

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Technologii Leków i Biochemii

Rozprawa doktorska

Wpływ pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na indukcję stresu oksydacyjnego, apoptozy, katastrofy mitotycznej, autofagii oraz starzenia komórek nowotworowych.

mgr inż. Dorota Nowak-Ziatyk

Promotor: prof. dr hab. inż. Jerzy Konopa

Gdańsk 2011

...Moim Rodzicom w podziękowaniu...

Panu Profesorowi Jerzemu Konopie serdecznie dziękuję za nadanie kierunku mojej pracy, przekazaną wiedzę oraz pomoc i czas poświęcony podczas pisania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pani Doktor Ewie Augustin i Pani Doktor Zofii Mazerskiej dziękuję za przekazaną wiedzę oraz podtrzymywanie wiary w chwilach zwątpienia.

Pani Doktor Annie Skwarskiej dziękuję za przekazaną wiedzę, wspólne wyprawy cytometryczne, rzeczowe uwagi i dyskusje podczas prowadzenia badań oraz pisania niniejszej rozprawy, a także za wspaniałe wsparcie w każdej sytuacji i najfajniejsze wspomnienia z okresu Studium Doktoranckiego.

Magdalenie Niemirze dziękuję za pomoc w trakcie realizacji badań oraz nieustanne wsparcie.

Calemu Zespołowi i Koleżankom z laboratorium dziękuję za życzliwe rady i miłą atmosferę pracy.

Moim Kochanym Rodzicom dziękuję za ich miłość, wyrozumiałość, wiarę we mnie i za milion innych rzeczy, których nie wyrażą zwykłe słowa.

Mojemu Mężowi dziękuję za cierpliwość, wyrozumiałość, pomoc przy edycji niniejszej pracy oraz za gotowość do jadania na mieście.

Mojej Kochanej Córci Natalii dziękuję za to, że dzięki niej doświadczyłam tego rodzaju miłości, za który ludzie dobrowolnie oddają życie.

Wykaz najważniejszych skrótów zastosowanych w pracy:

C-1748	9-(2'-hydroksyloetylamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna
Cdc2	kinaza cyklino-zależna 1 (Cdk1)
DAPI	4,6-diamino-fenylindol
EC ₅₀ , EC ₉₀	stężenia związków hamujące proliferację komórek w hodowli komórkowej <i>in vitro</i> odpowiednio w 50% i 90% w stosunku do komórek nie traktowanych związkiem
JC-1	jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny
MAP I LC3	białko – marker procesu autofagii (ang. <i>Microtubule Associated Protein I Light Chain 3</i>)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy
p53	białko supresorowe transformacji nowotworowej
PBS	roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami
PI	jodek propidyny
RFT	reaktywne formy tlenu
SA-β-gal	enzym SA-β-galaktozydaza (ang. <i>senescent - associated β-galactosidase</i>)
TUNEL	technika wykrywająca wolne końce 3'-OH pofragmentowanego DNA (ang. <i>Terminal deoksynukleotydyl transferase mediated d-UTP Nick End Labelling</i>)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolylo-β-D-galaktopyranozyd
ΔΨ _m	mitochondrialny potencjał błonowy

Spis treści

I.	Część teoretyczna	1
I.1.	Reaktywne formy tlenu i ich rola – wprowadzenie.....	1
I.2.	Zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe źródła RFT.....	3
I.3.	Uszkodzenie składników komórek przez reaktywne formy tlenu.....	7
I.3.1.	Białka jako pierwotny obiekt ataku reaktywnych form tlenu w komórce.....	8
I.3.2.	Peroksydacja lipidów.....	9
I.3.3.	Uszkodzenie kwasów nukleinowych przez reaktywne formy tlenu.....	12
I.4.	Rola reaktywnych form tlenu w warunkach fizjologicznych i metaboliczne efekty stresu oksydacyjnego.....	14
I.5.	Reaktywne formy tlenu, a choroby nowotworowe.....	18
I.5.1.	RFT – przyczyna czy skutek choroby nowotworowej?.....	18
I.5.2.	Adaptacja komórek nowotworowych do warunków podwyższonego poziomu RFT.....	21
I.5.3.	Reaktywne formy tlenu jako narzędzie walki z chorobami nowotworowymi.....	22
I.5.3.1.	RFT generowane przez chemoterapeutyki przeciwnowotworowe oraz ich rola w indukcji apoptozy.....	23
I.5.3.2.	Udział RFT w procesie starzenia komórek.....	33
II.	Wprowadzenie, założenia i cel pracy	35
III.	Omówienie przeprowadzonych badań i dyskusja wyników	42
III.1.	Wpływ pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29.....	42
III.1.1.	Generowanie przez związek C-1748 reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29.....	43

III.1.2	Oznaczenie poziomu zredukowanej formy glutationu (GSH) w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29, poddanych działaniu związku C-1748.....	46
III.1.3	Wpływ reaktywnych form tlenu, generowanych przez 4-metylo-1-nitroakrydynę C-1748, na aktywność biologiczną tego związku w stosunku do komórek HCT8 i HT29.....	49
III.1.4	Podsumowanie badań dotyczących wpływu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29.....	54
III.2.	Charakterystyka odpowiedzi komórek ludzkich raków jelita grubego HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.....	55
III.2.1.	Wpływ związku C-1748 na proliferację oraz progresję komórek HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+} w ich cyklu życiowym.....	56
III.2.2.	Analiza progresji komórek HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+} , poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, z fazy G2 cyklu życiowego do mitozy.....	67
III.2.3.	Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji katastrofy mitotycznej w komórkach HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+}	71
III.2.4.	Badanie, w oparciu o metody biochemiczne, apoptotycznej śmierci komórek HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+} , indukowanej przez pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.....	82
III.2.4.1.	Badanie apoptozy w oparciu o zmiany w błonie plazmatycznej komórek HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+} traktowanych związkiem C-1748.....	82
III.2.4.2.	Określenie funkcji mitochondriów w procesie apoptozy komórek HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+} , indukowanej przez związek C-1748.....	91
III.2.4.3.	Stwierdzenie obecności aktywnej formy kaspazy-3 w komórkach HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+} traktowanych związkiem C-1748....	95
III.2.5.	Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji autofagii w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+}	98

III.2.6.	Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do uruchomienia procesu przyspieszonego starzenia komórek ludzkich raków jelita grubego HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+}	109
III.2.7.	Podsumowanie badań dotyczących odpowiedzi komórek ludzkich raków jelita grubego HCT116 p53 ^{-/-} i HCT116 p53 ^{+/+} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.....	119
III.3.	Charakterystyka odpowiedzi komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.....	124
III.3.1.	Wpływ związku C-1748 na proliferację oraz progresję komórek LNCaP w ich cyklu życiowym.....	124
III.3.2.	Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji apoptozy komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP.....	127
III.3.3.	Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji autofagii w komórkach ludzkiego raka prostaty LNCaP.....	133
III.3.4.	Określenie zdolności związku C-1748 do uruchomienia procesu przyspieszonego starzenia komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP.....	136
III.3.5.	Podsumowanie badań dotyczących odpowiedzi komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.....	142
IV.	Część doświadczalna	144
IV.1.	Materiał doświadczalny.....	144
IV.1.1.	Badany związek przeciwnowotworowy.....	144
IV.1.2.	Linie komórkowe oraz materiały używane do prowadzenia hodowli komórkowej.....	144
IV.1.3.	Stosowane związki chemiczne i zestawy.....	145
IV.1.4.	Barwniki i enzymy.....	145
IV.1.5.	Przeciwciała.....	146
IV.2.	Metody doświadczalne.....	146
IV.2.1.	Hodowla komórek nowotworowych.....	146

IV.2.2.	Detekcja reaktywnych form tlenu (RFT) w cytoplazmie lub w mitochondriach komórek HCT8 i HT29 traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, przy wykorzystaniu techniki cytometrii przepływowej.....	147
IV.2.3.	Oznaczanie poziomu zredukowanej formy glutationu (GSH) w komórkach HCT8 i HT29 metodą spektrofluorymetryczną...	148
IV.2.4.	Badanie wpływu generowanych RFT na cytotoksyczność pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 wobec komórek HCT8 i HT29.....	148
IV.2.5.	Oznaczanie aktywności biologicznej związku C-1748 wobec komórek nowotworowych HCT116 p53 ^{+/+} , HCT116 p53 ^{-/-} i LNCaP w oparciu o liczenie ilości komórek.....	149
IV.2.6.	Badanie wpływu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na cykl życiowy komórek nowotworowych przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej.....	150
IV.2.7.	Obserwacje zmian w morfologii komórek nowotworowych przy wykorzystaniu techniki mikroskopii fluorescencyjnej.....	150
IV.2.8.	Analiza zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej komórek nowotworowych traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.....	151
IV.2.9.	Cytometryczna analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$	152
IV.2.10.	Badanie zmian ilości komórek nowotworowych posiadających aktywną kaspazę-3.....	152
IV.2.11.	Obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach nowotworowych, traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.....	153
IV.2.12.	Oznaczanie aktywności SA- β -galaktozydazy w komórkach nowotworowych.....	154
IV.2.13.	Immunodetekcja białek metodą Western blotting.....	155
V.	Streszczenie i wnioski.....	157
VI.	Literatura	166

I. Część teoretyczna.

I.1. Reaktywne formy tlenu i ich rola – wprowadzenie.

Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w wielu procesach biologicznych, jak również w wyniku działania na komórkę różnych czynników fizycznych i chemicznych. Niewielkie, fizjologiczne stężenie RFT zapewnia prawidłowe funkcjonowanie komórki, jej wzrost, różnicowanie czy proliferację. W warunkach homeostazy, reaktywne formy tlenu odgrywają rolę mediatorów i regulatorów wielu procesów komórkowych [Gałęcka E. i wsp., 2008]. Z kolei wzrost stacjonarnych stężeń RFT, w wyniku ich wzmożonej produkcji lub osłabienia aktywności enzymów ochronnych i obniżenia poziomu komórkowych antyoksydantów, wywołuje w komórkach stres oksydacyjny. Niekorzystne działanie reaktywnych form tlenu objawia się przede wszystkim destrukcją podstawowych składników komórki, czyli białek, kwasów nukleinowych oraz lipidów. W związku z tym, ekspozycja komórki na wyższe stężenia wolnych rodników tlenowych, może prowadzić do jej śmierci lub uruchomienia procesu starzenia komórkowego [Ramsey M. R. i Sharpless N. E., 2006]. Na straży przed toksycznym działaniem RFT stoją dwa systemy antyoksydacyjne: enzymatyczny (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa) i nieenzymatyczny (drobnocząsteczkowe substancje zdolne do neutralizacji RFT, takie jak glutation, kwas askorbinowy czy melatonina) [Zabłocka A. i Janusz M., 2008]. Dokładne poznanie mechanizmów działania reaktywnych form tlenu stwarza nowe możliwości ingerencji w choroby, w rozwoju których molekuly te uczestniczą, jak również może prowadzić do opracowania innowacyjnych metod terapeutycznych.

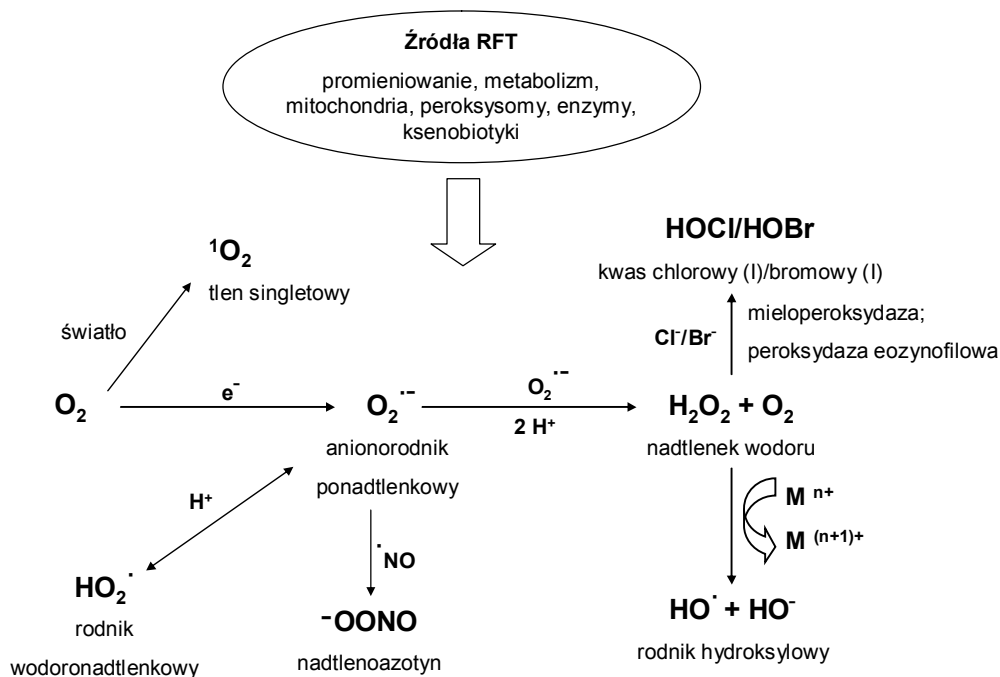
Tlen cząsteczkowy, reagując ze związkami organicznymi utlenia je pobierając od nich elektrony, a sam ulega redukcji. Możliwości reakcji cząsteczki tlenu są jednak ograniczone ze względu na jej trypletowy stan. Całkowita redukcja cząsteczki tlenu oznacza przyłączenie czterech elektronów i czterech protonów, w wyniku czego powstają dwie cząsteczki wody [James M. A. i wsp., 2005]. Jednak tlen nie zawsze ulega pełnej, czteroelektronowej redukcji, czego konsekwencją jest generowanie jego reaktywnych form.

Wolne rodniki definiuje się jako indywidua chemiczne (cząsteczki lub jony), które posiadają na powłoce walencyjnej reaktywnego atomu co najmniej jeden niesparowany, wolny elektron. Wolne rodniki tlenowe (WRT) zawierają w swej strukturze atom tlenu, np.: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy (HO^{\cdot}), rodnik

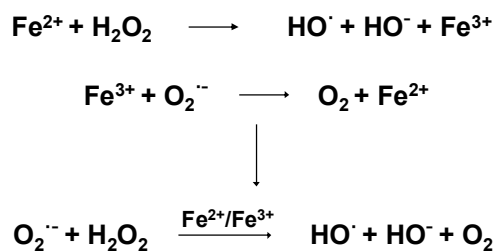
wodoronadtlenkowy (HO_2^\cdot), rodnik nadtlenkowy (ROO^\cdot) oraz rodnik alkoksyłowy (RO^\cdot). Pozostałe reaktywne formy tlenu nie mają charakteru rodnikowego, np.: nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz tlen singletowy ($^1\text{O}_2$).

Obok wymienionych wyżej reaktywnych form tlenu, będących główną przyczyną toksyczności tego pierwiastka, należy wspomnieć również o innych RFT, które mogą pośredniczyć w jego toksycznym działaniu. Są to przede wszystkim alotropowa odmiana tlenu (ozon O_3) oraz powstające w wyniku reakcji metabolicznych: tlenek azotu (NO), dwutlenek azotu (NO_2) kwas nadtlenoazotawy (HONO_2), kwas podchlorawy (HOCl) oraz kwas podtocyjanawy (HOSCN) [Bartosz G., 2003].

W większości układów biologicznych tworzony jest pierwotnie anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Jednak występowanie jednej formy RFT oznacza pojawienie się również i innych. Anionorodnik ponadtlenkowy ulega bowiem dysmutacji, tworząc H_2O_2 . Reakcja ta jest zazwyczaj katalizowana przez enzym zwany dysmutazą ponadtlenkową (SOD), przy czym proces ten może zachodzić także bez udziału enzymów. Nadtlenek wodoru może z kolei brać udział w reakcji Fentona, w wyniku której powstają: anion wodorotlenkowy (HO^-) i niezwykle reaktywny rodnik hydroksylowy (HO^\cdot), który ulega redukcji pod wpływem dwóch różnych enzymów: katalazy lub peroksydazy glutationowej, tworząc przy tym wodę [Inoue M. i wsp., 2003; Qiang M., 2010].



Rys.1. Reaktywne formy tlenu (opracowane na podstawie [Zaremba T. i Oliński R., 2010]).



Rys. 2. Reakcja Fentona.

I.2. Zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe źródła RFT.

Reaktywne formy tlenu powstają w komórce między innymi w wyniku działania na roztwory wodne zewnętrznych czynników fizycznych, takich jak promieniowanie nadfioletowe, promieniowanie jonizujące i ultradźwięki [Riesz P. i Kondo T., 1992; Kovacic P. i Osuna J. A., 2000; Mark G. i wsp., 2000; Chen Q. i wsp., 2003]. Z kolei wewnątrzkomórkowe źródła RFT obejmują przede wszystkim procesy jednoelektronowego utleniania zredukowanych form wielu związków przez tlen cząsteczkowy oraz szereg reakcji enzymatycznych [Bartosz G., 2003]. Najważniejszym wewnątrzkomórkowym źródłem reaktywnych form tlenu są mitochondria, ponieważ pewna część elektronów przepływających przez łańcuch oddechowy może redukować tlen w procesie jednoelektronowym, w wyniku czego powstaje anionorodnik ponadtlenkowy [Adam-Vizi V. i Chinopoulos Ch., 2006].

Jak już wspomniano, istotne źródło anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot -}$) stanowią reakcje zredukowanych form wielu związków niskocząsteczkowych (RH_2) z tlenem. W reakcji jednoelektronowego utlenienia, którą znacznie przyspieszają jony metali przejściowych, powstaje zarówno $\text{O}_2^{\cdot -}$, jak i wolny rodnik $^\cdot\text{RH}$. W reakcjach tego typu biorą udział ważne biologicznie substancje, takie jak: zredukowana ryboflawina, zredukowane nukleotydy flawinowe, katecholoaminy i związki tiolowe (np. glutation) [Bartosz G., 2003].

Jednoelektronowemu utlenieniu mogą również ulegać obce dla organizmu ksenobiotyki. Do tej grupy substancji zaliczamy niektóre składniki pożywienia, leki, kosmetyki, pestycydy, konserwanty żywności, mykotoksyny i inne. Mechanizm toksyczności wielu z wyżej wymienionych związków opiera się właśnie na generowaniu reaktywnych form tlenu lub azotu. Każda cząsteczka ksenobiotyku może wytwarzać wiele cząsteczek RFT, ponieważ związki te ulegają w komórkach cyklicznej redukcji i cyklicznie reagują z tlenem. Wiele chemoterapeutyków zawiera w swej strukturze ugrupowania biorące udział w reakcjach oksydoredukcyjnych, co w konsekwencji sprzyja generowaniu reaktywnych form

tłenu przez te związki. Są to między innymi: mitomycyna C, antracykliny, etopozyd, tamoksifen oraz związki aromatyczne posiadające grupę nitrową [Kovacic P. i Osuna J. A., 2000]. Indukcja RFT przez chemoterapeutyki może odgrywać ważną rolę w procesie leczenia nowotworów, choć z drugiej strony może również stanowić istotną komplikację takiej terapii (tak jak w przypadku mitomycyny C czy antracyklin) [Olson R. D. i wsp., 1980].

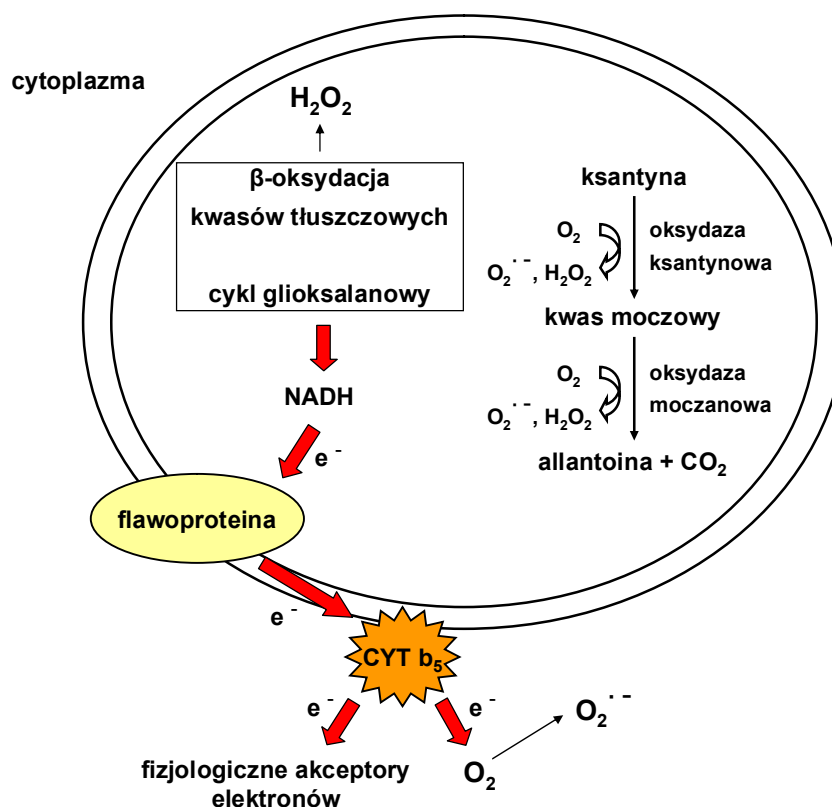
Jednym ze źródeł reaktywnych form tlenu w komórce jest mikrosomalny łańcuch transportu elektronów, odpowiedzialny za utlenianie wielu ksenobiotyków. W łańcuchu tym, NADPH redukuje enzym - reduktazę cytochromu P-450, a ten z kolei redukuje cytochrom P-450, który w takiej formie wiąże tlen i przeprowadza hydroksylację substratu. W wyniku reakcji zredukowanej formy reduktazy cytochromu P-450 z tlenem, a także na skutek rozpadu oksy- i peroksycytochromu P-450, wytwarzane są $O_2^{\cdot -}$ oraz H_2O_2 [Gabbita S. P. i wsp., 2000; Matés M. J. i Sánchez-Jiménez M. F., 2000].

Reaktywne formy tlenu mogą powstawać także na skutek utleniania białek oddechowych, którymi w komórkach kręgowców są hemoproteiny: hemoglobina (obecna w erytrocytach) i mioglobina (występująca w mięśniach). Grupy hemowe obu białek zawierają jon żelaza Fe^{2+} , który w kontakcie z tlenem łatwo ulega utlenieniu do jonów żelaza Fe^{3+} . Utlenianie to jest reakcją jednoelektronową, w wyniku której powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$). W erytrocytach człowieka, w ciągu doby, około 3% hemoglobiny ulega utlenieniu do methemoglobiny i reakcja ta jest głównym źródłem $O_2^{\cdot -}$ w tychże komórkach [Bartosz G., 2003]. W obecności donorów elektronów (np. hydrochinonów, aminofenoli lub azotynów) dochodzi do dwuelektronowej redukcji tlenu związanego z hemoglobina, na skutek czego powstaje nadtlenek wodoru (H_2O_2) [Halliwell B. i Gutteridge J. M. C., 1999].

Kolejnym wewnątrzkomórkowym źródłem reaktywnych form tlenu są niektóre reakcje enzymatyczne. Oksydazy, zawierające obok jonu metalu dinukleotyd flawinoadeninowy jako koenzym, biorą udział w reakcjach, w wyniku których powstaje nadtlenek wodoru (H_2O_2). Do tej klasy enzymów należą między innymi: oksydaza aldehydowa, oksydaza D-aminokwasowa, oksydaza α -hydroksykwasowa, oksydaza ksantynowa, oksydaza acylokoenzymu A, oksydaza glutarylokoenzymu A, oksydaza galaktozowa oraz oksydaza glikolanowa [Percy M. E., 1984]. Reakcje enzymatyczne prowadzą również do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot -}$), przy czym proces ten stanowi zazwyczaj reakcję uboczną, konkurencyjną wobec katalitycznej reakcji enzymu i polega na jednoelektronowym utlenieniu przez tlen zredukowanej formy koenzymu, pojawiającej się w toku reakcji. Do enzymów generujących $O_2^{\cdot -}$ należą np.: oksydaza

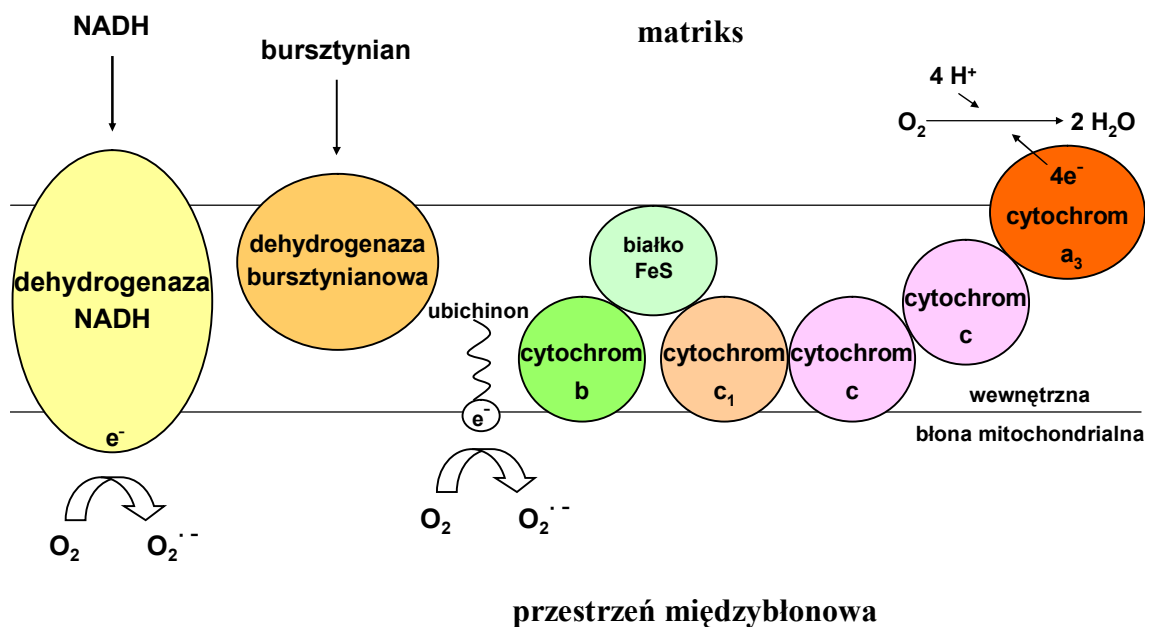
ksantynowa, oksydaza NAD(P)H fagocytów, oksydoreduktaza NAD(P)H:cytochrom c, reduktaza cytochromu P-450, reduktaza glutationowa i wiele innych [Maeda H. i wsp., 1999].

Głównym źródłem nadtlenu wodoru w komórce są peroksysomy. Organelle te, zwane początkowo mikrociałkami, mogą pełnić różnorodne funkcje w różnych tkankach. W każdej tkance zawierają one co najmniej jedną oksydazę flawinową, wytwarzającą H_2O_2 na drodze bezpośredniej, dwuelektronowej redukcji cząsteczki tlenu. W zależności od rodzaju tkanki w jakiej występują peroksysomy, oksydazami takimi mogą być: oksydaza D-aminokwasowa, oksydaza α -hydroksykwasowa, oksydaza glikolanowa, oksydaza acylokoenzymu A oraz oksydaza glutarylokoenzymu A. Ponadto, w peroksysomach może występować oksydaza moczanowa, nie będąca flawoproteina. Peroksysomy są też źródłem anionorodnika ponadtlennowego ($O_2^{\cdot -}$), który powstaje na skutek zachodzenia reakcji z udziałem oksydazy ksantynowej oraz funkcjonowania obecnego w błonie tych organeli łańcucha transportu elektronów, składającego się z flawoproteiny - reduktazy NADH i cytochromu b_5 [Farber L. J., 1994; Matés M. J. i Sánchez-Jiménez M. F., 2000].



Rys. 3. Powstawanie RFT w peroksysomach. Nadtlenek wodoru powstaje w wyniku działania oksydaz biorących udział w procesie β -oksydacji kwasów tłuszczowych i w cyklu glioksalanowym, jak również w wyniku działania oksydazy ksantynowej. Za powstawanie anionorodnika ponadtlennego odpowiedzialna jest oksydaza ksantynowa oraz błonowy łańcuch transportu elektronów, w skład którego wchodzi flawoproteina i cytochrom b_5 (opracowane na podstawie [Bartosz G., 2003]).

Podstawowa funkcja biologiczna mitochondriów komórek eukariotycznych polega na dostarczaniu komórce ATP oraz regulacji procesu apoptozy w wyniku uwalniania czynników proapoptotycznych. Jednak organelle te są również głównym źródłem reaktywnych form tlenu w komórkach ssaków [Morel Y. i Barouki R., 1999]. Pomimo, iż łańcuch oddechowy jest wyrafinowanym tworem ewolucji biochemicznej, to jednak konstrukcja ta nie jest doskonała z punktu widzenia prewencji powstawania RFT. Przepływ elektronów przez łańcuch oddechowy nie jest zupełnie „szczelny”, w związku z czym procesowi fosforylacji oksydacyjnej towarzyszy generowanie reaktywnych form tlenu. Od 1 do 2% tlenu wykorzystywanego do produkcji ATP, jest przekształcane w anionorodnik ponadtlenkowy na drodze jego jednoelektronowej redukcji [Inoue M. i wsp., 2003; Poli G. i wsp., 2004; Orrenius S., 2007].



Rys. 4. Mitochondrialny łańcuch oddechowy. Zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH) odpowiedniej dehydrogenazy redukuje dinukleotyd flawinoadeninowy flawoproteiny, sam ulegając w tej reakcji utlenieniu. Zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy redukuje ubichinon (koenzym Q), a ten redukuje cytochrom b, który następnie redukuje cytochrom c_1 . Zredukowany cytochrom c_1 redukuje cytochrom c. Zredukowany cytochrom c redukuje oksydazę cytochromową, która redukuje tlen dostarczając mu czterech elektronów (opracowane na podstawie [Bartosz G., 2003]).

Mitochondrialny łańcuch oddechowy składa się z czterech kompleksów enzymatycznych, które transportują elektrony zgodnie z gradientem ich potencjałów redoks. Elektrony przenoszone są z układu o niższym, do układu o wyższym potencjale redoks. Donorem elektronów i protonów są zredukowane nukleotydy (NADH , FADH_2), zaś ich akceptorem jest tlen cząsteczkowy, którego czteroelektronowa redukcja prowadzi do

powstania dwóch cząsteczek wody (Rys. 4). Kompleks I tworzy para oksydoreduktaza NADH:ubichinon, kompleks II - oksydoreduktaza bursztynian:ubichinon, kompleks III – oksydoreduktaza ubichinon:cytochrom c, a kompleks IV - oksydoreduktaza cytochromu c i tlen [Płoszaj T. i wsp., 2010]

Anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$), będący produktem jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego, powstaje przede wszystkim w trakcie reakcji w obrębie kompleksów I i III [Turrens J. F., 1997; Żmijewski J. W. i wsp., 2005; Murphy M. P., 2009]. Ubichinon, pełniący w obrębie kompleksu III rolę donora elektronów, przenosi elektrony na tlen cząsteczkowy, obecny po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej. Kompleks I zaś uwalnia $O_2^{\cdot -}$ wyłącznie do macierzy mitochondrialnej. Rodzaj tkanki, a także wydajność oddechowa mitochondriów znajdujących się w jej komórkach decyduje o udziale poszczególnych kompleksów w wytwarzaniu anionorodnika ponadtlenkowego. Szybki przepływ elektronów, wysoka wydajność syntezy ATP, częściowa depolaryzacja wewnętrznej błony mitochondrialnej i obniżona wartość stosunku stężeń $NADH/NAD^+$ sprzyjają uwalnianiu $O_2^{\cdot -}$ przez kompleks III. Z kolei niskie tempo transportu elektronów i syntezy ATP oraz wysokie stężenie zredukowanych nukleotydów tworzy warunki, w których anionorodnik jest generowany przede wszystkim przez kompleks I [Płoszaj T. i wsp., 2010].

Alternatywne źródło reaktywnych form tlenu w mitochondriach stanowią enzymy zlokalizowane w matriks mitochondrialnym, do których należą między innymi enzymy kompleksu dehydrogenazy α -ketoglutaranowej: dehydrogenaza liponianowa i acetylotransferaza dihydroliponianowa [Jezek P. i Hlavata L., 2005].

I.3. Uszkodzenie składników komórek przez reaktywne formy tlenu.

Wpływ reaktywnych form tlenu na komórki zależy przede wszystkim od ich stężenia oraz czasu działania. Niewielkie stężenia reaktywnych form tlenu spełniają funkcje fizjologiczne, podczas gdy wyższe stężenia tych cząsteczek stanowią przyczynę toksycznych uszkodzeń komórek, prowadzących do ich destrukcji. Spośród wielu potencjalnych obiektów ataku RFT, uszkodzenie tylko trzech makromolekuł: DNA, lipidów albo białek, może mieć kluczowe znaczenie dla losu komórek.

I.3.1. Białka jako pierwotny obiekt ataku reaktywnych form tlenu w komórce.

Szkodliwe działanie RFT przejawia się między innymi w ich zdolności do utleniania białek [Marnett L. J. i wsp., 2003; Zabłocka A. i Janusz M., 2008; Gębicki J. M. i Bartosz G., 2010]. Nadtlenki białek powstają na skutek kontaktu tychże molekuł z reaktywnymi formami tlenu, generowanymi w reakcjach z udziałem ksantyny i oksydazy ksantynowej, mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz pobudzonych komórek fagocytykujących. Powstawanie nadtlenków białek stwierdzono między innymi w komórkach ludzkiej białaczki U937, poddanych działaniu inicjatora azowego, którego homolityczny rozkład prowadzi do powstawania rodników nadtlenkowych [Gieseg S. i wsp., 2000]. Inne badania, w których komórki szpiczaka myszy Sp2/20 poddane zostały ekspozycji na działanie rodnika HO[•], również wskazały na obecność nadtlenków białek w tychże komórkach [Du J. i Gębicki J. M., 2004].

Mediatorem uszkodzenia białek przez RFT jest zazwyczaj rodnik hydroksylowy, chociaż niektóre rodzaje modyfikacji cząsteczek białkowych (np. utlenianie grup –SH) mogą być wywoływane przez anionorodnik ponadtlenkowy lub nadtlenek wodoru. Również kwas podchloraowy i nadtlenoazotyn utleniają grupy tiolowe białek oraz reszty metionylowe [Bartosz G., 2003]. Nadtlenoazotyn jest wysoce reaktywny. Jego zdolność do tworzenia pochodnej w postaci 3-nitrotyrozyny oraz reagowania z wolną grupą sulfhydrylową prowadzi do zahamowania aktywności m. in.: fibrynogenu lub czynnika tkankowego [Alvarez B. i Radi R., 2003; Ponczek M. B. i Wachowicz B., 2005]. Dowiedziono także, iż nadtlenoazotyn utlenia łańcuch polipeptydowy, będący składnikiem palca cynkowego w białkach [Gabbita S. P. i wsp., 2000].

Szereg obserwacji wskazuje na białka jako najbardziej prawdopodobny, pierwotny obiekt ataku reaktywnych form tlenu. Prawdopodobieństwo reakcji HO[•] z białkami jest bardzo wysokie z kilku powodów. Jednym z nich jest wysoka wartość potencjału redoks rodnika hydroksylowego, w związku z czym, w złożonych układach, o reaktywności HO[•] decydują przede wszystkim stężenia potencjalnych substratów (w typowej komórce ssaka ponad 70% wytworzonych rodników hydroksylowych reaguje z białkami, nie zaś z kwasami nukleinowymi czy lipidami) [Gębicki J. M. i Bartosz G., 2010]. Ponadto, rodnik hydroksylowy powstaje tam, gdzie zlokalizowane są jony metali mogące uczestniczyć w reakcji Fentona, w której anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru wytwarzają HO[•] (jony metali przejściowych są zwykle nietrwale związane z białkami) [Inoue M. i wsp., 2003; Hilman O. E. i wsp., 2004]. Co więcej, rodnik HO[•] reaguje blisko miejsca powstania,

ponieważ średnia droga dyfuzji tej cząsteczki wynosi zaledwie kilka nm. Zatem, w wyniku działania rodnika hydroksylowego na białka, uszkodzeniu ulegają głównie aminokwasy wiążące jony metali [Davies M. J. i Dean R. T., 1997]. Do uszkodzenia białek może dojść nawet w obecności innych potencjalnych obiektów ataku RFT, ponieważ błony biologiczne i chromatyna zawierają zazwyczaj zbliżone ilości białek, lipidów i DNA.

Reakcje reaktywnych form tlenu z białkami prowadzą nie tylko do utlenienia białek. W wyniku tychże reakcji, na skutek uszkodzenia aminokwasów aromatycznych (zwłaszcza tyrozyny), powstają w białkach grupy redukujące, zdolne do redukcji cytochromu c i metali [Stadtman E. R. i Levine R. L., 2000].

Jak już wspomniano, większość białek jest inaktywowana przez reaktywne formy tlenu, ale są też i takie, których aktywność wzrasta w obecności RFT. Przykładem takich białek są: cyklaza guanylanowa, 5-lipooksygenaza oraz niektóre białka transportowe [Catalano A. i wsp., 2005]. I tak np.: transport serotoniny do płytek krwi jest pobudzany w wyniku utlenienia grup tiolowych białka transportującego przez RFT, podobnie jak transport glukozy do komórek jest stymulowany przez nadtlenek wodoru [Marti L. i wsp., 1998].

Nadtlenki białek i aminokwasów można uważać za „wtórne przekaźniki” uszkodzeń generowanych przez RFT. Ich stosunkowo długi czas trwania umożliwia przemieszczenie grupy nadtlenkowej daleko od miejsca powstania, natomiast reakcje ze związkami, takimi jak np. glutation czy kwas askorbinowy, mogą prowadzić do znacznego zmniejszenia puli tychże „buforów redoks” [Gębicki J. M., 1997; Gębicki J. M. i Bartosz G., 2010].

Zmodyfikowane, utlenione formy wielu białek gromadzone są w starzejących się komórkach. Uszkodzone białka, które utraciły swą aktywność biologiczną, są zazwyczaj selektywnie usuwane przez proteazy. Jednak obniżenie aktywności proteolitycznej w miarę starzenia się, może prowadzić do gromadzenia się tychże białek w komórkach [Sohal R. S., 2002].

I.3.2. Peroksydacja lipidów.

Kolejne, po białkach, makromolekuły komórkowe szczególnie narażone na szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu to lipidy. Pod wpływem RFT dochodzi do utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów, w wyniku czego powstają nadtlenki tych związków. *In vivo* procesowi peroksydacji ulegają przede wszystkim reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzące w skład fosfolipidów, gdyż to

fosfolipidy są głównym składnikiem budulcowym błon komórkowych [Poli G. i wsp., 2004]. W przebiegu procesu peroksydacji lipidów wyróżnia się trzy fazy: inicjację, propagację i terminację. Etap inicjacji rozpoczyna się oderwaniem atomu wodoru od cząsteczki nienasyconego kwasu tłuszczowego, co może zostać zapoczątkowane między innymi przez następujące rodniki: hydroksylowy (HO^\cdot), nadtlenkowy (LOO^\cdot), alkoksylowy (LO^\cdot), alkiłowy substancji obecnych w komórce bądź ksenobiotyków (L^\cdot) oraz ozon, tlenek i dwutlenek azotu, a także dwutlenek siarki czy podchloryn (symbol L oznacza cząsteczkę nienasyconego kwasu tłuszczowego lub fosfolipidu, w którego składzie występuje reszta takiego kwasu) [Dix T. A. i Aikens J., 1993; Panasenko O. M., 1997; Zabłocka A. i Janusz M., 2010]. Faza inicjacji prowadzi do przekształcenia cząsteczki kwasu tłuszczowego w wolny rodnik alkiłowy, posiadający niesparowany elektron przy atomie węgla, który utracił atom wodoru. W cząsteczce wolnego rodnika kwasu tłuszczowego dochodzi do przegrupowania wiązań podwójnych, w wyniku czego powstają wiązania sprzężone.

W fazie propagacji wolne rodniki alkiłowe reagują z tlenem dając wolne rodniki nadtlenkowe, a następnie nadtlenek kwasu tłuszczowego. Ten cykl reakcji może się powtarzać wielokrotnie, aż do etapu terminacji, prowadząc tym samym do przekształcenia w nadtlenek nawet kilkuset cząsteczek kwasów tłuszczowych.

Do zakończenia procesu wolnorodnikowego utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych dochodzi w wyniku reakcji pomiędzy dwoma rodnikami alkiłowymi, nadtlenkowymi oraz dwoma różnymi rodnikami występującymi w układzie. Produktami tej reakcji są zmodyfikowane, uszkodzone cząsteczki lipidów (dimery kwasów tłuszczowych oraz okso- lub hydroksykwasów tłuszczowych). Wolne rodniki powstające w procesach peroksydacji lipidów mogą reagować dalej z białkami, co prowadzi do powstawania wolnych rodników białek. Rodniki białek mogą z kolei uczestniczyć w reakcjach terminacji peroksydacji lipidów, tworząc mieszane połączenia białkowo-lipidowe [Bartosz G., 2003].

Dalsze przemiany produktów peroksydacji lipidów prowadzą do rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w wyniku czego powstają kilku- i kilkunastowęglowe fragmenty, takie jak dwualdehyd malonowy lub 4-hydroksynonenal. Na skutek tychże przemian powstają także inne aldehydy i hydroksyaldehydy, w tym: 4-hydroksyalkenale, 2-alkenale, hepta-2,4-dienal oraz 5-hydroksyoktanal. Oprócz nich powstają też węglowodory, takie jak etan i pentan [Rahman I. i wsp., 2004; Zabłocka A. i Janusz M., 2010].

Generowanie nadtlenków lipidów może również inicjować tlen singletowy, jednakże mechanizm tej reakcji nie ma charakteru wolnorodnikowego i polega na addycji cząsteczki

tlenu do wiązania podwójnego. Bezpośrednie przyłączenie zaś ozonu do wiązania podwójnego prowadzi do powstawania ozonków, które mogą rozpadać się z wytworzeniem wolnych rodników [Bartosz G., 2003].

Produkty końcowe procesu peroksydacji lipidów, zwłaszcza aldehydy, mogą pełnić funkcję „wtórnych przekaźników” uszkodzeń generowanych przez reaktywne formy tlenu. Wynika to z faktu, iż aldehydy są znacznie mniej reaktywne niż wolne rodniki, w związku z czym mogą one w komórkach dyfundować na znaczne odległości [Halliwell B. i Grootveld M., 1987]. Aldehydy biorą udział między innymi w reakcjach z grupami tiolowymi białek oraz z grupami aminowymi białek, lipidów, aminocukrów i zasad azotowych, wchodzących w skład kwasów nukleinowych. Reagują one również z resztami aminokwasów, takimi jak: reszty tyrozylowe, arginylowe, histydyłowe i lizolowe. Co więcej, aldehydowe produkty końcowe peroksydacji lipidów zmieniają właściwości antygenowe białek, z którymi się łączą, a także hamują aktywność wielu enzymów, co w rezultacie powoduje m. in.: zatrzymanie replikacji DNA, transkrypcji i oddychania komórkowego. Ponadto, są one odpowiedzialne za powstawanie pęknięć nici DNA, są cytotoksyczne, jak również wykazują działanie mutagenne i kancerogenne [Marnett L. J., 1999; Niemela O., 1999].

Jak wynika z doniesień literaturowych, nadtlarki kwasów tłuszczowych i aldehydowe produkty peroksydacji lipidów osłabiają zależność pomiędzy transportem elektronów przez łańcuch oddechowy, a syntezą ATP w mitochondriach. Dzieje się tak prawdopodobnie na skutek niwelowania różnicy stężeń protonów po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej, której przepuszczalność wzrasta w wyniku działania na nią produktów peroksydacji lipidów [Bartosz G., 2003]. Co więcej, produkty peroksydacji lipidów zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych poprzez wprowadzenie polarnych grup nadtlarkowych, ketonowych, aldehydowych lub hydroksylowych do rejonów cząsteczek fosfolipidów, które znajdują się wewnątrz dwuwarstwy lipidowej błon. Prowadzi to do obniżenia hydrofobowości lipidowego wnętrza błon komórkowych i zmiany organizacji dwuwarstwy, dzięki czemu w sposób niespecyficzny wzrasta przepuszczalność błon dla jonów H^+ i innych substancji polarnych. Depolaryzacja błon i zaburzenie ich lipidowej asymetrii, wynikające z peroksydacji lipidów, sprzyjają ekspozycji na zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej fosfatydyloseryny, normalnie obecnej wyłącznie w wewnętrznej warstwie podwójnej błony komórkowej [Tyurina Y. Y. i wsp., 2000]. Produkty peroksydacji lipidów wpływają również na zahamowanie aktywności enzymów błonowych i białek transportujących, co w ostateczności może prowadzić do utraty

integralności błon wewnątrzkomórkowych (np. błon lizosomalnych) lub błony cytoplazmatycznej [Halliwell B. i Gutteridge J. M. C., 1990].

I.3.3. Uszkodzenie kwasów nukleinowych przez reaktywne formy tlenu.

Reakcje reaktywnych form tlenu z DNA mogą prowadzić do najpoważniejszych uszkodzeń w komórkach. W wyniku tychże oddziaływań może bowiem dojść do powstania pojedynczych oraz podwójnych pęknięć DNA, spośród których zwłaszcza te ostatnie są szczególnie niebezpieczne dla komórki i mogą prowadzić do jej śmierci [Farber J. L., 1994]. Ponadto, na skutek wspomnianych oddziaływań często dochodzi do powstawania wiązań sieciujących DNA lub modyfikacji zasad azotowych [Wiseman H. i Halliwell B., 1996]. Coraz większą uwagę poświęca się uszkodzeniom mitochondrialnego DNA (mtDNA), które prawdopodobnie stanowią istotny element etiologii wielu zmian chorobowych oraz starczych. mtDNA jest szczególnie narażony na uszkodzenia oksydacyjne, ponieważ występuje w bliskim sąsiedztwie mitochondrialnego łańcucha oddechowego, nie jest związany z białkami jądrowymi (histonami i białkami niehistonowymi), które mogłyby go chronić przed uszkodzeniami, a możliwości jego naprawy są ograniczone. Dodatkowo, stopień redundancji informacji kodowanej w mitochondrialnym DNA jest znikomy, natomiast gęstość informacji duża, gdyż mtDNA nie zawiera intronów [Wiseman H. i Halliwell B., 1996; Zaremba T. i Oliński R., 2010].

Kwasy nukleinowe są związkami bardziej stabilnymi niż białka i lipidy, dlatego też nadtlenek wodoru oraz anionorodnik ponadtlenkowy nie powodują ich uszkodzeń w sposób bezpośredni. Mogą one natomiast inicjować uszkodzenia DNA w reakcji Fentona (której produktem jest między innymi HO^\cdot), poprzez oddziaływanie z jonami związków organicznych, zawierających metale (żelazo, miedź) [Wang Y., 2008]. Rodnik hydroksylowy, będący jednym z najbardziej reaktywnych utleniaczy, stanowi prawdopodobnie najważniejszą przyczynę uszkodzeń DNA. W wyniku reakcji tego rodnika, jak również tlenu singletowego, z kwasami nukleinowymi, dochodzi do uszkodzenia reszt cukrowych, zasad purynowych i pirymidynowych lub do rozerwania wiązań fosfodiesterowych, łączących nukleotydy [Higuchi Y., 2003].

Najbardziej podatne na reakcje z udziałem rodnika hydroksylowego są występujące w DNA reszty tymidyny. Na skutek ich reakcji z HO^\cdot powstają wolne rodniki reszt tymidynyłowych, które reagując z tlenem tworzą nadtenki. Powstają przy tym trzy izomery nadtlenku tymidyny, posiadające grupę nadtlenkową w pozycji 5 lub 6 pierścienia

pirymidynowego, albo związaną z węglem grupy metylowej. Nadtlutki te są związkami stosunkowo trwałymi. Ulegają one jednak rozpadowi np. w wyniku reakcji z substancjami redukującymi. Z izomerów posiadających grupę nadtlutkową w pozycji 5 lub 6 pierścienia pirymidynowego powstaje pochodna tyminy, określana jako *cis*-glikol tymidyny. Zawiera ona dwie grupy hydroksylowe w pozycjach 5 i 6 pierścienia, w którym wiązanie między węglami w pozycjach 5 oraz 6 uległo wysyceniu. Trzeci z nadtlutków tymidyny rozpada się, tworząc dwa główne produkty: 5-hydroksymetylo-2'-deoksyurydynę i 5-formylo-2'-deoksyurydynę, których reakcje z reaktywnymi formami tlenu mogą prowadzić do dalszej degradacji glikolu tymidyny [Breen A. P. i Murphy J. A., 1995; Bartosz G., 2003]. Jak wynika z doniesień literaturowych, glikol tymidyny nie posiada znaczącego potencjału mutagennego, aczkolwiek może on stanowić przyczynę zablokowania replikacji DNA w odległości jednego nukleotydu przed lub za uszkodzeniem [Rossman T. G. i Goncharova E. I., 1998].

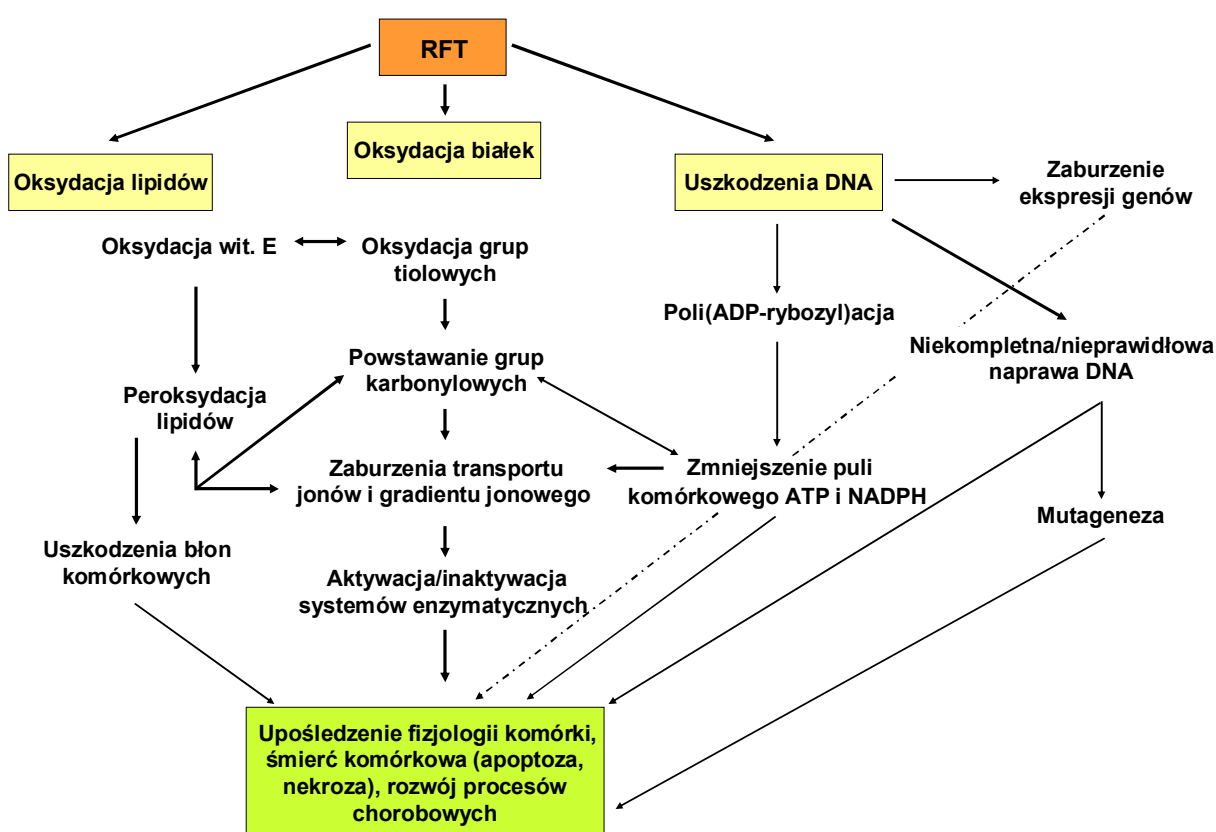
Analogicznie do tyminy, reakcje cytozyny z rodnikiem hydroksylowym prowadzą do powstania szeregu produktów degradacji [Breen A. P. i Murphy J. A., 1995].

Reaktywne formy tlenu, poza oddziaływaniem z zasadami azotowymi wchodzącymi w skład kwasów nukleinowych, mogą również reagować z pierścieniami rybozy oraz deoksyrybozy. Rodnik hydroksylowy może indukować oderwanie każdego atomu wodoru związanego z cząsteczką cukru, co niejednokrotnie prowadzi do powstawania pęknięć nici DNA lub RNA [Knapp Pogożelski W. i Tullius T. D., 1998].

Jedną z najlepiej poznanych modyfikacji oksydacyjnych DNA jest powstawanie 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oksy-dG), posiadającej właściwości mutagenne. Jako forma tautomeryczna 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG) jest ona bardziej stabilna w warunkach fizjologicznych. 8-oksy-dG występuje w dwóch formach: *anty* i *syn*. Jak wynika z doniesień literaturowych, forma *syn* może tworzyć stabilne pary zasad z adeniną i prawdopodobnie z guaniną [Wang D. i wsp., 1998]. Co więcej, jeśli w czasie replikacji DNA nastąpi włączenie adeniny naprzeciw 8-oksy-dG, wówczas po dwóch rundach replikacyjnych może dojść do transwersji G→T. Przeprowadzone badania wskazują, iż obecność 8-oksy-dG w rejonie promotorowym genów może w istotny sposób wpływać na wiązanie czynników transkrypcyjnych. Dowiedziono między innymi, że obecność jednej reszty 8-oksy-dG w rejonie wiązania czynnika transkrypcyjnego AP-1 w obszarze promotorowym genów, może całkowicie zahamować wiązanie tego czynnika, a tym samym zablokować transkrypcję. Inne badania wskazują na zaburzenia wiązania czynników transkrypcyjnych Sp1 lub NF-κB w nerkach i wątrobie szczurów chorujących na cukrzycę, na

skutek uszkodzeń DNA, spowodowanych przez reaktywne formy tlenu [Ghosh R. i Mitchell D. L., 1999; Ramon O. i wsp., 2001; Zaremba T. i Oliński R., 2010].

Przypuszcza się, iż większość oksydacyjnych modyfikacji materiału genetycznego jest skutecznie usuwana przez systemy naprawy DNA lub że zmiany te usytuowane są w nieaktywnej części genomu, inaczej uszkodzenia DNA w komórce, w szybkim czasie prowadziłyby do jej śmierci. Należy jednak pamiętać, że promutagenne uszkodzenia mogą występować w obrębie genów supresorowych i onkogenów. Jeśli uszkodzenia te nie zostaną usunięte, wówczas może dojść do transformacji nowotworowej komórki.



Rys. 5. Zmiany struktury i funkcji komórek jako wynik oddziaływania RFT z lipidami, białkami i DNA (opracowane na podstawie [Zaremba T. i Oliński R., 2010]).

I.4. Rola reaktywnych form tlenu w warunkach fizjologicznych i metaboliczne efekty stresu oksydacyjnego.

Utrzymanie odpowiedniej homeostazy prooksydacyjno-antyoksydacyjnej jest niezwykle ważne dla właściwego funkcjonowania organizmu. Reaktywne formy tlenu są bowiem istotną składową prawidłowego metabolizmu komórkowego [Poli G. i wsp., 2004].

Kiedy jednak równowaga pomiędzy reakcjami wytwarzającymi reaktywne formy tlenu, a układem obrony antyoksydacyjnej przechyla się w stronę zwiększonej produkcji RFT, organizm znajduje się w stanie stresu oksydacyjnego. W wyniku nadmiernego generowania reaktywnych form tlenu może dojść do zaburzeń w przekazywaniu sygnałów w komórkach i między komórkami oraz uszkodzenia krytycznych elementów komórek [Anderson K. M. i wsp., 1999]. Ponad 50 chorób i sytuacji upośledzających funkcjonowanie organizmu, takich jak np.: artretyzm, niektóre nowotwory, choroby płuc, chroniczne stany zapalne, choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimerera, choroba Parkinsona) i starzenie są powodowane, wzmagane lub przyspieszane na skutek podwyższonego poziomu RFT [Adam-Vizi V. i Chinopoulos Ch., 2006; Qiang M., 2010].

Jedną z ważniejszych, fizjologicznych funkcji pełnionych przez reaktywne formy tlenu jest przekazywanie sygnałów z komórki do komórki oraz w jej obrębie [Dróge W., 2002]. RFT niejednokrotnie pełnią rolę wtórnych przekaźników lub modulatorów działania szlaków przekazywania informacji w komórkach. Podstawowe szlaki przekazywania informacji do komórki: szlak cykazy adenylanowej, szlak fosfolipazy C oraz szlak fosfolipazy A₂ mogą być modyfikowane przez RFT (anionorodnik ponadtlenny i nadtlenek wodoru pełnią funkcję przekaźnika wtórnego lub modulatora działania szlaków przekazywania informacji w szlaku cykazy adenylanowej oraz w szlaku fosfolipazy C) [Valko M. i wsp., 2007]. Niektóre ligandy, takie jak płytkowy czynnik wzrostu (PDGF), epidermalny czynnik wzrostu (EGF) i angiotensyna II wywołują szybką, wewnątrzkomórkową produkcję reaktywnych form tlenu, co może świadczyć o udziale tych form w przekazywaniu sygnałów w komórce. Hipotezę tę potwierdzają wyniki doświadczeń, w których zastosowanie antyoksydantów lub enzymów usuwających RFT hamowało przekazywanie sygnału indukowanego działaniem tychże ligandów [Finkel T., 2000; Gabbita S. P i wsp., 2000].

Reaktywne formy tlenu wpływają na przekazywanie sygnałów w komórkach eukariotycznych poprzez regulowanie aktywności istotnej grupy enzymów, jakimi są kinazy i fosfatazy białkowe. Na skutek działania H₂O₂ lub O₂⁻ na niereceptorowe kinazy tyrozynowe PTKs (ang. *non-receptor protein kinases*) dochodzi do stymulacji fosforylacji tyrozyny wspomnianych kinaz, wynikiem czego zostaje zainicjowane przekazywanie sygnału poprzez aktywowane mitogenem kinazy białkowe MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) [Genestra M., 2007; Qiang M., 2010]. Kinazy MAPK biorą udział w regulowaniu szeregu procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie czy apoptoza [Chang L. i Karin M., 2001]. Wyróżnia się cztery kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny: kinaza

regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ERK 1/2), *c-jun*-N-końcowa kinaza – kinaza białkowa regulowana przez stres (JNK/SAPK), kinaza p38 oraz kinaza białkowa 1 aktywowana przez duże mitogeny (BMK 1). Dowiedziono, że RFT wpływają na funkcjonowanie serynowo-treoninowych kinaz białkowych, między innymi poprzez zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia (Ca^{2+}) (znaczące zwiększenie stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie może indukować wiele destrukcyjnych procesów np. poprzez aktywację zależnych od Ca^{2+} proteaz i nukleaz) [Brookes P. S. i wsp., 2004]. Ostatecznie, jak wspomniano wyżej, reaktywne formy tlenu oddziałują także na białkowe fosfatazy tyrozynowe PTPs (ang. *protein tyrosine phosphatases*), dzięki czemu odgrywają istotną rolę w kontroli procesów utleniania i redukcji zachodzących w komórce [Salmeen A. i Bradford D., 2005].

Z punktu widzenia odpowiedzi immunologicznej, jak również proliferacji i różnicowania się komórek, reaktywne formy tlenu odgrywają istotną, regulatorową rolę w aktywacji określonych czynników transkrypcyjnych. W komórkach człowieka RFT mogą pośrednio lub bezpośrednio wpływać na aktywację czynników transkrypcyjnych, takich jak NF- κ B i AP-1. Czynniki jądrowe NF- κ B jest aktywatorem ekspresji wielu genów, w tym genów kodujących cytokiny, białka odpornościowe, tioredoksynę oraz SOD [Rahman I. i wsp., 2004]. Dowiedziono, iż związki tiolowe i chelatory metali, pełniące w komórce między innymi funkcję antyoksydantów, przeciwdziałają aktywacji NF- κ B [Li N. i Karin M., 1999]. Stwierdzono także, że nadekspresja mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej MnSOD (SOD-2) w komórkach ludzkiego raka piersi MCF-7, prowadzi do całkowitego zahamowania aktywacji czynnika NF- κ B, indukowanej przez generujący reaktywne formy tlenu czynnik martwicy nowotworów TNF- α [Matés J. M. i Sánchez-Jiménez F. M., 2000]. Czynniki jądrowe AP-1 jest aktywowany na skutek wspólnego działania nadtlenu wodoru i określonych metali. Podobnie jak NF- κ B, jest on aktywatorem ekspresji szeregu genów kodujących np. cytokiny lub czynniki wzrostu [Hess J. i wsp., 2004]. Pomimo, iż czynniki transkrypcyjne są niezwykle istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki, to jednak ich nadmierna i ciągła aktywacja jest niejednokrotnie odpowiedzialna za kancerogenezę [Dalton P. T. i wsp., 1999; Benhar M. i wsp., 2002].

Fizjologiczne zmiany stężenia reaktywnych form tlenu, uruchamiające kaskadę sygnałową, prowadzą także do ekspresji genów kodujących odpowiednie enzymy antyoksydacyjne oraz systemy transportujące cysteinę, która z kolei jest odpowiedzialna za zwiększenie stężenia glutationu – głównego wewnątrzkomórkowego antyoksydanta. Wzrost ilości wolnych rodników w komórce prowadzi również do powstawania dużej ilości

substancji o małej reaktywności, które są „zmiataczami” tychże rodników (np. białka lub aminokwasy) [Galecka E. i wsp., 2008].

Zaburzenie homeostazy prowadzące do zwiększenia stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu określa się mianem stresu oksydacyjnego. Jedną z jego konsekwencji może być zmniejszenie stosunku stężeń GSH/GSSG oraz całkowitego stężenia glutationu. W normalnych warunkach ponad 99% glutationu występuje w formie zredukowanej (GSH) [Kearns R. P. i Hall G. A., 1998]. Grupa tiolowa GSH reaguje z reaktywnymi formami tlenu, a także regeneruje utlenione grupy –SH. Na skutek tych reakcji dochodzi do obniżenia stężenia GSH, a zwiększenia stężenia GSSG, którego część jest usuwana na zewnątrz komórki za pomocą mechanizmu aktywnego transportu. A zatem, w warunkach stresu oksydacyjnego regeneracja grup tiolowych białek, utlenionych przez RFT, może nie być możliwa. Co więcej, może dojść do powstawania mieszanych disulfidów glutationowo-białkowych. Końcowe produkty peroksydacji lipidów również reagują z glutationem, tworząc odpowiednie S-koniugaty glutationu, które są następnie eksportowane poza komórkę, a proces ten przyczynia się do zużycia ATP i spadku wewnątrzkomórkowego stężenia GSH [Kepler D., 1999].

Kolejną konsekwencją narażenia komórek na wzmożoną produkcję reaktywnych form tlenu, jak już wspomniano, jest obniżenie poziomu ATP w komórce, wynikające z kilku różnych przyczyn. Jak już wspomniano, białka, których aktywność zależna jest od grup –SH, mogą być inaktywowane przez RFT. Jednym z takich białek jest dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, będąca enzymem szlaku glikolitycznego. Konsekwencją jej inhibicji jest zahamowanie glikolizy i zmniejszenie stężenia ATP w komórce. Kolejne przyczyny obniżenia poziomu ATP to: wzmożony katabolizm nukleotydów adeninowych, uszkodzenie mitochondriów, zwiększone zużycie ATP przez aktywny transport utlenionego glutationu i zależne od ATP proteazy trawiące oksydacyjnie uszkodzone białka, zmniejszenie podaży zredukowanych form dinukleotydów nikotynoadeninowych w wyniku ich zużycia do redukcji glutationu i naprawy uszkodzeń DNA oraz przeciekanie nukleotydów adeninowych przez błonę plazmatyczną [de Lamirande E. i wsp., 1997].

Stres oksydacyjny może prowadzić do zwiększenia stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. W normalnej komórce stężenie to jest utrzymywane na bardzo niskim poziomie. Jest to możliwe dzięki transportowi jonów Ca^{2+} na zewnątrz komórki, a także do wewnątrzkomórkowych magazynów, czyli siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów. Znaczne zwiększenie poziomu jonów wapnia w cytoplazmie jest odpowiedzialne za indukcję wielu destrukcyjnych procesów, w tym za aktywację zależnych od Ca^{2+} proteaz i nukleaz. Do

wzrostu stężenia cytoplazmatycznych jonów Ca^{2+} dochodzi między innymi na skutek inaktywacji przez RFT pompy wapniowej, odpowiedzialnej za aktywny transport jonów wapnia. Inny mechanizm może polegać na aktywacji kanału wapniowego, uwalniającego jony wapnia z siateczki śródplazmatycznej [Nictotera P. i wsp., 1985; Farber J. L., 1994; Squier T. C. i Bigelow D. J., 2000].

Jedną z najbardziej istotnych funkcji RFT jest ich udział w procesie starzenia [Harman D., 1956]. Ponadto, indywidua te decydują o śmierci lub przeżyciu komórki. Ekspozycja komórek na wyższe stężenia RFT może bowiem prowadzić do ich śmierci na drodze apoptozy bądź nekrozy, co pozwala eliminować komórki, które uległy poważnym uszkodzeniom i mogłyby stanowić zagrożenie dla organizmu [Fruehauf J. P. i Meyskens F. L., 2007]. Reaktywne formy tlenu odgrywają również istotną rolę w uruchomieniu autofagii przebiegającej przede wszystkim w warunkach fizjologicznych [Scherz-Shouval R. i Elazar Z., 2011], aczkolwiek do indukcji tego procesu może dojść także na skutek działania na komórki nowotworowe określonych chemoterapeutyków, których mechanizm działania opiera się na generowaniu RFT [Itoh T. i wsp., 2008].

I.5. Reaktywne formy tlenu, a choroby nowotworowe.

Proces powstawania nowotworu obejmuje wiele etapów, kontrolowanych przez szereg genów, takich jak onkogeny i geny supresorowe transformacji nowotworowej. Faza indukcji nowotworu dzieli się na dwa etapy, tj. inicjację i promocję. Komórka, która przeszła przez fazę inicjacji, traci kontrolę procesu replikacji. Może to nastąpić na skutek mutacji, amplifikacji lub transformacji onkogenu, a także utraty genu supresorowego transformacji nowotworowej. Inicjacja może być wynikiem działania zarówno mutagenów chemicznych, jak i fizycznych, których wspólnym mianownikiem działania jest m. in. generowanie reaktywnych form tlenu oraz innych wolnych rodników.

I.5.1. RFT – przyczyna czy skutek choroby nowotworowej?

Oksydacyjne uszkodzenia DNA odgrywają istotną rolę w procesie mutagenezy. Wystąpienie bowiem mutacji w genach supresorowych i/lub onkogenach może prowadzić do inicjacji, promocji oraz progresji procesu nowotworzenia. Udowodniono, że reaktywne formy tlenu indukują mutacje między innymi w genie supresorowym p53 oraz onkogenie *H-ras* [Oliński R. i wsp., 2003]. I tak, indukowana przez RFT mutacja w kodonie 248 (CGG) genu

p53 jest jedną z najczęściej pojawiających się mutacji w kilku nowotworach występujących u człowieka [Zaremba T. i Oliński R., 2010]. Dowiedziono również, że częstą przyczyną mutacji genu supresorowego *p53* w komórkach ludzkiego raka płuc oraz protoonkogenu *ras* w przypadku ludzkiego raka wątroby są transwersje GC→TA, charakterystyczne dla nieprawidłowego parowania 8-oksyo-Gua [Wiseman H. i Halliwell B., 1996; Oliński R. i wsp., 2003]. Jednocześnie należy podkreślić, że mutacje w genie kodującym białko *p53*, powstałe niezależnie od działania RFT, mogą prowadzić do indukcji stresu oksydacyjnego. Dzieje się tak dlatego, iż białko *p53*, nie tylko odgrywa istotną rolę w procesach naprawy DNA (zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego) [Achanta G. i Huang P., 2004], ale spełnia ono również funkcję czynnika transkrypcyjnego, odpowiedzialnego za regulację ekspresji szeregu genów związanych m. in. z procesami pro- oraz antyoksydacyjnymi [Sablina A. A. i wsp., 2005]. Brak funkcjonalnego białka *p53* w komórkach nowotworowych wiąże się z zaburzeniami homeostazy prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, indukcją stresu oksydacyjnego, nasileniem mutagenezy oraz inwazyjnością tychże komórek [Attardi L. D. i Donehower L. A., 2005].

Jak wspomniano wcześniej, indukowane przez reaktywne formy tlenu uszkodzenia materiału genetycznego prowadzą nie tylko do powstawania pojedynczych oraz podwójnych pęknięć DNA, ale także do modyfikacji poszczególnych zasad azotowych [Matés J. M. i Sánchez-Jiménez F. M., 2000]. Przeprowadzone badania wskazują na obecność oksydacyjnych uszkodzeń tychże zasad między innymi w komórkach ludzkiego raka płuc [Oliński R. i wsp., 1992] oraz piersi [Malins D. C. i wsp., 1993]. Z doniesień literaturowych wynika również, że indukowane przez RFT modyfikacje puryn i pirymidyn mogą wpływać na potencjał metastatyczny nowotworów [Malins D. C. i Gunselman S. J., 1994].

Komórki nowotworowe często funkcjonują w warunkach stresu oksydacyjnego. Podwyższony poziom reaktywnych form tlenu obserwowano między innymi w komórkach ludzkiej białaczki, świeżo wyizolowanych z krwi pacjentów cierpiących na chroniczną białaczkę limfocytarną [Zhou Y. i wsp., 2003]. Jednocześnie, badania prowadzone na komórkach nowotworów litych wskazały na zwiększoną ilość oksydacyjnych uszkodzeń DNA i lipidów w tychże komórkach [Patel B. P. i wsp., 2007; Kumar B. i wsp., 2008]. Jest to najprawdopodobniej związane z faktem, iż komórki nowotworowe często wykazują znacznie obniżoną aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych, w porównaniu do komórek prawidłowych. Niskie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy sprzyjają indukcji stresu oksydacyjnego, którego skutkiem mogą być uszkodzenia DNA w komórkach [Oberley R. W. i Buettner G. R., 1979; Skrzydlewska E. i wsp., 2005]. Ponadto, jak

wspomniano wcześniej, H_2O_2 może być przekształcany w rodnik hydroksylowy w obecności metali grup przejściowych (zwłaszcza żelaza Fe^{2+}), w przebiegu reakcji Fentona. I tak, wykazano dodatnią korelację pomiędzy poziomem żelaza, które nie jest silnie związane z białkami, a endogennym poziomem 8-oksy-dG w limfocytach człowieka, co wskazuje na możliwość zachodzenia reakcji Fentona w pobliżu komórkowego DNA, a co za tym idzie zwiększone prawdopodobieństwo generowania oksydacyjnych uszkodzeń materiału genetycznego [Gackowski D. i wsp., 2002]. Udowodniono także, iż podwyższony poziom żelaza w organizmie może być czynnikiem predysponującym do rozwoju choroby nowotworowej [Stevens R. G. i wsp., 1994]. Co więcej, w większości ludzkich nowotworów stwierdza się niestabilność genomu i dużą liczbę mutacji, których źródłem mogą być między innymi uszkodzenia DNA związane z aktywnością reaktywnych form tlenu [Pelicano H. i wsp., 2004].

Mechanizmy, według których pewne linie komórek nowotworowych generują znaczące ilości reaktywnych form tlenu bez egzogennej indukcji, wciąż wymagają wyjaśnienia. Postuluje się jednak, że na wzrost stacjonarnych stężeń RFT w komórkach nowotworowych wpływają takie czynniki jak: aktywacja onkogenów, nieprawidłowo przebiegający metabolizm, uszkodzenia mitochondriów, utrata funkcjonalności białka p53 [Trachootham D. i wsp., 2009], a także ekspresja genów związanych z transformacją nowotworową (np. *Ras*, *Bcr-Abl* i *c-Myc*) [Vafa O. i wsp., 2002; Behrendt L. i wsp., 2003].

Przeprowadzone badania wskazują, iż reaktywne formy tlenu są odpowiedzialne za powstawanie mutacji w mitochondrialnym DNA (mtDNA), związanych z procesem nowotworzenia [Fruehauf J. P. i Meyskens F. L. Jr., 2007]. Jednocześnie, wyniki innych badań dowodzą, że zwiększenie stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu zarówno w komórkach białaczek, jak i nowotworów litych, jest niejednokrotnie konsekwencją uszkodzeń mtDNA [Carew J. S. i wsp., 2003; Ishikawa K. i wsp., 2008]. Na skutek mutacji w genach kodujących białka wchodzące w skład mitochondrialnego łańcucha oddechowego, dochodzi bowiem do wzmożonej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego, który jest następnie przekształcany w inne RFT.

Ostatecznie, podwyższony poziom RFT w komórkach jest odpowiedzialny za konstytutywną aktywację czynników transkrypcyjnych, a co za tym idzie genów podlegających ich kontroli. Taka sytuacja, w połączeniu ze zwiększonym poziomem oksydacyjnych modyfikacji DNA, sprzyja rozwojowi fenotypu charakterystycznego dla nowotworu [Toyokuni S. i wsp., 1995]. Jednocześnie, w przypadku wielu chorób nowotworowych, wzmożone generowanie reaktywnych form tlenu prowadzi nie tylko do

zwiększenia ilości oksydacyjnych uszkodzeń DNA, ale także do obniżenia syntezy i/lub aktywności enzymów usuwających takie modyfikacje [Wickman H. i wsp., 2000].

I.5.2. Adaptacja komórek nowotworowych do warunków podwyższonego poziomu RFT.

Zaobserwowano, że ciągła ekspozycja prawidłowych komórek nabłonka na niewielkie stężenia egzogennych oksydantów, sprzyja wytworzeniu w tychże komórkach oporności na stres oksydacyjny [Choi J. i wsp., 1997]. Pozwala to sądzić, iż komórki mogą przystosować się do funkcjonowania w warunkach podwyższonego poziomu reaktywnych form tlenu (oczywiście w pewnym tylko zakresie stężeń RFT). Wiąże się to z wykształceniem szeregu mechanizmów adaptacyjnych. I tak, w niektórych komórkach nowotworowych, produkujących duże ilości anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru, dochodzi do zwiększonej ekspresji antyoksydantów, takich jak peroksyredoksyna-3 oraz peroksydaza tioredoksyny [Young T. W. i wsp., 2004]. W ten sposób, komórki te unikają apoptozy indukowanej przez reaktywne formy tlenu, przede wszystkim zaś nadtlenu wodoru [Young T. W. i wsp., 2004]. Co więcej, komórki nowotworowe często wykazują dużą wrażliwość na wszelkie zmiany stężenia glutationu, będącego głównym wewnątrzkomórkowym antyoksydantem. Obniżenie bowiem poziomu GSH w komórkach nowotworowych zazwyczaj prowadzi do akumulacji RFT i śmierci komórki [Trachootham D. i wsp., 2006]. Dlatego też, w przypadku niektórych nowotworów dochodzi do zwiększenia syntezy glutationu, co stanowi jeden z mechanizmów adaptacyjnych do warunków podwyższonego poziomu reaktywnych form tlenu. Stwierdzono między innymi, że komórki ludzkiego raka skóry M14 oraz SbCl, w których aktywowano onkogen *c-Myc*, odpowiedzialny za kontrolowanie transkrypcji genów kodujących enzymy biorące udział w syntezie GSH, funkcjonują w warunkach stresu oksydacyjnego właśnie dzięki zwiększeniu poziomu tego antyoksydanta [Benassi B. i wsp., 2006].

