele A – D). Jednocześnie odnotowano istotny statystycznie spadek odsetka komórek HPEKp w fazie G₀/G₁ podczas 24 godzinnej inkubacji w przypadku 1,25(OH)₂D₃ stosowanego w stężeniu 100 nM w porównaniu z kontrolą ($p < 0,05$); (Ryc. 25, panel A). Natomiast 24 godzinna

inkubacja komórek HPEKp z analogiem 20OHD₃ doprowadzała do zwiększenia odsetka komórek w fazie G2/M ($p < 0,05$); (Ryc. 25, panel B).

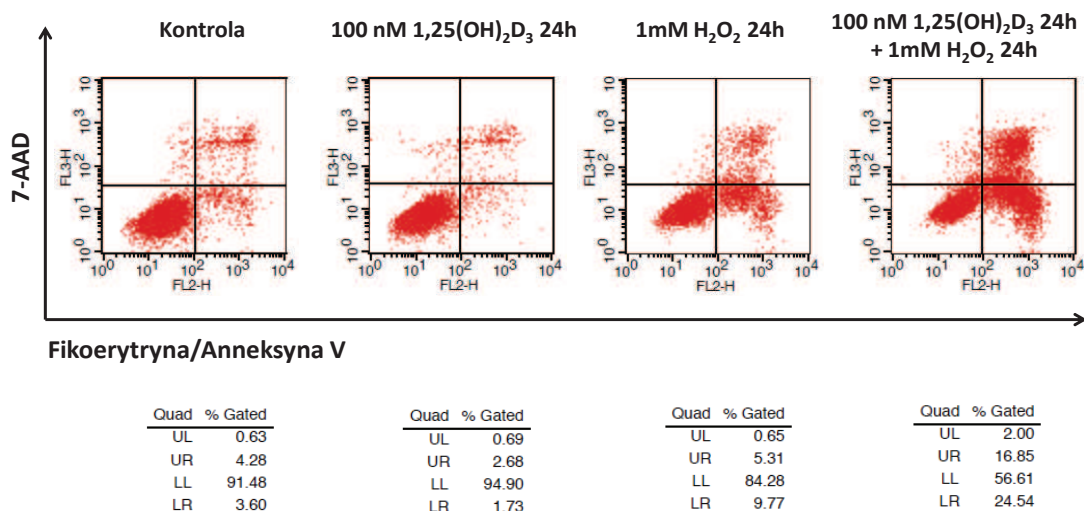


Ryc. 25. Porównanie wpływu nadtlenu wodoru w stężeniu 1mM i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM (1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) i kalcypotriol (D); w ostatnim wypadku wynik pochodzi z odrębnej serii doświadczeń) na cykl komórkowy komórek linii HPEKp. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1mM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3. Ocena apoptozy keratynocytów linii HaCaT testem PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I

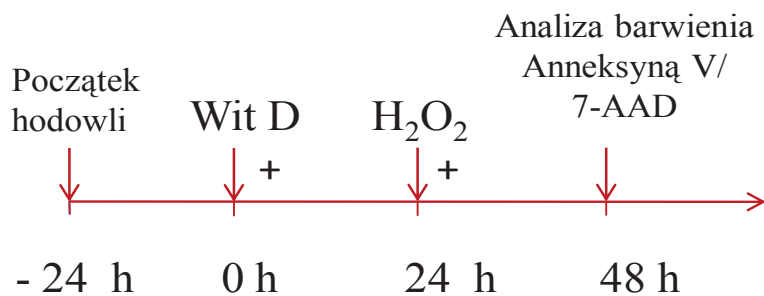
W odpowiedzi na działanie czynników cytotoksycznych może dojść do zatrzymania cyklu życiowego komórki bądź do indukcji śmierci na drodze apoptozy lub nawet nekrozy. Przeprowadzona analiza cyklu komórkowego wykazała, że poddawanie komórek HaCaT 24 godzinnemu działaniu nadtlenu wodoru w stężeniach 1 – 2 mM powoduje wzrost odsetka komórek frakcji SubG1. Wzrost ten był jednak istotnie większy w przypadku zastosowania uprzedniej 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D (Wyniki, 5.2.3 oraz 5.2.4). Dlatego też w celu zgłębienia mechanizmu cytotoksycznego działania nadtlenu wodoru oraz wpływu preinkubacji komórek linii HaCaT ze związkami witaminy D na ich odpowiedź na inkubację z nadtlenkiem wodoru przeprowadzono test mający na celu określenie rodzaju śmierci komórki indukowanej w trakcie doświadczeń. Przeprowadzone badania z użyciem testu PE Annexin V pozwoliły na ocenę stopnia uszkodzeń komórek powodowanych przez nadtlenek wodoru i porównanie ich z uszkodzeniami spowodowanymi przez działanie nadtlenu wodoru poprzedzone inkubacją ze związkami witaminy D. Zastosowana procedura umożliwiła rozróżnienie trzech populacji komórek: żywych – nieapoptotycznych (7-AAD-, Ann-V-), komórek znajdujących się na wczesnych etapach apoptozy (7-AAD-, Ann-V+), oraz populacji komórek późnoapoptotycznych, bądź nekrotycznych (7-AAD+, Ann-V+).

Ryc. 26 przedstawia reprezentacyjny wynik analizy cytometrycznej przeprowadzonej przy pomocy testu PE Annexin V, pozostałe wyniki przedstawiono w dalszej części rozdziału w formie wykresów słupkowych.



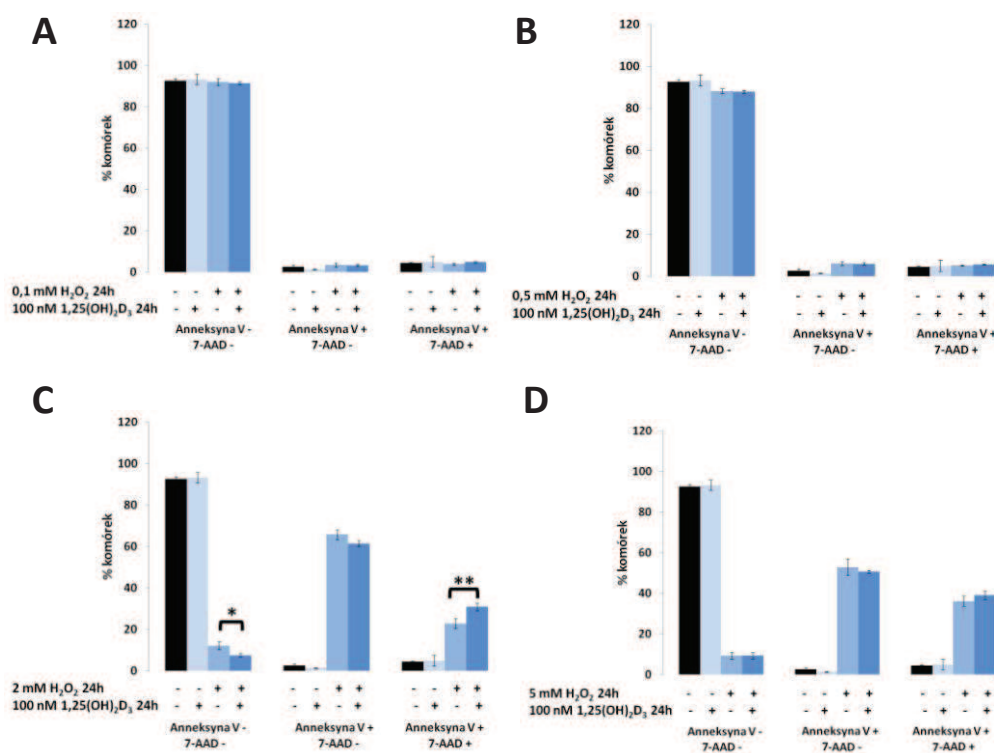
Ryc. 26. Reprezentacyjny wynik analizy cytometrycznej procesu apoptozy przy pomocy testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) w komórkach linii HaCaT. Komórki poddawano działaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM lub H₂O₂ w stężeniu 1 mM przez 24 godziny bądź też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM, po której komórki poddawano działaniu H₂O₂ w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny.

Doświadczenia przeprowadzano zgodnie ze Schematem 5.



Schemat 5. Plan doświadczeń.

Zaobserwowano, że 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM nie indukował eksternalizacji fosfatydyloseryny w komórkach linii HaCaT podczas zastosowanej 24 godzinnej inkubacji (Ryc. 27).

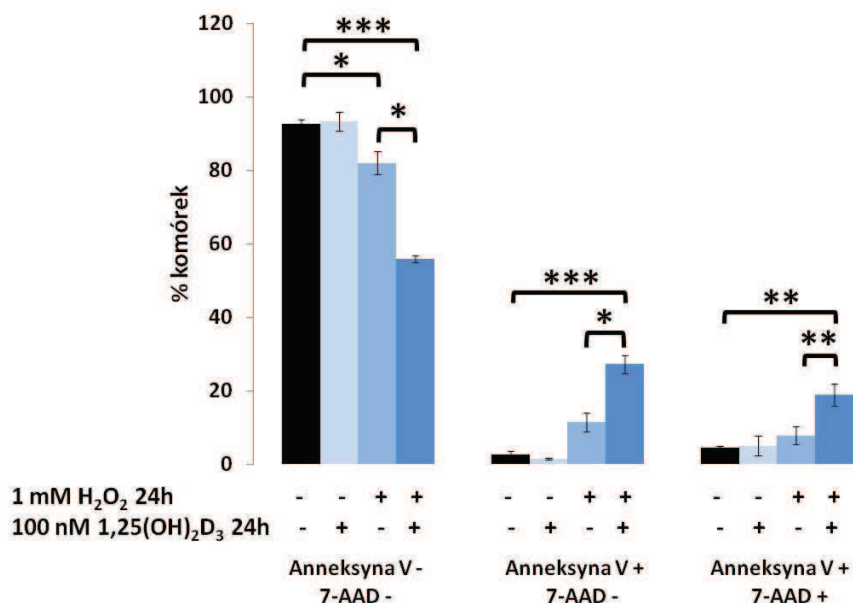


Ryc. 27. Porównanie wpływu nadtlenu wodoru oraz 1,25(OH)₂D₃ na indukcję procesu apoptozy przy pomocy testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Komórki inkubowano z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM bądź z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 5 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniach 0,1 – 5 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu Annexyną V/7-AAD analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów ± SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; **p*<0,05; ***p*<0,01.

Stopień aktywności proapoptotycznej nadtlenu wodoru wzrastał wraz ze wzrostem stężenia substancji. Zauważono również, iż proapoptotyczna aktywność nadtlenu wodoru w stężeniu 2 mM istotnie wzrastała w przypadku komórek poddawanych uprzednio 24 godzinnej inkubacji z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM (Ryc. 27, panel C). W przytoczonym przypadku istotnie spadała ilość komórek tworzących populację „żywą” (7-AAD-, Ann-V-), wzrastała zaś frakcja komórek

późnoapoptotycznych bądź nekrotycznych (7-AAD+, Ann-V+). Efekt ten nie został zaobserwowany dla nadtlenu wodoru w pozostałych stężeniach (0,1, 0,5 lub 5 mM). Należy jednak zauważyć, że w przypadku nadtlenu wodoru w stężeniach 0,1 oraz 0,5 mM nie obserwowano indukcji śmierci komórki niezależnie od tego czy komórki były preinkubowane z 1,25(OH)₂D₃ czy też nie. Natomiast, już sam nadtlenek wodoru w stężeniu 5 mM powodował indukcję śmierci większości komórek (89%), co tłumaczy brak wpływu preinkubacji komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM na jego działanie.

Poniaważ wykazano, że nadtlenek wodoru w stężeniu 2 mM oraz 5 mM indukował śmierć większości keratynocytów linii HaCaT (odpowiednio 88 % i 89 %), kolejne badania wykonano przy nieco obniżonym stężeniu związku, aby uwypuklić potencjalny wpływ preinkubacji z analogami witaminy D. Zbadano więc wpływ 24 godzinnej preinkubacji komórek z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM na proapoptotyczne działanie nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM (Ryc. 28). Odnutowano, że ilość komórek żywych bez oznak indukcji procesu apoptozy malała po 24 godzinnej stymulacji nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM w porównaniu z grupą kontrolną. Efekt ten był jednak zdecydowanie silniejszy w przypadku komórek poddawanych uprzednio 24 godzinnej inkubacji z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM (Ryc. 28). Wzmocniony proapoptotyczny efekt nadtlenu wodoru wyraźnie widoczny był zarówno w populacji komórek wczesnoapoptotycznych, jak i w populacji komórek późnoapoptotycznych bądź nekrotycznych.

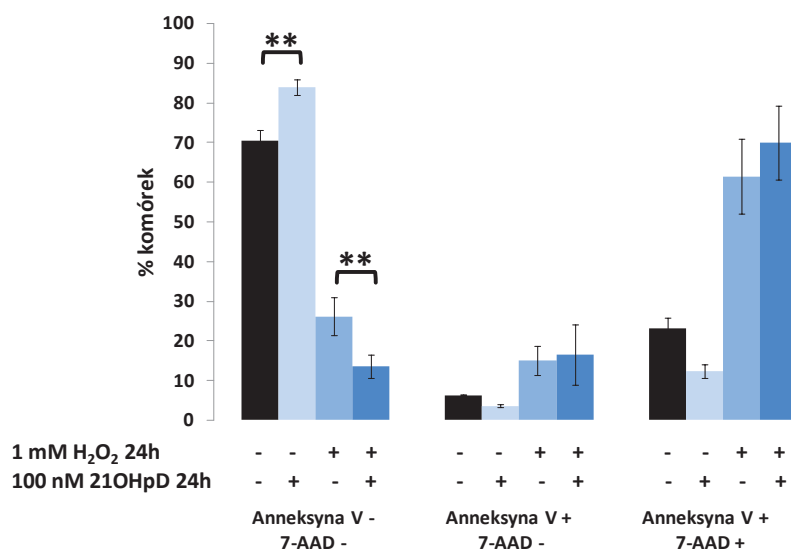


Ryc. 28. Ocena apoptozy przy pomocy testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Komórki inkubowano z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM bądź z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenku wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu Anneksyną V/7-AAD analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zaobserwowane wzmocnienie proapoptotycznych właściwości nadtlenku wodoru poprzez preinkubację komórek z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM spowodowało wykonanie analogicznych doświadczeń z wybraną pochodną witaminy D. Do dalszych doświadczeń wytypowano analog 21OHpD.

Wyniki analizy cytometrycznej wykazały, że ilość komórek żywych bez oznak utraty asymetryczności błony komórkowej istotnie wzrastała pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z analogiem witaminy D – 21OHpD w stężeniu 100 nM w porównaniu z kontrolą (Ryc. 29). Jednocześnie zaobserwowano, że aktywność proapoptotyczna nadtlenku wodoru w stężeniu 1 mM została wzmocniona przez 24 godzinną preinkubację komórek z 21OHpD w stężeniu 100 nM, co zostało

odzwierciedlone w ponad 10% spadku liczebności populacji komórek żywych w porównaniu z komórkami poddawanymi jedynie stymulacji nadtleniem wodoru w stężeniu 1 mM (Ryc. 29). Wzmocniony proapoptotyczny efekt nadtlenu wodoru widoczny był zwłaszcza w populacji komórek późnoapoptotycznych bądź nekrotycznych, jednak nie był to wynik istotny statystycznie.

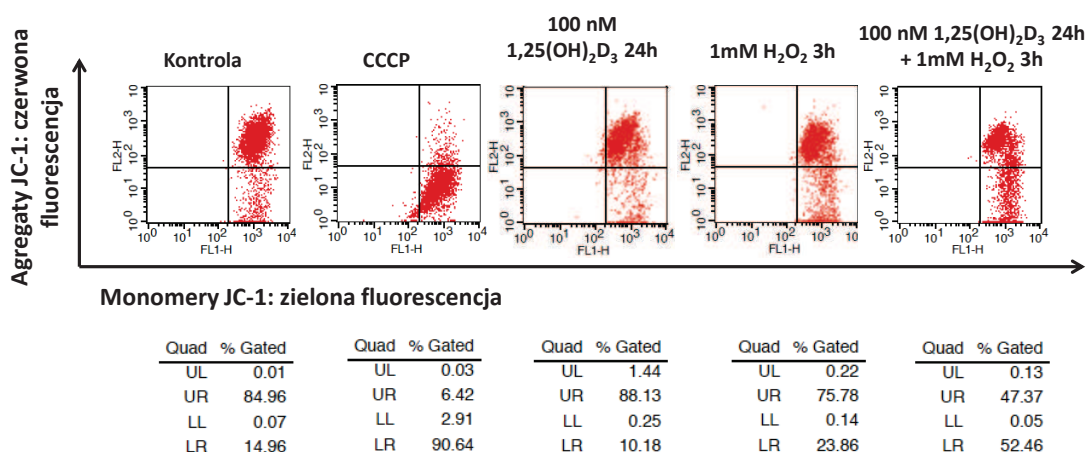


Ryc. 29. Ocena apoptozy przy pomocy testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Komórki inkubowano z 21OHpD w stężeniu 100 nM bądź z nadtleniem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 21OHpD w stężeniu 100 nM, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu Anneksyną V/7-AAD analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; $**p < 0,01$.

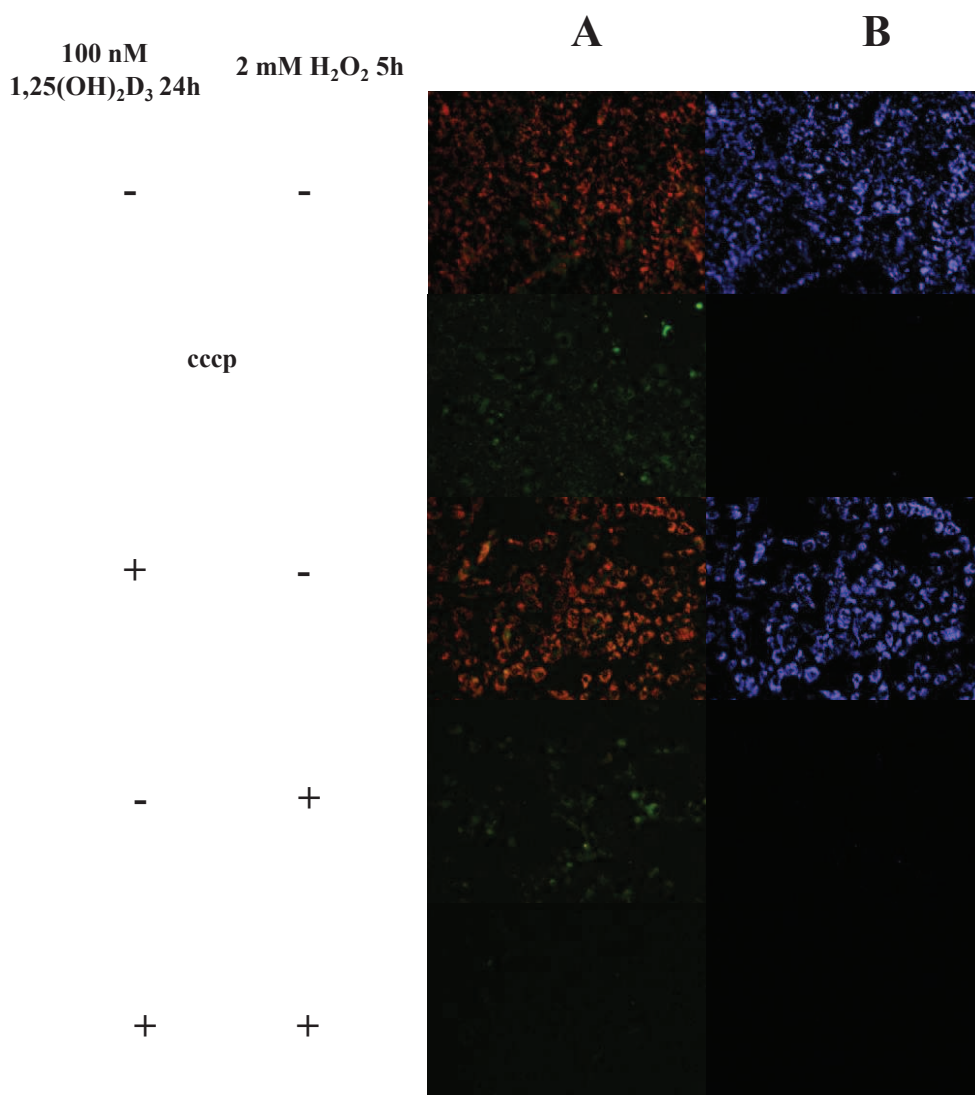
5.4. Analiza zmian potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$

Potencjał błony mitochondrialnej $\Delta\psi$, który jest ważnym parametrem określającym stan funkcjonalny mitochondriów, określono za pomocą cytometrycznej oceny komórek wybarwionych JC-1. Barwnik ten akumuluje i agreguje w

nienaruszonych mitochondriach w sposób zależny od potencjału. Spadek potencjału $\Delta\psi$ może być uznawany za wczesną oznakę wkraczania komórki na ścieżkę apoptozy, której towarzyszą właśnie zmiany w mitochondriach. Ryc. 30 prezentuje reprezentacyjny wynik analizy cytometrycznej, Ryc. 31 przedstawia mikrofotografie z mikroskopu fluorescencyjnego, które stanowią wizualne potwierdzenie wyników uzyskanych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Pozostałe wyniki przedstawiono w formie wykresów słupkowych poniżej.



Ryc. 30. Reprezentacyjny wynik cytometrycznej analizy zmiany potencjału błony mitochondrialnej komórek linii HaCaT z wykorzystaniem barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM lub H₂O₂ w stężeniu 1 mM przez 24 godziny bądź też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM, po której komórki poddawano działaniu H₂O₂ w stężeniu 1 mM.



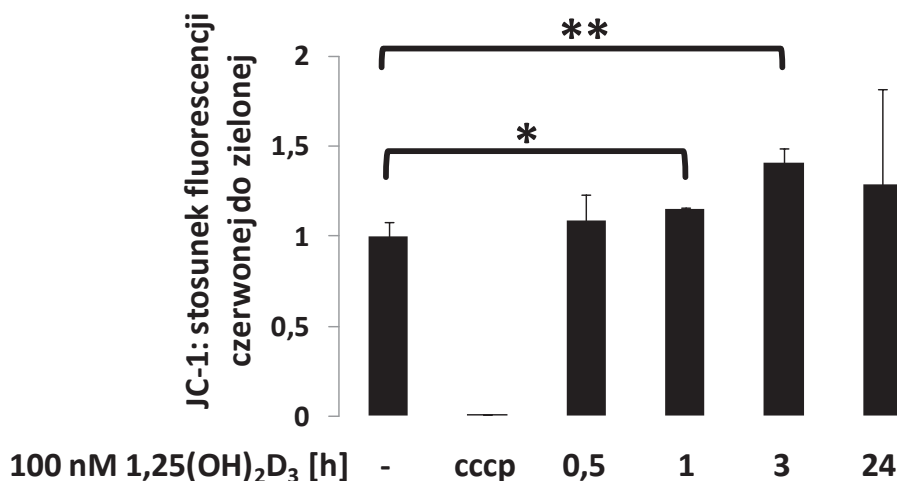
Ryc. 31. Porównanie wpływu preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji komórek z nadtlenkiem wodoru z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 2 mM przez 5 godzin, po czym barwiono JC-1, zdjęcia wykonywano bez utrwalania komórek z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego AxioVert 200. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu 1,25(OH)₂D₃ ani też nadtlenku wodoru, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Mikrofotografie z Panelu A przedstawiają nałożenie fluorescencji czerwonej i zielonej, zaś panel B różnicę fluorescencji czerwonej i zielonej. W ostatnim panelu brak widocznej fluorescencji mimo obecności komórek (1,25(OH)₂D₃+, H₂O₂+). Powiększenie 200x.

