

A k a d e m i a M e d y c z n a w G d a ń s k u

ANNALES

ACADEMIAE MEDICAE

GEDANENSIS

**APOPTOZA SPONTANICZNA I INDUKOWANA
KOMÓREK DWÓCH LINII CZERNIAKA
PRZESZCZEPIALNEGO
CHOMIKA RÓŻNIĄCYCH SIĘ CECHAMI
BIOLOGICZNYMI**

2397

MIROSLAWA CICHOREK

ROZPRAWA HABILITACYJNA

TOM XXXVI

2 0 0 6

SUPPLEMENT 7



**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVI
2 0 0 6
SUPPLEMENT 7**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Mirosława Cichorek

**APOPTOZA SPONTANICZNA I INDUKOWANA KOMÓREK
DWÓCH LINII CZERNIAKA PRZESZCZEPIALNEGO
CHOMIKA RÓŻNIĄCYCH SIĘ CECAMI BIOLOGICZNYMI**

***SPONTANEOUS AND INDUCED APOPTOSIS OF TWO HAMSTER
TRANSPLANTABLE MELANOMA LINES DIFFERING IN THEIR
BIOLOGICAL FEATURES***

Rozprawa habilitacyjna

Praca została wykonana w byłej Samodzielnej Pracowni Embriologii AMG
kierowanej przez prof. dr hab. med. Krystynę Kozłowską

Od 1.09.2006 r. Pracownia Embriologii znajduje się w
Zakładzie Anatomii i Neurobiologii Katedry Anatomii
Akademii Medycznej w Gdańsku

GDAŃSK 2006

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan, prof. AMG,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Akademia Medyczna w Gdańsku
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

*Najserdeczniej dziękuję
Pani Profesor dr hab. med. Krystynie Kozłowskiej
za przekazane mi doświadczenie, wiedzę,
poświęcony czas i wiele cennych wskazówek
w trakcie powstawania pracy*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	13
1.1. Zarys informacji o czerniaku.....	13
1.1.1. Epidemiologia czerniaka.....	13
1.1.2. Patogeneza czerniaka.....	14
1.1.3. Terapia czerniaka.....	15
1.1.4. Progresja i stadia rozwoju czerniaka.....	16
1.1.5. Czerniak amelanotyczny człowieka jako stosunkowo mało poznana forma tego nowotworu.....	18
1.1.5.1. Częstość występowania czerniaka amelanotycznego i prognozy dla osób chorych.....	19
1.1.5.2. Biologia czerniaka amelanotycznego.....	20
1.1.5.3. Mechanizm amelanizacji komórek czerniaka.....	21
1.2. Czerniak przeszczepialny chomika jako model badawczy do badań nad biologią czerniaka.....	23
1.3. Apoptoza.....	26
1.3.1. Ogólna charakterystyka procesu.....	27
1.3.2. Zmiany w przebiegu apoptozy w komórkach nowotworowych.....	29
1.3.3. Zmiany w przebiegu apoptozy w komórkach czerniaka.....	32
1.4. Apoptoza a proliferacja.....	33
1.5. Apoptoza, progresja czerniaka a jego cechy biologiczne.....	34
1.6. Kamptotecyna jako induktor apoptozy.....	39
2. UZASADNIENIE I CEL PODJĘTYCH BADAŃ.....	41
3. MATERIAŁ I METODY.....	43
3.1. Materiał.....	43
3.1.1. Zwierzęta.....	43
3.1.2. Linie czerniaka przeszczepialnego.....	43
3.1.3. Izolacja komórek czerniaka przeszczepialnego.....	43
3.1.4. Inkubacja komórek czerniaka.....	44
3.2. Metody oceniające odsetek komórek apoptycznych.....	44
3.2.1. Zmiany potencjału transbłonowego mitochondriów ($\Delta\Psi$) – barwienie JC-1.....	44
3.2.2. Zmiany w strukturze błony komórkowej (eksternalizacja fosfatydyloseryny) – jednoczesne barwienie aneksyną V oraz jodkiem propidyny.....	45
3.2.3. Aktywacja kaspaz – metoda FLICA.....	46
3.2.4. Degradacja DNA oceniana metodą TUNEL.....	46
3.3. Analiza cyklu komórkowego.....	47
3.4. Oznaczenie obecności receptora Fas i ligandu FasL w błonie komórkowej badanych komórek czerniaka.....	47
3.5. Identyfikacja metodą Western blot: cytochromu c, prokaspazy 8 i 9, PARP, Bcl-2, surwiwiny, AIF, białka p53 w lizatach badanych komórek czerniaka.....	48
3.6. Ocena morfologii komórek – barwienie oranżem akrydyny (AO) i jodkiem propidyny.....	49
3.7. Ocena masy mitochondriów.....	49