Kolejny mechanizm, za pomocą którego komórki nowotworowe przystosowują się do funkcjonowania w warunkach stresu oksydacyjnego polega na aktywacji szeregu czynników transkrypcyjnych, takich jak: NF- κ B, Nrf-2 [Florczyk U. i wsp., 2010], c-Jun [Behrendt L. i wsp., 2003] i HIF-1 [Stachurska A. i wsp., 2010]. Czynniki te chronią komórki nowotworowe przed szkodliwym działaniem RFT poprzez zwiększenie ekspresji określonych antyoksydantów, w tym: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i tioredoksyny. Niektóre czynniki transkrypcyjne, których aktywność regulowana jest przez reaktywne formy tlenu, indukują ekspresję molekuł sprzyjających utrzymaniu komórki przy życiu, do których

zaliczamy między innymi antyapoptotyczne białko Bcl-2 [Trachootham D. i wsp., 2009]. Ponadto, w odpowiedzi na stres oksydacyjny komórki nowotworowe zwiększają poziom czynnika VEGF, który indukuje angiogenezę, jak również aktywują czynnik transkrypcyjny HIF-1, który z kolei wzmacnia glikolizę, hamując w ten sposób proces starzenia komórkowego [Xia C. i wsp., 2007; Kondoh H. i wsp., 2007].

Opisane powyżej mechanizmy adaptacji komórek nowotworowych do warunków podwyższonego stężenia reaktywnych form tlenu stanowią jedną z przyczyn wykształcenia oporności tychże komórek na stosowane terapie przeciwnowotworowe [Pervaiz S. i Clement M. V., 2004]. Dowiedziono między innymi, że charakteryzujące się opornością wielolekową komórki ludzkiej białaczki HL-60, nie wykazują wrażliwości na cytotoksyczne działanie nadtlenku wodoru, co jest bezpośrednio związane ze zwiększonym poziomem i aktywnością katalazy w tychże komórkach [Lenahan P. i wsp., 1995]. Co więcej, szereg badań wskazuje, że zwiększenie aktywności antyoksydantów w komórkach nowotworowych jest jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za ich oporność wobec takich chemoterapeutyków jak paklitaksel, doksorubicyna, czy związki zawierające platynę [Hoshida Y. i wsp., 2007; Ramanathan B. i wsp., 2005].

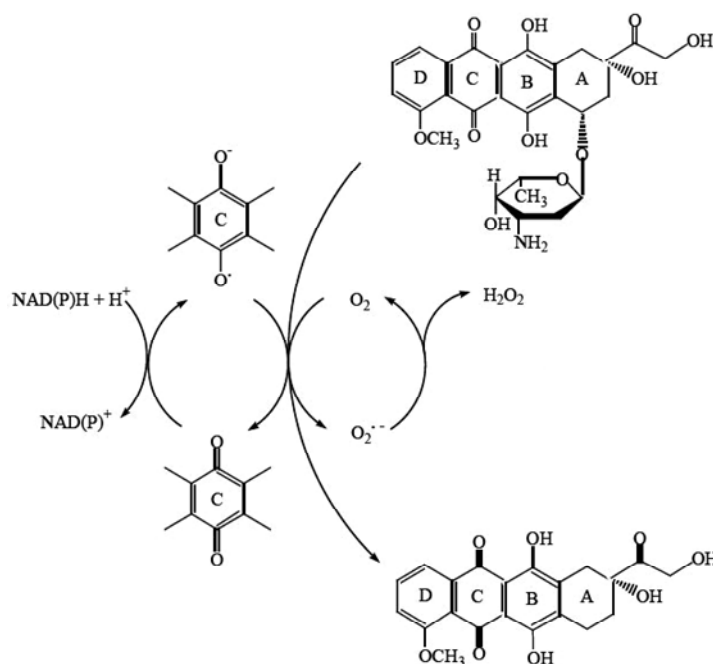
I.5.3. Reaktywne formy tlenu jako narzędzie walki z chorobami nowotworowymi.

W walce z chorobami nowotworowymi niezwykle ważne jest zastosowanie takiej terapii, która pozwoliłaby na skuteczną eliminację komórek nowotworowych, bez uszkodzenia komórek prawidłowych. Ze względu na fakt, iż komórki nowotworowe często funkcjonują w warunkach stresu oksydacyjnego, można przypuszczać, że będą one szczególnie wrażliwe na działanie czynników generujących reaktywne formy tlenu lub osłabiających systemy obrony antyoksydacyjnej. Zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej związków, których mechanizm działania ściśle wiąże się z produkcją RFT, okazało się w wielu przypadkach skuteczne [Deeb D. i wsp., 2010; Jianyong L. i wsp., 2010; Moon D.-O. i wsp., 2010], chociaż obserwowano również brak wrażliwości określonych komórek nowotworowych na tego typu substancje [Niu C. i wsp., 1999; Ramanathan B. i wsp., 2005]. Jak wynika z doniesień literaturowych, szereg chemoterapeutyków wpływa na zwiększenie stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych, jednakże mechanizmy wiążące RFT ze śmiercią tychże komórek w wielu przypadkach wymagają wyjaśnienia.

I.5.3.1. RFT generowane przez chemoterapeutyki przeciwnowotworowe oraz ich rola w indukcji apoptozy.

Do najbardziej znanych chemoterapeutyków przeciwnowotworowych generujących RFT zaliczamy między innymi antracykliny, które jako związki o budowie chinonowej łatwo ulegają redukcji jednoelektronowej do formy semichinonowej. Na skutek przyłączenia jednego elektronu do cząsteczki antracykliny powstaje rodnik semichinonowy, który reagując z tlenem cząsteczkowym ulega utlenieniu i powraca do macierzystej formy chinonowej, natomiast tlen cząsteczkowy po przyjęciu niesparowanego elektronu przechodzi w anionorodnik ponadtlenkowy (Rys. 6) [Kovacic P. i Osuna J. A., 2000; Szulawska A. i Czyż M., 2006]. Badania przeprowadzone na frakcjach subkomórkowych serca wykazały, że decydującą rolę w reakcji redukcji jednoelektronowej antracyklin odgrywiają: mikrosomalna reduktaza NADPH-cytochrom P-450, mitochondrialna NADH dehydrogenaza oraz w mniejszym stopniu cytoplazmatyczna oksydaza ksantynowa [Dudka J., 2006]. Dowiedziono również, iż generowanie reaktywnych form tlenu może przebiegać nieenzymatycznie, przez połączenie antracykliny z jonami żelaza (III), w którym to połączeniu dochodzi do przemieszczeń elektronów i redukcji żelaza (do formy Fe^{2+}). Kompleks taki ma charakter wolnego rodnika i z łatwością przenosi elektron na tlen cząsteczkowy, tworząc w ten sposób anionorodnik ponadtlenkowy [Zweier J. L. i wsp., 1986; Cheeseman K. H. i Slater T. F., 1993]. Należy także pamiętać, iż żelazo, niezależnie od tworzenia połączeń z antracyklinami, spełnia funkcję katalizatora w reakcji Fentona, w przebiegu której powstaje silnie toksyczny rodnik hydroksylowy [Kotamraju S. i wsp., 2002].

W przypadku antracyklin, generowanie przez nie RFT, pociąga za sobą występowanie niezwykle niekorzystnego efektu ubocznego w terapii przeciwnowotworowej, a mianowicie efektu kardiotoksycznego [Olson R. D. i wsp., 1980]. Mięsień sercowy jest szczególnie wrażliwy na działanie reaktywnych form tlenu, ponieważ kardiomiocyty charakteryzują się niskim poziomem enzymów ochronnych (np. dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy), a antracykliny dodatkowo wpływają na obniżenie poziomu peroksydazy glutationowej. Dowiedziono również, że doksorubicyna zaburza syntezę ATP, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia kurczliwości mięśnia sercowego, kardiomiopatii i trwałego uszkodzenia serca [Cortes E. P. i wsp., 1975].



Rys. 6. Powstawanie reaktywnych form tlenu w jednoelektronowej reakcji redukcji antracyklin. Dodanie jednego elektronu do reszty chinonu w pierścieniu C doksorubicyny prowadzi do powstania semichinonu. W wyniku przemiany semichinonu do chinonu dochodzi do redukcji tlenu i powstawania anionorodnika nadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), a następnie nadtlenku wodoru (H_2O_2). Semichinon utlenia również wiązania glikozydowe między pierścieniem A a daunoazaminą, na skutek czego powstaje 7-deoksyaglikon, który wnika do błon komórkowych sprzyjając powstawaniu jeszcze większej ilości RFT [Szuławska A. i Czyż M., 2006].

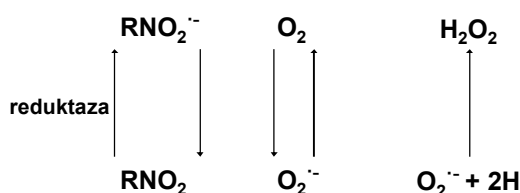
Poza antracyklinami, szereg innych chemoterapeutyków generuje reaktywne formy tlenu na drodze reakcji oksydoredukcyjnych, co udowodniono między innymi w przypadku naftochinonów, aromatycznych eterów, antyestrogenów, związków aromatycznych posiadających grupę nitrową oraz związków o budowie fenoli [Kovacic P. i Osuna J. A., 2000]. Niektóre z nich zawierają w swej strukturze ugrupowania biorące bezpośredni udział w reakcjach oksydoredukcyjnych [Cai J. i Jones P. D., 1999; Wen J. i wsp., 2002]. Inne zaś, ulegają w komórkach metabolicznym przemianom, prowadzącym do powstawania reaktywnych metabolitów, które w reakcji z tlenem mogą wytwarzać RFT. Przykład tego typu chemoterapeutyków stanowią zarówno etopozyd, jak i tamoksifen, które w komórkach tworzą metabolity o budowie chinonowej, generujące reaktywne formy tlenu według mechanizmu opisanego dla antracyklin [Sinha B. K., 1989; Dehal S. S. i Kupfer D., 1996]. Jednocześnie, w przypadku chinonów, obserwowany na skutek ich zastosowania wzrost stacjonarnych stężeń RFT w komórkach, niejednokrotnie wynika ze znacznego obniżenia poziomu GSH przez te związki, nie zaś z przebiegu reakcji oksydoredukcyjnych z ich udziałem (chinony wykazują silną zdolność do tworzenia adduktów ze związkami zawierającymi w swej strukturze grupy $-SH$, w tym z glutationem).

Dowodzą tego badania przeprowadzone między innymi na komórkach ludzkiego raka prostaty PC-3, LNCaP i C4-2 traktowanych naftochinonem – plumbaginą [Powolny A. A. i Singh S. V., 2008].

Redukcja związków aromatycznych posiadających grupę nitrową, również prowadzi do powstawania reaktywnych metabolitów tychże związków, które mogą wytwarzać RFT na drodze bezpośredniej reakcji z tlenem lub pośrednio, poprzez obniżenie poziomu zredukowanej formy glutationu [Kovacic P. i Osuna J. A., 2000]. Kończącym produktem redukcji grupy nitrowej jest grupa aminowa (Rys. 7). O ile pochodne nitrowe oraz aminowe są stosunkowo trwałe, o tyle produkty pośrednie, powstające w procesie redukcji pochodnych nitrowych do aminowych, wykazują wysoką reaktywność [Beland F. A. i wsp., 1985]. W przypadku związków nitrowych, główne źródło RFT, w pierwszej zaś kolejności anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot -}$), stanowi reakcja utlenienia anionorodnika nitrowego, generowanego na skutek redukcji grupy nitrowej [Mason R. P. i Holtzman J. L., 1975] (Rys. 8).



Rys. 7. Schemat redukcji związków aromatycznych zawierających grupę nitrową: 1-związek aromatyczny z grupą nitrową, 2-anionorodnik nitrowy, 3-pochodna nitrozo, 4-rodnik nitroksydowy, 5-hydroksyloamina, 6-kationorodnik aminowy, 7-aromatyczna amina [Moreno S. N. J. i Docampo R., 1985].



Rys. 8. Reakcja utlenienia anionorodnika nitrowego, będącego jednym z produktów pośrednich procesu redukcji pochodnych nitrowych do aminowych. W reakcji tej, poza wyjściowym związkiem nitrowym powstaje również anionorodnik ponadtlenkowy, ulegający przekształceniu w nadtlenek wodoru (opracowane na podstawie [Mason R. P. i Holtzman J. L., 1975]).

Flawonoidy, które z reguły wykazują działanie antyoksydacyjne, w określonych okolicznościach i w zależności od swej struktury, także mogą generować reaktywne formy tlenu w wyniku obniżania poziomu glutationu. I tak, spadek stężenia GSH i związany z tym wzrost ilości RFT obserwowano w komórkach ludzkiego raka płuc A549, ludzkiej białaczki HL-60 i ludzkiego raka prostaty PC-3 poddanych działaniu chryzyny [Kachadourian R.

i Day B.J., 2006], jak również w komórkach ludzkiego raka wątroby HepG2 traktowanych 8-bromo-7-metoksychryzyną [Yang X.-H. i wsp., 2010].

Jak wynika z doniesień literaturowych, szereg związków stosowanych w leczeniu chorób nowotworowych indukuje stres oksydacyjny poprzez osłabienie mechanizmów obrony antyoksydacyjnej komórek. Przykładem takiego związku jest butioninosulfoksymina (BSO), która hamuje syntezę glutationu [Armstrong J. S. i wsp., 2002]. Stosowane są również związki, będące specyficznymi inhibitorami enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) czy katalaza. Do inhibitorów SOD można zaliczyć między innymi 2-metoksyestradiol, który preferencyjnie eliminuje komórki ludzkiej białaczki, nie wykazując przy tym właściwości cytotoksycznych w stosunku do normalnych limfocytów ludzkich [Huang P. i wsp., 2000; Hileman E. O. i wsp., 2004] oraz chelatory miedzi, w tym związek o symbolu ATN-224 [Juarez J. C. i wsp., 2006]. Trójtlenek arsenu zaś, może hamować aktywność peroksydazy glutationowej, co sprzyja akumulacji H_2O_2 w komórce [McCafferty-Grad J. i wsp., 2003]. Ponadto, związek ten wpływa na zwiększenie produkcji anionorodnika ponadtlenkowego poprzez zaburzenie prawidłowego funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego [Pelicano H. i wsp., 2003].

Zwiększenie stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych obserwowano również w przypadku zastosowania cis-platyny, związku zaburzającego syntezę DNA [Spitz D. R. i wsp., 1993; Miyajima A. i wsp., 1997], a także bleomycyny [Rashid R. i wsp., 1999], która wykazuje zdolność do indukowania rodnika hydroksylowego i uszkodzenia DNA w obecności jonów żelaza oraz czynnika redukującego [Kovacic P. i Osuna J. A., 2000].

Niezwykle istotną funkcją pełnioną przez reaktywne formy tlenu jest udział w programowanej śmierci komórki, zwanej też apoptozą. RFT mogą zarówno przyczyniać się do powstawania uszkodzeń komórki będących sygnałem do inicjacji apoptozy, jak również mogą one brać udział w realizacji tego procesu [Bartosz G., 1998; Simon H.-U. i wsp., 2000]. Ponadto, apoptozę indukują produkty reakcji reaktywnych form tlenu (np. nadtlenki) oraz związki powstające z rozpadu tych produktów, a także czynniki bezpośrednio generujące lub pośrednio zwiększające wytwarzanie RFT. Dowiedziono również, że reaktywne formy tlenu indukują apoptozę tylko w pewnym przedziale dawek, albowiem bardzo wysokie ich stężenia prowadzą do śmierci komórek na drodze nekrozy [Anderson K. M. i wsp., 1999].

Wysunięto kilka hipotez dotyczących możliwych mechanizmów indukcji apoptozy na skutek wystąpienia w komórce stresu oksydacyjnego. Reaktywne formy tlenu powodują między innymi powstawanie podwójnych pęknięć DNA, które są szczególnie toksyczne dla

komórki i mogą prowadzić do jej śmierci [Breen P. A. i Murphy A. J., 1995; Helleday T. i wsp., 2007]. Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach ludzkiego raka piersi MCF-7 poddanych działaniu salwicyny potwierdziły, iż tworzone przez ten związek RFT prowadzą do indukcji apoptozy wspomnianych komórek właśnie poprzez generowanie podwójnych pęknięć DNA [Lu H.-R. i wsp., 2005]. Co więcej, szereg chemoterapeutyków uszkadzających DNA, takich jak np. interkalująca do DNA amsakryna, będąca pochodną 9-anilinoakrydyny, wpływa na zwiększenie ilości RFT w komórce [Baguley B. C. i wsp., 2003]. Ostatecznie, uszkodzenia DNA mogą aktywować polimerazę poli(ADP-rybozy), co prowadzi do obniżenia wewnątrzkomórkowej puli NAD^+/NADH oraz spadku stężenia ATP, a co za tym idzie do pozbawienia komórki energii i w konsekwencji jej śmierci [Stoian I. i wsp., 1996].

Obniżenie stężenia zredukowanego glutationu (GSH), będącego głównym wewnątrzkomórkowym antyoksydantem, obserwowano w przebiegu apoptozy indukowanej działaniem szeregu czynników, między innymi we wczesnych stadiach apoptozy tymocytów wywołanej przez deksametazon, tapsygarginę lub gliotoksynę [Macho A. i wsp., 1997; Armstrong J. S. i wsp., 2002; Chen Q. i wsp., 2003]. Przeprowadzone badania dowiodły, że egzogenny GSH w wielu sytuacjach przeciwdziała apoptozie, podczas gdy jego utleniona forma (GSSG) nasila ją [Beaver J. P. i Waring P., 1995]. Ponadto stwierdzono, iż do spadku poziomu wewnątrzkomórkowego glutationu niekoniecznie dochodzi na skutek jego utlenienia. Może to nastąpić w wyniku jego wypływu z komórki, co obserwowano w przypadku monocytów oraz limfocytów ekspozowanych na działanie szeregu czynników apoptotycznych [van den Dobbelen D. J. i wsp., 1996].

Jak już wspomniano, niektóre chemoterapeutyki indukują apoptozę na skutek obniżenia poziomu glutationu w komórce i związanego z tym wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu, co obserwowano między innymi w przypadku komórek ludzkiego raka płuc SCLC traktowanych inhibitorem proteasomów MG132 [Bang J. H. i wsp., 2004] oraz komórek ludzkiego raka prostaty PC-3 poddanych działaniu sulforafanu [Singh V. S. i wsp., 2005], a także w przypadku komórek ludzkiej białaczki HL-60 ekspozowanych na działanie (+)-kordiachinonu J (ang. *(+)-cordiaquinone J*) [Marinho-Filho J. D. B. i wsp., 2010]. Niekiedy jednak mamy do czynienia z sytuacją odwrotną, czego dowodzą badania przeprowadzone na komórkach ludzkiego raka wątroby HepG2 traktowanych benzotiazolem DPB-5. Wówczas do spadku stężenia GSH w komórce dochodzi na skutek zwiększonej produkcji RFT [Li J. i wsp., 2010]. Niezależnie jednak od mechanizmu, obniżenie stężenia głównego wewnątrzkomórkowego przeciwutleniacza, jeśli nie jest następstwem stresu oksydacyjnego, to indukuje go.

Okolo 10% glutationu występującego w komórce znajduje się w mitochondriach (mGSH) [Armstrong J. S. i wsp., 2002]. Organelle te nie są zdolne do syntezy GSH, więc importują go z cytozolu. Utrzymywanie odpowiedniego stężenia glutationu w mitochondriach ma szczególne znaczenie dla usuwania reaktywnych form tlenu powstających podczas oksydacyjnej fosforylacji, jak również dla zapobiegania procesowi apoptozy [Muyderman H. i wsp., 2004]. Wykazano, iż na skutek obniżenia poziomu GSH w komórkach ludzkiej białaczki HL-60 traktowanych butioninosulfoksyminą (BSO), dochodziło do nadprodukcji RFT przez kompleks III mitochondrialnego łańcucha oddechowego, co prowadziło do apoptozy [Armstrong J. S. i Jones D. P., 2002]. Dowiedziono również, że komórki ludzkiego raka trzustki COLO357 oraz PANC1, poddane działaniu triterpenoidu CDDO-Im, ulegają apoptozie na skutek selektywnego obniżenia poziomu mitochondrialnego glutationu przez ten związek [Samudio I. i wsp., 2005].

Kluczową rolę w procesie apoptozy odgrywa główne wewnątrzkomórkowe źródło reaktywnych form tlenu, a mianowicie mitochondria [Green D. i Reed J. C., 1998; Gulbins E. i wsp., 2000]. Jednym z kluczowych parametrów, określających zaburzenie funkcji tych organelli podczas apoptozy, jest spadek potencjału elektrochemicznego ($\Delta\Psi_m$) na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Spadek potencjału $\Delta\Psi_m$ poniżej krytycznej wartości tzw. potencjału bramkującego, sprzyja otwieraniu megakanałów mitochondrialnych, w wyniku czego dochodzi do uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy szeregu białek apoptogennych (np. cytochromu c i czynnika indukującego apoptozę AIF), jak również może prowadzić do wtórnego generowania dużych ilości RFT [Grzelakowska-Sztabert B., 1998; Düssmann H. i wsp., 2003]. Jednym z czynników, które mogą powodować otwarcie megakanału mitochondrialnego jest stres oksydacyjny [Herrera B. i wsp., 2001; Huang J. i wsp., 2008; Marinho-Filho J. D. B. i wsp., 2010]. Wykazano istnienie dwóch centrów redoks regulujących otwarcie tego kanału. Jedno z nich kontrolowane jest przez stopień utlenienia układu dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych ($NAD^+/NADH$ i $NADP^+/NADPH$). Drugie zaś zależy od stopnia utlenienia wewnątrzkomórkowych tioli (przede wszystkim GSH/GSSG) [Constantini P. i wsp., 1996].

Szereg związków przeciwnowotworowych, w tym chemoterapeutyki generujące RFT, indukuje apoptozę zależną od mitochondriów, co dowiodły badania przeprowadzone między innymi na komórkach ludzkiego raka wątroby Hep3B poddanych działaniu związku VCA wyizolowanego z *Viscum album* L. [Kim W.-H. i wsp., 2004] i komórkach ludzkiej białaczki K562 traktowanych związkiem MG132, będącym inhibitorem proteasomów oraz czynnika NF- κ B [Zanotto-Filho A. i wsp., 2010]. Co więcej udowodniono, iż tworzone przez

chemoterapeutyki reaktywne formy tlenu mogą bezpośrednio wpływać na spadek potencjału $\Delta\Psi_m$ i związaną z tym śmierć komórek na drodze apoptozy, tak jak w przypadku komórek ludzkiego raka jelita grubego Colo-205 traktowanych herbimycyną A [Mancini M. i wsp., 1997], czy komórek białaczki limfoblastycznej Jurkat eksponowanych na działanie kapsaicyny [Macho A. i wsp., 1998] oraz komórek ludzkiej białaczki HL-60 traktowanych duokarmycyną A [Tada-Oikawa S. i wsp., 1999]. Niekiedy jednak, dochodzi do wtórnego generowania dużych ilości RFT w wyniku działania chemoterapeutyku, powodującego spadek potencjału mitochondrialnego na drodze nie związanej z indukcją stresu oksydacyjnego. Nie zmienia to faktu, iż powstające w ten sposób reaktywne formy tlenu mogą uczestniczyć w ostatniej, wykonawczej fazie apoptozy, o czym świadczą wyniki badań przeprowadzonych między innymi na komórkach ludzkiego raka piersi MCF-7 poddanych działaniu staurosporyny [Düssmann H. i wsp., 2003].

Kluczowym, pod względem biochemicznym, zjawiskiem zachodzącym w komórce apoptotycznej, oprócz zaniku integralności wewnętrznej błony mitochondrialnej, jest uruchomienie kaskady specyficznych proteaz cysteinowych – kaspaz [Brenner C. i Kroemer G., 2000]. Zarówno permeabilizacja błony mitochondrialnej, jak i aktywacja kaspaz przeplatają się ze sobą. Z jednej strony, kaspazy mogą stymulować zmiany integralności mitochondriów, z drugiej zaś zanik integralności zewnętrznej błony mitochondrialnej pociąga za sobą uwolnienie szeregu czynników apoptogennych, w tym bezpośrednich aktywatorów kaspaz [Guo Y. i wsp., 2002]. A zatem, pod względem molekularnym aktywacja kaspaz i permeabilizacja błony mitochondrialnej, razem bądź niezależnie, stanowią punkt kontrolny apoptozy [Green D. i Kroemer G., 1998]. Aktywację kaspaz obserwowano podczas przebiegu apoptozy indukowanej przez szereg chemoterapeutyków, w tym związków generujących RFT [Wang X.-S. i wsp., 2006; Deeb D. i wsp., 2010]. Jak wynika z doniesień literaturowych, reaktywne formy tlenu mogą stymulować, bądź hamować aktywność proteaz cysteinowych, będących głównymi enzymami wykonawczymi procesu apoptozy. Jednak dokładny mechanizm, według którego RFT wpływają na kaspazy, w wielu przypadkach pozostaje niewyjaśniony. Prawdopodobnie, jak wspomniano wyżej, reaktywne formy tlenu wpływają bezpośrednio na permeabilizację błony mitochondrialnej, a co za tym idzie sprzyjają uwalnianiu z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów cytochromu c [Fernández-Checa C. J., 2003; Samudio I. i wsp., 2005], który jest czynnikiem niezbędnym do aktywacji kaspaz efektorowych, w tym kaspazy-3 [Tada-Oikawa S. i wsp., 1999; Lee M.-G. i wsp., 2001]. Z taką sytuacją mamy do czynienia między innymi w przypadku komórek ludzkiego raka płuc SCLC traktowanych inhibitorem

proteasomów MG132 [Bang J. H. i wsp., 2004], a także ludzkich raków prostaty LNCaP oraz PC-3 poddanych działaniu triterpenoidu CDDO-Me [Deeb D. i wsp., 2010]. Wyniki innych badań, przeprowadzonych na komórkach ludzkiego raka wątroby HepG2 eksponowanych na działanie 8-bromo-7-metoksychryzyny wskazują, iż generowane przez ten związek RFT w pierwszej kolejności aktywują kinazę JNK, a ta z kolei wpływa na aktywację kaspazy-3 [Yang X.-H. i wsp., 2010]. We wszystkich wymienionych powyżej przypadkach, zastosowanie antyoksydanta w postaci N-acetylo-L-cysteiny zapobiegało aktywacji kaspazy-3 oraz związanej z tym procesem indukcji apoptozy. Aktywacja kinazy JNK, zależna od RFT, może również wpływać na aktywację kaspazy-2, co wykazały badania prowadzone na komórkach białaczki limfoblastycznej Jurkat poddanych działaniu aromatycznego alkaloidu ASC [Dirsch M. V. i wsp., 2004]. Dowiedziono również, że reaktywne formy tlenu odgrywają istotną rolę w aktywacji kaspazy-8 w komórkach ludzkiego raka prostaty PC-3 traktowanych sulforafanem [Singh S. V. i wsp., 2005] oraz kaspazy 7, 8 i 9 w komórkach nowotworu wątroby SH-J1 eksponowanych na działanie partenolidu [Wen J. i wsp., 2002]. Ostatecznie, jak już wspomniano, reaktywne formy tlenu mogą nie tylko stymulować, ale także hamować aktywność kaspaz, głównie poprzez modyfikacje krytycznej reszty cysteiny w centrum aktywnym tychże enzymów [Marnett L. J. i wsp., 2003].

Reaktywne formy tlenu mogą uczestniczyć w indukcji apoptozy również na drodze aktywacji „receptora śmierci” CD95, głównie poprzez regulowanie transkrypcji liganda CD95-L [Matés J. M. i Sánchez-Jiménez F. M., 2000], co obserwowano między innymi w przypadku komórek ludzkiej białaczki CEM traktowanych doksorubicyną, gdzie udowodniono bezpośrednią zależność pomiędzy nadprodukcją RFT przez wspomniany chemoterapeutyk, a wzmożoną transkrypcją liganda CD95-L [Friesen C. i wsp., 1999]. Podobną zależność obserwowano także w przypadku komórek ludzkiego raka wątroby, poddanych działaniu bleomycyny [Hug H. i wsp., 1997]. W obu sytuacjach, zastosowanie N-acetylo-L-cysteiny lub glutationu nie tylko wpłynęło na obniżenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach, ale również doprowadziło do zmniejszenia ekspresji CD95-L mRNA i produkcji liganda CD95-L, a co za tym idzie do zahamowania śmierci wymienionych wyżej komórek nowotworowych na drodze apoptozy.

Jak wspomniano wcześniej, nadtlenek wodoru i inne RFT wpływają na aktywację szeregu czynników transkrypcyjnych, w tym NF- κ B oraz AP-1, co odgrywa istotną rolę w procesie apoptozy (NF- κ B prowadzi między innymi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego p53, głównego egzekutora apoptozy) [Johnson T. M. i wsp., 1996; Ye J. i wsp., 1999; Huang J. i wsp., 2008]. Aktywację czynnika NF- κ B, zależną od reaktywnych

form tlenu, obserwowano między innymi w komórkach nowotworowych eksponowanych na działanie antracyklin, w tym daunorubicyny [Boland M. P. i wsp., 1997].

Stres oksydacyjny, wynikający z osłabienia mechanizmów antyoksydacyjnych komórek, także prowadzi do indukcji programowanej śmierci. Obniżenie stężeń antyoksydantów niskocząsteczkowych oraz antyoksydacyjnych enzymów ochronnych może mieć działanie apoptotyczne [Armstrong J. S. i wsp., 2002; Chen Q. i wsp., 2003]. I tak, komórki z niedoborem peroksydazy glutationowej wykazują większą wrażliwość na apoptotyczne działanie czynników generujących nadtlenek wodoru [Kayanoki Y. i wsp., 1996], natomiast niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej zwiększa podatność leukocytów na apoptotyczne działanie czynników takich jak promieniowanie jonizujące lub daunomycyna [Bartosz G., 1998]. Dowiedziono również, że zahamowanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej Cu,ZnSOD przez disulfiram, będący chelatorem jonów miedzi, prowadzi do apoptozy komórek ludzkiego raka skóry w warunkach *in vitro* [Cen D. i wsp., 2004]. Co więcej, wyniki szeregu badań wskazują na zdolność antyoksydantów do hamowania apoptozy uruchamianej przez różne czynniki, między innymi przez glikokortykoidy, ceramid i jonofory Ca²⁺. Procesowi apoptozy komórek mięśni gładkich zaś, poddanych działaniu dimetylomaleinianu (tworzącego koniugat z glutationem i pozbawiającego komórki głównego, wewnątrzkomórkowego antyoksydanta), przeciwdziała zarówno katalaza, jak i chelator jonów żelaza - deferryoksamina [Li P-F. i wsp., 1997], natomiast apoptozie wywołanej przez TNF przeciwdziałają antyoksydanty takie jak tioredoksyna i N-acetylo-L-cysteina (NAC), a także podwyższony poziom aktywności SOD w komórkach [Chang D. J. i wsp., 1992; Hirose K. i wsp., 1993]. N-acetylo-L-cysteina hamuje również apoptozę mieloidalnych komórek białaczkowych M1, zależną, jak i niezależną od statutu genu *p53* [Lotem J. i wsp., 1996].

Nadekspresja białka Bcl-2 może odgrywać istotną rolę w zapobieganiu apoptozie komórek ssaków, ponieważ jedną z przypisywanych mu funkcji jest funkcja antyoksydacyjna [Veis D. J. i wsp., 1993]. Wyniki szeregu badań dowodzą, że podwyższony poziom tego białka chroni komórki przed apoptozą wywołaną przez nadtlenek wodoru, menadion, wodoronadtlenek t-butyłu oraz obniżenie poziomu GSH indukowane działaniem dietylomaleinianu lub butionylosulfoksyminy (BSO) [Hockenbery D. M. i wsp., 1993; Kane D. J. i wsp., 1993; Bartosz G., 1998]. Mechanizm antyoksydacyjnego działania białka Bcl-2 najprawdopodobniej związany jest z faktem, iż jego nadekspresja stymuluje aktywność Cu,ZnSOD (ale nie MnSOD) oraz zwiększa poziom glutationu w komórkach [Lee M. i wsp., 2001]. Co więcej udowodniono, iż białko Bcl-2 przeciwdziała peroksydacji lipidów

[Hockenbery D. M. i wsp., 1993], a także spełnia funkcję „zmiatacza” reaktywnych form tlenu [Stoian I. i wsp., 1996]. Białko Bcl-xL, homolog Bcl-2, również zapobiega apoptozie indukowanej przez czynniki generujące RFT, takie jak chemoterapeutyki, promieniowanie gamma, ceramid i czynniki utleniające, a także wzmaga biosyntezę glutationu [Bartosz G., 2003]. Przeprowadzone badania dowiodły między innymi, że nadekspresja genu *bcl-xL* w komórkach ludzkiej białaczki CEM prowadzi do zwiększenia poziomu GSH w tychże komórkach i wykształcenia związanej z tym faktem oporności wspomnianych komórek na działanie doksorubicyny [Friesen C. i wsp., 2004].

Reaktywne formy tlenu są odpowiedzialne za aktywację kinaz MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*), do których zaliczane są m. in. kinazy JNK (ang. *c-jun-N-terminal kinases*) i p38 [El-Najjar N. i wsp., 2010; Yang X-H. i wsp., 2010]. Jedną z funkcji wymienionych kinaz jest promowanie procesu apoptozy w wielu typach komórek, włączając komórki nowotworowe. Dowiedzono między innymi, iż komórki ludzkiego szpiczaka U266, traktowane jednocześnie flawopirydolem oraz inhibitorem białka Bcl-2 - HA14-1, umierają na drodze apoptozy, w której istotną rolę odgrywa kinaza JNK, aktywowana na skutek działania RFT generowanych przez flawopirydol [Pei X.-Y. i wsp., 2004]. Podobny efekt obserwowano w komórkach ludzkiego raka wątroby HepG2 traktowanych 8-bromo-7-metoksychryzyną [Yang X.-H. i wsp., 2010] lub buteiną [Moon D.-O. i wsp., 2010]. Aktywację obu kinaz, zarówno JNK, jak i p38, obserwowano w ulegających apoptozie komórkach neuroblastomy KP-N-TK, poddanych działaniu fenretinidu [Osone S. i wsp., 2004]. Uważa się, że szlak sygnalizacyjny związany z kinazą JNK odgrywa istotną rolę w indukcji apoptozy zależnej od mitochondriów (sprzyja uwalnianiu cytochromu c z mitochondriów poprzez fosforylację białek Bcl-2 i Bcl-xL) [Dirsch M. V. i wsp., 2004; Kim W-H. i wsp., 2004]. Działanie proapoptotyczne JNK i p38 może być również poparte faktem, iż pośredniczą one w aktywacji białka p53, które spełnia ważną funkcję w procesie apoptozy [Osone S. i wsp., 2004]. Przeprowadzone badania dowiodły, iż RFT generowane przez oridonin, diterpenoid wyizolowany z *Rabdosia rubescens*, aktywują kinazę p38, a ta z kolei aktywuje białko p53, co prowadzi do śmierci komórek ludzkiego raka wątroby HepG2 na drodze apoptozy. Dodatkowo, zastosowanie antyoksydanta w postaci N-acetylo-L-cysteiny, nie tylko wpłynęło na zablokowanie fosforylacji kinazy p38, ale również doprowadziło do częściowego zahamowania aktywacji białka p53, a tym samym procesowi apoptozy wspomnianych komórek [Huang J. i wsp., 2008].

I.5.3.2. Udział RFT w procesie starzenia komórek.

W 1956 roku Harman przedstawił wolnorodnikową teorię starzenia, według której uszkodzenia DNA, spowodowane działaniem reaktywnych form tlenu, uważane są za główną i pierwotną przyczynę tego procesu [Harman D., 1956].

Badania hodowli komórkowych dowiodły, że w starzejących się ludzkich fibroblastach każdego dnia powstaje czterokrotnie więcej 8-oksyo-dG (tzw. markera wolnorodnikowych uszkodzeń DNA), w porównaniu z młodymi komórkami. Co więcej, stały poziom 8-oksyo-dG w DNA jest o około 35% wyższy w starzejących się komórkach, niż w prawidłowych. Udowodniono również, że podczas starzenia komórek *in vitro* w znaczącym stopniu obniżeniu ulega aktywność mechanizmów naprawczych DNA, co może tłumaczyć wzrost poziomu 8-oksyo-dG wraz z wiekiem komórek [Chen Q. i wsp., 1995].

W różnych narządach organizmu człowieka i wielu zwierząt doświadczalnych, między innymi w wątrobie szczura [Richter C. i wsp., 1988] i mózgu człowieka [Mecocci P. i wsp., 1993], obserwowano wraz z upływem czasu wzrost poziomu oksydacyjnych uszkodzeń jądrowego i mitochondrialnego DNA. Co ciekawe, poziom oksydacyjnych modyfikacji DNA jest często kilkukrotnie wyższy w mitochondriach, niż w jądrowym DNA [Wiseman H. i Halliwell B., 1996]. W zgodzie z powyższym pozostaje fakt, iż to właśnie mitochondria uważane są za główne źródło reaktywnych form tlenu, odpowiedzialnych za starzenie się komórek i całych organizmów [Balaban R. S., 2005; Lesnefsky E. J., 2006]. Badania przeprowadzone na myszach dowiodły między innymi, iż nadekspresja katalazy w mitochondriach komórek tychże gryzoni prowadzi do wydłużenia ich życia [Linford N. J. i wsp., 2006].

Destrukcyjne działanie RFT, towarzyszących procesowi starzenia, dotyczy nie tylko oksydacyjnych uszkodzeń materiału genetycznego, ale również innych składników komórki, takich jak białka czy lipidy. Na skutek toksycznego działania reaktywnych form tlenu dochodzi bowiem do akumulacji oksydacyjnie zmodyfikowanych składników komórki, co może być wynikiem osłabienia mechanizmów naprawczych lub systemów degradujących uszkodzone cząsteczki [Camougrand N. i Rigoulet M., 2001].

Obecnie uwagę badaczy skupia proces tzw. przyspieszonego starzenia (ang. *accelerated senescence*) komórek nowotworowych, stanowiący mechanizm nieodwracalnego zahamowania ich proliferacji [Campisi J., 2001]. Proces ten polega na zahamowaniu wzrostu i rozwoju komórki nowotworowej w odpowiedzi na szereg różnych czynników, w tym związków generujących RFT [Roninson I. i wsp., 2001; Catalano A.

i wsp., 2005]. Choć komórki starzejące się nie są zdolne do podziałów, to jednak pozostają one metabolicznie aktywne [Roninson I., 2003].

Starzenie komórkowe jest w normalnych komórkach nadzorowane przez geny odpowiedzialne za kontrolę cyklu komórkowego na pograniczu faz G1/S lub G2/M. Stąd, podstawową rolę w tym procesie pełnią geny takie jak *p53*, *p21^{Cip1/Waf1}* (*p21*) oraz *p16^{INK4a}* (*p16*) [Catalano A. i wsp., 2005]. Geny *p53* i *p16* należą do jednych z najczęściej zmutowanych w komórkach nowotworowych. Pomimo mniejszej wrażliwości tychże komórek na indukcję starzenia w warunkach fizjologicznych, ich proliferacja może jednak ulec nieodwracalnemu zatrzymaniu pod wpływem chemo- czy radioterapii. Z doniesień literaturowych wynika, że reaktywne formy tlenu mogą odgrywać istotną rolę w procesie starzenia. Podwyższony poziom RFT obserwowano między innymi w komórkach ludzkiego raka piersi MCF-7 oraz ludzkiego raka płuc H460 ulegających starzeniu na skutek działania doksorubicyny [Song Y. S. i wsp., 2005] Uważa się, że udział reaktywnych form tlenu w procesie starzenia zależnym od *p53* może wynikać z ich zdolności do aktywowania tego genu [Ramsey M. R. i Sharpless N. E., 2006; Vigneron A. i Vousden K. H., 2010]. Ponadto, przeprowadzone badania wskazują na udział RFT w aktywacji kinazy p38, która z kolei aktywuje geny związane z procesem starzenia komórek, takie jak *p16^{INK4a}* oraz *p19^{Arf}* [Papaconstantinou J. i Hsieh Ch.-Ch., 2010]. Ostatecznie, reaktywne formy tlenu, w szczególności zaś nadtlenek wodoru, są zaangażowane w indukcję procesu starzenia komórek nowotworowych, wywołanego przez białka Ras [Lee A. C. i wsp., 1999].

II. Wprowadzenie, założenia i cel pracy.

Istotnym etapem w poznawaniu mechanizmu działania związku o właściwościach przeciwnowotworowych jest określenie jego wpływu na komórki nowotworowe w warunkach *in vitro*. Jak dowiedziono, odpowiedź tychże komórek na działanie związków uszkodzających DNA zależy od szeregu czynników, z których jedne warunkują ich obecność w komórkach, a inne regulują procesy naprawy uszkodzeń DNA, progresję komórek w cyklu życiowym oraz śmierć komórkową [Eastman A. i Rigas J., 1999]. Komórki, w których powstałe uszkodzenia w materiale genetycznym nie zostaną naprawione, niejednokrotnie są eliminowane na drodze apoptozy, nekrozy, katastrofy mitotycznej lub autofagii [Roninson I. B. i wsp., 2001; Kanzawa T. i wsp., 2005]. Niekiedy też, komórki te mogą ulegać procesowi określanemu jako przedwczesne lub przyspieszone starzenie (ang. *premature or accelerated senescence*), któremu towarzyszy nieodwracalne zahamowanie ich proliferacji [Campisi J., 2001].

Apoptoza, zwana też programowaną śmiercią typu I, zgodnie z klasyczną definicją zaproponowaną przez Kerr'a i współpracowników, stanowi zespół zmian biochemicznych oraz morfologicznych, występujących w umierającej komórce [Kerr J. F. i wsp., 1972]. Proces ten podlega złożonym mechanizmom regulacyjnym i wymaga w swym przebiegu indukcji specyficznych genów, syntezy RNA oraz białek. Komórki umierające na drodze apoptozy wykazują szereg charakterystycznych, morfologicznych zmian. Na skutek utraty wewnątrzkomórkowej wody i elektrolitów komórka apoptotyczna ulega obkurczeniu, jak również zmienia kształt. Co więcej, dochodzi do zagęszczenia jej cytoplazmy, kondensacji chromatyny oraz postępującej fragmentacji jądra komórkowego. W późniejszych stadiach apoptozy, fragmenty jądra wraz z cytoplazmą i pozostałymi organellami zostają otoczone błoną cytoplazmatyczną tworząc tzw. ciała apoptotyczne, zaś komórka wygląda jakby pączkowała [Sikora E., 1994]. W warunkach fizjologicznych, wytworzone ciała apoptotyczne są szybko fagocytowane przez makrofagi lub sąsiadujące komórki, co sprawia, że apoptoza nie wywołuje stanów zapalnych w otaczającej tkance [Arends M.J. i Wyllie A.H., 1991], do czego dochodzi w przypadku nekrozy, w wyniku której zawartość komórki wydostaje się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej na skutek pęcznienia cytoplazmy i przerwania ciągłości błon plazmatycznych [Columbano A., 1995]. Do kluczowych, pod względem biochemicznym, zjawisk zachodzących w komórce apoptotycznej należą: eksternalizacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej, uruchomienie

kaskady specyficznych proteaz cysteinowych – kaspaz oraz zanik integralności wewnętrznej błony mitochondrialnej [Darżynkiewicz Z. i wsp., 1996; Makin G. i Dive C., 2001].

Jak wynika z doniesień literaturowych, wiele czynników jest zdolnych do wywołania śmierci komórek. Jednym z nich jest stres oksydacyjny, do którego dochodzi w komórce na skutek zwiększenia stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu (RFT) w wyniku ich wzmożonej produkcji lub osłabienia aktywności enzymów ochronnych i obniżenia poziomu komórkowych antyoksydantów. RFT mogą zarówno powodować uszkodzenia komórki będące sygnałem do inicjacji apoptozy, jak również mogą one brać udział w egzekucji tego procesu [Bartosz G., 1998; Simon H.-U. i wsp., 2000]. Jednocześnie, indywidualnie te indukują apoptozę tylko w pewnym przedziale stężeń, albowiem bardzo wysoki ich poziom powoduje śmierć komórek na skutek zachodzenia nekrozy [Anderson K. M. i wsp., 1999]. Wyniki szeregu badań wskazują, iż mechanizm działania wielu chemoterapeutyków prowadzących do śmierci komórek nowotworowych na drodze apoptozy, w tym związków aromatycznych posiadających grupę nitrową, opiera się właśnie na generowaniu reaktywnych form tlenu [Kovacic P. i Osuna J. A., 2000; Wang X.-S. i wsp., 2006]. Zagadnienie to zostało szerzej omówione w części teoretycznej niniejszej rozprawy doktorskiej.

Powstawanie i rozwój nowotworu to nie tylko wynik nagromadzenia się mutacji w poszczególnych klasach genów komórek, ale również ich zdolności do wyłączenia mechanizmu samozniszczenia. Zastosowanie chemoterapeutyków, w celu przywrócenia komórkom nowotworowym umiejętności samoeliminacji, spowodowało ogromny wzrost zainteresowania apoptozą. W toku przeprowadzonych badań wykazano, że wiele leków i związków przeciwnowotworowych, niezależnie od ich budowy chemicznej lub mechanizmu działania, indukuje apoptozę komórek nowotworowych *in vitro* [Makin G. i Dive C., 2001]. Okazało się jednak, iż możliwość uruchomienia apoptozy przez określony związek zależy częściej od rodzaju komórek, aniżeli od właściwości chemoterapeutyku. Komórki nowotworowe wykształciły bowiem cały szereg mechanizmów, które pozwalają im na unikanie apoptozy i w związku z tym czynią je opornymi na czynniki indukujące ten rodzaj śmierci [Pan H. i wsp., 1997; Mansilla S. i wsp., 2006].

Oprócz apoptozy, w odpowiedzi na działanie związków przeciwnowotworowych, w tym uszkodzających DNA, komórki nowotworowe mogą ulegać procesowi określanemu jako przedwczesne lub przyspieszone starzenie (ang. *premature or accelerated senescence*), któremu towarzyszy nieodwracalne zahamowanie proliferacji (w fazie G1 lub G2 cyklu życiowego w zależności od statutu białka p53 [Schmitt C. A. i wsp., 2002]), a także fenotypowe cechy starzenia replikacyjnego [Campisi J., 2001; Dimri G. P., 2005]. Komórki

starzejące się prezentują szereg charakterystycznych cech morfologicznych, takich jak powiększony rozmiar, zwiększona ziarnistość i bardziej płaski kształt [Campisi J., 2001], zaś głównym, biochemicznym markerem procesu starzenia jest podwyższona ekspresja kwaśnej SA- β -galaktozydazy (SA- β -gal ang. *senescence-associated β -galactosidase*) [Dimri G. P. i wsp., 1995]. Trwałe zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych stanowi interesującą alternatywę między innymi w stosunku do apoptozy, co wynika z faktu, iż dawka leku potrzebna do zainicjowania starzenia tychże komórek jest często znacznie niższa niż dawka wymagana do indukcji śmierci komórkowej. A zatem, do zahamowania rozwoju komórek nowotworowych może dochodzić nawet w warunkach obniżonej toksyczności stosowanego związku [Eom Y.-W. i wsp., 2005; Mansilla S. i wsp., 2006].

Zastosowanie chemoterapeutyków uszkadzających DNA w szczególny sposób czyni komórki nowotworowe podatnymi na katastrofę mitotyczną, co wynika przede wszystkim z osłabienia punktów kontrolnych cyklu życiowego tychże komórek i ich zdolności do wejścia do mitozy mimo uszkodzeń DNA [Nitta M. i wsp., 2004]. Katastrofę mitotyczną pierwotnie definiowano jako rodzaj śmierci komórkowej wynikającej z zaburzeń w przebiegu mitozy, związanych z nieprawidłowym rozdziałem chromosomów i podziałem komórki prowadzącym do powstawania gigantycznych, niezdolnych do podziału oraz zawierających po kilka mikrojąderek komórek [Roninson I. B. i wsp., 2001; Mansilla S. i wsp., 2006]. Coraz częściej jednak postuluje się, iż katastrofa mitotyczna nie jest odrębnym typem śmierci. Wielu badaczy traktuje ten proces jako zaburzoną mitozę, która ostatecznie prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy [Chu K. i wsp., 2004; Portugal J. i wsp., 2010; Skwarska A. i wsp., 2007]. Co istotne, ze względu na fakt, iż znaczna część nowotworów pochodzenia ludzkiego nie dysponuje prawidłowo funkcjonującymi mechanizmami kontroli cyklu komórkowego, katastrofa mitotyczna może stanowić niezwykle skuteczną drogę eliminowania komórek nowotworowych, szczególnie tych, które poddano działaniu czynników uszkadzających DNA [Hirose Y. i wsp., 2001].

W ciągu ostatnich kilkunastu lat, w kontekście terapii nowotworów, bardzo duże zainteresowanie wzbudziła autofagia, zwana również autofagocytozą lub programowaną śmiercią typu II. Proces ten znany jest przede wszystkim jako wewnątrzkomórkowy, zachodzący przy udziale lizosomów, system degradacji składników komórkowych, tj. białek o długim okresie półtrwania, mitochondriów, peroksysomów, fragmentów aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej [Kim J. i Kilonsky D. J., 2000]. W pierwszym etapie autofagii dochodzi do tworzenia otoczonej podwójną błoną plazmatyczną wakuoli (autofagosomu), która następnie łączy się z lizosomem, dzięki czemu jej zawartość zostaje zhydrolizowana

przez lizosomalne proteazy [Gozuacik D. i Kimchi A., 2004]. Jednym z głównych, biochemicznych markerów autofagii jest białko MAP I LC3 (ang. *Microtubule Associated Protein I Light Chain 3*), które po indukcji tego procesu ulega przekształceniu z formy LC3-I (18 kDa) do formy LC3-II (16 kDa), wiążącej się z autofagosomami [Kabeya Y. i wsp., 2004; Rubinsztein D. C. i wsp., 2009]. Autofagia, której molekularny mechanizm jest stosunkowo skomplikowany i jak dotąd dość słabo poznany, może stanowić jeden z typów odpowiedzi komórek nowotworowych na działanie leków lub potencjalnych chemoterapeutyków, w tym uszkodzających DNA [Kanzawa T. i wsp., 2004; Kanzawa T. i wsp., 2005]. Jak wynika z doniesień literaturowych, choć zapoczątkowanie autofagii może wywoływać bądź opóźniać apoptozę, to jednak oba te procesy niejednokrotnie przebiegają zupełnie niezależnie od siebie, a dominacja jednego z nich zależy od rodzaju stosowanej terapii. Alternatywność autofagii w stosunku do apoptozy może leżeć u podstaw zwiększenia skuteczności terapii onkologicznej, ponieważ w komórkach opornych na indukcję apoptozy, autofagia może kompensować jej deficyt [Tsujiimoto Y. i Shimizu S., 2005].

Pomimo, iż zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej związków uszkodzających DNA może prowadzić do uruchomienia procesu starzenia lub śmierci komórkowej [Campisi J., 2001; Roninson I. B. i wsp., 2001; Kanzawa T. i wsp., 2005], to jednak należy pamiętać, że w odpowiedzi na uszkodzenia powstałe w materiale genetycznym, może również dojść do zatrzymania progresji komórek nowotworowych w ich cyklu życiowym, uruchomienia mechanizmów naprawy DNA i tym samym uniknięcia przez nie śmierci [Molinari M., 2000]. Jednocześnie, osłabienie punktów kontrolnych cyklu życiowego w komórkach nowotworowych niejednokrotnie pozwala im na wejście do mitozy mimo uszkodzeń DNA. Istnieje zatem ryzyko przeżycia komórek z uszkodzonym genomem, a co za tym idzie wykształcenia populacji bardziej agresywnej i odpornej na leczenie. Co więcej, należy także zwrócić uwagę na fakt, iż komórki ulegające starzeniu, choć nie są zdolne do proliferacji, to jednak pozostają żywe i metabolicznie aktywne, a wydzielane przez nie czynniki mogą przyczyniać się do transformacji nowotworowej sąsiadujących z nimi komórek [Campisi J., 2005]. A zatem, najbardziej skutecznym rozwiązaniem, w kontekście terapii nowotworów, byłaby szybka indukcja śmierci komórek, znajdujących się w danej fazie cyklu życiowego.

Pochodne 1-nitroakrydyny stanowią grupę związków przeciwnowotworowych, które otrzymano w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej. Zespół pod kierownictwem profesora Jerzego Konopy od wielu lat prowadzi badania nad pochodnymi 1-nitro-9-aminoakrydyny, o udowodnionej *in vivo* aktywności przeciwnowotworowej

[Hrabowska M. i wsp., 1982] i wysokiej cytotoksyczności [Konopa J. i wsp., 1969]. Jednym ze związków należących do tej grupy jest Ledakrin (Nitracrine, C-283) – pierwszy, polski, oryginalny lek przeciwnowotworowy, wprowadzony do leczenia w 1974 roku [Radzikowski C., 1974], a następnie wycofany z terapii klinicznej ze względu na jego znaczną toksyczność [Mazerska Z. i wsp., 1990]. Badania nad mechanizmem działania oraz zależnością aktywności biologicznej od struktury wykazały, że za właściwości cytotoksyczne i przeciwnowotworowe 1-nitro-9-aminoakrydyn odpowiada przede wszystkim ugrupowanie nitrowe w pozycji 1 łańcucha pierścieniowego akrydyny, które nie tylko bierze bezpośredni udział w tworzeniu kowalencyjnych wiązań sieciujących DNA, ale również aktywuje grupę aminową w pozycji 9 rdzenia akrydynowego, czyniąc ją zdolną do kowalencyjnego wiązania się do DNA [Konopa J. i wsp., 1969; Radzikowski C. i wsp., 1969; Pawlak J. W. i Konopa J., 1979; Pawlak K. i wsp., 1983; Pawlak J.W. i wsp., 1983; Gorlewska K. i wsp., 2001]. Dowiedziono także, iż pochodne 1-nitroakrydyny, po uprzedniej aktywacji metabolicznej, posiadają zdolność do międzyłańcuchowego sieciowania jądrowego DNA w komórkach nowotworowych pochodzenia ludzkiego [Pawlak K. i wsp., 1984]. Co więcej, związki te oddziałują na drodze interkalacji do DNA, choć ten rodzaj wiązania się z DNA nie wpływa w istotny sposób na ich aktywność biologiczną [Pawlak K. i wsp., 1983, Bartoszek A. i Konopa J., 1989; Szostek A., 2003].

Wprowadzenie dodatkowego podstawnika elektronodonorowego w położeniu *para* do grupy nitrowej, tzn. w pozycji 4 w układzie akrydyny, zaowocowało powstaniem nowej generacji pochodnych 4-metylo- lub 4-metoksy-1-nitroakrydyn, które stały się mniej podatne na redukcję, a tym samym bardziej stabilne metabolicznie niż macierzyste 1-nitroakrydyny, co prawdopodobnie odpowiada za ich szersze spektrum działania przeciwnowotworowego [Tadi K. i wsp., 2004; Tadi K. i wsp., 2007] i obniżoną toksyczność [Szostek A., 2003]. Jednym z głównych przedstawicieli tej grupy związków jest pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny o symbolu C-1748 (9-(2'-hydroksyloetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna; Capridine β).

Dotychczasowe badania nad mechanizmem działania pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny o symbolu C-1748, prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej wskazały między innymi, że związek ten interkaluje do DNA, aczkolwiek ten rodzaj oddziaływań z komórkowym DNA, podobnie jak w przypadku macierzystych 1-nitroakrydyn, nie odgrywa decydującej roli w jego aktywności biologicznej [Szostek A., 2003]. Dowiedziono także, iż pochodna C-1748, po uprzedniej aktywacji metabolicznej, wykazuje istotną dla jej aktywności biologicznej zdolność do

międzyłańcuchowego sieciowania jądrowego DNA w komórkach nowotworowych pochodzenia ludzkiego, w tym w komórkach raka prostaty LNCaP, jajnika HeLaS3, okrężnicy HT29 i HCT8 oraz białaczki CEM [Szostek A., 2003; Dyrz A. i wsp., 2004; Wiśniewska A. i wsp., 2004]. Ponadto, związek ten indukuje międzyłańcuchowe sieciowanie mitochondrialnego DNA komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP oraz okrężnicy HCT8 i HT29 [Lendzion A., 2009]. A zatem, związek C-1748 wpływa na funkcjonowanie najważniejszej makromolekuły komórkowej jaką jest DNA. Co więcej, jak wynika z doniesień literaturowych, redukcja związków aromatycznych posiadających grupę nitrową, do których należy badana pochodna, może prowadzić do powstawania reaktywnych metabolitów tychże związków, które w reakcji z tlenem mogą wytwarzać reaktywne formy tlenu, jak również obniżać poziom zredukowanej formy glutationu, a tym samym indukować w komórkach stres oksydacyjny, będący jednym z czynników prowadzących do ich śmierci na drodze apoptozy lub nekrozy [Kovacic P. i Osuna J. A., 2000].

Jak dotąd, w znacznym stopniu scharakteryzowano podstawowe mechanizmy działania C-1748 na poziomie molekularnym, co związane było z określeniem różnych rodzajów jego oddziaływań z DNA oraz ich znaczenia dla aktywności biologicznej tego związku. Jednocześnie, badania prowadzone na różnych modelach komórkowych, nie doprowadziły do tej pory, do stworzenia pełnego i konsekwentnego obrazu odnośnie mechanizmu biologicznego działania C-1748. Dlatego też, prowadzenie dalszych badań nad mechanizmem działania wspomnianej pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny, szczególnie na poziomie odpowiedzi komórkowej, wydaje się być uzasadnione, zwłaszcza, iż związek C-1748 jest przygotowywany do pierwszej fazy badań klinicznych i przechodzi zaawansowane badania przedkliniczne [Ashok B. T. i wsp., 2006; Ashok B. T. i wsp., 2007; Tadi K. i wsp., 2007].

Głównym celem prezentowanej pracy doktorskiej było określenie odpowiedzi komórek wybranych linii nowotworowych na działanie pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748. Realizacja tego celu obejmowała zarówno zbadanie wpływu związku C-1748 na cykl życiowy komórek nowotworowych, jak również określenie zdolności tejże pochodnej do indukcji apoptozy, katastrofy mitotycznej, autofagii i przedwczesnego starzenia komórkowego oraz zbadanie roli białka p53 w tych procesach.

Celem o znaczeniu pobocznym było zbadanie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji reaktywnych form tlenu oraz określenie znaczenia tego zjawiska dla aktywności biologicznej badanego związku.

Wybrana przeze mnie do badań pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w badaniach *in vitro* cechuje się wysoką aktywnością cytotoksyczną wobec komórek linii nowotworu prostaty [Tadi K. i wsp., 2004], a w badaniach *in vivo* wykazuje wysoką aktywność przeciwnowotworową w stosunku do ksenoprzeszczepów na myszy bezgranicze raków prostaty i okrężnicy pochodzenia ludzkiego [Tadi K. i wsp., 2007]. Dlatego też, w prowadzonych przeze mnie badaniach, jako modele eksperymentalne posłużyły mi między innymi komórki ludzkiego raka okrężnicy HCT8 i HT29 oraz komórki ludzkiego raka prostaty LNCaP. Badania przeprowadzone uprzednio w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej wykazały, iż komórki ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29, poddane działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}), umierały na drodze apoptozy, przy czym proces ten przebiegał ze znacznie większą intensywnością w przypadku komórek HCT8. Ponadto, część komórek HCT8 ulegała procesowi starzenia, czego nie obserwowano w przypadku komórek HT29 [Augustin E. i wsp., 2010]. Wyraźne różnice w efektach działania badanego związku na komórki dwóch różnych linii tego samego rodzaju nowotworu - raków jelita grubego – mogły po części wynikać z odmiennego statusu genu *p53* w tychże komórkach. Komórki linii HCT8 posiadają bowiem tzw. funkcjonalny gen *p53* (wt-*p53* ang. *wilde type of p53*), natomiast komórki linii HT29 posiadają zmutowany gen *p53* (mt-*p53* ang. *mutated type of p53*) (*p53* jest białkiem supresorowym transformacji nowotworowej i odgrywa istotną rolę w odpowiedzi komórek na stres genotoksyczny) [Petak I. i wsp., 2000]. W celu jednoznacznego określenia wpływu białka *p53* na typ odpowiedzi komórkowej, indukowanej przez pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, posłużyłam się układem złożonym z komórek ludzkiego raka jelita grubego HCT116 z funkcjonalnym genem *p53* (HCT116 $p53^{+/+}$), jak również podlinii z knock-out'em tego genu (HCT116 $p53^{-/-}$).

III. Omówienie przeprowadzonych badań i dyskusja wyników.

III.1. Wpływ pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29.

Do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach dochodzi na skutek zwiększenia stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu (RFT), wynikającego z ich wzmożonej produkcji lub osłabienia aktywności enzymów ochronnych i obniżenia poziomu komórkowych antyoksydantów. Niekorzystne działanie reaktywnych form tlenu objawia się przede wszystkim destrukcją podstawowych składników komórki, czyli białek, kwasów nukleinowych oraz lipidów, co w konsekwencji może prowadzić do śmierci komórki lub uruchomienia procesu starzenia komórkowego [Ramsey M. R. i Sharpless N. E., 2006].

Jak wynika z doniesień literaturowych, szereg chemoterapeutyków wpływa na zwiększenie stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych [Moon D.-O. i wsp., 2010; Deeb D. i wsp., 2010; Jianyong L. i wsp., 2010]. Niektóre z nich zawierają w swej strukturze ugrupowania biorące bezpośredni udział w reakcjach oksydoredukcyjnych, w przebiegu których dochodzi do generowania RFT [Cai J. i Jones P. D., 1999; Wen J. i wsp., 2002]. Inne zaś, ulegają w komórkach metabolicznym przemianom, prowadzącym do powstawania reaktywnych metabolitów, które w reakcji z tlenem mogą wytwarzać RFT, co udowodniono między innymi w przypadku związków aromatycznych, posiadających grupę nitrową. Co więcej, związki te mogą zwiększać stacjonarne stężenia reaktywnych form tlenu na skutek obniżania poziomu zredukowanej formy glutationu w komórkach [Kovacic P. i Osuna J. A., 2000].

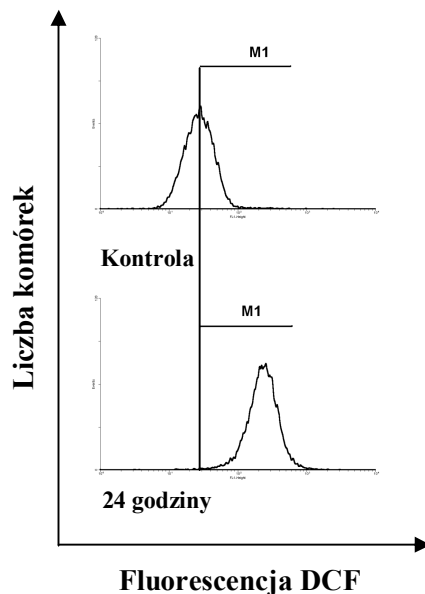
Badania przeprowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej dowiodły, iż pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 ulega metabolicznej aktywacji, a zachodząca w komórkach redukcja grupy nitrowej tego związku prowadzi do powstawania reaktywnych metabolitów [Wiśniewska A. i wsp., 2004]. W związku z powyższym, możliwe jest bezpośrednie generowanie reaktywnych form tlenu przez związek C-1748 w wyniku zachodzenia reakcji oksydoredukcyjnych z jego udziałem, jak również pośrednio, na skutek wiązania się reaktywnych metabolitów C-1748 z glutationem i obniżania poziomu tego wewnątrzkomórkowego antyoksydanta. Dlatego też, w pierwszym etapie swojej pracy postanowiłam zbadać zdolność C-1748 do indukcji reaktywnych form tlenu

w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29 oraz ewentualnie określić wpływ generowanych RFT na aktywność biologiczną tego związku.

III.1.1. Generowanie przez związek C-1748 reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29.

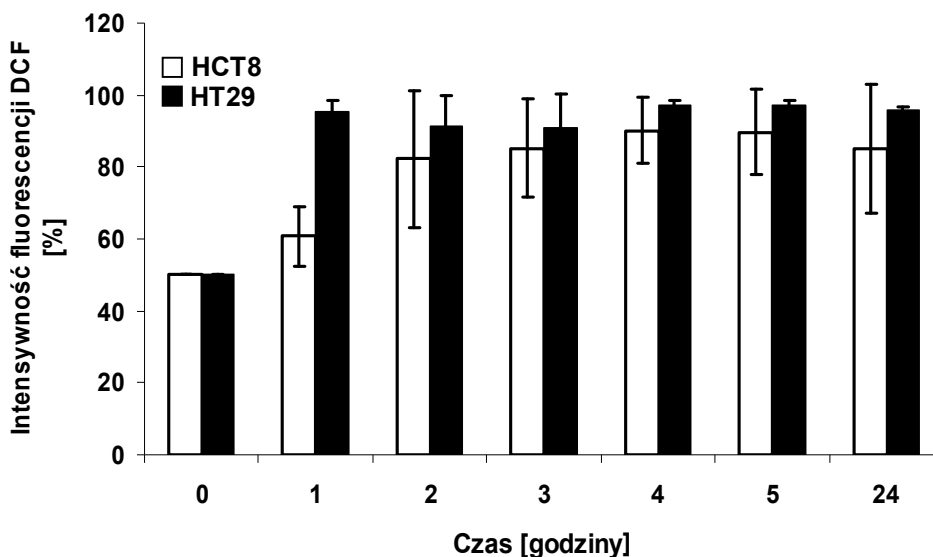
Wytwarzanie reaktywnych form tlenu w cytoplazmie komórek ekspozowanych na działanie określonego chemoterapeutyku lub związku najczęściej stwierdza się na podstawie pomiarów zmian fluorescencji utlenionej formy dioctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA), wskaźnika wrażliwego w szczególności na obecność H₂O₂, HO[•] oraz ONOO[•] [Carranza E. S. i Pantano P., 2003; Macip S. i wsp., 2003; Han Y. H. i Park W. H., 2010]. Jednocześnie, wykorzystując inny wskaźnik - dihydrorodaminę 123 (DHR 123), można dokonać detekcji RFT nie tylko w cytoplazmie, ale również w mitochondriach komórek. DHR 123 ulega bowiem akumulacji we wspomnianych organellach komórkowych, wykazując przy tym szczególną wrażliwość na RFT takie jak: ONOO[•], HOCl oraz H₂O₂ [Henderson L. M. i Chappell J. B., 1993; Macip S. i wsp., 2003]. Podstawowa zasada detekcji reaktywnych form tlenu w oparciu o wykorzystanie wymienionych powyżej wskaźników polega na tym, iż nie fluoryzujące formy tychże związków, pod wpływem RFT, zostają utlenione do postaci fluoryzujących, co można mierzyć za pomocą cytometru przepływowego (dla obu barwników: $\lambda_{\text{ex.}}$ - 488 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ - 520 nm) [Bartosz G., 1998; Carranza E. S. i Pantano P., 2003]. A zatem, w celu zbadania zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych na skutek generowania reaktywnych form tlenu, komórki ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29 poddawałam inkubacji z badanym związkiem w stężeniach biologicznie istotnych (EC₉₀), przez określoną liczbę godzin, a następnie barwiłam dioctanem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny lub dihydrorodaminą 123 i analizowałam na cytometrze przepływowym. Pomiarów dokonałam przy użyciu cytometru FACScan firmy Becton Dickinson (dzięki uprzejmości Pracowni Immunologii Komórkowej i Molekularnej, Katedry Zakładu Fizjopatologii Akademii Medycznej w Gdańsku), natomiast uzyskane wyniki analizowałam wykorzystując oprogramowanie WinMDI (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

Przykład:



Rys. 9. Zmiany poziomu reaktywnych form tlenu w cytoplazmie komórek HT29 poddanych 24-godzinnej inkubacji ze związkiem C-1748. Zwiększenie poziomu RFT obserwujemy jako wzrost fluorescencji utlenionej formy 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCF) (przesunięcie piku w prawą stronę w odniesieniu do komórek kontrolnych) i związany z tym wzrost wartości markera M1, którego wartość dla komórek kontrolnych przyjmowałam za 50% (opracowane na podstawie [Kim W.-H. i wsp., 2004]).

Przedstawione na Rys. 10 wyniki wskazały, iż zarówno w komórkach HCT8, jak i HT29 poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}), doszło do zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu. Świadczył o tym przyrost fluorescencji pochodzącej od utlenionej formy 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCF) w komórkach traktowanych badanym związkiem. W cytoplazmie komórek HCT8, już po upływie 1 godziny inkubacji z C-1748 obserwowano wzrost poziomu RFT w porównaniu do komórek kontrolnych (do ok. 61%). W miarę wydłużania czasu ekspozycji na badany związek poziom ten nadal wzrastał, osiągając maksimum (ok. 90%) po upływie 4 godzin (dla porównania, w komórkach HCT8 traktowanych H_2O_2 w stężeniu 0.1 mM przez 30 minut, poziom RFT wynosił ok. 74%). W przypadku komórek HT29, wyraźny przyrost w ilości RFT również nastąpił po upływie 1 godziny inkubacji z badanym związkiem (do ok. 95%), a następnie utrzymywał się na tym samym, wysokim poziomie w miarę wydłużania czasu ekspozycji (ilość reaktywnych form tlenu w komórkach HT29 poddanych działaniu H_2O_2 , osiągała wartość ok. 83%). A zatem, uzyskane wyniki dowodzą, iż w przypadku obu linii komórek ludzkich raków jelita grubego, poziom RFT był maksymalnie około dwukrotnie wyższy w porównaniu do komórek kontrolnych.



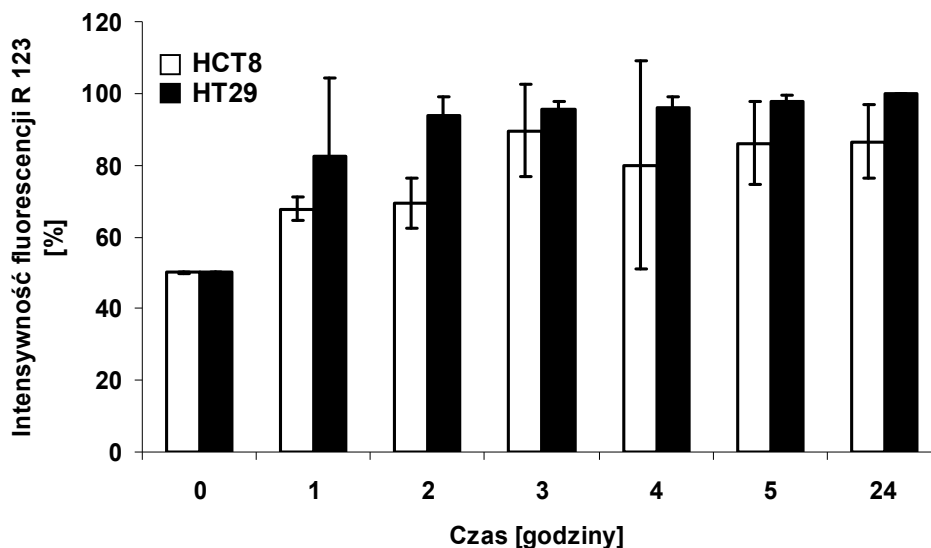
Rys. 10. Generowanie reaktywnych form tlenu w cytoplazmie komórek HCT8 oraz HT29 traktowanych związkiem C-1748 (EC_{90} : HCT8 - 0.04 μ M, HT29 - 0.21 μ M), wyrażone jako zmiany w intensywności fluorescencji utlenionej formy 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCF). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z dwóch niezależnie wykonanych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Jak pokazano na Rys. 11, w mitochondriach zarówno komórek HCT8, jak i HT29 traktowanych związkiem C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}), również dochodziło do zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu, co obserwowano w postaci przyrostu fluorescencji pochodzącej od utlenionej formy dihydrorodaminy 123 (R 123). W mitochondriach komórek HCT8, począwszy od 1 godziny inkubacji, poziom RFT wzrastał w porównaniu do komórek kontrolnych (do ok. 68%), osiągając maksimum po upływie 3 godzin (ok. 90%), a następnie utrzymywał mniej więcej tę samą wartość w miarę wydłużania czasu ekspozycji na C-1748.

W przypadku komórek HT29, wyraźny przyrost w ilości RFT również nastąpił po upływie 1 godziny inkubacji z badanym związkiem (do ok. 83%) (Rys. 11). Po 2 godzinach, poziom reaktywnych form tlenu w mitochondriach komórek HT29 przekroczył 93%, po czym nadal nieznacznie wzrastał w miarę wydłużania czasu ekspozycji na C-1748, osiągając ostatecznie wartość 100% po 24 godzinach. Wzrost w ilości reaktywnych form tlenu zarówno w mitochondriach komórek HT29, jak i HCT8, osiągał podobny poziom – dwukrotnie wyższy niż w komórkach kontrolnych. Co więcej, tempo indukcji RFT w mitochondriach komórek obu linii traktowanych C-1748 było bardzo podobne.

Podsumowując, uzyskane wyniki dowiodły, iż zarówno w cytoplazmie, jak i w mitochondriach komórek HCT8 oraz HT29 poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}), doszło do zwiększenia

poziomu reaktywnych form tlenu. A zatem, badany związek posiada zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach obu wymienionych powyżej linii ludzkich raków jelita grubego.



Rys. 11. Generowanie reaktywnych form tlenu w mitochondriach komórek HCT8 oraz HT29 traktowanych związkiem C-1748 (EC_{90} : HCT8 - 0.04 μ M, HT29 - 0.21 μ M), wyrażone jako zmiany w intensywności fluorescencji utlenionej formy dihydrorodaminy 123 (R 123). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z dwóch niezależnie wykonanych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

III.1.2. Oznaczenie poziomu zredukowanej formy glutationu (GSH) w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29, poddanych działaniu związku C-1748.