5.4.1. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zmiana potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$

Ponieważ doświadczenia przeprowadzone z użyciem testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Wyniki, 5.3) wykazały, że 24 godzinna preinkubacja komórek linii HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM wzmacniała proapoptotyczny efekt wywierany przez nadtlenek wodoru w stężeniu 1 mM, doprowadzając do zwiększenia populacji komórek wczesnoapoptotycznych i późnoapoptotycznych/nekrotycznych o odpowiednio 16 i 11% w stosunku do efektu wywieranego przez sam nadtlenek wodoru, postanowiono zbadać zmianę potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ stosując analogiczne warunki inkubacji jak we wspomnianym powyżej doświadczeniu.

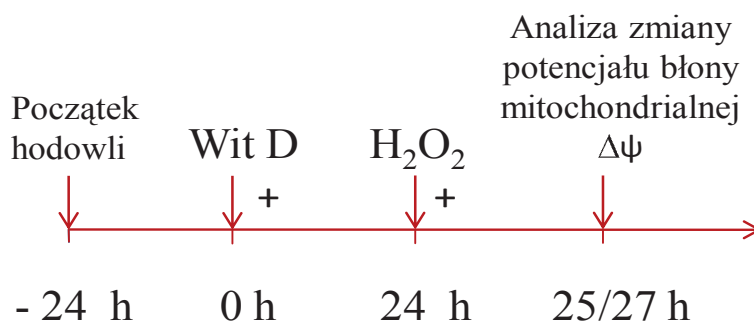
W pierwszym etapie scharakteryzowano wpływ inkubacji komórek linii HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM na potencjał błony mitochondrialnej. W tym celu komórki inkubowano z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM przez 0,5 – 24 godziny. Wyniki analizy przedstawiono na Ryc. 32.

Zaobserwowano, iż potencjał błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ wzrastał w wyniku inkubacji komórek z 1,25(OH)₂D₃ w sposób wprost proporcjonalny do czasu inkubacji. Wzrost potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ istotny statystycznie zauważono po 1 godzinnej (około 15% wzrost) i 3 godzinnej (około 40% wzrost) inkubacji komórek z 1,25(OH)₂D₃. Natomiast po 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM obserwowano jedynie 30% wzrost potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$, jednak wynik ten nie był znamieny statystycznie.



Ryc. 32. Ocena wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na zmianę potencjału błony mitochondrialnej z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przez 0,5 – 24 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu kalcytriolu, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

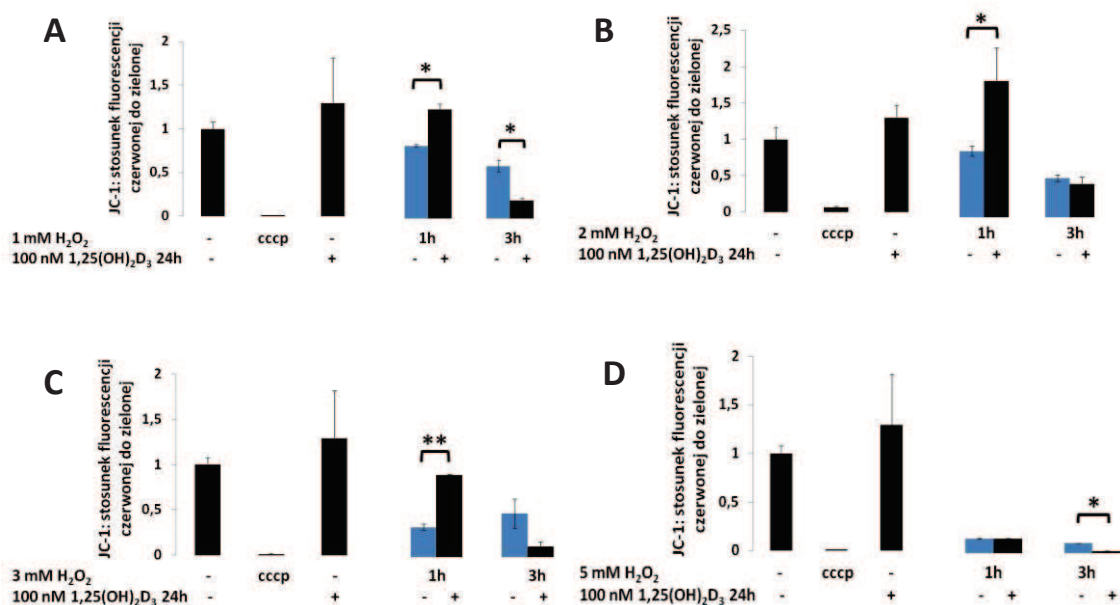
Następnie wykonano doświadczenia mające na celu określenie wpływu preinkubacji komórek linii HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na zmianę potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ pod wpływem inkubacji z nadtlenkiem wodoru, podobnie jak w doświadczeniach z użyciem testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Wyniki, 5.3) stosując 24 godzinową inkubację komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM. Doświadczenia przeprowadzano zgodnie ze Schematem 6. Wyniki przedstawiono na Ryc. 33.



Schemat 6. Plan doświadczeń.

Wykazano, że ekspozycja komórek linii HaCaT przez 1 lub 3 godziny na nadtlenek wodoru w zakresie stężeń 1 – 5 mM prowadziła do depolaryzacji błony mitochondrialnej, sygnalizowanej przez zmianę fluorescencji JC-1 (Ryc. 33). Zaobserwowano też, że fluorescencja JC-1 malała wraz ze wzrostem stężenia nadtlenu wodoru oraz wydłużeniem czasu ekspozycji komórek na jego działanie (Ryc. 33). Co ciekawe, 24 godzinna preinkubacja komórek linii HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM chroniła je przed depolaryzacją błony mitochondrialnej wywoływaną przez 1 godziną inkubację z nadtlenkiem wodoru w stężeniach 1, 2 lub 3 mM (Ryc. 32, panele A, B i C odpowiednio), zaś depolaryzacja błony mitochondrialnej pod wpływem 1 godzinnej inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 3 mM była jedynie nieznaczna w porównaniu z kontrolą (Ryc. 33, panel C). Nie obserwowano natomiast efektu protekcyjnego w analogicznym doświadczeniu z 5 mM nadtlenkiem wodoru, prawdopodobnie dlatego, że przy tym stężeniu dochodziło do zbyt znaczących zmian w mitochondriach, które nie mogły być skompensowane preinkubacją z witaminą D. (Ryc. 33, panel D).

Protekcyjny efekt 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM zanikał, gdy przedłużano inkubację komórek z nadtlenkiem wodoru w zakresie stężeń 1 – 5 mM do 3 godzin. Co więcej, zastosowanie 1,25(OH)₂D₃ doprowadzało do istotnego spadku fluorescencji JC-1 w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu nadtlenu wodoru (Ryc. 33, panele A – D). Efekt ten obserwowano dla wszystkich stężeń nadtlenu wodoru jednak jedynie dla nadtlenu wodoru w stężeniach 1 i 5 mM efekt ten był istotny statystycznie ($p < 0,05$).

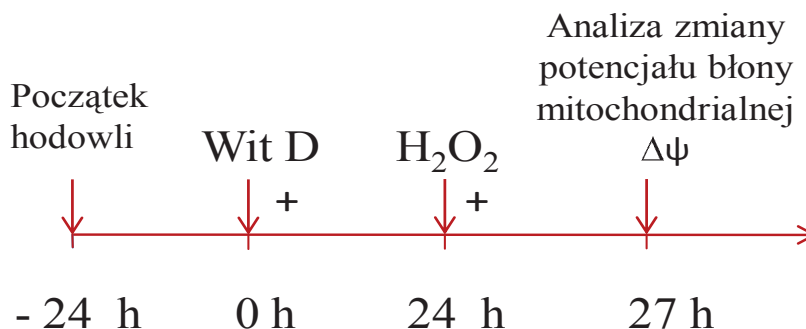


Ryc. 33. Porównanie wpływu preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlakiem wodoru w stężeniach 1 – 5 mM przez 1 i 3 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu 1,25(OH)₂D₃, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów ± SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.4.2. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlaku wodoru. Zmiana potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$

Postanowiono również zbadać wpływ preinkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D – 20OHD₃, 21OHpD oraz z kalcypotriolem na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru. Do

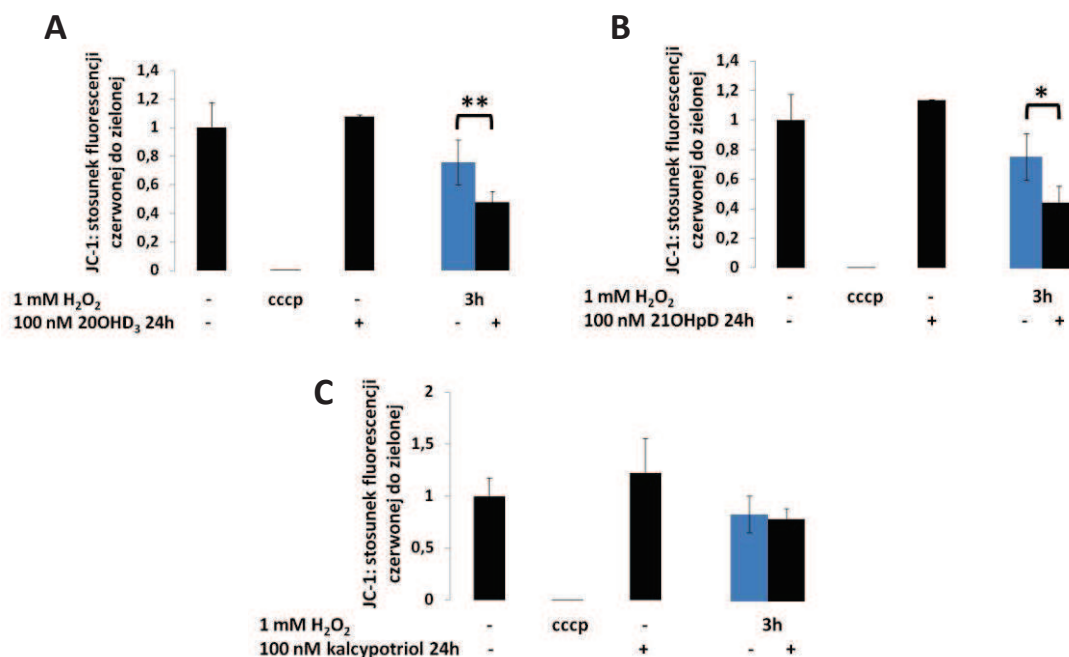
doświadczeń wybrano nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM. Wyniki przedstawiono na Ryc. 34. Doświadczenia przeprowadzano zgodnie ze Schematem 7.



Schemat 7. Plan doświadczeń.

Zaobserwowano podobną zależność wpływu inkubacji komórek HaCaT ze związkami witaminy D jak w przypadku 1,25(OH)₂D₃. 24 godzinna inkubacja komórek z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM powodowała wzrost potencjału błony mitochondrialnej mierzonego przy wykorzystaniu JC-1 (Ryc. 34, panele A – C). Nie był to jednak wynik istotny statystycznie.

Podobnie jak w przypadku 1,25(OH)₂D₃, 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z analogami witaminy D – 20OHD₃ i 21OHpD w stężeniu 100 nM wzmacniała depolaryzację błony mitochondrialnej, wywołaną przez 3 godziną inkubację z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM (Ryc. 34, panele A – B). Nie zaobserwowano natomiast różnicy w stopniu depolaryzacji błony mitochondrialnej pod wpływem 3 godzinnego działania nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM w przypadku komórek HaCaT poddanych 24 godzinnej preinkubacji z kalcypotriolem w stężeniu 100 nM (Ryc. 34, panel C).

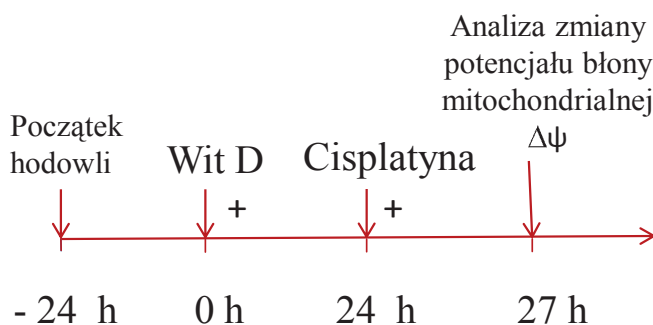


Ryc. 34. Porównanie wpływu preinkubacji z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji komórek z nadtlenkiem wodoru z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu 20OHD₃ (A), 21OHpD (B) lub kalcypotriolu (C) w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 3 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu analogów witaminy D, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.4.3. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ na wrażliwość komórek na działanie cisplatyny. Zmiana potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$

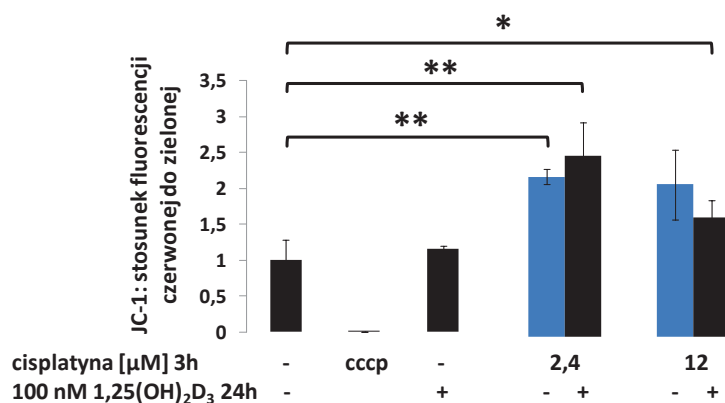
W kolejnym etapie badań postanowiono również zbadać wpływ 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału

błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji komórek z cisplatyną. Doświadczenia przeprowadzono zgodnie ze Schematem 8.



Schemat 8. Plan doświadczeń.

Do doświadczeń wybrano początkowo dwa stężenia cisplatyny: 2,4 oraz 12 μM . Komórki inkubowano z cisplatyną przez 3 godziny. Wyniki przedstawiono na Ryc. 35.



Ryc. 35. Ocena wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem działania cisplatyny z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z cisplatyną w stężeniach 2,4 - 12 μM przez 3 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu kalcytriolu, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

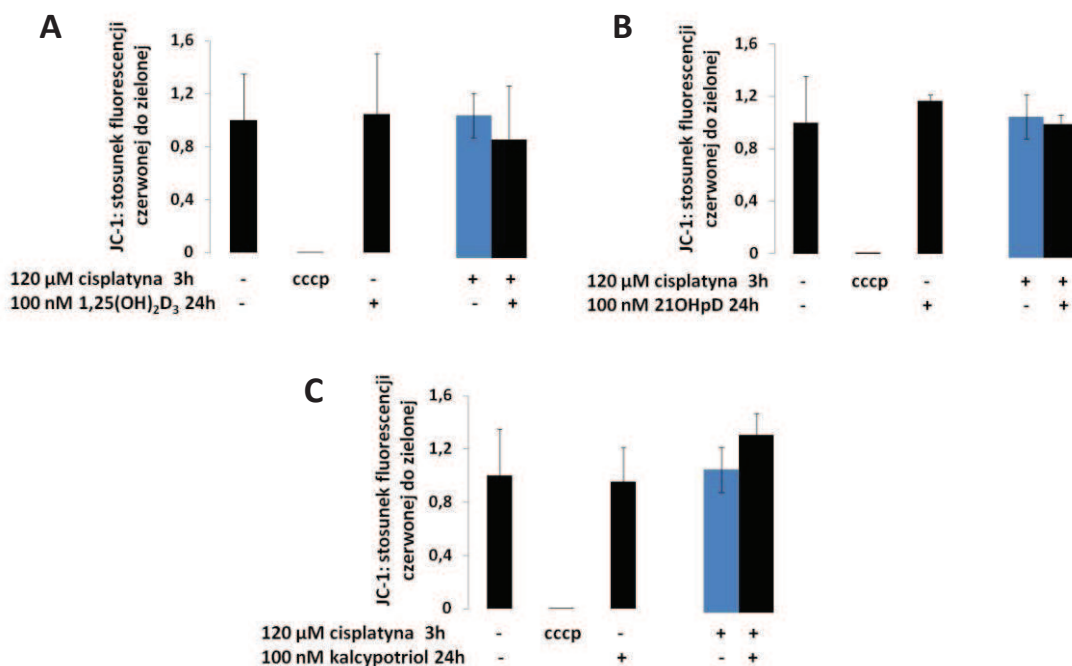
Zaobserwowano, że 3 godzinna inkubacja komórek HaCaT z cisplatyną w stężeniu 2,4 μM powodowała wzrost potencjału błony mitochondrialnej mierzonego z wykorzystaniem JC-1 ($p < 0,01$). Podobną tendencję obserwowano podczas 3 godzinnej inkubacji komórek z cisplatyną w stężeniu 12 μM , jednak wynik ten nie był istotny statystycznie. Nie zaobserwowano również istotnego statystycznie wpływu 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem 3 godzinnej inkubacji z cisplatyną w stężeniach 2,4 i 12 μM , choć w przypadku 3 godzinnej inkubacji komórek z cisplatyną w stężeniu 2,4 μM odnotowano wzrost potencjału błony mitochondrialnej w próbach traktowanych uprzednio $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu samej cisplatyny. Odwrotny zaś efekt obserwowano w przypadku wyższego stężenia cisplatyny. Komórki HaCaT poddawane 24 godzinnej preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM, a następnie 3 godzinnej inkubacji z cisplatyną w stężeniu 12 μM , wykazywały obniżony potencjał błony mitochondrialnej w porównaniu z próbami inkubowanymi jedynie z cisplatyną.

5.4.4. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie cisplatyny. Zmiana potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$

Z uwagi na niewielki wpływ niskich stężeń cisplatyny, w kolejnych doświadczeniach postanowiono zwiększyć jej stężenie do 120 μM , zachowując jednocześnie 3 godzinny czas inkubacji. Dodatkowo do doświadczeń włączono dwa analogi witaminy D – 21OHpD oraz kalcypotriol.

Zaobserwowano, że 3 godzinna inkubacja komórek HaCaT z cisplatyną w stężeniu 120 μM nie zmieniała potencjału błony mitochondrialnej w porównaniu z kontrolą (Ryc. 36). Nie odnotowano istotnego statystycznie wpływu 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Ryc. 36, panel A), 21OHpD (Ryc. 36, panel B) oraz kalcypotriolem w stężeniu 100 nM (Ryc. 36, panel C) na zmianę potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ pod wpływem 3 godzinnego

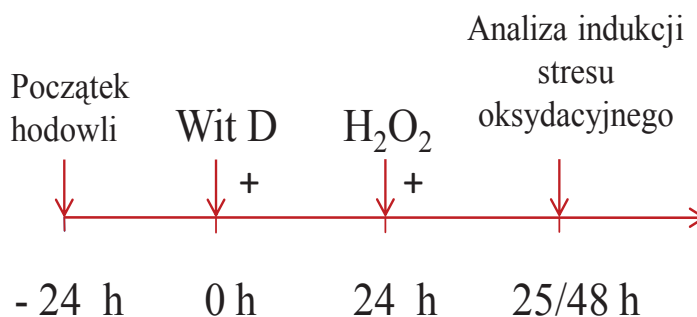
działania cisplatyny w stężeniu 120 μM . Być może wydłużenie czasu inkubacji mogłoby wpłynąć istotnie na zmianę potencjału błony mitochondrialnej.



Ryc. 36. Porównanie wpływu preinkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji z cisplatyną z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu 20OHD3 (A), 21OHpD (B) lub kalcyptriolu (C) w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z cisplatyną w stężeniu 120 μM przez 3 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu analogów witaminy D, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.5. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Indukcja stresu oksydacyjnego

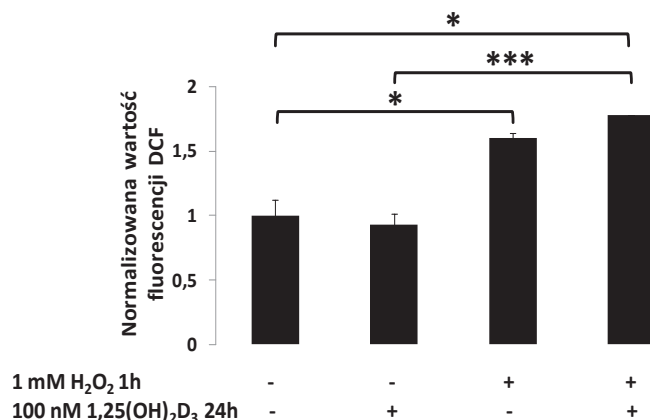
Ponieważ doświadczenia przeprowadzone z użyciem testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Wyniki, 5.3) wykazały, że 24 godzinna preinkubacja komórek linii HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM wzmacniała proapoptotyczny efekt wywierany przez nadtlenek wodoru w stężeniu 1 mM oraz doprowadzała do istotnie nasilonej depolaryzacji błony mitochondrialnej w porównaniu z próbami poddawanych jedynie działaniu nadtlenu wodoru (Wyniki, 5.4.1), postanowiono zbadać czy obserwowane zależności wynikają z nasilonej produkcji reaktywnych form tlenu w komórkach HaCaT we wspomnianych warunkach. W tym celu wykonano cytometryczny pomiar fluorescencji emitowanej przez komórki wyznakowane 2',7' – dwuocetanem dichlorofluoresceiny (H_2DCFDA). Wyniki pomiarów fluorescencji przedstawiono w formie wykresów słupkowych, normalizując dane w stosunku do kontroli, dla której wartość emitowanej fluorescencji określono jako 1,0. Doświadczenia przeprowadzano zgodnie ze Schematem 9.



Schemat 9. Plan doświadczeń.

Zaobserwowano, że 24 godzinna inkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM w nieznaczny sposób obniżała produkcję reaktywnych form tlenu (8% spadek) przez komórki, nie był to jednak wynik istotny statystycznie (Ryc. 37). Produkcja reaktywnych form tlenu w komórkach HaCaT wzrastała natomiast o około 60% w stosunku do kontroli pod wpływem 1 godzinnej inkubacji z nadtlenkiem wodoru

w stężeniu 1 mM ($p < 0,05$). Zauważono, iż 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM doprowadzała do wzrostu produkcji reaktywnych form tlenu przez komórki pod wpływem 1 godzinnej inkubacji z nadtlentkiem wodoru w stężeniu 1 mM w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu nadtlentku wodoru. Wynik ten jednak nie był istotny statystycznie ($p = 0,07$).