3.8. Ocena statystyczna uzyskanych wyników	50
4. WYNIKI.....	51
4.1. Ocena apoptozy spontanicznej komórek linii melanotycznej i amelanotycznej czerniaka	51
4.1.1. Komórki o obniżonym potencjale transbłonowym mitochondriów ($\Delta\Psi$); ocena potencjału transbłonowego mitochondriów we wszystkich komórkach	51
4.1.2. Komórki z aktywnymi kaspazami	57
4.1.3. Komórki ze zmianami w błonie komórkowej (eksternalizacja fosfatydyloseryny)	57
4.1.4. Komórki wykazujące pęknięcia nici DNA wykrywane metodą TUNEL	59
4.1.5. Komórki o obniżonej zawartości DNA (komórki lokalizujące się w obszarze sub G0/G1)	60
4.2. Ocena apoptozy indukowanej kamptotecyną (CPT) w komórkach linii melanotycznej i amelanotycznej czerniaka.....	62
4.2.1. Komórki o obniżonym potencjale transbłonowym mitochondriów ($\Delta\Psi$); ocena potencjału transbłonowego mitochondriów we wszystkich komórkach	64
4.2.2. Komórki z aktywnymi kaspazami	68
4.2.2.1. Zawartość procentowa komórek z aktywnymi kaspazami oceniana metodą cytometryczną	68
4.2.2.2. Obraz w mikroskopie konfokalnym komórek inkubowanych z CPT.....	72
4.2.3. Komórki ze zmianami w błonie komórkowej (eksternalizacja fosfatydyloseryny)	75
4.2.4. Komórki wykazujące pęknięcia nici DNA wykrywane metodą TUNEL	79
4.2.5. Komórki o obniżonej zawartości DNA (komórki lokalizujące się w obszarze sub G0/G1).....	79
4.3. Dynamika procesu apoptozy oznaczana poprzez zmiany zawartości wczesno- i późnoapoptycznych komórek	81
4.3.1. Dynamika apoptozy spontanicznej	81
4.3.2. Dynamika apoptozy indukowanej przez CPT.....	84
4.4. Analiza zawartości komórek w poszczególnych fazach cyklu oraz ocena z jakiej fazy cyklu komórkowego pochodzą komórki ginące na drodze spontanicznej i indukowanej CPT apoptozy	85
4.4.1. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu wśród komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego	85
4.4.2. Analiza spontanicznej apoptozy komórek badanych czerniaków znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego	88
4.4.3. Analiza apoptozy komórek z poszczególnych faz cyklu komórkowego po działaniu CPT	91
4.5. Ocena udziału elementów drogi zewnętrznej i wewnętrznej w przebiegu apoptozy.....	92
4.5.1. Zawartość receptora Fas i cząsteczki FasL w błonie komórkowej	92