Glutation jest jednym z najważniejszych, wewnątrzkomórkowych antyoksydantów. W normalnych warunkach, ponad 99% tego przeciwutleniacza występuje w komórkach w formie zredukowanej (GSH) [Kearns R. P. i Hall G. A., 1998]. Podstawowa funkcja glutationu polega na zachowaniu grup tiolowych białek w postaci zredukowanej, co w wielu przypadkach jest niezbędne dla ich aktywności funkcjonalnej. W związku z powyższym, utrzymanie odpowiedniej homeostazy GSH/GSSG odgrywa fundamentalną rolę w aktywacji oraz inhibicji białek odpowiedzialnych za przeżycie lub śmierć komórki [Farber L. J., 1994; Dalton P. T. i wsp., 1999]. Co więcej, grupa tiolowa glutationu bierze udział w reakcjach z różnymi substancjami elektrofilowymi, co stanowi jeden z etapów detoksykacji ksenobiotyków.

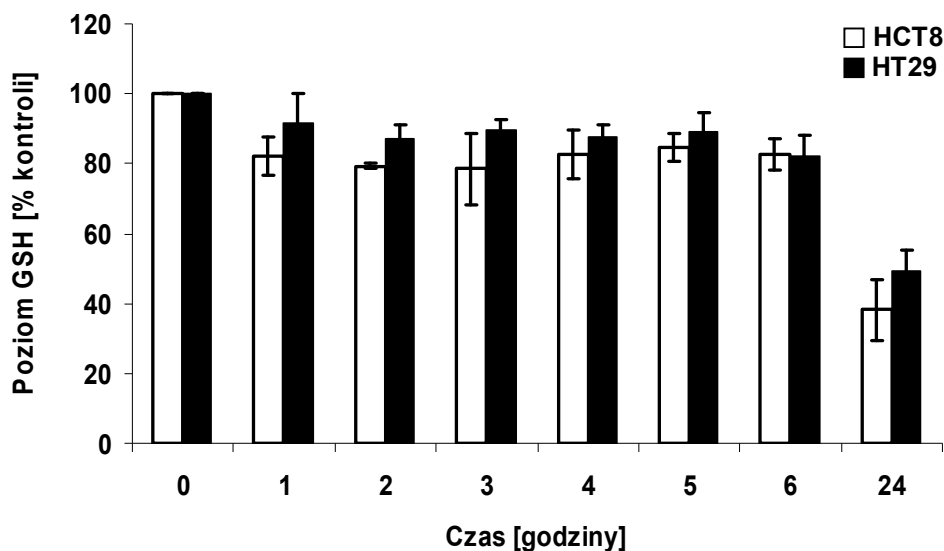
Jak już wspomniano w części teoretycznej niniejszej pracy doktorskiej, zastosowanie niektórych chemoterapeutyków lub związków prowadzi do wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu, a co za tym idzie do obniżenia poziomu glutationu w komórce i związanej z tym faktem indukcji apoptozy [Li J. i wsp., 2010]. Niekiedy jednak mamy do czynienia z sytuacją odwrotną, gdzie do zwiększonej produkcji RFT w komórce dochodzi na skutek spadku stężenia GSH, związanego z działaniem określonego czynnika egzogenego, między innymi chemoterapeutyku [Wen J. i wsp., 2002; Singh V. S. i wsp., 2005; Marinho-Filho J. D. B. i wsp., 2010]. Niezależnie jednak od mechanizmu, obniżenie stężenia głównego wewnątrzkomórkowego przeciwutleniacza, jeśli nie jest następstwem stresu oksydacyjnego, to stanowi jego przyczynę.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazały, iż pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, stosowana w stężeniach odpowiadających wartościom EC_{90} , indukuje stres oksydacyjny w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29, o czym świadczył podwyższony poziom reaktywnych form tlenu zarówno w cytoplazmie, jak i w mitochondriach tychże komórek, poddanych działaniu badanego związku.

Biorąc pod uwagę fakt, iż redukcja związków aromatycznych z grupą nitrową prowadzi do powstawania reaktywnych metabolitów, które reagując z glutationem mogą obniżać poziom tego antyoksydanta w komórkach [Kovacic P. i Osuna J. A., 2000], w kolejnym etapie swojej pracy postanowiłam sprawdzić, czy w komórkach HCT8 oraz HT29 eksponowanych na działanie C-1748, dochodzi do spadku stężenia zredukowanej formy glutationu, jak również to, czy ewentualny spadek poziomu GSH nastąpił przed wyraźnym wzrostem w ilości reaktywnych form tlenu, czy tuż po nim.

Podstawą szeroko stosowanej metody oznaczania stężenia zredukowanej formy glutationu jest reakcja grup $-SH$ i $-NH_2$ tegoż tripeptydu z aldehydem o-ftalowym, w wyniku czego powstaje fluoryzujący produkt [Scatudo C. R. Jr., 1988; Poli G. i wsp., 2004]. Pomiar fluorescencji utworzonego w ten sposób produktu, przy długości fali wzbudzenia 350 nm i długości fali emisji 420 nm, dostarcza informacji o stężeniu GSH w badanej próbce.

A zatem, w celu oznaczenia poziomu zredukowanej formy glutationu w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 oraz HT29, poddawałam je ekspozycji na działanie związku C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}), przez określoną liczbę godzin, po czym odpowiednio przygotowane próbki analizowałam na spektrofлуorymetrze PerkinElmer LS-5B. Stężenie GSH w komórkach kontrolnych przyjmowałam za 100% i w stosunku do nich wyznaczałam % obniżenia poziomu tego antyoksydanta w komórkach traktowanych badanym związkiem.



Rys. 12. Zmiany poziomu zredukowanej formy glutationu (GSH) w komórkach HCT8 i HT29 traktowanych związkiem C-1748 (EC_{90} : HCT8 - 0.04 μ M, HT29 - 0.21 μ M). Oś X - czas inkubacji komórek z badanym związkiem. Oś Y - poziom GSH. Zawartość zredukowanej formy glutationu w komórkach nie poddanych działaniu C-1748 uznano za 100% i w stosunku do tej wartości określono spadek poziomu GSH w komórkach inkubowanych z badanym związkiem. Wyniki przedstawiono w formie średniej z trzech niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Jak pokazano powyżej na Rys. 12, w komórkach HCT8 traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (EC_{90}), po upływie 1 godziny inkubacji, dochodziło do wyraźnego spadku stężenia zredukowanej formy glutationu (o ok. 18%). W ciągu kolejnych pięciu godzin ekspozycji wspomnianych komórek nowotworowych na badany związek, poziom GSH początkowo ulegał dalszemu obniżeniu, osiągając minimum po 3 godzinach (spadek o ok. 22% w porównaniu do komórek kontrolnych), a następnie utrzymywał mniej więcej stałą wartość. Ostatecznie, największy spadek stężenia GSH w komórkach HCT8, obserwowano po 24 godzinach inkubacji (o ok. 62%).

W przypadku komórek HT29, niewielki spadek w ilości GSH obserwowano już po upływie 1 godziny inkubacji z C-1748 (ok. 8%) (Rys. 12). Po 2 godzinach, poziom zredukowanej formy glutationu obniżył się w porównaniu do komórek kontrolnych o ok. 13%, a następnie utrzymywał mniej więcej stałą wartość pomiędzy 3 a 5 godziną ekspozycji na badany związek, po czym ponownie spadał po upływie 6 godzin (o ok. 18%). Ostatecznie, największy spadek stężenia GSH, podobnie jak w komórkach HCT8, obserwowano po 24 godzinach inkubacji z C-1748 (o ok. 51%).

Podsumowując, uzyskane wyniki dowiodły, iż zarówno w komórkach HCT8, jak i HT29 poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach

biologicznie istotnych (EC_{90}), doszło do spadku stężenia zredukowanej formy glutationu, choć spadek ten był nieco większy w przypadku komórek linii HCT8. Co więcej, do spadku stężenia GSH w komórkach obu linii traktowanych C-1748 doszło w tym samym czasie co do wzrostu w ilości reaktywnych form tlenu, przy czym uzyskane wyniki nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie co następuje wcześniej, spadek poziomu GSH, czy wzrost w ilości RFT.

III.1.3. Wpływ reaktywnych form tlenu, generowanych przez 4-metylo-1-nitroakrydynę C-1748, na aktywność biologiczną tego związku w stosunku do komórek HCT8 i HT29.

Cały szereg przesłanek przemawia za udziałem reaktywnych form tlenu zarówno w indukcji, jak i przebiegu procesu apoptozy. Powodowane przez nie uszkodzenia podstawowych biomolekuł komórkowych mogą stanowić bezpośrednią przyczynę śmierci komórki. Ponadto, RFT mogą także działać nie bezpośrednio, lecz uczestniczyć w szlakach sygnalizacyjnych, prowadzących do egzekucji apoptozy [Matés M. J. i Sánchez-Jiménez M. F., 2000; Simon H.-U. i wsp., 2000; Benhar M. i wsp., 2002].

Stwierdzenie zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 oraz HT29 na skutek poddania ich działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny o symbolu C-1748, wskazywało na celowość wyjaśnienia znaczenia tego zjawiska dla aktywności biologicznej badanego związku. Zamierzałam tego dokonać na drodze pośredniej, poprzez określenie wpływu antyoksydantów na aktywność cytotoksyczną C-1748 i jego zdolność do uruchomienia procesu apoptozy. Dlatego też, w kolejnym etapie swojej pracy podjęłam badania zmierzające do określenia zdolności przeciwutleniaczy, takich jak N-acetylo-L-cysteina (NAC) i melatonina, do obniżenia aktywności cytotoksycznej związku C-1748 wobec komórek HCT8 oraz HT29 oraz do zahamowania indukcji apoptozy w komórkach HCT8.

N-acetylo-L-cysteina jest szeroko stosowana w badaniach mających na celu wyjaśnienie związku pomiędzy stresem oksydacyjnym, a śmiercią komórki na drodze apoptozy. Substancja ta może bezpośrednio reagować z reaktywnymi formami tlenu lub obniżać ich poziom pośrednio, poprzez zwiększanie stężenia zredukowanej formy glutationu (NAC jest bowiem prekursorem GSH) [Mancini M. i wsp., 1997; Lin S. i wsp., 2003; Quadrilatero J. i Hoffman-Goetz L., 2004].

Aktywność antyoksydacyjna melatoniny, będącej hormonem szyszynki, wynika przede wszystkim z jej zdolności do neutralizowania zarówno reaktywnych form tlenu, jak

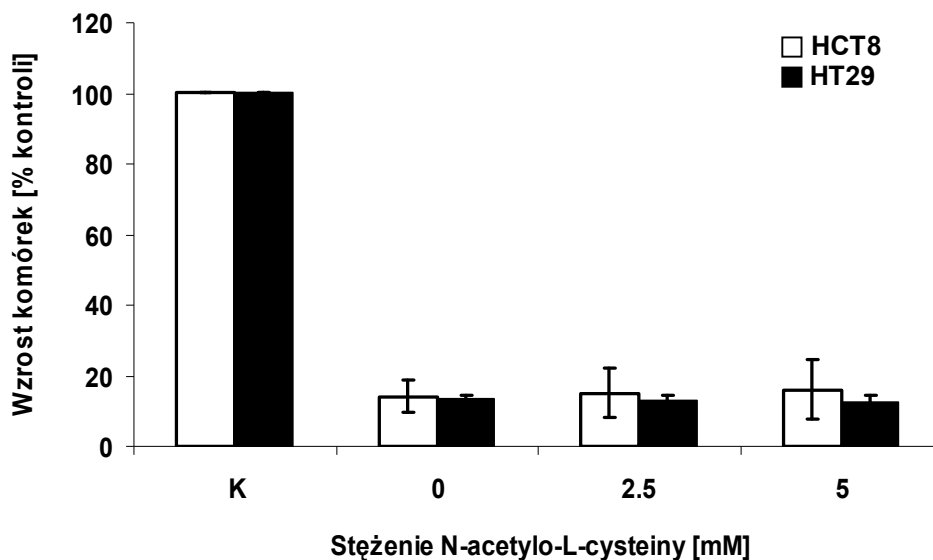
i azotu. Dowiedziono, iż związek ten zmiata rodniki nadtlenkowe skuteczniej niż witamina E, a rodniki hydroksylowe skuteczniej niż glutation [Reiter R. J., 1995; Bang J. H. i wsp., 2004].

W celu określenia wpływu reaktywnych form tlenu na aktywność cytotoksyczną pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 wobec komórek ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29, komórki te poddawałam 1-godzinnej preinkubacji z roztworami N-acetylo-L-cysteiny lub melatoniny o wzrastających stężeniach, a następnie 72-godzinnej inkubacji ze związkiem C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}). Po upływie 72 godzin, przeżywalność komórek określałam za pomocą testu MTT [Ghavami S. i wsp., 2004].

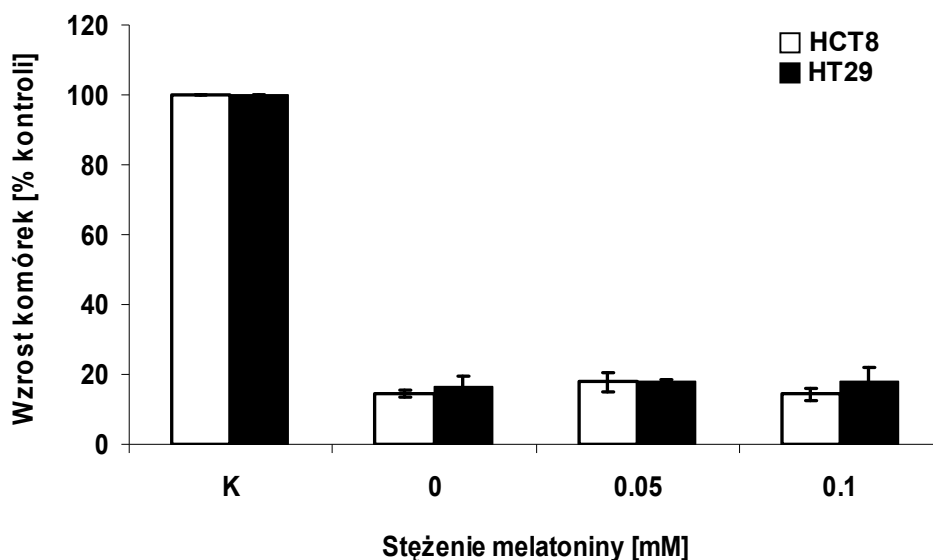
Jak pokazano poniżej na Rys. 13, zastosowanie antyoksydanta w postaci N-acetylo-L-cysteiny, w stężeniach nie wpływających na wzrost komórek kontrolnych (2.5 mM oraz 5 mM), nie spowodowało obniżenia aktywności cytotoksycznej pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 zarówno wobec komórek HCT8, jak i HT29.

Zastosowanie kolejnego antyoksydanta - melatoniny, będącej skutecznym zmiataczem reaktywnych form tlenu i azotu, przyniosło efekt podobny do opisanego powyżej. W tym przypadku również nie udało się wpłynąć w istotny sposób na obniżenie aktywności cytotoksycznej związku C-1748 wobec komórek obu wymienionych powyżej linii ludzkich raków jelita grubego (Rys. 14).

Podsumowując, uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, iż zdolność C-1748 do indukcji reaktywnych form tlenu w komórkach HCT8 i HT29 nie ma istotnego znaczenia dla aktywności cytotoksycznej badanego związku wobec tychże komórek.

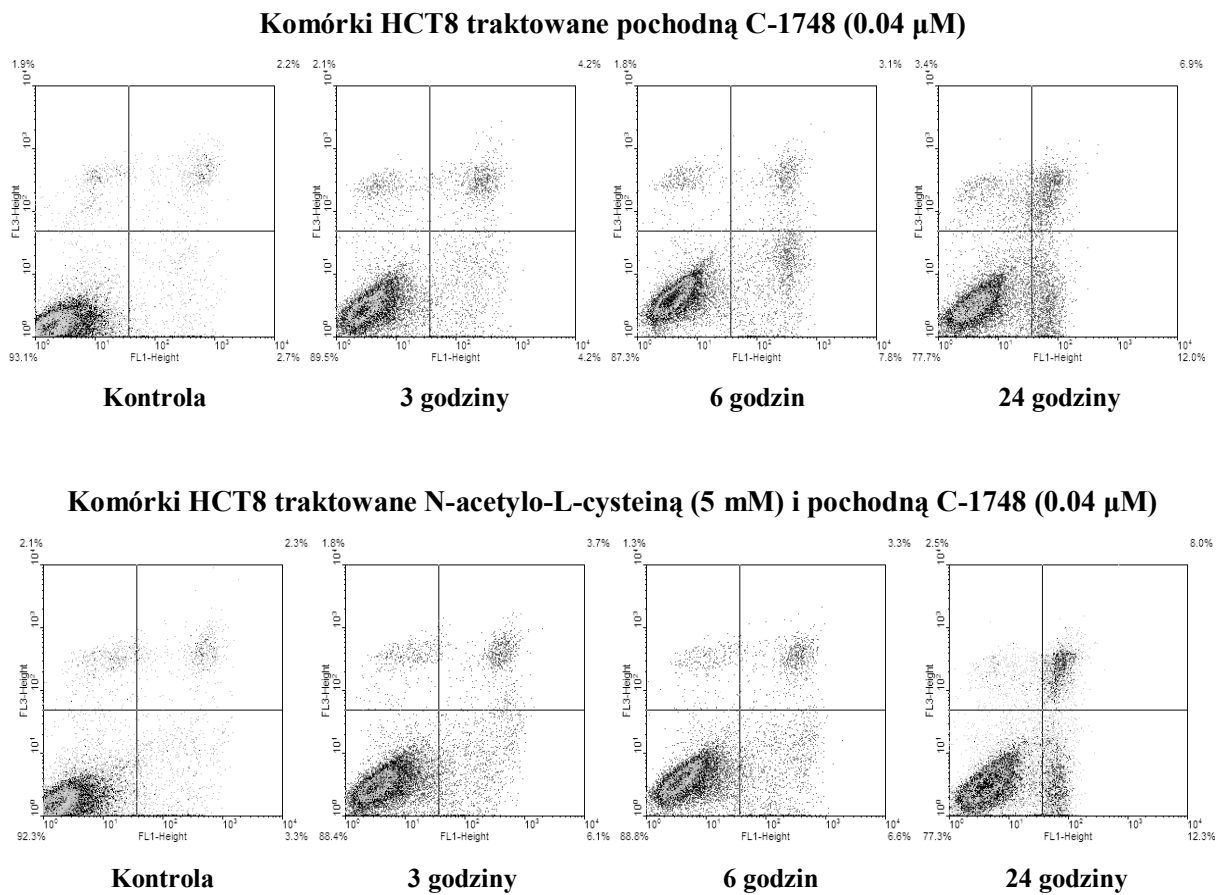


Rys. 13. Wpływ N-acetylo-L-cysteiny (NAC) na aktywność cytotoksyczną związku C-1748 wobec komórek HCT8 i HT29. Wzrost komórek kontrolnych przyjęto za 100% i w stosunku do nich wyznaczono % zahamowania wzrostu komórek traktowanych C-1748 przy stężeniach odpowiadających EC_{90} . Symbol *K* oznacza komórki traktowane wyłącznie N-acetylo-L-cysteiną o stężeniu 5 mM. Wyniki przedstawiono w formie średniej z trzech niezależnie wykonanych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.



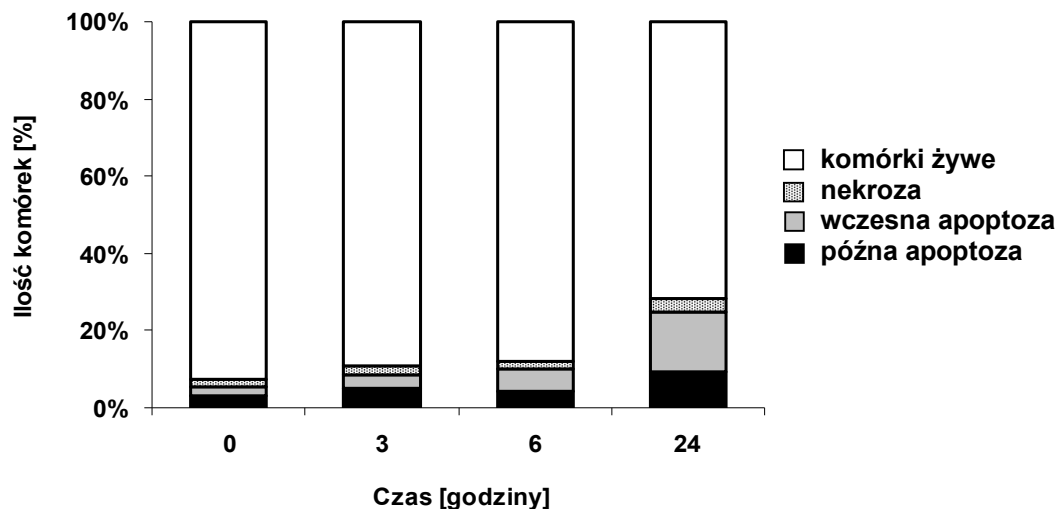
Rys. 14. Wpływ melatoniny na aktywność cytotoksyczną związku C-1748 wobec komórek HCT8 i HT29. Wzrost komórek kontrolnych przyjęto za 100% i w stosunku do nich wyznaczono % zahamowania wzrostu komórek traktowanych C-1748 przy stężeniach odpowiadających EC_{90} . Symbol *K* oznacza komórki traktowane wyłącznie melatoniną o stężeniu 0.1 mM. Wyniki przedstawiono w formie średniej z trzech niezależnie wykonanych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

W kolejnym etapie swojej pracy, postanowiłam również zbadać wpływ RFT, generowanych przez pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, na indukcję apoptozy w komórkach HCT8 (komórki te, pod wpływem badanej pochodnej, umierały na drodze apoptozy w znacznie większym stopniu niż komórki linii HT29). W tym celu komórki HCT8 poddawałam 1-godzinnej preinkubacji z N-acetylo-L-cysteiną (5 mM), a następnie inkubacji z badanym związkem w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}), przez odpowiednią ilość godzin. Po zakończeniu inkubacji, dokonałam badania zmian w budowie błony cytoplazmatycznej komórek, charakterystycznych dla apoptozy (ekspozycja fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie błony plazmatycznej) i nekrozy (uszkodzenie błony plazmatycznej), wykorzystując przy tym technikę cytometrii przepływowej [Lu H.-R. i wsp., 2005].

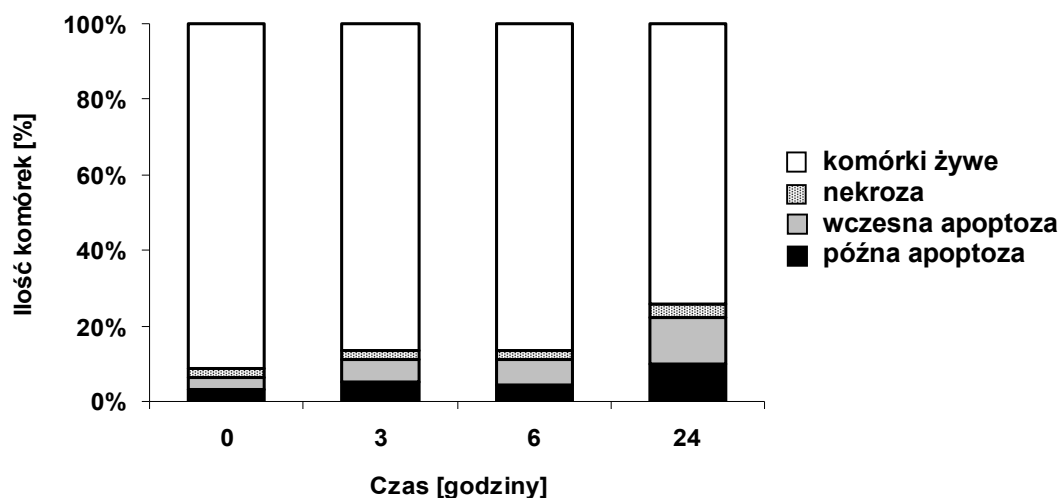


Rys. 15. Cytometryczna analiza zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT8, zarówno kontrolnych jak i traktowanych C-1748 (0.04 μ M), w obecności lub bez N-acetylo-L-cysteinę (5 mM). Oś X – fluorescencja emitowana przez fluoresceinę skoniugowaną z aneksyną V. Oś Y – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny. Lewy, dolny kwadrant: komórki żywe (aneksyna V-/PI-); prawy, dolny kwadrant: komórki wczesnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI-); prawy, górny kwadrant: komórki późnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI+); lewy, górny kwadrant: komórki nekrotyczne (aneksyna V-/PI+).

Komórki HCT8 traktowane pochodną C-1748 (0.04 μ M)



Komórki HCT8 traktowane N-acetylo-L-cysteiną (5 mM) i pochodną C-1748 (0.04 μ M)



Rys. 16. Procentowy udział komórek żywych, nekrotycznych, wczesno- i późnoapoptotycznych (określony w odniesieniu do całkowitej populacji komórek HCT8) w zależności od czasu inkubacji ze związkiem C-1748, w obecności lub bez N-acetylo-L-cysteiny (5 mM). Wykresy przedstawiają dane uzyskane z dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń.

Cytometryczna analiza zmian zachodzących w błonie plazmatycznej komórek HCT8 traktowanych C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (0.04 μ M), wskazała na pojawienie się, po 24 godzinach inkubacji, niewielkiej frakcji komórek (ok. 4%) wybarwionych jedynie jodkiem propidyny (aneksyna V-/PI+) (Rys. 15 i 16). Wynik ten dowodzi, iż komórki HCT8 nie ulegają śmierci na drodze bezpośredniej nekrozy (ang. *primary necrosis*) pod wpływem

badanego związku. Jednocześnie, uzyskane wyniki wskazały na obecność komórek wybarwionych aneksyną V, czyli ulegających apoptozie. Po 3 godzinach ekspozycji na C-1748, ilość komórek wczesnoapoptotycznych (aneksyna V+/PI-) osiągała poziom ok. 4%. Przy dłuższych czasach inkubacji, liczba komórek wybarwionych jedynie aneksyną V wzrastała, ostatecznie osiągając wartość maksymalną ok. 16% po 24 godzinach. Dodatkowo, analiza przedstawionych powyżej cytogramów wykazała, że populacja komórek HCT8, znajdujących się w późnej fazie apoptozy (aneksyna V+/PI+), nieznacznie wzrastała w miarę wydłużania czasu ekspozycji na C-1748, osiągając poziom ok. 9% po 24 godzinach. Jednocześnie, wyniki cytometrycznej analizy zmian zachodzących w błonie plazmatycznej komórek HCT8 traktowanych zarówno C-1748 (0.04 μ M), jak i N-acetylo-L-cysteiną (5 mM), prezentowały się niemalże identycznie w porównaniu do wyników opisanych powyżej, gdzie wspomniane komórki nowotworowe poddawano działaniu wyłącznie badanego związku. A zatem, uzyskane wyniki dowodzą, iż zastosowanie antyoksydanta w postaci N-acetylo-L-cysteininy nie wpłynęło w istotny sposób na zahamowanie indukcji apoptozy w komórkach ludzkiego raka jelita grubego HCT8 eksponowanych na działanie C-1748.

Podsumowując, opisane powyżej wyniki badań sugerują, iż generowane przez pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 reaktywne formy tlenu, nie wpływają w istotny sposób zarówno na aktywność cytotoksyczną badanego związku wobec komórek HCT8 i HT29, jak również na jego zdolność do uruchomienia procesu apoptozy oraz nekrozy w komórkach HCT8.

III.1.4. Podsumowanie badań dotyczących wpływu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29.

Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły mi na określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach wybranych nowotworów jelita grubego pochodzenia ludzkiego oraz na wyjaśnienie znaczenia tego zjawiska dla aktywności biologicznej badanego związku. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że zarówno w cytoplazmie, jak i w mitochondriach komórek HCT8 oraz HT29 poddanych działaniu C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}), doszło do zwiększenia ilości reaktywnych form tlenu, maksymalnie do poziomu dwukrotnie wyższego niż w komórkach kontrolnych. Co więcej, tempo indukcji RFT w komórkach obu linii traktowanych badanym związkiem było bardzo podobne. Równoległe ze wzrostem w ilości

reaktywnych form tlenu, w komórkach HCT8 i HT29 eksponowanych na działanie C-1748, doszło również do spadku stężenia zredukowanej formy glutationu – głównego wewnątrzkomórkowego antyoksydanta, przy czym analiza kinetyki obu tych zjawisk nie pozwoliła na jednoznaczne stwierdzenie co następuje wcześniej, spadek poziomu GSH, czy wzrost w ilości RFT. Niemniej jednak, uzyskane wyniki wskazują na zdolność pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach obu wymienionych powyżej linii ludzkich raków jelita grubego. Jednocześnie, badania zmierzające do wyjaśnienia znaczenia tego zjawiska dla aktywności biologicznej C-1748 dowiodły, iż generowane przez badany związek reaktywne formy tlenu, nie wpływają w istotny sposób zarówno na jego aktywność cytotoksyczną wobec komórek HCT8 i HT29, jak również na jego zdolność do uruchomienia procesu apoptozy oraz nekrozy w komórkach HCT8.

III.2. Charakterystyka odpowiedzi komórek ludzkich raków jelita grubego HCT116 $p53^{-/-}$ i HCT116 $p53^{+/+}$ traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

Jak już wspomniano, badania przeprowadzone uprzednio w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej wykazały, iż część komórek ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29, poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}), umierała na drodze apoptozy (HCT8: maksymalnie ok. 30%; HT29: maksymalnie ok. 10%). Co więcej, część komórek HCT8 ulegała procesowi starzenia, czego nie obserwowano w przypadku komórek HT29 [Augustin E. i wsp., 2010]. Wyraźne różnice w efektach działania C-1748 na komórki dwóch różnych linii tego samego rodzaju nowotworu - raków jelita grubego – mogą po części wynikać z odmiennego statutu genu $p53$ w tychże komórkach. Komórki linii HCT8 posiadają bowiem funkcjonalny gen $p53$, zaś komórki linii HT29 posiadają zmutowany gen $p53$ [Petak I. i wsp., 2000].

W celu określenia wpływu białka $p53$ na typ odpowiedzi komórkowej, indukowanej przez pochodną C-1748, przeprowadziłam badania na komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT116 posiadających „dziki” gen $p53$ (HCT116 $p53^{+/+}$) oraz równolegle na podlinii z knock-out’em tegoż genu (HCT116 $p53^{-/-}$). Podjęcie tego typu badań jest istotne ze względu na brak jednoznacznych odpowiedzi, dotyczących funkcji białka $p53$ w terapii przeciwnowotworowej. Wyniki szeregu badań wskazują między innymi na kluczową rolę

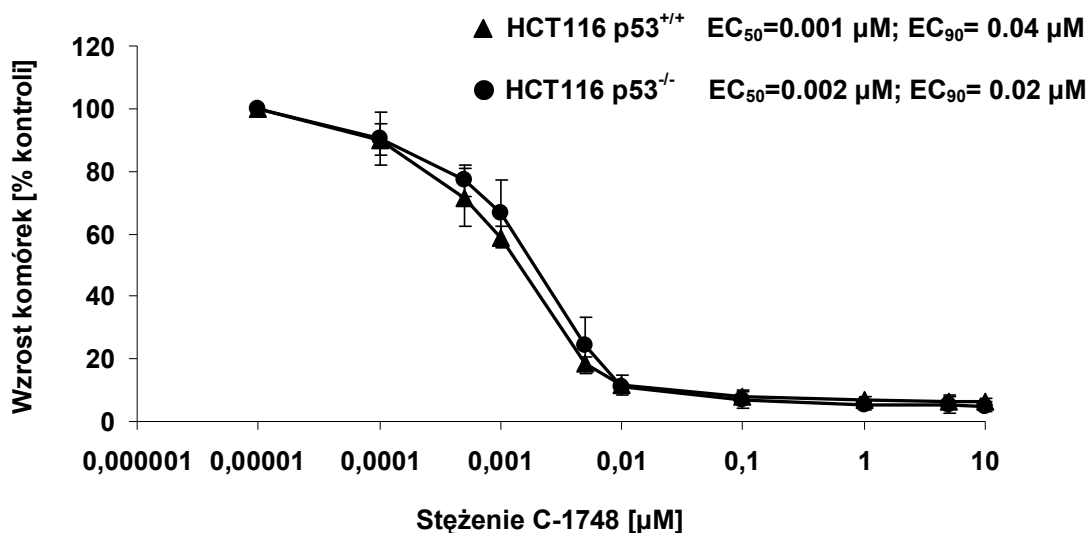
tego białka dla efektu cytotoksycznego związków uszkadzających DNA [Pan H. i wp., 1997; Kim E. i wsp., 2009]. Jednocześnie, opublikowano mnóstwo przykładów wskazujących na brak udziału białka p53 w przebiegu zarówno śmierci, jak również procesu starzenia komórek [Roninson I., 2002; Mansilla S. i wsp., 2006; Roos W. P. i Kaina B., 2006]. Dowiedziono także, że ponad 50% ludzkich nowotworów nie posiada funkcjonalnego białka p53 [Gupta M. i wsp., 1997; Mansilla S. i wsp., 2006]. Dodatkowym argumentem, przemawiającym za wyborem komórek HCT116 były wyniki badań przeprowadzonych w New York College of Medicine (Vallhala, USA), które wskazały na wysoką aktywność przeciwnowotworową pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stosunku do ksenoprzeszczepów na myszy bezgranicze raków okrężnicy pochodzenia ludzkiego.

III.2.1. Wpływ związku C-1748 na proliferację oraz progresję komórek HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+} w ich cyklu życiowym.

Badania przeprowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej dowiodły, że pochodne 4-metylo-1-nitroakrydyny to związki latentne, które po uprzedniej aktywacji metabolicznej wiążą się kowalencyjnie z DNA i tworzą międzylańcuchowe wiązania sieciujące DNA, co jest istotne dla ich aktywności przeciwnowotworowej [Szostek A. i wsp., 2002]. Co więcej, wyniki badań prowadzonych w naszym Zespole wykazały, iż zarówno związki międzylańcuchowo sieciujące DNA, jak również inhibitory topoizomerazy II, indukują zjawiska bloku G2 oraz następującej po nim śmierci komórkowej, w przedziale stężeń biologicznie istotnych, odpowiadających wartościom EC₅₀–EC₉₉ (są to stężenia związku hamujące proliferację komórek odpowiednio w 50 i 99%) [Augustin E. i wsp., 2006; Skwarska A. i wsp., 2007]. Dlatego też, w pierwszym etapie swojej pracy zbadalam wpływ pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na proliferację komórek ludzkich raków jelita grubego HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-}.

Aktywność biologiczną C-1748 wobec komórek obu linii HCT116 oznaczałam przy wykorzystaniu metody liczenia komórek (za pomocą licznika Coulter Counter), po 72-godzinnej inkubacji ciągłej z różnymi stężeniami badanego związku. Ilość komórek kontrolnych przyjmowałam za 100% i w stosunku do nich wyznaczałam % zahamowania wzrostu komórek traktowanych roztworami C-1748, a następnie sporządziłam wykresy zależności wzrostu komórek od stężenia związku, na podstawie których wyznaczyłam wartości EC₅₀ i EC₉₀.

W przeciwieństwie do zastosowanej przez mnie metody, inne testy stosowane do oznaczania zahamowania wzrostu komórek opierają się przede wszystkim na określeniu całkowitej zawartości białka lub DNA w komórce, jak również na pomiarze aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów, gdzie oznaczany parametr jest proporcjonalny do ilości komórek. W przypadku związków sieciujących DNA oraz hamujących proliferację komórek w fazie G2 ich cyklu życiowego (komórki takie zawierają podwójną ilość białka i DNA, a także wykazują zwiększoną aktywność oksydoredukcyjną mitochondriów), testy te mogą dawać zafałszowane wyniki. Stąd, zastosowana przez mnie metoda bezpośredniego liczenia komórek najlepiej nadaje się do oznaczenia aktywności biologicznej pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 wobec komórek wybranych linii nowotworowych.



Rys. 17. Wykres zależności zahamowania wzrostu komórek HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-} od stężenia pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748. Wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Przedstawione na Rys. 17 wyniki wskazują, że pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 hamowała proliferację komórek HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-} w sposób zależny od stężenia. Przebieg krzywych zahamowania wzrostu dla komórek obu linii HCT116 był zbliżony, a wartości stężeń hamujących proliferację komórek w 50 i 90%, wyznaczone na podstawie tychże krzywych, były porównywalne i wynosiły odpowiednio: EC₅₀=0.001 µM i EC₉₀=0.04 µM dla komórek HCT116 p53^{+/+} oraz EC₅₀=0.002 µM i EC₉₀=0.02 µM dla komórek HCT116 p53^{-/-}. Najbardziej korzystne, z terapeutycznego punktu widzenia, byłoby wyznaczenie takiej wartości stężenia badanego związku, przy której doszłoby do 100%

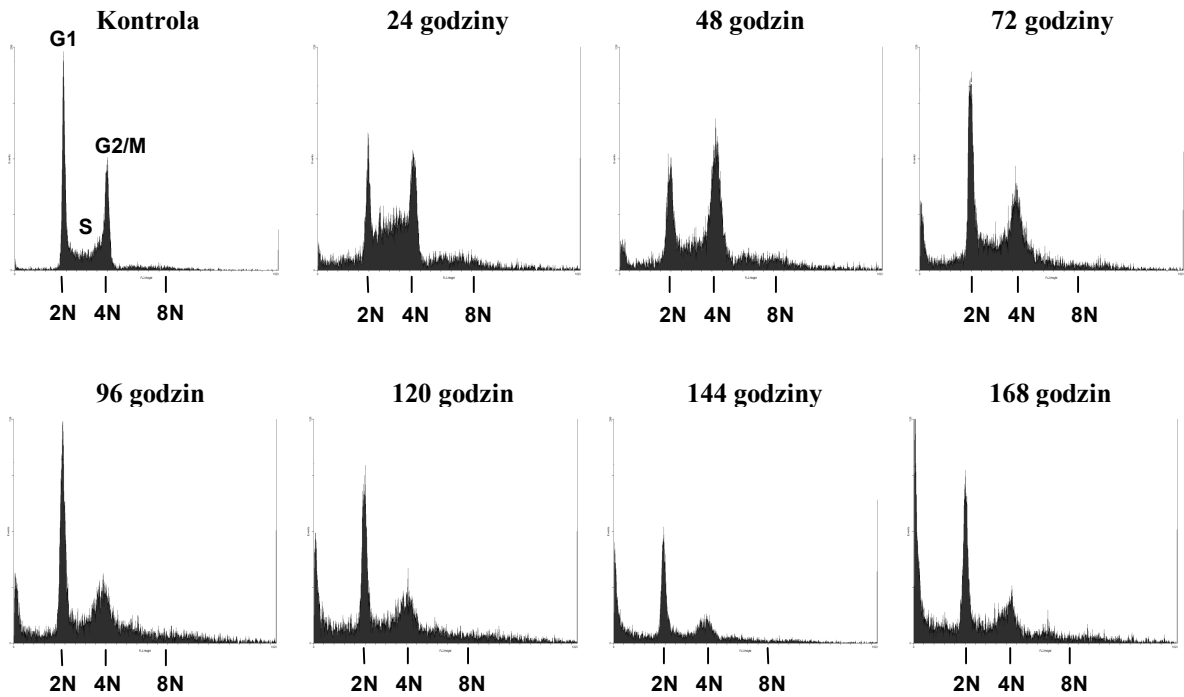
zahamowania proliferacji komórek nowotworowych. Ze względu na fakt, iż w warunkach eksperymentalnych jest to praktycznie niemożliwe, dalsze badania prowadziłam przy stężeniach związku C-1748, odpowiadających wartościom EC₉₀.

Brak wyraźnych różnic w wartościach stężeń EC₅₀ i EC₉₀ pomiędzy komórkami HCT116 p53^{+/+} oraz HCT116 p53^{-/-} sugeruje, iż białko p53 nie wpływa w istotny sposób na zdolność pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do hamowania proliferacji tychże komórek (Rys. 17). Nie oznacza to jednak, iż efekt cytotoksyczny nie będzie zróżnicowany w zależności od statusu p53. Należy bowiem podkreślić, że samo zahamowanie proliferacji komórek przez badany związek nie dostarcza nam informacji o jego efekcie cytotoksycznym.

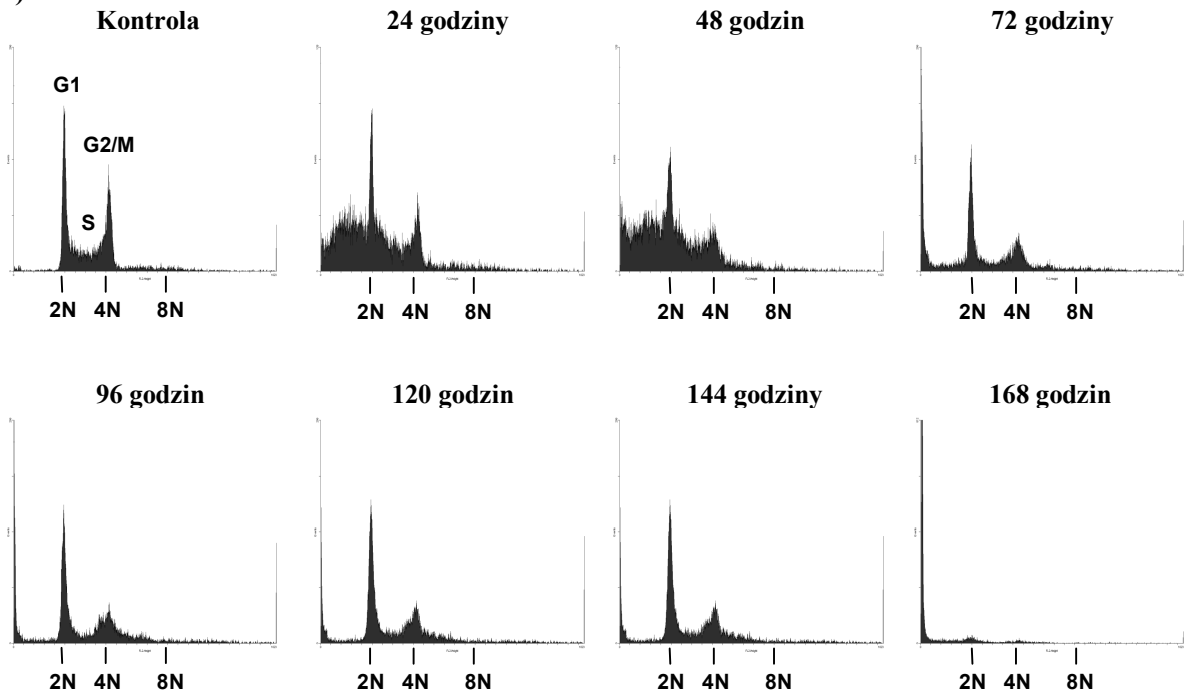
Jedną z podstawowych funkcji pełnionych przez białko p53 jest regulowanie progresji komórek w ich cyklu życiowym. W wyniku uszkodzenia DNA, w komórkach posiadających funkcjonalny gen *p53*, dochodzi do nadekspresji białka p53. Ufosforylowana postać tego białka aktywuje transkrypcję genu *p21*, którego produkt białkowy jest inhibitorem cyklino-zależnych kinaz, takich jak CDK2 oraz CDK1. Zahamowanie aktywności wspomnianych kinaz prowadzi ostatecznie do zatrzymania progresji komórek odpowiednio w fazie G1 lub G2 cyklu życiowego [Molinari M., 2000; Kawabe T., 2004]. Kolejną funkcją pełnioną przez białko p53 w komórce jest regulowanie procesu apoptozy. Białko to bowiem decyduje, czy komórka zatrzyma podziały do czasu naprawienia uszkodzeń DNA, czy też uruchomi proces śmierci komórkowej. Dlatego też, produkt białkowy genu *p53* jest powszechnie uważany za „strażnika genomu”, a wszelkie jego dysfunkcje stanowią jedną z przyczyn oporności komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną stosowanymi obecnie chemoterapeutykami [Hickman J., 1996; Roos W. P. i Kaina B., 2006].

W celu bliższego poznania roli białka p53 w efekcie cytotoksycznym pochodnej C-1748, przeprowadziłam badanie wpływu tego związku na przebieg cyklu życiowego komórek HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-}. Wpływ C-1748 na cykl życiowy wspomnianych komórek nowotworowych z badałam w oparciu o ocenę zawartości komórkowego DNA, wybarwionego jodkiem propidyny i przy wykorzystaniu techniki cytometrii przepływowej [Huan X. i wsp., 2005]. Uzyskane wyniki, prezentowane poniżej, przedstawiłam w formie zarówno histogramów (Rys. 18), jak również sporządzonych na ich podstawie wykresów, obrazujących procentowy udział komórek obu linii HCT116 w poszczególnych fazach cyklu życiowego, w zależności od długości czasu inkubacji z pochodną C-1748 (Rys. 19).

A)

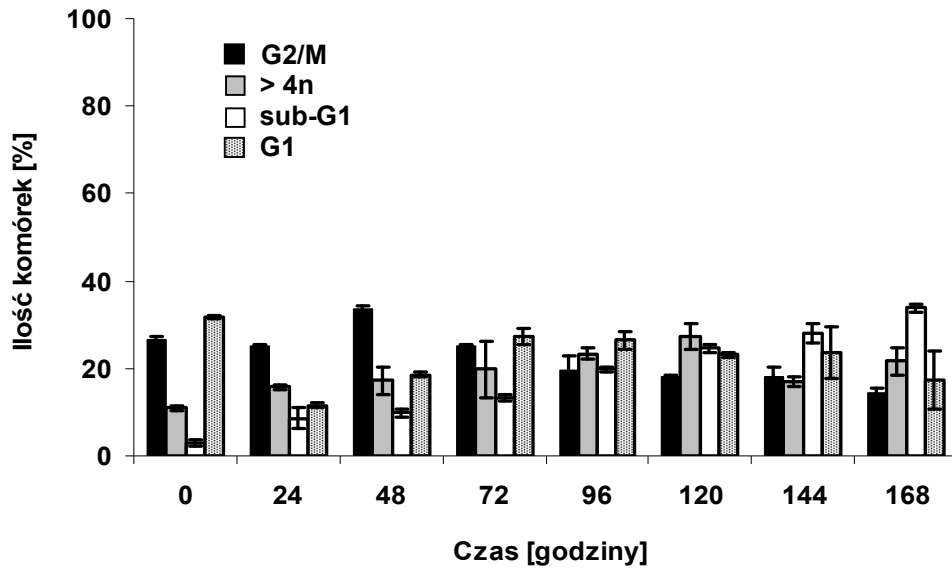


B)

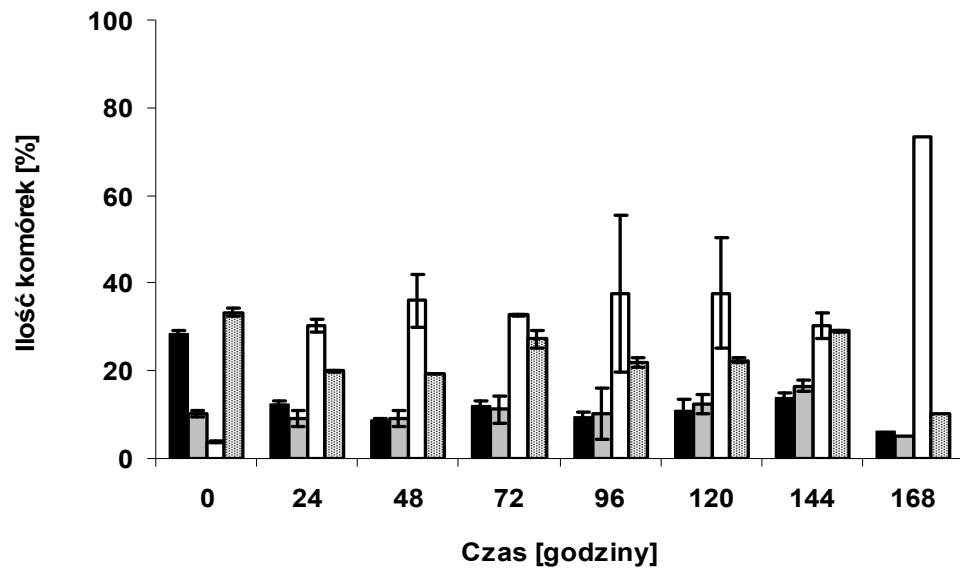


Rys. 18. Histogramy przedstawiające zmiany w przebiegu cyklu życiowego komórek ludzkich raków jelita grubego A) HCT116 p53^{-/-} i B) HCT116 p53^{+/+}, traktowanych związkiem C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC₉₀ (HCT116 p53^{+/+}: 0.04 μM; HCT116 p53^{-/-}: 0.02 μM), przez określoną liczbę godzin. Oś X – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny, określająca zawartość jądrowego DNA. Oś Y – ilość komórek. Histogramy prezentują wyniki jednego z trzech niezależnie przeprowadzonych doświadczeń. Zawartość DNA odpowiadająca ilości równej: 2N - cechuje komórki w fazie G1; 4N - cechuje komórki w fazie G2, mitozie lub post-mitotycznej, tetraploidalnej fazie G1; > 4N: komórki poliploidalne; < 2N (frakcja sub-G1): komórki apoptotyczne [Huang X. i wsp., 2005].

A)



B)



Rys. 19. Procent komórek A) HCT116 p53^{-/-} i B) HCT116 p53^{+/+}, kontrolnych oraz inkubowanych ze związkiem C-1748 (EC₉₀), w poszczególnych fazach cyklu życiowego. Wykres przedstawia średnie z trzech niezależnych eksperymentów wraz z odchyleniami standardowymi.

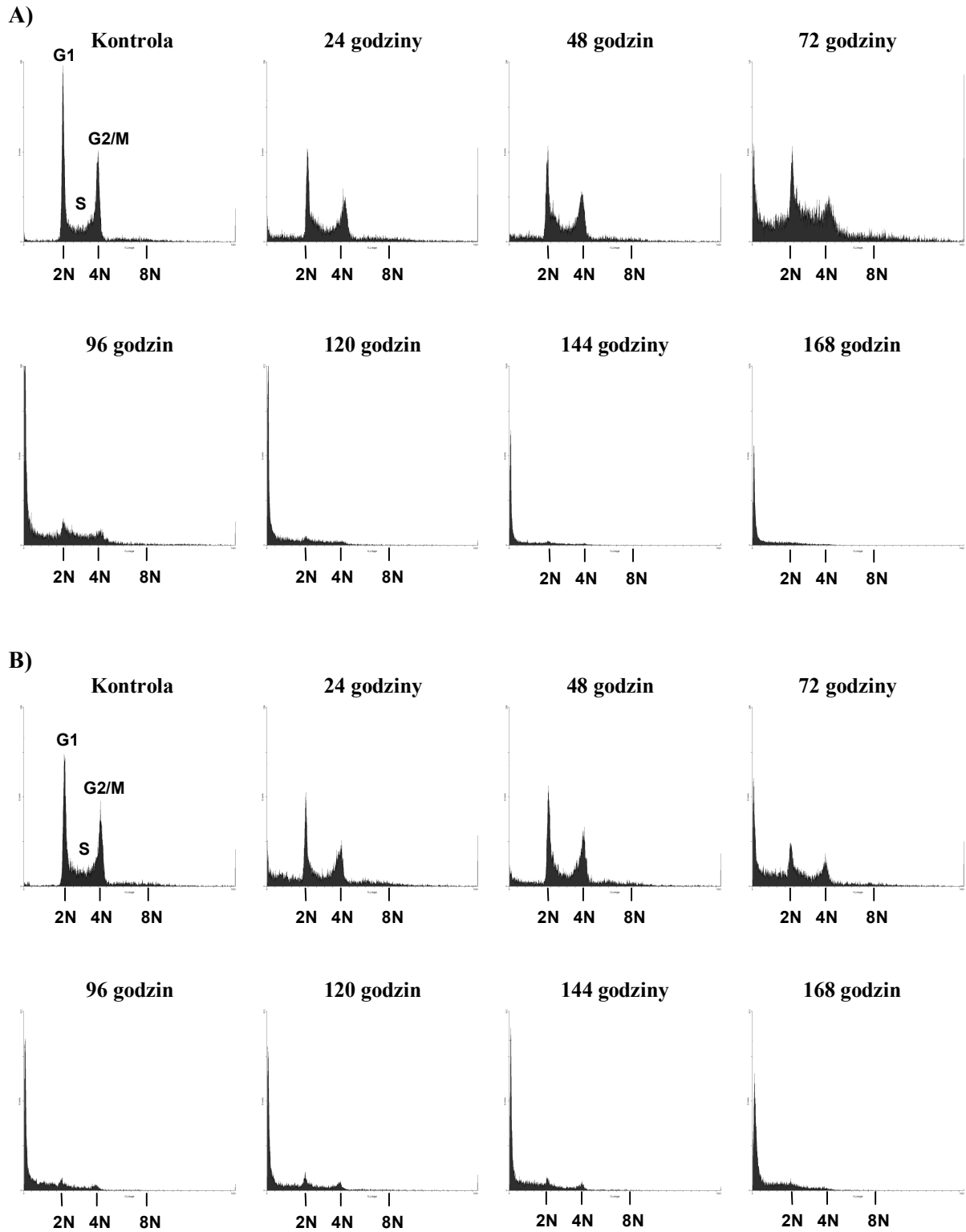
Jak wynika z analizy histogramów (Rys. 18A), komórki HCT116 p53^{-/-} ulegały niewielkiej akumulacji w fazie G2/M cyklu życiowego już po 48 godzinach inkubacji z C-1748 (ok. 34%). Wynik ten pozostaje w zgodzie z powszechnym poglądem, iż na skutek uszkodzenia DNA, komórki nie posiadające funkcjonalnego białka p53, choć niezdolne do uruchomienia punktu kontrolnego w fazie G1, mogą jednak zatrzymać progresję w fazie G2 cyklu życiowego [Eastman A. i Rigas J. R., 1999]. W przypadku komórek HCT116 p53^{-/-},

efekt ten nie utrzymał się jednak długo, gdyż po upływie 72 godzin ekspozycji na badany związek, frakcja komórek w fazie G2/M zaczęła się stopniowo zmniejszać (do ok. 25%). Jednocześnie, zanikowi frakcji G2/M towarzyszył wzrost w ilości komórek poliploidalnych (maksymalnie do ok. 27% po 120 godzinach inkubacji) oraz komórek z zawartością DNA < 2N (frakcja sub-G1) (ok. 34% po 168 godzinach inkubacji). Procent komórek w fazie S cyklu życiowego wzrastał po 24 godzinach ekspozycji na C-1748, a następnie spadał do upływu 120 godzin inkubacji (do ok. 8%) i ponownie nieznacznie wzrastał (do ok. 14% po 168 godzinach). Frakcja komórek w fazie G1 malała w ciągu pierwszych 24 godzin inkubacji ze związkiem (do ok. 11%), a następnie wzrastała (do ok. 27% po upływie 72 godzin ekspozycji) i utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie do 144 godzin. Wynik ten wskazuje na zatrzymanie progresji znacznej części komórek w fazie G1 cyklu życiowego, co jest dość zaskakujące z uwagi na pogląd, iż komórki nie posiadające funkcjonalnego białka p53 nie są do tego zdolne. W tym przypadku, zawyżenie frakcji G1 może być związane z uruchomieniem procesu śmierci komórkowej, o czym świadczy postępująca degradacja DNA (pojawienie się frakcji sub-G1). Wynika to z faktu, iż dla umierających komórek poliploidalnych przedział sub-G1 mieści się właśnie w obrębie fazy G1 (także S). W tym miejscu należy również podkreślić, że pojawienie się frakcji sub-G1 może świadczyć o indukcji apoptozy. Trzeba jednak pamiętać, iż populacja sub-G1 może również reprezentować komórki nekrotyczne i uszkodzone mechanicznie, komórki o mniejszej zawartości DNA lub o odmiennej strukturze chromatyny, które mają zmniejszoną dostępność DNA dla fluorochromów [Darżynkiewicz Z. i wsp., 1996]. Podsumowując, pod wpływem pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 progresja części komórek HCT116 p53^{-/-} została zatrzymana w fazie G1, a także doszło do wyraźnego wzrostu w ilości komórek frakcji sub-G1. Co więcej, komórki te ulegały przejściowej akumulacji w fazie G2/M.

W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, w ciągu pierwszych 48 godzin inkubacji ze związkiem C-1748, doszło do wyraźnego wzrostu w ilości komórek frakcji sub-G1 (ok. 36%), przy jednoczesnym spadku liczby komórek w fazach G1, S oraz G2/M (Rys. 18A i 19A). Począwszy od 72 godzin ekspozycji na badany związek, frakcja sub-G1 utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie (nie przekraczającym 38%), po czym intensywnie wzrastała po upływie 168 godzin (do ok. 73%). Wielkość frakcji sub-G1 była tu zdecydowanie większa niż w przypadku komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53. Liczba komórek poliploidalnych przez 120 godzin inkubacji utrzymywała się na stałym poziomie (ok. 10%), po czym wzrastała do ok. 17% po upływie 144 godzin i ponownie malała po 168 godzinach ekspozycji na badany związek (do ok. 5%). Procent

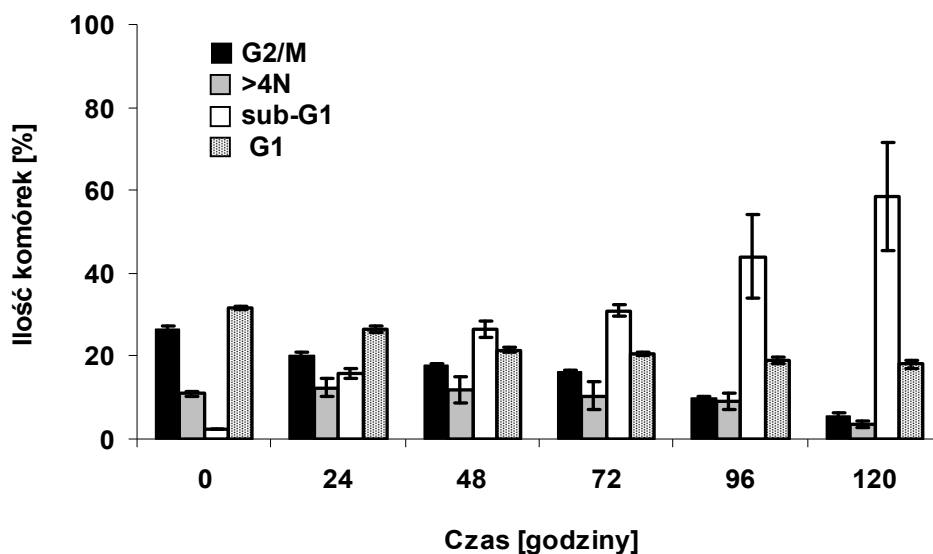
komórek HCT116 p53^{+/+} w fazie S cyklu życiowego sukcesywnie malał w miarę upływu czasu inkubacji z C-1748, natomiast liczba komórek w fazie G2/M, pomiędzy 24 a 144 godziną ekspozycji, utrzymywała się praktycznie na tym samym poziomie i stanowiła ok. 11% całkowitej populacji komórek. A zatem, w przeciwieństwie do linii HCT116 p53^{-/-}, nie obserwowano tu przejściowej akumulacji komórek w fazie G2/M cyklu życiowego. Po wspomnianym spadku w ciągu pierwszych 48 godzin inkubacji ze związkami, frakcja komórek w fazie G1 wzrastała (do ok. 27% po upływie 72 godzin) i z niewielkimi wahaniami, utrzymywała się praktycznie na stałym poziomie do 144 godzin. Po 168 godzinach ekspozycji doszło do znacznego spadku zarówno frakcji G1, jak również G2/M (odpowiednio do ok. 10% oraz ok. 6%). Zatrzymanie komórek w fazach G1 oraz G2/M cyklu życiowego do 144 godziny inkubacji z badanym związkiem może sugerować uruchomienie mechanizmów naprawy DNA, które w tym przypadku są nieskuteczne, na co może wskazywać znaczący wzrost frakcji sub-G1 po upływie 168 godzin ekspozycji na C-1748. Podsumowując, z wyjątkiem znacznego wzrostu frakcji sub-G1, pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 nie wpłynęła w istotny sposób na przebieg cyklu życiowego komórek HCT116 p53^{+/+}.

Niewielki wpływ związku C-1748 stosowanego w stężeniach odpowiadających wartościom EC₉₀ na dystrybucję komórek obu linii HCT116 w ich cyklu życiowym, z wyjątkiem nieznacznej i przejściowej akumulacji komórek HCT116 p53^{-/-} w fazie G2/M oraz wyraźnego wzrostu frakcji sub-G1 w przypadku komórek posiadających funkcjonalne białko p53, skłaniał do sprawdzenia czy i w jaki sposób zwiększenie stężenia badanej pochodnej (w tym przypadku do wartości pięciokrotnie wyższych od wartości EC₉₀- 5xEC₉₀), wpłynie na przebieg cyklu życiowego wspomnianych komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki, prezentowane poniżej, przedstawiłam jak uprzednio w formie histogramów (Rys. 20) oraz sporządzonych na ich podstawie wykresów, obrazujących procentowy udział komórek obu linii HCT116 w poszczególnych fazach cyklu życiowego, w zależności od długości czasu inkubacji ze związkiem C-1748 (Rys. 21).

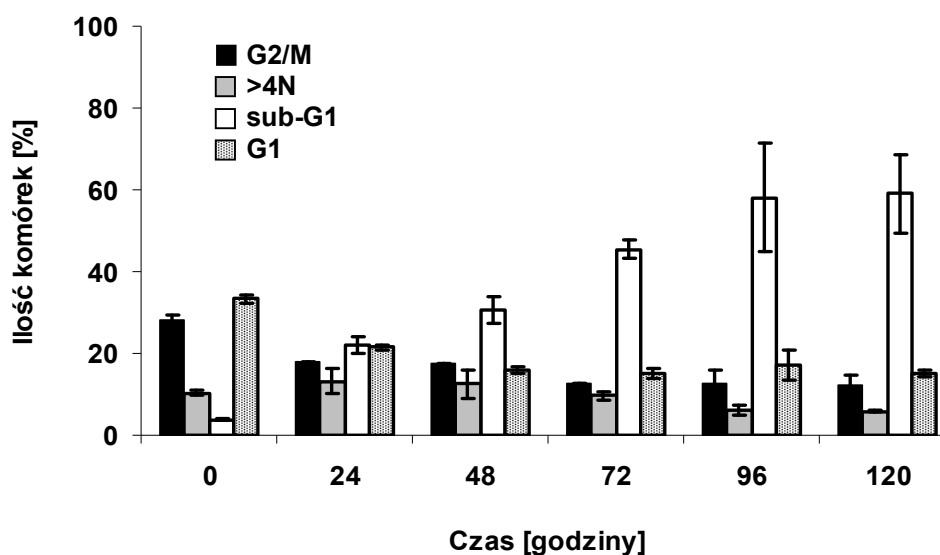


Rys. 20. Histogramy przedstawiające zmiany w przebiegu cyklu życiowego komórek ludzkich raków jelita grubego A) HCT116 p53^{-/-} i B) HCT116 p53^{+/+}, traktowanych związkiem C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom 5xEC₉₀ (HCT116 p53^{+/+}: 0.2 μM; HCT116 p53^{-/-}: 0.1 μM), przez określoną liczbę godzin. Oś X – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny, określająca zawartość jądrowego DNA. Oś Y – ilość komórek.

A)



B)



Rys. 21. Procent komórek A) HCT116 p53^{-/-} i B) HCT116 p53^{+/+}, kontrolnych oraz inkubowanych ze związkiem C-1748 przy stężeniach 5xEC₉₀, w poszczególnych fazach cyklu życiowego. Wykres przedstawia średnie z trzech niezależnych eksperymentów wraz z odchyleniami standardowymi.

Jak wynika z analizy histogramów (Rys. 20A), w przypadku komórek HCT116 p53^{-/-} poddanych inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającemu wartości 5xEC₉₀ (0.1 μM), wielkość frakcji sub-G1 znacząco wzrastała przez okres 120 godzin ekspozycji (ostatecznie osiągając ok. 59%), przy jednoczesnym spadku liczby komórek w fazach G1 i G2/M (odpowiednio do 18% oraz ok. 5%). Ilość komórek znajdujących się w fazie S cyklu życiowego przez okres 120 godzin inkubacji z C-1748 sukcesywnie malała (ostatecznie osiągając ok. 11%), natomiast liczba komórek

poliploidalnych nieznacznie wzrastała w ciągu pierwszych 24 godzin ekspozycji (do ok. 12%), po czym stopniowo zmniejszała się (ostatecznie osiągając ok. 3%). Uzyskane wyniki wskazują na brak wyraźnego wzrostu liczby komórek poliploidalnych oraz na zdecydowanie szybszą i bardziej intensywną fragmentację DNA, w porównaniu do stężenia związku C-1748 odpowiadającego wartości EC_{90} . W tym miejscu należy podkreślić, iż po 144 i 168 godzinach inkubacji ze związkiem, stopień degradacji DNA był tak duży, że niemożliwym było określenie odsetka komórek HCT116 p53^{-/-} w poszczególnych fazach cyklu życiowego. Ponadto, przy stężeniu $5xEC_{90}$, nie obserwowano zarówno przejściowej akumulacji tychże komórek w fazie G2/M cyklu życiowego, jak również ich zatrzymania w fazie G1, co miało miejsce przy stężeniu EC_{90} . Podsumowując, zwiększenie stężenia związku C-1748 do wartości $5xEC_{90}$ wpłynęło przede wszystkim na wzrost frakcji sub-G1 komórek HCT116 p53^{-/-} i szybsze tempo jej pojawiania się niż w przypadku stężenia odpowiadającego wartości EC_{90} . Co więcej, szybkiej i intensywnej fragmentacji DNA przy stężeniu $5xEC_{90}$ towarzyszył brak akumulacji komórek HCT116 p53^{-/-} w którejkolwiek z faz cyklu życiowego oraz brak pojawienia się frakcji komórek poliploidalnych.

Przedstawione na Rys. 20B i 21B wyniki wskazują, że frakcja sub-G1 komórek HCT116 p53^{+/+} inkubowanych z C-1748 w stężeniu równym wartości $5xEC_{90}$ (0.2 μ M), wyraźnie wzrastała już po upływie 24 godzin ekspozycji (ok. 22%). Tendencja wzrostowa frakcji sub-G1 utrzymywała się w miarę wydłużania czasu inkubacji, osiągając poziom 59% po 120 godzinach. Należy zauważyć, iż fragmentacja DNA postępowała szybciej w komórkach HCT116 p53^{+/+}, niż w przypadku komórek HCT116 p53^{-/-}. Ostatecznie jednak poziom frakcji sub-G1, po 120 godzinach ekspozycji na C-1748, osiągnął identyczną wartość dla obu linii (ok. 59%). Co więcej, podobnie jak w przypadku komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, po 144 i 168 godzinach inkubacji ze związkiem, stopień degradacji DNA był tak duży, że niemożliwym było określenie odsetka komórek HCT116 p53^{+/+} w poszczególnych fazach cyklu życiowego. Ilość komórek HCT116 p53^{+/+} znajdujących się w fazie G1 cyklu życiowego malała w ciągu pierwszych 48 godzin inkubacji z C-1748, a następnie utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie (ok. 15%). W przypadku populacji G2/M, wyraźny spadek obserwowano po 24 godzinach ekspozycji (do ok. 18%), po czym liczba komórek tejże frakcji, z niewielkimi wahaniami, utrzymywała się na tym samym poziomie (w przedziale ok. 12-17%). Wielkość populacji S komórek HCT116 p53^{+/+} nieznacznie malała przez okres 120 godzin inkubacji z badanym związkiem (ostatecznie osiągając wartość ok. 20%), zaś liczba komórek poliploidalnych wzrastała po 24 godzinach (do ok. 13%), a następnie malała osiągając wartość ok. 6% po 120 godzinach

inkubacji. Podsumowując, zwiększenie stężenia badanego związku do wartości pięciokrotnie większej niż EC_{90} , nie wpłynęło w istotny sposób na wzrost wielkości frakcji sub-G1 komórek HCT116 $p53^{+/+}$, aczkolwiek przy tym stężeniu, frakcja sub-G1 osiągała wartość 59% już po 120 godzinach inkubacji, czyli znacznie szybciej niż przy stężeniu EC_{90} . Ponadto, przy obu zastosowanych stężeniach pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, obserwowano zatrzymanie komórek w fazach G1 oraz G2/M cyklu życiowego (mniej wyraźne przy wyższej dawce badanego związku), po czym następowała intensywne degradacja DNA (po 168 godzinach dla stężenia EC_{90} oraz po 144 godzinach dla stężenia $5 \times EC_{90}$). A zatem, nie zaobserwowano istotnych różnic w przebiegu cyklu życiowego komórek HCT116 $p53^{+/+}$ traktowanych C-1748 przy stężeniach EC_{90} i $5 \times EC_{90}$, przy czym zastosowanie wyższej dawki badanego związku powodowało szybszą i bardziej intensywną degradację DNA.

Jak już wspomniałam, białko supresorowe transformacji nowotworowej p53 spełnia istotną rolę w regulacji progresji cyklu życiowego komórek [Molinari M., 2000]. Dlatego też, komórki ze zmutowanym genem *p53* lub pozbawione tego genu, nie posiadają właściwie funkcjonującego punktu kontrolnego G1/S, a co za tym idzie nie są zdolne do zatrzymania cyklu życiowego w fazie G1 w obliczu uszkodzeń DNA [Eastman A. i Rigas J. R., 1999; Roos W. P. i Kaina B., 2006]. Co więcej, komórki te często wykazują dysfunkcje w punkcie kontrolnym G2/M oraz zależnym od białka p53, post-mitotycznym punkcie kontrolnym w tetraploidalnej fazie G1 [Molinari M., 2000; Kastan M. i Bartek J., 2004]. Konsekwencją tego zjawiska jest wchodzenie do mitozy komórek z uszkodzonym DNA, co najczęściej prowadzi do poliploidyzacji oraz śmierci komórki [Erenpreisa J. i Cragg M. S., 2001; Nitta M. i wsp., 2004]. Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, można wytłumaczyć dlaczego akumulacja w fazie G2/M cyklu życiowego komórek HCT116 $p53^{-/-}$ traktowanych C-1748 w stężeniu EC_{90} , była zjawiskiem przejściowym. Dodatkowo, pojawienie się komórek poliploidalnych sugerowało, że przynajmniej część komórek HCT116 $p53^{-/-}$, po opuszczeniu fazy G2, mogła wejść do nieprawidłowo przebiegającej mitozy (stąd poliploidia). Ponadto, pojawienie się populacji sub-G1 komórek HCT116 $p53^{-/-}$ wskazywało, że ewentualna progresja tychże komórek z fazy G2 do mitozy mogła w rezultacie prowadzić do indukcji ich śmierci na drodze apoptozy. Potwierdzenie tych hipotez wymagało przeprowadzenia dodatkowych badań. Wynika to z faktu, iż w konwencjonalnej analizie cyklu komórkowego, w fazie G2/M, znajdują się komórki o zawartości DNA równej 4N, wśród których mogą występować zarówno komórki w fazie G2, mitozie oraz tetraploidalnej fazie G1. Stąd, w oparciu o przeprowadzone badania nie było możliwym jednoznaczne

stwierdzenie, w której z wymienionych faz komórki faktycznie się znajdują [Wang Q. i wsp., 1996].

III.2.2. Analiza progresji komórek HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+}, poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, z fazy G2 cyklu życiowego do mitozy.

Progresja z fazy G2 cyklu życiowego do mitozy kontrolowana jest przez zestawienie i aktywację kompleksu MPF (ang. *mitosis-promoting factor*), w skład którego wchodzi zarówno kinaza cyklinozależna 1 (Cdc2), jak również cyklina B1 (kinaza Cdc2 tworzy aktywne heterodimery z cykliną B1, będącą jej allosterycznym aktywatorem) [Erenpreisa J. i Cragg M. S., 2001]. Aktywność kompleksu MPF, podtrzymywana od momentu rozpoczęcia profazy do metafazy, gwarantuje inicjację mitozy poprzez aktywacyjną fosforylację enzymów regulujących kondensację chromatyny, rozpad błony jądrowej, a także reorganizację mikrotubul i szkieletu aktynowego komórki [Nigg E. A., 2001]. W wyniku inaktywacji kinazy Cdc2 na skutek jej fosforylacji na reszcie Thr-14 (przez kinazę Myt1) i Tyr-15 (przez kinazę Wee1), wejście komórek do mitozy staje się niemożliwe [Molinari M., 2000]. Do aktywacji kinazy Cdc2 dochodzi w wyniku defosforylacji wspomnianych reszt przez fosfatazę Cdc25C oraz na skutek fosforylacji tejże kinazy na reszcie Thr-161 przez kompleks CAK (ang. *cdk activating kinase*), będący heterodimerem złożonym z cykliny H i kinazy Cdk7 [Castedo M. i wsp., 2004a]. A zatem, zanik ufosforylowanej na Tyr-15 formy kinazy Cdc2 może wskazywać na przejście komórek z fazy G2 do mitozy. W związku z tym, ocena stopnia fosforylacji wspomnianej kinazy na Tyr-15, pozwoliłaby na odróżnienie komórek znajdujących się w fazie G2, mitozie oraz tetraploidalnej fazie G1, które przy opisie wyników badania wpływu pochodnej C-1748 na cykl życiowy komórek obu linii HCT116, określałam nieprecyzyjnym zwrotem faza G2/M.

Stopień fosforylacji kinazy Cdc2 na Tyr-15 oceniłam stosując technikę Western blotting i przeciwciała skierowane przeciwko formie tejże kinazy ufosforylowanej w pozycji Tyr-15.