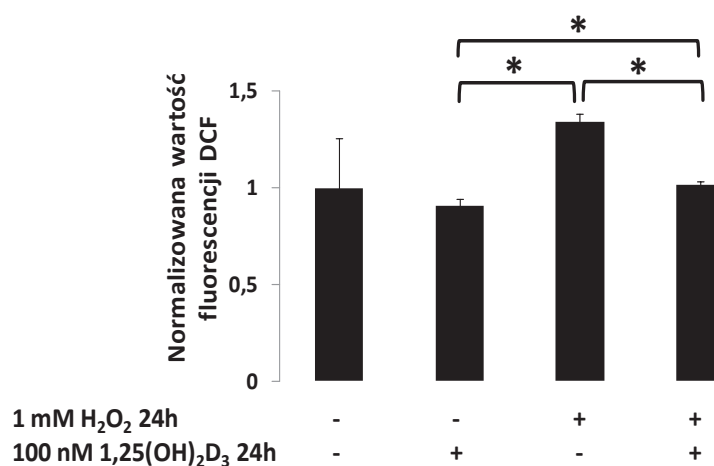


Ryc. 37. Wpływ preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM na powstawanie reaktywnych form tlenu w komórkach HaCaT pod wpływem inkubacji komórek z nadtlentkiem wodoru. Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlentkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 1 godzinę, po czym barwiono H_2DCFDA i analizowano cytometrycznie. Kontrolę stanowiły komórki niepoddawane działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ani też nadtlentku wodoru. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD normalizowane względem kontroli. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

W kolejnym etapie doświadczeń postanowiono wydłużyć czas ekspozycji komórek HaCaT na działanie nadtlentku wodoru w stężeniu 1 mM do 24 godzin (Ryc. 38). Ponownie zaobserwowano wzrost produkcji reaktywnych form tlenu w komórkach HaCaT pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z nadtlentkiem wodoru w stężeniu 1 mM w odniesieniu do kontroli, choć wynik ten nie był istotny statystycznie. Zaobserwowany

wzrost produkcji reaktywnych form tlenu w komórkach HaCaT pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM był jednak mniejszy w porównaniu z wzrostem indukowanym przez nadtlenek wodoru w tym samym stężeniu w czasie 1 godzinnej inkubacji, bo wynosił jedynie około 30% (Ryc. 38).

Odmienne skutki natomiast wywierała 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM na efekt powodowany przez nadtlenek wodoru w stężeniu 1 mM w czasie wydłużonej, bo 24 godzinnej, inkubacji komórek. Zastosowanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ doprowadzało do spadku wartości fluorescencji DCF w porównaniu z próbami poddawanymi jedynie działaniu nadtlenku wodoru ($p < 0,05$). Jednocześnie wartość fluorescencji DCF w omawianych próbach była istotnie wyższa niż w próbach poddawanych jedynie 24 godzinnemu działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM ($p < 0,05$).



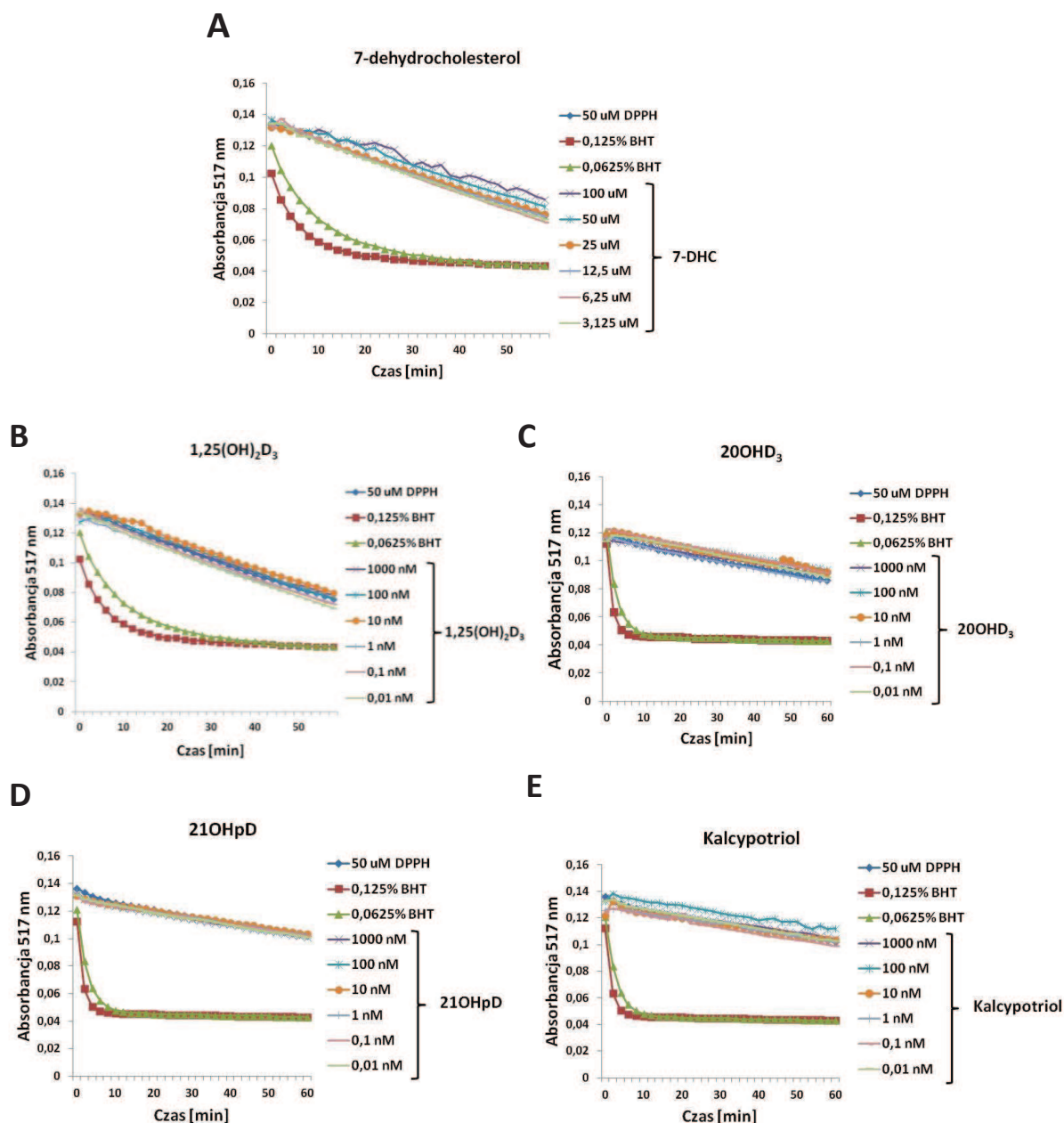
Ryc. 38. Wpływ preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM na powstawanie reaktywnych form tlenu w komórkach HaCaT pod wpływem inkubacji komórek nadtlenkiem wodoru. Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny, po czym barwiono H_2DCFDA i analizowano cytometrycznie. Kontrolę stanowiły komórki niepoddawane działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ani też nadtlenku wodoru. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD normalizowane względem kontroli. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; $*p < 0,05$.

5.6. Analiza wymiatania wolnego rodnika DPPH[•]

Wyniki pomiarów fluorescencji DCF wykazały, że 24 godzinna inkubacja komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM obniżała produkcję reaktywnych form tlenu przez komórki o około 8% w stosunku do kontroli (Wyniki, 5.5, Ryc. 37 oraz 38). Mimo, że nie był to wynik znamieny statystycznie postanowiono zbadać potencjał antyoksydacyjny analogów witaminy D oraz ich prekursora – 7-dehydrocholesterolu.

W tym celu wykorzystano metodę obrazującą zdolność badanych związków do zmiatania wolnego rodnika DPPH[•] (1,1-difenylo-2-pikrylhydrazyl). Polega ona na użyciu stabilnego rodnika DPPH[•], czynnika utleniającego, którego redukcję można mierzyć spektrofotometrycznie. W doświadczeniach zastosowano roztwory BHT (butylowany hydroksytoluen), standardowego antyoksydanta, jako kontrolę pozytywną. Wyniki zdolności zmiatania wolnego rodnika DPPH[•] przedstawiono na Ryc. 39.

Podczas pomiaru spektrofotometrycznego trwającego 60 minut nie zaobserwowano efektywnego zmiatania wolnego rodnika DPPH[•] przez zastosowane związki: 7-dehydrocholesterol w zakresie stężeń 3 – 100 μM (Ryc. 39, panel A) oraz analogi witaminy D w zakresie stężeń 0,01 – 1000 nM (1,25(OH)₂D₃, 20OHD₃, 21OHpD oraz kalcypotriol, Ryc. 39, panele B, C, D i E odpowiednio). Wraz z wydłużaniem czasu inkubacji obserwowano natomiast spontaniczne wygaszanie fluorescencji DPPH[•], jednocześnie odnotowano wymiatanie DPPH[•] przez BHT.

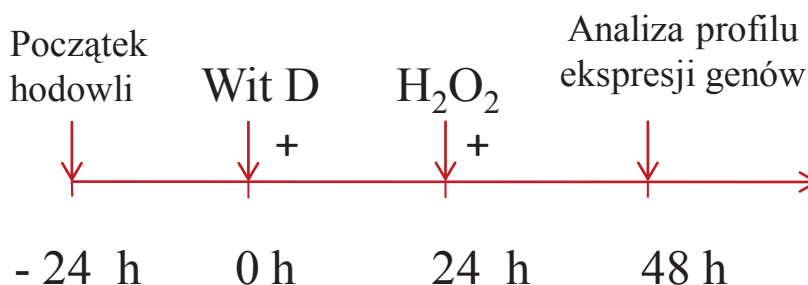


Ryc. 39. Ocena zdolności prekursora witaminy D (A) oraz analogów witaminy D (1,25(OH)₂D₃ (B), 20OHD₃ (C), 21OHpD (D), kalcypotriol (E)) do zmiatania wolnego rodnika DPPH. Związki rozcieńczano seryjnie w 96% etanolu i inkubowano z roztworem DPPH w stężeniu 50 μM. Mierzono absorbancję przy długości fali 517 nm. Etanolowy roztwór BHT zastosowano jako kontrolę o właściwościach antyoksydacyjnych.

5.7. Profil ekspresji genów

Klasyczny model działania witaminy D polega na aktywacji receptora VDR i zmianie ekspresji setek genów, dzięki czemu witamina D może regulować szereg procesów takich jak różnicowanie się komórek czy działanie układu immunologicznego.

Dlatego też, dokonano oceny wpływu analogów witaminy D oraz nadtlenu wodoru na ekspresję genów związanych z syntezą oraz metabolizmem reaktywnych form tlenu, jak również genów związanych z aktywnością i metabolizmem witaminy D. Badania przeprowadzono analogicznie do opisanych powyżej, stosując preinkubację komórek HaCaT z analogami witaminy D, a następnie poddając te komórki działaniu nadtlenu wodoru (Schemat 10). Zmiany w poziomie mRNA dla badanych genów analizowano za pomocą reakcji PCR czasu rzeczywistego. W doświadczeniach wykorzystano wszystkie cztery badane analogi witaminy D, tj. 1,25(OH)₂D₃, 20OHD₃, 21OHpD oraz kalcypotriol.



Schemat 10. Plan doświadczeń.

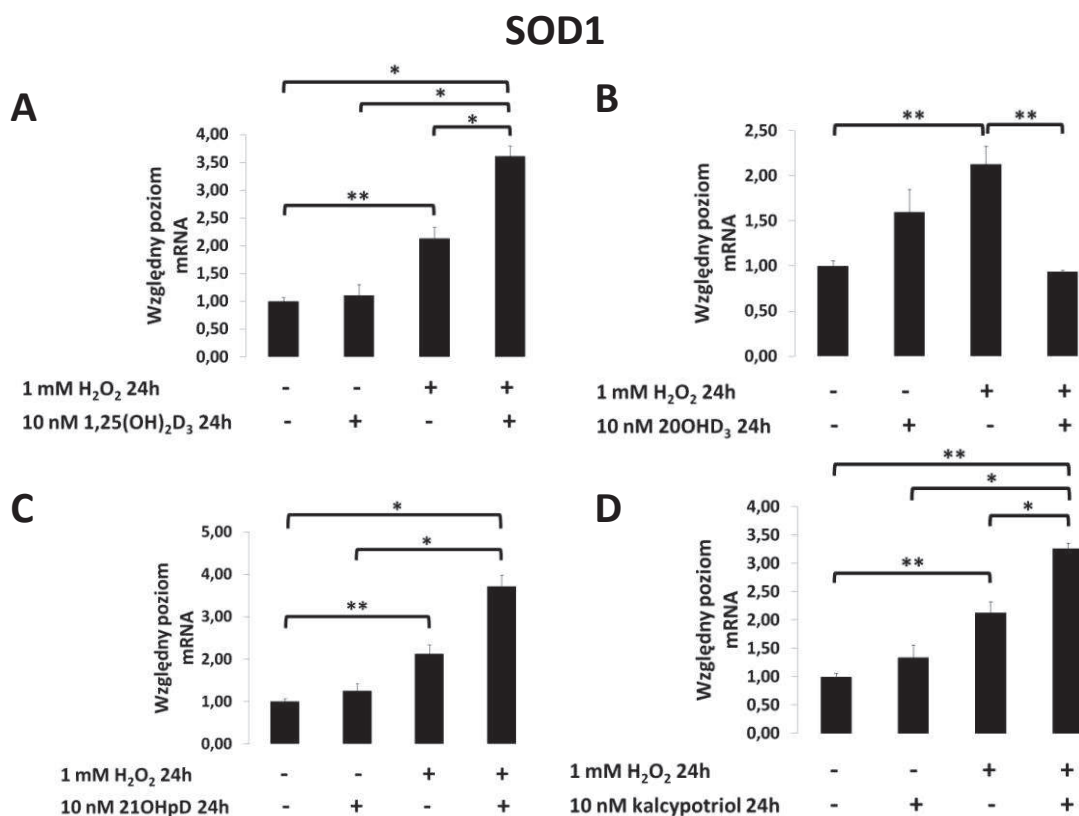
5.7.1. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów HaCaT z analogami witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Profil ekspresji genów aktywowanych przez RFT

W przeprowadzonych doświadczeniach oceniano zarówno wpływ 24 godzinnej inkubacji keratynocytów z analogami witaminy D (10 nM) lub nadtlenu wodoru (1mM), jaki i wpływ jaki miała 24 godzinna preinkubacja komórek z analogami

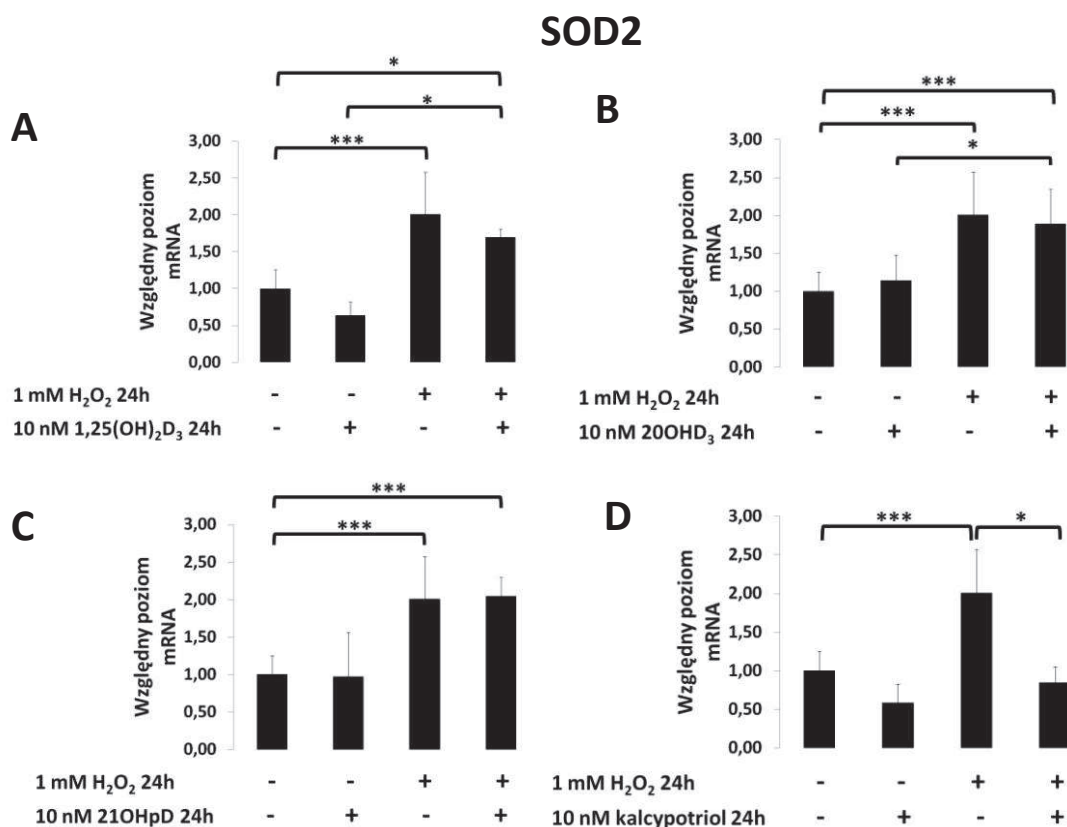
witaminy D (10 nM) na działanie nadtlenu wodoru. Wyniki zaprezentowano na Ryc. 40 – 42 w formie wykresów słupkowych, przedstawiając relatywną zmianę poziomu mRNA wybranego genu w odniesieniu do kontroli, dla której przyjęto wartość 1,0.

Zastosowanie 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D stosowanymi w stężeniu 10 nM poprzedzającej właściwą 24 godzinną inkubację komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniu 1 mM powodowało istotny statystycznie wzrost poziomu mRNA genu *SOD1* zarówno w porównaniu z próbami poddawanymi wyłącznie działaniu wybranego analogu witaminy D, jak i w odniesieniu do prób traktowanych wyłącznie nadtlaniem wodoru. Porównanie wyników wykazało statystyczne różnice pomiędzy wszystkimi badanymi grupami dla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Ryc. 40, panel A) oraz kalcypotriolu (Ryc. 40, panel D). Podobną tendencję obserwowano dla analogu 21OHpD , jednakże wynik ten nie był istotny statystycznie w odniesieniu do prób stymulowanych wyłącznie nadtlaniem wodoru (Ryc. 40, panel C). Natomiast w przypadku mitochondrialnej izofory dysmutazy ponadtlenkowej (*SOD2*), obserwowano podwyższenie poziomu mRNA pod wpływem nadtlenu wodoru, natomiast 24 godzinna preinkubacja z analogami witaminy nie miała zasadniczego wpływu na ten poziom. Tylko w przypadku zastosowania 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z kalcypotriolem D stosowanym w stężeniu 10 nM wykazano istotny statystycznie spadek poziomu mRNA genu *SOD2* pod wpływem następującej kolejno 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniu 1 mM w odniesieniu do prób traktowanych wyłącznie nadtlaniem wodoru ($p < 0,05$); (Ryc. 41, panel D).

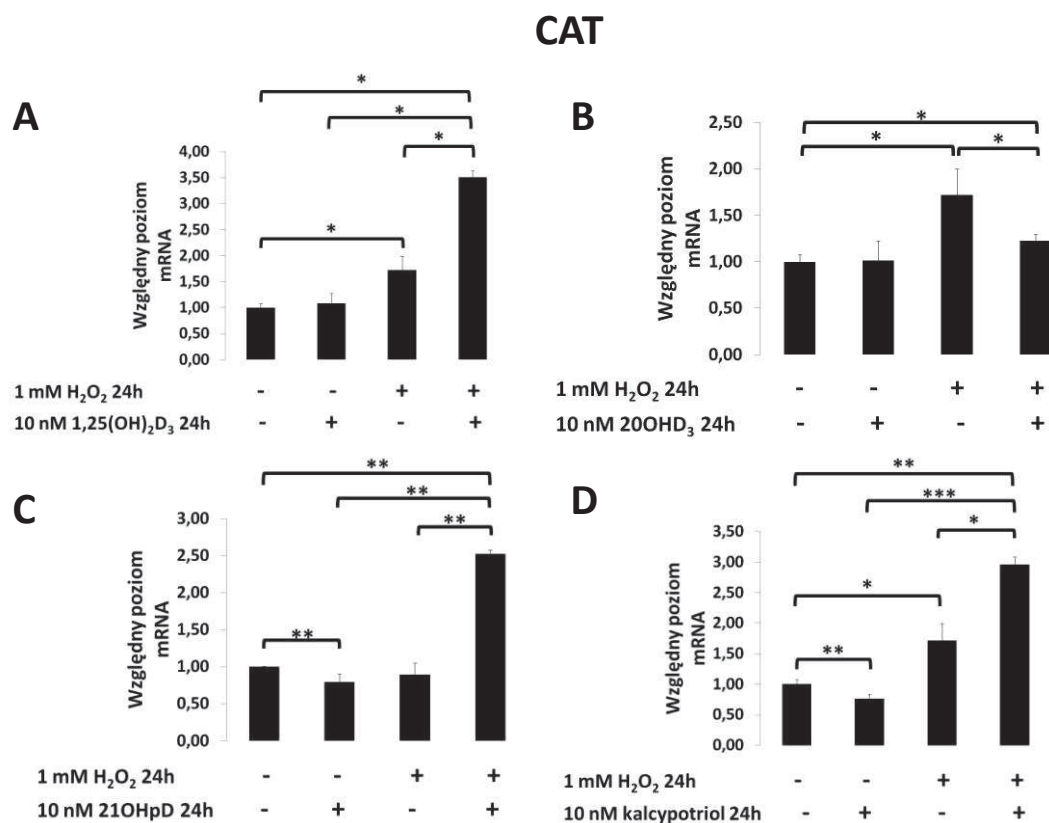
W przypadku genu *CAT* zaobserwowano istotnie wyższy poziom mRNA tego genu w próbach poddawanych 24 godzinnej preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 21OHpD albo z kalcypotriolem, stosowanymi w stężeniu 10 nM, po której następowała 24 godzinna inkubacja z nadtlaniem wodoru w stężeniu 1 mM, w porównaniu z próbami stymulowanymi przez 24 godziny wyłącznie wybranym analogiem witaminy D albo wyłącznie nadtlaniem wodoru. (Ryc. 42, panele A, C i D). Co ciekawe, w przypadku, gdy komórki HaCaT były inkubowane z kalcypotriolem bądź z 21OHpD przez 24 godziny, obserwowano spadek poziomu mRNA *CAT* (Ryc. 42, panele C i D).



Ryc. 40. Porównanie poziomu mRNA genu *SOD1* w linii komórkowej *HaCaT* poddawanej preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHPD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach ± SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego *RPL37A*. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.



Ryc. 41. Porównanie poziomu mRNA genu *SOD2* w linii komórkowej *HaCaT* poddawanej preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach ± SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego *RPL37A*. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.



Ryc. 42. Porównanie poziomu mRNA genu CAT w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHPD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach ± SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

5.7.2. Ocena wpływu preinkubacji keratynocytów linii HaCaT na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Profil ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D

Określając wpływ analogów witaminy D, jak również wpływ nadtlenu wodoru, którego działanie poprzedzała preinkubacja komórek z analogami witaminy D, na profil ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D, posłużono się analogicznymi warunkami doświadczalnymi jak poprzednio (Wyniki, 5.7.1), tj. zastosowano 24 godzinną inkubację komórek HaCaT z analogami witaminy D w stężeniu 10 nM, po której następowała 24 godzinna inkubacja komórek z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM. Wyniki zaprezentowano na Ryc. 43 – 47 w formie wykresów słupkowych, przedstawiając relatywną zmianę poziomu mRNA wybranego genu w odniesieniu do kontroli, dla której przyjęto wartość 1,0.

Zaobserwowano, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z analogami witaminy D w stężeniu 10 nM, po której następowała 24 godzinna inkubacja komórek z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM, istotnie indukowała wzrost poziomu mRNA genu *PDI43* w przypadku 21OHpD, zarówno w porównaniu z próbami traktowanymi jedynie 21OHpD, jak i w odniesieniu do prób traktowanych wyłącznie nadtlakiem wodoru ($p < 0,05$); (Ryc. 47, panel C). Podobną tendencję obserwowano w przypadku analogu 20OHD₃ oraz kalcypotriolu, jednak wyniki te nie były istotne statystycznie.