4.5.2.	Obecność prokaspazy 8 i prokaspazy 9 oraz fragmentów powstających w czasie aktywacji tych kaspaz w badanych komórkach	93
4.5.3.	Uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytosolu.....	93
4.5.4.	Proteoliza PARP jako przejaw aktywacji kaspaz efektorowych.....	93
4.6.	Ocena udziału wybranych białek regulujących przebieg apoptozy: białka Bcl-2, surwiwiny, białka p53 w apoptozie badanych komórek.....	96
4.6.1.	Apoptoza spontaniczna.....	96
4.6.1.1.	Białko Bcl-2.....	96
4.6.1.2.	Surwiwina.....	96
4.6.1.3.	Białko p53.....	97
4.6.2.	Apoptoza indukowana CPT.....	99
4.6.2.1.	Białko Bcl-2.....	99
4.6.2.2.	Surwiwina.....	99
4.6.2.3.	Białko p53.....	99
4.7.	Ocena udziału AIF – czynnika pozakaspazowej drogi apoptozy – w śmierci badanych komórek czerniaka	102
4.7.1.	AIF w apoptozie spontanicznej.....	102
4.7.2.	AIF w apoptozie indukowanej CPT.....	102
5.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	104
6.	WNIOSKI	119
7.	STRESZCZENIE	120
8.	SUMMARY	123
9.	PIŚMIENNICTWO.....	126

Wykaz najważniejszych skrótów używanych w pracy

Ab	linia amelanotyczna czerniaka przeszczepialnego chomika
AIF	czynnik aktywujący pozakaspazową drogę apoptozy (<i>apoptosis inducing factor</i>)
AO	oranż akrydyny; wiążąc się z DNA pozwala uwidocznić kondensację chromatyny w jądrze komórkowym (<i>acridine orange</i>)
Bcl-2	antyapoptyczne białko rodziny Bcl-2
CPT	kamptotecyna
$\Delta\Psi$	potencjał transblonowy błony mitochondrialnej
Fas	receptor błonowy dla FasL
FasL	ligand receptora Fas
G0, G1, S, G2, M	fazy cyklu komórkowego
FLICA	metoda identyfikacji komórek z aktywnymi kaspazami (<i>fluorochrome-labeled inhibitors of caspases</i>)
IAP	białka hamujące apoptozę (<i>inhibitor apoptosis proteins</i>)
JC-1	barwnik fluorescencyjny kationowego fluorochromu jodku 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylbzenoimidazolo-karbocyanu
Ma	linia melanotyczna czerniaka przeszczepialnego chomika
NAO	nonylo oranż akrydny; barwnik wiążący się z kardioliną w błonie mitochondrialnej służący do oceny masy mitochondriów w komórce (<i>nonyl acridine orange</i>)
PARP	polimeraza poli (ADP-rybozy)
PI	jodek propidyny (<i>propidium iodide</i>)
PS	fosfatydyloseryna; fosfolipid w wewnętrznej warstwie fosfolipidów błony komórkowej
TUNEL	metoda oceny apoptycznych pęknięć DNA (<i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated d-UTP nick end labeling</i>)

1. WSTĘP

1.1. Zarys informacji o czerniaku

Proces powstawania nowotworu jest procesem wieloczynnikowym i wieloetapowym. Za podstawę procesu nowotworzenia przyjmuje się zmiany w genach supresorowych i protoonkogenach prowadzące do rozregulowania cyklu komórkowego, czego wynikiem jest nieograniczona proliferacja komórek nowotworowych [42, 53, 56, 135, 140, 198]. Według niektórych autorów, wzrastająca wiedza o mechanizmach regulujących podstawowe procesy (proliferyację, różnicowanie, śmierć), zarówno w komórce prawidłowej jak i nowotworowej, w niedługim czasie pozwoli na określenie cech odróżniających komórkę nowotworową od prawidłowej bez względu na rodzaj powstałego nowotworu [125, 130]. Obserwacje powstawania i rozwoju nowotworów u człowieka i zwierząt wskazują, iż komórki nowotworowe podlegają selekcji klonalnej, w trakcie której powstają komórki przystosowane do zmieniających się warunków, związanych z progresją nowotworu [221].

Hanahan i Weinberg [125] wyróżniają sześć podstawowych zmian w fizjologii komórki, które zachodzą w czasie przemiany nowotworowej:

- samowystarczalność pod względem produkcji czynników wzrostu
- niewrażliwość na czynniki hamujące wzrost
- **zdolność do unikania śmierci drogą apoptozy**
- nieograniczona zdolność do replikacji
- zdolność do indukcji angiogenezy
- zdolność komórek do rozprzestrzeniania się w obrębie sąsiadujących tkanek i tworzenia odległych przerzutów

Większość tych zmian jest wynikiem zmian genetycznych, które nie zostały usunięte przez systemy naprawcze DNA [27, 50, 57, 127, 166].