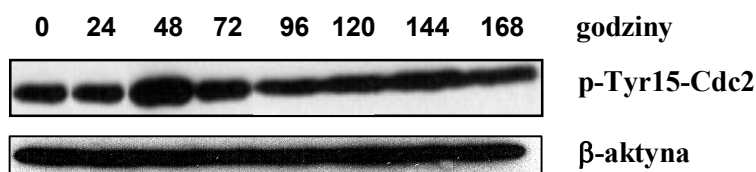
Jak pokazano na Rys. 22, poziom kinazy Cdc2 ufosforylowanej w pozycji Tyr-15, w porównaniu do komórek kontrolnych, w sposób istotny wzrastał po upływie 48 godzin inkubacji komórek HCT116 p53^{-/-} z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748. Jednoczesne pojawienie się ufosforylowanej kinazy Cdc2, łącznie z obserwowanym uprzednio wzrostem liczby komórek HCT116 p53^{-/-} w fazie G2/M cyklu życiowego (Rys. 18A i 19A) wskazywało, że wspomniane komórki po 48 godzinach inkubacji

z badanym związkiem ulegały akumulacji w fazie G2. Po 72 i 96 godzinach ekspozycji na C-1748, ubywało ufosforylowanej formy kinazy Cdc2, po czym w miarę wydłużania czasu inkubacji jej poziom nie ulegał większym zmianom. Spadek poziomu ufosforylowanej kinazy Cdc2 na reszcie Tyr-15 wskazuje na zachodzenie procesu defosforylacji Tyr-15, co jest niezbędne dla aktywności wspomnianej kinazy i może świadczyć o możliwości przechodzenia komórek HCT116 p53^{-/-}, zablokowanych w fazie G2 cyklu życiowego, do mitozy (do etapu profazy). Jest to prawdopodobne, oczywiście pod warunkiem, że całkowity poziom kinazy Cdc2 nie ulegał zmianom podczas inkubacji komórek HCT116 p53^{-/-} ze związkiem C-1748 oraz dochodziło do pełnej aktywacji kinazy Cdc2, gdzie obok jej defosforylacji na reszcie Tyr-15, wymagana jest również między innymi defosforylacja na Thr-14 oraz fosforylacja na reszcie Thr-161. Uwzględniając kilka faktów można założyć, iż powyższe warunki w tym przypadku zostały spełnione. Po pierwsze, należy pamiętać, że transkrypcja Cdc2 jest negatywnie regulowana przez białko p53, a zatem w komórkach HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, wszelkie zmiany w całkowitym poziomie kinazy Cdc2 najprawdopodobniej nie wynikają ze zmian w transkrypcji genu Cdc2. Po drugie, mało prawdopodobne jest, aby fosfataza treoninowo-tyrozynowa Cdc25C przeprowadzała proces defosforylacji jedynie Tyr-15 kinazy Cdc2, pozostawiając przy tym ufosforylowaną Thr-14. I wreszcie po trzecie, zahamowanie aktywności wspomnianego już kompleksu CAK, który fosforyluje kinazę Cdc2 na reszcie Thr-161, jest mało prawdopodobne w komórkach nie posiadających funkcjonalnego białka p53 (białko p53 hamuje aktywność kinazową kompleksu CAK, jak również wpływa na zahamowanie aktywności tego kompleksu poprzez aktywację białka p21 [Schneider E. i wsp., 1998]). Stwierdzona uprzednio obecność komórek poliploidalnych (Rys. 18A) sugerowała, iż komórki HCT116 p53^{-/-} były nie tylko zdolne do wejścia do mitozy, ale przy braku cytokinezy, mogły one również wejść w tetraploidalną fazę G1 i ponownie replikować DNA. Za zatrzymanie komórek w tetraploidalnej fazie G1 lub wznowienie syntezy DNA odpowiada post-mitotyczny punkt kontrolny (ang. *tetraploidy checkpoint*), zależny od obecności białka p53 [Margolis R. L. i wsp., 2003]. W przypadku komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, wydaje się to wspierać postawioną powyżej hipotezę, która tak czy inaczej wymaga potwierdzenia doświadczalnego.

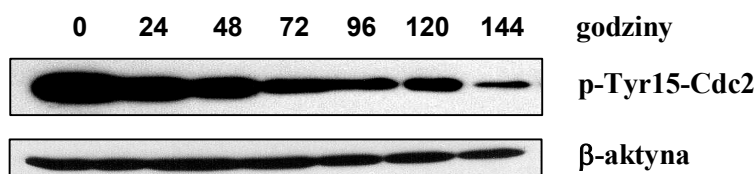
Jak pokazano na Rys. 22, w miarę wydłużania czasu inkubacji komórek HCT116 p53^{+/+} ze związkiem C-1748, poziom kinazy Cdc2 ufosforylowanej w pozycji Tyr-15 spadał w porównaniu do komórek kontrolnych. Na podstawie uzyskanych wyników, łącznie z obserwowanym uprzednio brakiem wzrostu liczby komórek HCT116 p53^{+/+} w fazie

G2/M cyklu życiowego (Rys. 18B) można sądzić, iż komórki te nie ulegały akumulacji w fazie G2 pod wpływem badanego związku. Stwierdzenie zaś możliwości wchodzenia komórek HCT116 posiadających funkcjonalne białko p53 do mitozy, jedynie na podstawie zaniku ufosforylowanej formy kinazy Cdc2, następuje pewne trudności. Wynika to, jak już wspomniano, między innymi z faktu negatywnej regulacji transkrypcji genu Cdc2 przez białko p53 oraz możliwości hamowania fosforylacji kinazy Cdc2 na reszcie Thr-161 przez białko p21 (aktywowane przez białko p53), co czyni ją nieaktywną. W tej sytuacji, należałoby przeprowadzić dodatkowe badania, potwierdzające lub negujące wejście do mitozy komórek HCT116 p53^{+/+} traktowanych C-1748.

HCT116 p53^{-/-}



HCT116 p53^{+/+}

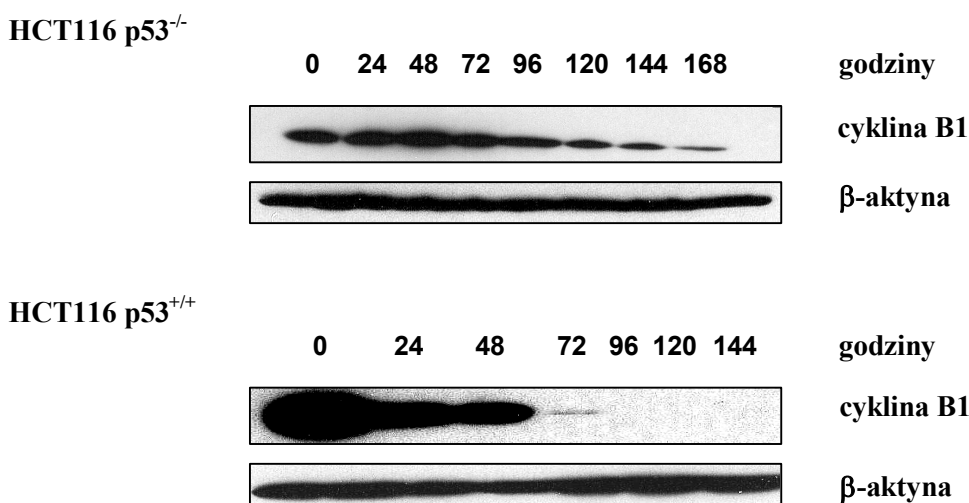


Rys. 22. Poziom kinazy Cdc2, ufosforylowanej na Tyr-15, w komórkach HCT116 p53^{-/-} i p53^{+/+}, kontrolnych oraz traktowanych związkiem C-1748 (EC₉₀) przez podaną liczbę godzin. Wynik przedstawia jedną z dwóch niezależnych analiz Western blotting. β-aktynę zastosowano w celu sprawdzenia równomiernego napełnienia studzienek.

Aktywacja kinazy Cdc2, niezbędna dla uruchomienia procesu mitozy, wymaga nie tylko defosforylacji lub fosforylacji odpowiednich reszt aminokwasowych, ale także związania z cykliną B1, będącą jej allosterycznym aktywatorem. Dlatego też, w kolejnym etapie prowadzonych przeze mnie badań postanowiłam określić poziom cykliny B1 w komórkach obu linii HCT116 poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC₉₀. W tym celu wykorzystałam technikę Western blotting oraz przeciwciała skierowane przeciwko cyklinie B1.

Jak pokazano poniżej na Rys. 23, do wyraźnego wzrostu poziomu cykliny B1, w porównaniu do komórek kontrolnych, doszło po upływie 48 godzin inkubacji komórek HCT116 p53^{-/-} ze związkiem C-1748. Po 72 godzinach, poziom cykliny B1 obniżył się i nadal sukcesywnie spadał w miarę wydłużania czasu inkubacji. Jak wynika z doniesień literaturowych, do zaniku cykliny B1 w komórce dochodzi na skutek degradacji tego białka pod koniec metafazy [Peters J. M., 2002]. A zatem, obserwowany spadek poziomu cykliny B1, łącznie z zanikiem ufosforylowanej na reszcie Tyr-15 kinazy Cdc2 wskazuje, że przynajmniej część komórek HCT116 p53^{-/-} inkubowanych z C-1748, nie tylko weszła do mitozy, ale także dotarła do metafazy.

W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, poziom cykliny B1, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, obniżył się już po 24 godzinach ekspozycji na C-1748 (Rys. 23). W miarę wydłużania czasu inkubacji, poziom cykliny B1 sukcesywnie spadał i był praktycznie niewykrywalny pomiędzy 96, i 144 godzinami. Jak już wspomniano, zestawienie i aktywacja kompleksu MPF (ang. *mitosis-promoting factor*), w skład którego wchodzi zarówno kinaza Cdc2, jak również cyklina B1, jest niezbędne dla progresji komórek z fazy G2 cyklu życiowego do mitozy. A zatem, szybki zanik cykliny B1 w komórkach HCT116 p53^{+/+} inkubowanych ze związkiem C-1748, może wskazywać na brak możliwości utworzenia kompleksu z kinazą Cdc2, a co za tym idzie na brak możliwości wejścia tychże komórek do mitozy. W tym miejscu należy również podkreślić, iż funkcjonalne białko p53 negatywnie reguluje transkrypcję genu kodującego cyklinę B1 [Castedo M. i wsp., 2004a].



Rys. 23. Poziom cykliny B1 w komórkach HCT116 p53^{-/-} i p53^{+/+}, kontrolnych oraz traktowanych związkiem C-1748 (EC₉₀) przez podaną liczbę godzin. Wynik przedstawia jedną z dwóch niezależnych analiz Western blotting. β-aktynę zastosowano w celu sprawdzenia równomiernego napełnienia studzienek.

Podsumowując, wyniki cytometrycznej analizy progresji komórek HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-}, inkubowanych z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, w ich cyklu życiowym oraz równoległa ocena poziomu kinazy Cdc2 ufosforylowanej na reszcie Tyr-15 i poziomu cykliny B1, pozwoliły mi na sformułowanie następujących wniosków: 1) obecność funkcjonalnego białka p53 nie była konieczna do przejściowej akumulacji komórek HCT116, traktowanych badanym związkiem, w fazie G2 cyklu życiowego; 2) można sugerować, iż status białka p53 wpłynął na zdolność komórek do przejścia z fazy G2 do mitozy (do mitozy wchodziły komórki HCT116 nie posiadające białka p53); 3) wyższy poziom frakcji sub-G1 komórek HCT116 p53^{+/+}, w porównaniu do komórek nie posiadających funkcjonalnego białka p53 sugerował, że białko to może mieć istotne znaczenie dla efektu cytotoksycznego pochodnej C-1748 (obecność białka p53 zwiększała wrażliwość komórek na działanie badanego związku).

III.2.3. Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji katastrofy mitotycznej w komórkach HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+}.

Związki uszkadzające DNA w szczególny sposób czynią komórki nowotworowe podatnymi na śmierć mitotyczną [Nitta M. i wsp., 2004]. Wynika to głównie z osłabienia punktu kontrolnego G2/M cyklu życiowego tychże komórek, co pozwala im na wejście do mitozy mimo uszkodzeń DNA, konsekwencją czego może być indukcja katastrofy mitotycznej [Mansilla S. i wsp., 2006; Portugal J. i wsp., 2010]. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazały, iż przynajmniej część komórek HCT116 p53^{-/-} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, jest zdolna do przekroczenia bariery G2/M. Dlatego też, uzasadnione było podjęcie badań mających na celu określenie zdolności badanego związku do uruchomienia katastrofy mitotycznej we wspomnianych komórkach ludzkiego nowotworu okrężnicy. Podobne badania przeprowadziłam także, w celach porównawczych, na komórkach HCT116 posiadających funkcjonalne białko p53.

Podanie spójnej definicji katastrofy mitotycznej, na podstawie dostępnych danych literaturowych, jest dość skomplikowane. Proces ten, jest niekiedy traktowany jako rodzaj śmierci, odrębnej od apoptozy i nekrozy, zachodzącej w mitozie lub tuż po jej zakończeniu [Roninson I. B. i wsp., 2001]. Jednocześnie, rozróżnia się dwa podtypy tego rodzaju śmierci. Jeden z nich prowadzi do śmierci komórek w okolicach metafazy, w sposób niezależny od białka p53 [Castedo M. i wsp., 2004a; Nitta M. i wsp., 2004]. Drugi zaś, występuje po zakończeniu nieprawidłowo przebiegającej mitozy, podczas aktywacji post-mitotycznego

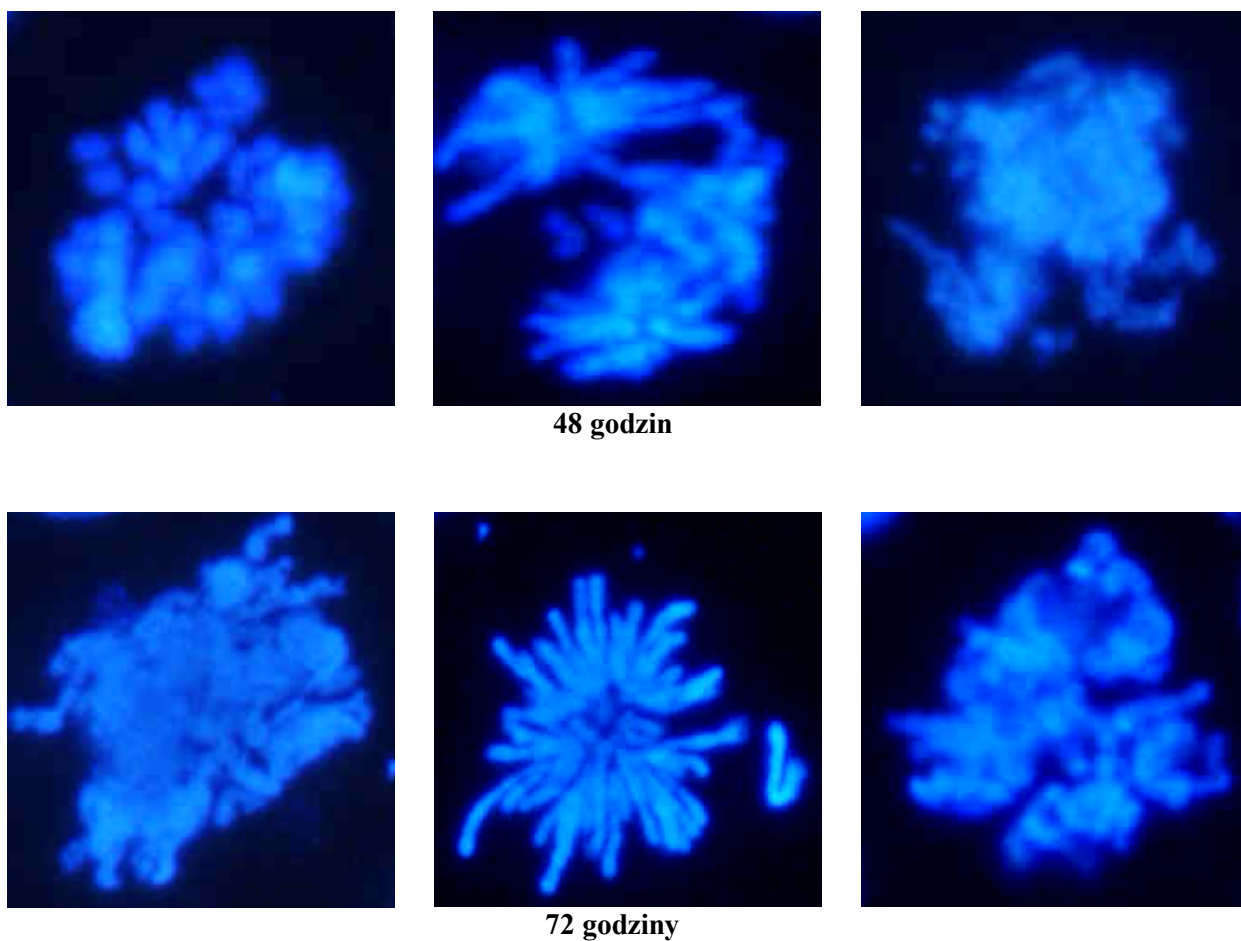
punktu kontrolnego, w sposób częściowo zależny od białka p53 [Castedo M. i wsp., 2004a]. Część badaczy postuluje jednak, iż katastrofa mitotyczna nie jest odrębnym typem śmierci. Traktują ten proces jako zaburzoną mitozę, która prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy [Chu K. i wsp., 2004]. Wyniki badań faktycznie wskazują, iż katastrofa mitotyczna wykazuje szereg biochemicznych podobieństw do procesu apoptozy (np. eksternalizacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony plazmatycznej [Eom Y.-W. i wsp., 2005]; spadek błonowego potencjału mitochondrialnego oraz uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy [Castedo M. i wsp., 2004a]; aktywacja kaspaz [Castedo M. i wsp., 2004b]). Co więcej, badania przeprowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej dowiodły, że komórki ludzkiej białaczki MOLT4 traktowane imidazoakrydonem C-1311, ulegają katastrofie mitotycznej, po której następuje apoptoza [Skwarska A. i wsp., 2007]. Istnieją jednak dowody wskazujące na odrębny charakter obydwu procesów. Dowiedziono bowiem, że komórki ludzkiego raka piersi ulegały katastrofie mitotycznej pod wpływem zarówno doksorubicyny, jak i związku o symbolu WP631, ale tylko w przypadku doksorubicyny dochodziło do aktywacji kaspazy 2 i 3. Dodatkowo, komórki MCF-7/VP, które nie posiadają funkcjonalnej kaspazy 3, również wykazały zdolność do umierania na drodze katastrofy mitotycznej [Mansilla S. i wsp., 2006]. Komórki Huh-7, poddane działaniu doksorubicyny o dużym stężeniu, umierały na drodze apoptozy, podczas gdy zastosowanie niskich dawek tego chemoterapeutyku prowadziło do indukcji katastrofy mitotycznej [Eom Y.-W. i wsp., 2005]. Kolejnym dowodem na to, że procesy apoptozy i katastrofy mitotycznej mogą przebiegać niezależnie od siebie, są wyniki badań prowadzonych na komórkach nowotworowych z nadekspresją onkoproteiny Bcl-2. Wysoki poziom tego białka czynił bowiem komórki traktowane etopozydem opornymi na apoptozę, ale nie chronił ich przed indukcją katastrofy mitotycznej [Mansilla S. i wsp., 2006].

Identyfikacja katastrofy mitotycznej w dużym stopniu opiera się na obserwacjach zmian w morfologii komórek. Z doniesień literaturowych wynika bowiem, iż proces ten charakteryzuje się obecnością dużych, często poliploidalnych komórek, zawierających dwa jądra lub kilka (kilkanaście) mikrojąder o różnej wielkości (ang. *multinucleated cells*), powstających na skutek wyjścia komórek z mitozy do interfazy bez prawidłowego rozdziału chromosomów oraz cytokinezy [Roninson I. B. i wsp., 2001; Castedo M. i wsp., 2004a; Mansilla S. i wsp., 2006; Portugal J. i wsp., 2010]. Ponadto, chromatyna komórek ulegających katastrofie mitotycznej jest zdekondensowana [Roninson I. B. i wsp., 2001], podczas gdy komórki apoptotyczne zawierają skondensowaną i silnie pofragmentowaną

chromatynę (tworzą również tzw. ciała apoptotyczne) [Farber E. i wsp., 1994; Sikora E. i wsp., 1994].

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, wykrywanie procesu katastrofy mitotycznej przeprowadziłam w oparciu o kryterium morfologiczne. Oceny stopnia kondensacji chromatyny oraz fragmentacji jąder komórek obu linii HCT116, traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, dokonałam przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego i interkalującego do DNA fluorochromu DAPI. W przypadku linii HCT116 p53^{-/-}, określałam także procentowy udział komórek prezentujących cechy morfologiczne, typowe dla apoptozy lub katastrofy mitotycznej, każdorazowo licząc około 500 komórek w próbce.

Analiza mikroskopowa komórek HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-} traktowanych związkiem C-1748, wskazała na wyraźne różnice w morfologii jąder komórek obu linii ludzkich raków jelita grubego.

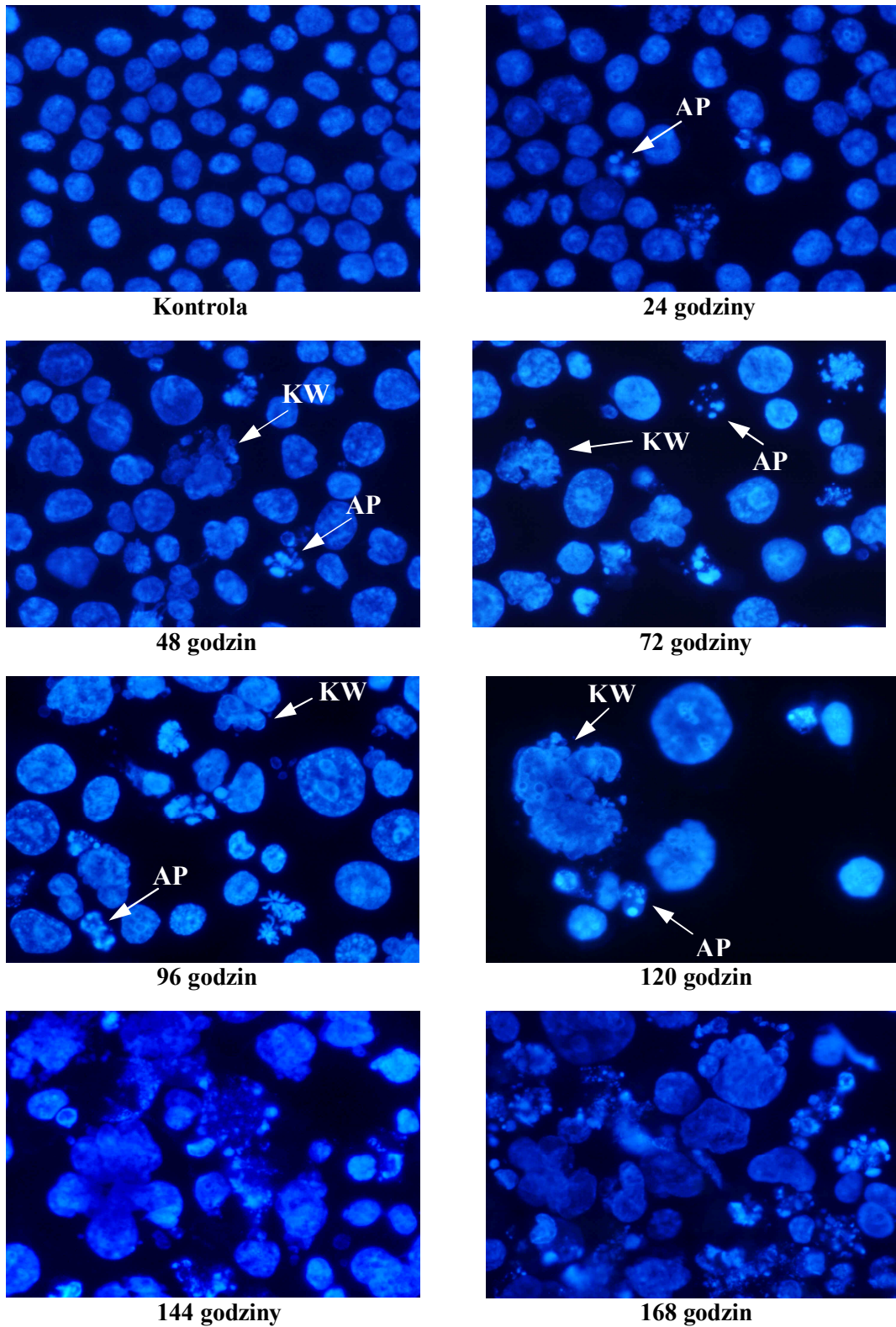


Rys. 24. Chromosomy komórek HCT116 p53^{-/-} inkubowanych ze związkiem C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀). Komórki barwiono za pomocą fluorochromu DAPI i oceniano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

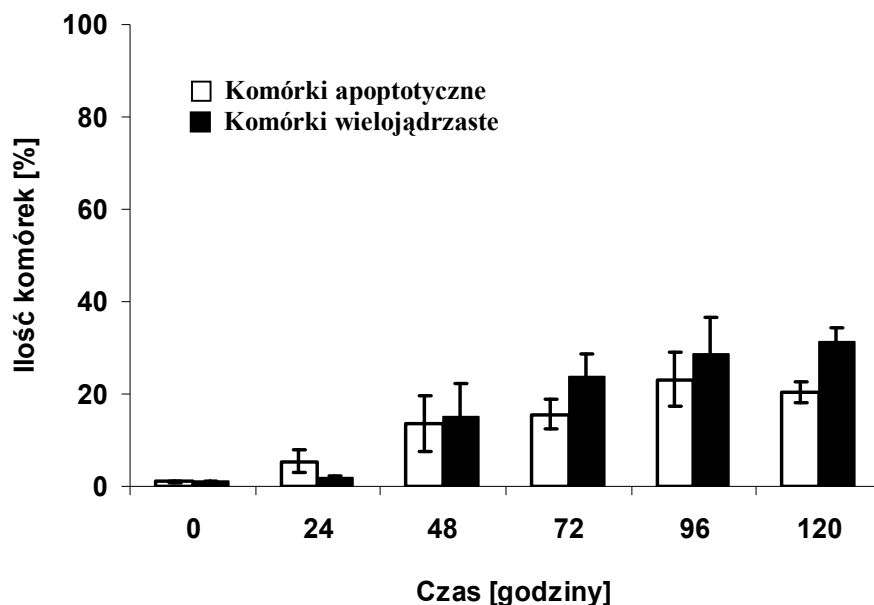
Jak pokazano na Rys. 24, obecność chromosomów mitotycznych komórek HCT116 p53^{-/-}, inkubowanych z C-1748, wyraźna szczególnie po 48 i 72 godzinach, potwierdziła wejście tychże komórek do mitozy. Dodatkowo, obserwowane chromosomy były nie w pełni skondensowane, często z zaburzonym i chaotycznym rozkładem, co wskazywało, iż proces mitozy nie przebiegał prawidłowo.

Dalsza analiza morfologii jąder komórek HCT116 p53^{-/-} traktowanych związkiem C-1748, wskazała na pojawienie się komórek wielojądrzastych (ulegających katastrofie mitotycznej), w ilości około 2%, po 24 godzinach inkubacji. W tym czasie liczba komórek apoptotycznych nie przekraczała 6% (Rys. 25 i 26). Po upływie 48 godzin ekspozycji na C-1748, ilość komórek należących do obu frakcji wzrastała i utrzymywała się mniej więcej na tym samym poziomie (apoptoza: ok. 14%; komórki wielojądrzaste: ok. 15%), natomiast po 72 godzinach liczba komórek wielojądrzastych znacznie wzrosła (do ok. 24%) w stosunku do liczby komórek apoptotycznych (ok. 16%). Taka tendencja utrzymywała się do 120 godzin ekspozycji na badany związek, gdzie odsetek komórek wielojądrzastych wynosił około 31%, zaś liczba komórek apoptotycznych osiągnęła wartość 20% (począwszy od 144 godzin inkubacji, precyzyjne określenie wielkości populacji komórek obu frakcji okazało się niemożliwe). Warto zauważyć, iż po 120 godzinach inkubacji zaczynało ubywać komórek apoptotycznych, podczas gdy liczba komórek wielojądrzastych nadal nieznacznie wzrastała. Uzyskane wyniki wskazują, iż komórki typowe dla katastrofy mitotycznej pojawiały się równolegle do komórek apoptotycznych, co sugeruje niezależny od siebie przebieg obu tych procesów. Pozostaje jednak do ustalenia, co dzieje się z komórkami HCT116 p53^{-/-}, które uległy katastrofie mitotycznej. Na podstawie poczynionych przeze mnie obserwacji nie można bowiem wykluczyć, że proces ten ostatecznie prowadzi do śmierci wspomnianych komórek nowotworowych na drodze apoptozy lub nekrozy, co postuluje szereg badaczy [Chu K. i wsp., 2004; Skwarska A. i wsp., 2007; Portugal J. i wsp., 2010].

HCT116 p53^{-/-}



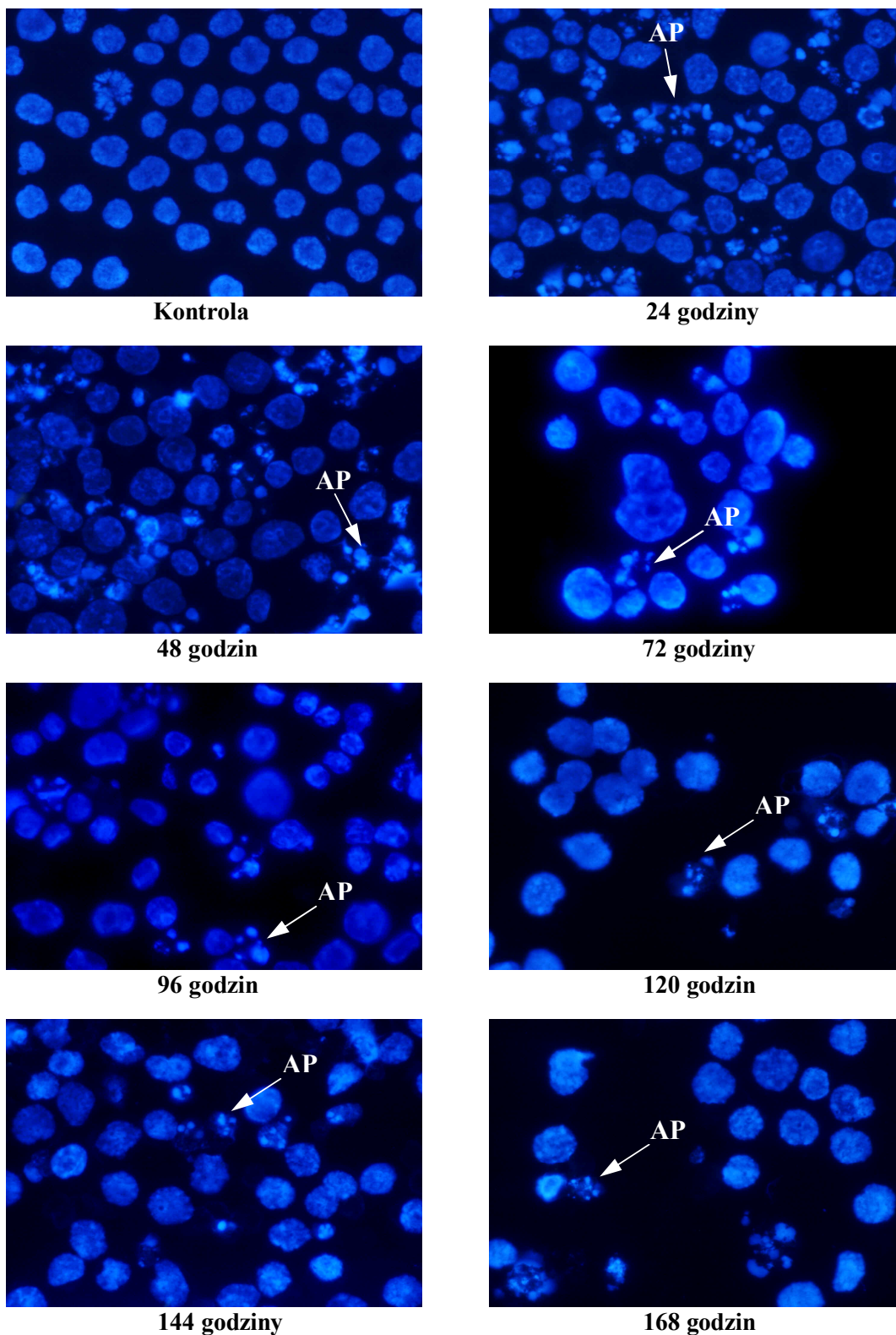
Rys. 25. Morfologia komórek HCT116 p53^{-/-}, kontrolnych i poddanych działaniu związku C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀: 0.02 μM), przez podaną liczbę godzin. Po zakończonej inkubacji ze związkiem, komórki barwiono za pomocą fluorochromu DAPI i oceniano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Komórki apoptotyczne (AP) cechowała skondensowana, pofragmentowana i intensywnie wybarwiona chromatyna, zaś komórki zawierające kilka równomiernie wybarwionych jąder traktowano jako typowe dla katastrofy mitotycznej (*komórki wielojądrzaste*, KW).



Rys. 26. Ilościowa ocena populacji komórek HCT116 p53^{-/-} prezentujących zmiany morfologiczne charakterystyczne dla apoptozy lub katastrofy mitotycznej w zależności od czasu inkubacji ze związkiem C-1748 (EC₅₀: 0.02 μM). W każdym preparacie mikroskopowym liczono 500 komórek z losowo wybranych pól, po czym określono procentowy udział komórek apoptotycznych oraz wielojądrzastych w stosunku do całkowitej liczby komórek. Wyniki przedstawiono w postaci średnich z dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+} inkubowanych z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 nie obserwowano obecności komórek wielojądrzastych, co świadczy o braku indukcji katastrofy mitotycznej przez badany związek w tychże komórkach (Rys. 27). Jednocześnie, analiza morfologii wybarwionych za pomocą fluorochromu DAPI jąder wspomnianych komórek nowotworowych wskazała na wyraźną obecność komórek apoptotycznych już po upływie 24 godzin inkubacji z C-1748. Po 48 godzinach ekspozycji na badany związek, ilość komórek apoptotycznych, widocznych na zamieszczonych poniżej zdjęciach, nadal stanowiła dużą część całkowitej populacji komórek HCT116 p53^{+/+}. Po upływie 72 godzin, liczba tychże komórek spadała, po czym utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie.

HCT116 p53^{+/+}

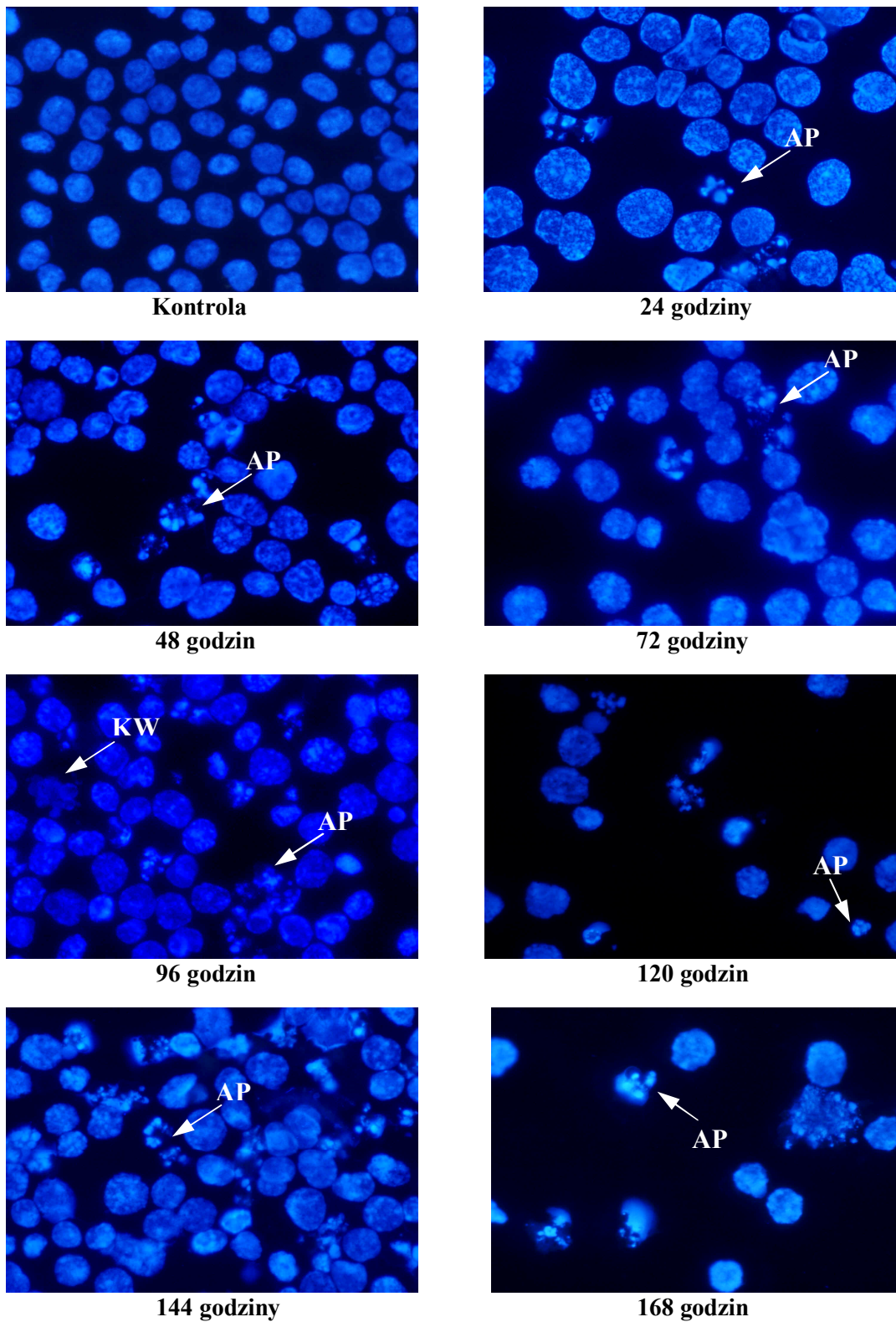


Rys. 27. Morfologia komórek HCT116 p53^{+/+}, kontrolnych i poddanych działaniu związku C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀: 0.04 μM), przez podaną liczbę godzin. Po zakończonej inkubacji ze związkiem, komórki barwiono za pomocą fluorochromu DAPI i oceniano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Komórki apoptotyczne (AP) cechowała skondensowana, pofragmentowana i intensywnie wybarwiona chromatyna, zaś komórki zawierające kilka równomiernie wybarwionych jąder traktowano jako typowe dla katastrofy mitotycznej (*komórki wielojądrzaste*, KW).

W kolejnym etapie swojej pracy postanowiłam sprawdzić, czy i w jaki sposób zwiększenie stężenia pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do wartości pięciokrotnie wyższych od wartości EC_{90} ($5xEC_{90}$), wpłynie na morfologię jąder komórek obu linii HCT116.

Analiza mikroskopowa komórek HCT116 $p53^{-/-}$ poddanych działaniu związku C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości $5xEC_{90}$ ($0.1 \mu M$), wskazała na obecność komórek apoptotycznych już po upływie 24 godzin inkubacji. W miarę wydłużania czasu ekspozycji na badany związek, ilość tychże komórek, widocznych na zamieszczonych poniżej zdjęciach, wzrastała (Rys. 28). Ponadto, przy stężeniu związku odpowiadającym wartości $5xEC_{90}$, komórki apoptotyczne stanowiły większą część całkowitej populacji komórek HCT116 $p53^{-/-}$, niż przy stężeniu równym EC_{90} . Co ważniejsze, przy zastosowaniu dawki pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 równej $5xEC_{90}$, praktycznie nie obserwowano pojawienia się komórek wielojądrzastych. Jak napisałam wcześniej, podobny efekt obserwowano w przypadku komórek Huh-7, które pod wpływem działania doksorubicyny o dużym stężeniu umierały na drodze apoptozy, podczas gdy zastosowanie niskich dawek tego chemoterapeutyku prowadziło do indukcji katastrofy mitotycznej wspomnianych komórek [Eom Y.-W. i wsp., 2005]. Wynik ten, przez zacytowanych badaczy, potraktowany został jako dowód na to, iż katastrofa mitotyczna stanowi niezależny od apoptozy rodzaj śmierci komórki. Należy jednak pamiętać, iż obecnie szereg autorów postrzega katastrofę mitotyczną jako zaburzoną mitozę, która ostatecznie prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy, czego nie mogę wykluczyć również w przypadku komórek HCT116 $p53^{-/-}$ traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 przy stężeniu równym EC_{90} [Chu K. i wsp., 2004; Skwarska A. i wsp., 2007; Portugal J. i wsp., 2010].

HCT116 p53^{-/-}

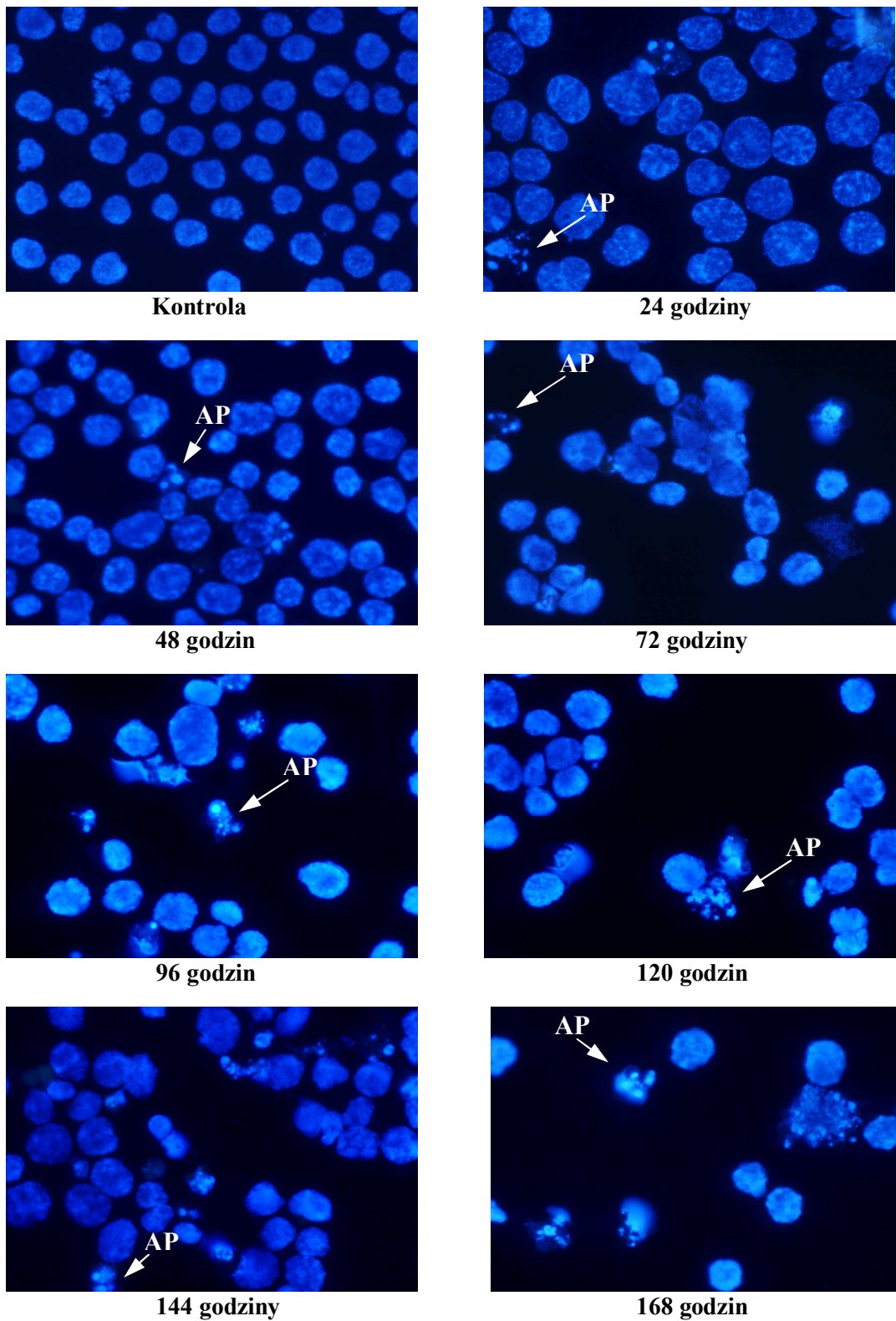


Rys. 28. Morfologia komórek HCT116 p53^{-/-}, kontrolnych i poddanych działaniu związku C-1748 w stężeniu odpowiadającemu wartości 5xEC₉₀ (0.1 μM), przez podaną liczbę godzin. Po zakończonej inkubacji ze związkiem, komórki barwiono za pomocą fluorochromu DAPI i oceniano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Symbol AP oznacza przykładowe komórki apoptotyczne.

Analiza morfologii jąder komórek HCT116 p53^{+/+} poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającemu wartości 5xEC₉₀ (0.2 μM), wskazała na obecność komórek apoptotycznych, począwszy od 24 godzin inkubacji. W miarę wydłużania czasu ekspozycji na badany związek, degradacja jąder komórkowych postępowała, aczkolwiek nie obserwowano wyraźnego przyrostu liczby ciałek apoptotycznych (Rys. 29). Ponadto, przy stężeniu C-1748 o wartości równej 5xEC₉₀, ilość komórek ulegających apoptozie, widocznych na prezentowanych zdjęciach, była zdecydowanie mniejsza, niż w przypadku stężenia EC₉₀ (Rys. 27). Jednocześnie, podobnie jak przy stężeniu związku o wartości EC₉₀, również przy pięciokrotnie wyższej dawce, nie obserwowano pojawienia się komórek wielojądrzastych.

Podsumowując, wyniki uzyskane na drodze analizy morfologii jąder komórek HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-}, inkubowanych z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, pozwoliły mi na sformułowanie następujących wniosków: 1) zdolność C-1748 do indukcji katastrofy mitotycznej w komórkach HCT116, zależała od statusu białka p53 i stężenia badanego związku (procesowi temu ulegały wyłącznie komórki HCT116, nie posiadające funkcjonalnego białka p53, poddane działaniu C-1748 w stężeniu odpowiadającemu wartości EC₉₀); 2) możliwość uruchomienia przez C-1748 śmierci komórek ludzkich raków jelita grubego na drodze apoptozy, także zależała od statusu p53. Proces ten pojawiał się szybciej i zachodził z większą intensywnością w przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}; 3) katastrofa mitotyczna, indukowana przez badany związek w komórkach HCT116 p53^{-/-}, przebiegała równolegle do apoptozy i niezależnie od niej, aczkolwiek końcowy los komórek ulegających temu procesowi nie jest znany. Na podstawie poczynionych przeze mnie obserwacji nie można bowiem wykluczyć, że katastrofa mitotyczna ostatecznie prowadzi do śmierci wspomnianych komórek nowotworowych na drodze apoptozy lub nekrozy.

HCT116 p53^{+/+}



Rys. 29. Morfologia komórek HCT116 p53^{+/+}, kontrolnych i poddanych działaniu związku C-1748 w stężeniu odpowiadającemu wartości 5xEC₉₀ (0.2 μM), przez podaną liczbę godzin. Po zakończonej inkubacji ze związkiem, komórki barwiono za pomocą fluorochromu DAPI i oceniano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Symbol AP oznacza przykładowe komórki apoptotyczne.

III.2.4. Badanie, w oparciu o metody biochemiczne, apoptotycznej śmierci komórek HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+}, indukowanej przez pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

Analiza morfologiczna jąder komórek obu linii HCT116 poddanych działaniu związku C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC₉₀ i 5xEC₉₀), wskazała na obecność w ich strukturze zmian charakterystycznych dla apoptozy (kondensacja chromatyny oraz fragmentacja jądrowego DNA, prowadzące do powstawania tzw. ciałek apoptotycznych – Rys. 25, 27, 28 i 29). Apoptoza, w przeciwieństwie do identyfikowanej głównie na podstawie obserwacji mikroskopowych katastrofy mitotycznej, jest procesem nieporównywalnie lepiej poznanym zarówno pod względem morfologicznym, jak i molekularnym. Dlatego też, w kolejnym etapie mojej pracy, postanowiłam dokonać oceny tego zjawiska również na poziomie biochemicznym.

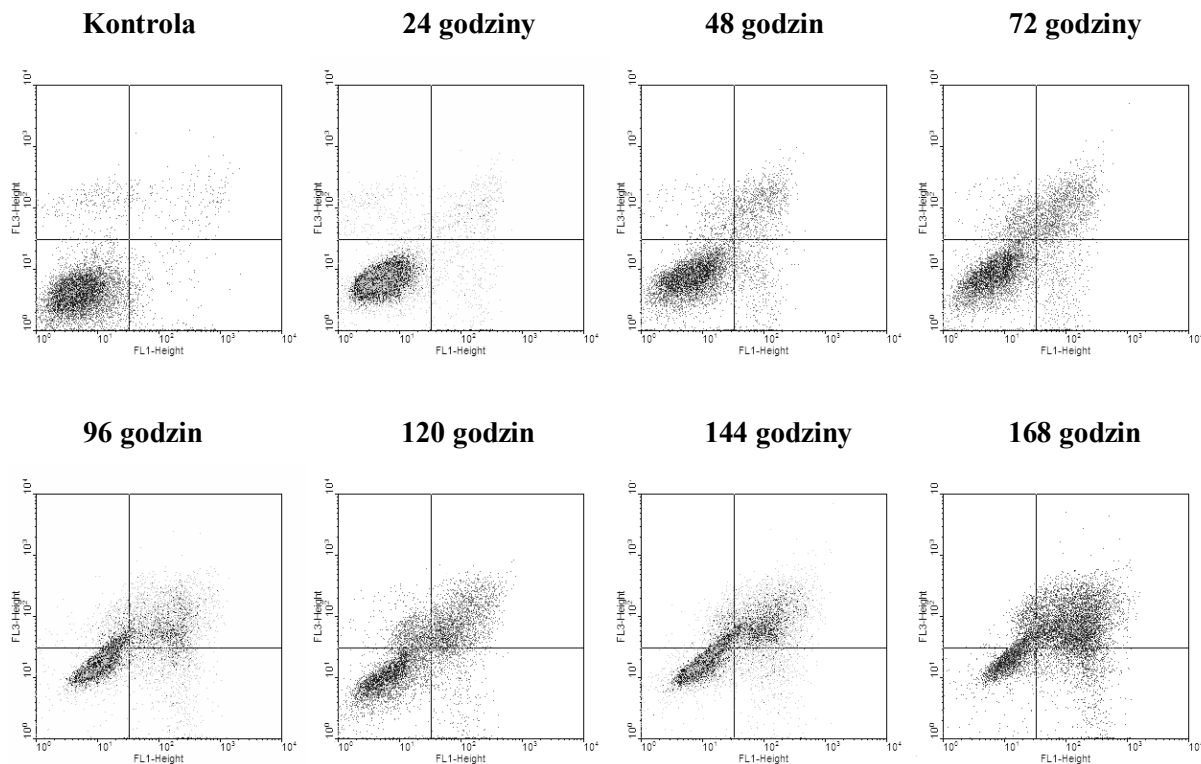
III.2.4.1. Badanie apoptozy w oparciu o zmiany w błonie plazmatycznej komórek HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+} traktowanych związkiem C-1748.

W żywych komórkach, fosfolipidy błony komórkowej rozmieszczone są asymetrycznie w wewnętrznej i zewnętrznej warstwie tejże błony. W komórkach ulegających apoptozie zaś, dochodzi do utraty asymetrii rozmieszczenia fosfolipidów w błonie komórkowej. I tak, cząsteczki fosfatydyloseryny, które w normalnej komórce zlokalizowane są w wewnętrznej warstwie błony plazmatycznej, podczas wczesnych etapów apoptozy ulegają translokacji do zewnętrznej warstwy tejże błony. Stanowi to jedną z najbardziej charakterystycznych zmian, zachodzących w komórce apoptotycznej, która w warunkach fizjologicznych umożliwia makrofagom rozpoznanie i wchłonięcie umierającej komórki [Marczak A. i Józwiak Z., 2007]. Zastosowanie sprzężonego z fluorochromem (np. fluoresceiną - FITC) białka – aneksyny V, która w obecności jonów Ca²⁺ wykazuje wysokie powinowactwo do fosfatydyloseryny, pozwala na identyfikację komórek apoptotycznych [Hanshaw R. G. i Smith B. D., 2005]. Biorąc pod uwagę fakt, iż błona komórek umierających i martwych, w przeciwieństwie do komórek żywych oraz we wczesnych stadiach apoptozy, jest całkowicie przepuszczalna dla barwników kationowych, jednoczesne zastosowanie aneksyny V-FITC, a także jodku propidyny (PI), umożliwi rozróżnienie, przy użyciu cytometrii przepływowej, komórek żywych (aneksyna V-/PI-) od tych we wczesnej fazie apoptozy (aneksyna V+/PI-) oraz od komórek w późnej fazie

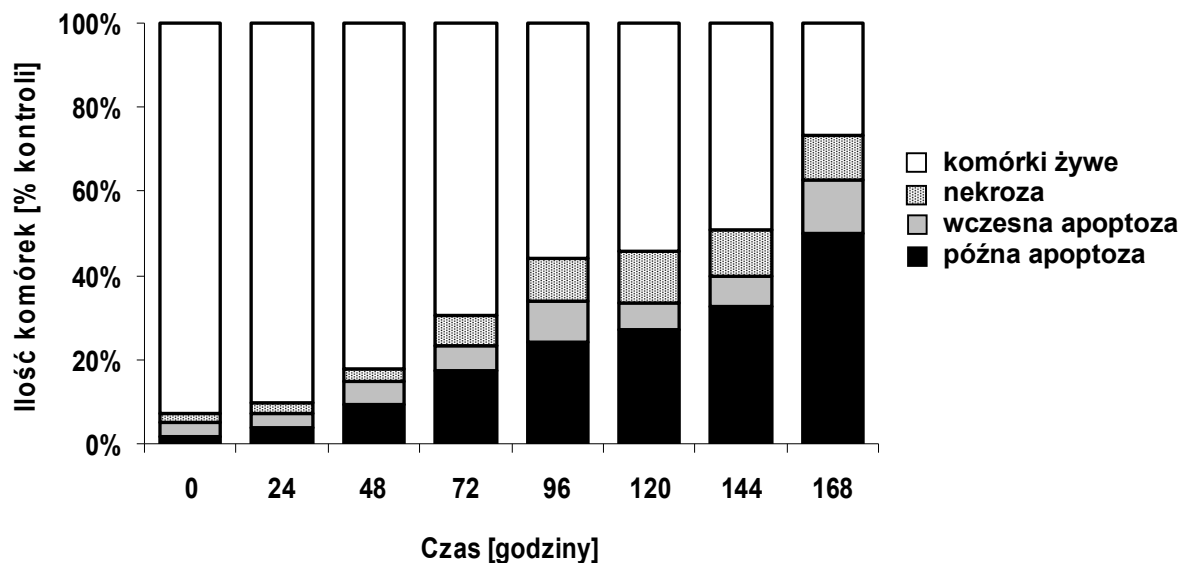
apoptozy i ulegających wtórnej nekrozie (aneksyna V+/PI+), jak również komórek typowo nekrotycznych (aneksyna V-/PI+) [Darzynkiewicz Z. i wsp., 1996].

Cytometryczna analiza zmian, zachodzących w błonie plazmatycznej komórek HCT116 p53^{-/-} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydiny C-1748 (0.02 μM), wskazała na pojawienie się, po 72 godzinach inkubacji, niewielkiej frakcji komórek (ok. 7%) wybarwionych jedynie jodkiem propidyny (aneksyna V-/PI+) (Rys. 30 i 31). Po 96 godzinach ekspozycji na badany związek, frakcja ta nieznacznie wzrosła, a następnie utrzymywała się praktycznie na tym samym poziomie (ok. 11%). Wynik ten dowodzi, iż C-1748 nie indukuje masowej śmierci komórek HCT116 p53^{-/-} na skutek bezpośredniej nekrozy (ang. *primary necrosis*). Jednocześnie, uzyskane wyniki wskazały na obecność komórek wybarwionych aneksyną V, czyli ulegających apoptozie. Po 48 godzinach inkubacji z badanym związkiem, ilość komórek wczesnoapoptotycznych (aneksyna V+/PI-) osiągała poziom ok. 5%. Przy dłuższych czasach inkubacji, liczba komórek wybarwionych jedynie aneksyną V utrzymywała się w przedziale 5-9%, ostatecznie osiągając wartość maksymalną ok. 13% po 168 godzinach. Wczesna apoptoza stanowi jedynie etap przejściowy, a zatem w miarę upływu czasu, komórki przechodzą do późniejszych jej etapów, podczas których ich błona plazmatyczna staje się całkowicie przepuszczalna dla barwników kationowych, takich jak jodek propidyny [Darzynkiewicz Z. i wsp., 1996]. Analiza przedstawionych poniżej cytogramów wykazała, że populacja komórek HCT116 p53^{-/-}, znajdujących się w późnej fazie apoptozy (aneksyna V+/PI+), wzrastała w miarę wydłużania czasu ekspozycji na C-1748, osiągając poziom ok. 50% po 168 godzinach. A zatem, po upływie 168 godzin inkubacji z badanym związkiem, łączna ilość komórek wczesno- i późnoapoptotycznych wynosiła nieco ponad 60%, co mogłoby sugerować, iż proces apoptozy odgrywa wiodącą rolę w eliminacji komórek HCT116 p53^{-/-} traktowanych C-1748. Jednocześnie, wynik ten wskazywał na znacznie większy udział apoptozy, niż można było sądzić na podstawie wielkości frakcji sub-G1 lub ilościowej oceny populacji komórek HCT116 p53^{-/-}, prezentujących zmiany morfologiczne charakterystyczne dla tego procesu. Należy jednak pamiętać, że część wymienionych wyżej komórek ludzkiego raka okrężnicy, pod wpływem C-1748, ulegała katastrofie mitotycznej (Rys. 25 i 26). Jak wynika zaś z danych literaturowych, komórki umierające na drodze tego procesu, mogą barwić się zarówno aneksyną V-FITC, jak również jodkiem propidyny [Eom Y. W. i wsp., 2005; Park S. S. i wsp., 2005]. Dlatego też, w przypadku komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53 należy uznać, iż w skład całkowitej populacji komórek określanych przeze mnie jako apoptotyczne, wchodzi

także komórki ulegające katastrofie mitotycznej (odróżnienie obu rodzajów śmierci na podstawie analizy zmian zachodzących w błonie plazmatycznej komórek jest niemożliwe).



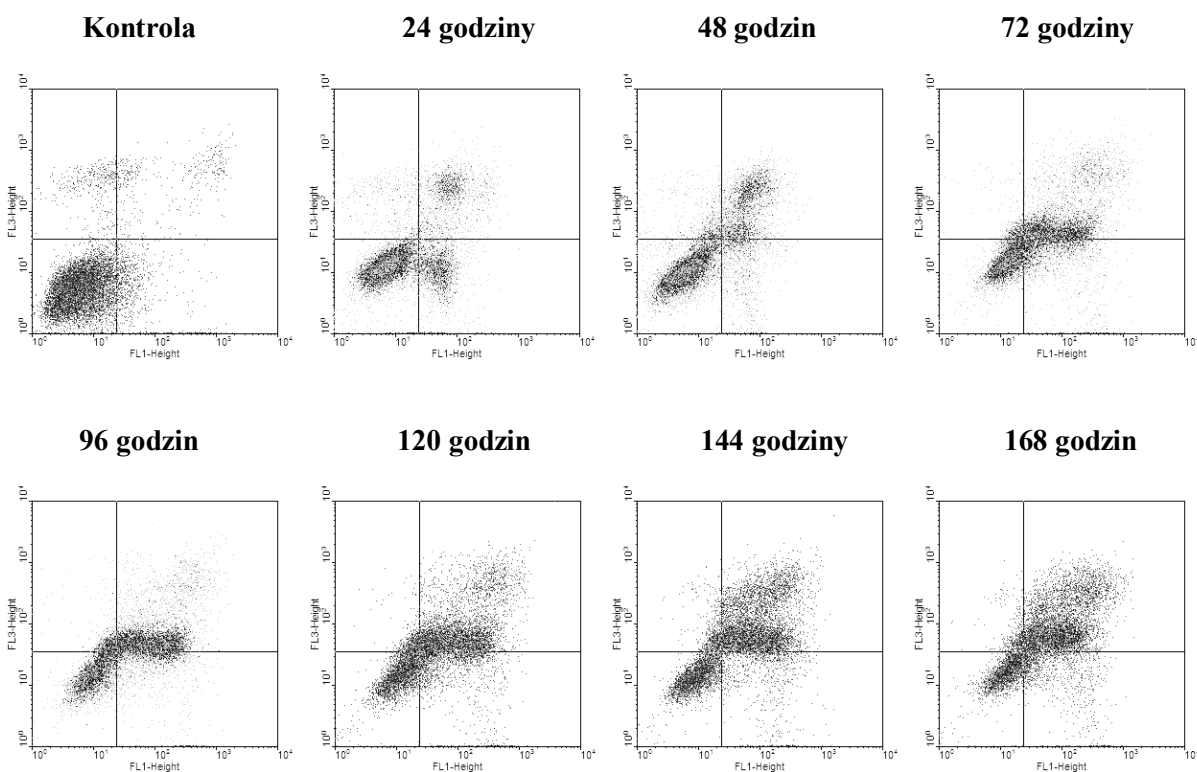
Rys. 30. Cytometryczna analiza zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT116 p53^{-/-}, zarówno kontrolnych jak i traktowanych C-1748 (EC₉₀: 0.02 μM). Oś X – fluorescencja emitowana przez fluoresceinę skoniugowaną z aneksyną V. Oś Y – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny. Lewy, dolny kwadrant: komórki żywe (aneksyna V-/PI-); prawy, dolny kwadrant: komórki wczesnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI-); prawy, górny kwadrant: komórki późnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI+); lewy, górny kwadrant: komórki nekrotyczne (aneksyna V-/PI+).



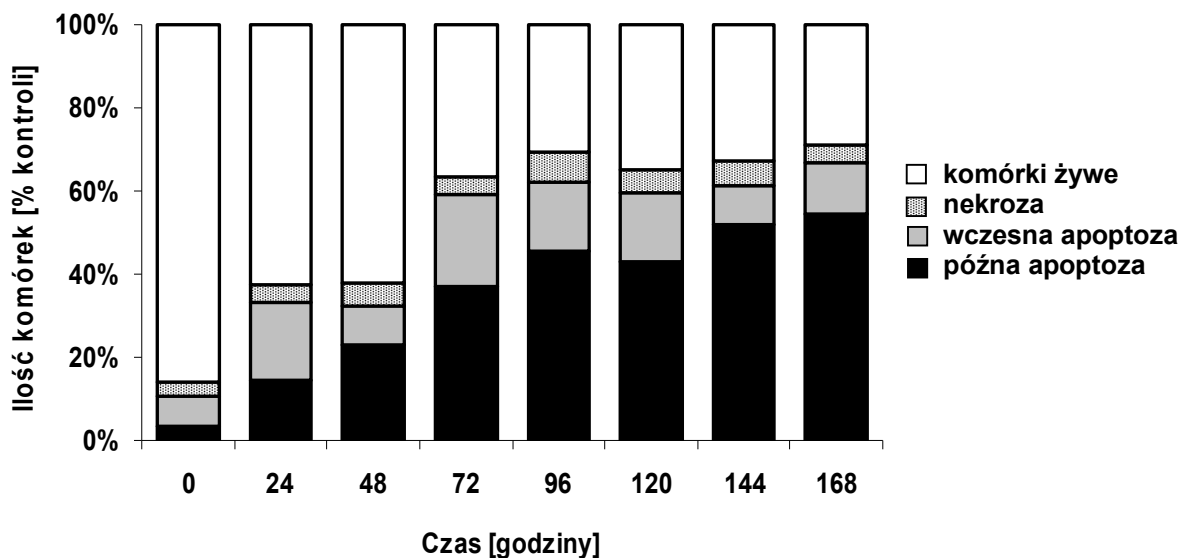
Rys. 31. Procentowy udział komórek żywych, nekrotycznych, wczesno- i późnoapoptotycznych (określony w odniesieniu do całkowitej populacji komórek HCT116 p53^{-/-} w oparciu o test aneksyna V/PI) w zależności od czasu inkubacji ze związkiem C-1748 (EC₉₀). Wykres przedstawia wyniki reprezentacyjne dla trzech niezależnych doświadczeń, w których otrzymano podobne wyniki.

Populacja komórek HCT116 p53^{+/+} wybarwionych jedynie jodkiem propidyny (aneksyna V-/PI+), w miarę wydłużania czasu inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (0.04 μM), utrzymywała się na niskim poziomie, w przedziale 4-7% (Rys. 32 i 33). Wynik ten dowodzi, podobnie jak w przypadku komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53 (Rys. 30 i 31), iż badany związek nie indukuje masowej śmierci komórek HCT116 p53^{+/+} na skutek bezpośredniej nekrozy (ang. *primary necrosis*). Jednocześnie, uzyskane wyniki wskazały na obecność komórek wybarwionych aneksyną V, czyli ulegających apoptozie. Komórki wczesnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI-), pojawiły się już po upływie 24 godzin ekspozycji na C-1748 (ok. 19%), osiągając znacznie wyższy poziom niż w przypadku linii z niefunkcyjnym p53. Po upływie 48 godzin, ilość komórek we wczesnej fazie apoptozy malała (ok. 9%), natomiast znacznie przybywało komórek późnoapoptotycznych (ok. 23%). Po 72 godzinach inkubacji z badanym związkiem, przybywało zarówno komórek we wczesnej (ok. 22%), jak również w późnej fazie apoptozy (ok. 37%). Pomiędzy 72 a 144 godziną ekspozycji na C-1748, łączny odsetek komórek wczesno- i późnoapoptotycznych utrzymywał się na poziomie ok. 60% (z wyraźną przewagą populacji komórek w późnej apoptozie). Ostatecznie, po upływie 168 godzin, całkowita ilość komórek umierających na drodze apoptozy wynosiła ok. 67%, co zdecydowanie wskazało na dominujące znaczenie tego procesu w eliminacji komórek HCT116 p53^{+/+} poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748. Biorąc pod uwagę fakt, iż badany

związek nie indukował katastrofy mitotycznej w komórkach HCT116 posiadających funkcjonalne białko p53, można przypuszczać, że całkowita populacja komórek wybarwionych aneksyną i/lub jodkiem propidyny nie ulegała zawyżeniu, związanemu z obecnością komórek wielojądrzastych.



Rys. 32. Cytometryczna analiza zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT116 p53^{+/+}, zarówno kontrolnych jak i traktowanych C-1748 (EC₉₀: 0.04 μM). Oś X – fluorescencja emitowana przez fluoresceinę skoniugowaną z aneksyną V. Oś Y – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny. Lewy, dolny kwadrant: komórki żywe (aneksyna V-/PI-); prawy, dolny kwadrant: komórki wczesnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI-); prawy, górny kwadrant: komórki późnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI+); lewy, górny kwadrant: komórki nekrotyczne (aneksyna V-/PI+).

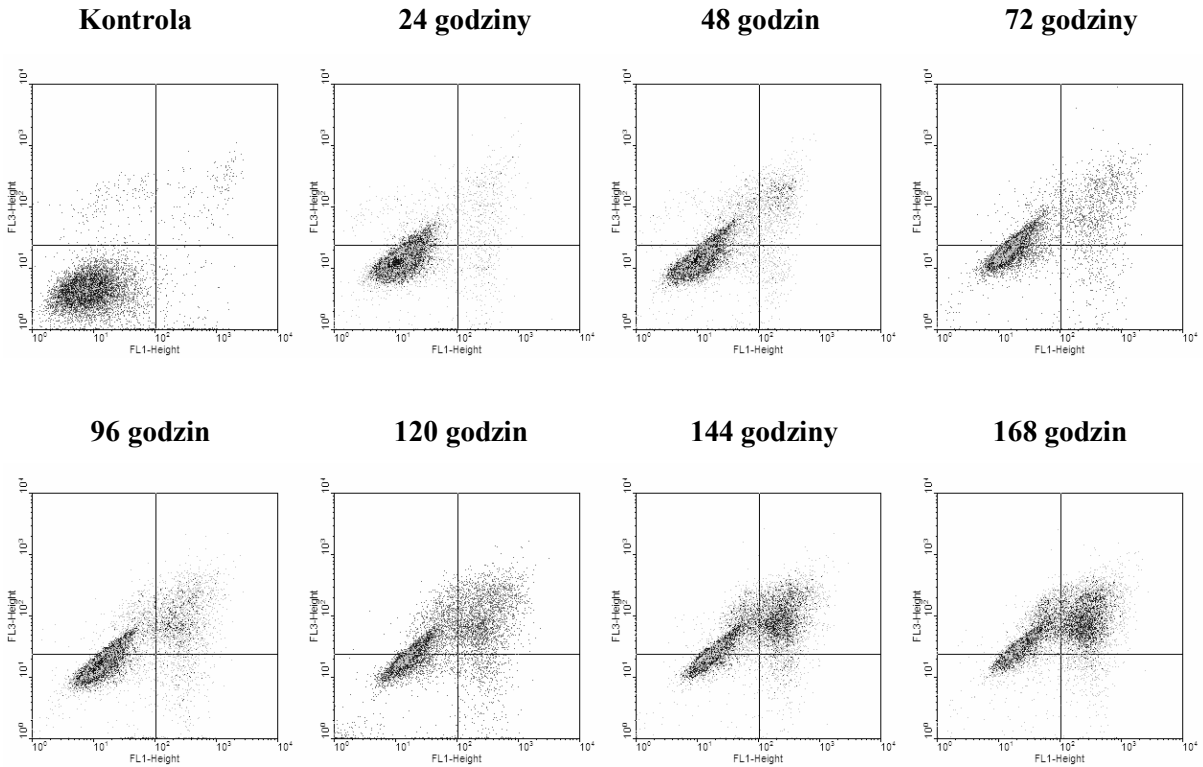


Rys. 33. Procentowy udział komórek żywych, nekrotycznych, wczesno- i późnoapoptycznych (określony w odniesieniu do całkowitej populacji komórek HCT116 p53^{+/+} w oparciu o test aneksyna V/PI) w zależności od czasu inkubacji ze związkiem C-1748 (EC₉₀). Wykres przedstawia wyniki reprezentacyjne dla trzech niezależnych doświadczeń, w których otrzymano podobne wyniki.

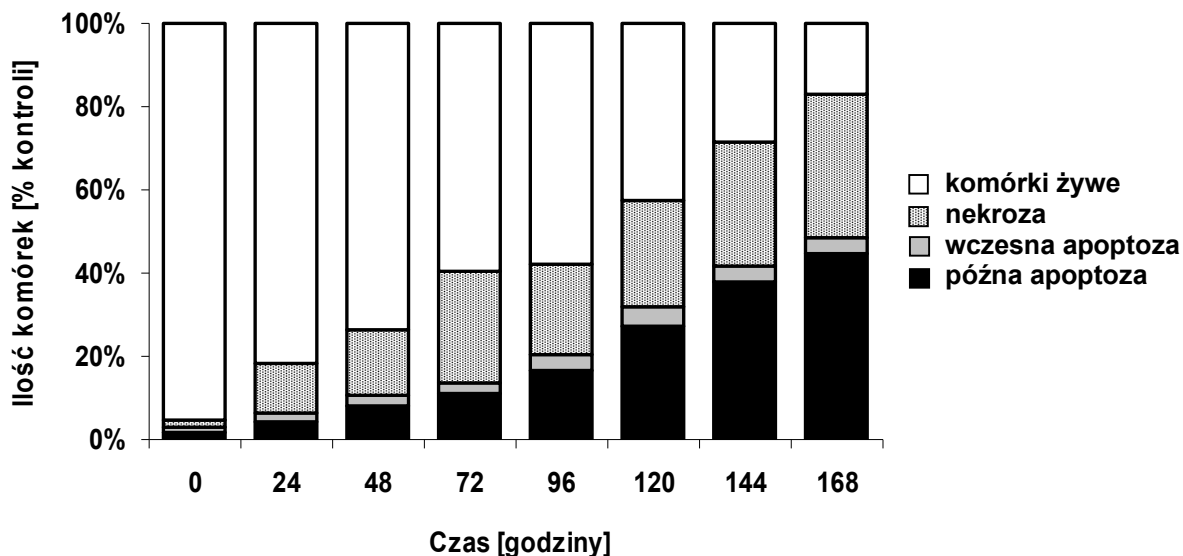
Biorąc pod uwagę powyższe wyniki postanowiłam sprawdzić, czy i w jaki sposób zwiększenie stężenia pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do wartości pięciokrotnie wyższych niż EC₉₀, wpłynie na zmiany w strukturze błony plazmatycznej komórek obu linii ludzkich raków jelita grubego HCT116.

Cytometryczna analiza zmian, zachodzących w błonie plazmatycznej komórek HCT116 p53^{-/-} traktowanych związkiem C-1748 (5xEC₉₀: 0.1 μM) wskazała, że już po 24 godzinach inkubacji, pojawiła się znacząca frakcja komórek (ok. 12%) wybarwionych jedynie jodkiem propidyny (aneksyna V-/PI+) (Rys. 34 i 35). Po upływie 48 i 72 godzin, liczba tychże komórek wzrastała (ok. 27%), po czym utrzymywała się mniej więcej na tym samym poziomie przez okres od 72 do 120 godzin ekspozycji na badany związek, a następnie ponownie rosła, osiągając wartość ok. 34% po 168 godzinach. Wynik ten dowodzi, iż C-1748 indukuje śmierć komórek HCT116 p53^{-/-} na skutek bezpośredniej nekrozy, czego nie obserwowano przy stężeniu związku odpowiadającym wartości EC₉₀. Dalsza analiza cytogramów wykazała, że w miarę wydłużania czasu inkubacji, liczba komórek wczesnoapoptycznych (aneksyna V+/PI-) nie ulegała większym zmianom, utrzymując się na poziomie od ok. 2 do 5%. A zatem, ilość komórek we wczesnej fazie apoptozy była niższa niż przy stężeniu związku odpowiadającym wartości EC₉₀. Jednocześnie, liczba komórek w późnej fazie apoptozy, była również nieco niższa niż przy stężeniu EC₉₀ (Rys. 30 i 31). Pierwsze komórki późnoapoptyczne (ok. 4%) pojawiły się po 24 godzinach ekspozycji na

C-1748 ($5xEC_{90}$), a w miarę upływu czasu inkubacji ich liczba sukcesywnie wzrastała, ostatecznie osiągając poziom ok. 45% po 168 godzinach. Należy pamiętać, iż w powyższych rozważaniach nie bierzemy pod uwagę komórek wielojądrzastych, ponieważ związek C-1748 w stężeniu równym $5xEC_{90}$, nie indukował katastrofy mitotycznej w komórkach HCT116 p53^{-/-} (Rys. 28).