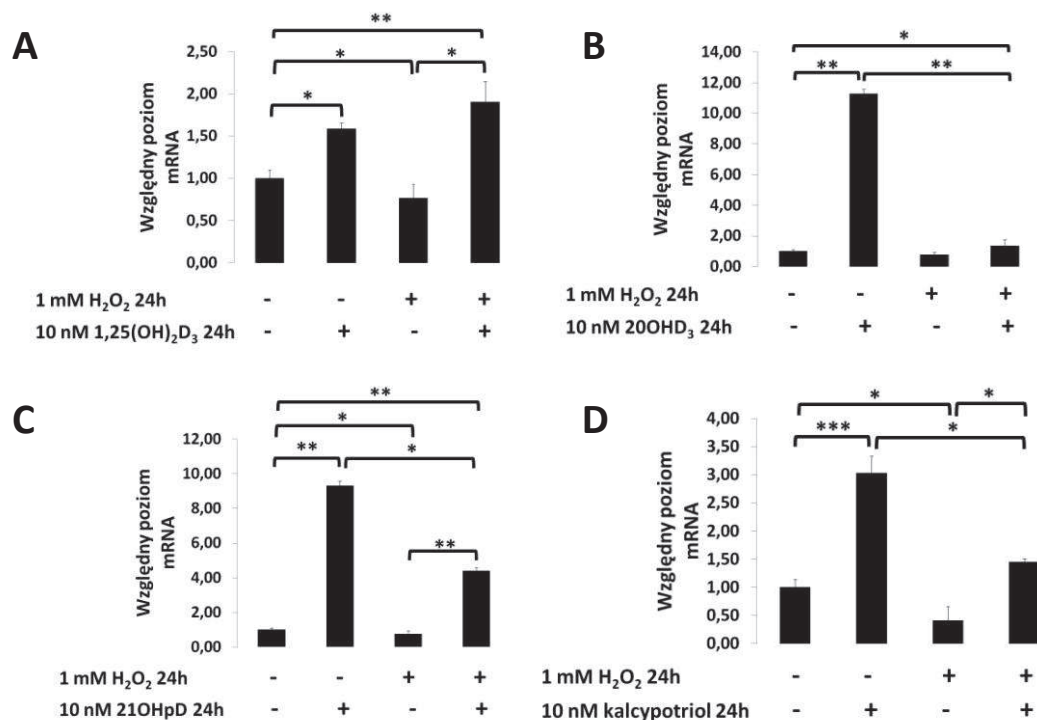
Dwudziestoczwierogodzinna preinkubacja komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ albo kalcypotriolem, prowadziła od zwiększenia poziomu mRNA genu *CYP27B1* w komórkach poddanych działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godzinny. Obserwowany wzrost był statystycznie istotny w w porównaniu z próbami traktowanymi każdą z tych substancji z osobna ($p < 0,05$ w obu przypadkach); (Ryc. 45, panele A i D). Podobną tendencję obserwowano również w przypadku analogu 21OHpD, jednak wynik ten był istotny statystycznie jedynie w odniesieniu do prób traktowanych wyłącznie analogiem 21OHpD, nie zaś w odniesieniu do prób traktowanych jedynie nadtlakiem wodoru (Ryc. 45, panel C).

Poprzedzenie 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1mM trwającą 24 godziny preinkubacją komórek z analogami witaminy D w stężeniu 10 nM powodowało istotny wzrost poziomu mRNA genu *CYP3A4* w

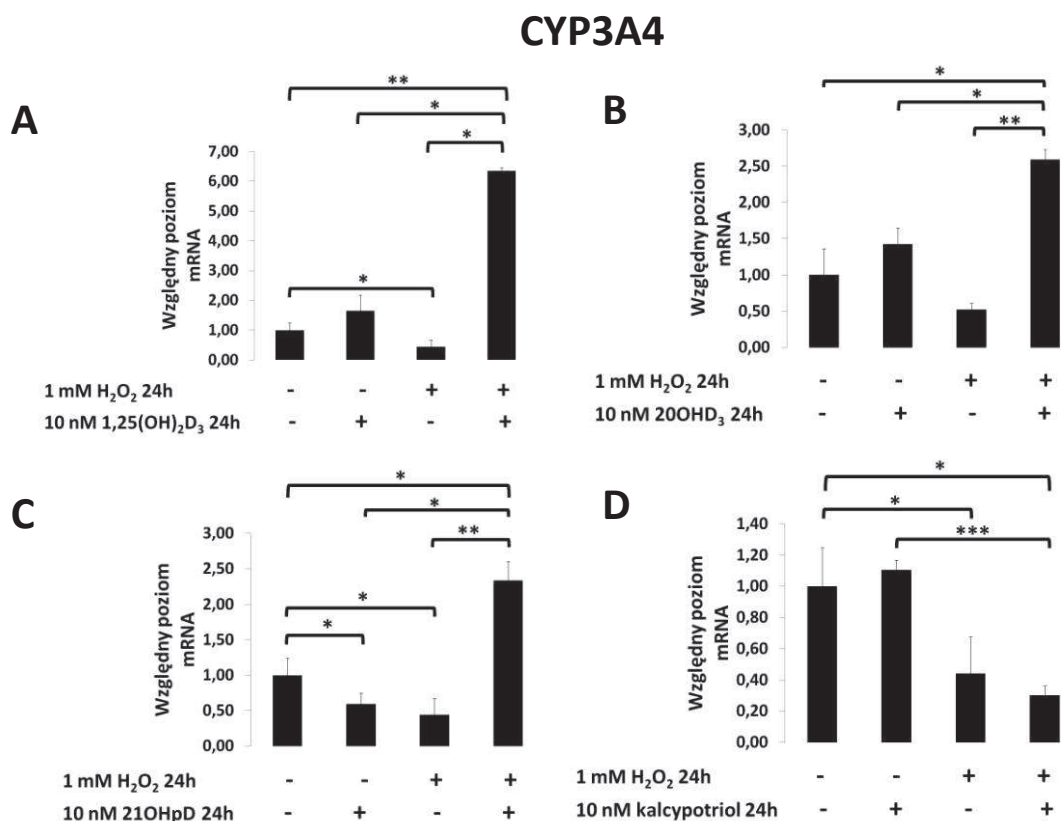
przypadku $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Ryc. 44, panel A), 20OHD_3 (Ryc. 44, panel B) albo 21OHpD (Ryc. 44, panel C) w porównaniu z próbami traktowanymi wyłącznie samym analogiem albo wyłącznie nadtleniem wodoru ($p < 0,05$ dla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; $p < 0,05$ w porównaniu z próbami traktowanymi jedynie analogami witaminy D i $p < 0,01$ w porównaniu z próbami traktowanymi jedynie nadtleniem wodoru w przypadku 20OHD_3 albo 21OHpD).

Nie zaobserwowano natomiast wzmocnienia indukcji mRNA genów *CYP24A1* oraz *VDR* poprzez 24 godzinną preinkubację komórek HaCaT z analogami witaminy D, po której następowała 24 godzinna ekspozycja komórek na działanie nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM, w odniesieniu do prób inkubowanych wyłącznie z wybranym analogiem witaminy D albo wyłącznie z nadtleniem wodoru (Ryc. 46 oraz 43), choć w przypadku mRNA genu *VDR* w omówionych warunkach zaobserwowano pewną tendencję wzrostową w przypadku zastosowania $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Ryc. 43, panel A).

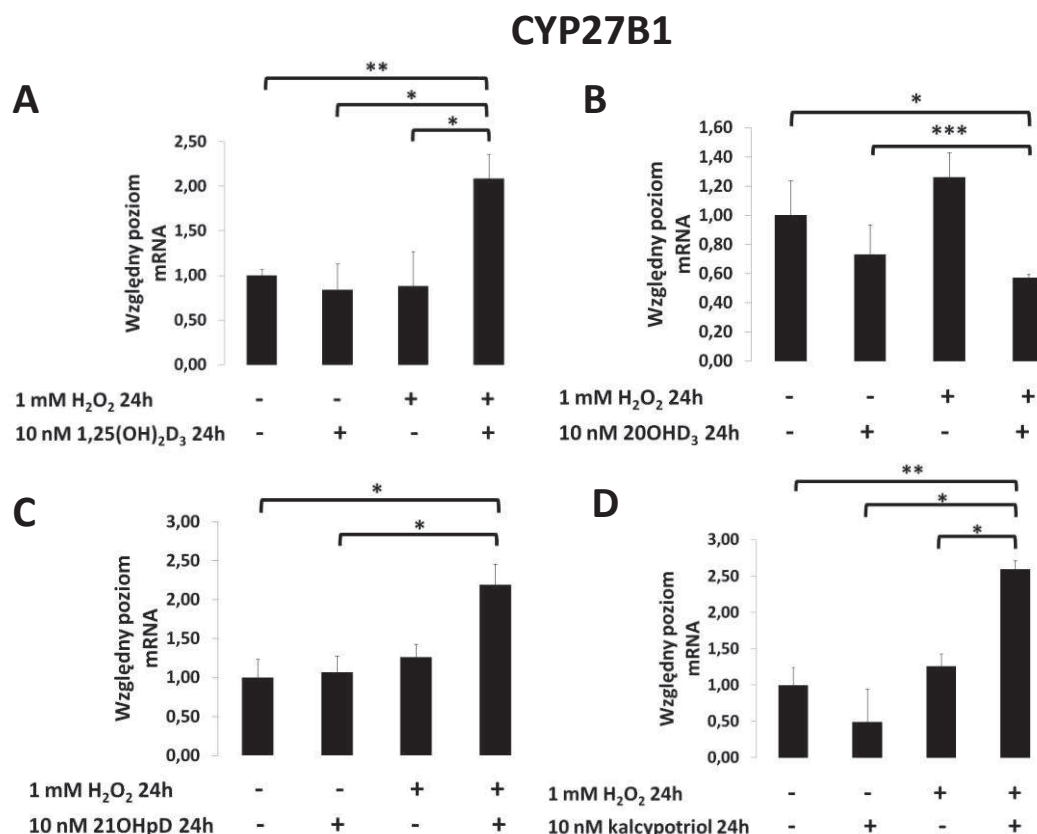
VDR



Ryc. 43. Porównanie poziomu mRNA genu VDR w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach $\pm$ SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

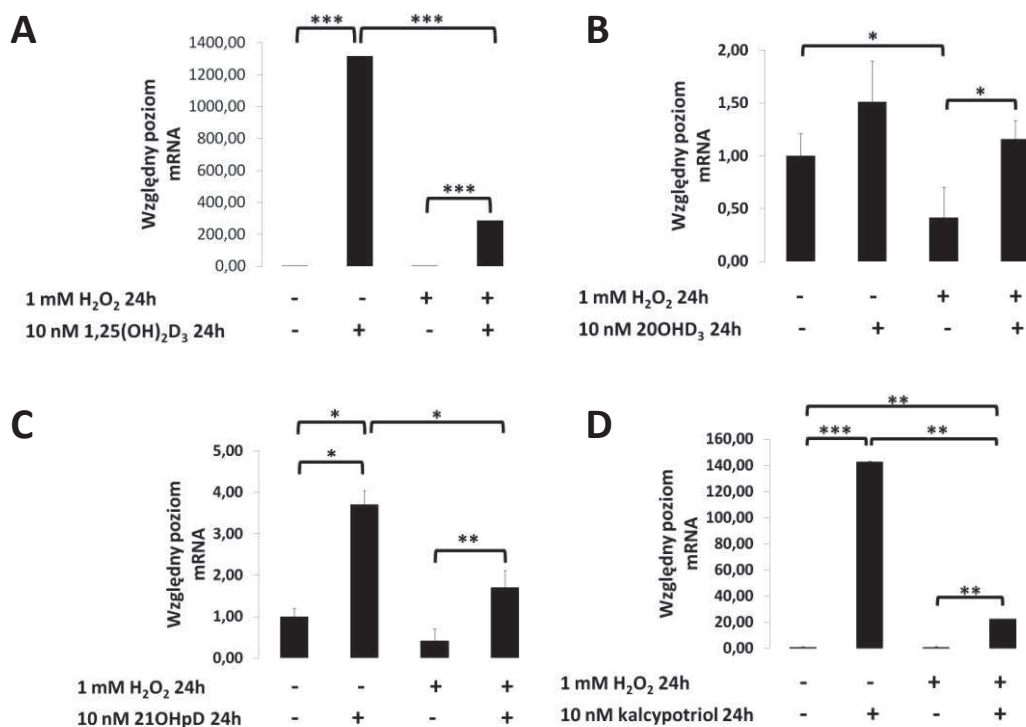


Ryc. 44. Porównanie poziomu mRNA genu CYP3A4 w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach $\pm$ SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

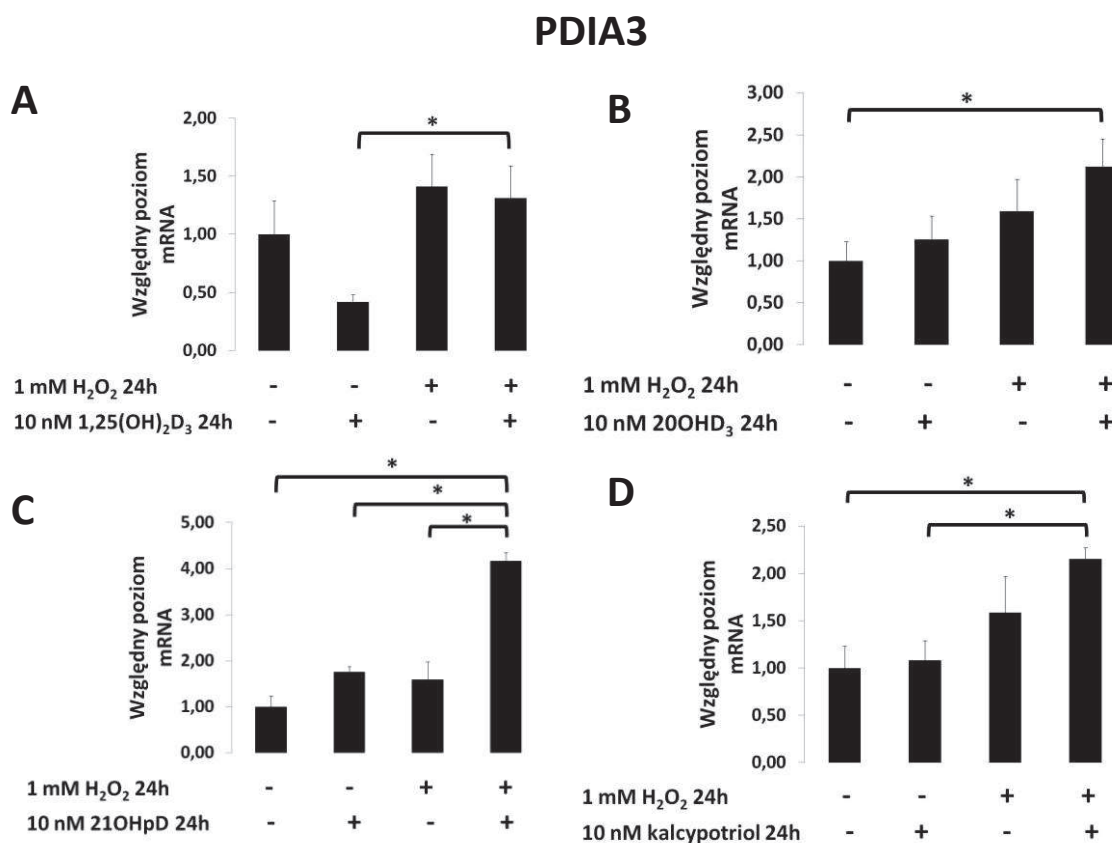


Ryc. 45. Porównanie poziomu mRNA genu CYP27B1 w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach $\pm$ SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

CYP24A1



Ryc. 46. Porównanie poziomu mRNA genu CYP24A1 w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach $\pm$ SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

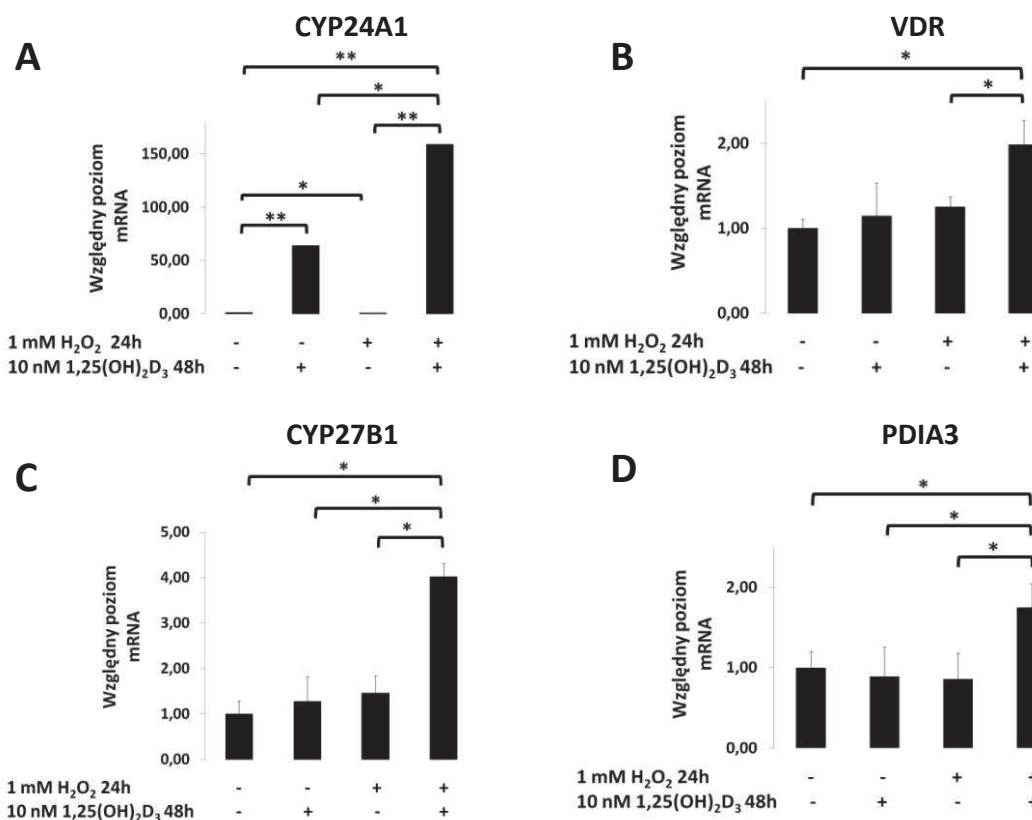


Ryc. 47. Porównanie poziomu mRNA genu *PDIA3* w linii komórkowej *HaCaT* poddawanej preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach ± SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego *RPL37A*. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

5.7.3. Ocena wpływu 48 godzinnej inkubacji keratynocytów linii HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru. Profil ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D

Przeprowadzona analiza profilu ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D wykazała istotny statystycznie wpływ 24-godzinnej preinkubacji z analogami witaminy D (10 nM) na poziom mRNA dla tych genów w komórkach HaCaT poddanych działaniu nadtlenu wodoru (1 mM) przez 24 godziny. (Wyniki, 5.7.2, Ryc. 43, 45 – 47, panele A). Biorąc pod uwagę założenia opisanych doświadczeń, nie można było jednak jednoznacznie stwierdzić, czy obserwowany efekt wynikał z rzeczywistej zmiany ekspresji genów pod wpływem nadtlenu wodoru, czy też spowodowany był spadkiem ekspresji po 48 godzinach inkubacji. W doświadczeniach opisanych w poprzednim punkcie (Wyniki, 5.7.2) porównywano bowiem poziom mRNA w komórkach HaCaT inkubowanych przez 24 godziny z analogami witaminy D, do poziomu mRNA w komórkach preinkubowanych przez 24 godziny z analogami witaminy D a następnie inkubowanymi z nadtlakiem wodoru przez kolejne 24 godziny (razem 48 godzin po dodaniu analogów witaminy D). W celu wyjaśnienia zaistniałych wątpliwości zaplanowano doświadczenia, w których komórki HaCaT inkubowane były z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM przez 48 godzin, bądź poddawane były działaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, następnie zaś do pożywki zawierającej dodany uprzednio 1,25(OH)₂D₃ dodawano nadtlak wodoru w stężeniu 1 mM i komórki inkubowano kolejne 24 godziny. Wyniki przedstawiono w formie wykresów słupkowych na Ryc. 48.

W opisanych warunkach doświadczalnych zaobserwowano istotny wzrost poziomu mRNA genów *CYP24A1*, *VDR*, *CYP27B1* oraz *PDIA3* (Ryc. 48, panele A – D odpowiednio) w próbach inkubowanych 48 godzin z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM, w tym 24 godziny z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM, w porównaniu z próbami inkubowanymi 48 godzin jedynie z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM albo inkubowanymi wyłącznie z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny. Wyniki te wykazują, że pierwotne uwrażliwienie komórek HaCaT preinkubacją z analogami witaminy D w warunkach następującego stresu oksydacyjnego podwyższa ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D.



Ryc. 48. Porównanie poziomu mRNA genów *CYP24A1* (A), *VDR* (B), *CYP27B1* (C) oraz *PDIA3* (D) w linii komórkowej HaCaT. Komórki inkubowano z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM przez 48 godzin, bądź z nadtlenkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny albo też po upływie 24 godzinnej inkubacji z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM do pożywki dodawano nadtlenek wodoru w stężeniu 1 mM i inkubowano przez 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu *t* z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach ± SD dla dwóch niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego *RPL37A*. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

6. DYSKUSJA

Witamina D to wielofunkcyjna cząsteczka, której fizjologiczna rola daleko wykracza poza klasycznie przypisywaną jej regulację homeostazy wapniowej w organizmie (137, 138). Wiadomym jest, że witamina D stymuluje proces różnicowania różnego rodzaju komórek, w tym keratynocytów (50, 51, 55), a także monocytów i makrofagów (139). Dane epidemiologiczne, badania przedkliniczne oraz kliniczne wykazują także, że witamina D chroni komórki przed transformacją nowotworową. Między innymi zaobserwowano korelację pomiędzy wyższym poziomem 25-hydroksywitaminy D₃ a zmniejszoną zapadalnością na nowotwory sutka (140, 141), okrężnicy (142), płuc (143), prostaty (144), skóry oraz chłoniaki (145).

Dodatkowo, doniesienia naukowe pokazują także, że witamina D, bądź jej analogi, stosowane w terapii łączonej wzmacniają działanie leków przeciwnowotworowych, takich jak cisplatyna (146-150), doksorubicyna (151, 152), cyklofosfamid (151) czy gemcytabina (152). Mechanizm działania wspomnianych cytostatyków opiera się w głównej mierze na wprowadzaniu uszkodzeń do DNA komórek poddawanych ich działaniu. Jednocześnie wiadomym jest, że cisplatyna (136, 153, 154), a także doksorubicyna (155, 156), cyklofosfamid (157) czy gemcytabina (158) indukują powstawanie reaktywnych form tlenu w komórkach poddawanych ich działaniu, co w dużym stopniu przyczynia się do cytotoksyczności stosowanych chemioterapeutyków.

Zbadanie modulacyjnych właściwości witaminy D oraz jej nowych analogów wobec reaktywnych form tlenu wydaje się zatem stanowić interesujący i pożądany temat badawczy. Warto podkreślić, że do tej pory nie udało się w sposób jednoznaczny scharakteryzować witaminy D w kontekście regulacji stresu oksydacyjnego. Część doniesień przypisuje witaminie D właściwości prooksydacyjne (128-130), podczas gdy inne wykazują jej antyoksydacyjny charakter (131-134).