Jednym z nowotworów, o którego przyczynach powstania i biologii komórek nadal wiadomo niewiele jest czerniak.

1.1.1. Epidemiologia czerniaka

Statystyki światowe wskazują, iż liczba zachorowań na czerniaka skóry stale rośnie. Największą zachorowalność na ten nowotwór stwierdza się w Australii (26,0/100 000), a najniższą w Chinach (0,3/100 000) [332]. Wzrost zachorowalności na czerniaka jest obserwowany we wszystkich krajach prowadzących takie statystyki.

W Polsce nowotwór ten należy do stosunkowo rzadkich nowotworów złośliwych – zajmuje piętnaste miejsce wśród wszystkich nowotworów [332], ale obser-

wuje się ciągle wzrost współczynnika zachorowalności z 0,8 w roku 1962 do 3,5/100 000 w roku 2002 [332].

1.1.2. Patogeneza czerniaka

Powszechnie uważa się, iż czerniak powstaje z melanocytów, w wyniku zmian genetycznych wywołanych głównie promieniowaniem UV, ale mechanizm molekularny tego procesu wciąż nie jest wyjaśniony.

Istnieje jednak wiele obserwacji wskazujących na różnice między komórkami czerniaka i melanocytami, które dotyczą:

- procesu wzrostu [23, 119, 234]
- przebiegu apoptozy [123, 267, 313]
- zdolności migracyjnych komórek [33, 119, 136, 138, 151]
- mechanizmów chroniących komórki przed działaniem układu immunologicznego [44, 148, 287, 292]

Na podkreślenie zasługuje również obserwowana duża heterogenność komórek tego nowotworu [18, 44, 130].

Uważa się, że promieniowanie UV zwiększa w melanocytach produkcję czynników wzrostu takich jak: CSF (czynniki stymulujące powstawanie kolonii), FGF (czynniki wzrostu fibroblastów), TGF (transformujące czynniki wzrostu), które przekazują sygnał do komórki przy udziale drogi RAS/BRAF/MAPK {RAS – białko należące do białek G aktywujące kaskadę kinaz, kinazy serynowo-treoninowe: BRAF (typ B kinazy RAF), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)} [130].

Okazuje się, że mutacje genu kodującego kinazę serynowo-treoninową B-Raf występują w komórkach w ponad 60% wczesnych zmian melanocytarnych prowadzących do powstania czerniaka [68]. Innymi genami, w obrębie których stwierdzono zmiany w komórkach czerniaka są:

- gen INK4A/MTS1 kodujący białko p16 (w warunkach prawidłowych białko p16 hamuje działanie kompleksu: cykliny D1/Cdk4 w wyniku czego nie dochodzi do fosforylacji białka Rb i następuje areszt komórki w fazie G1) – w postaci rodzinnej czerniaka uznany za gen supresorowy [44, 77, 234],
- gen CDK4 kodujący kinazę zależną od cykliny Cdk4, która tworzy kompleks z cykliną D1 [44, 234],
- gen HDM2 (białko Hdm2 wiąże białko p53 i kieruje je do proteasomu) [44, 234],
- gen PTEN – w warunkach prawidłowych białko PTEN jest fosfatazą lipidową (defosforyluje PIP3 co prowadzi do zahamowania aktywacji kinazy Akt) i białkową (defosforyluje np. kinazę FAK, białka szlaku MAPK), a jego działanie wpływa na proliferację, apoptozę, proces adhezji komórek i ich migrację [333].

W dalszych etapach przemiany nowotworowej, komórki czerniaka ze zmianami genetycznymi, aby uniknąć zniszczenia drogą apoptozy podwyższają m.in.

produkcję białek antyapoptycznych Bcl-2 [40] oraz obniżają zawartość Apaf-1 koniecznego do aktywacji kaspazy 9 [11].