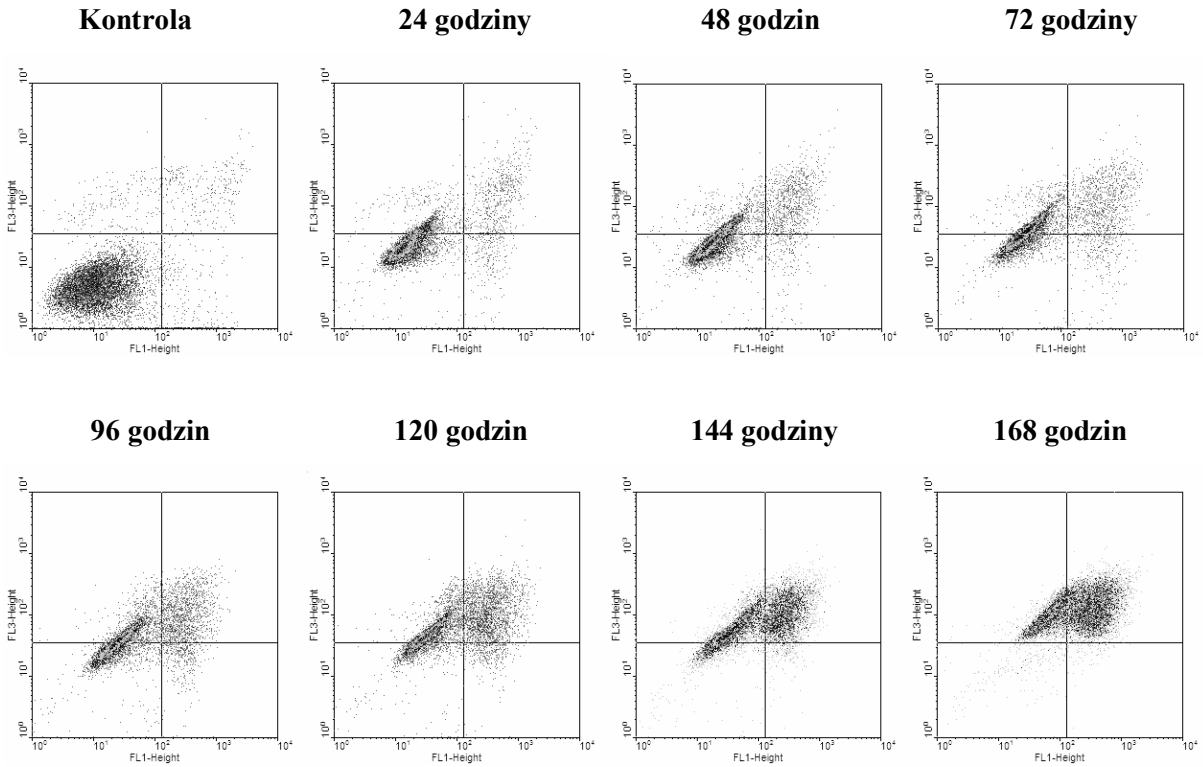


Rys. 34. Cytometryczna analiza zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT116 p53^{-/-}, zarówno kontrolnych jak i traktowanych C-1748 ($5xEC_{90}$: 0.1 μ M). Oś X – fluorescencja emitowana przez fluoresceinę skoniugowaną z aneksyną V. Oś Y – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny. Lewy, dolny kwadrant: komórki żywe (aneksyna V-/PI-); prawy, dolny kwadrant: komórki wczesnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI-); prawy, górny kwadrant: komórki późnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI+); lewy, górny kwadrant: komórki nekrotyczne (aneksyna V-/PI+).

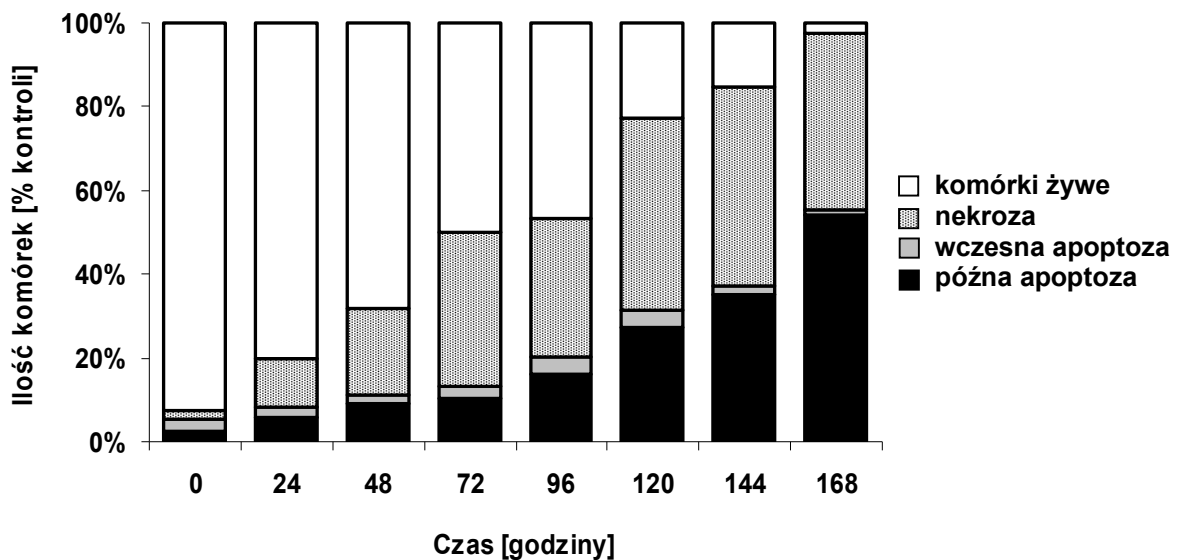


Rys. 35. Procentowy udział komórek żywych, nekrotycznych, wczesno- i późnoapoptotycznych (określony w odniesieniu do całkowitej populacji komórek HCT116 p53^{-/-} w oparciu o test aneksyna V/PI) w zależności od czasu inkubacji ze związkiem C-1748 (5xEC₉₀). Wykres przedstawia wyniki reprezentacyjne dla trzech niezależnych doświadczeń, w których otrzymano podobne wyniki.

Populacja komórek HCT116 p53^{+/+} wybarwionych jedynie jodkiem propidyny (aneksyna V-/PI+) (ok. 12%), pojawiła się już po upływie 24 godzin inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (5xEC₉₀: 0.2 μM) (Rys. 36 i 37). Liczba tychże komórek sukcesywnie wzrastała przez okres 144 godzin ekspozycji na C-1748 (ok. 47%), po czym nieznacznie malała, osiągając wartość ok. 42% po upływie 168 godzin. Wynik ten dowodzi, podobnie jak w przypadku komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53 (Rys. 34 i 35), iż badany związek indukuje śmierć komórek HCT116 p53^{+/+} na skutek bezpośredniej nekrozy, czego również nie obserwowano przy stężeniu związku odpowiadającemu wartości EC₉₀. Dalsza analiza cytogramów wykazała, że w miarę wydłużania czasu inkubacji z C-1748, liczba komórek wczesnoapoptotycznych (aneksyna V+/PI-) nie ulegała większym zmianom, utrzymując się na poziomie od ok. 2 do 4%. A zatem, ilość komórek we wczesnej fazie apoptozy była wyraźnie niższa niż przy stężeniu związku odpowiadającemu wartości EC₉₀ (Rys. 32 i 33). Jednocześnie, liczba komórek w późnej fazie apoptozy była również zdecydowanie niższa niż w przypadku, kiedy dawka związku wynosiła EC₉₀ (poza czasem inkubacji 168 godzin). I tak, pierwsze komórki późnoapoptotyczne (ok. 6%) pojawiły się po 24 godzinach ekspozycji na C-1748 (5xEC₉₀), a w miarę upływu czasu inkubacji ich liczba sukcesywnie wzrastała, ostatecznie osiągając poziom ok. 54% po 168 godzinach.



Rys. 36. Cytometryczna analiza zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT116 p53^{+/+}, zarówno kontrolnych jak i traktowanych C-1748 (5xEC₉₀: 0.2 μM). Oś X – fluorescencja emitowana przez fluoresceinę skoniugowaną z aneksyną V. Oś Y – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny. Lewy, dolny kwadrant: komórki żywe (aneksyna V-/PI-); prawy, dolny kwadrant: komórki wczesnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI-); prawy, górny kwadrant: komórki późnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI+); lewy, górny kwadrant: komórki nekrotyczne (aneksyna V-/PI+).



Rys. 37. Procentowy udział komórek żywych, nekrotycznych, wczesno- i późnoapoptotycznych (określony w odniesieniu do całkowitej populacji komórek HCT116 p53^{+/+} w oparciu o test aneksyna V/PI) w zależności od czasu inkubacji ze związkiem C-1748 (5xEC₉₀). Wykres przedstawia wyniki reprezentacyjne dla trzech niezależnych doświadczeń, w których otrzymano podobne wyniki.

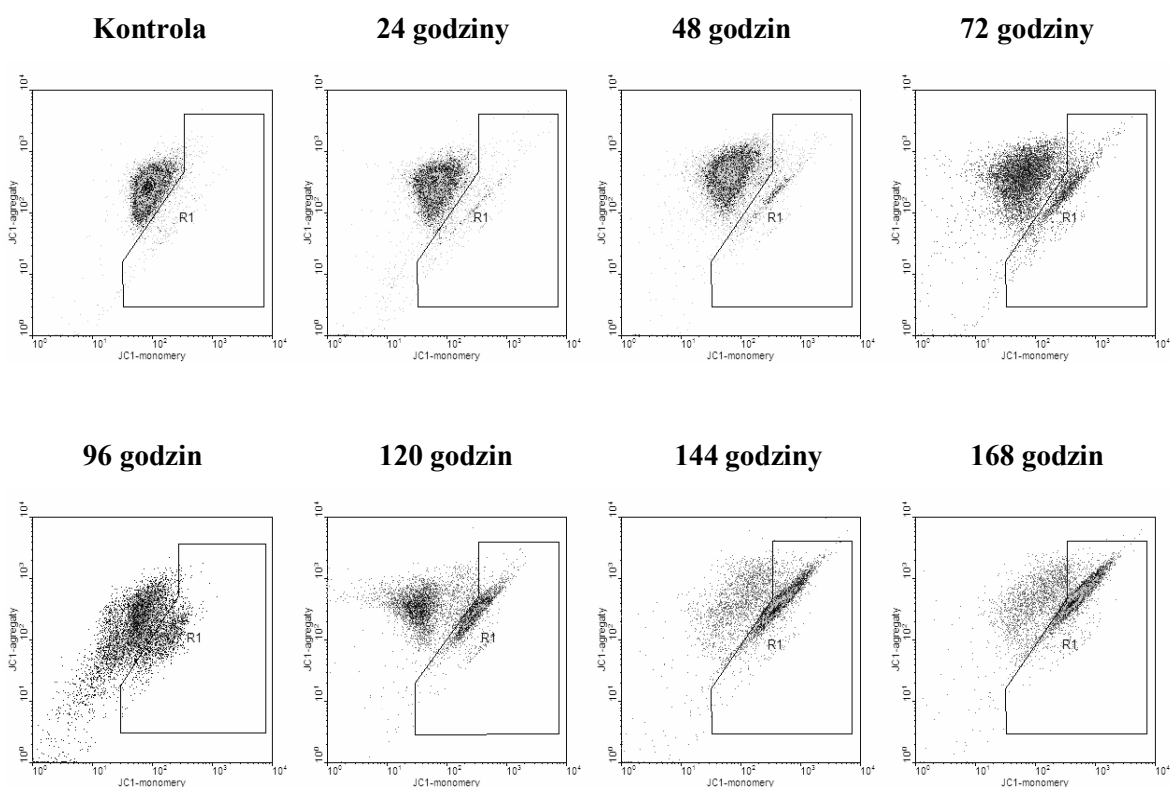
III.2.4.2. Określenie funkcji mitochondriów w procesie apoptozy komórek HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+} indukowanej przez związek C-1748.

Wyniki cytometrycznej analizy zmian w błonie plazmatycznej, wraz z obserwacjami morfologicznymi wskazały, iż w komórkach obu linii HCT116, poddanych działaniu związku C-1748, dochodziło do indukcji apoptozy. Co więcej, odsetek komórek umierających na drodze tego procesu był znacznie większy w przypadku komórek HCT116 posiadających funkcjonalne białko p53. Biorąc to pod uwagę, w dalszej części pracy postanowiłam określić rolę mitochondriów w mechanizmie indukcji apoptozy komórek HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-}, indukowanej przez C-1748.

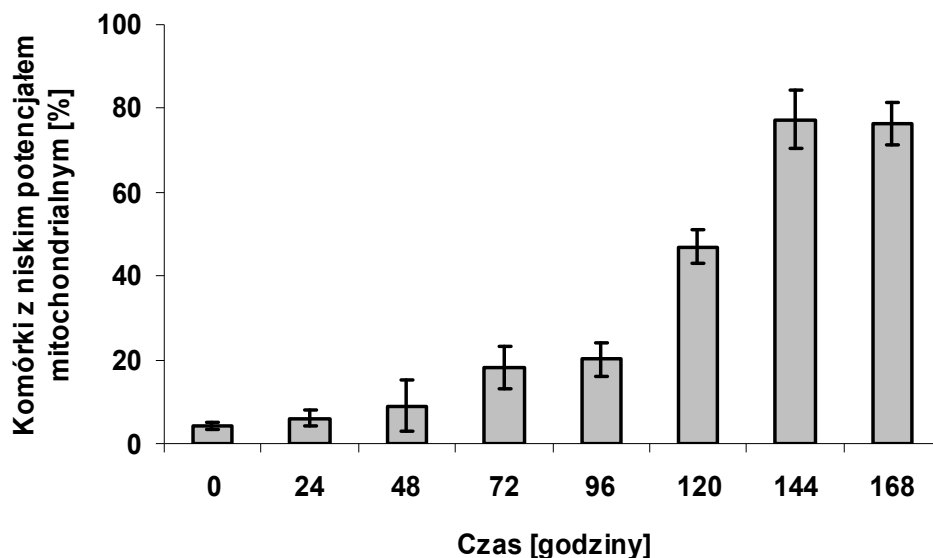
Szereg doniesień literaturowych wskazuje na istotny udział mitochondriów w kontrolowaniu procesu apoptozy, indukowanej przez związki przeciwnowotworowe (w tym uszkodzające DNA) [Green D. i Reed J. C., 1998]. Jednym z kluczowych parametrów, określających zaburzenie funkcji tychże organelli podczas apoptozy, jest spadek potencjału elektrochemicznego ($\Delta\Psi_m$) na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, następujący przed pojawieniem się fragmentacji DNA i charakterystycznych dla tego rodzaju śmierci zmian w morfologii komórki. Spadek potencjału $\Delta\Psi_m$ poniżej krytycznej wartości, tzw. potencjału bramkującego, sprzyja otwieraniu megakanałów mitochondrialnych i uwalnianiu z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej czynników proapoptotycznych (np. cytochromu c oraz czynnika AIF), co w sposób nieodwracalny kieruje komórkę na drogę apoptozy [Gulbins E. i wsp., 2000].

W celu oznaczenia depolaryzacji mitochondriów komórek HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC₉₀), zastosowałam lipofilowy barwnik kationowy JC-1, który posiada zdolność do selektywnego wnikania do mitochondriów. W sytuacji, kiedy błona mitochondrialna jest spolaryzowana, a więc wartość potencjału $\Delta\Psi_m$ jest wysoka, barwnik ten tworzy agregaty, które emitują światło w zakresie fluorescencji pomarańczowej. Wraz ze spadkiem wartości potencjału, maleje również ilość agregatów wspomnianego fluorochromu, który zaczyna występować w formie monomerów, emitujących światło w zakresie fluorescencji zielonej. A zatem komórki, w których doszło do spadku potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, będą charakteryzowały się obniżoną fluorescencją pochodzącą od agregatów i podwyższoną fluorescencją pochodzącą od monomerów JC-1 [Cossarizza A. i wsp., 1993].

Przedstawione na Rys. 38 i 39 wyniki dwuparametrowej analizy komórek HCT16 p53^{-/-} poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (0.02 μM) i barwionych JC-1, a następnie analizowanych w cytometrze przepływowym, wskazały na postępującą wraz z czasem inkubacji depolaryzację mitochondriów. Po 24 godzinach ekspozycji na badany związek, ilość komórek z niskim potencjałem mitochondrialnym, w porównaniu do komórek kontrolnych, była niewielka (ok. 6%). Począwszy od 48 godzin, populacja komórek z obniżonym ΔΨ_m sukcesywnie wzrastała, ostatecznie osiągając wielkość ok. 77% po 168 godzinach inkubacji z C-1748. Dokonując interpretacji opisanych powyżej wyników należy mieć na uwadze, iż o ile spadek mitochondrialnego potencjału błonowego po krótkich czasach inkubacji komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53 z badanym związkiem, może być związany z indukcją apoptozy, o tyle po dłuższych czasach ekspozycji, frakcja komórek z niskim ΔΨ_m obejmuje również komórki ulegające katastrofie mitotycznej [Castedo M. i wsp., 2004a; Eom Y.-W. i wsp., 2005].



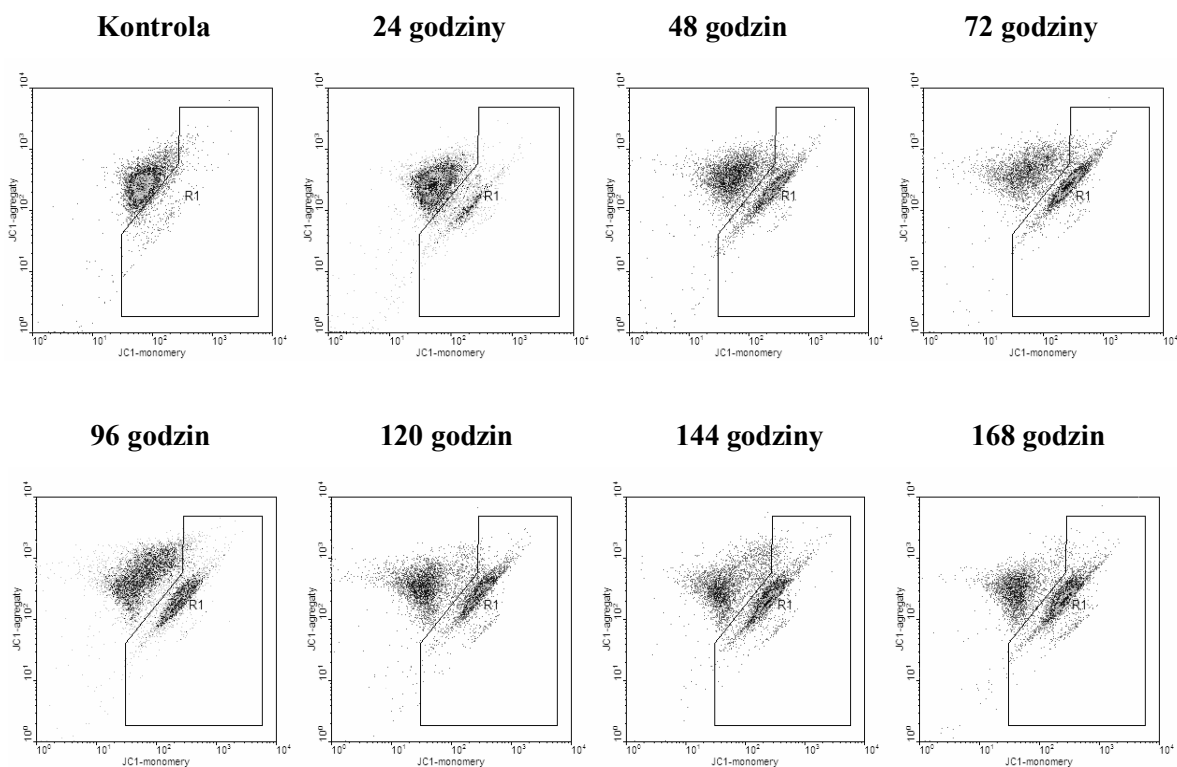
Rys. 38. Cytometryczna analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego w komórkach HCT116 p53^{-/-}, zarówno kontrolnych, jak i traktowanych C-1748 (EC₉₀: 0.02 μM). Oś X - intensywność fluorescencji pochodzącej od monomerów JC-1. Oś Y - intensywność fluorescencji pochodzącej od agregatów JC-1. Zaznaczony obszar przedstawia komórki, w których doszło do spadku mitochondrialnego potencjału błonowego. Cytogramy przedstawiają jedno z dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń



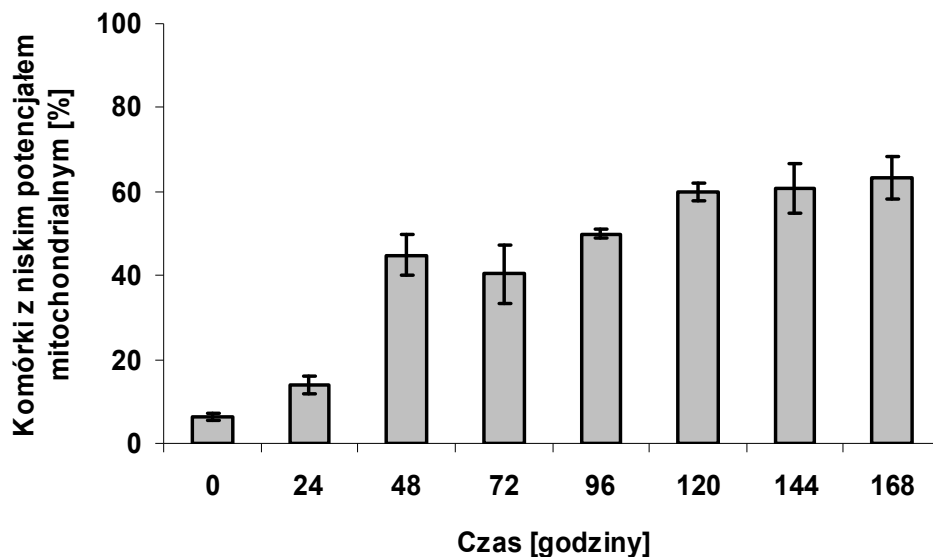
Rys. 39. Odsetek komórek HCT116 p53^{-/-} z obniżonym potencjałem mitochondrialnym $\Delta\Psi_m$, w zależności od czasu inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (EC₅₀: 0.02 μ M). Wyniki przedstawiono w postaci średnich z dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Podobnie jak w przypadku komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, wyniki dwuparametrowej analizy komórek HCT116 p53^{+/+} poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (0.04 μ M) i barwionych JC-1, również wskazały na postępującą wraz z czasem inkubacji depolaryzację mitochondriów. Po 24 godzinach ekspozycji na badany związek, ilość komórek z niskim potencjałem mitochondrialnym wzrosła w porównaniu do komórek kontrolnych i wynosiła ok. 14% (Rys. 40 i 41). Po upływie 48 godzin, populacja komórek z obniżonym $\Delta\Psi_m$ nadal wzrastała (ok. 45%), a następnie utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie do 96 godzin (ok. 50%), po czym ponownie przybywało komórek z uszkodzonymi mitochondriami. Ostatecznie, po 168 godzinach inkubacji z C-1748, frakcja komórek z niskim $\Delta\Psi_m$ wynosiła ok. 63%.

Podsumowując, w komórkach obu linii HCT116 traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 dochodzi do depolaryzacji mitochondriów, co wskazuje na udział tychże organelli w indukcji i przebiegu procesu apoptozy wspomnianych komórek nowotworowych.



Rys. 40. Cytometryczna analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego w komórkach HCT116 p53^{+/+}, zarówno kontrolnych, jak i traktowanych C-1748 (EC₉₀: 0.04 μM). Oś X - intensywność fluorescencji pochodzącej od monomerów JC-1. Oś Y - intensywność fluorescencji pochodzącej od agregatów JC-1. Zaznaczony obszar przedstawia komórki, w których doszło do spadku mitochondrialnego potencjału błonowego. Cytogramy przedstawiają jedno z dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń.



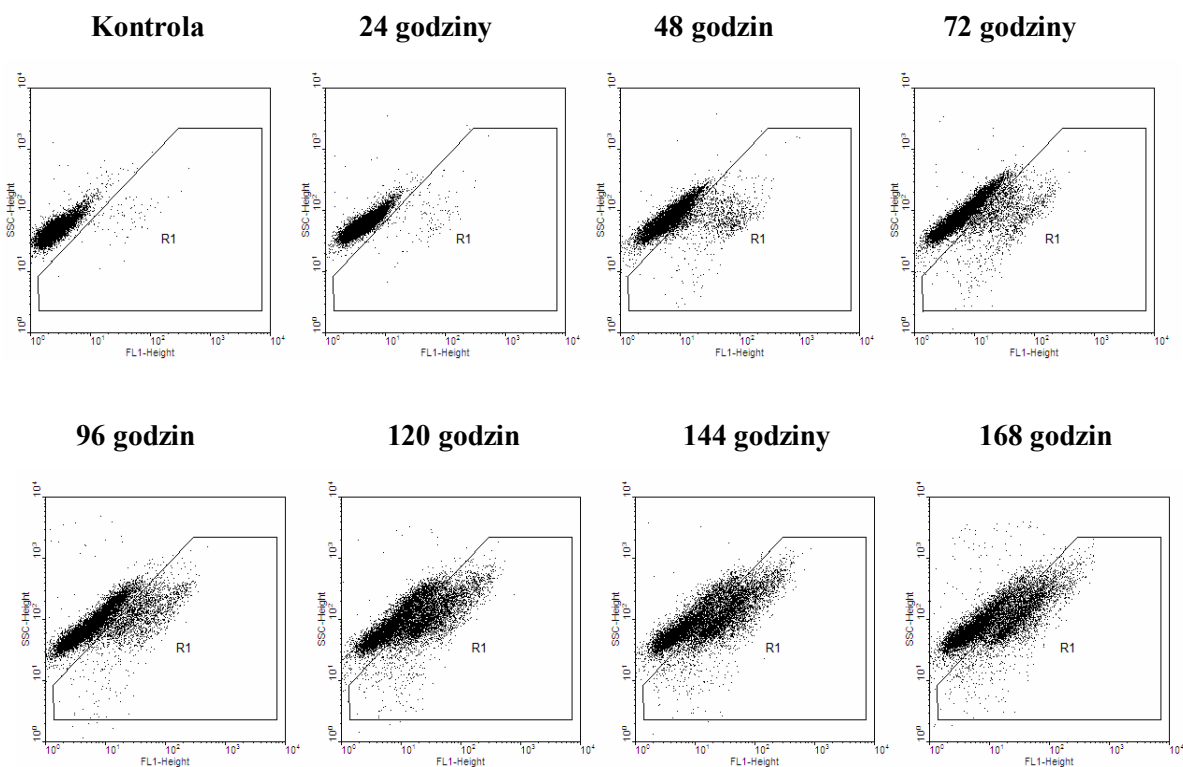
Rys. 41. Odsetek komórek HCT116 p53^{+/+} z obniżonym potencjałem mitochondrialnym $\Delta\Psi_m$, w zależności od czasu inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (EC₉₀: 0.04 μM). Wyniki przedstawiono w postaci średnich z dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

III.2.4.3. Stwierdzenie obecności aktywnej formy kaspazy-3 w komórkach HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+} traktowanych związkiem C-1748.

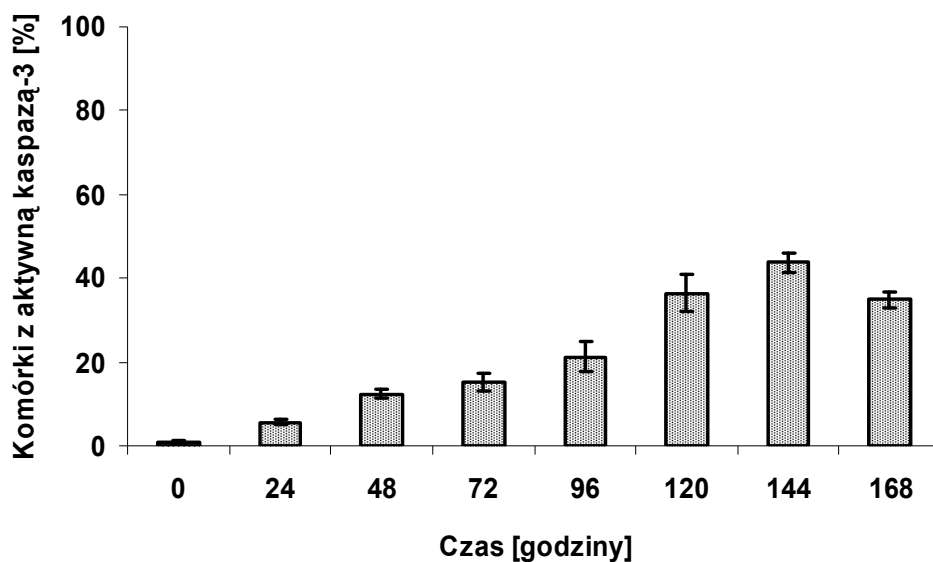
Jak wspomniałam wyżej, spadek potencjału na zewnętrznej błonie mitochondrialnej sprzyja otwieraniu megakanałów mitochondrialnych i uwalnianiu z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej szeregu czynników proapoptotycznych. I tak, na skutek uwolnienia cytochromu c, dochodzi do aktywacji inicjatorowej kaspazy-9, a co za tym idzie proteolitycznej aktywacji szeregu kaspaz wykonawczych. A zatem, można się było spodziewać, iż obniżenie potencjału mitochondrialnego w komórkach obu linii HCT116 inkubowanych z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, będzie prowadziło do uruchomienia kaskady kaspaz.

Jedną z głównych proteaz wykonawczych procesu apoptozy, bezpośrednio aktywowaną przez kaspazę-9, jest kaspaza-3 [Green D. R. i Reed J. C., 1998; Grądzka I., 2000]. Dlatego też, postanowiłam sprawdzić, czy apoptoza komórek HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-} traktowanych związkiem C-1748, przebiegała właśnie z jej udziałem. W tym celu wykorzystałam technikę cytometrii przepływowej oraz przeciwciała rozpoznające aktywną formę kaspazy-3.

Jak pokazano na Rys. 42 i 43, w komórkach HCT116 p53^{-/-} poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀), doszło do aktywacji kaspazy-3. Niewielką frakcję komórek zawierających aktywną kaspazę-3 (ok. 6%) obserwowałam już po upływie 24 godzin inkubacji z badanym związkiem. Co więcej, populacja ta wzrastała w miarę wydłużania czasu ekspozycji, osiągając maksymalną wartość ok. 44% po 144 godzinach. Uzyskane wyniki sugerują, że apoptoza uruchamiana w komórkach HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, w odpowiedzi na działanie związku C-1748, jest procesem zależnym od aktywacji kaspazy-3. Jednocześnie, jak wynika z doniesień literaturowych, komórki ulegające katastrofie mitotycznej, również mogą zawierać aktywne kaspazy, w tym kaspazę-3 [Castedo M. i wsp., 2004a; Castedo M. i wsp., 2004b; Mansilla S. i wsp., 2006]. Dlatego też, należy pamiętać, iż poszczególne frakcje komórek HCT116 p53^{-/-} z aktywną kaspazą-3 mogą obejmować nie tylko komórki apoptotyczne, ale także wielojądrzaste.

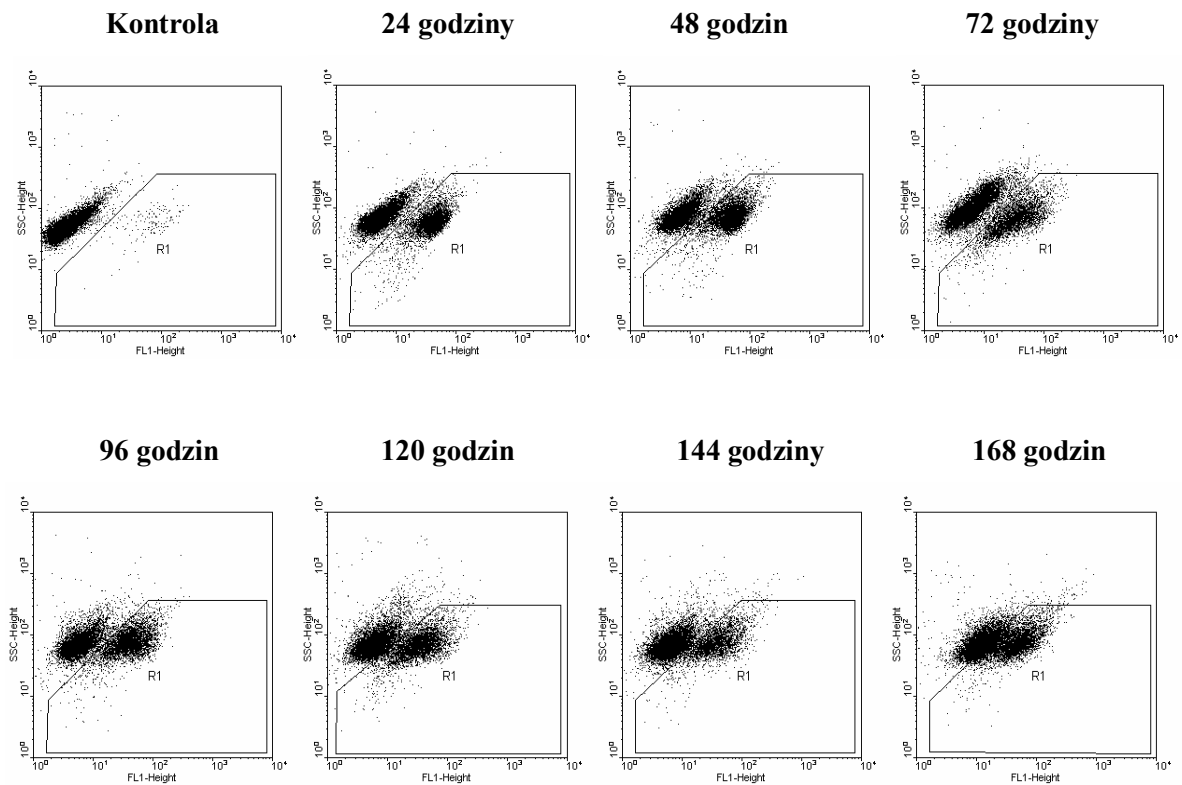


Rys. 42. Cytometryczna analiza obecności aktywnej formy kaspazy-3 w komórkach HCT116 p53^{-/-}, kontrolnych i traktowanych C-1748 (EC₉₀: 0.02 μM). Oś X - fluorescencja pochodząca od fluoresceiny skoniugowanej z przeciwciałem anty-aktywna kaspaza-3. Zaznaczony obszar przedstawia komórki zawierające aktywną kaspazę-3. Cytogram jest reprezentacyjny dla dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń.

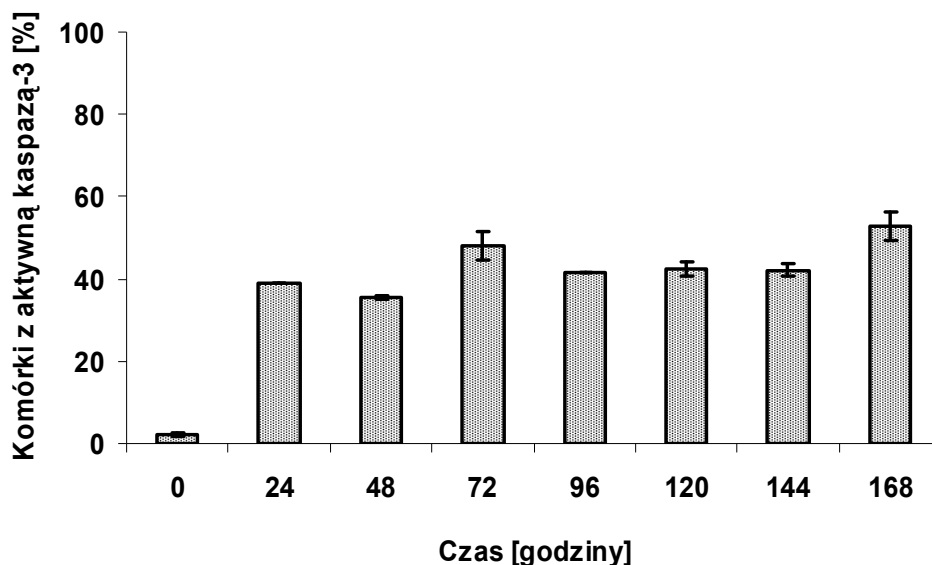


Rys. 43. Odsetek komórek HCT116 p53^{-/-} zawierających aktywną kaspazę-3, w zależności od długości czasu inkubacji ze związkiem C-1748 (EC₉₀: 0.02 μM). Wyniki przedstawiono w postaci średnich z dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Jak pokazano na Rys. 44 i 45, również w komórkach HCT116 p53^{+/+} poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀), doszło do aktywacji kaspazy-3. Jednocześnie, już po 24 godzinach ekspozycji na badany związek, ilość komórek HCT116 p53^{+/+} z aktywną kaspazą-3 była znacznie wyższa niż w przypadku linii nie posiadającej funkcjonalnego białka p53 i wynosiła ok. 39%. Po upływie 72 godzin, populacja komórek zawierających aktywną kaspazę-3 ponownie wzrastała (ok. 48%), a następnie utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie ok. 42% pomiędzy 96 i 144 godziną inkubacji. Ostatecznie, po 168 godzinach ekspozycji na C-1748, frakcja ta wynosiła ok. 53%. A zatem, powyższe obserwacje, łącznie z wynikami dwuparametrowej analizy komórek HCT116 p53^{+/+} poddanych działaniu pochodnej C-1748 i barwionych JC-1 wskazują, iż apoptoza indukowana w tychże komórkach przebiegała nie tylko w sposób związany z uszkodzeniem mitochondriów, ale także w sposób zależny od aktywacji kaspazy-3.



Rys. 44. Cytometryczna analiza obecności aktywnej formy kaspazy-3 w komórkach HCT116 p53^{+/+}, kontrolnych i traktowanych C-1748 (EC₉₀: 0.04 μM). Oś X - fluorescencja pochodząca od fluoresceiny skoniugowanej z przeciwciałem anty-aktywna kaspaza-3. Zaznaczony obszar przedstawia komórki zawierające aktywną kaspazę-3. Cytogram jest reprezentacyjny dla dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń.



Rys. 45. Odsetek komórek HCT116 p53^{+/+} zawierających aktywną kaspazę-3, w zależności od długości czasu inkubacji ze związkem C-1748 (EC₉₀: 0.04 μM). Wyniki przedstawiono w postaci średnich z dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

III.2.5. Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji autofagii w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+}.

Obecnie uważa się, że jednym z rodzajów odpowiedzi komórek nowotworowych na działanie leków lub potencjalnych chemoterapeutyków, w tym uszkodzających DNA, może być uruchomienie autofagii [Kanzawa T. i wsp., 2005; Di X. i wsp., 2009; Pan Y. i wsp., 2011]. Z doniesień literaturowych wynika, iż proces ten jest indukowany w odpowiedzi na radio- lub chemoterapię, między innymi w komórkach ludzkich nowotworów piersi, prostaty, mózgu i jelita grubego [Paglin S. i wsp., 2001; Kondo Y. i wsp., 2005].

Autofagia, zwana też autofagocytą lub programowaną śmiercią typu II, jest znana przede wszystkim jako wewnątrzkomórkowy, zachodzący przy udziale lizosomów, system degradacji składników komórkowych, tj. białek o długim okresie półtrwania, mitochondriów, peroksysomów, fragmentów aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej [Kim J. i Kilonsky D. J., 2000]. Efekt tego procesu jest zawsze ten sam – całkowita i nieodwracalna degradacja wielkocząsteczkowych substratów do ich podstawowych składników, przy udziale enzymów lizosomalnych. Pierwszym etapem autofagii jest powstawanie autofagosomu, będącego wakuolą otoczoną podwójną błoną plazmatyczną. W kolejnym etapie następuje połączenie autofagosomu z lizosomem (powstaje autofagolizosom), w wyniku czego

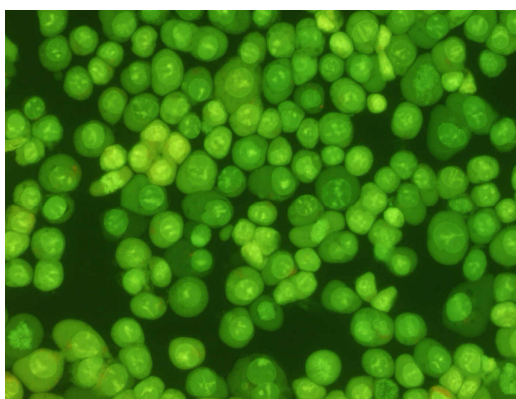
dochodzi do hydrolizy składników zawartych w jego wnętrzu na skutek działania lizosomalnych proteaz [Gozuacik D. i Kimchi A., 2004]. Jednym z markerów procesu autofagii jest białko MAP I LC3 (ang. *Microtubule Associated Protein I Light Chain 3*). Po indukcji autofagii, lekki łańcuch tego białka ulega modyfikacji potranslacyjnej, polegającej na odcięciu jego fragmentu na C-końcu, w wyniku czego powstaje cytosolowa forma LC3-I. Ostatecznie, LC3-I łączy się kowalencyjnie z fosfatydyloetanolaminą, tworząc formę LC3-II, która wiąże się z autofagosomami [Kabeya Y. i wsp., 2004; Rubinsztein D. C. i wsp., 2009]. Molekularny mechanizm autofagii jest stosunkowo skomplikowany i słabo poznany. Stwierdzono jednak, iż na przebieg tego procesu mogą wpływać fosfatazy należące do rodziny MTM, MTMR oraz homologi PTEN, a formowanie i dojrzewanie wakuoli autofagicznych jest związane z funkcją cytoszkieletu oraz aktywnością GTPaz [Lamparska-Przybysz M. i Motyl T., 2005; Yorimitsu T. i Klionsky D. J., 2005]. Co więcej, w powstawanie autofagosomów zaangażowana jest kinaza PI3K (klasa III) i związane z nią białko beklina 1 (ludzki gen *beclin 1* jest genem supresorowym transformacji nowotworowej i ulega on monoallelicznym delecjom w 40-70% nowotworów sutka, jajnika oraz prostaty) [Edinger A. i Thompson C., 2003; Mathew R. i wsp., 2007]. Dowiedziono również, że beklina 1 oddziałuje z antyapoptotycznym białkiem Bcl-2, co wskazuje na powiązania autofagii z apoptozą [Liang X. H. i wsp., 1998; Pattingre S. i wsp., 2005]. Jak wynika z doniesień literaturowych, zapoczątkowanie autofagii może wywoływać bądź opóźniać apoptozę. Badania dowodzą, że rozpad lizosomów (ang. *lysosomal rupture*) prowadzi do apoptozy [Yuan X.-M. i wsp., 2002], natomiast apoptoza zachodząca po uszkodzeniu lizosomów jest poprzedzana autofagią [Lockshin R. A. i Zakeri Z., 2004]. Inne badania zaś wskazują, iż oba te procesy przebiegają zupełnie niezależnie od siebie, a dominacja jednego z nich zależy od rodzaju stosowanej terapii. I tak, komórki ludzkiego raka piersi MCF-7 poddane działaniu TNF- α lub TRAIL, ulegają przede wszystkim apoptozie. Z kolei zastosowanie tamoksifenu, czy analogów taksolu, prowadzi do uruchomienia autofagii w tychże komórkach [Lamparska-Przybysz M. i Motyl T., 2005]. Alternatywność autofagii w stosunku do apoptozy może leżeć u podstaw zwiększenia skuteczności terapii onkologicznej, ponieważ w komórkach opornych na indukcję apoptozy, autofagia może kompensować jej deficyt [Tsujimoto Y. i Shimizu S., 2005]. Należy jednak pamiętać, iż w określonych sytuacjach autofagia sprzyja przeżyciu komórek nowotworowych. Szereg dowodów wskazuje na ochronną rolę tego procesu, utrzymującego przy życiu między innymi komórki nowotworowe narażone na stres metaboliczny w warunkach *in vitro*, czy

niedotlenienie w warunkach *in vivo* [Lum J. J. i wsp., 2005; Degenhardt K. i wsp., 2006; Sato K. i wsp., 2007].

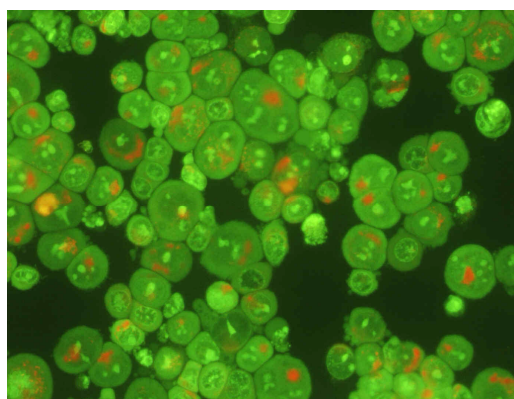
Rezultaty przeprowadzonych przeze mnie dotychczas badań wykazały, że w komórkach HCT116 posiadających funkcjonalne białko p53, pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 indukuje głównie apoptozę. Natomiast, w przypadku linii z niefunkcjonalnym p53, uruchamiana przez ten związek apoptoza i katastrofa mitotyczna przebiegały w ograniczonym stopniu. Jednocześnie, wspomniana pochodna nie była wcześniej badana pod kątem możliwości indukcji autofagii w komórkach nowotworowych. Dlatego też, w kolejnym etapie swojej pracy postanowiłam zbadać zdolność związku C-1748 do uruchomienia tego procesu w komórkach obu linii HCT116 w zależności od statusu p53 i ewentualnie określić jego charakter, jako narzędzia przetrwania lub śmierci komórek ludzkich raków jelita grubego.

Zdolność pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji autofagii określiłam pierwotnie w oparciu o obserwację zmian w ilości kwaśnych organelli pęcherzykowych (ang. *AVO – Acidic Vesicular Organelle*) w komórkach obu linii HCT116, eksponowanych na działanie związku w stężeniach odpowiadających wartościom EC_{90} . W tym celu wykorzystałam metodę barwienia tychże organelli za pomocą oranżu akrydyny oraz technikę mikroskopii fluorescencyjnej. Oranż akrydyny, w formie nie posiadającej ładunku elektrycznego, łatwo przenika przez błony biologiczne. Następnie jest on akumulowany w kwaśnych organellach (w wyniku jego protonowania), gdzie tworzy agregaty, które emitują światło w zakresie fluorescencji czerwonej. Przyrost w ilości kwaśnych organelli (a tym samym czerwonej fluorescencji), w stosunku do komórek nie traktowanych badanym związkiem, może świadczyć o indukcji procesu autofagii [Paglin S. i wsp., 2001; Kanzawa T. i wsp., 2004].

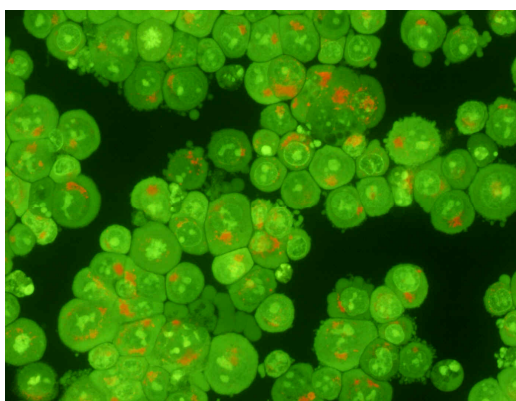
HCT116 p53^{-/-}



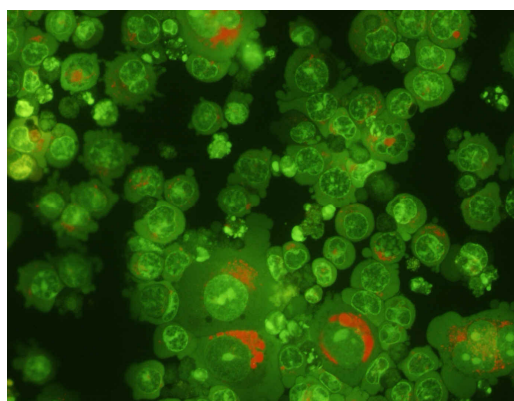
Kontrola



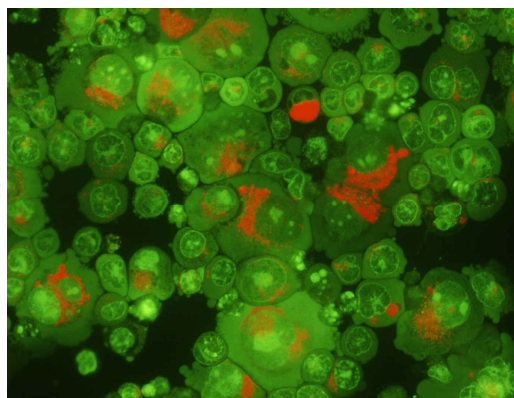
24 godziny



48 godzin



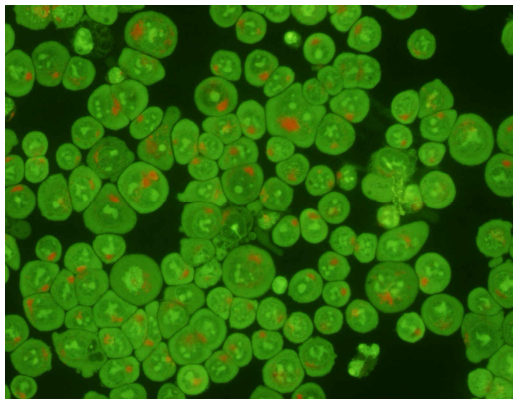
72 godziny



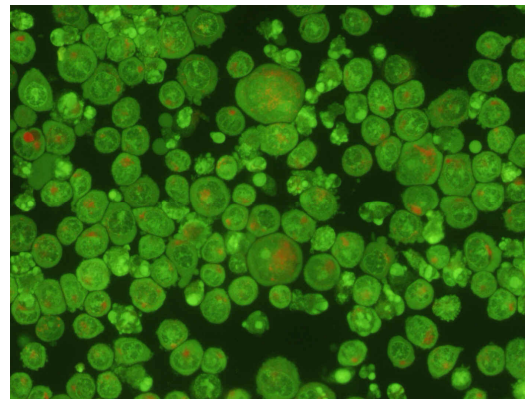
96 godzin

Rys. 46. Ocena zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach HCT116 p53^{-/-}, kontrolnych i traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC₉₀ (0.02 μM), a następnie barwionych oranżem akrydyny.

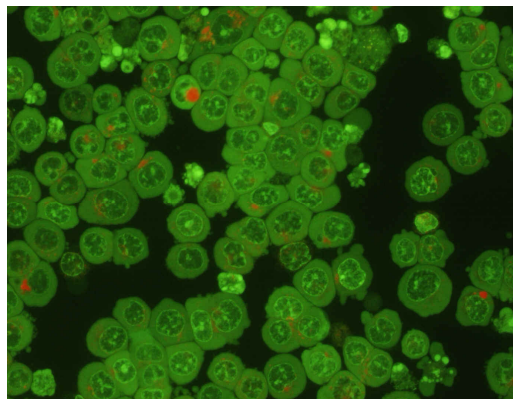
HCT116 p53^{+/+}



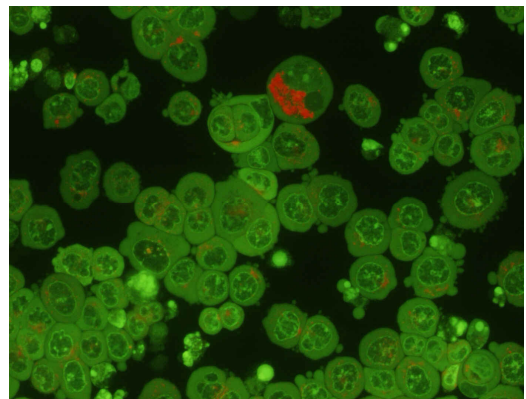
Kontrola



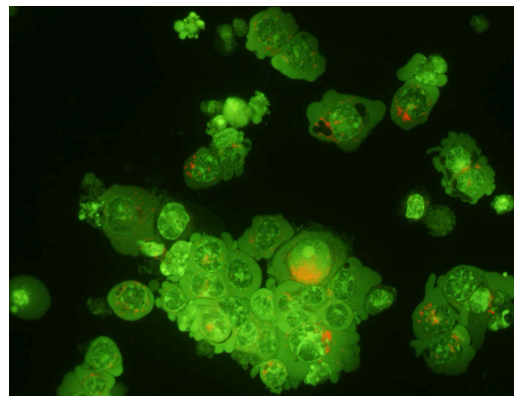
24 godziny



48 godzin



72 godziny



96 godzin

Rys. 47. Ocena zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach HCT116 p53^{+/+}, kontrolnych i traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC₉₀ (0.04 μM), a następnie barwionych oranżem akrydyny.

Jak pokazuje Rys. 46, w komórkach HCT116 p53^{-/-} poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (0.02 μM), zauważalny przyrost w ilości kwaśnych organelli, w porównaniu do komórek kontrolnych, obserwowano już po upływie 24 godzin

inkubacji. Świadczył o tym wzrost intensywności czerwonej fluorescencji, pochodzącej od oranżu akrydyny, który jak już wspomniano jest akumulowany w kwaśnych organellach. W miarę wydłużania czasu ekspozycji na badany związek, ilość kwaśnych organelli w komórkach HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, nadal nieznacznie rosła. Po 96 godzinach inkubacji, obserwowano wyraźne zwiększenie rozmiarów komórek HCT116 p53^{-/-} wykazujących intensywną, czerwoną fluorescencję, co łącznie wskazywało na indukcję procesu autofagii w tychże komórkach.

W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC₉₀ (0.04 μM), a następnie barwionych oranżem akrydyny, analiza mikroskopowa wskazała na brak wyraźnego wzrostu liczby kwaśnych organelli w odniesieniu do komórek kontrolnych. Świadczył o tym fakt, iż w miarę wydłużania czasu ekspozycji na badany związek, intensywność czerwonej fluorescencji pochodzącej od oranżu akrydyny akumulowanego w kwaśnych organellach, utrzymywała się na stałym, niskim poziomie. Wynik ten wskazuje na brak indukcji autofagii w komórkach HCT116 p53^{+/+} poddanych działaniu związku C-1748 (Rys. 47).

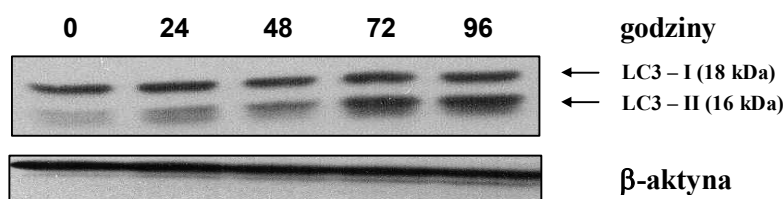
Mikroskopowa ocena komórek obu linii HCT116 traktowanych związkiem C-1748, a następnie barwionych oranżem akrydyny, wskazała na możliwość indukcji autofagii jedynie w komórkach nie posiadających funkcjonalnego białka p53. Jak wynika z doniesień literaturowych, udział p53 w uruchomieniu i przebiegu autofagii nie jest dokładnie poznany. Wyniki szeregu badań wskazują jednak na możliwość uruchomienia tego procesu zarówno w komórkach posiadających zmutowane białko p53, jak również w komórkach nie posiadających tego białka wogóle [Arthur C. R. i wsp., 2007; Di X. i wsp., 2009].

W celu potwierdzenia uzyskanych wyników, dodatkowo przeprowadziłam test biochemiczny, polegający na oznaczeniu poziomu białka MAP I LC3 (ang. *Microtubule Associated Protein I Light Chain*), będącego jednym z podstawowych markerów autofagii. Jak już wspomniano, po indukcji tego procesu, białko LC3 ulega modyfikacji potranslacyjnej, w wyniku której powstaje cytosolowa forma LC3-I, a ta po związaniu się fosfatydyloetanolaminą tworzy formę LC3-II, występującą na autofagosomach oraz błonach izolujących [Kabeya Y. i wsp., 2004; Rubinsztein D. C. i wsp., 2009]. A zatem, ilość białka LC3-II jest bezpośrednio skorelowana z liczbą autofagosomów. Należy jednak pamiętać, iż w wyniku połączenia autofagosomu z lizosomem, białko LC3-II występujące wewnątrz autofagolizosomu, ulega degradacji na skutek działania lizosomalnych proteaz. Dlatego też, poziom tego białka, określane przy użyciu techniki Western blotting, często jest zaniżony. Zastosowanie inhibitorów proteaz lizosomalnych, takich jak związek o symbolu E64d oraz

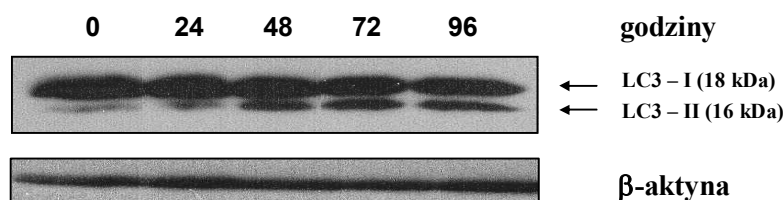
pepstatyna A, w dużym stopniu zapobiega degradacji białka LC3-II, natomiast nie wpływa w istotny sposób na poziom białka LC3-I [Mizushima N., 2004; Tanida I. i wsp., 2005]. Jak wynika z doniesień literaturowych, uruchomienie procesu autofagii niejednokrotnie stwierdzano na podstawie wzrostu stosunku LC3-II/LC3-I lub LC3-II/(LC3-I + LC3-II). Obecnie uważa się, że bardziej adekwatne jest porównywanie poziomu białka LC3-II pomiędzy poszczególnymi próbkami [Mizushima N. i Yoshimori T., 2007].

Obserwacje poziomu zarówno białka LC3-I, jak i LC3-II, w komórkach HCT116 p53^{+/+} i p53^{-/-} poddanych działaniu związku C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC₉₀), przeprowadziłam przy użyciu przeciwciała rozpoznającego obie wymienione formy białka LC3 oraz techniki Western blotting [Mizushima N., 2004; Klionsky D. J. i wsp., 2007; Mizushima N. i Yoshimori T., 2007].

HCT116 p53^{-/-}



HCT116 p53^{+/+}



Rys. 48. Poziom białek LC3-I i LC3-II w komórkach HCT116 p53^{-/-} oraz p53^{+/+}, kontrolnych i traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC₉₀), przez podaną liczbę godzin. Wynik przedstawia jedną z dwóch niezależnych analiz Western blotting. Jako kontrolę równomiernego napełnienia studzienek zastosowano β-aktynę.

Jak pokazano na Rys. 48, w przypadku komórek HCT116 p53^{-/-} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, ilość białka LC3-I, w porównaniu do komórek kontrolnych, utrzymywała się na stałym poziomie w miarę wydłużania czasu inkubacji. Jednocześnie, po upływie 24 i 48 godzin ekspozycji na badany związek, nieznacznie przybywało białka LC3-II. Wyraźny wzrost poziomu tego białka obserwowano po 72 i 96

godzinach inkubacji. Uzyskany wynik jest nieco zaskakujący ze względu na fakt, iż zwiększeniu ilości białka LC3-II nie towarzyszył spadek poziomu białka LC3-I, co jednoznacznie wskazywałoby na indukcję autofagii. Jednakże, przyrost poziomu białka LC3-II pozostaje w zgodzie z obserwowanym wcześniej wzrostem liczby kwaśnych organelli w komórkach HCT116 p53^{-/-} poddanych działaniu C-1748. A zatem, można przyjąć, iż w komórkach HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, dochodzi do uruchomienia procesu autofagii pod wpływem badanego związku.

W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+} traktowanych C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀), poziom białka LC3-I, w odniesieniu do komórek kontrolnych, nie ulegał istotnym zmianom w miarę wydłużania czasu inkubacji, natomiast ilość białka LC3-II wzrastała po upływie 24 i 48 godzin ekspozycji na badany związek, po czym utrzymywała się na stałym poziomie (Rys. 48). Wzrost w ilości białka LC3-II w ciągu pierwszych 48 godzin inkubacji komórek HCT116 p53^{+/+} z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 mógłby wskazywać na indukcję procesu autofagii w tychże komórkach. Zaskakujące jest jednak, iż w miarę wydłużania czasu ekspozycji wspomnianych komórek nowotworowych na działanie badanego związku, poziom białek LC3-I i LC3-II pozostawał bez zmian, podczas gdy skutkiem zachodzenia procesu autofagii jest degradacja obu form białka LC3 [Mizushima N. i Yoshimori T., 2007]. Obserwacja ta, w połączeniu z brakiem przyrostu liczby kwaśnych organelli w komórkach HCT116 p53^{+/+} poddanych działaniu C-1748, może świadczyć o „zatrzymaniu” procesu autofagii na etapie tworzenia autofagosomów [Mizushima N. i Yoshimori T., 2007; Rubinsztein D. C. i wsp., 2009]. Fakt powstawania autofagosomów wyjaśniałby obserwowane zwiększenie poziomu białka LC3-II po krótkich czasach inkubacji z badanym związkiem, natomiast brak degradacji obu form białka LC3 w miarę wydłużania czasu ekspozycji oraz brak przyrostu liczby kwaśnych organelli wynikałyby z niemożności utworzenia autofagolizosomów, na skutek zahamowania fuzji pomiędzy autofagosomami i lizosomami. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak przeprowadzenia dodatkowych badań.

Choć autofagia może stanowić skuteczne narzędzie eliminacji komórek nowotworowych [Kanzawa T. i wsp., 2004; Park K.-J. i wsp., 2007], to jednak proces ten niejednokrotnie sprzyja przeżyciu tychże komórek. Dowiedziono bowiem, że uruchomienie autofagii może zapobiegać śmierci komórek na drodze apoptozy, bądź opóźniać indukcję tego procesu, co obserwowano między innymi w przypadku komórek ludzkiego raka piersi MCF-7 eksponowanych na działanie kamptotecyny [Abedin M. J. i wsp., 2007]. Jest to najprawdopodobniej związane z faktem, iż zachodząca na skutek uruchomienia autofagii

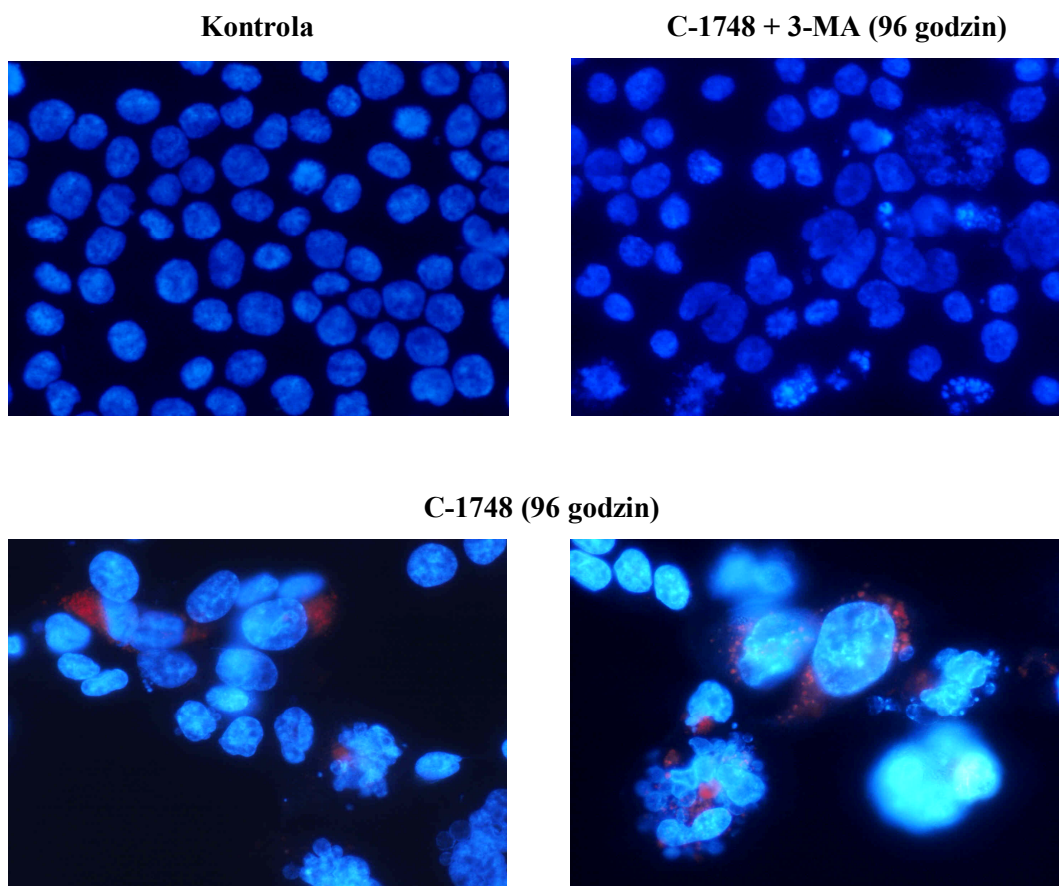
selektywna sekwestracja mitochondriów w odpowiedzi na czynnik apoptogenny, chroni komórki przed uwalnianiem czynników proapoptotycznych, takich jak cytochrom c, AIF, Smac/DIABLO lub Omi/Htr2 [Gozuacik D. i Kimchi A., 2004; Codogno P. i Mejer A. J., 2005]. Stwierdzono także, iż zachodzenie autofagii w komórkach glejaka U251 (nie posiadających funkcjonalnego białka p53) poddanych działaniu temozolomidu, chroniło je przed śmiercią na drodze katastrofy mitotycznej, natomiast zahamowanie tego procesu prowadziło do zwiększenia liczby komórek wielojądrzastych [Katayama M. i wsp., 2007].

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania oraz fakt, iż pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 indukuje autofagię w komórkach ludzkiego raka jelita grubego HCT116 p53^{-/-}, postanowiłam sprawdzić, czy zahamowanie tego procesu doprowadzi do zwiększenia liczby wspomnianych komórek nowotworowych, umierających na drodze apoptozy. W celu zahamowania autofagii wykorzystałam 3-metyloadeninę (3-MA) - powszechnie stosowany inhibitor tego procesu, który zapobiega tworzeniu autofagosomów poprzez hamowanie aktywności kinazy PI3K (klasy III) [Kanzawa T. i wsp., 2004; Debnath J. i wsp., 2005; Kondo Y. i wsp., 2005].

Komórki HCT116 p53^{-/-} poddawałam godzinnej preinkubacji z 3-metyloadeniną (0.125 µM), po czym traktowałam je związkiem C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC₉₀ (0.02 µM). Odsetek komórek nowotworowych ulegających apoptozie określiłam na podstawie analizy zmian w budowie ich błony cytoplazmatycznej, wykorzystując w tym celu podwójne barwienie aneksyną V (skoniugowaną z fluoresceiną) i jodkiem propidyny oraz technikę cytometrii przepływowej. Skuteczność 3-metyloadeniny w hamowaniu autofagii określiłam na podstawie zmian w ilości zawierających kwaśne organelle komórek HCT116 p53^{-/-} eksponowanych na działanie C-1748 zarówno w obecności, jak i przy braku tego inhibitora, a następnie poddanych podwójnemu barwieniu fluorochromem DAPI (barwi chromatynę jądra komórkowego) oraz barwnikiem LysoTracker Red DND-99 (barwi lizosomy) [Park K.-J. i wsp., 2007].

Jak pokazano poniżej na Rys. 49, w komórkach HCT116 p53^{-/-} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀), dochodziło do wzrostu liczby kwaśnych organelli (w porównaniu do komórek kontrolnych nie poddanych działaniu badanego związku oraz 3-MA), o czym świadczył wzrost intensywności czerwonej fluorescencji pochodzącej od barwnika LysoTracker Red DND-99, który podobnie jak oranż akrydyny jest akumulowany w kwaśnych organelach. Sugeruje to indukcję procesu autofagii w tychże komórkach, co stanowi potwierdzenie wcześniejszych wyników, uzyskanych na podstawie obserwacji morfologicznych wspomnianych komórek

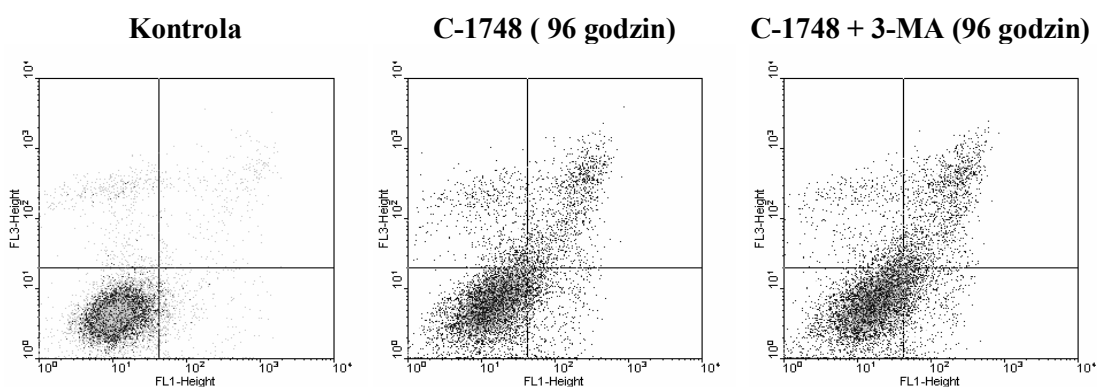
ludzkiego raka jelita grubego barwionych oranżem akrydyny oraz oznaczenia poziomu białek LC3-I i LC3-II (Rys. 46 i 48). Po równoczesnym zastosowaniu 3-metyloadeniny ($0.125 \mu\text{M}$), intensywność czerwonej fluorescencji wyraźnie zmalała w odniesieniu do komórek HCT116 $p53^{-/-}$ poddanych działaniu wyłącznie C-1748, co wskazuje na zahamowanie tworzenia kwaśnych organelli, a tym samym procesu autofagii w tychże komórkach.



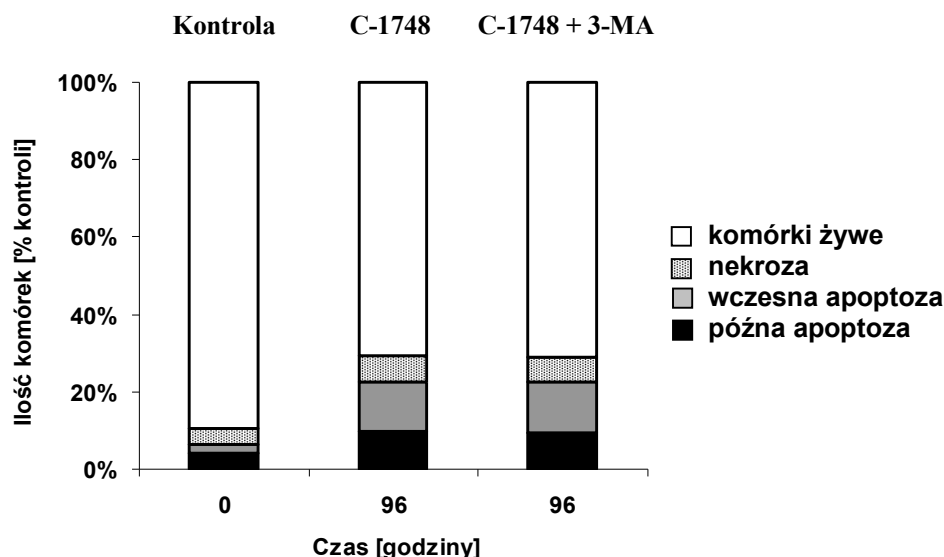
Rys. 49. Komórki HCT116 $p53^{-/-}$ traktowane pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} ($0.02 \mu\text{M}$), w obecności lub przy braku 3-metyloadeniny ($0.125 \mu\text{M}$), a następnie barwione jednocześnie DAPI i barwnikiem LysoTrackerRed DND-99. Kontrola: komórki HCT116 $p53^{-/-}$ nie poddane działaniu badanego związku oraz 3-MA; C-1748 + 3-MA (96 godzin): komórki HCT116 $p53^{-/-}$ traktowane zarówno badanym związkiem, jak i 3-MA przez okres 96 godzin; C-1748 (96 godzin): komórki HCT116 $p53^{-/-}$ traktowane wyłącznie badanym związkiem przez okres 96 godzin.

Cytometryczna analiza zmian, zachodzących w błonie plazmatycznej komórek HCT116 $p53^{-/-}$ traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 ($0.02 \mu\text{M}$), wskazała na pojawienie się, po 96 godzinach inkubacji, niewielkiej frakcji komórek (ok. 7%) wybarwionych jedynie jodkiem propidyny (aneksyna V-/PI+) (Rys. 50). W tym samym czasie, liczba komórek wczesno- (aneksyna V+/PI-) oraz późnoapoptotycznych

(aneksyna V+/PI+) osiągały wartości odpowiednio ok. 11% i 14%. Jednocześnie, wyniki uzyskane dla komórek traktowanych zarówno C-1748, jak i 3-metyloadeniną, prezentowały się następująco: komórki wybarwione jedynie jodkiem propidyny (aneksyna V-/PI+) – ok. 6%, komórki wczesnoapoptotyczne – ok. 10% i komórki późnoapoptotyczne – ok. 14% (Rys. 50). A zatem, uzyskane wyniki dowodzą, iż zastosowanie inhibitora autofagii w postaci 3-metyloadeniny nie spowodowało wzrostu liczby komórek apoptotycznych. Ponadto, nie wpłynęło to również na wzrost w ilości komórek ulegających katastrofie mitotycznej. Należy bowiem pamiętać, iż w przypadku komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, w skład całkowitej populacji komórek uznawanych w opisywanym teście za apoptotyczne, wchodzi także komórki ulegające katastrofie mitotycznej (komórki umierające na drodze tego procesu, mogą barwić się zarówno aneksyną V-FITC, jak i jodkiem propidyny [Eom Y. W. i wsp., 2005; Park S. S. i wsp., 2005]). W zasadzie, wyniki uzyskane dla komórek HCT116 p53^{-/-} poddanych działaniu C-1748 w obecności 3-MA, w żaden sposób nie odbiegały od wyników uzyskanych dla tychże komórek traktowanych wyłącznie badaną pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny. W związku z powyższym, można sądzić, iż w tym przypadku autofagia nie spełnia funkcji ochronnej.



Rys. 50. Cytometryczna analiza zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT116 p53^{-/-}, zarówno kontrolnych jak i traktowanych C-1748 (EC₉₀: 0.02 μM) w obecności i przy braku 3-metyloadeniny (0.125 μM). Oś X – fluorescencja emitowana przez fluoresceinę skoniugowaną z aneksyną V. Oś Y – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny. Lewy, dolny kwadrant: komórki żywe (aneksyna V-/PI-); prawy, dolny kwadrant: komórki wczesnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI-); prawy, górny kwadrant: komórki późnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI+); lewy, górny kwadrant: komórki nekrotyczne (aneksyna V-/PI+). Kontrola: komórki HCT116 p53^{-/-} nie poddane działaniu badanego związku oraz 3-MA; C-1748 + 3-MA (96 godzin): komórki HCT116 p53^{-/-} traktowane zarówno badanym związkiem, jak i 3-MA przez okres 96 godzin; C-1748 (96 godzin): komórki HCT116 p53^{-/-} traktowane wyłącznie badanym związkiem przez okres 96 godzin.



Rys. 51. Procentowy udział komórek żywych, nekrotycznych, wczesno- i późnoapoptotycznych, w odniesieniu do całkowitej populacji komórek HCT116 p53^{-/-} poddanych inkubacji ze związkiem C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC₉₀ (0.02 µM), przez 96 godzin, w obecności lub przy braku 3-metyloadeniny (0.125 µM), określony w oparciu o wyniki prezentowane na Rys. 50. Wykres przedstawia wyniki reprezentacyjne dla dwóch niezależnych doświadczeń, w których otrzymano podobne wyniki.

III.2.6. Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do uruchomienia procesu przyspieszonego starzenia komórek ludzkich raków jelita grubego HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+}.