6.1. Witamina D jako antyoksydant w komórkach linii HaCaT

Badania z wykorzystaniem barwienia H_2DCFDA wykonane w niniejszej pracy wykazały, że 24 godzinna inkubacja komórek z $1,25(OH)_2D_3$ w stężeniu 100 nM hamuje produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach o około 8% w porównaniu z kontrolą, choć wynik ten nie był istotny statystycznie (Wyniki, 5.5). Dane te niemniej jednak sugerują antyoksydacyjne właściwości $1,25(OH)_2D_3$. Podobną zależność obserwowano w przypadku monocytarnej linii U937, którą poddawano 24 godzinnej inkubacji z $1,25(OH)_2D_3$ w stężeniu 10 i 25 nM, w obu przypadkach obserwując istotne statystycznie obniżenie produkcji RFT w stosunku do kontroli (159). Hamowanie produkcji RFT pod wpływem 48 godzinnej inkubacji z $1,25(OH)_2D_3$ w stężeniu 10 nM obserwowano także w mysich komórkach białaczki mielomonocytarnej linii WEHI-3B (160). Za charakterem antyoksydacyjnym przemawia również obserwowany wzrost potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ pod wpływem 1 - 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z $1,25(OH)_2D_3$ w stężeniu 100 nM (Wyniki, 5.4.1, Ryc. 32). Wiadomo bowiem, że obniżenie potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ może doprowadzać do nasilonej produkcji RFT w mitochondriach, a tym samym nasila stres oksydacyjny (161). Z drugiej strony inne doniesienia naukowe wykazują, że 48 godzinna inkubacja ludzkich adipocytów z $1,25(OH)_2D_3$ w stężeniu 1 nM obniża poziom mRNA *UCP2* (z ang. uncoupling protein 2, rozsprzęgacz protonów, typ 2) oraz redukuje ilość białka (162). Białka UCP 1 – 5 występują w błonie mitochondrialnej wewnętrznej, gdzie rozprzegają fosforylację oksydacyjną (163). Funkcjonują one jako sensory mitochondrialnego stresu oksydacyjnego, działając na zasadzie lokalnego sprzężenia zwrotnego. Umożliwiają transport zwrotny protonów do macierzy mitochondrialnej i obniżają w ten sposób produkcję RFT powstających podczas transportu elektronów w łańcuchu oddechowym (164). Warto zauważyć, że u szczurów z niedoborem witaminy D zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji genów *Ucp1* i *Ucp2* (165). U myszy *Vdr*^{-/-} zaobserwowano istotnie podwyższony poziom białek *Ucp1* – *Ucp3* w tkance tłuszczowej żółtej (166). Co ciekawe, ekspresja genów *UCP* nie jest zarezerwowana wyłącznie dla tkanki tłuszczowej, jak pierwotnie sądzono. Wykazano bowiem ekspresję *UCP1* – *UCP3* także w skórze, głównie w keratynocytach (167). Wiadomo, że mitochondrialne białko *Ucp2* obniża potencjał błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ (168), zatem

wzrost potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ pod wpływem inkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ może wynikać z obniżania ilości białka UCP2. Zatem zbadanie wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na ekspresję białek UCP w keratynocytach z pewnością wiele by wyjaśniło i takie oznaczenie zostanie wykonane w najbliższej przyszłości w ramach kontynuacji tematyki badawczej. Z drugiej strony w niniejszej pracy zaobserwowano, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przywracała potencjał błony mitochondrialnej $\Delta\psi$, obniżony w wyniku 1 godzinnej inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniach 1 – 3 mM (Wyniki, 5.4.1, Ryc. 33, panele A – C). Podobną zależność odnotowano w przypadku komórek nerwowych. Zaobserwowano mianowicie, że preinkubacja neuronów kory mózgowej z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pozwala na utrzymanie potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ mimo traktowania komórek cyjankiem (169). W dalszych doświadczeniach badacze wykazali, że preinkubacja komórek nerwowych z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ chroni je przed uszkodzeniami wywołanymi przez cyjanek poprzez obniżenie RFT wynikające ze stabilizacji komórkowej puli GSH oraz przez hamowanie aktywacji białka UCP-2 (169). O ile efekt ochronny wywierany przez 24 godzinną inkubację komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM był obserwowany podczas 1 godzinnej inkubacji, to dłuższa, bo 3 godzinna, ekspozycja keratynocytów na nadtlenek wodoru w stężeniach 1 – 3 mM znosiła ten efekt. Co więcej, w tym przypadku 24 godzinna preinkubacja komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM pogłębiała efekt działania nadtlenu wodoru, dodatkowo obniżając potencjał błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ (Wyniki, 5.4.1, Ryc. 33). Wydaje się zatem, że wpływ wywierany przez 24 godzinną preinkubację komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zależy w dużej mierze od stężenia RFT w komórkach, a także od czasu ich oddziaływania. Pokazano bowiem także, że zastosowanie nadtlenu wodoru w stężeniu 5 mM całkowicie znosiło ochronny efekt 24 godzinnej preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Wyniki, 5.4.1, Ryc. 33, panel D).

Jednocześnie warto zwrócić uwagę, że doświadczenia opierające się na zmiataniu wolnego rodnika DPPH $\cdot$ nie potwierdziły właściwości antyoksydacyjnych $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ani żadnego z testowanych analogów witaminy D oraz jej prekursora, 7-DHC. Brak efektu można jednak przypisywać relatywnie niskim stężeniom testowanych związków (Wyniki, 5.6). Ponadto uzyskany wynik nie wyklucza możliwości, że analogi witaminy D w komórkach, po wbudowaniu w błony biologiczne

mogą wykazywać właściwości antyoksydacyjne lub uszczelniając błony chronić komórki przed przenikaniem RFT.

Wyniki badań poziomu mRNA nie wykazują również wzmocnienia ekspresji genów zaangażowanych w neutralizację reaktywnych form tlenu, takich jak *SOD1* i *SOD2*, a także *CAT* pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D w stężeniu 10 nM (Wyniki, 5.7.1). W pracy nie badano jednak ekspresji peroksydazy glutationowej pod wpływem inkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D. Wydaje się, że zmiany w poziomie tego enzymu mogłyby dostarczyć dodatkowych informacji o potencjalnym antyoksydacyjnym wpływie analogów witaminy D. Należy mieć na uwadze, że analogi witaminy D zastosowane zostały w relatywnie niskim stężeniu, co może przyczyniać się do uzyskanego obrazu ekspresji genów zaangażowanych w obronę komórek przed reaktywnymi formami tlenu. Dodatkowo w przyjętym modelu badawczym zastosowano jedynie 24 godzinną inkubację. Ponieważ odpowiedź na RFT jest procesem dynamicznym, analiza innych punktów czasowych mogłaby przynieść więcej informacji wskazujących na regulacyjną funkcję witaminy D.

Wydaje się również, że ekspresja VDR może mieć wpływ na regulację odpowiedzi komórkowej na RFT, gdyż VDR reguluje ekspresję setek genów, w tym szeregu związanych z produkcją i usuwaniem RFT. Badania przeprowadzone na ludzkich liniach nabłonkowych kanalików proksymalnych nerki wykazały, że obniżenie ekspresji *VDR* w komórkach zainfekowanych wirusem HIV przyczynia się do zwiększonej produkcji RFT, zaś podanie witaminy D odwraca ten efekt (170). Wynik ten pośrednio świadczy o antyoksydacyjnym potencjale witaminy D. Zatem podwyższenie poziomu mRNA *VDR* w komórkach HaCaT obserwowane w niniejszej pracy (Wyniki, 5.7.2, Ryc. 43, panele A – D) rozumiane być może jako przejaw antyoksydacyjnego działania badanych analogów witaminy D.

6.2. Witamina D jako prooksydant w komórkach HaCaT

Ponieważ uzyskane wyniki nie wykazywały jednoznacznie antyoksydacyjnego działania witaminy D i jej analogów, tak więc w tym rozdziale przeanalizowane będą dane wskazujące na jej wpływ na tworzenie RFT na modelu keratynocytów linii HaCaT.

Na prooksydacyjne właściwości witaminy D w komórkach HaCaT wskazują w pewnym stopniu wyniki analizy ekspresji genów. Zaobserwowano na przykład, że ekspresja *SOD2* ulega obniżeniu pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ albo kalcypotriolem w stężeniu 10 nM, choć efekt ten nie był istotny statystycznie (Wyniki, 5.7.1, Ryc. 41). Także w komórkach raka prostaty obserwowano supresję MnSOD pod wpływem działania 1,25(OH)₂D₃ w zakresie stężeń 10 – 1000 nM, co w tym przypadku powiązane było z uwrażliwieniem tych komórek na stosowaną radioterapię (171). Kolejne badania przeprowadzone w trakcie realizacji niniejszej pracy wykazały obniżenie ekspresji *CAT* w komórkach HaCaT pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z 21OHpD albo kalcypotriolem (Wyniki, 5.7.1, Ryc. 42). Dane literaturowe wykazują natomiast, że podawanie parykalcytolu, analogu ergokalcysterolu (witaminy D₂), pacjentom poddawanych hemodializie zmniejsza u nich nasilenie stresu oksydacyjnego poprzez podwyższenie aktywności SOD i CAT mierzonej w surowicy krwi (172). Badania *in vivo* nie obejmowały jednak określania ekspresji genów *SOD* i *CAT*, a ponadto pacjentom podawano farmakologiczne dawki stosowanego analogu witaminy D, co może tłumaczyć odmienny efekt od uzyskanego w niniejszej pracy.

Jak opisano w rozdziale 6.1, badania z wykorzystaniem barwienia H₂DCFDA sugerują antyoksydacyjny charakter witaminy D. Z drugiej jednak strony wykazano, że zastosowanie preinkubacji keratynocytów HaCaT uwrażliwia je na działanie nadtlenu wodoru, co świadczyć może o jej prooksydacyjnym charakterze w tych warunkach doświadczalnych (Wyniki, 5.2.3, 5.2.4, 5.3, 5.4, 5.5). Efekt ten potraktowano jako modulacyjny wpływ witaminy D na działanie RFT w keratynocytach HaCaT i omówiono szczegółowo w kolejnym rozdziale.

6.3. Witamina D jako modulator RFT w komórkach HaCaT

Ponieważ jedna z przyjętych hipotez badawczych zakładała, że witamina D uwrażliwia komórki HaCaT na cytotoksyczne działanie nadtlenu wodoru, dlatego też większość przedstawionych doświadczeń wykonywano stosując 24 godzinną preinkubację z witaminą D w stężeniach potencjalnie fizjologicznych, po której następowała ekspozycja komórek na działanie nadtlenu wodoru lub cisplatyny. Można zatem przyjąć, że stworzony model badawczy umożliwił zbadanie odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny w sytuacji optymalnego stężenia witaminy D w komórce.

Testy proliferacyjne przeprowadzone na linii HaCaT wykazały, że jednoczesne zastosowanie nadtlenu wodoru w zakresie stężeń 0,0256 – 5 mM oraz badanych analogów witaminy D wywiera znacznie silniejszy efekt antyproliferacyjny od obserwowanego dla samego nadtlenu wodoru (Wyniki, 5.1.3). Ma to swoje odzwierciedlenie w 1,5 – 3 krotnym obniżeniu wartości EC_{50} w stosunku do wartości EC_{50} wyznaczonej dla samego nadtlenu wodoru (Tabela 9). Podobny efekt opisany był już w literaturze, gdyż wzmacnianie cytotoksycznego działania nadtlenu wodoru w wyniku 24 godzinnej preinkubacji komórek z $1,25(OH)_2D_3$ w stężeniu 100 nM obserwowano w keratynocytach linii HaCaT (173). Wzmacnianie cytotoksycznego działania nadtlenu wodoru obserwowano również w wyniku 48 godzinnej preinkubacji komórek z $1,25(OH)_2D_3$ w stężeniu 100 nM w liniach komórkowych raka piersi MCF-7 (174) oraz raka jelita grubego (175).

Większość prac badawczych wykazuje, że keratynocyty linii HaCaT są relatywnie odporne na cytotoksyczne działanie nadtlenu wodoru, gdyż inhibicję wzrostu obserwowano stosując milimolowe stężenia tego związku (176). Podobne rezultaty osiągnięto w niniejszej pracy (Wyniki, 5.1.2). Wykazano natomiast, że pierwotne linie keratynocytów są wrażliwsze, ponieważ obserwowano zahamowanie ich wzrostu już przy niskich, bo mikromolowych, stężeniach nadtlenu wodoru (177). Przedstawione w niniejszej pracy, choć bardzo selektywne, eksperymenty z pierwotnymi keratynocytami HPEKp wydają się jednak nie potwierdzać tych obserwacji, gdyż zastosowanie 1 mM nadtlenu wodoru tylko w niewielkim stopniu wpływało na cykl

komórkowy i nie wywoływało wzrostu ilości komórek frakcji SubG1 (Wyniki, 5.2.6, Ryc. 25).

W prezentowanej rozprawie aktywna forma witaminy D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wzmacnia również cytotoksyczność cisplatyny, co wykazano w testach proliferacyjnych (Wyniki, 5.1.4). Podobnie jak w doświadczeniach z nadtlaniem wodoru, wartość Ec_{50} dla cisplatyny była blisko trzykrotnie niższa gdy komórki HaCaT inkubowane były łącznie z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM (Tabela 10). Wynik ten potwierdza synergistyczne działanie antyproliferacyjne analogów witaminy D w stężeniu 10 nM z cisplatyną obserwowane w mysich liniach komórkowych białaczki WEHI-3 oraz w ludzkich liniach raka piersi MCF-7 i T47D, w których odnotowano nawet 55-krotne obniżenie wartości IC_{50} obliczanych dla cisplatyny (152).

Analiza dystrybucji komórek HaCaT w poszczególnych fazach cyklu komórkowego wykazała, że 24 godzinna inkubacja komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w zakresie stężeń 0,1 – 100 nM powodowała zwiększenie odsetka komórek fazy S oraz G2/M, z proporcjonalnym spadkiem odsetka komórek fazy G0/G1, a także frakcji SubG1 (Wyniki, 5.2.1). Dane literaturowe podają, że antyproliferacyjny potencjał witaminy D w dużej mierze opiera się na regulacji ekspresji genów kodujących inhibitory cyklu komórkowego, białka p27 i p21, co w konsekwencji doprowadza do hamowania kinaz zależnych od cyklin i blokowania przejścia z fazy G1 do S cyklu komórkowego (145, 178, 179). Jednocześnie efekt ten zależny jest od czasu inkubacji komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, co pokazano doświadczalnie w mielomonocytarnej linii komórkowej U937 poddawanej 12 – 72 godzinnej inkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM (180). Zatem wynik uzyskany podczas realizacji niniejszej pracy potwierdza obserwacje dotyczące wzrostu odsetka komórek fazy S cyklu komórkowego pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM. Inne dane literaturowe potwierdzają także zatrzymanie cyklu komórkowego ludzkich keratynocytów w fazie G2/M pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Wykazano bowiem, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniach 100 – 1000 nM powodował zwiększenie odsetka komórek znajdujących się w fazie G2/M poprzez podwyższenie poziomu kinaz Wee1 oraz Myt1, które inaktywują białko Cdc2 (181).

Inne badania wykazują również, że nadtlenek wodoru działa jako cząsteczka sygnałowa w szlakach transdukcji sygnału, indukując sygnały mitogenne (182, 183). Na

przykład wykazano, że niskie stężenia nadtlenu wodoru mogą nasilać wzrost komórek ssaczych (184). Natomiast wysokie stężenia H_2O_2 stymulują stan terminalnego różnicowania komórek (185) oraz wywierają efekt cytotoksyczny na komórki, co może prowadzić do ich apoptozy (186). Co ciekawe, zmiany stężenia endogennego nadtlenu wodoru obserwowane są podczas cyklu komórkowego, co powiązane jest z regulacją ekspresji cykliny D1 (187). Z drugiej strony wykazano, że nadekspresja katalazy oraz peroksydazy glutationu, prowadząca do usuwania endogennego nadtlenu wodoru, powiązana jest z zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G0/G1 (188). Wyniki prezentowane w niniejszej pracy wykazały jednak, że 24 godzinna inkubacja komórek HaCaT z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 5 mM powoduje spadek odsetka komórek fazy G0/G1 w sposób proporcjonalny do zastosowanego stężenia związku, czemu towarzyszy proporcjonalny wzrost odsetka komórek w fazie S, G2/M oraz wzrost frakcji SubG1 (Wyniki, 5.2.1).

Zaobserwowano również, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(OH)_2D_3$ w zakresie stężeń 0,1 – 100 nM istotnie wpływała na dystrybucję w cyklu komórkowym komórek poddanych działaniu nadtlenu wodoru przez kolejne 24 godziny (Wyniki, 5.2.3). Podobną zależność obserwowano również dla zastosowanych analogów witaminy D – 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $20OHD_3$, $21OHpD$ albo z kalcypotriolem, stosowanymi w stężeniu 100 nM, wzmacniała efekt wywierany przez nadtlak wodoru stosowany w stężeniu 1 mM na dystrybucję komórek w cyklu komórkowym, powodując między innymi wzrost odsetka komórek frakcji SubG1 w porównaniu z próbami poddawanych wyłącznie działaniu nadtlenu wodoru (Wyniki, 5.2.4). Warto zauważyć, że ilość komórek we frakcji SubG1 zależała głównie od stężenia nadtlenu wodoru, gdyż zarówno witamina D, jak i jej analogi, nie wykazywały właściwości proapoptotycznych w badanych stężeniach.

Istotnym elementem pracy było też zbadanie wpływu preinkubacji keratynocytów HaCaT z witaminą D na wrażliwość komórek na modelowy lek cytotoksyczny – cisplatynę. Wykazano, że 24 – 48 godzinna inkubacja komórek HaCaT z cisplatyną w stężeniu 12 – 120 μM powodowała wzrost odsetka komórek fazy S oraz G2/M, z proporcjonalnym spadkiem odsetka komórek w fazie G0/G1. Nie odnotowano natomiast wzrostu odsetka komórek frakcji SubG1 (Wyniki, 5.2.5). Wynik ten potwierdza dane literaturowe, które wykazują zahamowanie cyklu

komórkowego pod wpływem cisplatyny właśnie w fazie S oraz G2/M (189-191). Brak wzrostu odsetka komórek frakcji SubG1, reprezentującej komórki apoptotyczne, pod wpływem działania cisplatyny powiązany może być z mutacją p53 w komórkach linii HaCaT (zmutowane są oba allele tego genu) (192, 193). Wykazano bowiem, że komórki linii niosących mutację p53 lub też komórki, w których ekspresję p53 wyciszono, są odporne na apoptozę wywoływaną działaniem cisplatyny (194, 195). Należy jednak podkreślić, że w prezentowanych doświadczeniach obserwowano zahamowanie wzrostu komórek HaCaT pod wpływem cisplatyny (Wyniki, 5.1.4, Ryc. 10). Obserwowano również, że 24-godzinna preinkubacja komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃, bądź też 21OHpD albo kalcyptriolem w stężeniu 100 nM, powoduje wzrost odsetka komórek w fazie S pod wpływem 48 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z cisplatyną w stężeniu 120 µM (Wyniki, 5.2.5, Rycina 24, Panele A – C). 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃, bądź z kalcyptriolem, stosowanymi w stężeniu 100 nM, powodowała wzrost odsetka komórek fazy G2/M pod wpływem 24 godzinnej inkubacji z cisplatyną w stężeniu 120 µM w porównaniu z próbami poddawanych wyłącznie działaniu cisplatyny (Wyniki, 5.2.5, Rycina 22, Panele A i C). Dane literaturowe wykazują podobną zależność dla nowotworowych komórek prostaty linii LNCaP, tj. zwiększenie odsetka komórek w fazie G2/M w wyniku kumulatywnego działania 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 10 nM oraz związków platyny, takich jak karboksypatyna (196).

O ile w przypadku doświadczeń z cisplatyną nie obserwowano zwiększenia frakcji SubG1 niezależnie od tego czy komórki HaCaT były poddawane preinkubacji z analogami witaminy D, czy też nie, to w przypadku zastosowania nadtlenu wodoru w stężeniach powyżej 1 mM efekt ten był widoczny (Wyniki, 5.2.3 oraz 5.2.4). Ponieważ obecność frakcji SubG1 wskazuje na indukcję śmierci komórki, zbadano ten proces szczegółowo przy wykorzystaniu testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I. Wykazano, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM zwiększała frakcję komórek wczesnoapoptotycznych (Ann-V+/ 7-AAD-), a także frakcję komórek późnoapoptotycznych/nekrotycznych (Ann-V+/ 7-AAD-) pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM (Wyniki, 5.3; Rycina 28). Stosunkowo duży odsetek komórek wczesnoapoptotycznych wskazywał na indukcję szlaku apoptotycznego, jednak opisana w keratynocytach

HaCaT mutacja p53 powinna ograniczać zdolność tych komórek do apoptozy. Co ciekawe, Gogna i wsp. wykazali indukcję p-53 niezależnego szlaku apoptozy, opierającego się na aktywacji ścieżki zewnętrznej Fas-zależnej przez jony Ca^{2+} , w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc linii H1299 (197). Z drugiej strony dane literaturowe wykazują, że 24 godzinna inkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM hamuje aktywację kaspaz indukowanych stresem wywoływanym 1 godziną inkubacją z nadtlaniem wodoru w stężeniu 0,8 mM (198). Jak to zostało przedstawione w niniejszej pracy, efekt preinkubacji z analogami witaminy D jest w dużej mierze zależny od stężenia nadtlenu wodoru oraz czasu inkubacji, co tłumaczy powyższe obserwacje. Ponadto w niniejszej pracy nie badano aktywacji kaspaz, a jedynie eksternalizację fosfatydyloseryny, co dodatkowo przyczynia się do nieco innego obrazu uzyskanych wyników. Co ciekawe, Kim i wsp. sugerują, że śmierć komórkowa indukowana przez nadtlenek wodoru, niezależnie od typu komórek, jest aktywowana przez ścieżkę niezależną od kaspaz (199). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy, tj. wzmożona eksternalizacja fosfatydyloseryny obserwowana w zastosowanym modelu badawczym, sugerować mogą również śmierć komórkową typu nekrotycznego. Przebieg śmierci typu nekrotycznego może charakteryzować się bowiem w początkowych etapach właśnie eksternalizacją fosfatydyloseryny (200). Dodatkowo wykazano, że może następować w wyniku aktywacji ścieżki zewnętrznej Fas-zależnej (201). Uzasadniałoby to obserwowanie śmierci typu nekrotycznego w komórkach HaCaT, niosących mutację p53 (192), a jednocześnie pozostawałoby w zgodności w obserwowaną p-53 niezależną śmiercią komórkową Fas-zależną w przytoczonym wcześniej doniesieniu naukowym (197).