Podkreśla się również, iż w transformacji melanocyta w komórkę czerniaka mogą brać również udział inne komórki występujące w skórze i towarzyszące melanocytom np. keratynocyty [44, 58, 129].

W ostatnim czasie pojawiają się doniesienia informujące o istnieniu macierzystych komórek nowotworowych w różnych nowotworach [266], w tym i w czerniaku [84, 111, 266]. Dotychczas badania komórek macierzystych czerniaka dotyczyły głównie ich charakterystyki morfologicznej i poszukiwania swoistych markerów [84, 111]. Jakie jest pochodzenie tych komórek dokładnie nie wiadomo. Grichnik i wsp. uważają, że komórki macierzyste czerniaka mogą pochodzić ze zmutowanych komórek grzebieni nerwowych, komórek z których pochodzą melanocyty [111]. Należy jednak podkreślić, iż dokładny mechanizm powstawania czerniaka nie został jeszcze wyjaśniony.

1.1.3. Terapia czerniaka

Główną metodą leczenia czerniaka jest chirurgiczne usunięcie zmiany, gdyż na chemioterapię nowotwór ten wykazuje dużą oporność, a wrażliwość na radioterapię jest bardzo zróżnicowana i dotąd nie znane są mechanizmy takiego zachowania komórek czerniaka. Pomimo usilnych poszukiwań skutecznych chemioterapeutyków, na terapię odpowiada jedynie 18–24% chorych [306]. Radioterapia ze względu na bardzo zróżnicowaną wrażliwość komórek czerniaka jest stosowana głównie w pooperacyjnym leczeniu uzupełniającym i paliatywnym, w ograniczaniu masy przerzutów, szczególnie do kości i mózgu [254]. Oporność czerniaka w zaawansowanych stadiach rozwoju na chemio- i radioterapię skłania do poszukiwań metod aktywujących układ immunologiczny pacjenta do walki z nowotworem. W tych metodach podejmowane są próby stymulacji układu immunologicznego przez różne cytokiny np. interferony, interleukiny [149, 204] oraz szczepionki ze zmodyfikowanych komórek czerniaka [199] lub uczulonych antygenami czerniaka limfocytów T [233].

Pomimo, iż czerniak jest nowotworem immunogennym i znane są swoiste antygeny komórek czerniaka rozpoznawane przez komórki układu immunologicznego [124, 149, 204, 306], to wyniki immunoterapii nadal są niezadowalające, gdyż np. tylko około 16% osób chorych odpowiadało na interleukinę 2 podawaną w dużych dawkach [15, 303, 306]. Od kilku lat trwają próby łączenia chemio- i immunoterapii zwane biochemioterapią, gdzie stosuje się czynniki chemiczne oraz interferon α i interleukinę 2, w metodzie tej jednak uzyskano również niewielki efekt terapeutyczny [271, 303, 306].

Ze względu na brak skutecznych metod leczenia czerniak zaliczany jest do tzw. „nowotworów sygnałowych” tzn. takich, które jako pierwsze testuje się przy badaniu nowych leków i metod leczenia. W związku z niepowodzeniami terapeu-

tycznymi trwają intensywne badania nad znalezieniem nowych możliwości interwencji na poziomie molekularnych szlaków odpowiedzialnych za wzrost czerniaka [44, 46, 90, 127, 130, 261]. Wiadomo, że wzrost nowotworu jest wypadkową proliferacji i śmierci komórek nowotworowych, dlatego szczególnie te dwa procesy w ostatnich latach są intensywnie badane.

Do interesujących doniesień należy zaliczyć wykrycie występowania mutacji w genie B-RAF występującej w około 60% czerniaków [68] oraz amplifikację genu kodującego czynnik transkrypcyjny związany z procesem melanogenezy – MITF (*Microphthalmia Transcription Factor*) [98]. Wyniki tych badań wskazują potencjalne cele w terapii czerniaka w fazie przerzutów, mutacje wyżej wspomnianego genu kinazy B-Raf prowadzą do aktywacji kinaz stymulujących proliferację komórek i dlatego zablokowanie tych kinaz staje się jednym z celów nowych terapii w czerniaku [130, 262].