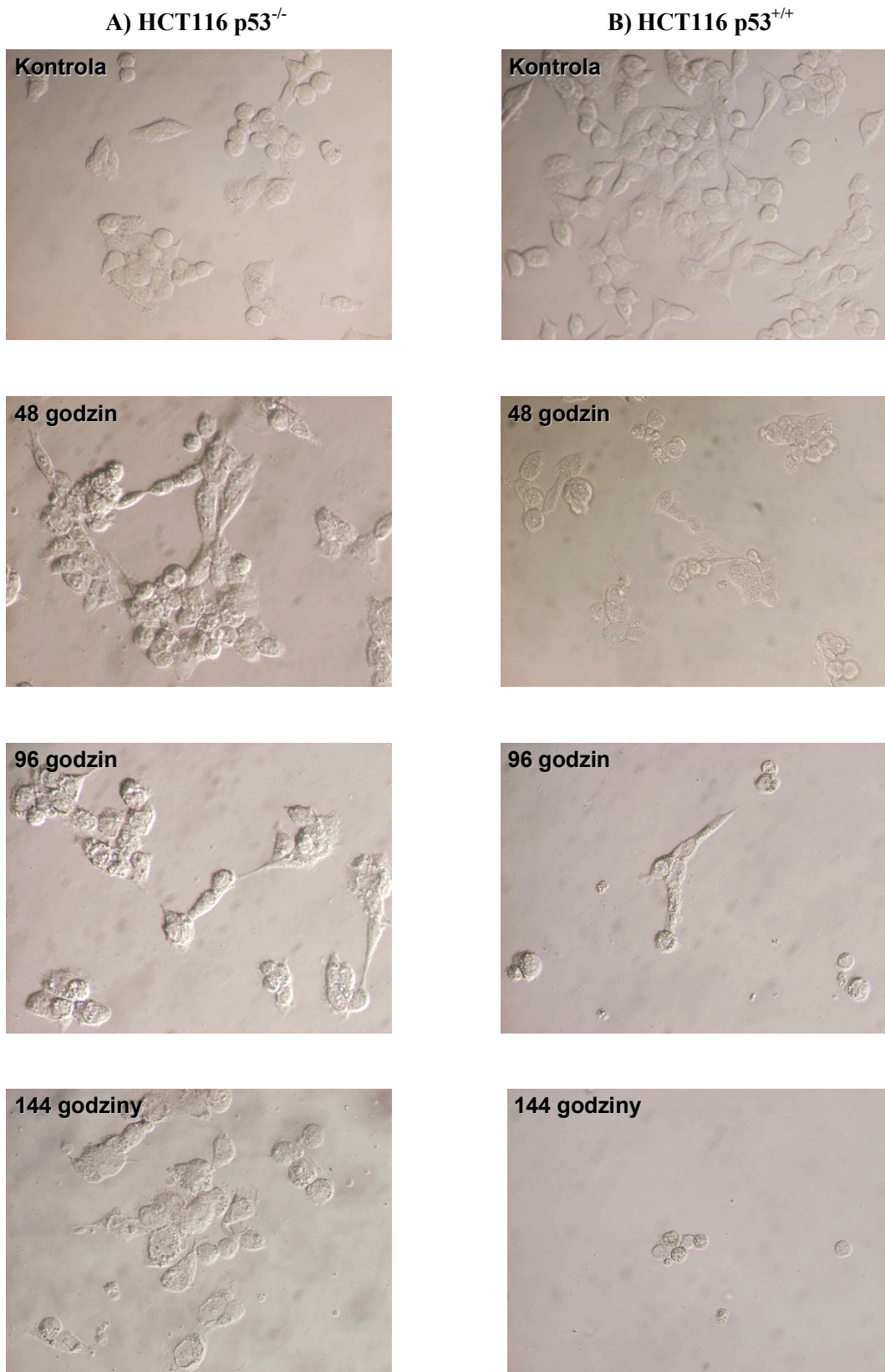
Jak wynika z doniesień literaturowych, w odpowiedzi na działanie związków uszkadzających DNA, komórki nowotworowe mogą ulegać procesowi określanemu jako przedwczesne lub przyspieszone starzenie (ang. *premature or accelerated senescence*), któremu towarzyszy nieodwracalne zahamowanie proliferacji, a także fenotypowe cechy starzenia replikacyjnego [Campisi J., 2001; Dimri G. P., 2005], choć proces ten, w przeciwieństwie do starzenia replikacyjnego, nie jest związany ze zmianami w długości odcinków telomerowych [Itahana K. i wsp., 2001; Hwang E. S., 2002]. Komórki starzejące się, zatrzymane w fazie G1 lub G2 cyklu życiowego (w zależności od statusu białka p53) [Schmitt C. A. i wsp., 2002], pozostają żywe i metabolicznie aktywne, aczkolwiek nie są one zdolne do proliferacji [Roninson I. B. i wsp., 2001].

Starzejące się komórki prezentują szereg charakterystycznych cech morfologicznych, do których zaliczamy powiększony rozmiar, zwiększoną ziarnistość i bardziej płaski kształt w porównaniu do komórek nie ulegających temu procesowi [Campisi J., 2001]. Jednocześnie, głównym, biochemicznym markerem procesu starzenia jest podwyższona ekspresja kwaśnej SA-β-galaktozydazy (SA-β-gal ang. *senescence-associated β-galactosidase*), której

obecność w komórkach wykrywa się na drodze barwienia histochemicznego z użyciem substratu 5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktopyranozydu (X-Gal) [Roninson I., 2003]. SA- β -galaktozydaza, w środowisku kwaśnym (pH 6.0), katalizuje reakcję hydrolizy bezbarwnego X-Gal, na skutek czego komórki starzejące się uzyskują charakterystyczne, niebieskie zabarwienie [Dimri G. P. i wsp., 1995].

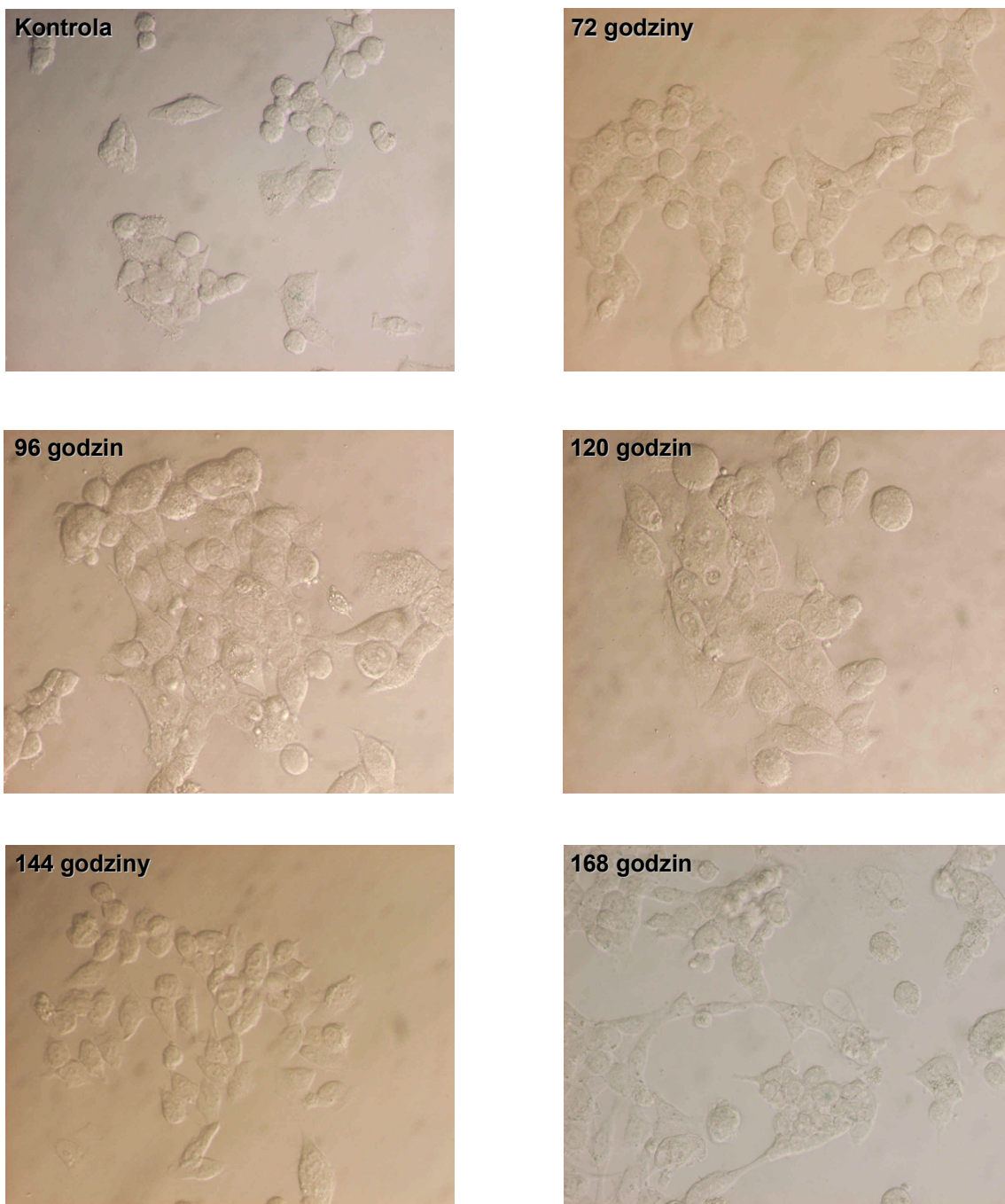
Dawka leku potrzebna do zainicjowania starzenia komórkowego jest często znacznie niższa niż dawka wymagana do indukcji śmierci komórkowej [Eom Y.-W. i wsp., 2005; Mansilla S. i wsp., 2006]. Dowiedziono między innymi, iż komórki HCT116 poddane działaniu wysokich stężeń kamptotecyny ulegają przede wszystkim apoptozie, podczas gdy zastosowanie niskich dawek tego chemoterapeutyku sprzyja uruchomieniu procesu starzenia tychże komórek, na drodze zależnej od białek p53 i p21 [Han Z. i wsp., 2002]. W związku z powyższym, postanowiłam sprawdzić, czy komórki obu linii HCT116 eksponowane na działanie związku C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC_{90} i EC_{50} , będą ulegały procesowi starzenia.

Połączona ocena morfologiczna i histochemiczna komórek obu linii HCT116 poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC_{90} , wskazała na brak indukcji procesu starzenia tychże komórek (Rys. 52). Co więcej, komórki HCT116 p53^{-/-} traktowane badanym związkiem w stężeniu EC_{50} (0,002 μ M), również nie ulegały starzeniu, o czym świadczył brak zarówno charakterystycznych dla tego procesu zmian w ich morfologii, jak i aktywności enzymu SA- β -galaktozydazy w tychże komórkach (Rys. 53). W przypadku linii HCT116 posiadającej funkcjonalne białko p53, obniżenie stężenia C-1748 do wartości EC_{50} (0.001 μ M) doprowadziło do uruchomienia procesu przyspieszonego starzenia wspomnianych komórek nowotworowych. Pierwsze komórki HCT116 p53^{+/+}, wyraźnie wybarwione na kolor niebieski, pojawiły się po upływie 120 godzin inkubacji z badanym związkiem (Rys. 54). Jednocześnie, komórki te były powiększone i prezentowały bardziej płaski kształt w porównaniu do komórek kontrolnych. W miarę wydłużania czasu inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 przybywało komórek posiadających charakterystyczne, niebieskie zabarwienie. Ponadto, intensywność tego zabarwienia wzrastała przy dłuższych czasach ekspozycji, co świadczyło o wzroście aktywności SA- β -galaktozydazy i przedwczesnym starzeniu komórek HCT116 p53^{+/+}.



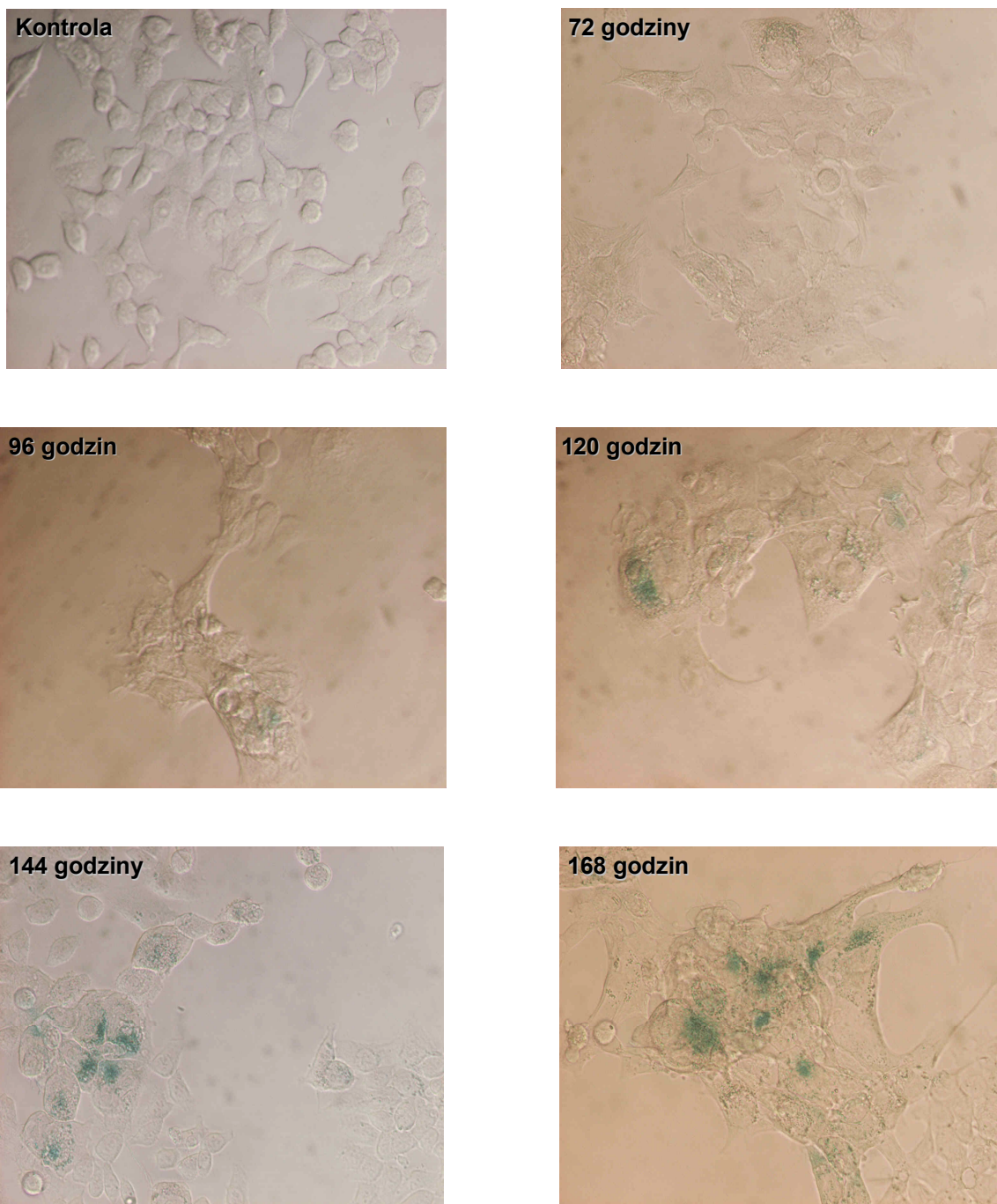
Rys. 52. Morfologia komórek A) HCT116 p53^{-/-} i B) HCT116 p53^{+/+} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC₉₀, a następnie barwionych X-Gal.

HCT116 p53^{-/-}



Rys. 53. Morfologia komórek HCT116 p53^{-/-} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC₅₀ (0.002 μM), a następnie barwionych X-Gal.

HCT116 p53^{+/+}



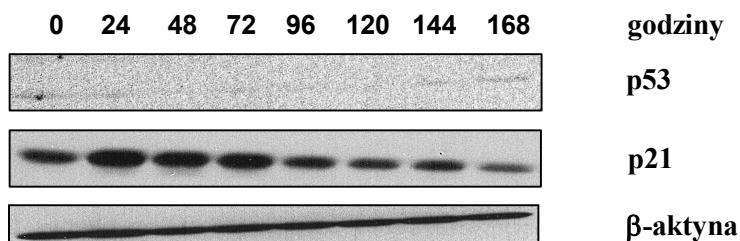
Rys. 54. Morfologia komórek HCT116 p53^{+/+} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC₅₀ (0.001 μM), a następnie barwionych X-Gal. Charakterystyczne niebieskie zabarwienie cechuje komórki ulegające starzeniu.

Opisane powyżej wyniki badań sugerują, iż białko p53 odgrywa istotną rolę w uruchomieniu procesu starzenia komórek HCT116 traktowanych związkiem C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC_{50} . Starzeniu ulegają bowiem jedynie komórki HCT116 posiadające funkcjonalne białko p53. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z danymi literaturowymi, które wskazują na kluczową funkcję tego białka w indukcji procesu starzenia [Itahana K. i wsp., 2001; Dimri G. P., 2005]. Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach nowotworowych różniących się statusem p53 dowiodły, że doksorubicyna i cisplatyna prowadzą do trwałego zahamowania proliferacji i wzrostu aktywności SA- β -galaktozydazy przede wszystkim w komórkach posiadających funkcjonalne białko p53 [Chang B. D. i wsp., 1999a]. Udowodniono bowiem, iż w komórkach posiadających niezmutowany gen *p53*, na skutek uszkodzenia DNA, dochodzi do nadekspresji białka p53, którego ufosforylowana postać aktywuje transkrypcję genu *p21*. Produkt białkowy genu *p21* jest inhibitorem cyklino-zależnych kinaz, takich jak CDK2 oraz CDK1. Zahamowanie aktywności wspomnianych kinaz prowadzi ostatecznie do zatrzymania progresji komórek odpowiednio w fazie G1 lub G2 cyklu życiowego, co jest niezbędne dla uruchomienia procesu starzenia [Kawabe T., 2004; Dimri G. P., 2005]. Jednocześnie dowiedziono, że w komórkach ulegających przedwczesnemu starzeniu, wzrost poziomu zarówno białka p53, jak i p21, jest przejściowy (w porównaniu z białkiem p53, podwyższony poziom białka p21 utrzymuje się znacznie dłużej) [Itahana K. i wsp., 2001]. W związku z powyższym, niektórzy badacze sugerują, że o ile oba wymienione białka mogą odgrywać istotną rolę w indukcji procesu starzenia, o tyle za utrzymanie komórek w stanie zahamowanej proliferacji odpowiedzialne jest białko p16 [Itahana K. i wsp., 2001; Hwang E. S., 2002]. Co więcej, choć białka p53 oraz p21 uważane są za pozytywne regulatory starzenia komórkowego, to jednak szereg doniesień literaturowych wskazuje, iż nie są one niezbędne do indukcji tego procesu [Chang B. D. i wsp., 1999b]. Podobnie, chociaż szereg dowodów wskazuje na podstawową rolę białka p16 w mechanizmie molekularnym procesu starzenia, to jednak inaktywacja tego białka w komórkach nowotworowych wcale nie oznacza, że nie będą one ulegały starzeniu, co udowodniono między innymi w przypadku komórek ludzkiego raka jelita grubego HCT116 posiadających zmetylowany promotor genu kodującego białko p16 [Roninson I. B. i wsp., 2001].

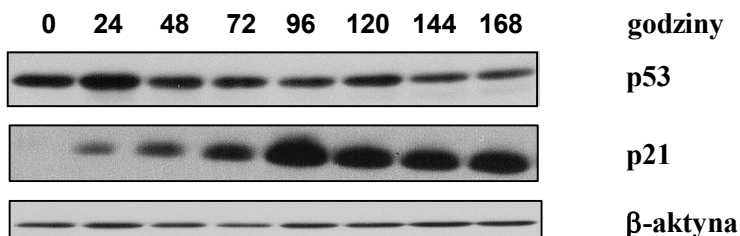
Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, w kolejnym etapie prowadzonych przeze mnie badań postanowiłam określić poziom białek p53 oraz p21 w komórkach obu linii HCT116 eksponowanych na działanie pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748

w stężeniach odpowiadających wartościom EC_{50} . W tym celu wykorzystałam technikę Western blotting oraz przeciwciała anty-p53 i anty-p21.

HCT116 p53^{-/-}



HCT116 p53^{+/+}



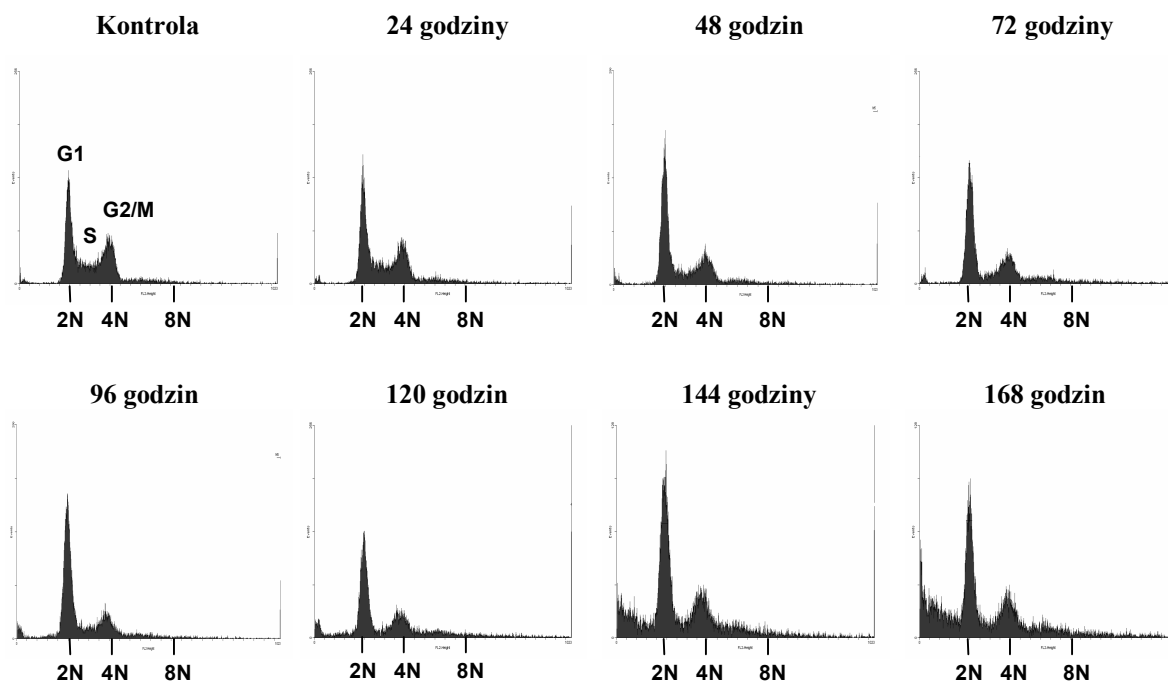
Rys. 55. Poziom białek p53 i p21 w komórkach HCT116 p53^{-/-} i p53^{+/+}, kontrolnych oraz traktowanych związkiem C-1748 (EC_{50}) przez podaną liczbę godzin. Wynik przedstawia jedną z dwóch niezależnych analiz Western blotting. β -aktynę zastosowano w celu sprawdzenia równomiernego napełnienia studzienek.

Jak pokazano na Rys. 55, poziom białka p53 w komórkach HCT116 p53^{-/-}, zarówno kontrolnych jak i traktowanych związkiem C-1748, był praktycznie niewykrywalny, co pozostaje w zgodzie z postulowanymi własnościami tychże komórek. Jednocześnie, przedstawione na Rys. 55 wyniki analizy Western blotting wskazały na niezależną od p53 aktywację białka p21, czego dowodzili również inni autorzy [Di X. i wsp., 2009]. Poziom tego białka wyraźnie wzrastał już w ciągu pierwszych 24 godzin ekspozycji komórek HCT116 p53^{-/-} na badany związek, aczkolwiek w miarę wydłużania czasu inkubacji, ulegał sukcesywnemu obniżeniu. Tak gwałtowny i znaczący spadek w ilości białka p21 w komórkach HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, może sugerować niemożność trwałego zahamowania ich proliferacji pod wpływem badanego związku, co tłumaczyłoby obserwowany brak indukcji starzenia tychże komórek.

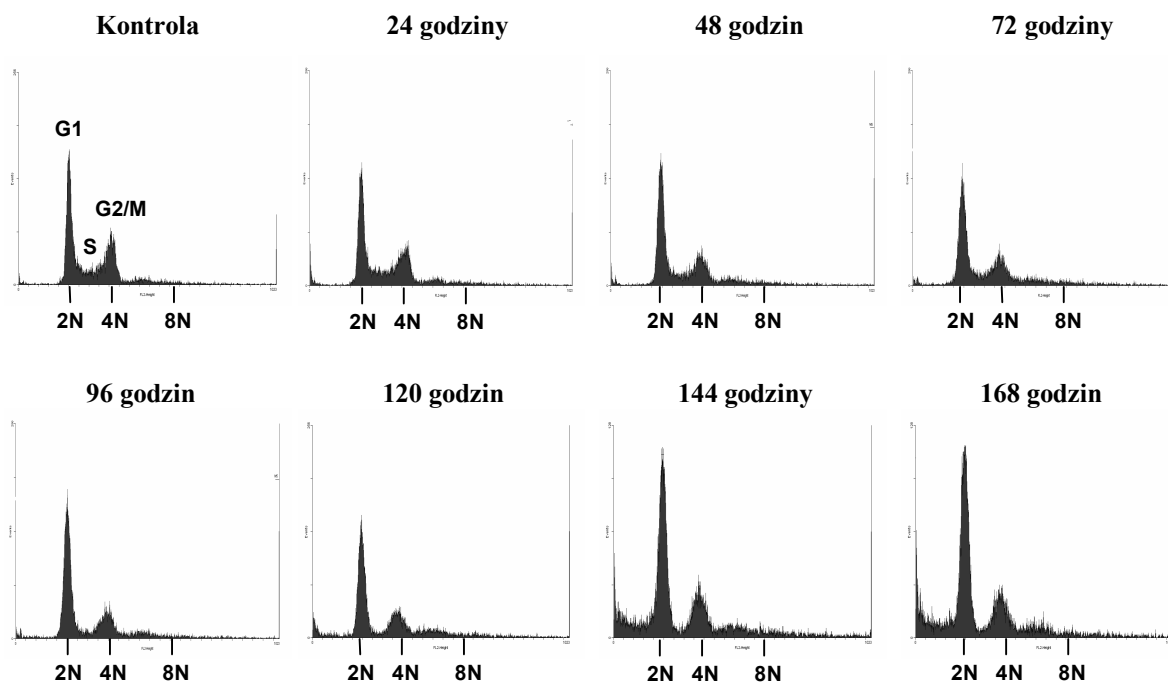
W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, poziom białka p53, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, wyraźnie wzrastał już po 24 godzinach ekspozycji na C-1748. W ciągu kolejnych 24 godzin inkubacji ilość tego białka zmalała, po czym utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie do 120 godzin, a następnie ponownie ulegała obniżeniu (Rys. 55). Jednocześnie, już po upływie 24 godzin inkubacji z badanym związkiem, przybywało również białka p21, którego poziom sukcesywnie wzrastał w miarę wydłużania czasu ekspozycji na C-1748, osiągając wartość maksymalną po 96 godzinach (Rys. 55). Ostatecznie, po upływie 120 godzin, ilość białka p21 nieznacznie zmalała, a następnie utrzymywała się na stałym, wysokim poziomie, co potwierdza udział tego białka w indukcji przedwczesnego starzenia komórek HCT116 p53^{+/+} przez związek C-1748.

Biorąc pod uwagę opisane powyżej wyniki badań postanowiłam sprawdzić, w jaki sposób obserwowane zmiany poziomu białek p53 i/lub p21 w komórkach obu linii HCT116 traktowanych C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC₅₀, wpłynęły na przebieg cyklu życiowego tychże komórek, a zwłaszcza na zahamowanie ich proliferacji w fazie G1 lub G2. Wpływ badanego związku na cykl życiowy wspomnianych komórek nowotworowych zbadalam w oparciu o ocenę zawartości komórkowego DNA, wybarwionego jodkiem propidyny i przy wykorzystaniu techniki cytometrii przepływowej [Huan X. i wsp., 2005].

A)

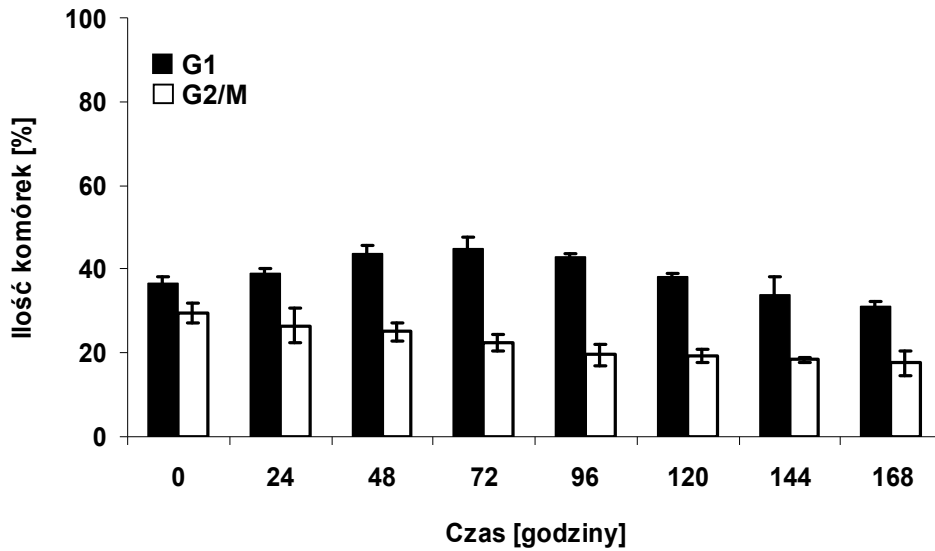


B)

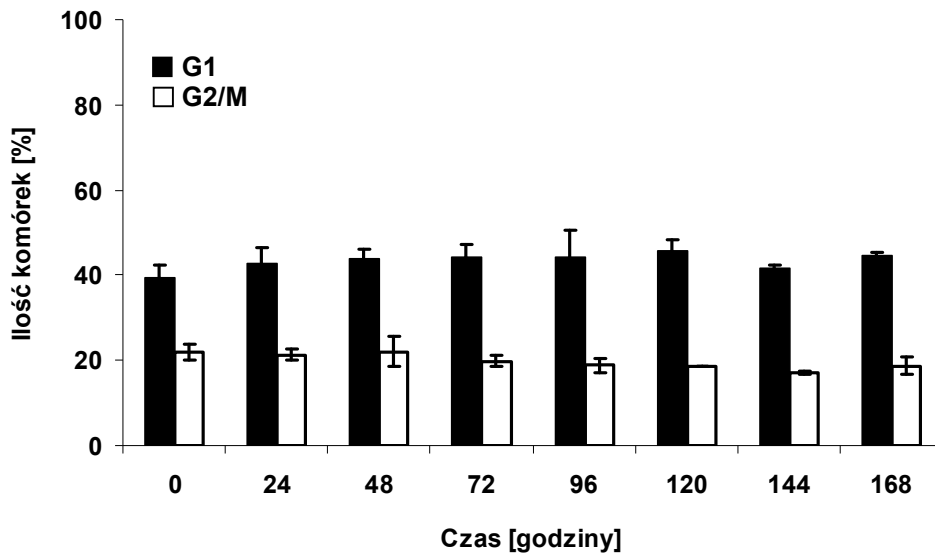


Rys. 56. Histogramy przedstawiające zmiany w przebiegu cyklu życiowego komórek ludzkich raków jelita grubego A) HCT116 p53^{-/-} i B) HCT116 p53^{+/+}, traktowanych związkiem C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC₅₀ (HCT116 p53^{+/+}: 0.001 μM; HCT116 p53^{-/-}: 0.002 μM), przez określoną liczbę godzin. Oś X – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny, określająca zawartość jądrowego DNA. Oś Y – ilość komórek.

A)



B)



Rys. 57. Procent komórek A) HCT116 p53^{-/-} i B) HCT116 p53^{+/+}, kontrolnych oraz inkubowanych ze związkiem C-1748 (EC₅₀), w poszczególnych fazach cyklu życiowego, oparty na wynikach prezentowanych na Rys. 56. Wykres przedstawia średnie z trzech niezależnych eksperymentów wraz z odchyleniami standardowymi.

Jak wynika z analizy histogramów (Rys. 56A i 57A), komórki HCT116 p53^{-/-} ulegały niewielkiej akumulacji w fazie G1 cyklu życiowego już po 48 i 72 godzinach inkubacji z badanym związkiem (odpowiednio ok. 44% i 45%), aczkolwiek efekt ten nie utrzymał się długo, gdyż po upływie 96 godzin ekspozycji na C-1748, frakcja komórek w fazie G1 zaczęła się stopniowo zmniejszać (ok. 43%), ostatecznie osiągając wartość ok. 31% po upływie 168 godzin. Jednocześnie, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, już po 24 godzinach

inkubacji ubywało komórek HCT116 p53^{-/-} znajdujących się w fazie G2/M cyklu życiowego. Co więcej, tendencja ta utrzymywała się w miarę wydłużania czasu ekspozycji na badany związek. A zatem, uzyskane wyniki potwierdziły, iż przejściowa aktywacja białka p21 w komórkach HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, była najprawdopodobniej niewystarczająca do trwałego zahamowania ich proliferacji w fazie G1 lub G2 cyklu życiowego, a co za tym idzie do uruchomienia procesu starzenia tychże komórek na skutek działania pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+} poddanych działaniu związku C-1748, ilość komórek zatrzymanych w fazie G1 cyklu życiowego wzrosła już po 24 godzinach inkubacji (ok. 43%), a następnie utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie (ok. 44%) aż do 168 godzin (Rys. 56B i 57B). Jednocześnie, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, frakcja G2/M nie ulegała większym zmianom przez pierwsze 72 godziny ekspozycji na badany związek, po czym zaczęła się stopniowo zmniejszać w miarę wydłużania czasu inkubacji. A zatem, opisane powyżej wyniki potwierdzają, iż obserwowana uprzednio aktywacja białek p53 i p21 w komórkach HCT116 p53^{+/+} traktowanych C-1748, doprowadziła do trwałego zahamowania ich proliferacji w fazie G1 cyklu życiowego oraz indukcji procesu starzenia tychże komórek.

Podsumowując, choć wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazały na aktywację białka p21 zarówno w komórkach HCT116 p53^{+/+}, jak i p53^{-/-}, to jednak wyłącznie komórki posiadające funkcjonalne białko p53 ulegały starzeniu. Obserwacja ta, łącznie z faktem, iż komórki obu linii HCT116 posiadają nieaktywne białko p16, zdaje się potwierdzać kluczową rolę p53 w procesie przyspieszonego starzenia tychże komórek.

III.2.7. Podsumowanie badań dotyczących odpowiedzi komórek ludzkich raków jelita grubego HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p53^{+/+} traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

Jednym z celów niniejszej pracy doktorskiej było wyjaśnienie roli statusu białka p53 na działanie C-1748, w oparciu o badania prowadzone na komórkach ludzkiego raka jelita grubego HCT116 posiadających funkcjonalny gen *p53* (HCT116 p53^{+/+}), jak również podlinii z knock-out'em tego genu (HCT116 p53^{-/-}).

Brak wyraźnych różnic w wartościach stężeń EC₅₀ i EC₉₀, wyznaczonych na podstawie krzywych zahamowania wzrostu, pomiędzy komórkami HCT116 p53^{+/+} oraz HCT116 p53^{-/-} sugeruje, iż białko p53 nie wpływa w istotny sposób na zdolność pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do hamowania proliferacji tychże komórek.

Analiza dystrybucji komórek HCT116 p53^{-/-} w ich cyklu życiowym, w połączeniu z obecnością ufosforylowanej formy kinazy Cdc2 (Tyr15) i podwyższoną ekspresją cykliny B1 wskazała, iż jednym z najwcześniej obserwowanych efektów działania związku C-1748 była akumulacja tychże komórek w fazie G2 cyklu komórkowego. Wspomniana akumulacja miała jednak charakter przejściowy i jak pokazuje stopniowy zanik zarówno nieaktywnej formy kinazy Cdc2, jak również jej allosterycznego aktywatora - cykliny B1, komórki HCT116 p53^{-/-} były zdolne do przekroczenia punktu kontrolnego fazy G2 i przejścia do mitozy, która ostatecznie przebiegała nieprawidłowo. Mikroskopowa analiza morfologii jąder komórkowych wykazała bowiem, iż obserwowane chromosomy nie były w pełni skondensowane i często chaotycznie ułożone. Co więcej, pojawienie się komórek zawierających liczne mikrojądra, łącznie ze wzrostem populacji komórek poliploidalnych (8N DNA) dodatkowo wskazało, że proces mitozy nie zakończył się prawidłowym podziałem na dwie komórki potomne. Obecność dużych, często poliploidalnych komórek, zawierających dwa jądra lub kilka (kilkanaście) mikrojąder o różnej wielkości, powstających na skutek wyjścia komórek z mitozy do interfazy bez prawidłowego rozdziału chromosomów oraz cytokinezy, jest powszechnie uznawane za cechę charakterystyczną katastrofy mitotycznej, która jak dotąd nie posiada spójnej definicji. Proces ten, przez część badaczy traktowany jest jako odrębny rodzaj śmierci komórkowej, natomiast przez niektórych postrzegany jest jako wadliwa mitoza, która prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy. W przypadku komórek ludzkiego raka jelita grubego HCT116 p53^{-/-} poddanych działaniu C-1748, komórki typowe dla katastrofy mitotycznej pojawiały się równolegle do komórek apoptotycznych, co sugeruje, iż obydwa te procesy mogły przebiegać niezależnie od siebie. Niemniej jednak, końcowy los komórek HCT116 nie posiadających białka p53, ulegających katastrofie mitotycznej, nie jest znany. Na podstawie poczynionych przeze mnie obserwacji nie można bowiem wykluczyć, że katastrofa mitotyczna ostatecznie prowadzi do śmierci tychże komórek na drodze apoptozy lub nekrozy, co postuluje szereg badaczy [Chu K. i wsp., 2004; Skwarska A. i wsp., 2007; Portugal J. i wsp., 2010].

Badanie zjawiska apoptozy w oparciu o znaczniki biochemiczne, takie jak translokacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej, zanik potencjału mitochondrialnego oraz aktywacja kaspazy-3 potwierdziło, iż proces ten jest odpowiedzialny za eliminację części komórek HCT116 p53^{-/-}. Dokładne określenie odsetka komórek ulegających temu rodzajowi śmierci komórkowej było jednak niemożliwe ze względu na obecność w badanych próbkach komórek wielojądrzastych, które wykazują szereg biochemicznych podobieństw do procesu apoptozy. Z kolei, obserwowany w odniesieniu do

komórek kontrolnych przyrost w ilości kwaśnych organelli, łącznie ze wzrostem poziomu białka LC3-II w komórkach HCT116 p53^{-/-} traktowanych C-1748, wskazał na zdolność badanego związku do indukcji autofagii we wspomnianych komórkach nowotworowych, która w tym przypadku najprawdopodobniej nie spełnia funkcji ochronnej. Przeprowadzone przeze mnie badania dowiodły również, iż komórki ludzkiego raka jelita grubego HCT116 nie posiadające funkcjonalnego białka p53, nie ulegały procesowi przyspieszonego starzenia zarówno przy stężeniu związku C-1748 odpowiadającym wartości EC₉₀, jak również przy niższej jego dawce (EC₅₀).

Analiza dystrybucji komórek HCT116 p53^{+/+} poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (EC₉₀) w ich cyklu życiowym, wskazała na brak istotnych zmian w jego przebiegu, z wyjątkiem znacznego wzrostu frakcji sub-G1, co sugerowało uruchomienie procesu śmierci wspomnianych komórek nowotworowych na drodze apoptozy. Ponadto, w przeciwieństwie do linii HCT116 p53^{-/-}, nie obserwowano tu przejściowej akumulacji komórek w fazie G2/M cyklu życiowego. Co więcej, szybki zanik zarówno ufosforylowanej formy kinazy Cdc2 (Tyr15), jak również cykliny B1, począwszy od 24 godzin inkubacji z C-1748, wskazywał na niemożność zestawienia i aktywacji kompleksu MPF (ang. *mitosis-promoting factor*), a tym samym przejścia komórek HCT116 p53^{+/+} z fazy G2 do mitozy. Mikroskopowa ocena morfologii jąder komórek HCT116 p53^{+/+} potwierdziła zachodzenie procesu apoptozy i to ze znacznie większą intensywnością niż w komórkach HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, a także wskazała na brak obecności komórek wielojądrzastych, charakterystycznych dla procesu katastrofy mitotycznej. Badanie zjawiska apoptozy w oparciu o znaczniki biochemiczne, takie jak translokacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej, zanik potencjału mitochondrialnego oraz aktywacja kaspazy-3 potwierdziło, iż to właśnie apoptoza odgrywa decydującą rolę w eliminacji komórek HCT116 p53^{+/+} – po 168 godzinach ekspozycji ok. 67% całkowitej populacji komórek wykazywało zmiany typowe dla apoptozy (test aneksyna V/PI), podczas gdy frakcja komórek nekrotycznych nie przekroczyła 5%. Przeprowadzone przeze mnie badania dowiodły także, że pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 nie posiada zdolności do indukcji autofagii we wspomnianych komórkach nowotworowych. Co więcej, komórki HCT116 p53^{+/+} poddane działaniu badanego związku w stężeniu odpowiadającym wartości EC₉₀ nie ulegały procesowi przedwczesnego starzenia. Jednakże, obniżenie stężenia C-1748 do wartości EC₅₀ spowodowało, iż komórki HCT116 p53^{+/+} zaczęły się starzeć, o czym świadczyło pojawienie się zarówno charakterystycznych dla tego procesu zmian w ich morfologii, jak również wzrost aktywności

enzymu SA- β -galaktozydazy. Z kolei, przyrost poziomu białek p53 oraz p21 w komórkach HCT116 p53^{+/+} traktowanych badanym związkiem w stężeniu odpowiadającym wartości EC₅₀ wskazał na ich udział w indukcji procesu przedwczesnego starzenia wspomnianych komórek nowotworowych.

Zwiększenie stężenia związku C-1748 do wartości 5xEC₉₀ wpłynęło przede wszystkim na wzrost liczby komórek HCT116 p53^{-/-} ulegających apoptozie oraz szybsze tempo ich pojawiania się, czego dowiodła analiza dystrybucji tychże komórek w ich cyklu życiowym, w połączeniu z obserwacją mikroskopową. Co więcej, szybkiej i intensywnej fragmentacji DNA towarzyszył brak akumulacji komórek HCT116 p53^{-/-} w którejkolwiek z faz ich cyklu życiowego oraz brak pojawienia się frakcji komórek poliploidalnych. Analiza mikroskopowa jąder wspomnianych komórek nowotworowych poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości 5xEC₉₀ dodatkowo wskazała na brak obecności komórek wielojądrzastych, a zatem na brak zachodzenia procesu katastrofy mitotycznej, której indukcję obserwowano przy dawce badanego związku równej EC₉₀. Ponadto, badanie zmian zachodzących pod wpływem C-1748 (5xEC₉₀) w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53 nie tylko potwierdziło, iż znaczna ich część umierała na drodze apoptozy, ale także wskazało na istotną rolę nekrozy w eliminacji tychże komórek, czego nie stwierdzono przy stężeniu badanego związku odpowiadającym wartości EC₉₀ - po 168 godzinach ekspozycji ok. 49% całkowitej populacji komórek wykazywało zmiany typowe dla apoptozy (test aneksyna V/PI), podczas gdy frakcja komórek nekrotycznych przekroczyła 34%.

W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, zastosowanie dawki związku C-1748 równej 5xEC₉₀ nie spowodowało wyraźnych zmian w przebiegu ich cyklu życiowego, jak również znacznego zwiększenia liczby tychże komórek ulegających apoptozie, aczkolwiek wpłynęło na szybsze tempo ich pojawiania się niż przy stężeniu odpowiadającym wartości EC₉₀. Badanie zmian zachodzących pod wpływem C-1748 (5xEC₉₀) w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT116 p53^{+/+} wskazało, podobnie jak w przypadku linii HCT116 nie posiadającej funkcjonalnego białka p53, iż badany związek indukuje śmierć tychże komórek nie tylko na drodze apoptozy, ale także bezpośrednio nekrozy, czego również nie obserwowano przy stężeniu związku odpowiadającym wartości EC₉₀ – po 168 godzinach ekspozycji ok. 55% całkowitej populacji komórek wykazywało zmiany typowe dla apoptozy (test aneksyna V/PI), podczas gdy frakcja komórek nekrotycznych przekroczyła 42%.

Komórki ludzkiego raka jelita grubego	HCT116 p53 ^{-/-}	HCT116 p53 ^{+/+}
Wpływ związku C-1748 na proliferację komórek obu linii HCT116	EC ₅₀ = 0.002 μM EC ₉₀ = 0.02 μM	EC ₅₀ = 0.001 μM EC ₉₀ = 0.04 μM
Cykl komórkowy	<p>przy stężeniu 1xEC₉₀:</p> <ul style="list-style-type: none"> - nieznaczna i przejściowa akumulacja komórek w fazie G2/M; - zatrzymanie części komórek w fazie G1 pomiędzy 72 a 144 godziną inkubacji; - wzrost w ilości komórek poliploidalnych (maks. do ok. 27% po 120 godzinach); - przyrost frakcji sub-G1 (maks. do ok. 34% po 168 godzinach) <p>przy stężeniu 5xEC₉₀:</p> <ul style="list-style-type: none"> - wzrost frakcji sub-G1 oraz szybsze tempo jej pojawiania się niż przy stężeniu odpowiadającemu wartości 1xEC₉₀; - brak pojawienia się komórek poliploidalnych; - brak akumulacji komórek w fazie G2/M, jak również ich zatrzymania w fazie G1 cyklu życiowego 	<p>przy stężeniu 1xEC₉₀:</p> <ul style="list-style-type: none"> - brak akumulacji komórek w fazie G2/M; - zatrzymanie części komórek w fazie G1 pomiędzy 72 a 144 godziną inkubacji; - brak wzrostu w ilości komórek poliploidalnych; - znaczny i szybki przyrost frakcji sub-G1 (maks. do ok. 73%) <p>przy stężeniu 5xEC₉₀:</p> <ul style="list-style-type: none"> - brak istotnych różnic w przebiegu cyklu życiowego komórek przy stężeniach 1xEC₉₀ i 5xEC₉₀, przy czym zastosowanie wyższej dawki C-1748 powodowało szybszą oraz bardziej intensywną degradację DNA
Progresja komórek z fazy G2 do mitozy	zdolne do przekroczenia punktu kontrolnego fazy G2 i wejścia do mitozy	najprawdopodobniej niezdolne do przekroczenia punktu kontrolnego fazy G2 i wejścia do mitozy
Katastrofa mitotyczna	zachodzi	brak
Apoptoza	zachodzi w sposób związany z uszkodzeniem mitochondriów i zależny od aktywacji kaspazy-3 w znacznie mniejszym stopniu niż w komórkach z funkcjonalnym p53	zachodzi w sposób związany z uszkodzeniem mitochondriów oraz zależny od aktywacji kaspazy-3 i spełnia decydującą rolę w eliminacji komórek HCT116 p53 ^{+/+}
Autofagia	zachodzi	brak
Proces przyspieszonego starzenia	przy stężeniu EC ₉₀ – brak przy stężeniu EC ₅₀ - brak	przy stężeniu EC ₉₀ – brak przy stężeniu EC ₅₀ - zachodzi

Tabela 1. Porównanie odpowiedzi komórek ludzkiego raka jelita grubego HCT116 posiadających funkcjonalny gen *p53* oraz podlinii z knock'outem tego genu na działanie pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

III.3. Charakterystyka odpowiedzi komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

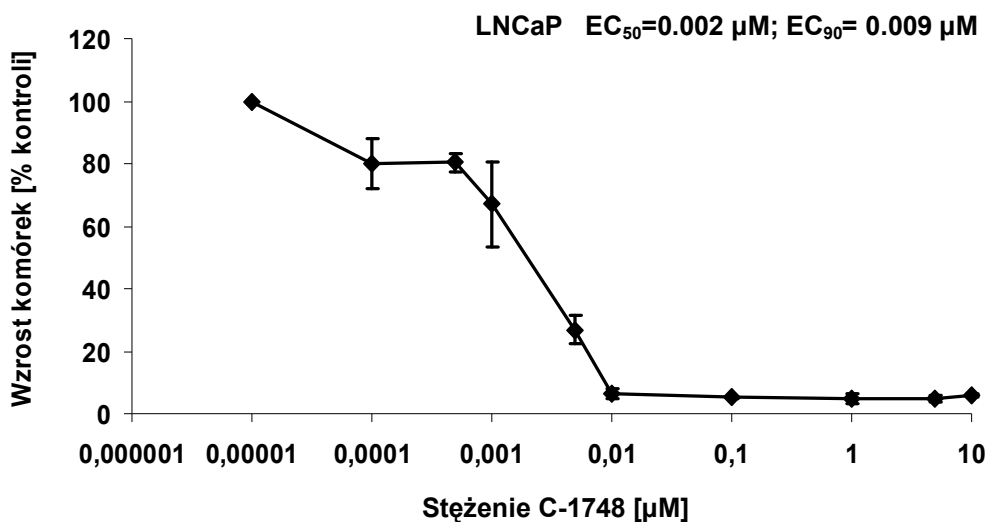
Przeprowadzone przeze mnie dotychczas badania wykazały, iż komórki dwóch linii nowotworu jelita grubego pochodzenia ludzkiego, tj. HCT116 p53^{+/+} i HCT116 p53^{-/-}, poddane działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC₉₀, umierały na drodze apoptozy, przy czym proces ten przebiegał z różną intensywnością w zależności od statusu białka p53. Jednocześnie, część komórek z niefunkcjonalnym p53 ulegała katastrofie mitotycznej. Co więcej, na skutek obniżenia stężenia badanego związku do wartości EC₅₀, dochodziło do uruchomienia procesu starzenia komórek HCT116 p53^{+/+}. W tej części pracy postanowiłam sprawdzić efekty działania związku C-1748 również w przypadku innego modelu komórkowego. W tym celu, do dalszych badań wybrałam komórki ludzkiego raka prostaty LNCaP, posiadające funkcjonalne białko p53. Podstawowym argumentem przemawiającym za takim wyborem był fakt, iż C-1748 wykazywał wysoką aktywnością przeciwnowotworową w stosunku do ksenoprzeszczepów na myszy bezgranicze raków prostaty, w tym LNCaP, PC-3 oraz TSU [Tadi K. i wsp., 2004].

III.3.1. Wpływ związku C-1748 na proliferację oraz progresję komórek LNCaP w ich cyklu życiowym.

Aktywność biologiczną C-1748 wobec komórek LNCaP, podobnie jak w przypadku komórek obu linii HCT116, oznaczałam przy wykorzystaniu metody liczenia komórek (za pomocą licznika Coulter Counter), po 72-godzinnej inkubacji ciągłej z różnymi stężeniami badanego związku.

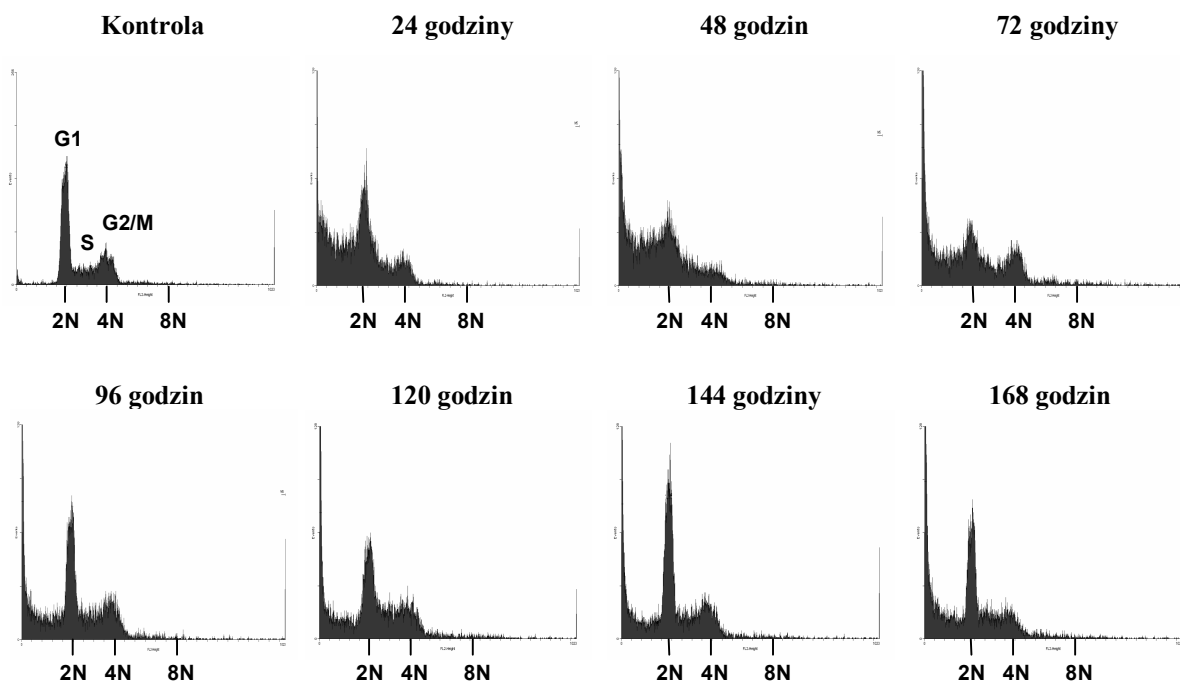
Przedstawione na Rys. 58 wyniki wskazują, iż pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 hamowała proliferację komórek LNCaP w sposób zależny od stężenia. Wartości stężeń EC₅₀ i EC₉₀, wyznaczone na podstawie krzywych zahamowania wzrostu komórek, wynosiły odpowiednio: EC₅₀ = 0.002 μM oraz EC₉₀ = 0.009 μM. A zatem, stężenie związku hamujące proliferację komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP w 90%, było niemalże dwukrotnie niższe od wyznaczonego dla linii HCT116 p53^{-/-} i blisko czterokrotnie niższe niż dla linii HCT116 p53^{+/+} (Rys. 17). W związku z powyższym, w dalszej części swojej pracy postanowiłam sprawdzić, czy różnice w aktywności biologicznej pomiędzy wymienionymi

komórkami nowotworowymi, będą miały swoje odzwierciedlenie także na poziomie odpowiedzi komórkowej.

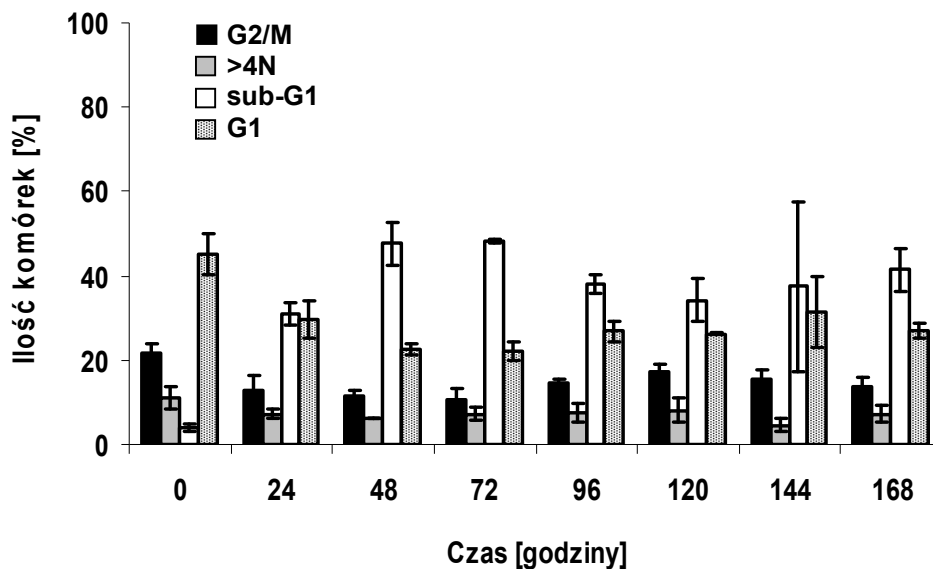


Rys. 58. Wykres zależności zahamowania wzrostu komórek LNCaP od stężenia pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748. Wyniki stanowią średnią z trzech niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Wpływ pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na cykl życiowy komórek LNCaP zbadalam w oparciu o ocenę zawartości komórkowego DNA, wybarwionego jodkiem propidyny i przy wykorzystaniu techniki cytometrii przepływowej [Huan X. i wsp., 2005]. Uzyskane wyniki, prezentowane poniżej, przedstawiłam w formie zarówno histogramów (Rys. 59), jak również sporządzonego na ich podstawie wykresu, obrazującego procentowy udział komórek LNCaP w poszczególnych fazach cyklu życiowego, w zależności od długości czasu inkubacji z badanym związkiem (Rys. 60).



Rys. 59. Histogramy przedstawiające zmiany w przebiegu cyklu życiowego komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP traktowanych związkiem C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} ($0.009 \mu M$), przez określoną liczbę godzin. Oś X – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny, określająca zawartość jądrowego DNA. Oś Y – ilość komórek.



Rys. 60. Procent komórek LNCaP, kontrolnych oraz inkubowanych ze związkiem C-1748 (EC_{90}), w poszczególnych fazach cyklu życiowego. Wykres przedstawia średnie z trzech niezależnych eksperymentów wraz z odchyleniami standardowymi.

Jak wynika z analizy histogramów, w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji ze związkami C-1748, doszło do wyraźnego wzrostu w ilości komórek frakcji sub-G1 (do ok. 48%), przy jednoczesnym spadku liczby komórek w fazach G1, S oraz G2/M (Rys. 59 i 60). Po upływie 96 godzin ekspozycji na badany związek, frakcja sub-G1 zmniejszyła się (do ok. 38%), a następnie utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie, po czym nieznacznie wzrastała po 168 godzinach (do ok. 42%). Liczba komórek poliploidalnych, w miarę wydłużania czasu inkubacji, osiągała wartość od ok. 5% do ok. 8%. Odsetek komórek LNCaP w fazie S cyklu życiowego sukcesywnie malał do 72 godzin, a następnie utrzymywał się na poziomie ok. 14% w miarę wydłużania czasu ekspozycji na C-1748. Liczba komórek w fazie G2/M spadała pomiędzy 24 a 72 godziną inkubacji (do ok. 11%), po czym nieznacznie wzrastała po 96 godzinach (do ok. 15%), a następnie utrzymywała się praktycznie na tym samym poziomie (14–17%). Jednocześnie, po wspomnianym spadku w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji ze związkami, frakcja komórek w fazie G1 wzrastała (do ok. 27% po upływie 96 godzin) i z niewielkimi wahaniami, utrzymywała praktycznie tę samą wartość do 168 godzin.

Opisane powyżej wyniki wskazują, iż w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji komórek LNCaP z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 dochodziło do uruchomienia procesu śmierci komórkowej, o czym świadczyła postępująca degradacja DNA (pojawienie się frakcji sub-G1). Jednocześnie, wielkość frakcji sub-G1, po krótkich czasach inkubacji, była tu zdecydowanie największa w porównaniu z komórkami obu linii HCT116. Po dłuższych czasach ekspozycji na badany związek (począwszy od 96 godzin), komórki ludzkiego raka prostaty zostały zatrzymane w fazach G1, S lub G2/M cyklu życiowego. W przypadku zarówno komórek HCT116 p53^{+/+}, jak również HCT116 p53^{-/-}, odsetek komórek żywych zmniejszał się w miarę wydłużania czasu inkubacji z C-1748, co stanowi zasadniczą różnicę w porównaniu do komórek LNCaP.

III.3.2. Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji apoptozy komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP.

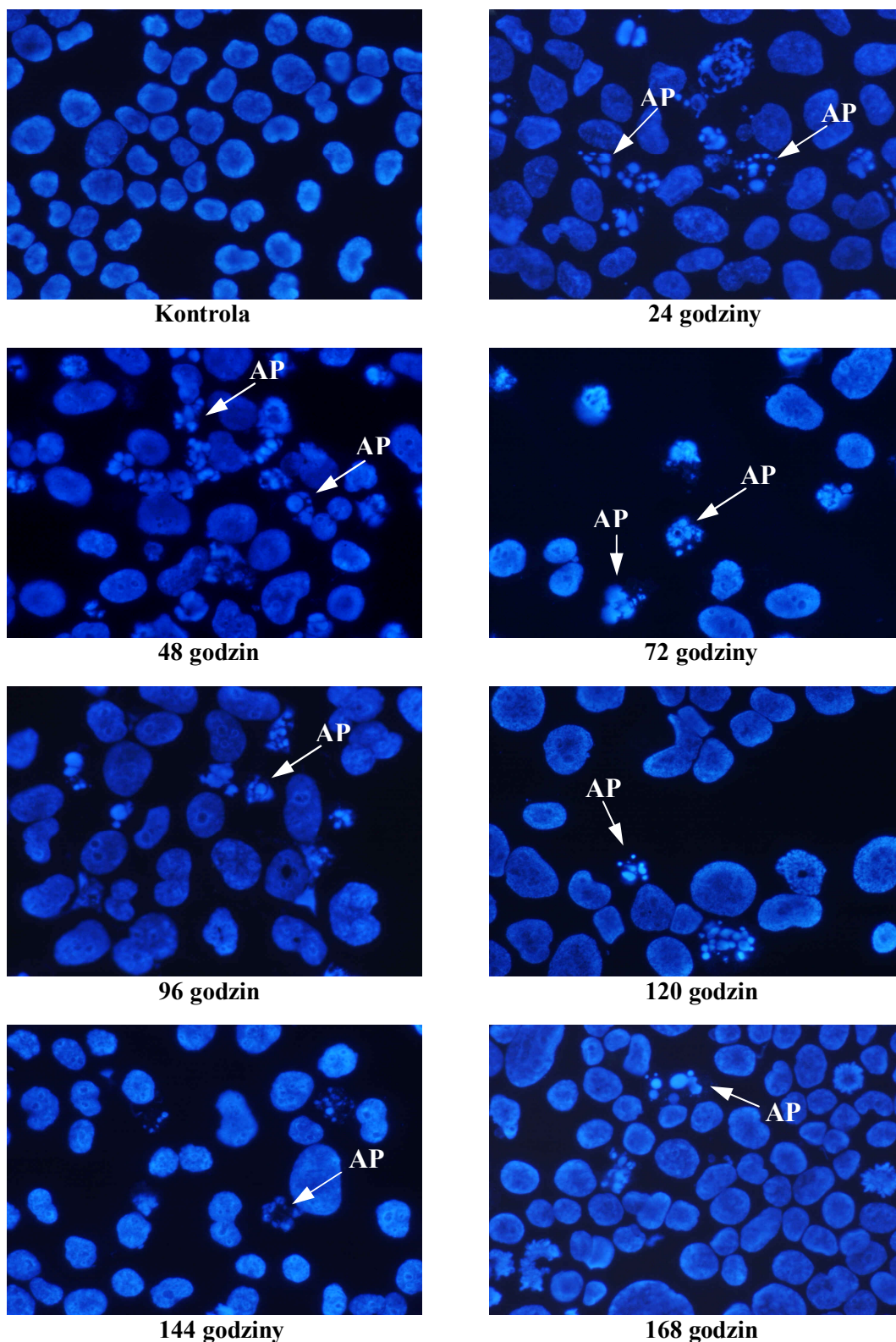
Pojawienie się populacji sub-G1 podczas badania dystrybucji komórek LNCaP w ich cyklu życiowym wskazywało, iż komórki te poddane działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀), mogły umierać na drodze apoptozy (Rys. 59 i 60). Obecność frakcji sub-G1 jest ważnym, aczkolwiek nie wystarczającym kryterium, aby śmierć komórkową uznać za apoptotyczną. Dlatego też,

zdolność badanego związku do indukcji apoptozy komórek LNCaP należało potwierdzić innymi, niezależnymi metodami.

Badanie zmian w morfologii komórek jest podstawowym i najprostszym sposobem identyfikacji komórek ulegających apoptozie, które charakteryzują się obkurczeniem, kondensacją chromatyny i pojawieniem się ciałek apoptotycznych. Ocenę stopnia kondensacji chromatyny oraz fragmentacji jąder komórek LNCaP traktowanych związkiem C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} ($0.009 \mu\text{M}$), dokonałam przy użyciu interkalującego do DNA fluorochromu DAPI i techniki mikroskopii fluorescencyjnej.

Analiza morfologii jąder komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP poddanych działaniu C-1748, wskazała na wyraźną obecność komórek apoptotycznych już po upływie 24 godzin inkubacji (Rys. 61). Po 48 godzinach ekspozycji na badany związek, ilość komórek apoptotycznych, widocznych na zamieszczonych poniżej zdjęciach, nadal stanowiła dużą część całkowitej populacji komórek LNCaP. Po upływie 72 godzin, liczba tychże komórek spadała, po czym utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie. Podobnie jak w przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, nie obserwowałam pojawienia się komórek wielojądrzastych, charakterystycznych dla procesu katastrofy mitotycznej.

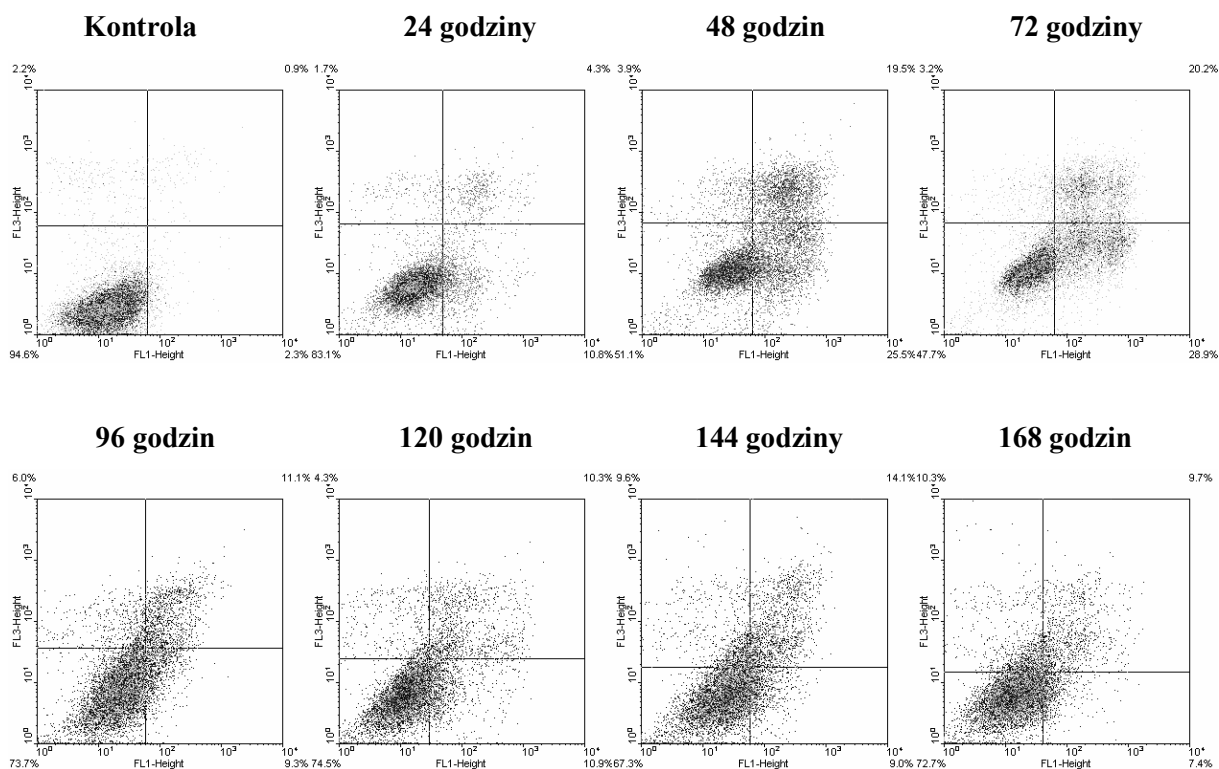
LNCaP



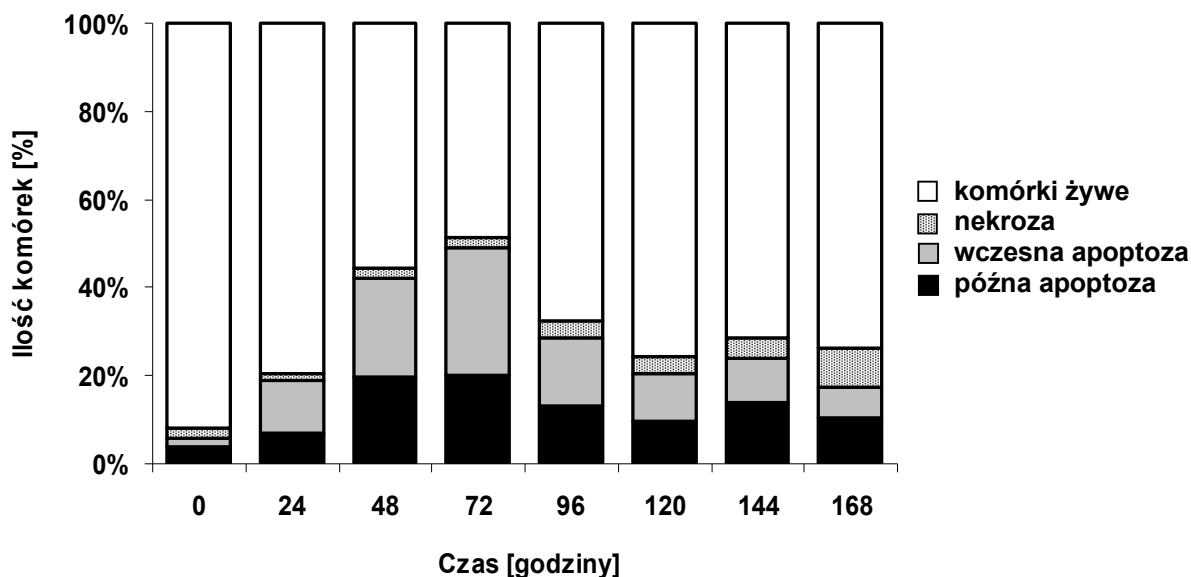
Rys. 61. Morfologia komórek LNCaP, kontrolnych i poddanych działaniu związku C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} ($0.009 \mu\text{M}$), przez podaną liczbę godzin. Po zakończonej inkubacji ze związkiem, komórki barwiono za pomocą fluorochromu DAPI i oceniano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Symbol AP oznacza przykładowe komórki apoptotyczne.

Równoległe z kryterium morfologicznym postanowiłam sprawdzić, w oparciu o test z użyciem aneksyny V i jodku propidyny, czy w komórkach LNCaP traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC_{90}), dochodzi do charakterystycznych dla apoptozy zmian w budowie błony cytoplazmatycznej.

Jak przedstawiono na Rys. 62 i 63, populacja komórek LNCaP wybarwionych jedynie jodkiem propidyny (aneksyna V-/PI+), w miarę wydłużania czasu inkubacji z C-1748 (0.009 μ M), utrzymywała się na niskim poziomie, w przedziale 2-9%. Wynik ten dowodzi, podobnie jak w przypadku komórek obu linii HCT116 (Rys. 30, 31, 32 i 33), iż badany związek indukuje śmierć na drodze bezpośredniej nekrozy (ang. *primary necrosis*) jedynie niewielkiej części komórek ludzkiego raka prostaty. Uzyskane wyniki wskazały również na obecność komórek wybarwionych aneksyną V, czyli ulegających apoptozie. Komórki wczesnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI-), pojawiły się już po upływie 24 godzin ekspozycji na C-1748 (ok. 12%). Po upływie 48 i 72 godzin, ilość komórek we wczesnej fazie apoptozy wzrastała (ok. 29%), jak również wyraźnie przybywało komórek późnoapoptotycznych (ok. 20%). Po 96 godzinach inkubacji z badanym związkiem, ubywało zarówno komórek we wczesnej (ok. 16%), jak i w późnej fazie apoptozy (ok. 14%). Ostatecznie, pomiędzy 120 a 168 godziną ekspozycji na C-1748, łączny odsetek komórek wczesno- i późnoapoptotycznych utrzymywał się na poziomie od ok. 18% do ok. 24%. Wyniki uzyskane na drodze badania zmian w strukturze błony cytoplazmatycznej potwierdziły zdolność C-1748 do indukcji apoptozy komórek LNCaP, a ilościowy charakter tej metody w przekonujący sposób dowodzi, że tylko część (maksymalnie 50%) komórek ludzkiego raka prostaty ulega temu rodzajowi śmierci. Co więcej, opisane powyżej wyniki wskazały, że proces apoptozy komórek LNCaP poddanych działaniu związku C-1748 zachodził szczególnie intensywnie jedynie w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji, co łącznie z wynikami cytometrycznej analizy progresji wspomnianych komórek ludzkiego raka prostaty w ich cyklu życiowym może sugerować między innymi, iż po dłuższych czasach ekspozycji pojawiła się populacja komórek opornych na działanie badanego związku lub, podobnie jak w przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, może dochodzić do uruchomienia mechanizmów naprawy DNA .

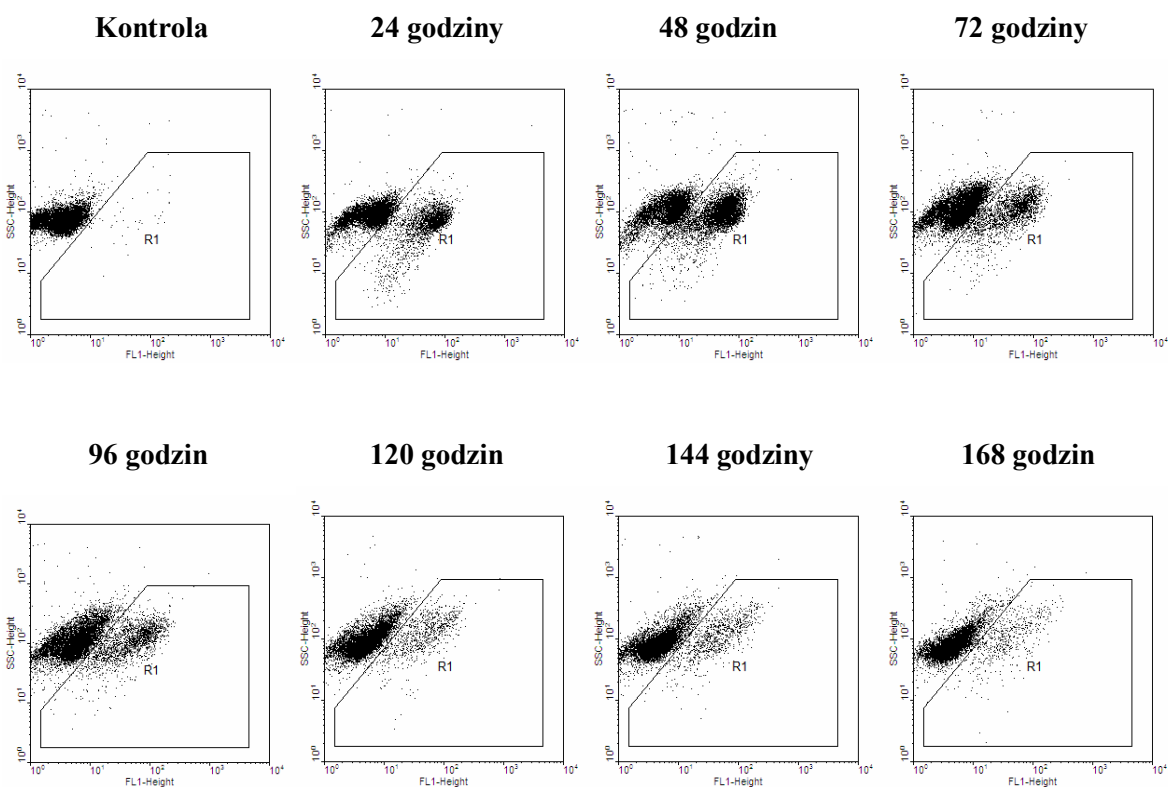


Rys. 62. Cytometryczna analiza zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej komórek LNCaP, zarówno kontrolnych jak i traktowanych C-1748 (EC_{90} : $0.009 \mu M$). Oś X – fluorescencja emitowana przez fluoresceinę skoniugowaną z aneksyną V. Oś Y – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny. Lewy, dolny kwadrant: komórki żywe (aneksyna V-/PI-); prawy, dolny kwadrant: komórki wczesnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI-); prawy, górny kwadrant: komórki późnoapoptotyczne (aneksyna V+/PI+); lewy, górny kwadrant: komórki nekrotyczne (aneksyna V-/PI+).