Ponieważ apoptoza może być indukowana przez zaburzenia w mitochondriach, poddano analizie zmiany potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ i wykazano, że inkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM powodowała wzrost tego potencjału w sposób zależny od czasu inkubacji (Wyniki, 5.4.1, Ryc. 32). Z kolei 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM powodowała obniżenie potencjału $\Delta\psi$ w wyniku 3 godzinnej inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w stężeniu 1 oraz 5 mM (Wyniki, 5.4.1, Ryc. 33). Podobną zależność obserwowano dla 20OHD_3 oraz 21OHpD i nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM (Wyniki, 5.4.2, Ryc. 34). Obserwowany spadek potencjału błony

mitochondrialnej $\Delta\psi$ może wynikać z indukcji stresu oksydacyjnego, któremu poddawane były komórki (202). Z drugiej strony spadek potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ może sugerować uszkodzenie mitochondriów i w konsekwencji oznaczać może produkcję dużych ilości reaktywnych form tlenu (203, 204). Nadmierna produkcja RFT prowadzić zaś może do śmierci komórek na drodze apoptozy (205) lub też nekrozy (206, 207). Wydaje się jednak, że szybki spadek potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ powiązany jest głównie ze śmiercią komórkową na drodze nekrozy (208). Tak więc można przypuszczać, że wyniki przywołanego powyżej doświadczenia ponownie potwierdzają hipotezę, zgodnie z którą preinkubacja komórek HaCaT z witaminą D nasila śmierć komórek na drodze nekrozy, wywołwaną przez nadtlenek wodoru. Co więcej, wcześniejsze badania przeprowadzone na linii keratynocytów HaCaT wykazały właśnie indukcję śmierci komórkowej typu nekrotycznego pod wpływem różnych czynników, takich jak np. palitoksyna (208, 209). Z drugiej strony inni badacze wykazali, że w komórkach linii HaCaT pod wpływem działania doksorubicyny, która doprowadza do produkcji rodników ponadtlenkowych, dochodzi do indukcji ścieżki wewnętrznej procesu apoptozy p53-niezależnej, wynikającej z obniżenia poziomu Bcl-2 (210). W badaniach klinicznych wykazano natomiast, że półroczna suplementacja 800 IU witaminy D₃ wzmacniała ekspresję białka proapoptotycznego Bax w całym obszarze krypt jelitowych, nie miała zaś istotnego statystycznie wpływu na ekspresję Bcl-2 (134). Obniżenie poziomu białka Bcl-2 w wyniku 48 godzinnej inkubacji komórek z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 1 – 1000 nM obserwowano także w ludzkiej linii mięśniaków macicy, co przyczyniało się do zahamowania wzrostu tych komórek (211). Tak więc, istotne będzie w przyszłych badaniach określenie poziomu mRNA białka Bcl-2 w zastosowanym modelu badawczym. Umożliwi to dokładniejsze określenie rodzaju śmierci komórkowej, indukowanej przez nadtlenek wodoru w keratynocytach linii HaCaT oraz wpływu preinkubacji z analogami witaminy D na ten proces. Ostateczne potwierdzenie rodzaju śmierci komórkowej zachodzącej w zastosowanym modelu badawczym wymagałoby jednak dodatkowych doświadczeń, takich jak obserwacja morfologii komórek, ocena ilości komórek barwiących się jodkiem propidyny z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego czy wreszcie zastosowania mikroskopu elektronowego (212).

Wyniki przedstawione w prezentowanej pracy wskazują również na pośredni efekt oddziaływania analogów witaminy D na komórki HaCaT, którego istotnym elementem jest zmiana w ekspresji szeregu genów. Doświadczenia z wykorzystaniem barwienia komórek H_2DCFDA wykazały, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(OH)_2D_3$ w stężeniu 100 nM jedynie w niewielkim stopniu wzmacnia produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach (Wyniki, 5,5, Ryc. 37). Wynik ten jednak nie był istotny statystycznie, $p=0,07$. Dodatkowo zaś efekt ten zanikał, gdy czas inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru po uprzedniej preinkubacji z $1,25(OH)_2D_3$ wydłużono do 24 godzin (Wyniki, 5,5, Ryc. 38). Uzasadnieniem tej obserwacji może być analiza ekspresji katalazy w doświadczeniach przeprowadzonych w warunkach analogicznych do doświadczeń z H_2DCFDA . Zaobserwowano mianowicie, że w przypadku poprzedzenia 24 godzinnej inkubacji komórek HaCaT z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM całodobową inkubacją z $1,25(OH)_2D_3$ poziom mRNA *CAT* był istotnie wyższy (Wyniki, 5.7.1, Ryc. 42). Inni badacze również wskazywali, że obecność egzogennej katalazy zmniejsza fluorescencję, która mierzona jest w doświadczeniach wykorzystujących barwienie H_2DCFDA (213). Wykazano również, że 24 godzinna preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(OH)_2D_3$, 21OHpD bądź z kalcypotriolem w stężeniu 10 nM powodowała podwyższenie ekspresji *SOD1* oraz *CAT* pod wpływem 24 godzinnej inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM (Wyniki, 5.7.1, Ryc. 40 oraz 42). W przypadku *SOD2* obserwowano natomiast obniżenie ilości jego mRNA pod wpływem preinkubacji komórek z $1,25(OH)_2D_3$ albo też z kalcypotriolem w zastosowanym modelu badawczym ($p<0,05$ dla kalcypotriolu; wynik nie był istotny statystycznie dla $1,25(OH)_2D_3$ (Wyniki, 5.7.1, Ryc. 41). Ostatni przytoczony wynik potwierdza tezę, zgodnie z którą preinkubacja komórek HaCaT z analogami witaminy D nasila stres oksydacyjny wywołowany działaniem nadtlaku wodoru, wskazując jednocześnie, że śmierć komórkowa wynika z uszkodzenia mitochondriów, co potwierdza obserwacje związane ze zmianą potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ (Wyniki, 5.4.1, Ryc. 33). Richardson i wsp. wykazali z kolei, że komórki niosące mutację *SOD1* cechuje obniżony poziom potencjału błony mitochondrialnej $\Delta\psi$ (214). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wykazały, że w zastosowanym modelu badawczym preinkubacja komórek HaCaT z $1,25(OH)_2D_3$, 20OHD₃, bądź z 21OHpD powodowała obniżenie potencjału błony mitochondrialnej

$\Delta\psi$ pod wpływem inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru (Wyniki, 5.4.1, Ryc. 33 oraz Wyniki, 5.4.2, Ryc. 34). Jednocześnie obserwowano także podwyższenie poziomu mRNA *SOD1* pod wpływem inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru w komórkach preinkubowanych z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 21OHpD albo też z kalcypotriolem (Wyniki, 5.7.1, Ryc. 40). Wydaje się więc, że uzyskane w niniejszej pracy wyniki pozostają w sprzeczności z wynikami zespołu Richardsona (214). Uzyskane w niniejszej pracy dane można wytłumaczyć włączeniem w komórkach mechanizmów kompensacyjnych, mających ochronić je przed podwyższonym poziomem RFT, wynikającym z uszkodzenia mitochondriów, na co wskazują doświadczenia wykorzystujące barwienia H_2DCFDA oraz JC-1 (Wyniki, 5.5, 5.4.1, 5.4.2). Na przykładzie kardiomiocytów wykazano bowiem, że rozprężenie mitochondriów może skutkować zwiększoną produkcją RFT (215). Nasilona produkcja RFT następnie prowadzić może do podwyższenia ekspresji *SOD1* (216), co zaobserwowano także w niniejszej pracy.

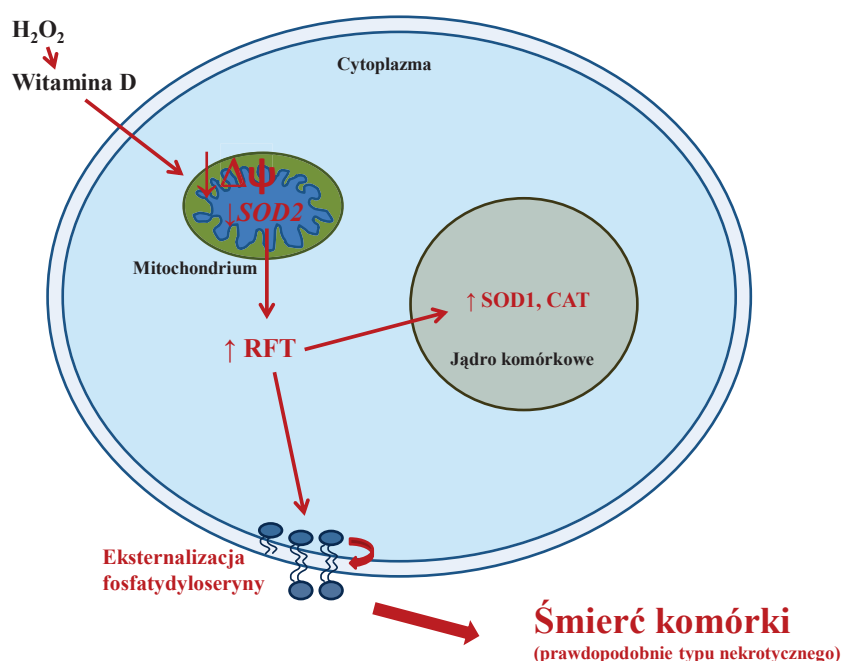
Na zakończenie warto dodać, że inkubacja komórek HaCaT z nadtlaniem wodoru wpływała na poziom mRNA genów związanych z aktywnością i metabolizmem witaminy D. Zaobserwowano mianowicie, że nadtlenek wodoru w stężeniu 1 mM powoduje podwyższenie poziomu mRNA genów *CYP24A1*, *VDR*, *CYP27B1* oraz *PDIA3* w komórkach HaCaT preinkubowanych z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Wyniki, 5.7.3, Ryc. 48). Obserwacje te sugerują, że stres oksydacyjny wpływa zarówno na aktywację witaminy D, poprzez zwiększenie ekspresji *CYP27B1*, jak i jej aktywność, o czym świadczy podwyższony poziom mRNA *VDR*, *PDIA3* oraz *CYP24A1*.

Przedstawiony w niniejszej pracy model badawczy może być uważany za reprezentacyjny fenotyp komórek o wysokim potencjale proliferacyjnym, który jest typowy dla szeregu patologii skórnych, włączając w to łuszczycę oraz nowotwory pochodzenia naskórkowego. Należy zwrócić uwagę że w badaniach zastosowano niskie stężenia analogów witaminy (do 100 nM), które odpowiadają fizjologicznym stężeniom 25OHD_3 w surowicy. Obserwowany wpływ witaminy D na wrażliwość komórek na działanie nadtlenu wodoru oraz cisplatyny uwypukla znaczenie witaminy D w terapii chorób hiperproliferacyjnych. Wiadomym jest bowiem, że poziom witaminy D jest obniżony w łuszczycy (217). Przywrócenie zatem jej właściwego poziomu powinno dodatnio wpłynąć na skuteczność terapii. Również w przypadku szeregu nowotworów

odnotowano obniżony poziom witaminy D (218), dlatego też wykazane współdziałanie witaminy D z cisplatyną może znaleźć praktyczne zastosowanie podczas terapii.

6.4. Podsumowanie i wnioski

W prezentowanej pracy wykazano, że łączne zastosowanie analogów witaminy D z nadtlaniem wodoru lub z cisplatyną, bądź też zastosowanie preinkubacji z witaminą D, wzmacnia działanie tych związków, nasilając śmierć komórkową, prawdopodobnie typu nekrotycznego. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy podkreślają istotną rolę mitochondriów w uwrażliwianiu komórek linii HaCaT poprzez preinkubację z analogami witaminy D na następujące działanie reaktywnych form tlenu (Ryc. 49).



Ryc. 49. Hipotetyczny mechanizm wzmacniania efektu wywieranego przez nadtlenek wodoru w komórkach HaCaT przez preinkubację z witaminą D.

Główne wnioski:

1. Wykazano, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zmniejsza odsetek komórek frakcji SubG1 ($p < 0,05$), hamuje eksternalizację fosfatydyloseryny, podwyższa potencjał błony mitochondrialnej $\Delta\psi$, a także obniża produkcję RFT w komórkach keratynocytów HaCaT (w ostatnim przypadku efekt był nieistotny statystycznie).
2. Łączne zastosowanie analogów witaminy D, tj. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 20OHD_3 , 21OHpD , bądź kalcypotriolu, z nadtlenkiem wodoru lub cisplatyną wzmacnia ich efekt cytotoksyczny.
3. Zastosowanie preinkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D zwiększa odsetek komórek frakcji SubG1 pod wpływem działania nadtlenku wodoru w stężeniu 1 mM oraz obniża potencjał błony mitochondrialnej $\Delta\psi$. Ponadto w przypadku $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nasila eksternalizację fosfatydyloseryny, a także podwyższa produkcję RFT w komórkach.
4. Zastosowanie preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 21OHpD , bądź z kalcypotriolem podwyższa mRNA *SOD1* oraz *CAT*, natomiast obniża poziom mRNA *SOD2* w przypadku $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (nie istotny statystycznie) albo kalcypotriolu.
5. Zastosowanie preinkubacji komórek HaCaT z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a następnie inkubacji komórek z nadtlenkiem wodoru podwyższa poziom mRNA genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D, tj. *CYP24A1*, *VDR*, *CYP27B1*, *PDIA3*.

7. STRESZCZENIE

Skóra stanowi dobrze zorganizowaną barierę chroniącą nasz organizm przed szkodliwym wpływem środowiska zewnętrznego. Wiele czynników fizykochemicznych, np. promieniowanie ultrafioletowe, powoduje generowanie reaktywnych form tlenu (RFT), które mogą uszkadzać komórki naskórka.

Z drugiej strony akumulacja RFT w komórkach może być wynikiem procesów fizjologicznych, wynikających z tlenowego sposobu oddychania. Brak równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu, a ich usuwaniem prowadzi do stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji do uszkodzenia elementów komórki. Dlatego też komórki naskórka – keratynocyty zaopatrzone są w mechanizmy obronne przed toksycznym nagromadzeniem RFT. Co ciekawe, mechanizm działania wielu leków, w tym leków przeciwnowotworowych, takich jak cisplatyna, opiera się na produkcji RFT, których nadmiar efektywnie eliminuje komórki nowotworowe.

W niniejszej pracy badano wpływ witaminy D, jako naturalnej cząsteczki powstającej w naskórku, na wrażliwość keratynocytów linii HaCaT na działanie reaktywnych form tlenu, reprezentowanych przez nadtlenek wodoru oraz cisplatynę. Warto zauważyć, że unieśmiertelniona linia keratynocytów HaCaT cechuje się wysokim tempem podziałów komórkowych, a więc stanowi świetny model badawczy hiperproliferacyjnych schorzeń skóry.

Badania wykonane w trakcie przygotowania prezentowanej rozprawy wskazują, że analogi witaminy D pełnią funkcję ochronną dla komórek epidermalnych. Wykazano to na przykładzie hamowania indukcji apoptozy, ochrony potencjału błony mitochondrialnej, a także obserwując obniżenie produkcji RFT przez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Natomiast, preinkubacja keratynocytów HaCaT z analogami witaminy D uwrażliwia je na działanie RFT. Wskazują na to wyniki testu proliferacyjnego SRB, a także cytometryczna analiza cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy, zmiany potencjału błony mitochondrialnej oraz analiza indukcji stresu oksydacyjnego. Należy podkreślić, że badania przeprowadzono stosując oprócz aktywnej formy witaminy D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) również jej analogi o obniżonym wpływie na gospodarkę wapniową (20OHD_3 , 21OHpd oraz kalcypotriol). Dodatkowo związki te stosowano w stężeniach

(10-100 nM dla większości doświadczeń) zbliżonych do optymalnego stężenia 25OHD₃ w surowicy człowieka (75 – 125 nM).

Uzyskane wyniki wskazują również na to, że analogi witaminy D stymulują ekspresję genów dla enzymów antyoksydacyjnych *SOD1* i *CAT* w warunkach stresu oksydacyjnego, a hamują *SOD2*, co może wskazywać na istotną rolę mitochondriów w indukcji śmierci komórek. Natomiast nadtlenek wodoru po preinkubacji komórek z analogami witaminy D moduluje geny związane z metabolizmem i aktywnością witaminy D.

Podsumowując, wyniki uzyskane na modelu unieśmiertelnionych keratynocytów HaCaT wykazują pozywny wpływ analogów witaminy D. Z drugiej strony preinkubacja keratynocytów HaCaT z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM, wzmacniała efekt cytotoksyczny nadtlenku wodoru oraz cisplatyny. Potencjalnie przeciwne efekty działania analogów witaminy D były zależne od stężenia oraz długości inkubacji z czynnikiem stresogennym. Ponadto wydaje się, że uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę utrzymywania właściwego stężenia witaminy D w organizmie zarówno w profilaktyce, jak i w leczeniu schorzeń związanych z hiperproliferacją komórek, takich jak łuszczyca, czy nowotwory skóry.

ABSTRACT

The skin constitutes a well-organized barrier protecting the body against harmful effects of the external environment. Many physico-chemical factors, such as ultraviolet light, result in generation of reactive oxygen species (ROS), which in turn may damage skin cells.

On the other hand, accumulation of ROS in mammalian cells occurs in physiological processes connected with aerobic respiration. The imbalance between the production of reactive oxygen species and their removal leads to oxidative stress and may lead to the damage of cellular components. Therefore, skin cells - keratinocytes are equipped with defense mechanisms against toxic accumulation of ROS. Interestingly, the mechanism of action of many anticancer drugs, such as cisplatin, bases on the production of ROS, that may eliminate cancer cells.

Present study examined the effects of vitamin D, as a naturally occurring molecule of the epidermis, on sensitization of HaCaT keratinocytes to reactive oxygen species, represented by hydrogen peroxide and cisplatin. It is worth to mention, that the immortalized HaCaT keratinocytes are characterized by a high proliferative potential, and thus constitute an excellent experimental model of hyperproliferative skin disorders.

It was shown that vitamin D analogs have a protective effect on the epidermal cells. It was exemplified by inhibition of apoptosis, protection of mitochondrial membrane potential, as well as reduction of ROS production in the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. In contrast, preincubation of HaCaT keratinocytes with vitamin D analogs sensitizes them to ROS. The results of proliferation test, flow cytometry analysis of cell cycle and induction of apoptosis, as well as mitochondrial membrane potential changes, finally the analysis of the induction of oxidative stress, strongly support this hypothesis. It should be emphasized that experiments include not only the active form of vitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), but also its analogs with reduced impact on the calcium homeostasis (20OHD_3 , 21OHpD and calcipotriol). In addition, these compounds were used at low concentrations (mainly 10-100 nM), similar to an optimal concentration of 25OHD_3 in human serum (75-125 nM). The results presented here also indicate, that under oxidative conditions vitamin D analogs stimulate the expression of genes encoding antioxidant enzymes, such as *SOD1*

and *CAT* and inhibit *SOD2*, pointing out the vital role of mitochondria in ROS-induced cell death. On the other hand, after preincubation of cells with vitamin D analogs, hydrogen peroxide modulates expression of genes related to the metabolism and activity of vitamin D. In conclusion, results obtained in presented PhD dissertation underline protective properties of vitamin D analogs. However, preincubation of HaCaT keratinocytes with vitamin D analogs in 100 nM concentration, enhances the cytotoxic effect of hydrogen peroxide and cisplatin. Potentially opposing effects of vitamin D analogs were dependent on concentration and duration of incubation with the stress factor. Presented results also indicate the importance of maintaining of the proper levels of vitamin D in human, both in the prevention and treatment of disorders associated with cell hyperproliferation, such as psoriasis or skin cancer.

PIŚMIENNICTWO

- [1] DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(2004):1689s-96s.
- [2] Norman AW. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(1998):1108-10.
- [3] Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol.* 1981;77(1981):51-8.
- [4] Bikle DD. Vitamin D metabolism and function in the skin. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;347(2011):80-9.
- [5] Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Jr., Anderson RR, et al. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science.* 1980;210(1980):203-5.
- [6] Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science.* 1997;277(1997):1827-30.
- [7] Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(2006):353-73.
- [8] Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008;29(2008):726-76.
- [9] Luderer HF, Demay MB. The vitamin D receptor, the skin and stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(2010):314-6.
- [10] Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.* 1998;13(1998):325-49.
- [11] Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 1998;78(1998):1193-231.
- [12] Slominski A, Kim TK, Zmijewski MA, Janjetovic Z, Li W, Chen J, et al. Novel vitamin D photoproducts and their precursors in the skin. *Dermatoendocrinol.* 2013;5(2013):7-19.
- [13] Slominski A, Zjawiony J, Wortsman J, Semak I, Stewart J, Pisarchik A, et al. A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450_{scc} system in mammalian skin. *Eur J Biochem.* 2004;271(2004):4178-88.

- [14] Slominski AT, Kim TK, Li W, Yi AK, Postlethwaite A, Tuckey RC. The role of CYP11A1 in the production of vitamin D metabolites and their role in the regulation of epidermal functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144 Pt A(2014):28-39.
- [15] Zmijewski MA, Li W, Zjawiony JK, Sweatman TW, Chen J, Miller DD, Slominski AT. Synthesis and photo-conversion of androsta- and pregna-5,7-dienes to vitamin D3-like derivatives. *Photochem Photobiol Sci*. 2008;7(2008):1570-6.
- [16] Zmijewski MA, Li W, Zjawiony JK, Sweatman TW, Chen J, Miller DD, Slominski AT. Photo-conversion of two epimers (20R and 20S) of pregna-5,7-diene-3beta, 17alpha, 20-triol and their bioactivity in melanoma cells. *Steroids*. 2009;74(2009):218-28.
- [17] Zmijewski MA, Li W, Chen J, Kim TK, Zjawiony JK, Sweatman TW, et al. Synthesis and photochemical transformation of 3beta,21-dihydroxypregna-5,7-dien-20-one to novel secosteroids that show anti-melanoma activity. *Steroids*. 2011;76(2011):193-203.
- [18] Slominski AT, Zmijewski MA, Semak I, Sweatman T, Janjetovic Z, Li W, et al. Sequential metabolism of 7-dehydrocholesterol to steroidal 5,7-dienes in adrenal glands and its biological implication in the skin. *PLoS One*. 2009;4(2009):e4309.
- [19] Slominski A, Semak I, Zjawiony J, Wortsman J, Gandy MN, Li J, et al. Enzymatic metabolism of ergosterol by cytochrome p450scc to biologically active 17alpha,24-dihydroxyergosterol. *Chem Biol*. 2005;12(2005):931-9.
- [20] Slominski A, Semak I, Zjawiony J, Wortsman J, Li W, Szczesniewski A, Tuckey RC. The cytochrome P450scc system opens an alternate pathway of vitamin D3 metabolism. *Febs j*. 2005;272(2005):4080-90.
- [21] Slominski A, Semak I, Wortsman J, Zjawiony J, Li W, Zbytek B, Tuckey RC. An alternative pathway of vitamin D metabolism. Cytochrome P450scc (CYP11A1)-mediated conversion to 20-hydroxyvitamin D2 and 17,20-dihydroxyvitamin D2. *Febs j*. 2006;273(2006):2891-901.
- [22] Tuckey RC, Li W, Shehabi HZ, Janjetovic Z, Nguyen MN, Kim TK, et al. Production of 22-hydroxy metabolites of vitamin d3 by cytochrome p450scc (CYP11A1) and analysis of their biological activities on skin cells. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(2011):1577-88.
- [23] Tuckey RC, Janjetovic Z, Li W, Nguyen MN, Zmijewski MA, Zjawiony J, Slominski A. Metabolism of 1alpha-hydroxyvitamin D3 by cytochrome P450scc to biologically active 1alpha,20-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;112(2008):213-9.
- [24] Slominski AT, Kim TK, Shehabi HZ, Semak I, Tang EK, Nguyen MN, et al. In vivo evidence for a novel pathway of vitamin D(3) metabolism initiated by P450scc and modified by CYP27B1. *Faseb j*. 2012;26(2012):3901-15.