Trwają także bardzo intensywne poszukiwania biomarkerów czerniaka, które stanowiłyby pomoc w wyborze terapii dla danego pacjenta i pozwalały na monitorowanie jej skuteczności.

Na konieczność doboru terapii dla określonego pacjenta wskazują obserwacje innych nowotworów np. raka płuc, gdzie tylko chorzy z mutacją w genie dla receptora EGF (czynnik wzrostu naskórka) odpowiadają na terapię antagonistami EGF [226]. Taka więc preselekcja pacjentów przed rozpoczęciem leczenia zdecydowanie polepsza wyniki terapii.

Wobec trwających poszukiwań sposobu skutecznego niszczenia komórek czerniaka w zaawansowanych stadiach jego rozwoju, stadiach z jakimi najczęściej zgłaszają się chorzy, pojawia się potrzeba oceny pewnych parametrów biologicznych np. tempa proliferacji komórek oraz zdolności tych komórek do umierania, w celu oceny skuteczności stosowanej terapii.

Zatem istnieje konieczność badań nad biologią czerniaka i znaczeniem jego cech biologicznych w rozwoju nowotworu, aby można było określić, które jego cechy najlepiej określają charakter tego nowotworu i którymi najskuteczniej można sterować przy stosowaniu efektywnej terapii.

1.1.4. Progresja i stadia rozwoju czerniaka

Jak już powyżej wspomniano przyjmuje się, że czerniak skóry powstaje w wyniku transformacji nowotworowej melanocytów znajdujących się w zmianach melanocytarnych.

Wyróżniono następujące etapy tego procesu [200]:

- powstanie znamienia atypowego – dotyczy głównie czerniaka rodzinnego
- czerniak *in situ*
- czerniak pierwotny o poziomej fazie wzrostu
- czerniak pierwotny o pionowej fazie wzrostu
- czerniak przerzutowy

Jednakże podział ten wprowadzony przez Clarka [54] dotyczy głównie rodzinnej formy czerniaka, zaś w czerniaku spontanicznym znajduje potwierdzenie tylko w 35% [129]. Szacuje się, że ze znamion melanocytnych pochodzi ponad 30% czerniaków [129, 249], niestety źródło pochodzenia większości spontanicznych czerniaków jest nie znane. Również nie są jeszcze poznane swoiste biomarkery dla poszczególnych molekularnych stadiów rozwoju czerniaka.

Oprócz wyżej wymienionych określeń opisujących etapy rozwoju czerniaka przy charakterystyce tego nowotworu podawany jest typ histopatologiczny tego nowotworu. Do najczęściej spotykanych typów histopatologicznych czerniaka należą [254]:

- postać powierzchniowa – SSM (*superficial spreading melanoma*); 60–70% wśród wszystkich czerniaków
- postać guzkowata – NMM (*nodular malignant melanoma*); 15–30%
- czerniak w plamie soczewicowatej – LMM (*lentigo malignant melanoma*); 5%
- czerniak powierzchni dłoni lub podeszwy – ALM (*acral lentiginous melanoma*); 2–10%

Do oceny progresji czerniaka służy skala TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*).

W klinicznej ocenie najistotniejsze w prognozowaniu rozwoju czerniaka są grubość zmiany oraz brak lub obecność komórek przerzutowych w węzłach chłonnych. Ustalono, iż grubość zmiany do 2 mm daje szansę pięcioletniego przeżycia prawie 90% chorych, zaś 4 mm zmiana daje taką szansę już tylko dla nieco ponad 40% chorych [257]. Zatem wczesna diagnoza czerniaka daje osobie chorej zdecydowanie większą szansę przeżycia. Innymi czynnikami branymi jeszcze pod uwagę przy ocenie klinicznej mogą być: wiek, płeć, miejsce lokalizacji zmiany, a przy badaniu histologicznym: owrzodzenie, liczba mitoz, regresja [16, 44, 76, 278, 306].

Z wiadomości przytoczonych powyżej widać wyraźnie, iż wyniki molekularnych badań nad biologią czerniaka, w diagnostyce tego nowotworu nie znajdują jeszcze powszechnego zastosowania. Z tego względu trwają bardzo intensywne poszukiwania parametrów biologicznych, które znalazłyby praktyczne zastosowanie w ocenie klinicznej.