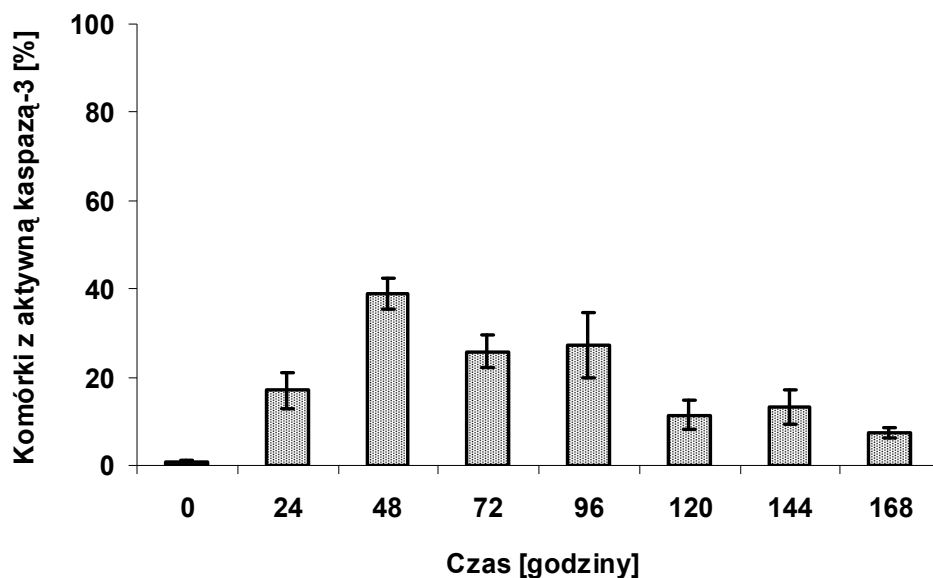


Rys. 63. Procentowy udział komórek żywych, nekrotycznych, wczesno- i późnoapoptotycznych (określony w odniesieniu do całkowitej populacji komórek LNCaP) w zależności od czasu inkubacji ze związkiem C-1748 (EC_{90}). Wykres przedstawia wyniki reprezentacyjne dla trzech niezależnych doświadczeń, w których otrzymano podobne wyniki.

Biorąc pod uwagę fakt, iż apoptoza komórek obu linii ludzkich raków jelita grubego HCT116 traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 przebiegała z udziałem mitochondrialnej drogi aktywacji kaspaz, w następnym etapie pracy postanowiłam sprawdzić, czy również w komórkach LNCaP dochodzi do uruchomienia apoptotycznej kaskady kaspaz. W tym celu zbadalam obecność aktywnej formy efektorowej kaspazy-3 w komórkach ludzkiego raka prostaty poddanych działaniu badanego związku.



Rys. 64. Cytometryczna analiza obecności aktywnej formy kaspazy-3 w komórkach LNCaP, kontrolnych i traktowanych C-1748 (EC_{90} : 0.009 μ M). Oś X - fluorescencja pochodząca od fluoresceiny skoniugowanej z przeciwciałem anty-aktywna kaspaza-3. Zaznaczony obszar (R1) przedstawia komórki zawierające aktywną kaspazę-3. Cytogram jest reprezentacyjny dla dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń.



Rys. 65. Odsetek komórek LNCaP zawierających aktywną kaspazę-3, w zależności od długości czasu inkubacji ze związkami C-1748 (EC_{90} : 0.009 μ M). Wyniki przedstawiono w postaci średnich z dwóch niezależnie przeprowadzonych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Jak pokazano na Rys. 64 i 65, w komórkach LNCaP traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC_{90} : 0.009 μ M), doszło do aktywacji kaspazy-3. Po 24 godzinach ekspozycji na badany związek, ilość komórek ludzkiego raka prostaty z aktywną kaspazą-3 wynosiła ok. 17%. W ciągu kolejnych 24 godzin ilość tychże komórek wzrastała do ok. 39%, a następnie spadała i utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie ok. 26% pomiędzy 72 i 96 godziną inkubacji. Po upływie 120 i 144 godzin, frakcja komórek z aktywną kaspazą-3 ponownie malała do ok. 13%. Ostatecznie, po 168 godzinach ekspozycji na badany związek, frakcja ta wynosiła ok. 7%. Powyższe obserwacje wskazują, iż apoptoza indukowana w komórkach LNCaP przez C-1748, podobnie jak w przypadku komórek obu linii ludzkich raków jelita grubego HCT116, przebiegała w sposób zależny od aktywacji kaspazy-3.

III.3.3. Określenie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji autofagii w komórkach ludzkiego raka prostaty LNCaP.

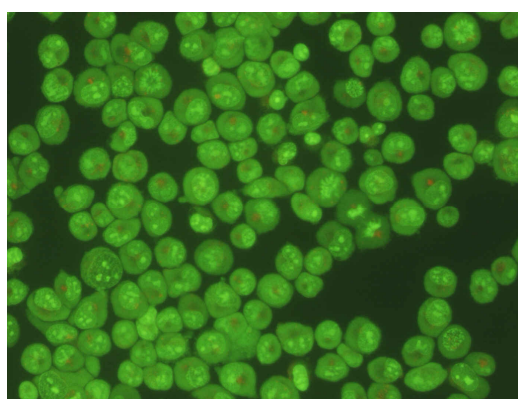
Rezultaty przeprowadzonych dotychczas przeze mnie badań wykazały, iż pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 indukuje autofagię w komórkach ludzkiego raka jelita grubego HCT116 p53^{-/-}, czego nie obserwowano w przypadku komórek HCT116 posiadających funkcjonalne białko p53. W dalszej części swojej pracy postanowiłam

sprawdzić, czy w komórkach LNCaP z funkcjonalnym p53, dojdzie do indukcji autofagii, czy może podobnie jak komórki HCT116 p53^{+/+} nie będą one zdolne do uruchomienia tego procesu pod wpływem pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

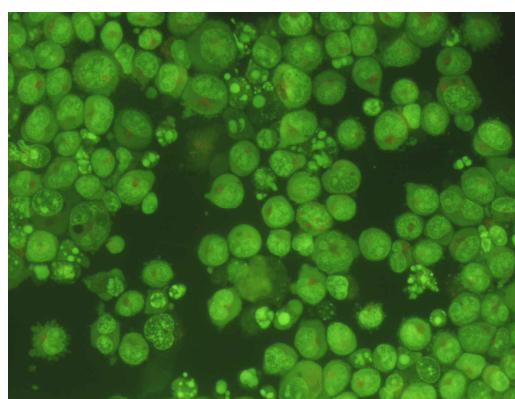
Zdolność C-1748 do indukcji autofagii, podobnie jak w przypadku komórek obu linii HCT116, określiłam w oparciu o obserwację zmian w ilości kwaśnych organelli pęcherzykowych (ang. *AVO – Acidic Vesicular Organelle*) w komórkach LNCaP eksponowanych na działanie badanego związku w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀), jak również zbadałam poziom białek LC3-I oraz LC3-II.

Jak pokazano na Rys. 66, w przypadku komórek LNCaP traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającemu wartości EC₉₀ (0.009 μM), a następnie barwionych oranżem akrydyny, analiza mikroskopowa wskazała na brak wyraźnego wzrostu liczby kwaśnych organelli w porównaniu do komórek kontrolnych. Świadczył o tym fakt, iż w miarę wydłużania czasu ekspozycji na badany związek, intensywność czerwonej fluorescencji, pochodzącej od oranżu akrydyny, utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie. Co więcej, poziom obu form białka MAP I LC3, zarówno LC3-I, jak i LC3-II, w porównaniu do komórek kontrolnych, nie ulegał istotnym zmianom w miarę wydłużania czasu inkubacji (Rys. 67). A zatem, uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na brak indukcji autofagii w komórkach ludzkiego raka prostaty LNCaP eksponowanych na działanie związku C-1748.

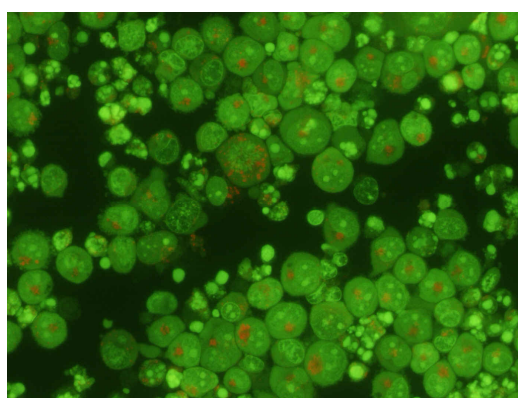
LNCaP



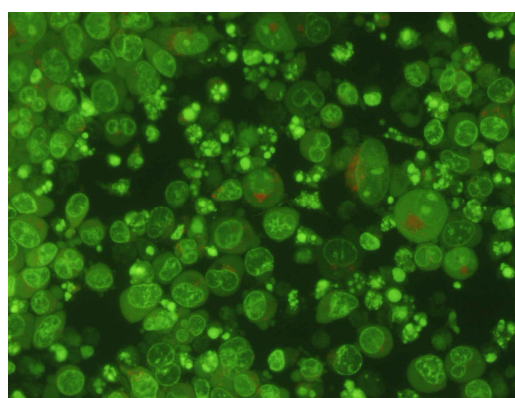
Kontrola



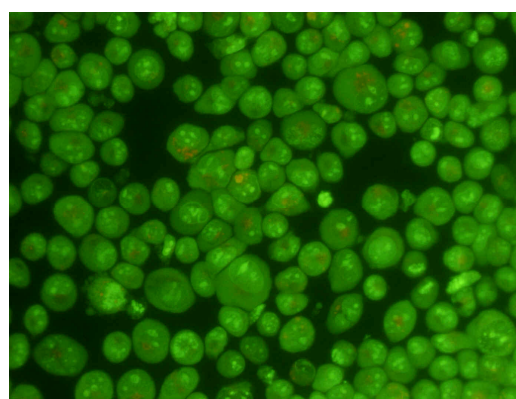
24 godziny



48 godzin

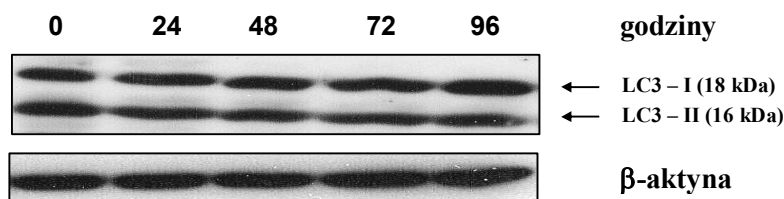


72 godziny



96 godzin

Rys. 66. Obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach LNCaP, kontrolnych i traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydiny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} ($0.009 \mu M$), a następnie barwionych oranżem akrydyny.

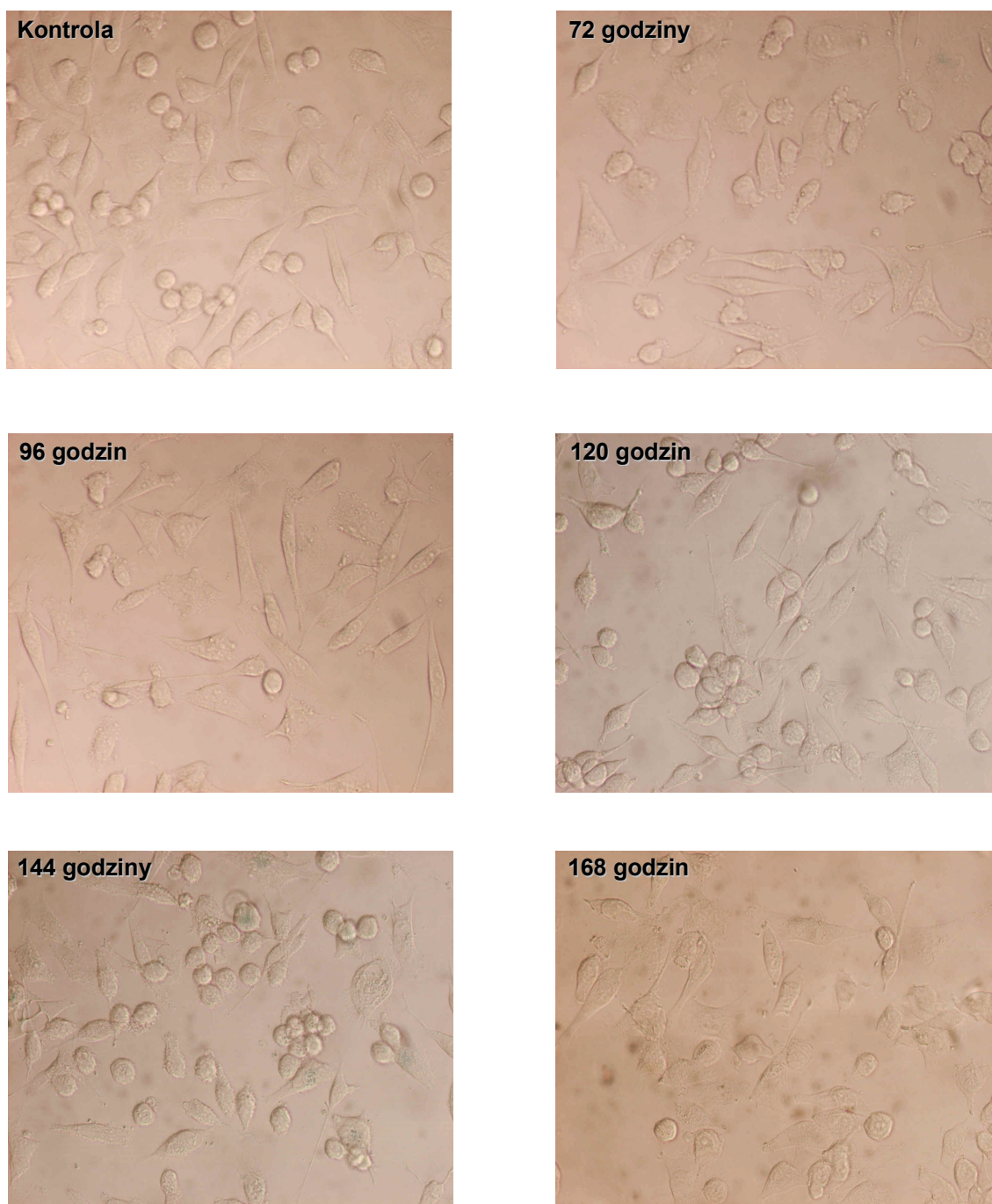


Rys. 67. Poziom białek LC3-I i LC3-II w komórkach LNCaP, kontrolnych i traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC_{90}), przez podaną liczbę godzin. Wynik przedstawia jedną z dwóch niezależnych analiz Western blotting. Jako kontrolę równomiernego napełnienia studzienek zastosowano β -aktynę.

III.3.4. Określenie zdolności związku C-1748 do uruchomienia procesu przyspieszonego starzenia komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP.

Rezultaty przeprowadzonych dotychczas przeze mnie badań wykazały, iż pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 indukuje apoptozę części komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP. Jednocześnie, dominująca rola apoptozy w eliminacji tychże komórek dotyczyła wyłącznie pierwszych 72 godzin inkubacji, natomiast po dłuższych czasach ekspozycji na badany związek proces ten przebiegał w znacznie ograniczonym stopniu (maksymalnie do 24%). Co więcej, analiza cyklu życiowego komórek LNCaP wskazała na zatrzymanie ich progresji w fazach G1, S oraz G2/M począwszy od 96 godzin inkubacji (Rys. 59 i 60). A zatem, skoro większość komórek ludzkiego raka prostaty pozostawała żywa pomimo traktowania związkiem C-1748, wykazując przy tym obniżoną zdolność do proliferacji, to należało sprawdzić, czy w komórkach tych nie doszło do uruchomienia procesu przyspieszonego starzenia po dłuższych czasach ekspozycji. W tym celu komórki LNCaP poddawałam inkubacji z pochodną C-1748 w stężeniu odpowiadającemu wartości EC_{90} , przez określoną ilość godzin, a następnie określałam aktywność SA- β -gal zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.2.12.

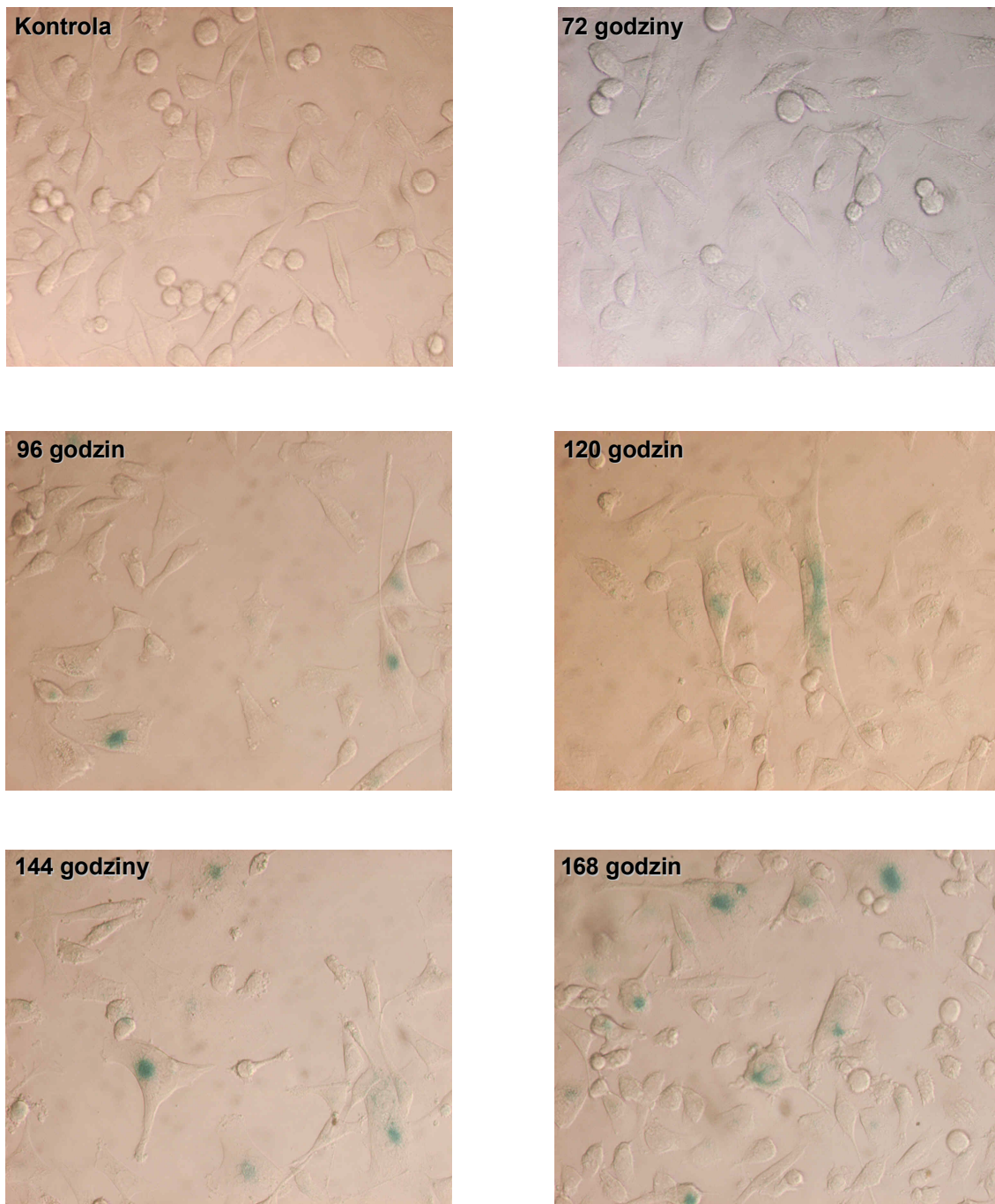
Połączona ocena morfologiczna i histochemiczna komórek LNCaP poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC_{90}), wskazała na brak indukcji procesu starzenia tychże komórek, o czym świadczył brak zarówno charakterystycznych dla tego procesu zmian w ich morfologii, jak i wzrostu aktywności enzymu SA- β -galaktozydazy (Rys. 68).



Rys. 68. Morfologia komórek LNCaP traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} ($0.009 \mu M$), a następnie barwionych X-Gal.

Jak dowiedziono wcześniej, komórki obu linii HCT116, podobnie jak komórki LNCaP, nie ulegały starzeniu pod wpływem związku C-1748, stosowanego w stężeniach odpowiadających wartościom EC_{90} (Rys. 52), aczkolwiek po obniżeniu stężenia badanej pochodnej do wartości EC_{50} , dochodziło do uruchomienia procesu starzenia komórek HCT116 $p53^{+/+}$. W związku z powyższym, postanowiłam sprawdzić, czy komórki LNCaP,

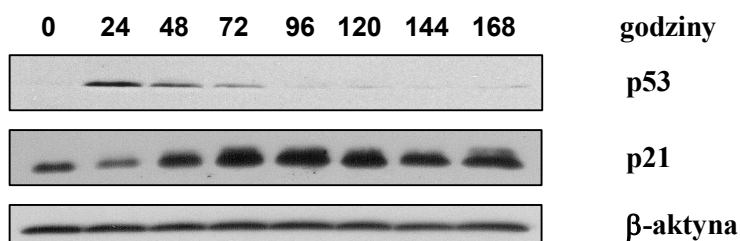
posiadające funkcjonalne białko p53, również będą ulegały starzeniu przy niższym stężeniu C-1748.



Rys. 69. Morfologia komórek LNCaP traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającemu wartości EC_{90} ($0.009 \mu\text{M}$), a następnie barwionych X-Gal. Charakterystyczne niebieskie zabarwienie cechuje komórki ulegające starzeniu.

Jak pokazuje Rys. 69, obniżenie stężenia C-1748 do wartości EC_{50} ($0.002 \mu M$) doprowadziło do uruchomienia procesu starzenia komórek LNCaP. Pierwsze komórki ludzkiego raka prostaty, wyraźnie wybarwione na kolor niebieski, a zatem wykazujące zwiększoną aktywność SA- β -galaktozydazy, pojawiły się po upływie 96 godzin inkubacji z badanym związkiem. Jednocześnie, komórki te były powiększone i prezentowały bardziej płaski kształt w porównaniu do komórek kontrolnych. W miarę wydłużania czasu inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 przybywało komórek posiadających charakterystyczne, niebieskie zabarwienie, co jednoznacznie wskazywało na indukcję przedwczesnego starzenia części komórek LNCaP przez badany związek. Należy jednak zauważyć, iż w porównaniu do komórek HCT116 p53^{+/+} (Rys. 54), mniejszy odsetek komórek LNCaP ulegał przyspieszonemu starzeniu.

W komórkach HCT116 p53^{+/+} ulegających starzeniu pod wpływem związku C-1748 (EC_{50}), dochodziło do zwiększenia poziomu zarówno białka p53, jak i p21 oraz związanego z tym faktem zahamowania proliferacji tychże komórek w fazie G1 ich cyklu życiowego (Rys. 55, 56 i 57). Dlatego też, w kolejnym etapie prowadzonych przeze mnie badań postanowiłam określić poziom obu wymienionych powyżej białek w komórkach LNCaP eksponowanych na działanie pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{50} . W tym celu wykorzystałam technikę Western blotting oraz przeciwciała anty-p53 i anty-p21.

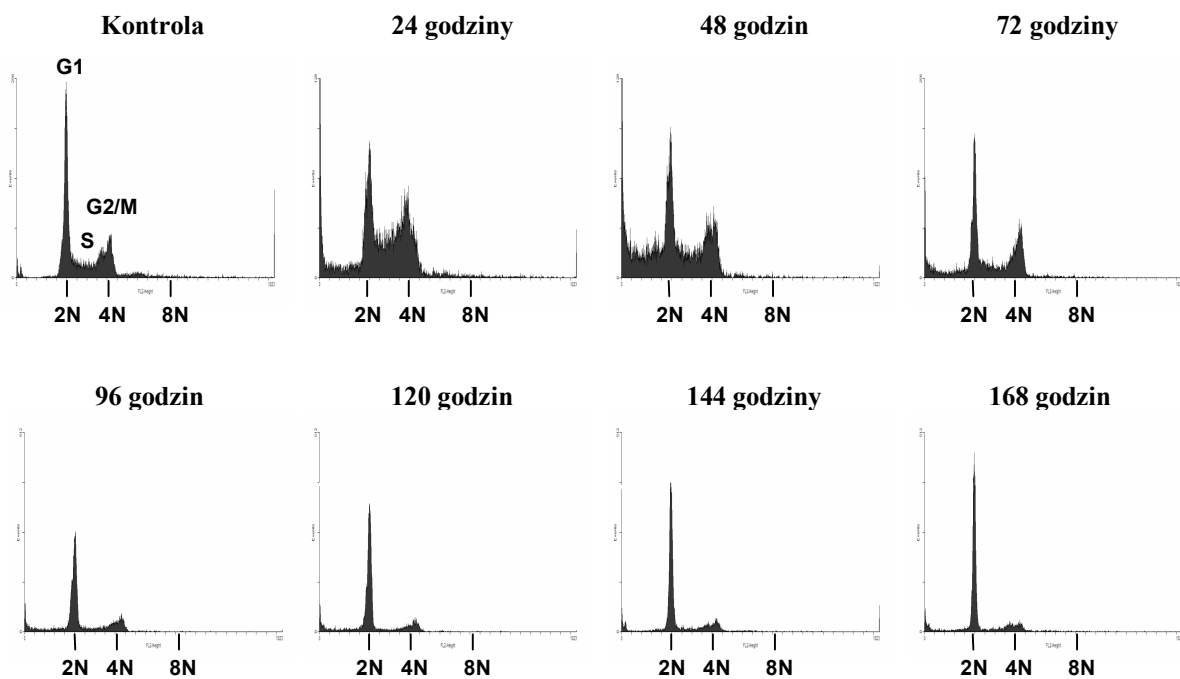


Rys. 70. Poziom białka p53 i p21 w komórkach LNCaP, kontrolnych oraz traktowanych związkiem C-1748 (EC_{50}) przez podaną liczbę godzin. Wynik przedstawia jedną z dwóch niezależnych analiz Western blotting. β -aktynę zastosowano w celu sprawdzenia równomiernego napełnienia studzienek.

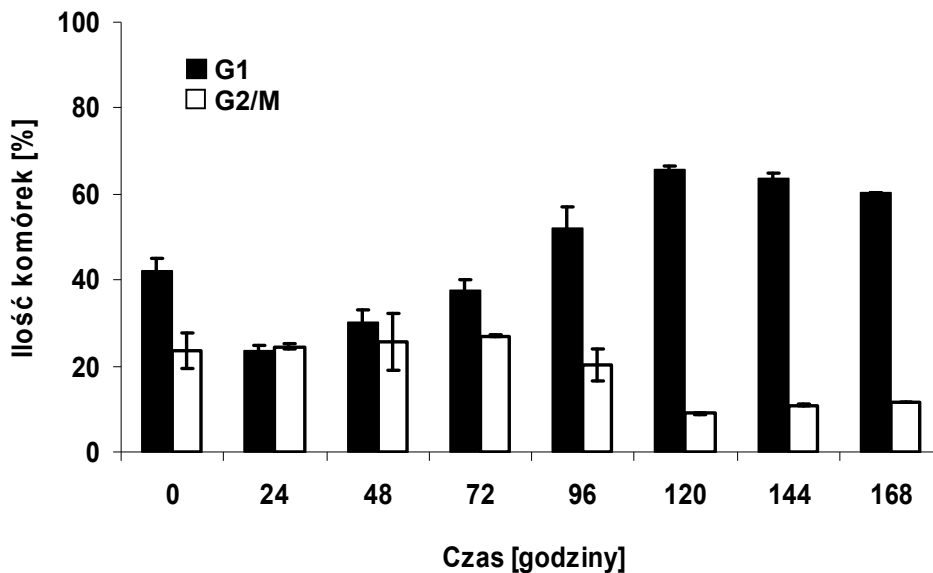
Jak pokazano na Rys. 70, poziom białka p53 w komórkach LNCaP nie traktowanych C-1748 był tak niski, że nie udało się go oznaczyć za pomocą techniki Western blotting, aczkolwiek było to możliwe już po upływie pierwszych 24 godzin ekspozycji na badany

związek. Po tym czasie inkubacji poziom białka p53 osiągał wartość maksymalną, a następnie sukcesywnie malał w miarę wydłużania czasu ekspozycji. Pomiędzy 96 a 168 godziną, białko to było praktycznie niewykrywalne. Jednocześnie, po upływie 48 godzin inkubacji z badanym związkiem, w porównaniu do komórek kontrolnych, przybywało białka p21, którego poziom sukcesywnie wzrastał w miarę wydłużania czasu ekspozycji na C-1748, osiągając wartość maksymalną po 96 godzinach (Rys. 70). Po upływie 120 i 144 godzin, ilość tego białka nieznacznie zmalała, a następnie utrzymywała się na stałym, wysokim poziomie. Uzyskane wyniki wskazują, iż białka p53 i p21, podobnie jak w przypadku linii HCT116 p53^{+/+}, mogą odgrywać istotną rolę w procesie przyspieszonego starzenia komórek LNCaP. W związku z powyższym, postanowiłam sprawdzić, w jaki sposób zmiany poziomu obu wymienionych białek wpłynęły na przebieg cyklu życiowego komórek ludzkiego raka prostaty, a zwłaszcza na zahamowanie ich proliferacji w fazie G1 lub G2/M.

Jak wynika z analizy przedstawionych poniżej histogramów (Rys. 71), komórki LNCaP ulegały wyraźnej akumulacji w fazie G1 cyklu życiowego począwszy od 96 godzin inkubacji z C-1748 (ok. 52%). Po upływie 120 godzin, ilość komórek zatrzymanych w fazie G1 wzrastała do ok. 66%, a następnie utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie w miarę wydłużania czasu ekspozycji na badany związek (Rys. 72). Jednocześnie, odsetek komórek LNCaP znajdujących się w fazie G2/M cyklu życiowego, w porównaniu do komórek kontrolnych, wzrastał nieznacznie w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji z C-1748 (ok. 27%), po czym spadał do wartości ok. 9% po upływie 120 godzin, a następnie utrzymywał się na mniej więcej stałym poziomie (Rys. 71 i 72). A zatem, uzyskane wyniki wskazują, iż komórki LNCaP traktowane pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC₅₀ ulegały zatrzymaniu w fazie G1 ich cyklu życiowego po dłuższych czasach inkubacji (od 96 godzin), podobnie jak to miało miejsce w przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}.



Rys. 71. Histogramy przedstawiające zmiany w przebiegu cyklu życiowego komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP traktowanych związkiem C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{50} ($0.002 \mu M$), przez określoną liczbę godzin. Oś X – fluorescencja emitowana przez jodek propidyny, określająca zawartość jądrowego DNA. Oś Y – ilość komórek.



Rys. 72. Procent komórek LNCaP, kontrolnych oraz inkubowanych ze związkiem C-1748 (EC_{50}), w poszczególnych fazach cyklu życiowego. Wykres przedstawia średnie z dwóch niezależnych eksperymentów wraz z odchyleniami standardowymi.

III.3.5. Podsumowanie badań dotyczących odpowiedzi komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

Analiza dystrybucji komórek LNCaP w ich cyklu życiowym, w połączeniu z obserwacją mikroskopową wykazały, iż pod wpływem pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (EC_{90}), w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji, doszło do uruchomienia śmierci komórkowej na drodze apoptozy, o czym świadczyło pojawienie się charakterystycznych dla tego procesu zmian w morfologii jąder wspomnianych komórek nowotworowych oraz postępująca degradacja DNA (obecność frakcji sub-G1). Co istotne, w odniesieniu do komórek obu linii HCT116, wielkość frakcji sub-G1, po krótkich czasach inkubacji, była w tym przypadku zdecydowanie najwyższa. Począwszy od 96 godzin ekspozycji na C-1748, komórki LNCaP, które nie uległy śmierci, zostały zatrzymane w fazach G1, S lub G2/M cyklu życiowego, co może wskazywać między innymi na pojawienie się populacji komórek opornych na działanie badanego związku lub uruchomienie mechanizmów naprawy DNA. Badanie zjawiska apoptozy w oparciu o znaczniki biochemiczne, takie jak translokacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej oraz aktywacja kaspazy-3 potwierdziło, iż to właśnie apoptoza odgrywa decydującą rolę w eliminacji komórek LNCaP, zwłaszcza w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji – po tym czasie ekspozycji ok. 49% całkowitej populacji komórek wykazywało zmiany typowe dla apoptozy (test aneksyna V/PI), podczas gdy frakcja komórek nekrotycznych nie przekroczyła 3%. Mikroskopowa analiza morfologii jąder komórkowych dodatkowo wskazała na brak obecności komórek zawierających mikrojądra, co dowodzi, iż komórki LNCaP nie ulegały katastrofie mitotycznej pod wpływem badanego związku. Co więcej, pochodna C-1748 nie indukowała autofagii we wspomnianych komórkach nowotworowych, o czym świadczył zarówno brak wzrostu w ilości kwaśnych organelli, jak również brak zmian w poziomie białek LC3-I oraz LC3-II w porównaniu do komórek kontrolnych. Komórki LNCaP traktowane C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} , nie ulegały również przedwczesnemu starzeniu. Jednakże, obniżenie stężenia badanego związku do wartości EC_{50} , doprowadziło do uruchomienia tego procesu w komórkach ludzkiego raka prostaty. Ponadto, podobnie jak w przypadku komórek HCT116 $p53^{+/+}$, w procesie przyspieszonego starzenia komórek LNCaP istotną rolę odgrywały białka p53 oraz p21.

Odpowiedź komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP na działanie pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 jest podobna do wyników uzyskanych dla komórek

HCT116 p53^{+/+}, co dodatkowo wskazuje na istotną rolę funkcjonalnego białka p53 w indukcji i przebiegu procesów takich jak apoptoza lub przyspieszone starzenie komórek.

IV. Część doświadczalna.

IV.1. Materiał doświadczalny.

IV.1.1. Badany związek przeciwnowotworowy.

Pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny o symbolu C-1748 (pełna nazwa związku to: 9-(2'-hydroksyloetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna), została zsyntetyzowana w postaci monochlorowodoru w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej przez dr Barbarę Wysocką-Skrzela. W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystalam roztwory badanego związku przygotowane w 50% (v/v) alkoholu etylowym.

IV.1.2. Linie komórkowe oraz materiały używane do prowadzenia hodowli komórkowej.

Linie komórkowe:

- ✓ HCT8 - rak jelita grubego pochodzenia ludzkiego.
- ✓ HT29 - rak jelita grubego pochodzenia ludzkiego.
- ✓ HCT116 p53^{+/+} - rak jelita grubego pochodzenia ludzkiego posiadający „dziki” gen *p53*, kodujący funkcjonalne białko p53.
- ✓ HCT116 p53^{-/-} - rak jelita grubego pochodzenia ludzkiego z knock-out'em genu *p53*.
- ✓ LNCaP - rak prostaty pochodzenia ludzkiego.

Komórki HCT8 oraz LNCaP udostępnił naszemu zespołowi dr R. K. Tiwari (Department of Microbiology and Immunology, New York Medical College, Valhalla, USA), zaś komórki HT29 udostępnił dr D. Banerjee (Department of Medicine and Pharmacology, Cancer Institute of New Jersey, New Jersey, USA). Komórki obu linii HCT116 zostały otrzymane dzięki uprzejmości dr B. Vogelsteina (Johns Hopkins Medical University, Baltimore, Maryland).

Materiały używane do prowadzenia hodowli komórkowej:

- ✓ Pożywka McCOY'S 5A - SIGMA, St Louis, MO, USA.
- ✓ Pożywka RPMI 1640 - SIGMA, St Louis, MO, USA.

- ✓ Płodowa surowica bydlęca (ang. *Fetal Bovine Serum, FBS*) inaktywowana termicznie w temperaturze 56°C przez 30 minut - GIBCO, Scotland, UK.
- ✓ Wodorowęglan sodu - SIGMA, St Louis, MO, USA.
- ✓ Trypsyna - EDTA - SIGMA, St Louis, MO, USA.
- ✓ Antybiotyki: penicylina i streptomycyna - SIGMA, St Louis, MO, USA.

IV.1.3. Stosowane związki chemiczne i zestawy.

- ✓ 3-metyloadenina, 5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktopyranozyd (X-Gal), APS (nadsiarazan amonu), aldehyd o-ftalowy, aldehyd β -fosfoglicerynowy, β -merkaptoetanol, BSA (surowicza albumina wołowa), deoksychofan sodu, EDTA (sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego), formaldehyd, glutaraldehyd, GSH (zredukowana forma glutationu), HEPES (kwas 4-(2-hydroxyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy), Igepal CA-630, KCl, $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$, KH_2PO_4 , melatonina, $MgCl_2$, MTT, N-acetylo-L-cysteina, NaCl, NaF, Na_2HPO_4 , NaN_3 , ortowanadan sodu, PMSF (fluorek fenylometylosulfonowy), SDS (sodowy siarczan dodecyłu), TEMED (N, N, N', N'- tetraetylenodiamina), Tris-Base (tris(hydroksylometylo)aminometan) i jego chlorowodorek - Tris-HCl, Tween 20 (monolaurynian polioksytylenosorbitanu), Triton X-100 - SIGMA, St Louis, MO, USA.
- ✓ Annexin-V-FLUOS Staining Kit; In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein – Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Niemcy.
- ✓ Bufor Laemmli, wzorzec wielkości białek, zestaw do oznaczania stężenia białka (Bradford Protein Assay Kit 2) - Bio-Rad, Herkules, USA.
- ✓ Zestaw ECL (Enhanced Chemiluminescence) - Pierce Biotechnology, Rocford, USA.
- ✓ Zestaw do oznaczania aktywności kaspazy-3 (Active Caspase-3 Apoptosis Kit) -BD Pharmingen, San Diego, USA.

IV.1.4. Barwniki i enzymy.

- ✓ DAPI - (4, 6-diaminoino-2-fenylindol) - SIGMA, St Louis, MO, USA.
- ✓ Dihydrorodamina 123 - SIGMA, St Louis, MO, USA.
- ✓ Dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny - SIGMA, St Louis, MO, USA.

- ✓ JC-1 (jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny) - Molecular Probes, Eugene, USA.
- ✓ Jodek propidyny - SIGMA, St Louis, MO, USA.
- ✓ Oranz akrydyny - SIGMA, St Louis, MO, USA.
- ✓ LysoTracker Red DND-99 - Molecular Probes, Eugene, USA.
- ✓ RNaza A - SIGMA, St Louis, MO, USA.

IV.1.5. Przeciwciała.

- ✓ Mysie monoklonalne przeciwciało anti- β -aktyna, królicze anti-mysie przeciwciało skoniugowane z HRP - SIGMA, St Louis, MO, USA.
- ✓ Królicze monoklonalne przeciwciało anti-aktywna kaspaza-3 skoniugowane z fluoresceiną - BD Pharmingen, San Diego, USA.
- ✓ Królicze poliklonalne przeciwciało anti-Cdc2 (P-Tyr15), kozie anti-królicze przeciwciało skoniugowane z HRP - Cell Signaling, Beverly, USA.
- ✓ Mysie monoklonalne przeciwciało anti-cyklina B1 - Santa Cruz Biotechnology, USA.
- ✓ Królicze poliklonalne przeciwciało anti-LC3B, kozie anti-królicze przeciwciało skoniugowane z HRP – SIGMA, St Louis, MO, USA.

IV.2. Metody doświadczalne.

IV.2.1. Hodowla komórek nowotworowych.

Komórki ludzkich raków okrężnicy HT29, HCT116 p53^{+/+} i HCT116 p53^{-/-} hodowałam w pożywce McCoy's 5A, natomiast komórki ludzkiego raka okrężnicy HCT8 oraz ludzkiego raka prostaty LNCaP hodowałam w pożywce RPMI 1640, we wszystkich przypadkach z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej, a także z dodatkiem antybiotyków (streptomycyna 0,1 μ g/ml, penicylina 100 U/ml). Wyżej wymienione komórki nowotworowe hodowałam w inkubatorze CO₂, w atmosferze 5% CO₂, 95% wilgotności, w temperaturze 37°C. Komórki rosły w postaci monowarstwy, a czas ich podwojenia, w stosowanych przeze mnie warunkach, wynosił 24 godziny. Podczas pasaży oraz w trakcie prowadzonych eksperymentów, do odklejania komórek od naczynia hodowlanego używałam 10-krotnie rozcieńzonego za pomocą PBS-u (pH=7.4), komercyjnie dostępnego roztworu trypsyny-EDTA (SIGMA, St Louis, MO, USA).

IV.2.2. Detekcja reaktywnych form tlenu (RFT) w cytoplazmie lub w mitochondriach komórek HCT8 i HT29 traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, przy wykorzystaniu techniki cytometrii przepływowej.

Wytwarzanie reaktywnych form tlenu w cytoplazmie lub w mitochondriach komórek ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29 przez pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 stwierdzałam na podstawie pomiarów zmian fluorescencji utlenionych form odpowiednio dioctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA) [Carranza E. S. i Pantano P., 2003; Macip S. i wsp., 2003; Han Y. H. i Park W. H., 2010] oraz dihydrorodaminy 123 (DHR 123) [Henderson L. M. i Chappell J. B., 1993; Macip S. i wsp., 2003] i przy zastosowaniu techniki cytometrii przepływowej (nie fluoryzujące formy wspomnianych wskaźników, pod wpływem RFT, zostają utlenione do postaci fluoryzujących, co można mierzyć za pomocą cytometru przepływowego).

Komórki HCT8 lub HT29 (1×10^6 /10 ml pożywki hodowlanej) wysiewałam na 100 mm płytki Petriego na 24 godziny przed dodaniem związku, w celu ich przyklejenia się do podłoża, a następnie inkubowałam z badaną pochodną w stężeniach biologicznie istotnych (EC₉₀), przez określoną ilość godzin. Po zakończeniu inkubacji, komórki płukałam dwukrotnie zimnym PBS-em (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.0 mM Na₂HPO₄), wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C) i zawieszałam w 50 µl roztworu dioctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA) o stężeniu 20 µM lub w 50 µl roztworu dihydrorodaminy 123 (DHR 123) o stężeniu 10 µM. Całość inkubowałam przez 30 minut w ciemności i w temperaturze 37°C, a następnie ponownie płukałam PBS-em [Macip S. i wsp., 2003]. Pomiarów zmian fluorescencji emitowanej przez utlenioną formę H₂DCFDA oraz DHR 123 (w obu przypadkach λ_{ex} - 488 nm, λ_{em} - 520 nm) dokonałam przy użyciu cytometru przepływowego FACScan firmy Becton Dickinson (dzięki uprzejmości Pracowni Immunologii Komórkowej i Molekularnej, Katedry Zakładu Fizjopatologii Akademii Medycznej w Gdańsku). Każdorazowo, analizie poddawałam 10 000 komórek na próbkę. Uzyskane wyniki analizowałam wykorzystując oprogramowanie WinMDI (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

IV.2.3. Oznaczanie poziomu zredukowanej formy glutationu (GSH) w komórkach HCT8 i HT29 metodą spektrofluorymetryczną.

Komórki HCT8 lub HT29 (1×10^6 /100 mm płytka Petriego), po zakończonej inkubacji ze związkami (EC_{90}) przez określoną liczbę godzin, płukałam dwukrotnie zimnym PBS-em, wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C), zawieszałam w 250 μ l buforu lizującego (5% TCA, 1mM EDTA, 0.1 M HCl zmieszane 1:1:1, v/v/v) i pozostawiałam na 5 minut w lodzie. W kolejnym etapie całość wirowałam (2500g, 20 minut, 4°C), a następnie supernatant (20 μ l uzupełnione buforem lizującym do 100 μ l) mieszałam z 1.8 ml buforu GSH (0.1 M bufor fosforanowy pH=8.0, 5 mM EDTA,) i 0.1 ml aldehydu o-ftalowego (roztwór 1 mg/ml w etanolu) [Puri R. N. i Roskoski R., 1988; Scatudo C. R. J., 1988]. Pomiaru fluorescencji tak przygotowanych próbek dokonałam przy długości fali wzbudzenia 350 nm i długości fali emisji 420 nm na spektrofluorymetrze PerkinElmer LS-5B. W celu określenia stężenia GSH w badanych próbkach posłużyłam się krzywą standardową, sporządzoną dla próbek o znanych stężeniach zredukowanej formy glutationu, przygotowanych według powyższej procedury. Przedstawiając graficznie wyniki, stężenie GSH w komórkach kontrolnych przyjęto za 100% i w stosunku do nich wyznaczono % obniżenia poziomu tego antyoksydanta w komórkach traktowanych badanym związkiem.

IV.2.4. Badanie wpływu generowanych RFT na cytotoksyczność pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 wobec komórek HCT8 i HT29.

Wpływ reaktywnych form tlenu na aktywność cytotoksyczną pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 wobec komórek ludzkiego raka okrężnicy HCT8 i HT29 badałam przy użyciu dwóch różnych antyoksydantów, a mianowicie: N-acetylo-L-cysteiny (NAC) [Lu H.-R. i wsp., 2005] oraz melatoniny [Bang J. H. i wsp., 2004].

Komórki znajdujące się w fazie logarytmicznego wzrostu (zarówno HCT8 jak i HT29) wysiewałam na 24-studzienkowe płytki hodowlane w ilości 20 tys. komórek w 2 ml pożywki na studzienkę. Po upływie 24 godzin, gdy komórki przykleiły się do podłoża, do studzienek dodawałam roztworu N-acetylo-L-cysteiny lub melatoniny o wzrastających stężeniach, na okres 1 godziny. Po zakończeniu preinkubacji z odpowiednim antyoksydantem, do studzienek dodawałam związku C-1748 o stężeniach odpowiadających wartościom EC_{90} . Do komórek kontrolnych zaś dodawałam 50% etanol. Po upływie 72 godzin od momentu

dotychczas, dodania związku, przeżywalność komórek traktowanych badaną pochodną określałam za pomocą testu MTT [Ghavami S. i wsp., 2004].

Test MTT:

Po zakończeniu 72-godzinnej inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, do każdej studzienki dodawałam po 200 μ l roztworu MTT o stężeniu 4 mg/ml i pozostawiałam na 4 godziny w temperaturze 37°C. Następnie odsysałam pożywkę, suszyłam płytki i dodawałam do studzienek po 2 ml DMSO, po czym umieszczałam całość na wytrząsarce w celu rozpuszczenia kryształów formazanu. Absorbencję tak przygotowanych próbek mierzyłam za pomocą czytnika płytek DigiScan firmy Asys Hitech przy długości fali 550 nm.

IV.2.5. Oznaczanie aktywności biologicznej związku C-1748 wobec komórek nowotworowych HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} i LNCaP w oparciu o liczenie ilości komórek.

Aktywność biologiczną pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny o symbolu C-1748 wobec komórek HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} i LNCaP oznaczałam po 72-godzinnej, ciągłej inkubacji z różnymi stężeniami badanego związku. Komórki znajdujące się w fazie logarytmicznego wzrostu wysiewałam na 24-studzienkowe płytki hodowlane (20 tys./2 ml pożywki na studzienkę) na 24 godziny przed dodaniem związku, aby mogły się one przykleić do podłoża. Po upływie 72 godzin od momentu dodania związku, komórki liczyłam przy pomocy licznika Coulter-Counter model ZBI [Bhuyan K. i wsp., 1992]. Ilość komórek kontrolnych przyjmowałam za 100% i w stosunku do nich wyznaczałam % zahamowania wzrostu komórek traktowanych roztworami pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748. Następnie sporządziłam wykresy zależności wzrostu komórek od stężenia związku, na podstawie których wyznaczyłam wartości EC₅₀ i EC₉₀, tj. wartości stężeń związku, przy których proliferacja komórek HCT116 oraz LNCaP w stosunku do komórek kontrolnych jest zahamowana odpowiednio w 50 % oraz 90 %.

IV.2.6. Badanie wpływu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na cykl życiowy komórek nowotworowych przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej.

Badanie wpływu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 na cykl życiowy komórek nowotworowych przeprowadziłam w oparciu o analizę zawartości DNA w komórkach wybarwionych jodkiem propidyny [Giunta M. i Pucillo C., 1996].

Komórki HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} lub LNCaP (1x10⁶/10 ml pożywki hodowlanej) wysiewałam na 100 mm płytki Petriego na 24 godziny przed dodaniem związku, w celu ich przyklejenia się do podłoża, a następnie inkubowałam je z badaną pochodną w stężeniach biologicznie istotnych (EC₅₀, EC₉₀ i 5xEC₉₀ dla komórek obu linii HCT116 oraz EC₅₀ i EC₉₀ dla komórek LNCaP), przez określoną ilość godzin. Po zakończeniu inkubacji, komórki płukałam dwukrotnie zimnym PBS-em, wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C) i utrwalalam 80% (v/v) roztworem alkoholu etylowego w temperaturze -20°C, przez co najmniej jedną dobę. Utrwalone komórki ponownie płukałam dwukrotnie zimnym PBS-em, wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C), a następnie barwiłam za pomocą mieszaniny barwiącej zawierającej PBS, jodek propidyny (20 µg/ml) oraz RNazę A (100 µg/ml) przez 30 minut w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła. Tak przygotowane próbki analizowałam na cytometrze przepływowym FACScan firmy Becton Dickinson, przy fali wzbudzenia 488 nm i fali emisji 600-650 nm. Analizę wyników przeprowadziłam w oparciu o histogramy przedstawiające dystrybucję komórek w poszczególnych fazach cyklu życiowego, które sporządziłam z wykorzystaniem oprogramowania WinMDI (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

IV.2.7. Obserwacje zmian w morfologii komórek nowotworowych przy wykorzystaniu techniki mikroskopii fluorescencyjnej.

Komórki HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} lub LNCaP (1x10⁶/100 mm płytki Petriego), po zakończonej inkubacji ze związkiem (EC₉₀ i 5xEC₉₀ dla komórek obu linii HCT116 oraz EC₉₀ dla komórek LNCaP), płukałam dwukrotnie zimnym PBS-em i wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C). Następnie, z każdej próbki pobierałam po 300 tys. komórek i nawirowywałam na szkiełka mikroskopowe przy pomocy cytowirówki (CytoFuge 2) (700 rpm, 4 minuty). Tak przygotowane preparaty utrwalalam przez 15 minut w roztworze Carnoy (metanol : lodowaty kwas octowy w stosunku 3:1), a następnie płukałam je przez 5 minut w PBS-ie. W kolejnym etapie komórki barwiłam za pomocą wiążącego się z chromatyną fluorochromu DAPI

(stężenie końcowe 0,1 µg/ml), przez 5 minut, w ciemności i w temperaturze pokojowej. Ostatnim etapem przygotowania preparatów do obserwacji mikroskopowej było 5-minutowe płukanie w PBS-ie. Zmiany morfologiczne w komórkach nowotworowych obserwowałam przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego firmy OLYMPUS BX60, w powiększeniu 400x. Fotografie przygotowanych preparatów wykonałam przy użyciu kamery, wykorzystując w tym celu oprogramowanie Studio Lite (Pixera Corporation, USA). W przypadku komórek HCT116 p53^{-/-} określałam procentowy udział komórek prezentujących cechy morfologiczne typowe dla apoptozy lub katastrofy mitotycznej, każdorazowo licząc około 500 komórek.

IV.2.8. Analiza zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej komórek nowotworowych traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

Badanie charakterystycznych dla apoptozy zmian w budowie błony cytoplazmatycznej komórek nowotworowych, eksponowanych na działanie związku C-1748, przeprowadziłam wykorzystując zdolność fosfatydyloseryny do wiązania się z aneksyną V, skoniugowaną z fluoresceiną. Dodatkowo, jednoczesne zastosowanie aneksyny V-FITC oraz jodku propidyny (PI) umożliwiło rozróżnienie, przy użyciu cytometrii przepływowej, komórek żywych (aneksyna V-/PI-) od tych we wczesnej fazie apoptozy (aneksyna V+/PI-) oraz od komórek w późnej fazie apoptozy i ulegających wtórnej nekrozie (aneksyna V+/PI+), jak również komórek typowo nekrotycznych (aneksyna V-/PI+) [Darżynkiewicz Z. i wsp., 1996].

Zawiesinę komórek HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} lub LNCaP (1x10⁶/10 ml pożywki hodowlanej) wysiewałam na 100 mm płytki Petriego. Po upływie 24 godzin, podczas których komórki przykleiły się do podłoża, poddawałam je inkubacji ze związkiem w stężeniach biologicznie istotnych (EC₉₀ i 5xEC₉₀ dla komórek obu linii HCT116 oraz EC₉₀ dla komórek HCT8 i LNCaP), przez określoną ilość godzin. Po zakończeniu inkubacji, komórki płukałam dwukrotnie zimnym PBS-em i wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C), a następnie dodawałam do próbek po 50 µl mieszaniny barwiącej z zestawu Annexin-V-FLUOS Staining Kit (20 µl aneksyny V, 20 µl jodku propidyny oraz 1160 µl buforu HEPES). Całość inkubowałam przez 15 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji do próbek dodawałam po 350 µl buforu HEPES, po czym poddawałam je analizie cytometrycznej. Pomiar intensywności fluorescencji emitowanej przez jodek propidyny (fluorescencja czerwona, dł. fali emisji 600-650 nm) oraz fluoresceinę, skoniugowaną z aneksyną V (fluorescencja zielona, dł. fali emisji 530-550 nm), prowadziłam przy fali wzbudzenia o długości 488 nm, przy wykorzystaniu cytometru przepływowego. Cytogramy

przedstawiające zmiany w budowie i przepuszczalności błony plazmatycznej analizowałam przy wykorzystaniu oprogramowania WinMDI (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

IV.2.9. Cytometryczna analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$.

Badanie zmian potencjału $\Delta\Psi_m$ przeprowadziłam według metody opisanej przez Cossarizza A. i wsp., która opiera się na wykorzystaniu kationowego barwnika JC-1. W komórkach o wysokim potencjale mitochondrialnym JC-1 tworzy agregaty, wykazujące fluorescencję pomarańczową. W wyniku depolaryzacji błony mitochondrialnej powstają monomery JC-1, wykazujące fluorescencję zieloną [Cossarizza A. i wsp., 1993].

Komórki HCT116 p53^{+/+} lub HCT116 p53^{-/-} ($1 \times 10^6/100$ mm płytka Petriego, po zakończonej inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (EC₉₀), płukałam dwukrotnie zimnym PBS-em, wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C) i dodawałam 1 ml świeżej pożywki McCOY'S 5A. Zawiesinę komórek (0,5 mln/ml) barwiłam za pomocą barwnika JC-1 (10 µg/ml) przez 15 minut, w temperaturze 37°C i bez dostępu światła, po czym płukałam dwukrotnie PBS-em (1000 rpm, 5 minut, 4°C). Pomiar fluorescencji emitowanej przez agregaty (fluorescencja pomarańczowa: długość fali emisji 560-590 nm) oraz monomery JC-1 (fluorescencja zielona: długość fali emisji 530-550 nm) prowadziłam na cytometrze przepływowym, przy fali wzbudzenia o długości 488 nm. Uzyskane cytogramy, przedstawiające zmiany polaryzacji błony mitochondrialnej w komórkach obu linii HCT116, analizowałam wykorzystując oprogramowanie WinMDI (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

IV.2.10. Badanie zmian ilości komórek nowotworowych posiadających aktywną kaspazę-3.

Aktywację kaspazy-3 badałam przy wykorzystaniu techniki cytometrii przepływowej oraz komercyjnie dostępnego zestawu Active Caspase-3 Apoptosis kit, którego używałam kierując się zaleceniami producenta (BD Pharmingen, San Diego, USA).

Komórki HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} lub LNCaP ($1 \times 10^6/100$ mm płytka Petriego), po zakończonej inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (EC₉₀), płukałam dwukrotnie zimnym PBS-em, wirowałam (1000 rpm, 5 minut, 4°C), utrzymywałam w buforze Cytotfix/CytopermTM (4% formaldehyd z dodatkiem saponiny) przez 20 minut w lodzie, a następnie płukałam dwukrotnie buforem Perm/WashTM (FBS, NaN₃, saponina) (1000 rpm,

5 minut, 4°C) i zawieszałam w 120 µl tegoż buforu, zawierającego 20 µl przeciwciała anty-aktywna kaspaza-3, związanego z fluoresceiną. Po zakończeniu 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła, komórki ponownie płukałam dwukrotnie buforem Perm/WashTM. Pomiaru intensywności fluorescencji emitowanej przez fluoresceinę, skoniugowaną z przeciwciałem anty-aktywna kaspaza-3 (fluorescencja zielona: długość fali emisji 530-550 nm), dokonałam na cytometrze przepływowym, przy fali wzbudzenia o długości 488 nm. Uzyskane cytogramy analizowałam wykorzystując oprogramowanie WinMDI (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

IV.2.11. Obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach nowotworowych, traktowanych pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

Obserwacje zmian w ilości kwaśnych organelli w komórkach nowotworowych poddanych działaniu związku C-1748 przeprowadziłam przy zastosowaniu dwóch barwników: oranżu akrydyny (AO) [Erdal H. i wsp., 2005] lub barwnika LysoTracker Red DND-99 [Park K.-J. i wsp., 2007].

Barwienie komórek nowotworowych oranżem akrydyny.

Komórki HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} lub LNCaP (1x10⁶/10 ml pożywki hodowlanej) wysiewałam na 100 mm płytki Petriego na 24 godziny, w celu ich przyklejenia się do podłoża, a następnie poddawałam je inkubacji z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC₉₀, przez określoną ilość godzin. Po zakończeniu inkubacji ze związkiem, do płytek Petriego dodawałam oranż akrydyny (stężenie końcowe 5µg/ml) i inkubowałam całość przez 15 minut w ciemności, w inkubatorze CO₂. W kolejnym etapie komórki odklejałam od podłoża za pomocą trypsyny, płukałam dwukrotnie PBS-em (1000 rpm, 5 minut, 4°C) i nosiłam zawiesinę komórek (3x10⁵) na szkiełka mikroskopowe przy użyciu cytowirówki (CytoFuge 2) (700 rpm, 4 minuty). Przygotowane w ten sposób preparaty analizowałam za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS BX60, przy powiększeniu 400x. Fotografie preparatów wykonałam przy użyciu kamery, wykorzystując w tym celu oprogramowanie Studio Lite (Pixera Corporation, USA).

Barwienie komórek nowotworowych barwnikiem LysoTracker Red DND-99.

Komórki HCT116 p53^{-/-} (1x10⁵/5 ml pożywki hodowlanej) wysiewałam na 50 mm płytki Petriego zawierające szkiełka mikroskopowe i po przyklejeniu się komórek do podłoża inkubowałam je z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu biologicznie istotnym (EC₉₀), przez określoną ilość godzin (przy braku lub w obecności inhibitora autofagii - 3-metyloadeniny, o stężeniu końcowym równym 0,125 µM). Po zakończonej inkubacji ze związkami, komórki przyklejone do szkiełek mikroskopowych przemywałam dwukrotnie ciepłą pożywką McCoy'S 5A, a następnie umieszczałam je w mieszaninie barwiącej, zawierającej pożywkę hodowlaną, fluorochrom DAPI (0.1 µg/ml) oraz barwnik wybarwiający lizosomy – LysoTracker Red DND-99 (0.5 µM). Całość barwiłam przez 30 minut w ciemności, w temperaturze 37°C, po czym przemywałam dwukrotnie ciepłą pożywką hodowlaną. Tak przygotowane preparaty obserwowałam przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego firmy OLYMPUS BX60, w powiększeniu 400x. Fotografie tychże preparatów wykonałam przy użyciu kamery, wykorzystując w tym celu oprogramowanie Studio Lite (Pixera Corporation, USA).

IV.2.12. Oznaczanie aktywności SA-β-galaktozydazy w komórkach nowotworowych.

Oznaczanie aktywności SA-β-galaktozydazy (SA-β-gal ang. *senescence-associated β-galactosidase*), której podwyższona aktywność jest powszechnie uznawanym wskaźnikiem procesu starzenia komórek, przeprowadziłam w oparciu o metodę opisaną przez Dimri'ego i wsp. [Dimri G. P. i wsp., 1995].

Komórki HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} oraz LNCaP (1x10⁵/5 ml pożywki hodowlanej) wysiewałam na 50 mm płytki Petriego zawierające szkiełka mikroskopowe i po przyklejeniu się komórek do podłoża inkubowałam je z pochodną 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC₅₀ lub EC₉₀), przez określoną ilość godzin. Po zakończonej inkubacji ze związkami, komórki przyklejone do szkiełek mikroskopowych przemywałam trzykrotnie ciepłym PBS-em o pH=7.2 i utrwalalam przez 5 min w roztworze PBS-u zawierającym 0.2% aldehydu glutarowego oraz 2% formaldehydu. W kolejnym etapie komórki przemywałam dwukrotnie ciepłym PBS-em o pH=6.0, a następnie inkubowałam przez 12 godzin (37°C, bez CO₂) w roztworze barwiącym, zawierającym 1 mg/ml X-Gal oraz bufor SA (5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 30 mM roztwór kwasu cytrynowego i Na₂HPO₄ pH=6.0). Po zakończeniu inkubacji, komórki przemywałam dwukrotnie PBS-em i analizowałam w świetle widzialnym przy pomocy

mikroskopu OLYMPUS BX60. Fotografie przygotowanych preparatów wykonałam przy użyciu kamery, wykorzystując w tym celu oprogramowanie Studio Lite (Pixera Corporation, USA).

IV.2.13. Immunodetekcja białek metodą Western blotting.

- ✓ Przygotowanie lizatów komórkowych.

Komórki (1×10^6 /100 mm płytką Petriego), po zakończonej inkubacji ze związkiem (EC₉₀) przez określoną ilość godzin, przemywałam dwukrotnie zimnym PBS-em (1000 rpm, 5 minut, 4°C), a następnie poddawałam lizie w buforze lizującym (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Igepal CA-630, 0.5% deoksychohan sodu, 50 mM Tris-HCl pH=8.0), zawierającym dodatkowo inhibitory fosfataz (50 mM NaF, 1mM PMSF, 1 mM ortowanadan sodu, 50 mM aldehyd β-fosfoglicerynowy) oraz inhibitory proteaz (Protease Inhibitor Cocktail Set III). Lizę komórek prowadziłam przez 30 minut w temperaturze 4°C. Tak przygotowane lizaty komórkowe wirowałam przy 14 000 rpm, w 4°C, przez 15 minut, a następnie oznaczałam w nich stężenie białka całkowitego metodą Bradford [Bradford M. M, 1976], wykorzystując w tym celu zestaw Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit 2.

- ✓ Elektroforeza SDS-PAGE.

Próbki zawierające odpowiednią ilość białka całkowitego (30 µg dla P-Tyr 15 Cdc2, LC3B, p53 i p21 oraz 40 µg dla cykliny B1) łączyłam z równą objętością buforu Laemmli (62.5 mM Tris-HCl pH=6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 0.01% błękit bromofenolowy), denaturowałam przez 5 minut w temperaturze 95°C i poddawałam elektroforezie w żelu poliakrylamidowym (5% żel zagęszczający; 12% żel rozdzielający dla cykliny B1 i białka p53; 15% żel rozdzielający dla P-Tyr 15 Cdc2, LC3B i białka p21). Elektroforezę prowadziłam przez 15 minut przy 90 V, a następnie przez 120 minut przy 120 V w buforze zawierającym 25 mM Tris-Base o pH=8.3, 192 mM glicyny i 0.1% SDS.

✓ Immunobarwienie (Immunoblotting).

Po zakończeniu elektroforezy, przeprowadziłam transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową, wykorzystując w tym celu metodę tzw. elektrotransferu półsuchego. Transfer białek, po uprzednim nasączeniu żelu, membrany oraz bibuły Whatman 3 mm w buforze zawierającym 25 mM Tris-Base o pH=8.3, 192 mM glicyny, 20% metanolu, prowadziłam przez 1 godzinę przy stałym natężeniu prądu 8 mA/cm². Po zakończonym transferze, blokowałam potencjalne miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał poprzez umieszczenie membrany w buforze blokującym (50 mM Tris-HCl o pH=7.5, 120 mM NaCl, 5% (w/v) odtłuszczonego mleka w proszku) na dwie godziny w temperaturze pokojowej. Następnie, membranę płukałam trzykrotnie po 15 minut w buforze TBS-T (150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 10 mM Tris-HCl o pH=7.4) i inkubowałam z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym, zawieszonym w buforze TBS-T z dodatkiem 0.5% (w/v) odtłuszczonego mleka w proszku lub 0.5% (w/v) BSA (dla P-Tyr 15 Cdc2), przez noc w temperaturze 4°C. Po kolejnym płukaniu w TBS-T (3 x 15 minut), membranę inkubowałam w buforze TBS-T z dodatkiem 0.5% (w/v) odtłuszczonego mleka w proszku, zawierającym odpowiednie przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową. Inkubację prowadziłam przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, łagodnie wytrząsając. Lokalizację białek na błonie przeprowadziłam stosując substrat luminescencyjny dla peroksydazy chrzanowej (zestaw ECL), z detekcją sygnału po odpowiednim czasie ekspozycji kliszy fotograficznej ECL Hyperfilm (Kodak, Polska). W celu weryfikacji równomiernego napełnienia studzienek podczas elektroforezy, oznaczałam poziom aktywności. W związku z tym, po zakończonej detekcji ECL, membranę płukałam trzykrotnie w buforze TBS-T przez 5 minut, a następnie inkubowałam w roztworze 0.2 M NaOH przez 5 minut, po czym ponownie płukałam buforem TBS-T (3 x 15 minut). Tak przygotowaną membranę blokowałam w buforze blokującym i powtarzałam procedurę inkubacji z odpowiednimi przeciwciałami. Przeciwciała pierwszorzędowe zostały użyte w następujących rozcieńczeniach: anty Cdc2 (P-Tyr 15) (1:1000); anty cyklina B1 (1:500); anty LC3B (1:1000); anty p21 (1:200); anty p53 (1:10000). Przeciwciała drugorzędowe zostały użyte w następujących rozcieńczeniach: dla anty Cdc2 (P-Tyr 15) (1:2000); dla anty cyklina B1 i anty aktywności (1:10000); dla anty LC3B (1:16000); dla anty p21 i anty p53 (1: 2000).

V. Streszczenie i wnioski.

Zrealizowana przeze mnie praca stanowi kontynuację badań prowadzonych przez zespół naukowy z Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, zmierzających do scharakteryzowania mechanizmu działania aktywnej przeciwnowotworowo pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, która jest obecnie przygotowywana do I fazy badań klinicznych.

Dotychczasowe badania wykazały, iż związek C-1748 interkaluje do DNA i po uprzedniej aktywacji metabolicznej wiąże się z nim kowalencyjnie tworząc międzylańcuchowe wiązania sieciujące [Szostek A., 2003; Dyrz A. i wsp., 2004; Wiśniewska A. i wsp., 2004]. O ile zatem w znacznym stopniu scharakteryzowano podstawowe mechanizmy działania C-1748 na poziomie molekularnym, o tyle badania prowadzone na różnych modelach komórkowych nie doprowadziły do tej pory do stworzenia pełnego i konsekwentnego obrazu odnośnie mechanizmu biologicznego działania badanej pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny. Badania przeprowadzone uprzednio w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej wykazały między innymi, iż komórki ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29, poddane działaniu C-1748 w stężeniach biologicznie istotnych (EC_{90}), umierały na drodze apoptozy, przy czym proces ten przebiegał ze znacznie większą intensywnością w przypadku komórek HCT8. Ponadto, część komórek HCT8 ulegała procesowi starzenia, czego nie obserwowano w przypadku komórek HT29 [Augustin E. i wsp., 2010]. Wyraźne różnice w efektach działania badanego związku na komórki dwóch różnych linii tego samego rodzaju nowotworu - raków jelita grubego – mogły po części wynikać z odmiennego statusu genu *p53* w tychże komórkach (komórki linii HCT8 posiadają bowiem funkcjonalny gen *p53*, podczas gdy komórki linii HT29 posiadają zmutowany gen *p53* [Petak I. i wsp., 2000]). Prowadzenie dalszych badań nad mechanizmem działania C-1748, szczególnie na poziomie odpowiedzi komórkowej, wydaje się być uzasadnione, zwłaszcza, iż związek ten przechodzi obecnie zaawansowane badania przedkliniczne.

Głównym celem prezentowanej pracy doktorskiej było określenie odpowiedzi komórek wybranych linii nowotworowych na działanie pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748. Realizacja tego celu obejmowała zarówno zbadanie wpływu związku C-1748 na cykl życiowy komórek nowotworowych, jak również określenie zdolności tejże pochodnej do indukcji apoptozy, katastrofy mitotycznej, autofagii i przedwczesnego starzenia komórkowego oraz zbadanie roli białka p53 w tych procesach.

Celem o znaczeniu pobocznym było zbadanie zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji reaktywnych form tlenu w komórkach wybranych linii nowotworowych oraz określenie znaczenia tego zjawiska dla aktywności biologicznej badanego związku.

Pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w badaniach *in vitro* cechuje się wysoką aktywnością cytotoksyczną wobec komórek linii nowotworu prostaty, a w badaniach *in vivo* wykazuje wysoką aktywność przeciwnowotworową w stosunku do ksenoprzeszczepów na myszy bezgranicze raków prostaty i okrężnicy pochodzenia ludzkiego [Tadi K. i wsp., 2004; Tadi K. i wsp., 2007]. W związku z powyższym, w prowadzonych przeze mnie badaniach, jako modele eksperymentalne posłużyły mi między innymi komórki ludzkiego raka okrężnicy HCT8 i HT29 oraz komórki ludzkiego raka prostaty LNCaP. Ponadto, w celu jednoznacznego określenia wpływu białka p53 na typ odpowiedzi komórkowej, indukowanej przez związek C-1748, posłużyłam się komórkami ludzkiego raka jelita grubego HCT116 posiadającymi funkcjonalny gen *p53* (HCT116 p53^{+/+}), jak również podlinią z knock-out'em tego genu (HCT116 p53^{-/-}). Do podjęcia tego typu badań skłaniał fakt, iż p53 jest białkiem supresorowym transformacji nowotworowej i odgrywa istotną rolę w odpowiedzi komórek na stres genotoksyczny. Co więcej, jego brak lub wadliwe funkcjonowanie stwierdzono w ponad połowie nowotworów pochodzenia ludzkiego [Gupta M. i wsp., 1997; Mansilla S. i wsp., 2006].

Redukcja związków aromatycznych posiadających grupę nitrową, do których należy badana pochodna, może prowadzić do powstawania reaktywnych metabolitów tychże związków, które w reakcji z tlenem mogą wytwarzać reaktywne formy tlenu, jak również obniżać poziom zredukowanej formy glutationu, a tym samym indukować w komórkach stres oksydacyjny, będący jednym z czynników prowadzących do ich śmierci na drodze apoptozy lub nekrozy. W związku z powyższym, w pierwszej części swojej pracy skupiłam się na zbadaniu zdolności pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29 oraz na wyjaśnieniu znaczenia tego zjawiska dla aktywności biologicznej badanego związku. Cytometryczna analiza komórek obu linii traktowanych C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC₉₀, a następnie barwionych diocetanem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA) lub dihydrorodaminą 123 (DHR123) wykazała, iż zarówno w cytoplazmie, jak i w mitochondriach tychże komórek doszło do zwiększenia ilości reaktywnych form tlenu (RFT), maksymalnie do poziomu dwukrotnie wyższego niż w komórkach kontrolnych, a tempo indukcji RFT było bardzo podobne.

Równoległe ze wzrostem w ilości reaktywnych form tlenu, w komórkach HCT8 i HT29 eksponowanych na działanie badanego związku, doszło również do spadku stężenia zredukowanej formy glutationu (GSH). Analiza kinetyki obu tych zjawisk nie pozwoliła na jednoznaczne stwierdzenie co następuje wcześniej, spadek poziomu GSH, czy wzrost w ilości RFT. Niemniej jednak, uzyskane wyniki wskazują na zdolność pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach obu wymienionych powyżej linii ludzkich raków jelita grubego. Jednocześnie, badania mierzące do wyjaśnienia znaczenia tego zjawiska dla aktywności biologicznej C-1748 dowiodły, iż generowane przez badany związek reaktywne formy tlenu, nie wpływają w istotny sposób zarówno na jego aktywność cytotoksyczną wobec komórek HCT8 i HT29, jak również na jego zdolność do uruchomienia procesu apoptozy oraz nekrozy w komórkach HCT8.

W kolejnym etapie swojej pracy podjęłam badania mierzące do określenia odpowiedzi komórek ludzkich raków jelita grubego HCT116 posiadających funkcjonalny gen *p53* (HCT116 $p53^{+/+}$) oraz podlinii z knock-out'em tego genu (HCT116 $p53^{-/-}$) na działanie pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, jak również ustalenia zależności tej odpowiedzi od statusu białka *p53*.

Przebieg krzywych zahamowania wzrostu dla komórek obu linii HCT116 traktowanych C-1748 był zbliżony, a wartości stężeń hamujących ich proliferację w 50 i 90%, wyznaczone na podstawie tychże krzywych, były porównywalne, co wskazuje, iż funkcjonalne białko *p53* nie wpływa w istotny sposób na zdolność badanego związku do hamowania proliferacji tychże komórek

Cytometryczna analiza komórek HCT116 $p53^{-/-}$ w ich cyklu życiowym, w połączeniu z obecnością ufosforylowanej formy kinazy Cdc2 (Tyr15) i podwyższoną ekspresją cykliny B1 wskazała, iż jednym z najwcześniej obserwowanych efektów działania związku C-1748 była akumulacja tychże komórek w fazie G2 cyklu komórkowego, czego nie obserwowano w przypadku komórek HCT116 posiadających funkcjonalne białko *p53*. Wspomniana akumulacja miała jednak charakter przejściowy i jak pokazuje stopniowy zanik zarówno nieaktywnej formy kinazy Cdc2, jak również jej allosterycznego aktywatora - cykliny B1, komórki HCT116 $p53^{-/-}$ były zdolne do przekroczenia punktu kontrolnego fazy G2 i przejścia do mitozy. W przypadku komórek HCT116 $p53^{+/+}$, szybki i intensywny zanik obu wymienionych powyżej białek wskazywał raczej na niemożność zestawienia i aktywacji kompleksu MPF (ang. *mitosis-promoting factor*), a tym samym przejścia tychże komórek z fazy G2 do mitozy.