- [25] Slominski AT, Janjetovic Z, Fuller BE, Zmijewski MA, Tuckey RC, Nguyen MN, et al. Products of vitamin D₃ or 7-dehydrocholesterol metabolism by cytochrome P450_{scc} show anti-leukemia effects, having low or absent calcemic activity. *PLoS One*. 2010;5(2010):e9907.
- [26] Slominski AT, Janjetovic Z, Kim TK, Wright AC, Grese LN, Riney SJ, et al. Novel vitamin D hydroxyderivatives inhibit melanoma growth and show differential effects on normal melanocytes. *Anticancer Res*. 2012;32(2012):3733-42.
- [27] Szyszka P, Zmijewski MA, Slominski AT. New vitamin D analogs as potential therapeutics in melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012;12(2012):585-99.
- [28] Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(2011):543-59.
- [29] Rachez C, Freedman LP. Mechanisms of gene regulation by vitamin D₃ receptor: a network of coactivator interactions. *Gene*. 2000;246(2000):9-21.
- [30] Bikle DD. Vitamin D: an ancient hormone. *Exp Dermatol*. 2011;20(2011):7-13.
- [31] Campbell MJ. Vitamin D and the RNA transcriptome: more than mRNA regulation. *Front Physiol*. 2014;5(2014):181.
- [32] Silvagno F, Consiglio M, Foglizzo V, Destefanis M, Pescarmona G. Mitochondrial translocation of vitamin D receptor is mediated by the permeability transition pore in human keratinocyte cell line. *PLoS One*. 2013;8(2013):e54716.
- [33] Long MD, Sucheston-Campbell LE, Campbell MJ. Vitamin D Receptor and RXR in the Post-Genomic Era. *J Cell Physiol*. 2014(2014).
- [34] Carlberg C. Current understanding of the function of the nuclear vitamin D receptor in response to its natural and synthetic ligands. *Recent Results Cancer Res*. 2003;164(2003):29-42.
- [35] Lisse TS, Saini V, Zhao H, Luderer HF, Gori F, Demay MB. The Vitamin D Receptor Is Required for Activation of cWnt and Hedgehog Signaling in Keratinocytes. *Mol Endocrinol*. 2014;28(2014):1698-706.
- [36] van de Peppel J, van Leeuwen JP. Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Front Physiol*. 2014;5(2014):137.
- [37] Wagatsuma A, Sakuma K. Vitamin D Signaling in Myogenesis: Potential for Treatment of Sarcopenia. *Biomed Res Int*. 2014;2014(2014):121254.
- [38] Goltzman D, Hendy GN, White JH. Vitamin D and its receptor during late development. *Biochim Biophys Acta*. 2014(2014).
- [39] Nemere I, Farach-Carson MC, Rohe B, Sterling TM, Norman AW, Boyan BD, Safford SE. Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)₂D₃ membrane

binding protein (1,25D3-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(2004):7392-7.

[40] Nemere I, Garbi N, Hammerling G, Hintze KJ. Role of the 1,25D3-MARRS receptor in the 1,25(OH)2D3-stimulated uptake of calcium and phosphate in intestinal cells. *Steroids*. 2012;77(2012):897-902.

[41] Doroudi M, Schwartz Z, Boyan BD. Phospholipase A2 activating protein is required for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 dependent rapid activation of protein kinase C via Pdia3. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012;132(2012):48-56.

[42] Ryan JW, Anderson PH, Turner AG, Morris HA. Vitamin D activities and metabolic bone disease. *Clin Chim Acta*. 2013;425(2013):148-52.

[43] Morris HA, Turner AG, Anderson PH. Vitamin-D regulation of bone mineralization and remodelling during growth. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4(2012):677-89.

[44] Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E. Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest*. 1984;74(1984):507-13.

[45] Friedman PA, Gesek FA. Vitamin D3 accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol*. 1993;265(1993):F300-8.

[46] Kim CJ, Kaplan LE, Perwad F, Huang N, Sharma A, Choi Y, et al. Vitamin D 1alpha-hydroxylase gene mutations in patients with 1alpha-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2007):3177-82.

[47] Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino AC, et al. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone*. 2007;40(2007):1517-28.

[48] Kogawa M, Findlay DM, Anderson PH, Atkins GJ. Modulation of osteoclastic migration by metabolism of 25OH-vitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;136(2013):59-61.

[49] Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T. Vitamin D and bone. *J Cell Biochem*. 2003;88(2003):259-66.

[50] Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem*. 2004;92(2004):436-44.

[51] Bikle DD, Oda Y, Xie Z. Calcium and 1,25(OH)2D: interacting drivers of epidermal differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90(2004):355-60.

[52] Pillai S, Bikle DD, Elias PM. Vitamin D and epidermal differentiation: evidence for a role of endogenously produced vitamin D metabolites in keratinocyte differentiation. *Skin Pharmacol*. 1988;1(1988):149-60.

- [53] Menon GK, Grayson S, Elias PM. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol.* 1985;84(1985):508-12.
- [54] Ratnam AV, Bikle DD, Cho JK. 1,25 dihydroxyvitamin D3 enhances the calcium response of keratinocytes. *J Cell Physiol.* 1999;178(1999):188-96.
- [55] Bikle DD, Ng D, Tu CL, Oda Y, Xie Z. Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;177(2001):161-71.
- [56] Su MJ, Bikle DD, Mancianti ML, Pillai S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the keratinocyte response to calcium. *J Biol Chem.* 1994;269(1994):14723-9.
- [57] Pillai S, Bikle DD. Role of intracellular-free calcium in the cornified envelope formation of keratinocytes: differences in the mode of action of extracellular calcium and 1,25 dihydroxyvitamin D3. *J Cell Physiol.* 1991;146(1991):94-100.
- [58] Garcia LA, King KK, Ferrini MG, Norris KC, Artaza JN. 1,25(OH)₂vitamin D3 stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology.* 2011;152(2011):2976-86.
- [59] Heath KM, Elovic EP. Vitamin D deficiency: implications in the rehabilitation setting. *Am J Phys Med Rehabil.* 2006;85(2006):916-23.
- [60] Okuno H, Kishimoto KN, Hatori M, Itoi E. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) enhances fast-myosin heavy chain expression in differentiated C2C12 myoblasts. *Cell Biol Int.* 2012;36(2012):441-7.
- [61] Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat.* 2005;29(2005):21-30.
- [62] Peterson AL, Murchison C, Zabetian C, Leverenz JB, Watson GS, Montine T, et al. Memory, mood, and vitamin D in persons with Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(2013):547-55.
- [63] Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(2007):684-700.
- [64] Ylikomi T, Laaksi I, Lou YR, Martikainen P, Miettinen S, Pennanen P, et al. Antiproliferative action of vitamin D. *Vitam Horm.* 2002;64(2002):357-406.
- [65] Looker AC, Johnson CL, Lacher DA, Pfeiffer CM, Schleicher RL, Sempos CT. Vitamin D status: United States, 2001-2006. *NCHS Data Brief.* 2011(2011):1-8.
- [66] Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol.* 2013;5(2013):51-108.

- [67] Kmiec P, Zmijewski M, Waszak P, Sworczak K, Lizakowska-Kmiec M. Vitamin D deficiency during winter months among an adult, predominantly urban, population in Northern Poland. *Endokrynol Pol.* 2014;65(2014):105-13.
- [68] Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92(2006):4-8.
- [69] Pludowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G, Chlebna-Sokol D, Czech-Kowalska J, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynol Pol.* 2013;64(2013):319-27.
- [70] Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 2006;116(2006):2062-72.
- [71] Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(2007):266-81.
- [72] Scragg R. Seasonality of cardiovascular disease mortality and the possible protective effect of ultra-violet radiation. *Int J Epidemiol.* 1981;10(1981):337-41.
- [73] Burgaz A, Orsini N, Larsson SC, Wolk A. Blood 25-hydroxyvitamin D concentration and hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens.* 2011;29(2011):636-45.
- [74] Pilz S, Tomaschitz A. Role of vitamin D in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010;8(2010):1599-608.
- [75] Kienreich K, Tomaschitz A, Verheyen N, Pieber T, Gaksch M, Grubler MR, Pilz S. Vitamin D and cardiovascular disease. *Nutrients.* 2013;5(2013):3005-21.
- [76] Snijder MB, Lips P, Seidell JC, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, van Dam RM. Vitamin D status and parathyroid hormone levels in relation to blood pressure: a population-based study in older men and women. *J Intern Med.* 2007;261(2007):558-65.
- [77] Forman JP, Williams JS, Fisher ND. Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension.* 2010;55(2010):1283-8.
- [78] Brewer LC, Michos ED, Reis JP. Vitamin D in atherosclerosis, vascular disease, and endothelial function. *Curr Drug Targets.* 2011;12(2011):54-60.
- [79] Oh J, Weng S, Felton SK, Bhandare S, Riek A, Butler B, et al. 1,25(OH)₂ vitamin d inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2009;120(2009):687-98.
- [80] de Boer IH, Kestenbaum B, Shoben AB, Michos ED, Sarnak MJ, Siscovick DS. 25-hydroxyvitamin D levels inversely associate with risk for developing coronary artery calcification. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(2009):1805-12.
- [81] Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart

failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2006):754-9.

[82] Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: the odd couple. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(2013):561-8.

[83] Cheng Q, Li YC, Boucher BJ, Leung PS. A novel role for vitamin D: modulation of expression and function of the local renin-angiotensin system in mouse pancreatic islets. *Diabetologia.* 2011;54(2011):2077-81.

[84] Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: its importance for beta cell and immune function. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;347(2011):106-20.

[85] Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, van Etten E, Decallonne B, Overbergh L, et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia.* 2004;47(2004):451-62.

[86] Tretli S, Schwartz GG, Torjesen PA, Rødsahl TE. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: a population-based study. *Cancer Causes Control.* 2012;23(2012):363-70.

[87] Cho M, Peddi PF, Ding K, Chen L, Thomas D, Wang J, et al. Vitamin D deficiency and prognostics among patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Transl Med.* 2013;11(2013):206.

[88] Ng K, Meyerhardt JA, Wu K, Feskanich D, Hollis BW, Giovannucci EL, Fuchs CS. Circulating 25-hydroxyvitamin d levels and survival in patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(2008):2984-91.

[89] Tretli S, Hernes E, Berg JP, Hestvik UE, Rødsahl TE. Association between serum 25(OH)D and death from prostate cancer. *Br J Cancer.* 2009;100(2009):450-4.

[90] Rose AA, Elser C, Ennis M, Goodwin PJ. Blood levels of vitamin D and early stage breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;141(2013):331-9.

[91] Mahon BD, Gordon SA, Cruz J, Cosman F, Cantorna MT. Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *J Neuroimmunol.* 2003;134(2003):128-32.

[92] Kampman MT, Steffensen LH. The role of vitamin D in multiple sclerosis. *J Photochem Photobiol B.* 2010;101(2010):137-41.

[93] Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2006):312-22.

[94] Grzegorz B. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie.: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013.

- [95] Augustyniak A, Bartosz G, Cipak A, Duburs G, Horakova L, Luczaj W, et al. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radic Res.* 2010;44(2010):1216-62.
- [96] Lukaszewicz-Hussain A. [The role of glutathione and glutathione-related enzymes in antioxidative process]. *Med Pr.* 2003;54(2003):473-9.
- [97] Nowak P, Olas B, Wachowicz B. [Oxidative stress in haemostasis]. *Postepy Biochem.* 2010;56(2010):239-47.
- [98] Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuzmicka L, Tarasiewicz M. [Biological function of some elements and their compounds. I. Oxygen--the element of life and death]. *Pol Merkur Lekarski.* 2009;27(2009):245-8.
- [99] Wozniak M, Czyz M. [Superoxide dismutase mimetics: possible clinical applications]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2008;62(2008):613-24.
- [100] Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed Res Int.* 2014;2014(2014):404680.
- [101] Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuzmicka L, Tarasiewicz M. [Reactive oxygen species and aging of organism]. *Wiad Lek.* 2009;62(2009):184-9.
- [102] Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuzmicka L, Tarasiewicz M. [Reactive nitrogen and oxygen species]. *Pol Merkur Lekarski.* 2009;27(2009):338-40.
- [103] Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuzmicka L, Tarasiewicz M. [Organism defense against reactive oxygen species]. *Wiad Lek.* 2009;62(2009):248-56.
- [104] Bocci V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1996;10(1996):31-53.
- [105] Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci.* 1999;56(1999):270-9.
- [106] Mudway IS, Kelly FJ. Ozone and the lung: a sensitive issue. *Mol Aspects Med.* 2000;21(2000):1-48.
- [107] Bouton C. Nitrosative and oxidative modulation of iron regulatory proteins. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(1999):1043-53.
- [108] Chen W, Cai S, Ren QQ, Wen W, Zhao YD. Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review. *Analyst.* 2012;137(2012):49-58.
- [109] Lugowski M, Saczko J, Kulbacka J, Banas T. [Reactive oxygen and nitrogen species]. *Pol Merkur Lekarski.* 2011;31(2011):313-7.
- [110] Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(2006):747-58.

- [111] Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 2007;74(2007):324-9.
- [112] Orr WC, Mockett RJ, Benes JJ, Sohal RS. Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*. 2003;278(2003):26418-22.
- [113] Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M, Chan PH. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci*. 2000;20(2000):2817-24.
- [114] Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(2002):9010-4.
- [115] Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurol Res Int*. 2011;2011(2011):458427.
- [116] Morten KJ, Ackrell BA, Melov S. Mitochondrial reactive oxygen species in mice lacking superoxide dismutase 2: attenuation via antioxidant treatment. *J Biol Chem*. 2006;281(2006):3354-9.
- [117] Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Marklund S, Heegaard NH, Steffensen R, Sillesen H, et al. Genetically reduced antioxidative protection and increased ischemic heart disease risk: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation*. 2004;109(2004):59-65.
- [118] Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(2007):44-50.
- [119] Goyal MM, Basak A. Hydroxyl radical generation theory: a possible explanation of unexplained actions of mammalian catalase. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(2012):282-9.
- [120] Hashimoto F, Hayashi H. Significance of catalase in peroxisomal fatty acyl-CoA beta-oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1987;921(1987):142-50.
- [121] Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005;308(2005):1909-11.
- [122] Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(2011):1957-97.
- [123] Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(2004):1481-95.

- [124] Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, et al. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem.* 2003;384(2003):567-74.
- [125] Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. *Adv Exp Med Biol.* 1999;467(1999):379-87.
- [126] Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci.* 2000;7(2000):444-58.
- [127] Pfeifer GP, Besaratinia A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci.* 2012;11(2012):90-7.
- [128] Koren R, Hadari-Naor I, Zuck E, Rotem C, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(2001):1439-44.
- [129] Ravid A, Rocker D, Machlenkin A, Rotem C, Hochman A, Kessler-Icekson G, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res.* 1999;59(1999):862-7.
- [130] Somjen D, Katzburg S, Knoll E, Sharon O, Posner GH, Stern N. Vitamin D analogs induce lipooxygenase mRNA expression and activity as well as reactive oxygen species (ROS) production in human bone cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(2010):265-7.
- [131] Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer.* 2008;122(2008):2699-706.
- [132] Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al. 1Alpha,25 dihydroxyvitamin D3: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2009;55(2009):215-22.
- [133] Eftekhari MH, Akbarzadeh M, Dabbaghmanesh MH, Hassanzadeh J. The effect of calcitriol on lipid profile and oxidative stress in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. *ARYA Atheroscler.* 2014;10(2014):82-8.
- [134] Fedirko V, Bostick RM, Long Q, Flanders WD, McCullough ML, Sidelnikov E, et al. Effects of supplemental vitamin D and calcium on oxidative DNA damage marker in normal colorectal mucosa: a randomized clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(2010):280-91.
- [135] Gomez-Sierra T, Molina-Jijon E, Tapia E, Hernandez-Pando R, Garcia-Nino WR, Maldonado PD, et al. S-allylcysteine prevents cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66(2014):1271-81.

- [136] Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS, Doetsch PW. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One*. 2013;8(2013):e81162.
- [137] Reid IR, Bolland MJ. Skeletal and nonskeletal effects of vitamin D: is vitamin D a tonic for bone and other tissues? *Osteoporos Int*. 2014;25(2014):2347-57.
- [138] Lai YH, Fang TC. The pleiotropic effect of vitamin d. *ISRN Nephrol*. 2013;2013(2013):898125.
- [139] Grober U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. *Dermatoendocrinol*. 2013;5(2013):331-47.
- [140] Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ. Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr*. 2003;133(2003):2425s-33s.
- [141] Mehta RG, Hussain EA, Mehta RR, Das Gupta TK. Chemoprevention of mammary carcinogenesis by 1alpha-hydroxyvitamin D5, a synthetic analog of Vitamin D. *Mutat Res*. 2003;523-524(2003):253-64.
- [142] Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(2003):601-14.
- [143] Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, Takeda E, Okano T. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26(2005):429-40.
- [144] Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D. The role of vitamin D in prostate cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2003;164(2003):205-21.
- [145] Ingraham BA, Bragdon B, Nohe A. Molecular basis of the potential of vitamin D to prevent cancer. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(2008):139-49.
- [146] Light BW, Yu WD, McElwain MC, Russell DM, Trump DL, Johnson CS. Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. *Cancer Res*. 1997;57(1997):3759-64.
- [147] Hershberger PA, McGuire TF, Yu WD, Zuhowski EG, Schellens JH, Egorin MJ, et al. Cisplatin potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis in association with increased mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEKK-1) expression. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(2002):821-9.
- [148] Wietrzyk J, Pelczynska M, Madej J, Dzimira S, Kusnierczyk H, Kutner A, et al. Toxicity and antineoplastic effect of (24R)-1,24-dihydroxyvitamin D3 (PRI-2191). *Steroids*. 2004;69(2004):629-35.

- [149] Ma Y, Yu WD, Trump DL, Johnson CS. 1,25D3 enhances antitumor activity of gemcitabine and cisplatin in human bladder cancer models. *Cancer*. 2010;116(2010):3294-303.
- [150] Rassnick KM, Muindi JR, Johnson CS, Balkman CE, Ramnath N, Yu WD, et al. In vitro and in vivo evaluation of combined calcitriol and cisplatin in dogs with spontaneously occurring tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;62(2008):881-91.
- [151] Wietrzyk J, Nevozhay D, Filip B, Milczarek M, Kutner A. The antitumor effect of lowered doses of cytostatics combined with new analogs of vitamin D in mice. *Anticancer Res*. 2007;27(2007):3387-98.
- [152] Pelczynska M, Switalska M, Maciejewska M, Jaroszewicz I, Kutner A, Opolski A. Antiproliferative activity of vitamin D compounds in combination with cytostatics. *Anticancer Res*. 2006;26(2006):2701-5.
- [153] Mondal J, Bishayee K, Panigrahi AK, Khuda-Bukhsh AR. Low doses of ethanolic extract of Boldo (*Peumus boldus*) can ameliorate toxicity generated by cisplatin in normal liver cells of mice in vivo and in WRL-68 cells in vitro, but not in cancer cells in vivo or in vitro. *J Integr Med*. 2014;12(2014):425-38.
- [154] Kikkawa YS, Nakagawa T, Taniguchi M, Ito J. Hydrogen protects auditory hair cells from cisplatin-induced free radicals. *Neurosci Lett*. 2014;579(2014):125-9.
- [155] Szwed M, Jozwiak Z. Genotoxic effect of doxorubicin-transferrin conjugate on human leukemia cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;771(2014):53-63.
- [156] Szwed M, Kania KD, Jozwiak Z. Molecular damage caused by generation of reactive oxygen species in the redox cycle of doxorubicin-transferrin conjugate in human leukemia cell lines. *Leuk Lymphoma*. 2014(2014):1-9.
- [157] Roy SS, Chakraborty P, Bhattacharya S. Intervention in cyclophosphamide induced oxidative stress and DNA damage by a flavonyl-thiazolidinedione based organoselenocyanate and evaluation of its efficacy during adjuvant therapy in tumor bearing mice. *Eur J Med Chem*. 2014;73(2014):195-209.
- [158] Arora S, Bhardwaj A, Singh S, Srivastava SK, McClellan S, Nirodi CS, et al. An undesired effect of chemotherapy: gemcitabine promotes pancreatic cancer cell invasiveness through reactive oxygen species-dependent, nuclear factor kappaB- and hypoxia-inducible factor 1alpha-mediated up-regulation of CXCR4. *J Biol Chem*. 2013;288(2013):21197-207.
- [159] Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437(2013):7-11.
- [160] Shabtay A, Sharabani H, Barvish Z, Kafka M, Amichay D, Levy J, et al. Synergistic antileukemic activity of carnosic acid-rich rosemary extract and the 19-nor

Gemini vitamin D analogue in a mouse model of systemic acute myeloid leukemia. *Oncology*. 2008;75(2008):203-14.

[161] Tang X, Luo YX, Chen HZ, Liu DP. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front Physiol*. 2014;5(2014):175.

[162] Shi H, Norman AW, Okamura WH, Sen A, Zemel MB. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits uncoupling protein 2 expression in human adipocytes. *Faseb j*. 2002;16(2002):1808-10.

[163] Toda C, Diano S. Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014;28(2014):757-64.

[164] Donadelli M, Dando I, Fiorini C, Palmieri M. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(2014):1171-90.

[165] Bhat M, Noolu B, Qadri SS, Ismail A. Vitamin D deficiency decreases adiposity in rats and causes altered expression of uncoupling proteins and steroid receptor coactivator3. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144 Pt B(2014):304-12.

[166] Wong KE, Szeto FL, Zhang W, Ye H, Kong J, Zhang Z, et al. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(2009):E820-8.

[167] Mori S, Yoshizuka N, Takizawa M, Takema Y, Murase T, Tokimitsu I, Saito M. Expression of uncoupling proteins in human skin and skin-derived cells. *J Invest Dermatol*. 2008;128(2008):1894-900.

[168] Park D, Han CZ, Elliott MR, Kinchen JM, Trampont PC, Das S, et al. Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. *Nature*. 2011;477(2011):220-4.

[169] Li L, Prabhakaran K, Zhang X, Zhang L, Liu H, Borowitz JL, Isom GE. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ attenuates cyanide-induced neurotoxicity by inhibiting uncoupling protein-2 up-regulation. *J Neurosci Res*. 2008;86(2008):1397-408.

[170] Salhan D, Husain M, Subrati A, Goyal R, Singh T, Rai P, et al. HIV-induced kidney cell injury: role of ROS-induced downregulated vitamin D receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(2012):F503-14.

[171] Xu Y, Fang F, St Clair DK, Josson S, Sompol P, Spasojevic I, St Clair WH. Suppression of RelB-mediated manganese superoxide dismutase expression reveals a primary mechanism for radiosensitization effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(2007):2048-56.

[172] Izquierdo MJ, Cavia M, Muniz P, de Francisco AL, Arias M, Santos J, Abaigar P. Paricalcitol reduces oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *BMC Nephrol*. 2012;13(2012):159.

- [173] Diker-Cohen T, Koren R, Ravid A. Programmed cell death of stressed keratinocytes and its inhibition by vitamin D: the role of death and survival signaling pathways. *Apoptosis*. 2006;11(2006):519-34.
- [174] Weitsman GE, Koren R, Zuck E, Rotem C, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D sensitizes breast cancer cells to the action of H₂O₂: mitochondria as a convergence point in the death pathway. *Free Radic Biol Med*. 2005;39(2005):266-78.
- [175] Koren R, Wacksberg S, Weitsman GE, Ravid A. Calcitriol sensitizes colon cancer cells to H₂O₂-induced cytotoxicity while inhibiting caspase activation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;101(2006):151-60.
- [176] Lee HJ, Sohn EJ, Lee EO, Kim JH, Lee MH, Kim SH. Inhibition of Connexin 26/43 and Extracellular-Regulated Kinase Protein Plays a Critical Role in Melatonin Facilitated Gap Junctional Intercellular Communication in Hydrogen Peroxide-Treated HaCaT Keratinocyte Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012(2012):589365.
- [177] Ido Y, Duranton A, Lan F, Cacicedo JM, Chen TC, Breton L, Ruderman NB. Acute activation of AMP-activated protein kinase prevents H₂O₂-induced premature senescence in primary human keratinocytes. *PLoS One*. 2012;7(2012):e35092.
- [178] Trump DL, Hershberger PA, Bernardi RJ, Ahmed S, Muindi J, Fakih M, et al. Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90(2004):519-26.
- [179] Wu W, Zhang X, Zanello LP. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D(3) antiproliferative actions involve vitamin D receptor-mediated activation of MAPK pathways and AP-1/p21(waf1) upregulation in human osteosarcoma. *Cancer Lett*. 2007;254(2007):75-86.
- [180] Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996;10(1996):142-53.
- [181] Dai X, Yamasaki K, Yang L, Sayama K, Shirakata Y, Tokumura S, et al. Keratinocyte G2/M growth arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2004):1356-64.
- [182] Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(2006):243-70.
- [183] Burhans WC, Heintz NH. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(2009):1282-93.
- [184] Ibanez IL, Bracalente C, Notcovich C, Tropper I, Molinari BL, Policastro LL, Duran H. Phosphorylation and subcellular localization of p27Kip1 regulated by hydrogen peroxide modulation in cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(2012):e44502.