Ostatnie lata dostarczyły wielu informacji z zakresu angiogenezy i limfogenezy w nowotworach oraz roli tych procesów w przeżyciu, wzroście i rozwoju wielu różnych nowotworów [44, 125, 242, 308]. Komórki czerniaka okazały się tu wyjątkowymi komórkami, ze względu na możliwość nabywania cech fenotypowych komórek śródbłonna i zdolności do tworzenia kanałów krwionośnych [128]. Zjawisko to nazwano „*vasculogenic mimicry* – „naczyniową mimikrą” i wiadomo już, że odgrywa ono istotną rolę w progresji tego nowotworu [128, 242].

Dość dobrze poznano interakcje komórek czerniaka z układem immunologicznym, zjawisko supresji tego układu przez komórki nowotworowe [44, 148, 287, 292], ale nadal niewiele wiemy o roli oddziaływań między komórkami nowotworowymi a komórkami prawidłowymi otaczającymi rozwijający się nowotwór takimi

jak: keratynocyty, fibroblasty, komórki śródbłonka, w rozwoju i progresji tego nowotworu [44, 58, 129].

Komórki barwnikowe pochodzące ze znamion melanocytarnych czy pierwotnych czerniaków mogą podlegać różnicowaniu lub śmierci, ale mechanizmy tych procesów są również stosunkowo mało poznane.

Przeciwciała używane do identyfikacji markerów powierzchniowych komórek czerniaka (HMB 45, vimentyna, białko S 100) pozwalają odróżnić ten nowotwór od innych, ale nie pozwalają na wczesne jego wykrycie.

Niektórzy badacze podkreślają, iż należy również wrócić do opisywanej heterogenności komórek czerniaka [18, 44, 130]. Szczególnie wobec wykrycia istnienia komórek macierzystych dla tego nowotworu [84, 111, 266]. Znalezienie substancji niszczącej komórki macierzyste czerniaka być może pozwoliłoby skutecznie walczyć z jego rozwojem.

Zatem badania nad poznaniem biologii czerniaka trwają i są prowadzone w wielu kierunkach, aby wykryć cele molekularne, które mogłyby być przydatne w terapii tego nowotworu.

Badania nad biologią czerniaka opierają się głównie na badaniu komórek linii wyprowadzanych z różnych stadiów rozwojowych czerniaka i porównywaniu ich zachowań. Taki jednak materiał pochodzi od różnych osób i uniemożliwia obserwacje zmian w trakcie rozwoju czerniaka. Z tego względu do badań nad zmianami w biologii czerniaka bardzo przydatne są modele zwierzęce zapewniające jednorodny, powtarzalny materiał badawczy.

Zatem wykorzystywane w obecnych badaniach dwie linie: melanotyczna i amelanotyczna (powstała w wyniku spontanicznej przemiany z linii melanotycznej) czerniaka przeszczepialnego chomika stanowią znakomity model badawczy umożliwiający prowadzenie powtarzalnych badań porównawczych nad biologią tych dwóch form czerniaka, różniących się cechami biologicznymi.

Czerniak amelanotyczny występuje również u człowieka i jest dość rzadko spotykaną formą tego nowotworu (stanowi 2–12% wszystkich czerniaków). Niewiele także wiadomo o biologii czerniaka amelanotycznego, wiedza nasza pochodzi głównie z obserwacji poszczególnych chorych.

1.1.5. Czerniak amelanotyczny człowieka jako stosunkowo mało poznana forma tego nowotworu

Ze względu, iż materiałem badawczym w obecnej pracy jest m.in. linia amelanotyczna czerniaka przeszczepialnego uzasadnione wydaje się przedstawienie zarysu dotychczasowej wiedzy o czerniaku amelanotycznym, opartej głównie na wynikach badań czerniaka u człowieka.