Mikroskopowa ocena morfologii jąder komórek HCT116 p53^{-/-}, poddanych działaniu C-1748 wykazała, iż proces mitozy nie przebiegał prawidłowo. Obserwowane chromosomy nie były w pełni skondensowane i często chaotycznie ułożone. Co więcej, pojawienie się komórek zawierających liczne mikrojądra, łącznie ze wzrostem populacji komórek poliploidalnych (8N DNA) dodatkowo wskazało, że proces mitozy nie zakończył się prawidłowym podziałem na dwie komórki potomne. Obecność komórek zawierających mikrojądra jest powszechnie uznawana za cechę charakterystyczną procesu określanego jako katastrofa mitotyczna, która jak dotąd nie posiada spójnej definicji. Proces ten, przez część badaczy traktowany jest jako odrębny rodzaj śmierci komórkowej, natomiast przez niektórych postrzegany jest jako wadliwa mitoza, która prowadzi do śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy. W przypadku komórek ludzkiego raka jelita grubego HCT116 p53^{-/-} poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (EC₉₀), populacja komórek typowych dla katastrofy mitotycznej pojawiła się po 48 godzinach i stopniowo rosła, osiągając maksymalny poziom po 120 godzinach inkubacji z badanym związkiem, podczas gdy frakcja komórek prezentujących charakterystyczne dla apoptozy cechy morfologiczne pojawiła się już po 24 godzinach i stopniowo rosła do 96 godzin ekspozycji na C-1748, a następnie nieznacznie spadała. A zatem, komórki typowe dla katastrofy mitotycznej pojawiały się równolegle do komórek apoptotycznych, co sugeruje, iż obydwie te procesy mogły przebiegać niezależnie od siebie. Niemniej jednak, końcowy los komórek HCT116 p53^{-/-}, ulegających katastrofie mitotycznej, nie jest znany. Na podstawie poczynionych przeze mnie obserwacji nie można bowiem wykluczyć, że katastrofa mitotyczna ostatecznie prowadzi do śmierci tychże komórek na drodze apoptozy lub nekrozy, co postuluje szereg badaczy [Chu K. i wsp., 2004; Portugal J. i wsp., 2010; Skwarska A. i wsp., 2007]. W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+} traktowanych C-1748, mikroskopowa ocena morfologii jąder wskazała nie tylko na zachodzenie procesu apoptozy i to ze znacznie większą intensywnością niż w komórkach HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53, ale także na brak obecności komórek wielojądrzastych, charakterystycznych dla procesu katastrofy mitotycznej.

Badanie zjawiska apoptozy w oparciu o znaczniki biochemiczne, takie jak translokacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej, zanik potencjału mitochondrialnego oraz aktywacja kaspazy-3 potwierdziło, iż proces ten jest indukowany w komórkach ludzkiego raka jelita grubego HCT116 p53^{-/-}, jednak dokładne określenie wielkości frakcji komórek apoptotycznych dla linii pozbawionej białka p53 było niemożliwe ze względu na obecność w badanych próbkach komórek wielojądrzastych, które wykazują

szereg biochemicznych podobieństw do procesu apoptozy. W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, wyniki przeprowadzonych badań wskazały, iż apoptoza odgrywała decydującą rolę w eliminacji tychże komórek i zachodziła ze zdecydowanie większą intensywnością niż w komórkach HCT116 p53^{-/-}, co może świadczyć o istotnym znaczeniu statusu białka p53 dla efektu cytotoksycznego pochodnej C-1748 – obecność tego białka zwiększała wrażliwość traktowanych komórek na działanie związku.

Jednym z rodzajów odpowiedzi komórek nowotworowych na działanie leków lub potencjalnych chemoterapeutyków uszkadzających DNA może być uruchomienie autofagii. I tak, obserwowany w odniesieniu do komórek kontrolnych przyrost w ilości kwaśnych organelli, łącznie ze wzrostem poziomu białka LC3-II w komórkach HCT116 p53^{-/-} traktowanych C-1748 (EC₉₀), wskazał na zdolność badanego związku do indukcji tego procesu we wspomnianych komórkach nowotworowych, czego nie stwierdzono w przypadku komórek HCT116 posiadających funkcjonalne białko p53. Ponadto, inhibitor autofagii - 3-metyloadenina, nie spowodował wzrostu liczby komórek HCT116 p53^{-/-} ulegających apoptozie lub katastrofie mitotycznej, co sugeruje, iż w tym przypadku proces autofagii najprawdopodobniej nie spełnia funkcji ochronnej.

Kolejnym typem odpowiedzi komórek nowotworowych na działanie związków uszkadzających DNA może być nieodwracalne zahamowanie ich proliferacji i indukcja przyspieszonego starzenia. Co istotne, niejednokrotnie dawka leku potrzebna do zainicjowania tego procesu jest często znacznie niższa niż dawka wymagana do indukcji śmierci komórkowej [Eom Y.-W. i wsp., 2005; Mansilla S. i wsp., 2006]. Połączona ocena morfologiczna i histochemiczna komórek obu linii HCT116 poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniach odpowiadających wartościom EC₉₀, wskazała na brak indukcji procesu przyspieszonego starzenia tychże komórek, o czym świadczył brak zarówno charakterystycznych dla tego procesu zmian w ich morfologii, jak i zwiększonej aktywności enzymu SA-β-galaktozydazy. Ponadto, o ile komórki HCT116 p53^{-/-} traktowane badanym związkiem w stężeniu EC₅₀ również nie ulegały starzeniu, o tyle w przypadku linii HCT116 posiadającej funkcjonalne białko p53, obniżenie stężenia C-1748 do wartości EC₅₀ doprowadziło do uruchomienia tego procesu po wydłużonym czasie inkubacji wspomnianych komórek z badanym związkiem. Jednocześnie, obserwowany wzrost poziomu p53 oraz p21 w komórkach HCT116 p53^{+/+} eksponowanych na działanie badanej pochodnej (EC₅₀), wskazał na udział obu wymienionych białek w indukcji procesu przyspieszonego starzenia tychże komórek.

Niewielki wpływ pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 stosowanej w stężeniach odpowiadających wartościom EC_{90} na dystrybucję komórek obu linii HCT116 w ich cyklu życiowym, z wyjątkiem nieznacznej i przejściowej akumulacji komórek HCT116 p53^{-/-} w fazie G2/M oraz wyraźnego wzrostu frakcji sub-G1 w przypadku komórek posiadających funkcjonalne białko p53, skłaniał do sprawdzenia czy i w jaki sposób zwiększenie stężenia badanego związku wpłynie zarówno na przebieg cyklu życiowego, jak również indukcję apoptozy, nekrozy lub katastrofy mitotycznej wspomnianych komórek nowotworowych.

Zwiększenie stężenia związku C-1748 do wartości $5xEC_{90}$ wpłynęło przede wszystkim na przyrost liczby komórek HCT116 p53^{-/-} ulegających apoptozie oraz szybsze tempo ich pojawiania się, czego dowiodła analiza dystrybucji tychże komórek w ich cyklu życiowym, w połączeniu z obserwacją mikroskopową. Co więcej, szybkiej i intensywnej fragmentacji DNA towarzyszył brak akumulacji komórek HCT116 p53^{-/-} w którejkolwiek z faz ich cyklu życiowego oraz brak pojawienia się frakcji komórek poliploidalnych. Analiza mikroskopowa jąder wspomnianych komórek nowotworowych poddanych działaniu pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości $5xEC_{90}$ dodatkowo wskazała na brak obecności komórek wielojądrzastych, a zatem na brak zachodzenia procesu katastrofy mitotycznej, której indukcję obserwowano przy dawce badanego związku równej EC_{90} . Ponadto, badanie zmian zachodzących pod wpływem C-1748 ($5xEC_{90}$) w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT116 nie posiadających funkcjonalnego białka p53 nie tylko potwierdziło, iż znaczna ich część umierała na drodze apoptozy, ale także wskazało na istotną rolę nekrozy w eliminacji tychże komórek, czego nie stwierdzono przy stężeniu badanego związku odpowiadającym wartości EC_{90} - po 168 godzinach ekspozycji ok. 49% całkowitej populacji komórek wykazywało zmiany typowe dla apoptozy (test aneksyna V/PI), a frakcja komórek nekrotycznych przekroczyła 34%. W przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, zastosowanie dawki związku C-1748 równej $5xEC_{90}$ nie spowodowało wyraźnych zmian w przebiegu ich cyklu życiowego, jak również znacznego zwiększenia liczby tychże komórek ulegających apoptozie, aczkolwiek wpłynęło na szybsze tempo ich pojawiania się niż przy stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} . Badanie zmian zachodzących pod wpływem C-1748 ($5xEC_{90}$) w błonie cytoplazmatycznej komórek HCT116 p53^{+/+} wskazało, podobnie jak w przypadku linii HCT116 nie posiadającej funkcjonalnego białka p53, iż badany związek indukuje śmierć tychże komórek nie tylko na drodze apoptozy, ale także bezpośredniej nekrozy, czego również nie obserwowano przy stężeniu związku odpowiadającym wartości EC_{90} - po 168 godzinach ekspozycji ok. 55%

całkowitej populacji komórek wykazywało zmiany typowe dla apoptozy (test aneksyna V/PI), a frakcja komórek nekrotycznych przekroczyła 42%.

W ostatniej, trzeciej części swojej pracy podjęłam badania zmierzające do określenia odpowiedzi komórek ludzkiego raka prostaty LNCaP, posiadających funkcjonalne białko p53, na działanie pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748.

Analiza dystrybucji komórek LNCaP w ich cyklu życiowym, w połączeniu z obserwacją mikroskopową wykazały, iż pod wpływem pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 (EC_{90}), w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji, doszło do uruchomienia śmierci komórkowej na drodze apoptozy, o czym świadczyło pojawienie się charakterystycznych dla tego procesu zmian w morfologii jąder wspomnianych komórek nowotworowych oraz postępująca degradacja DNA (obecność frakcji sub-G1). Co istotne, w odniesieniu do komórek obu linii HCT116, wielkość frakcji sub-G1, po krótkich czasach inkubacji, była w tym przypadku zdecydowanie najwyższa. Począwszy od 96 godzin ekspozycji na C-1748, komórki LNCaP zostały zatrzymane w fazach G1, S lub G2/M cyklu życiowego, co może wskazywać między innymi na pojawienie się populacji komórek opornych na działanie badanego związku lub uruchomienie mechanizmów naprawy DNA. Badanie zjawiska apoptozy w oparciu o znaczniki biochemiczne, takie jak translokacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej oraz aktywacja kaspazy-3 potwierdziło, iż to właśnie apoptoza odgrywa decydującą rolę w eliminacji komórek LNCaP, zwłaszcza w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji – po tym czasie ekspozycji ok. 49% całkowitej populacji komórek wykazywało zmiany typowe dla apoptozy (test aneksyna V/PI), podczas gdy frakcja komórek nekrotycznych nie przekroczyła 3%. Mikroskopowa analiza morfologii jąder komórkowych dodatkowo wskazała na brak obecności komórek zawierających mikrojądra, co dowodzi, iż komórki LNCaP nie ulegały katastrofie mitotycznej pod wpływem badanego związku. Co więcej, pochodna C-1748 nie indukowała autofagii we wspomnianych komórkach nowotworowych, o czym świadczył zarówno brak wzrostu w ilości kwaśnych organelli, jak również brak zmian w poziomie białek LC3-I oraz LC3-II w porównaniu do komórek kontrolnych. Komórki LNCaP traktowane C-1748 w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} , nie ulegały również przedwczesnemu starzeniu. Jednakże, obniżenie stężenia badanego związku do wartości EC_{50} , doprowadziło do uruchomienia tego procesu w komórkach ludzkiego raka prostaty. Ponadto, podobnie jak w przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, obserwowany wzrost poziomu p53 oraz p21 w komórkach LNCaP eksponowanych na działanie C-1748 przy stężeniu odpowiadającym EC_{50} , wskazał na udział obu wymienionych białek w indukcji procesu przyspieszonego starzenia tychże komórek.

Podsumowując, w prezentowanej pracy wykazałam, że:

1. Pochodna 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748 przy stężeniach odpowiadających wartościom EC_{90} indukowała stres oksydacyjny w komórkach ludzkich raków jelita grubego HCT8 i HT29, przy czym generowane przez ten związek reaktywne formy tlenu nie wpływały zarówno na jego aktywność cytotoksyczną wobec komórek obu wspomnianych nowotworów, jak również zdolność do uruchomienia procesu apoptozy oraz nekrozy w komórkach HCT8.
2. Status białka p53 determinuje odpowiedź komórek ludzkich raków jelita grubego HCT116 na działanie pochodnej 4-metylo-1-nitroakrydyny C-1748, za czym przemawiają wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań:
 - a. Brak wyraźnych różnic w wartościach stężeń EC_{50} i EC_{90} , wyznaczonych na podstawie krzywych zahamowania wzrostu, pomiędzy komórkami HCT116 p53^{+/+} oraz HCT116 p53^{-/-} sugeruje, iż białko p53 nie wpływa w istotny sposób na zdolność C-1748 do hamowania proliferacji tychże komórek.
 - b. W komórkach HCT116 pozbawionych p53, badany związek przy stężeniu odpowiadającym wartości EC_{90} indukował przejściową akumulację w fazie G2 cyklu życiowego, po której komórki z uszkodzonym DNA mogły wejść do mitozy, przy czym na skutek zaburzeń tego procesu ulegały katastrofie mitotycznej, czego nie obserwowano w przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}.
 - c. Katastrofa mitotyczna indukowana w komórkach HCT116 p53^{-/-} przez pochodną C-1748 przebiegała niezależnie od apoptozy i równolegle do niej, aczkolwiek końcowy los wspomnianych komórek ulegających temu procesowi nie jest znany.
 - d. W komórkach obu linii HCT116 doszło do uruchomienia apoptozy pod wpływem badanego związku. Poziom indukowanej apoptozy był zdecydowanie wyższy w komórkach HCT116 p53^{+/+}, co wskazuje, iż obecność funkcjonalnego białka p53 zwiększa wrażliwość komórek HCT116 na działanie pochodnej C-1748.
 - e. Apoptoza komórek obu linii HCT116 przebiegała podobnie, w sposób związany z uszkodzeniem mitochondriów oraz zależny od aktywacji kaspazy-3.
 - f. W komórkach HCT116 p53^{-/-} traktowanych C-1748 (EC_{90}) dochodziło do indukcji autofagii, czego nie obserwowano w komórkach z funkcjonalnym p53. Brak wpływu 3-metyloadeniny - inhibitora tego procesu na wzrost indukcji apoptozy lub katastrofy mitotycznej sugeruje, iż w tym przypadku autofagia najprawdopodobniej nie spełnia funkcji ochronnej.

- g. W przeciwieństwie do linii nie posiadającej białka p53, komórki HCT116 p53^{+/+} poddane działaniu C-1748 przy stężeniu odpowiadającemu wartości EC₅₀ ulegały przyspieszonemu starzeniu, czego nie obserwowano przy stężeniu EC₉₀. Wzrost poziomu p53 i p21 w komórkach HCT116 p53^{+/+} traktowanych badanym związkami (EC₅₀), wskazał na udział obu wymienionych białek w indukcji tego procesu.
- h. Zwiększenie stężenia C-1748 do wartości 5xEC₉₀ powodowało szybsze tempo pojawiania się komórek obu linii HCT116 ulegających apoptozie niż przy stężeniu równemu EC₉₀. W przypadku komórek HCT116 p53^{-/-}, zastosowanie wyższej niż EC₉₀ dawki badanego związku wpłynęło również na wzrost frakcji komórek apoptotycznych i zahamowanie indukcji procesu katastrofy mitotycznej. Ponadto, znaczna część komórek obu linii HCT116 traktowanych C-1748 przy stężeniach odpowiadających 5xEC₉₀ umierała na drodze bezpośredniej nekrozy.
3. W komórkach ludzkiego raka prostaty LNCaP posiadających funkcjonalne białko p53, w ciągu pierwszych 72 godzin inkubacji, pochodna C-1748 przy stężeniu odpowiadającemu wartości EC₉₀ indukowała apoptozę, której poziom był wyższy niż w komórkach obu linii HCT116.
4. Począwszy od 96 godzin ekspozycji na C-1748, progresja komórek LNCaP w ich cyklu życiowym została zatrzymana w fazach G1, S lub G2/M, co może wskazywać między innymi na pojawienie się populacji komórek opornych na działanie tego związku lub uruchomienie mechanizmów naprawy DNA.
5. W komórkach LNCaP traktowanych badanym związkiem (EC₉₀) nie doszło do uruchomienia katastrofy mitotycznej oraz autofagii, podobnie jak w przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}.
6. Komórki LNCaP poddane działaniu C-1748 przy stężeniu odpowiadającemu wartości EC₅₀ ulegały przyspieszonemu starzeniu, czego nie obserwowano przy stężeniu EC₉₀. Co więcej, podobnie jak w przypadku komórek HCT116 p53^{+/+}, wzrost poziomu p53 i p21 wskazał na istotną rolę obu wymienionych białek w indukcji tego procesu.
7. Odpowiedź komórek LNCaP na działanie C-1748 jest podobna do wykazywanej przez komórki HCT116 p53^{+/+}, co dodatkowo wskazuje, iż funkcjonalne białko p53 odgrywa ważną rolę w indukcji i przebiegu procesów takich jak apoptoza lub przyspieszone starzenie komórek, a jego brak sprzyja indukcji katastrofy mitotycznej oraz autofagii.

VI. Literatura.

- Abedin M. J., Wang D., McDonnell M. A., Lehmann U., Kelekar A.: Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage, *Cell Death Differ* 14 (2007) 500-510.
- Achanta G., Huang P.: Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents, *Cancer Res* 64 (2004) 6233-6239.
- Adam-Vizi V., Chinopoulos Ch.: Bioenergetics and formation of mitochondrial reactive oxygen species, *Trends Pharmacol Sci* 27 (12) (2006) 639-645.
- Alvarez B., Radi R.: Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins, *Amino Acids* 25 (2003) 295-311.
- Anderson K. M., Seed T., Ou D., Harris J. E.: Free radicals and reactive oxygen species in programmed cell death, *Med Hypotheses* 52 (5) (1999) 451-463.
- Arends M. J., Wyllie A. H.: Apoptosis: mechanism and roles in pathology, *Int Rev Exp Path* 32 (1991) 223 – 254.
- Armstrong J. S., Jones D. P.: Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in HL60 cells that overexpress Bcl-2, *FASEB J* 16 (2002) 1263-1265.
- Armstrong J. S., Steinauer K.K., Hornung B., Irish J. M., Lecane P., Birrell G. W., Peehl D. M., Knox S. J.: Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line, *Cell Death Differ* 9 (2002) 252-263.
- Arthur C. R., Gupton J. T., Kellog G. E., Yeudall W. A., Cabot M. C., Newsham I. F., Gewirtz D. A.: Autophagic cell death, polyploidy and senescence induced in breast tumor cells by the substituted pyrrole JG-03-14, a novel microtubule poison, *Biochem Pharmacol* 74 (2007) 981-991.
- Ashok B. T., Tadi K., Banerjee D., Konopa J., Iatropoulos M., Tiwari R. K.: Pre-clinical toxicology and pathology of 9-(2'-hydroxyethylamino)-4-methyl-1-nitroacridine (C-1748), a novel anti-cancer agent in male Beagle dogs, *Life Sci* 79 (14) (2006) 1334-1342.
- Ashok B. T., Tadi K., Garikapaty V. P., Chen Y., Huang O., Banerjee D., Konopa J., Tiwari R. K.: Preclinical toxicological examination of a putative prostate cancer-specific 4-methyl-1-nitroacridine derivative in rodents, *Anticancer Drugs* 18 (1) (2007) 87-94.
- Attardi L. D., Donehower L. A.: Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models, *Mutat Res* 576 (2005) 4-21.

- Augustin E., Moś-Rompa A., Nowak-Ziatyk D., Konopa J.: Antitumor 1-nitroacridine derivative C-1748, induces apoptosis, necrosis or senescence in human colon carcinoma HCT8 and HT29 cells, *Biochem Pharmacol* 79 (9) (2010) 1231-1241.
- Augustin E., Moś-Rompa A., Skwarska A., Witkowski J. M., Konopa J., *Biochem Pharmacol* 72 (2006) 1668-1679.
- Balaban R. S., Nemoto S., Finkel T.: Mitochondria, oxidants, and aging, *Cell* 120 (2005) 483-495.
- Bang J. H., Han S. E., Lim I., Lee S. Ch.: Differential response of MG132 cytotoxicity against small cell lung cancer cells to changes in cellular GSH contents, *Biochem Pharmacol* 68 (2004) 659-666.
- Baguley B. C., Wakelin L. P., Jacintho J. D., Kovacic P.: Mechanism of action of DNA intercalating acridine-based drugs: how important are contributions from electron transfer and oxidative stress?, *Curr Med Chem* 10 (24) (2003) 2643-2649.
- Bartosz G.: Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie, *Post Biochem* 44 (1) (1998) 22-31.
- Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- Bartoszek A., Konopa J: ³²P-post-labeling analysis of DNA adduct formation by antitumor drug nitracrine (Ledakrin) and other nitroacridines in different biological systems, *Biochem Pharmacol* 38 (8) (1989) 1301-1312.
- Beaver J. P., Waring P.: A decrease in intracellular glutathione concentration precedes the onset of apoptosis in murine thymocytes, *Eur J Cell Biol* 68 (1) (1995) 47-54.
- Behrendt L., Henderson G., Zwacka R. M.: Reactive oxygen species in oncogenic transformation, *Biochem Soc Trans* 31 (Pt 6) (2003) 1441-1444.
- Beland F. A., Heflich R. H., Howard P. C., Fu P. P.: The *in vitro* metabolic activation of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. In Harrey R. G. (ed): *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*. Washington, DC: Am Chem Soc (1985) 371-396.
- Benassi B., Fanciulli M., Fiorentino F., Porrello A., Chiorino G., Loda M., Zupi G., Biroccio A.: c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress, *Mol Cell* 21 (2006) 509-519.
- Benhar M., Engelberg D., Levitzki A.: ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer, *EMBO Rep* 3 (5) (2002) 420-425.
- Bhuyan K., Smith K. S., Adams E. G., Petzold G. L., Mc Govren J. P.: Lethality, DNA alkylation, and cell cycle effects of adozelesin (U-73975) on rodent and human cells, *Cancer Res* 52 (1992) 5687-5692.

- Boland M. P., Foster S. J., O'Neil L. A.: Daunorubicin activates NF- κ B and induces NF- κ B-dependent gene expression in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphomy cells, *J Biol Chem* 272 (1997) 12952-12960.
- Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.
- Breen P. A., Murphy A. J.: Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free Radic Biol Med* 18 (6) (1995) 1033-1077.
- Brenner C., Kroemer G.: Mitochondria – the death signaling integrator, *Science* 289 (2000) 1150-1151.
- Brookes P. S., Yoon Y., Robotam J. L., Anders M. W., Sheu S.-S.: Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, *Am J Physiol Cell Physiol* 287 (2004) 817-833.
- Cai J., Jones D. P.: Mitochondrial redox signaling during apoptosis, *J Bioenerg Biomemb* 31 (4) (1999) 327-334.
- Camougrand N., Rigoulet M.: Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress, *Respir Physiol* 128 (2001) 393-401.
- Campisi J.: Cellular senescence as a tumor – suppressor mechanism, *Trends Cell Biol* 11 (11) (2001) 27–31.
- Campisi J.: Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors, *Cell* 120 (2005) 513-522.
- Carew J. S., Zhou Y., Albitar M., Carew J. D., Keating M. J., Huang P.: Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications, *Leukemia* 17 (2003) 1437-1447.
- Carranza E. S., Pantano P.: Fluorescence microscopy and flow cytofluorometry of reactive oxygen species, *Applied Spectroscopy Rev* 38 (2) (2003) 245-261.
- Castedo M., Perfettini J.-L., Roumier T., Andreau K., Medema R., Kroemer G.: Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition, *Oncogene* 23 (2004a) 2825-2837.
- Castedo M., Perfettini J.-L., Roumier T., Valent A., Raslova H., Yakushijin K., Horne D., Feunteun J., Lenoir G., Medema R., Vainchenker W., Kroemer G.: Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy, *Oncogene* 23 (2004b) 4362-4370.
- Catalano A., Rodilossi S., Caprari P., Coppola V., Procopio A.: 5-Lipoxygenase regulates senescence-like growth arrest by promoting ROS-dependent p53 activation, *EMBO J* 24 (1) (2005) 170-179.

- Cen D., Brayton D., Shahandeh B., Meyskens F. L. Jr., Farmer P. J.: Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells, *J Med Chem* 47 (2004) 6914-6920.
- Chang B. D., Broude E. V., Dokmanovic M., Zhu H., Ruth A., Xuan Y., Kandel E. S., Lausch E., Chritov K., Roninson I. B.: A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents, *Cancer Res* 59 (1999a) 3761-3767.
- Chang B. D., Xuan Y., Bourde E. V., Zhu H., Schott B., Fang J., Roninson I. B.: Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs, *Oncogene* 18 (1999b) 4808-4818.
- Chang D. J., Ringold G. M., Heller R. A.: Cell killing and induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor- α is mediated by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid, *Biochem Biophys Res Comm* 188 (1992) 538-546.
- Chang L., Karin M.: Mammalian MAP kinase signaling cascades, *Nature* 410 (2001) 37-40.
- Cheeseman K. H., Slater T. F.: An introduction to free radical biochemistry, *Br Med Bull* 49 (3) (1993) 481-493.
- Chen Q., Chai Y.-C., Mazumder S., Jiang C., Macklis R. M., Chisolm G. M., Almasan A.: The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction, *Cell Death Differ* 10 (2003) 323-334.
- Chen Q., Fischer A., Reagan J. D., Yan L. J., Ames B. N.: Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995) 4337-4341.
- Choi J., Liu R.M., Forman H. J.: Adaptation to oxidative stress: quinine-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells, *Biochem Pharmacol* 53 (1997) 987-993.
- Chu K., Teele N., Dewey M. W., Albright N., Dewey W. C.: Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3 σ and CDKN1A (p21) knockout cell lines, *Radiat Res* 162 (2004) 270-286.
- Codogno P., Mejer A. J.: Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death, *Cell Death Differ* 12 (2005) 1509-1518.
- Columbano A.: Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo, *J Cellular Biochem* 58 (1995) 181-190.

- Constantini P., Chernyak B. V., Petronilli V., Bernardi P.: Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites, *J Biol Chem* 271 (1996) 6746-6751.
- Cortes E. P., Lutman G., Wanka J., Wang J. J., Pickren J., Wallace J., Holland J. F.: Adriamycin (NSC-123127) cardiotoxicity: A clinico pathologic correlation, *Cancer Chemother Rep* 6 (3) (1975) 215-255.
- Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova D., Franceschi C.: A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1), *Biochem Biophys Res Commun* 197 (1993) 40-45.
- Dalton P. T., Shertzer G. H., Puga A.: Regulation of gene expression by reactive oxygen, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39 (1999) 67-101.
- Darzynkiewicz Z., Gorczyca W., Ardelt B., Halicka D., Juan G., Traganos F.: Cytometria apoptozy i martwicy, *Central-European J Immunol* 21 (1996) S156-S170.
- Davies M. J., Dean R. T.: Radical-mediated protein oxidation, Oxford University Press, Oxford (1997).
- Debnath J., Baehrecke E. H., Kroemer G.: Does autophagy contribute to cell death?, *Autophagy* 1 (2) (2005) 66-74.
- Deeb D., Gao X., Jiang H., Janic B., Arbab A. S., Rojanasakul Y., Dulchavsky S. A., Gautam S. C.: Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism, *Biochem Pharmacol* 79 (2010) 350-360.
- Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B., Bray K., Anderson D., Chen G., Mukherjee C., Shi Y., G elinas C., Fan Y., Nelson D. A., Jin S., White E.: Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis, *Cancer Cell* 10 (2006) 51-64.
- Dehal S. S., Kupfer D.: Evidence that the catechol 3,4-dihydroxytamofen is a proximate intermediate to the reactive species binding covalently to proteins, *Cancer Res* 56 (1996) 1283-1290.
- de Lamirande E., Jiang H. Zini A., Kodama H., Gagnon C.: Reactive oxygen species and sperm physiology, *Rev Reprod* 2 (1997) 48-54.
- Di X., Siu R. P., Newsham I. F., Gewirtz D. A.: Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen species in the response of human breast tumor cells to Adriamycin, *Biochem Pharmacol* 77 (7) (2009) 1139-1150.
- Dimri G. P.: What has senescence got to do with cancer?, *Cancer Cell* 7 (2005) 505-511.

- Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and aging skin *in vivo*, *Cell Biol* 92 (1995) 9363-9367.
- Dirsch M. V., Kirschke O. S., Estermeier M., Steffan B., Vollmar M. A.: Apoptosis signaling triggered by the marine alkaloid ascididemin is routed via caspase-2 and JNK to mitochondria, *Oncogene* 23 (2004) 1586-1593.
- Dix T. A. i Aikens J.: Mechanisms an biological relevance of lipid peroxidation initiation, *Chem Res Toxicol* 6 (1993) 2-18.
- Dróge W.: Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev* 82 (2002) 47-95.
- Du J., Gębicki J. M.: Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals, *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2004) 2334-2343.
- Dudka J.: Rola reaktywnych form tlenu i azotu w zaburzeniach komórkowej homeostazy wapnia i żelaza w kardiotoksyczności antracyklinowej, *Post Hig Med Dosw* 60 (2006) 241-247.
- Düssmann H., Kögel D., Rehm M., Prehn H. M. J.: Mitochondrial membrane permeabilization and superoxide production during apoptosis, *J Biol Chem* 278 (15) (2003) 12645-12649.
- Dyrz A., Lewandowska J., Bartoszek A., Konopa J.: DNA adducts formation and DNA crosslinking by C-1748, a potent antitumor 4-methyl-1-nitroacridine in human colon cancer cells, *Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, (2004), Abstr. P4, 41.*
- Eastman A. i Rigas J.: Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation, *Seminars in Oncology* 26 (5) 16 (1999) 7-16.
- Edinger A., Thompson C.: Defective autophagy leads to cancer, *Cancer Cell* 4 (6) (2003) 422-424.
- El-Najjar N., Chatila M., Moukadem H., Vuorela H., Cocker M., Gandesiri M., Schneider-Stock R., Gail-Muhtasib H.: Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling, *Apoptosis* 15 (2010) 183-195.
- Eom Y.-W., Kim M. A., Park S. S., Goo M. J., Kwon H. J., Sohn S., Kim W.-H., Yoon G., Choi K. S.: Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype, *Oncogene* 24 (2005) 4765-4777.
- Erdal H., Berndtsson M., Castro J., Brunk U., Shoshan M. C., Linder S.: Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis, *PNAS* 102 (1) (2005) 192-197.

- Erenpreisa J., Cragg M. S.: Mitotic death: a mechanism of survival? A review, *Cancer Cell Int* 1 (1) (2001) 1-7.
- Farber J. L.: Mechanism of cell injury by activated oxygen species, *Environ Health Perspect* 102 (10) (1994) 17-24.
- Fernández-Checa C. J.: Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun* 304 (2003) 471-479.
- Finkel T.: Redox-dependent signal transduction, *FEBS Lett* 476 (2000) 52-54.
- Florczyk U., Łoboda A., Stachurska A., Józkwiać A., Dulak J.: Rola czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny, *Post Biochem* 56 (2) (2010) 147-155.
- Friesen C., Fulda S., Debatin K.-M.: Induction of CD95 ligand and apoptosis by doxorubicin is modulated by the redox state in chemosensitive- and drug-resistant tumor cells, *Cell Death Differ* 6 (1999) 471-480.
- Friesen C., Kiess Y., Debatin K.-M.: A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells, *Cell Death Differ* 11 (2004) 1-13.
- Fruehauf J. P., Meyskens F. L. Jr.: Reactive oxygen species: a breath of life or death?, *Clin Cancer Res* 13 (3) (2007) 789-794.
- Gabbita S. P., Robinson K. A., Stewart Ch. A., Floyd R. A., Hensley K.: Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction, *Arch Biochem Biophys* 376 (1) (2000) 1-13.
- Gackowski D., Kruszewski M., Bartłomiejczyk T., Jawien A., Ciecierski M., Olinski R.: The level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine is positively correlated with the size of the labile iron pool in human lymphocytes, *J Biol Inorg Chem* 7 (2002) 548-550.
- Gałęcka E., Mrowicka M., Malinowska K., Gałęcki P.: Wolne rodniki tlenu i azotu w fizjologii, *Pol Merk Lek* XXIV (143) (2008) 446-448.
- Genestra M.: Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants, *Cell Signal* 19 (2007) 1807-1819.
- Gębicki J. M.: Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species, *Redox Rep* 3 (1997) 99-110.
- Gębicki J. M., Bartosz G.: Rola białek jako przekaźników uszkodzeń indukowanych przez reaktywne formy tlenu *in vivo*, *Post Biochem* 56 (2) (2010) 115-123.

- Ghavami S., Kerkhoff C., Los M., Hashemi M., Sorg C., Karami-Tehrani F.: Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions, *J Leukoc Biol* 76 (2004) 169-175.
- Ghosh R., Mitchell D. L.: Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding, *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 3213-3218.
- Giese S., Duggan S., Gębicki J. M.: Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals, *Biochem J* 350 (2000) 215-218.
- Giunta M., Pucillo C. W.: Techniques for monitoring cell cycle phases, *Cell cycle-materials and methods*. 1st edition, ed. Pagano P., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1996) 46-52.
- Gorlewska K., Mazerska Z., Sowiński P., Konopa J.: Products of metabolic activation of the antitumor drug Ledakrin (Nitracrine) *in vitro*, *Chemical Res Toxicol* 14 (1) (2001) 1-10.
- Gozuacik D., Kimchi A.: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, *Oncogene* 23 (2004) 2891-2906.
- Grądzka I.: Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium, *Post Biochem* 46 (1) (2000) 2-15.
- Green D., Kroemer G.: The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?, *Trends Cell Biol* 8 (1998) 267-271.
- Green D., Reed J. C.: Mitochondria and apoptosis, *Science* 281 (1998) 1309–1311.
- Grzelakowska-Sztabert B.: Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R, *Post Biochem* 44 (1) (1998) 8-19.
- Gulbins E., Dreschers S., Bock J.: Role of mitochondria in apoptosis, *Exp Physiol* 88 (1) (2000) 44–46.
- Guo Y., Srinivasula S. M., Druilhe A., Fernandes-Alnemri T.: Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria, *J Biol Chem* 277 (2002) 13430-13437.
- Gupta M., Fan S., Zhan Q., Kohn K. W., O'Connor P. M., Pommier Y.: Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells, *Clin Cancer Res* 3 (1997) 1653-1660.
- Halliwell B., Grootveld M.: The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation, *FEBS Lett* 213 (1987) 9-14.

- Halliwell B., Gutteridge J. M.C.: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol* 186 (1990) 1-85.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, Oxford, New York (1999).
- Han Y. H., Park W. H.: The changes of reactive oxygen species and glutathione by MG132, a proteasome inhibitor affect As4.1 juxtaglomerular cell growth and death, *Chem-Biol Interact* 184 (3) (2010) 319-327.
- Han Z., Wei W., Dunaway S., Darnowski J. W., Calabresi P., Sedivy J., Hendricksom E.A., Balan K. V., Pantazis P., Wyche J. H.: Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin, *J Biol Chem* 277 (2002) 17154-17160.
- Hanshaw R. G., Smith B. D.: New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis, *Bioorg Med Chem* 13 (2005) 5035-5042.
- Harman D.: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J Gerontol* 11 (1956) 298-300.
- Helleday T., Lo J., Engelwird B. N.: DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment, *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 923-935.
- Henderson L. M., Chappell J. B.: Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation?, *Eur J Biochem* 217 (3) (1993) 973-980.
- Herrera B., Álvarez A. M., Sánchez A., Fernández M., Roncero C., Benito M., Fabregat I.: Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor β in fetal hepatocytes, *FASEB J* 15 (2001) 741-751.
- Hess J., Angel P., Schorpp-Kistner M.: AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings, *J Cell Sci* 117 (Pt 25) (2004) 5965-5973.
- Hickman J. A.: Apoptosis and chemotherapy resistance, *Eur J Cancer* 32A (6) (1996) 921-926.
- Higuchi Y.: Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress, *Biochem Pharmacol* 66 (2003) 1527-1535.
- Hileman O. E., Liu J., Albitar M., Keating J. M., Huang P.: Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity, *Cancer Chemother Pharmacol* 53 (2004) 209-219.

- Hirose K., Longo D. L., Oppenheim J. J., Matsushima K.: Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation, *FASEB J* 7 (1993) 361-368.
- Hirose Y., Berger M. S., Piper R. O.: p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells, *Cancer Res* 61 (2001) 1957-1963.
- Hockenbery D. M., Oltavi Z. N., Yin X.-M., Milliman C. L., Korsmeyer S. J.: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis, *Cell* 75 (1993) 241-251.
- Hoshida Y., Moriyama M., Otsuka M., Kato N., Taniguchi H., Shiratori Y., Seki N., Omata M.: Gene expression associated with chemosensitivity in human hepatoma cells, *Hepatology* 54 (2007) 489-492.
- Hrabowska M., Mazerska Z., Łukowicz J. P., Onoszko K., Ledóchowski A.: Antitumor activity of 1-nitro-9-aminoacridine derivatives, *Arzneimittel-Forschung* 32 (1982) 1013-1016.
- Huang J., Wu L., Tashiro S.-I., Onodera S., Ikejima T.: Reactive oxygen species mediate oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways, *J Pharmacol Sci* 107 (2008) 370-379.
- Huang P., Feng L., Oldham E. A., Keating M. J., Plunkett W.: Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells, *Nature* 407 (2000) 390-395.
- Huang X., Halicka H. D., Traganos F., Tanaka T., Kurose A., Darzynkiewicz Z.: Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis, *Cell Prolif* 38 (2005) 223-243.
- Hug H., Strand S., Grambihler A., Galle J., Hack V., Stremmel W., Krammer P. H., Galle P. R.: Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells, *J Biol Chem* 272 (1997) 28191-28193.
- Hwang E. S.: Replicative senescence and senescence-like state induced in cancer-derived cells, *Mechanism of Ageing and Development* 123 (2002) 1681-1694.
- Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., Park A.-M., Kira Y., Imada I., Utsumi K.: Mitochondria generation of reactive oxygen species and its role In aerobic life, *Curr Med. Chem* 10 (2003) 2495-2505.
- Ishikawa K., Takenaga K., Akimoto M., Koshikawa N., Yamaguchi A., Imanishi H., Nakada K., Honma Y., Hayashi J.: ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis, *Science* 320 (2008) 661-664.

- Itahana K., Dimri G., Campisi J.: Regulation of cellular senescence by p53, *Eur J Biochem* 268 (2001) 2784-2791.
- Itoh T., Ito Y., Ohguchi K., Ohyama M., Iinuma M., Otsuki Y., Nozawa Y., Akao Y.: Eupalinin A isolated from *Eupatorium chinese* L. induces autophagocytosis in human leukemia HL60 cells, *Bioorg Med Chem* 16 (2008) 721-731.
- James M. A., Cochemé H., Murphy M. P.: Mitochondria-targeted redox probes as tool in the study of oxidative damage and ageing, *Mechanism of Ageing and Development* 126 (2005) 982-986.
- Jezek P., Hlavata L.: Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues and organism, *Int J Biochem Cell Biol* 37 (2005) 2478-2503.
- Jianyong L., Xu Z., Tan M., Su W., Gong X.-G.: 3-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-1-phenyl-1H-pyrazol-3-yl) phenyl acetate induced HepG2 cell apoptosis through a ROS-mediated pathway, *Chem-Biol Interact* 183 (2010) 341-348.
- Johnson T. M., Yu Z.-X., Ferrans V. J., Lowenstein R. A., Finkel T.: Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis, *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 11848-11852.
- Juarez J., Betancourt O. Jr., Pirie-Shepherd S. R., Guan X., Price M. L., Shaw D.E., Mazar A. P., Donate F.: Copper binding by tetrathiomolybdate attenuates angiogenesis and tumor cell proliferation through the inhibition of superoxide dismutase 1, *Clin Cancer Res* 12 (2006) 4974-4982.
- Kabeya Y., Mizushima N., Yamamoto A., Oshitani-Okamoto S., Ohsumi Y., Yoshimori T.: LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation, *J Cell Sci* 117 (13) (2004) 2805-2812.
- Kachadourian R., Day B.J.: Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment, *Free Radic Biol Med* 41 (2006) 65-76.
- Kane D. J., Sarafian T. A., Anton R., Hahn H., Gralla E. B., Valentine J. S., Ord T., Bredesen D. E.: Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species, *Science* 262 (1993) 1274-1277.
- Kanzawa T., Germano I. M., Komata T., Ito H., Kondo Y., Kondo S.: Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells, *Cell Death Differ* 11 (2004) 448-457.
- Kanzawa T., Hang L., Xiao L., Germano I. M., Kondo Y., Kondo S.: Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3, *Oncogene* 24 (2005) 980-991.
- Kastan M., Bartek J.: Cell cycle checkpoints and cancer, *Nature* 432 (2004) 316-323.

- Katayama M., Kawaguchi T., Berger M. S., Pieper R. O.: DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells, *Cell Death Differ* 14 (2007) 548-558.
- Kawabe T.: G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs, *Mol Cancer Ther* 3 (4) (2004) 513-519.
- Kayanoki Y., Fuji J., Islam K. N., Suzuki K., Kawata S., Matsuzawa Y., Taniguchi N.: The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species, *J Biochem* 119 (1996) 817-822.
- Kearns R. P., Hall G. A.: Glutathione and the response of malignant cells to chemotherapy, *Drug Discovery Today* 3 (3) (1998) 113-121.
- Kepler D.: Export pumps for glutathione S-conjugates, *Free Radic Biol Med* 27 (1999) 985-991.
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Curie A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics, *Br J Cancer* 26 (4) (1972) 239-257.
- Kim E., Giese A., Geppert W.: Wild-type p53 in cancer cells: When a guardian turns into a blackguard, *Biochem Pharmacol* 77 (2009) 11-20.
- Kim J., Klionsky D. J.: Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells, *Ann Rev Biochem* 69 (2000) 303-342.
- Kim W.-H., Park B. W., Gao B., Jung H. M.: Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells, *Mol Pharmacol* 66 (2004) 1383-1396.
- Klionsky D. J., Cuervo A. M., Seglen P. O.: Methods for monitoring autophagy from yeast to human, *Autophagy* 3 (3) (2007) 181-206.
- Knapp P., Pogozelski W., Tullius T. D.: Oxidative strand scission of nucleic acids: router initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety, *Chem Rev* 98 (3) (1998) 1089-1107.
- Kondo Y., Kaczawa T., Sawaya R., Kondo S.: The role of autophagy in cancer development and response to therapy, *Cancer* 5 (2005) 726-734.
- Kondoh H., Leonart M., Bernard M. E., Gil J.: Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis: a possible mechanism of cellular immortalization, *Histol Histopathol* 22 (2007) 85-90.
- Konopa J., Ledóchowski A., Matuszkiewicz A., Jereczek-Morawska E.: In vitro studies on the cytotoxic properties of 9-amino-nitroacridine derivatives, *Neoplasma* 16 (1969) 171-179.

- Kotamraju S., Chitambar C. M., Kalivendi S. V., Joseph j., Kalyanaraman B.: Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis, *J Biol Chem* 277 (2002) 17179-17187.
- Kovacic P., Osuna J. A.: Mechanisms of anti-cancer agents: Emphasis on oxidative stress and electron transfer, *Curr Pharmacol Des* 6 (2000) 277-309.
- Kumar B., Koul S., Khandrika L., Macham R. B., Koul H. K.: Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype, *Cancer Res* 68 (2008) 1777-1785.
- Lamparska-Przybysz M., Motyl T.: Autofagia – narzędzie przeżycia czy śmierci komórki nowotworowej?, *Post Biol Kom* 32 (1) (2005) 13-22.
- Lee A. C., Ferster B. E., Takeda K., Bae N. S., Hirai T., Yu Z. X., Ferrans V. J., Howard B. H., Finkel B.: Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species, *J Biol Chem* 274 (1999) 936-940.
- Lee M., Hyun D. H., Marshall K. A., Ellerby L. M., Bredesen D.E., Jenner P., Halliwell B.: Effect of overexpression of Bcl-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome, *Free Radic Biol Med* 31 (2001) 1550-1559.
- Lee M.-G., Lee K.-T., Chi S.-G., Park J.-H.: Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome c release, *Biol Pharm Bull* 24 (3) (2001) 303-306.
- Lenzion A.: Badanie i porównanie zdolności wybranych leków i związków przeciwnowotworowych do międzyłańcuchowego sieciowania DNA mitochondrialnego i jądrowego w komórkach nowotworowych, *Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska* (2009).
- Lenehan P., Gutiérrez P. L., Wagner J. L., Milak N., Fisher G. R., Ross D. D.: Resistance to oxidants associated with elevated catalase activity in HL-60 leukemia cells that overexpress multidrug-resistance protein does not contribute to the resistance to daunorubicin manifested by these cells, *Cancer Chemother Pharmacol* 35 (1995) 377-386.
- Lesnefsky E. J., Hoppel C. L.: Oxidative phosphorylation and aging, *Ageing Res Rev* 5 (4) (2006) 402-433.
- Li J., Xu Z., Tan M., Su W., Gong X.-G.: 3-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-1-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)phenyl acetale induced Hep G2 cell apoptosis through a ROS-mediated pathway, *Chem-Biol Inter* 183 (2010) 341-348.
- Li N., Karin M.: Is NF- κ B the sensor of oxidative stress?, *FASEB J* 13 (1999) 1137-1143.

- Li P.-F., Dietz R., von Harsdorf R.: Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell, FEBS Lett 404 (1997) 249-252.
- Liang X. H., Kleeman L. K., Jiang H. H., Gordon G., Goldman J. E., Berry G., Herman B., Levine B.: Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein, J Virol 72 (1998) 8586-8596.
- Lin S., Fujii M., Hou D.-X.: Rhein induces apoptosis in HL-60 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death pathway, Arch Biochem Biophys 418 (2003) 99-107.
- Linford N. J., Schriener S. E., Rabinovitch P. S.: Oxidative damage and aging: spotlight on mitochondria, Cancer Res 66 (5) (2006) 2497-2499.
- Lockshin R. A., Zakeri Z.: Apoptosis, autophagy, and more, Int J Biochem Cell Biol 36 (12) (2004) 2405-2419.
- Lotem J., Peled-Kamar M., Groner Y., Sacha L.: Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines, Proc Natl Acad Sci USA 93 (17) (1996) 9166-9171.
- Lu H.-R., Zhu H., Huang M., Chen Y., Cai Y.-J., Miao Z.-H., Zhang J.-S., Ding J.: Reactive oxygen species elicit apoptosis by concurrently disrupting topoisomerase II and DNA-dependent protein kinase, Mol Pharmacol 68 (4) (2005) 983-994.
- Lum J. J., DeBerardinis R. J., Thompson C. B.: Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty, Mol Cell Biol 6 (2005) 439-448.
- Macho A., Hirsch T., Marzo I., Marchetti P., Dallaporta B., Susin S. A., Zamzami N., Kroemer G.: Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis, J Immunol 158 (1997) 4612-4619.
- Macho A., Blázquez M.-V., Navas P., Muñoz E.: Induction of apoptosis by vanilloid compounds does not require *deNovo* gene transcription and activator protein 1 activity, Cell Growth Differ 9 (1998) 277-286.
- Macip S., Igarashi M., Berggren P., Yu J., Lee S. W., Aaronson S. A.: Influence of induced reactive oxygen species in p 53-mediated cell fate decision, Mol Cell Biol 23 (23) (2003) 8576-8585.
- Maeda H., Sawa T., Yubisui T., Akaike T.: Free radical generation from heterocyclic amines by cytochrome b5 reductase in the presence of NADH, Cancer Lett 143 (1999) 117-121.
- Makin G., Dive C.: Apoptosis and cancer chemotherapy, Trends Cell Biol 11 (11) (2001) 22-25.

- Malins D. C., Holmes E. H., Polissar N. J., Gunselman S. J.: The etiology of breast cancer: characteristic alteration in hydroxyl radical-induced DNA base lesions during oncogenesis with a potential for evaluating incidence risk, *Cancer* 71 (1993) 3036-3043.
- Malins D. C., Gunselman S. J.: Fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry reveal a remarkable degree of structural damage in the DNA of wild fish exposed to toxic chemicals, *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 13038-13041.
- Mancini M., Anderson B. O., Caldwell E., Sedghinasab M., Paty P. B., Hockenbery D. M.: Mitochondrial Proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line, *J Cell Biol* 138 (1997) 449-469.
- Mansilla S., Bataller M., Portugal J.: Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy, *Anti-Cancer Agents in Med Chem* 6 (2006) 589-602.
- Marczak A., Józwiak Z.: Zaburzenia asymetrycznego rozmieszczenia fosfatydyloseryny w błonie komórkowej - najnowsze teorie, *Post Biol Kom* 34 (2) (2007) 231-240.
- Margolis R. L., Lohez O. D., Andreassen P. R.: G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis, *J Cell Biochem* 88 (2003) 673-683.
- Marinho-Filho J. D. B., Bezerra D. P., Araújo A. J., Montenegro R. C., Pessoa C., Diniz J. C., Viana F. A., Pessoa O. D. L., Silveira E. R., de Moraes M. O., Costa-Lotufo L. V.: Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells, *Chem-Biol Interact* 183 (2010) 369-379.
- Mark G., Schuchmann H.-P., von Sonntag C.: Formation of peroxynitrite by sonication of aerated water, *J Am Chem Soc* 122 (2000) 3781-3782.
- Marnett L. J.: Lipid peroxydation-DNA damage by malondialdehyde, *Mutat Res* 424 (1999) 83-95.
- Marnett L. J., Riggins J. N., West J. D.: Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein, *J Clin Invest* 111 (5) (2003) 583-593.
- Marti L., Morin N., Enrique-Tarancon G., Prevot D., Lafontan M., Testar X., Zorzano A., Carpenne C.: Tyramine and vanadate synergistically stimulate glucose transport in rat adipocytes by amine oxidase-dependent generation of hydrogen peroxide, *J Pharmacol Exp Ther* 285 (1998) 324-349.
- Mason R. P., Holtzman J. L.: The role of catalytic superoxide formation in the O₂ consumption of nitroreductase, *Biochem Biophys Res Commun* 67 (1975) 1267-1274.

- Matés M. J., Sánchez-Jiménez M. F.: Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy, *Int J Biochem Cell Biol* 32 (2000) 157-170.
- Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E.: Role of autophagy in cancer, *Cancer* 7 (2007) 961-967.
- Mazerska Z., Łukowicz J., Konopa J.: Antitumor activity of 1-nitro-9-aminoacridines including nitracrine against ascitic experimental tumors, *Arzneim-Forsch/Drug Res* 40 (1990) 472-477.
- McCafferty-Grad J., Bahlis N. J., Krett N., Aguilar T. M., Reis I., Lee K. P., Boise L. H.: Arsenic trioxide uses caspase-dependent and caspase-independent death pathways in myeloma cells, *Mol Cancer Ther* 2 (2003) 1155-1164.
- Mecocci P., MacGarvey U., Kaufman A. E., Koonty D., Shoffner J. M., Wallace D. C., Beal M. F.: Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain, *Ann Neurol* 34 (1993) 609-616.
- Miyajima A., Nakshima J., Yoshioka K., Tachibana M., Tazaki H., Murai M.: Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells, *Br J Cancer* 76 (1997) 206-210.
- Mizushima N.: Methods for monitoring autophagy, *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2004) 2491-2502.
- Mizushima N. i Yoshimori T.: How to interpret LC3 immunoblotting, *Autophagy* 3 (6) (2007) 542-545.
- Molinari M.: Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer, *Cell Prolif* 33 (2000) 261-274.
- Moon D.-O., Kim M.-O., Choi Y. H., Hyun J. W., Chang W. Y., Kim G.-Y.: Butein induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation, *Cancer Lett* 288 (2010) 204-213.
- Morel Y., Barouki R.: Repression of gene expression by oxidative stress, *Biochem J* 342 (1999) 481-496.
- Moreno S. N. J., Docampo R.: Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis, *Environmental Health Perspectives* 64 (1985) 199-208.
- Murphy M. P.: How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem J* 417 (2009) 1-13.
- Muyderman H., Nilsson M., Sims N. R.: Highly selective and prolonged depletion of mitochondrial glutathione in astrocytes markedly increases sensitivity to peroxynitrite, *J Neurosci* 24 (37) (2004) 8019-8028.

- Nictotera P., Moore M., Mirabelli F., Bellomo G., Orrenius S.: Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiol, *FEBS Lett* 181 (1) (1985) 149-153.
- Niemela O.: Aldehyde-protein adducts In the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress, *Front Biosci* 4 (1999) D506-D513.
- Nigg E. A.: Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 21-32.
- Nitta M., Kobayashi O., Honda S., Hirota T., Kuninaka S., Marumoto T., Ushio Y., Saya H.: Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents, *Oncogene* 23 (2004) 6548-6558.
- Niu C., Yan H., Yu T., Sun H. P., Liu J. X., Li X. S., Wu W., Zhang F. Q., Chen Y., Zhou L., Li J. M., Zeng X. Y., Yang R. R., Yuan M. M., Ren M. Y., Gu F. Y., Cao Q., Gu B. W., Su X. Y., Chen G. Q., Xiong S. M., Zhang T. D., Waxman S., Wang Z. Y., Chen Z., Hu J., Shen Z. X., Chen S. J.: Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring inn 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients, *Blood* 94 (1999) 3315-3324.
- Oberley R. W., Buettner G. R.: Role of superoxide dismutase in cancer: a review, *Cancer Res* 39 (1979) 1141-1149.
- Oliński R., Gackowski D., Rozalski R., Koksinski M., Biłkowski K.: Oxidative DNA damage In cancer patients: a causa or a consequence of the disease development?, *Mutat Res* 531 (2003) 177-190.
- Oliński R., Zastawny T., Budzbin J., Skokowski J., Zegarski W., Dizdargolu M.: DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues, *FEBS Lett* 309 (2) (1992) 193-198.
- Olson R. D., McDonald J. S., vanBoxtel Ch. J., Boerth R. C., Harbison R. D., Slonim A. E., Freeman R. W., Oates J. A.: Regulatory role of glutathione and soluble sulfhydryl groups in the toxicity of adriamycin, *J Pharmacol Exp Ther* 215 (2) (1980) 450-454.
- Orrenius S.: Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death, *Drug Metabolism Rev* 39 (2007) 443-455.
- Oson S., Hosoi H., Kuwahara Y., Matsumoto Y., Iehara T., Sugimoto T.: Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells, *Int J Cancer* 112 (2004) 219-224.
- Paglin S., Hollister T., Delohery T., Hackett N., McMahill M., Spiccas E., Domingo D., Yahalom J.: A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles, *Cancer Res* 61 (2001) 439-444.

- Pan H., Yin Ch., van Dyke T.: Apoptosis and cancer mechanisms, *Cancer Surveys* 29 (1997) 305-327.
- Pan Y., Gao Y., Chen L., Gao G., Dong H., Yang Y., Dong B., Chen X.: Targeting autophagy augments in vitro and in vivo antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy, *Clin Cancer Res* 17 (10) (2011) 3248-3258.
- Panasenko O. M.: The mechanism of the hypochlorite-induced lipid peroxidation, *Biofactors* 6 (1997) 181-190.
- Papaconstantinou J., Hsieh Ch.-Ch.: Activation of senescence and aging characteristic by mitochondrially generated ROS. How are they linked?, *Cell Cycle* 9 (19) (2010) 1-3.
- Park K.-J., Lee S.-H., Kim T.-I., Lee H.-W., Lee Ch.-H., Kim E.-H., Jang J.-Y., Choi K. S., Kwon M.-H., Kim Y.-S.: A human scFv antibody against TRAIL receptor 2 induces autophagic cell death in both TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant cancer cells, *Cancer Res* 67 (15) (2007) 7327-7334.
- Park S. S., Eom Y.-W., Choi K. S.: Cdc2 and Cdk2 play critical roles in low dose doxorubicin-induced cell death through mitotic catastrophe but not in high dose doxorubicin-induced apoptosis, *Biochem and Biophys Res Commun* 334 (2005) 1014-1021.
- Patel B. P., Upendra M. R., Tina K. D., Rakesh M. R., Shukla N. S., Patel P. S.: Lipid peroxydation, total antioxidant status, and total thiol levels predict overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma, *Integr Cancer Ther* 6 (2007) 365-372.
- Patingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X. H., Mizushima N., Packer M., Schneider M. D., Levine B.: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Berlin 1-dependent autophagy, *Cell* 122 (2005) 927-939.
- Pawlak J.W., Konopa J.: In vitro binding of metabolically activated [¹⁴C]-Ledakrin or 1-nitro-9-¹⁴C-(3'-dimethylamino-N-propylamino)acridine, a new antitumor and DNA cross-linking agent to macromolecules of subcellular fractions isolated from rat liver and HeLa cells, *Biochem Pharmacol* 28 (1979) 3391-3402.
- Pawlak J.W., Pawlak K., Konopa J.: The mode of action of cytotoxic and antitumor 1-nitroacridines. II. *In vivo* enzyme-mediated covalent binding of a 1-nitroacridine derivative, Ledakrin or Nitracrine, with DNA and other macromolecules of mammalian or bacterial cells, *Chem-Biol Interact* 43 (1983) 151-173.
- Pawlak K., Matuszkiewicz A., Pawlak J.W., Konopa J.: The mode of action of cytotoxic and antitumor 1-nitroacridines. I. The 1-nitroacridines do not exert their cytotoxic effects by physicochemical binding with DNA, *Chem-Biol Interact* 43 (1983) 131-149.

- Pawlak K., Pawlak J.W., Konopa J.: Cytotoxic and antitumor activity of 1-nitroacridines as an aftereffect of their interstrand DNA cross-linking, *Cancer Res* 44 (1984) 4289-4296.
- Pei X.-Y., Dai Y., Grant S.: The small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 interacts synergistically with flavopiridol to induce mitochondria injury and apoptosis in human myeloma cells through a free radical-dependent and Jun NH₂-terminal kinase-dependent mechanism, *Mol Cancer Ther* 3 (12) (2004) 1513-1524.
- Peitsch M. C., Mannherz H. G., Tscgopp J.: The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?, *Trends Cell Biol* 4 (1994) 37-41.
- Pelicano H., Carney D., Huang P.: ROS stress in cancer cells and therapeutic implications, *Drug Resist Updat* 7 (2004) 97-110.
- Pelicano H., Feng L., Zhou Y., Carew J. S., Hileman E. O., Plunkett W., Keating M. J., Huang P.: Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism, *J Biol Chem* 278 (2003) 37832-37839.
- Percy M. E.: Catalase: an old enzyme with a new role?, *Can J Biochem Cell Biol* 62 (1984) 1006-1014.
- Pervaiz S., Clement M. V.: Tumor intracellular redox status and drug resistance- serendipity or a casual relationship?, *Curr Pharm Des* 10 (2004) 1969-1977.
- Petak I., Tillman D.M., Houghton J.A.: p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines, *Clin Cancer Res* 6 (2000) 4432-4441.
- Peters J. M.: The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond, *Mol Cell* 9 (2002) 931-943.
- Płoszaj T., Robaszkiewicz A., Witas H.: Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA-przyczyna czy skutek zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu, *Post Biochem* 56 (2) (2010) 139-146.
- Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarpotto E.: Oxidative stress and cell signaling, *Curr Med Chem* 11 (2004) 1163-1182.
- Ponczek M. B., Wachowicz B.: Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami, *Post Biochem* 51 (2005) 140-145.
- Portugal J., Mansilla S., Bataller M.: Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells, *Curr Pharm Des* 16 (2010) 69-78.
- Powolny A. A., Singh S. V.: Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species, *Pharm Res* 25 (2008) 2171-2180.

- Puri R. N., Roskoski R.: Reaction of low molecular weight aminothiols with o-phthalaldehyde, *Anal Biochem* 173 (1988) 26-32.
- Qiang M.: Transcriptional response to oxidative stress: Pathological and toxicological implications, *Pharm Ther* 125 (2010) 376-393.
- Quadrilatero J., Hoffman-Goetz L.: N-acetyl-L-cysteine prevents exercise-induced intestinal lymphocyte apoptosis by maintaining intracellular glutathione levels and reducing mitochondrial membrane depolarization, *Biochem and Biophys Res Commun* 319 (2004) 894-901.
- Radzikowski C.: Compound C-283, a Survey of Collaborative Clinical and Preclinical Studies, United Pharmaceutical Industry "Polfa", Center of Scientific Information, Warszawa, (wyd.) 1974.
- Radzikowski C., Ledóchowski A., Hrabowska M., Horowska B., Stefańska B., Konopa J., Jereczek-Morawska E.: A search for antitumor compounds. Biological studies, VI., *Arch Imm Ther Exp* 17 (1969) 99.
- Rahman I., Marwick J., Kirkham P.: Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF- κ B and pro-inflammatory gene expression, *Biochem Pharmacol* 68 (2004) 1255-1267.
- Ramanathan B., Jan K. Y., Chen C. H., Hour T. C., Yu H. J., Pu Y. S.: Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity, *Cancer Res* 65 (2005) 8455-8460.
- Ramon O., Wong H. K., Joyeux M., Riondel J., Halimi S., Ravanat J. L., Favier A., Cadet J., Faure P.: 2'-deoxyguanosine oxidation is associated with decrease in the DNA-binding activity of the transcription factor Sp1 in liver and kidney from diabetic and insulin-resistant rats, *Free Radic Biol Med* 30 (2001) 107-118.
- Ramsey M. R., Sharpless N. E.: ROS as a tumor suppressor?, *Nature Cell Biol* 8 (11) (2006) 1213-1215.
- Rashid R., Langfinger D., Wagner R., Schuchmann H.-P., von Sonntag C.: Bleomycin vesus OH-radical-induced malonaldehydic-product formation in DNA, *Int J Radiat Biol* 75 (1) (1999) 101-109.
- Reiter R. J.: Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation, *Front Neuroendocrinol* 16 (4) (1995) 383-415.
- Richter C., Park J. W., Ames B. N.: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive, *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) 6465-6467.
- Riesz P., Kondo T.: Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications, *Free Radic Biol Med* 13 (1992) 247-270.

- Roninson I. B.: Tumor senescence as a determinant of drug response in vivo, *Drug Resistance Updates* 5 (2002) 204-208.
- Roninson I. B.: Tumor cell senescence in cancer treatment, *Can Res* 63 (2003) 2705-2715.
- Roninson I. B., Broude E. V., Chang B.-D.: If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells, *Drug Resistance Updates* 4 (2001) 303-313.
- Roos W. P., Kaina B.: DNA damage-induced cell death by apoptosis, *Trends in Mol Med* 12 (9) (2006) 440-450.
- Rossman T. G., Goncharova E. I.: Spontaneous mutagenesis in mammalian cells is caused mainly by oxidative events and can be blocked by antioxidants and metallothionein, *Mutat Res* 402 (1998) 103-110.
- Rubinsztein D. C., Cuervo A. M., Ravikumar B., Sarkar S., Korolchuk V., Kaushik S., Klionsky D. J.: Autophagy 5 (5) (2009) 585-589.
- Sablina A. A., Budanov A. V., Ilyinskaya G. V., Agapova L. S., Kravchenko J. E., Chumakov P. M.: The antioxidant function of the p53 tumor suppressor, *Nature Med.* 11 (2005) 1306-1313.
- Salmeen A., Bradford D.: Function and mechanism of redox regulation of cysteine-based phosphatases, *Antiox Redox Signal* 7 (2005) 556-577.
- Samudio I., Konopleva M., Hail N., Shi Y.-X., McQueen T., Hsu T., Evans R., Honda T., Gribble G. W., Sporn M., Gilbert H. F., Safe S., Andreeff M.: 2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-imidazolide (CDDO-Im) directly targets mitochondrial glutathione to induce apoptosis in pancreatic cancer, *J Biol Chem* 280 (43) (2005) 36273-36282.
- Sato K., Tsuchihara K., Fujii S., Sugiyama M., Goya T., Atomi Y., Ueno T., Ochiai A., Esumi H.: Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation, *Cancer Res* 67 (20) (2007) 9677-9684.
- Scatudo C. R. Jr.: Dithiothreitol and amino acids interfere with the fluorometric determination of glutathione with orthophthaldehyde, *Anal Biochem* 174 (1988) 265-270.
- Scherz-Shouval R., Elazar Z.: Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology, *Trends Biochem Sci* 36 (1) (2011) 30-38.
- Schmitt C. A., Fridman S. J., Yang M., Lee S., Baranov E., Hoffman R. M., Lowe S. W.: A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy, *Cell* 109 (2002) 335-346.

- Schneider E., Montenarh M., Wagner P.: Regulation of CAK kinase by p53, *Oncogene* 18 (1998) 2733-2741.
- Sikora E.: Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy), *Post Bioch* 40 (3) (1994) 150–159.
- Simon H.-U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F.: Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis* 5 (2000) 415-418.
- Singh V. S., Srivastava S. K., Choi S., Lew K. L., Antosiewicz A., Ciao D., Zeng Y., Watkins S. C., Johnson C. S., Trump D. L., Lee Y. J., Xiao H., Herman-Antosiewicz A.: Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species, *J Biol Chem* 280 (20) (2005) 19911-19924.
- Sinha B. K.: Free radicals in anticancer drug pharmacology, *Chem-Biol Inter* 69 (1989) 293-317.
- Skrzydlewska E., Sulkowski S., Koda M., Zalewski B., Kanczuga-Kona L., Sulkowska M.: Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer, *World J Gastroenterol* 11 (2005) 403-406.
- Skwarska A., Augustin E., Konopa J.: Sequential induction of mitotic catastrophe followed by apoptosis in human leukemia MOLT4 cells by imidazoacridinone C-1311, *Apoptosis* 12 (2007) 2245-2257.
- Sohal R. S.: Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process, *Free Radic Biol Med* 33 (2002) 37-44.
- Song Y. S., Lee B. Y., Hwang E. S.: Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis, *Mechanism of Ageing and Development* 126 (2005) 580-590.
- Spitz D. R., Philips J. W., Adams D. T., Sherman C. M., Deen D. F., Li G. C.: Cellular resistance to oxidative stress is accompanied by resistance to cisplatin: the significance of increased catalase activity and total glutathione in hydrogen peroxide-resistant fibroblasts, *J Cell Physiol* 156 (1993) 72-79.
- Squier T. C., Bigelow D. J.: Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis, *Front Biosci* 1 (2000) D504-D526.
- Stachurska A., Florczyk U., Józkwicz A., Dulak J., Łoboda A.: Nowe oblicza czynników indukowanych przez hipoksję-HIF-1 i HIF-2 a stres oksydacyjny, *Post Biochem* 56 (2) (2010) 156-164.
- Stadtman E. R., Levine R. L.: Protein oxidation, *Ann N Y Acad Sci* 899 (2000) 191-208.

- Stevens R. G., Graubard B. I., Micozzi M. S., Neriishi K., Blumberg B. S.: Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death, *Int J Cancer* 56 (1994) 364-369.
- Stoian I., Oros A., Moldoveanu E.: Apoptosis and free radicals, *Bioch Mol Med* 59 (1996) 93-97.
- Szostek A.: Wiązanie się do DNA pochodnych 4-metylo-1-nitroakrydyny wykazujących właściwości przeciwnowotworowe, Rozprawa doktorska, Uniwersytet Gdański (2003).
- Szostek A., Wysocka-Skrzela B., Tiwari R. K., Konopa J.: Interstrand crosslinking of DNA in tumor cells by a new group of antitumor 1-nitroacridines, *J Cancer Suppl* 13, 441 (2002).
- Szuławska A., Czyż M.: Molekularne mechanizmy działania antracyklin, *Post Hig Med Dosw* 60 (2006) 78-100.
- Tada-Oikawa S., Oikawa S., Kawanishi M., Yamada M., Kawanishi S.: Generation of hydrogen peroxide precedens loss of mitochondria membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis, *FEBS Lett* 442 (1999) 65-69.
- Tadi K., Ashok B. T., Chen Y., Banerjee D., Wysocka-Skrzela B., Konopa J., Darzynkiewicz Z., Tiwari R.K.: Pre-clinical evaluation of 1-nitroacridine derivative chemotherapeutic agent that has preferential cytotoxic activity towards prostate cancer, *Cancer Biol Ther* 6 (10) (2007) 1632-1637.
- Tadi K., Chen Y., Ashok B. T., Garikapaty V. P. S., Banerjee D., Wysocka-Skrzela B., Konopa J., Darzynkiewicz Z., Tiwari R.K.: Capridine β (C-1748): a novel 1-nitroacridine derivative targets the cyclin dependent kinase, cdk 4 and the tumor suppressor gene, p16 in prostate cancer, *Proc Ann Meet AACR* (2004) 3036.
- Tanida I., Minematsu-Ikeguchi N., Ueno T., Kominami E.: Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy, *Autophagy* 1 (2) (2005) 84-91.
- Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J., Hiai H.: Persistent oxidative stress in cancer, *FEBS Lett* 358 (1995) 1-3.
- Trachootham D., Alexandre J., Huang P.: Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, *Drug Discovery* 8 (2009) 579-591.
- Trachootham D., Zhou Y., Zhang H., Demizu Y., Chen Z., Pelicano H., Chiao P. J., Achanta G., Arlinghaus R. B., Liu J., Huang P.: Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate, *Cancer Cell* 10 (2006) 509-519.
- Tsujimoto Y., Shimizu S.: Another way to die: autophagic programmed cell death, *Cell Death and Differ* 12 (2005) 1528-1534.

- Turrens J. F.: Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain, *Bioscience Rep* 17 (1) (1997) 3-7.
- Tyurina Y. Y., Shvedova A. A., Kawai K., Tyurin V. A., Kommineni C., Quinn P. J., Schor N. F., Fabisiak J. P., Kagan V. E.: Phospholipid signaling In apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine, *Toxicology* 148 (2000) 93-101.
- Vafa O., Wade M., Kern S., Beeche M., Pandita T. K., Hampton G. M., Wahl G.M.: c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability, *Mol Cell* 9 (5) (2002) 1031-1041.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol* 39 (2007) 44-84.
- van den Dobbelen D. J., Nobel S. I., Schlegel J., Cotgreave I. A., Orrenius S., Slater A. F. G.: Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody, *J Biol Chem* 271 (26) (1996) 15420-15427.
- Veis D. J., Sorenson C. M., Shutter R. J., Korsmeyer S. J.: Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair, *Cell* 75 (1993) 229-240.
- Vigneron A., Vousden K. H.: p53, ROS and senescence in the control of aging, *Aging* 2 (8) (2010) 1-4.
- Wang D., Kreutzer d. A., Essigmann J. M.: Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions, *Mutat Res* 400 (1998) 99-115.
- Wang Q., Fan S., Eastman A., Worland P. J., Sausville E. A., O'Connor P. M.: UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53, *J Natl Cancer Inst* 88 (1996) 956-965.
- Wang X.-S., Yang W., Tao S.-J., Li K., Li M., Dong J.-H., Wang M.-W.: The effect of δ -elemene on Hela cell lines by apoptosis induction, *Yakuqaku Zasshi* 126 (10) (2006) 979-990.
- Wang Y.: Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species, *Chem Res Toxicol* 21 (2008) 276-281.
- Wen J., Sou K.-R., Lee S.-Y., Song Ch.-H., Kim D.-G.: Oxidative stress-mediated apoptosis, *J Biol Chem* 277 (41) (2002) 38954-38964.
- Wickman H., Rish A., Klimek F., Schmezer P., Spiegelhalder B., Dienemann H., Kayser k., Schulz V., Drings P., Bartsch H.: hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population, *Int J Cancer* 88 (2000) 932-937.

- Widłak P.: The DFF40/CAD endonuklease and its role in apoptosis, *Acta Biochim Pol* 47 (2000) 1037-1044.
- Wiseman H., Halliwell B.: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer, *Biochem J* 313 (1996) 17-29.
- Wiśniewska A., Mazerska Z., Konopa J.: Metabolic activation of antitumor 9-amino-1-nitroacridine derivatives C-857, C-1748 as a preliminary step of the covalent binding of this drug to DNA, *Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, (2004), Abstr. P36, 73.*
- Xia C., Meng Q., Liu L. Z., Rojanasakul Y., Wang X. R., Jiang B. H.: Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor, *Cancer Res* 67 (2007) 10823-10830.
- Yang X.-H., Zheng X., Cao J.-G., Xiang H.-L., Liu F., Lv Y.: 8-bromo-7-methoxychrysin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells involves ROS and JNK, *World J Gastroenterol* 16 (27) (2010) 3385-3393.
- Ye J., Wang S., Leonard S. S., Sun Y., Butterworth L., Antonini J., Ding M., Rojanasakul Y., Vallyathan V., Castranova V., Shi X.: Role of reactive oxygen species and p53 in chromium (VI)-induced apoptosis, *J Biol Chem* 274 (49) (1999) 34974-34980.
- Yorimitsu T., Klionsky D. J.: Autophagy: molecular machinery for self-eating, *Cell Death and Differ* 12 (2005) 1542-1552.
- Young T. W., Mei F. C., Yang G., Thompson-Lanza J. A., Liu J., Cheng X.: Activation of antioxidant pathways in ras-mediated oncogenic transformation of human surface ovarian epithelial cells revealed by functional proteomics and mass spectrometry, *Cancer Res* 64 (13) (2004) 4577-4584.
- Yuan X.-M., Li W., Dalen H., Lotem J., Kama R., Sachs L., Brunk U. T.: Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis, *PNAS* 99 (9) (2002) 6286-6291.
- Zabłocka A., Janusz M.: Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych, *Post Hig Med Dosw* 62 (2008) 118-124.
- Zanotto-Filho A., Delgado-Cañedo A., Schröder R., Becker M., Klamt F., Fonseca Moreira J. C.: The pharmacological NFκB inhibitors BAY117082 and MG132 induce cell arrest and apoptosis in leukemia cells through ROS-mitochondria pathway activation, *Cancer Lett* 288 (2010) 192-203.
- Zaremba T., Oliński R.: Oksydacyjne uszkodzenia DNA-ich analiza oraz znaczenie kliniczne, *Post Biochem* 56 (2) (2010) 124-138.
- Zhou Y., Hilman E. O., Plunkett W., Keating M. J., Huang P.: Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role In cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents, *Blond* 101 (2003) 4098-4104.

- Zweier J. L., Gianni L., Muindi J., Myers C. E.: Differences in O₂ reduction by the iron complexes of adriamycin and daunomycin: the importance of the sidechain hydroxyl group, *Biochim Biophys Acta* 884 (1986) 326-336.
- Żmijewski J. W., Landar A., Watanabe N., Dickinson D.A., Noguchi N., Darley-Usmar V. M.: Cell signaling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium, *Biochem Soc Trans* 33 (Pt 6) (2005) 1385-138.