- [185] Carreras MC, Converso DP, Lorenti AS, Barbich M, Levisman DM, Jaitovich A, et al. Mitochondrial nitric oxide synthase drives redox signals for proliferation and quiescence in rat liver development. *Hepatology*. 2004;40(2004):157-66.
- [186] Antunes F, Cadenas E. Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(2001):1008-18.
- [187] Burch PM, Heintz NH. Redox regulation of cell-cycle re-entry: cyclin D1 as a primary target for the mitogenic effects of reactive oxygen and nitrogen species. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(2005):741-51.
- [188] Onumah OE, Jules GE, Zhao Y, Zhou L, Yang H, Guo Z. Overexpression of catalase delays G0/G1- to S-phase transition during cell cycle progression in mouse aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(2009):1658-67.
- [189] Wagner JM, Karnitz LM. Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. *Mol Pharmacol*. 2009;76(2009):208-14.
- [190] He G, Kuang J, Khokhar AR, Siddik ZH. The impact of S- and G2-checkpoint response on the fidelity of G1-arrest by cisplatin and its comparison to a non-cross-resistant platinum(IV) analog. *Gynecol Oncol*. 2011;122(2011):402-9.
- [191] Bennukul K, Numkliang S, Leardkamolkarn V. Melatonin attenuates cisplatin-induced HepG2 cell death via the regulation of mTOR and ERCC1 expressions. *World J Hepatol*. 2014;6(2014):230-42.
- [192] Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*. 1993;14(1993):833-9.
- [193] Herbert KJ, Cook AL, Snow ET. SIRT1 inhibition restores apoptotic sensitivity in p53-mutated human keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;277(2014):288-97.
- [194] Gumulec J, Balvan J, Sztalmachova M, Raudenska M, Dvorakova V, Knopfova L, et al. Cisplatin-resistant prostate cancer model: Differences in antioxidant system, apoptosis and cell cycle. *Int J Oncol*. 2014;44(2014):923-33.
- [195] di Pietro A, Koster R, Boersma-van Eck W, Dam WA, Mulder NH, Gietema JA, et al. Pro- and anti-apoptotic effects of p53 in cisplatin-treated human testicular cancer are cell context-dependent. *Cell Cycle*. 2012;11(2012):4552-62.
- [196] Moffatt KA, Johannes WU, Miller GJ. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 1999;5(1999):695-703.

- [197] Gogna R, Madan E, Keppler B, Pati U. Gallium compound GaQ(3) -induced Ca(2+) signalling triggers p53-dependent and -independent apoptosis in cancer cells. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2012):617-36.
- [198] Diker-Cohen T, Koren R, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D protects keratinocytes from apoptosis induced by osmotic shock, oxidative stress, and tumor necrosis factor. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1010(2003):350-3.
- [199] Kim DK, Cho ES, Um HD. Caspase-dependent and -independent events in apoptosis induced by hydrogen peroxide. *Exp Cell Res*. 2000;257(2000):82-8.
- [200] Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2001):589-98.
- [201] Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W, Vandenabeele P. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med*. 1998;188(1998):919-30.
- [202] Hamzeloo-Moghadam M, Aghaei M, Fallahian F, Jafari SM, Dolati M, Abdolmohammadi MH, et al. Britannin, a sesquiterpene lactone, inhibits proliferation and induces apoptosis through the mitochondrial signaling pathway in human breast cancer cells. *Tumour Biol*. 2014(2014).
- [203] Maharjan S, Oku M, Tsuda M, Hoseki J, Sakai Y. Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Sci Rep*. 2014;4(2014):5896.
- [204] Camara AK, Lesnefsky EJ, Stowe DF. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(2010):279-347.
- [205] Javadov S, Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(2007):1-22.
- [206] Nair RR, Emmons MF, Cress AE, Argilagos RF, Lam K, Kerr WT, et al. HYD1-induced increase in reactive oxygen species leads to autophagy and necrotic cell death in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(2009):2441-51.
- [207] Chen HM, Zhu BZ, Chen RJ, Wang BJ, Wang YJ. The pentachlorophenol metabolite tetrachlorohydroquinone induces massive ROS and prolonged p-ERK expression in splenocytes, leading to inhibition of apoptosis and necrotic cell death. *PLoS One*. 2014;9(2014):e89483.
- [208] Pelin M, Sosa S, Pacor S, Tubaro A, Florio C. The marine toxin palytoxin induces necrotic death in HaCaT cells through a rapid mitochondrial damage. *Toxicol Lett*. 2014;229(2014):440-50.
- [209] Pelin M, Zanette C, De Bortoli M, Sosa S, Loggia RD, Tubaro A, Florio C. Effects of the marine toxin palytoxin on human skin keratinocytes: role of ionic imbalance. *Toxicology*. 2011;282(2011):30-8.

- [210] Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard SS, Stehlik C, Wang L, Rojanasakul Y. Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(2012):1643-54.
- [211] Sharan C, Halder SK, Thota C, Jaleel T, Nair S, Al-Hendy A. Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-O-methyltransferase. *Fertil Steril.* 2011;95(2011):247-53.
- [212] Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ.* 2012;19(2012):75-86.
- [213] Gao FH, Liu F, Wei W, Liu LB, Xu MH, Guo ZY, et al. Oridonin induces apoptosis and senescence by increasing hydrogen peroxide and glutathione depletion in colorectal cancer cells. *Int J Mol Med.* 2012;29(2012):649-55.
- [214] Richardson K, Allen SP, Mortiboys H, Grierson AJ, Wharton SB, Ince PG, et al. The effect of SOD1 mutation on cellular bioenergetic profile and viability in response to oxidative stress and influence of mutation-type. *PLoS One.* 2013;8(2013):e68256.
- [215] Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B. Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(2010):865-77.
- [216] St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 2006;127(2006):397-408.
- [217] Gisondi P, Rossini M, Di Cesare A, Idolazzi L, Farina S, Beltrami G, et al. Vitamin D status in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol.* 2012;166(2012):505-10.
- [218] Yin L, Ordonez-Mena JM, Chen T, Schottker B, Arndt V, Brenner H. Circulating 25-hydroxyvitamin D serum concentration and total cancer incidence and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Prev Med.* 2013;57(2013):753-64.

SPIS TABEL

Tabela 1. Status osobniczy witaminy D₃ wyznaczany na podstawie stężenia jej głównego metabolitu, 25OH D₃, w surowicy krwi.

Tabela 2. Rekomendowane dawki dziennego spożycia witaminy D.

Tabela 3. Charakterystyka głównych reaktywnych form tlenu.

Tabela 4. Skład 1 x stężonego roztworu do odwrotnej transkrypcji.

Tabela 5. Sekwencje starterów projektowanych w celu powielania fragmentów genów ludzkich związanych z metabolizmem i aktywnością witaminy D oraz ze stresem oksydacyjnym wraz z uwzględnieniem długości fragmentów oraz temperaturą ich topnienia. VDR – receptor witaminy D, PDIA3 – izomeraza dwusiarczkowa, CYP27B1 – 1- α -hydroksylaza, CYP3A4 – 25-hydroksylaza, CYP24A1 – 24-hydroksylaza, SOD1 i 2 – dysmutaza nadadtlenkowa, CAT – katalaza, gen kontrolny: RPL37A. (*) długość produktu reakcji PCR w parach zasad.

Tabela 6. Skład 1 x stężonego roztworu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 7. Najczęściej stosowany profil czasowo – temperaturowy reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 8. Porównanie wartości Ec₅₀ wyznaczonych dla analogów witaminy D.

Tabela 9. Porównanie wartości Ec₅₀ wyznaczonych dla nadtlenu wodoru oraz nadtlenu wodoru stosowanego jednocześnie z analogami witaminy D w stężeniu 10 nM.

Tabela 10. Porównanie wartości Ec₅₀ wyznaczonych dla cisplatyny oraz cisplatyny stosowanej jednocześnie z 10 nM kalcytriolem.

SPIS SCHEMATÓW

Schematy 1 – 10: Plan doświadczeń.

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat produkcji witaminy D₃ w skórze z 7 – dehydrocholesterolu pod wpływem promieniowania UVB.

Rycina 2. Klasyczna droga aktywacji cholekalcyferolu poprzez następujące po sobie etapy hydroksylacji, w wyniku których powstaje hormon w pełni aktywny biologicznie – 1,25(OH)₂D₃, kalcytriol.

Rycina 3. Klasyczny mechanizm działania witaminy D₃.

Rycina 4. Główne efekty wywierane przez biologicznie aktywną formę witaminy D₃ w różnych tkankach docelowych.

Rycina 5. Wzory strukturalne analogów witaminy D: 1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) oraz kalcyotropoliu (D).

Rycina 6. Wzór strukturalny wolnego rodnika DPPH[•].

Rycina 7. Porównanie wpływu 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) i kalcyotropoliu (D) na żywotność linii komórkowej HaCaT z zastosowaniem testu SRB. Komórki inkubowano ze związkami w stężeniach od 0,1 pM do 1 μM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce oraz pożywce z etanolem w ilości odpowiadającej zawartości etanolu w próbce o najwyższym stężeniu analogów witaminy D. Do analizy istotności statystycznej użyto testu One – Way ANOVA (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów ± SD, normalizowane względem kontroli.

Rycina 8. Wpływ nadtlenu wodoru na żywotność linii komórkowej HaCaT określony z zastosowaniem testu SRB. Komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniach od 0,0256 - 5 mM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce. Do analizy istotności statystycznej użyto testu One – Way ANOVA (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów ± SD, normalizowane względem kontroli.

Rycina 9. Porównanie wpływu nadtlenu wodoru lub nadtlenu wodoru podawanego jednocześnie z analogami witaminy D: 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) i kalcyotropolem (D) na żywotność linii komórkowej HaCaT z zastosowaniem testu SRB. Komórki inkubowano z nadtlakiem wodoru w stężeniach od 0,0256 – 5 mM bądź z analogami witaminy D w stężeniu 10 nM łącznie z nadtlakiem wodoru w stężeniach 0,0256 – 5 mM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce oraz pożywce z etanolem w ilości odpowiadającej zawartości etanolu w próbce o najwyższym stężeniu analogów witaminy D. W celu W celu wyeksponowania różnic dla paneli A, B, C i D zastosowano na ten sam wykres działania nadtlenu wodoru. Do analizy istotności statystycznej użyto testu One – Way ANOVA (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów ± SD, normalizowane względem kontroli.

Rycina 10. Wpływ cisplatyny na żywotność linii komórkowej HaCaT określony z zastosowaniem testu SRB. Komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniach od

0,00384 – 300 μM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce. Do analizy istotności statystycznej użyto test One – Way ANOVA (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów $\pm$ SD, normalizowane względem kontroli.

Rycina 11. Porównanie wpływu cisplatyny lub cisplatyny stosowanej równocześnie z 1,25(OH) $_2$ D $_3$ na żywotność linii komórkowej HaCaT z zastosowaniem testu SRB. Komórki inkubowano z cisplatyną w stężeniach od 0,00384 – 300 μM bądź 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w stężeniu 10 nM z cisplatyną w stężeniach 0,00384 – 300 μM przez 24 godziny. Jako kontrolę wykorzystano komórki inkubowane w samej pożywce. Do analizy istotności statystycznej użyto test One – Way ANOVA (GraphPad Prism) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresach pokazano wartości średnie z 3 niezależnych pomiarów $\pm$ SD normalizowane względem kontroli.

Rycina 12. Reprezentacyjny wynik analizy cytometrycznej cyklu komórkowego po barwieniu komórek linii HaCaT jodkiem propidyny. Komórki poddawano działaniu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w stężeniu 100 nM lub H $_2$ O $_2$ w stężeniu 1 mM przez 24 godziny bądź też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w stężeniu 100 nM, po której komórki poddawano działaniu H $_2$ O $_2$ w stężeniu 1 mM.

Rycina 13. Wpływ 1,25(OH) $_2$ D $_3$ na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w zakresie stężeń 0,1 – 100 nM przez 24 godziny, następnie zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 14. Wpływ nadtlenu wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 5 mM przez 24 godziny, następnie zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 15. Porównanie wpływu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w stężeniu 0,1 nM oraz nadtlenu wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w stężeniu 0,1 nM bądź z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w stężeniu 0,1 nM, a następnie komórki poddawano działaniu 0,1 – 2 mM nadtlenu wodoru przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 16. Porównanie wpływu 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w stężeniu 1 nM i nadtlenu wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w stężeniu 1 nM bądź z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 1,25(OH) $_2$ D $_3$ w stężeniu 1 nM, a następnie komórki poddawano działaniu 0,1 – 2 mM nadtlenu wodoru przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem

propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 17. Porównanie wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM i nadtlenu wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM bądź z nadtlaniem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 2 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godziną preinkubację z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 10 nM, a następnie komórki poddawano działaniu 0,1 – 2 mM nadtlenu wodoru przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 18. Porównanie wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM i nadtlenu wodoru na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM bądź z nadtlaniem wodoru w zakresie stężeń 0,1 – 5 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godziną preinkubację z 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM, a następnie komórki poddawano działaniu 0,1 – 5 mM nadtlenu wodoru przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 19. Porównanie wpływu nadtlenu wodoru w stężeniu 1mM i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (A), 20OHD_3 (B), 21OHpD (C) i kalcypotriol (D)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z nadtlaniem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godziną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 20. Porównanie wpływu 12 μM cisplatyny i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (A), 21OHpD (B), kalcypotriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z cisplatyną w stężeniu 12 μM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godziną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu 12 μM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 21. Porównanie wpływu 60 μM cisplatyny i 100 nM związków witaminy D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (A), 21OHpD (B), kalcypotriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii

HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z cisplatyną w stężeniu 60 μM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu 60 μM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 22. Porównanie wpływu cisplatyny w stężeniu 120 μM i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM (1,25(OH) $_2$ D $_3$ (A), 21OHpD (B), kalcypotriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z cisplatyną w stężeniu 120 μM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu 120 μM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 23. Porównanie wpływu cisplatyny w stężeniu 60 μM i analogów witaminy D w stężeniu 60 μM (1,25(OH) $_2$ D $_3$ (A), 21OHpD (B), kalcypotriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM przez 24 godziny bądź z cisplatyną w stężeniu 60 μM przez 48 godzin lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu 60 μM przez kolejne 48 godzin. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 24. Porównanie wpływu cisplatyny w stężeniu 120 μM i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM (1,25(OH) $_2$ D $_3$ (A), 21OHpD (B), kalcypotriol (C)) na cykl komórkowy komórek linii HaCaT. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM przez 24 godziny bądź z cisplatyną w stężeniu 120 μM przez 48 godzin lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu cisplatyny w stężeniu przez kolejne 48 godzin. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 25. Porównanie wpływu nadtlenu wodoru w stężeniu 1mM i analogów witaminy D w stężeniu 100 nM (1,25(OH) $_2$ D $_3$ (A), 20OHD $_3$ (B), 21OHpD (C) i kalcypotriol (D); w ostatnim przypadku wynik pochodzi z odrębnej serii doświadczeń) na cykl komórkowy komórek linii HPEKp. Komórki inkubowano z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM bądź z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1mM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z analogami witaminy D, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu jodkiem propidyny analizowano

cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej zastosowano test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 26. Reprezentacyjny wynik analizy cytometrycznej procesu apoptozy przy pomocy testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) w komórkach linii HaCaT. Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM lub H_2O_2 w stężeniu 1 mM przez 24 godziny bądź też stosowano 24 godzinną preinkubację z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM, po której komórki poddawano działaniu H_2O_2 w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny.

Rycina 27. Porównanie wpływu nadtlenu wodoru oraz $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na indukcję procesu apoptozy przy pomocy testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Komórki inkubowano z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM bądź z nadtlakiem wodoru w zakresie stężeń 0,1 - 5 mM (kolejno wykresy A, B, C i D) przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniach 0,1 – 5 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu Annexyną V/7-AAD analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Rycina 28. Ocena apoptozy przy pomocy testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Komórki inkubowano z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM bądź z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu Annexyną V/7-AAD analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 29. Ocena apoptozy przy pomocy testu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Komórki inkubowano z 21OHpD w stężeniu 100 nM bądź z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny lub też stosowano 24 godzinną preinkubację z 21OHpD w stężeniu 100 nM, a następnie komórki poddawano działaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Komórki zbierano i po barwieniu Annexyną V/7-AAD analizowano cytometrycznie. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; ** $p < 0,01$.

Rycina 30. Reprezentacyjny wynik cytometrycznej analizy zmiany potencjału błony mitochondrialnej komórek linii HaCaT z wykorzystaniem barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM lub H_2O_2 w stężeniu 1 mM przez 24 godziny bądź też stosowano 24 godzinną preinkubację z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM, po której komórki poddawano działaniu H_2O_2 w stężeniu 1 mM.

Rycina 31. Porównanie wpływu preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej i barwienia JC-1.

Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlaniem wodoru w stężeniu 2 mM przez 5 godzin, po czym barwiono JC-1, zdjęcia wykonywano bez utrwalania komórek z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego AxioVert 200. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ani też nadtlaniu wodoru, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Mikrofotografie z Panelu A przedstawiają nałożenie fluorescencji czerwonej i zielonej, zaś panel B różnicę fluorescencji czerwonej i zielonej. W ostatnim panelu brak widocznej fluorescencji mimo obecności komórek ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 +, \text{H}_2\text{O}_2 +$). Powiększenie 200x.

Rycina 32. Ocena wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na zmianę potencjału błony mitochondrialnej z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przez 0,5 – 24 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu kalcytriolu, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Rycina 33. Porównanie wpływu preinkubacji z $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlaniem wodoru w stężeniach 1 – 5 mM przez 1 i 3 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Rycina 34. Porównanie wpływu preinkubacji z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji komórek z nadtlaniem wodoru z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu 20OHD3 (A), 21OHPD (B) lub kalcyotropolu (C) w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlaniem wodoru w stężeniu 1 mM przez 3 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu analogów witaminy D, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Rycina 35. Ocena wpływu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem działania cisplatyny z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z cisplatyną w stężeniach 2,4 - 12 μM przez 3 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu kalcytriolu, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej

do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Rycina 36. Porównanie wpływu preinkubacji komórek HaCaT z analogami witaminy D w stężeniu 100 nM na zmianę potencjału błony mitochondrialnej pod wpływem inkubacji z cisplatyną z wykorzystaniem analizy cytometrycznej i barwienia JC-1. Komórki poddawano działaniu 20OHD₃ (A), 21OHpD (B) lub kalcypotriolu (C) w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z cisplatyną w stężeniu 120 μ M przez 3 godziny, po czym barwiono JC-1 i analizowano cytometrycznie. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niepoddawane działaniu analogów witaminy D, zaś kontrolę pozytywną komórki traktowane CCCP. Dane przedstawiono jako stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Rycina 37. Wpływ preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM na powstawanie reaktywnych form tlenu w komórkach HaCaT pod wpływem inkubacji komórek z nadtlakiem wodoru. Komórki poddawano działaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 1 godzinę, po czym barwiono H₂DCFDA i analizowano cytometrycznie. Kontrolę stanowiły komórki niepoddawane działaniu 1,25(OH)₂D₃ ani też nadtlaku wodoru. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD normalizowane względem kontroli. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Rycina 38. Wpływ preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM na powstawanie reaktywnych form tlenu w komórkach HaCaT pod wpływem inkubacji komórek nadtlakiem wodoru. Komórki poddawano działaniu 1,25(OH)₂D₃ w stężeniu 100 nM przez 24 godziny, a następnie inkubowano z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny, po czym barwiono H₂DCFDA i analizowano cytometrycznie. Kontrolę stanowiły komórki niepoddawane działaniu 1,25(OH)₂D₃ ani też nadtlaku wodoru. Wykres przedstawia wartości średnie uzyskane z trzech niezależnych pomiarów $\pm$ SD normalizowane względem kontroli. Do analizy istotności statystycznej użyto test t Studenta (Microsoft Excel) z rozkładem jednośladowym; * $p < 0,05$.

Rycina 39. Ocena zdolności prekursora witaminy D (A) oraz analogów witaminy D (1,25(OH)₂D₃ (B), 20OHD₃ (C), 21OHpD (D), kalcypotriol (E)) do zmiatania wolnego rodnika DPPH $\cdot$. Związki rozcieńczano seryjnie w 96% etanolu i inkubowano z roztworem DPPH $\cdot$ w stężeniu 50 μ M. Mierzono absorbancję przy długości fali 517 nm. Etanolowy roztwór BHT zastosowano jako kontrolę o właściwościach antyoksydacyjnych.

Rycina 40. Porównanie poziomu mRNA genu SOD1 w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25(OH)₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach $\pm$ SD dla trzech niezależnych pomiarów,

w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

Rycina 41. Porównanie poziomu mRNA genu SOD2 w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach ± SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

Rycina 42. Porównanie poziomu mRNA genu CAT w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach ± SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

Rycina 43. Porównanie poziomu mRNA genu VDR w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach ± SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

Rycina 44. Porównanie poziomu mRNA genu CYP3A4 w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach ± SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

Rycina 45. Porównanie poziomu mRNA genu CYP27B1 w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlakiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności

statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach $\pm$ SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

Rycina 46. Porównanie poziomu mRNA genu CYP24A1 w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlutkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach $\pm$ SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

Rycina 47. Porównanie poziomu mRNA genu PDIA3 w linii komórkowej HaCaT poddawanej preinkubacji z 1,25OH₂D₃ (A), 20OHD₃ (B), 21OHpD (C) lub kalcypotriolem (D) w stężeniu 10 nM przez 24 godziny, a następnie inkubacji z nadtlutkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez kolejne 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach $\pm$ SD dla trzech niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

Rycina 48. Porównanie poziomu mRNA genów CYP24A1 (A), VDR (B), CYP27B1 (C) oraz PDIA3 (D) w linii komórkowej HaCaT. Komórki inkubowano z 1,25OH₂D₃ w stężeniu 10 nM przez 48 godzin, bądź z nadtlutkiem wodoru w stężeniu 1 mM przez 24 godziny albo też po upływie 24 godzinnej inkubacji z 1,25OH₂D₃ w stężeniu 10 nM do pożywki dodawano nadtlutek wodoru w stężeniu 1 mM i inkubowano przez 24 godziny. Do analizy istotności statystycznej użyto testu t z rozkładem jednośladowym z dwiema próbami o równej wariancji; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach $\pm$ SD dla dwóch niezależnych pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego RPL37A. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych.

Rycina 49. Hipotetyczny mechanizm wzmacniania efektu wywieranego przez nadtlutek wodoru w komórkach HaCaT przez preinkubację z witaminą D.