Cechą czerniaka jest różna zawartość melaniny w komórkach, dlatego zmiany nowotworowe przybierają barwę od czarnej poprzez brązową, niebieską, aż do białej [165]. Komórki czerniaka amelanotycznego wykazują bardzo niską zawartość

lub brak melaniny. Czerniaki z małą ilością barwnika lub jego brakiem przy badaniu makroskopowym mogą przypominać pierwotne lub przerzutowe zmiany innych nowotworów [118, 180, 216, 314].

Wobec wspomnianego już faktu, iż nie ma jednoznacznego markera dla komórek czerniaka, identyfikacja czerniaka amelanotycznego stanowi wyzwanie dla patologów i wymaga dużego doświadczenia przy rozpoznawaniu tej formy nowotworu. Niektórzy patolodzy uważają, że przy braku ogniska pierwotnego nowotworu, identyfikując nowotwór z przerzutów, czerniaka można rozpoznawać stwierdzając w komórkach obecność markera procesu melanogenezy (np. HMB 45) i sprawdzając w mikroskopie elektronowym obecność melanosomów w komórce [165].

1.1.5.1. Częstotliwość występowania czerniaka amelanotycznego i prognozy dla osób chorych

Czerniak amelanotyczny, jak już wspomniano powyżej, jest formą nowotworu występującą stosunkowo rzadko, ale uznawany jest za formę bardziej złośliwą i gorzej rokującą niż forma melanotyczna czerniaka. Szacuje się, iż stanowi on od 2% [13, 32, 118] do 12% [101, 179, 314] wszystkich form czerniaka. Zaobserwowano, iż szczególnie często czerniak amelanotyczny skóry występuje w następujących histopatologicznych formach: postaci guzkowej czerniaka (NMM; około 50%) i w czerniaku powierzchni dłoni lub podeszwy (ALM; 25%) [165].

Ze względu na trudności w diagnostyce, czerniak amelanotyczny często jest wykrywany już w bardzo zaawansowanych stadiach rozwoju (4–5 stopień wg Clarka) i wtedy średni czas przeżycia wynosi 13 miesięcy [12].

Redondo i wsp. zwracają uwagę, iż forma amelanotyczna czerniaka może powstać w bliznie pourazowej [245], a Ferrari i wsp. wykazali, iż czerniak amelanotyczny stanowił około 78% czerniaków u dzieci [87].

W 35%–60% przerzutów występuje czerniak amelanotyczny [156, 232], nawet jeśli forma pierwotna była melanotyczna. Spotyka się również przerzuty z komórkami melanotycznymi i amelanotycznymi [156, 232]. Nie ma pełnej zgodności w kwestii czy prognozy dla chorych z formą amelanotyczną przerzutów są gorsze w porównaniu z chorymi z formą melanotyczną przerzutów; podczas gdy Huvos i wsp. opisują, iż osoby z formą amelanotyczną przerzutów żyły krócej [143], to Giuliano i wsp. wykazali podobny czas przeżycia u chorych z przerzutami melanotycznymi i amelanotycznymi [118].

Także Ariel i wsp., obserwując, iż dziesięcioletnie przeżycie wśród chorych z czerniakiem amelanotycznym wynosi 20%, a z melanotycznym 63%, wskazują na bardziej agresywny charakter czerniaka amelanotycznego [12].

Podkreślić jednak należy, że zarówno w piśmiennictwie krajowym [255, 273] jak i światowym [44, 61, 278] pojawia się stwierdzenie, iż utrata melaniny przez komórki czerniaka jest wyrazem niskiego zróżnicowania morfologicznego komórek

i pociąga za sobą szybkie tempo wzrostu, wzmożoną złośliwość oraz wiąże się ze złym rokowaniem.

Z powodu jednak braku systematycznych badań nad biologią czerniaka amelanotycznego, wciąż istnieją kontrowersje czy utrata melaniny może być czynnikiem prognostycznym [273].

Jednakże od momentu opisanych powyżej badań, przeprowadzonych wprawdzie na dużej grupie chorych 20 lat temu, pomimo uzyskania niejednoznacznych wyników, powszechnie przyjmuje się, iż stopień melanizacji komórek czerniaka nie ma wpływu na czas przeżycia chorych. Konsekwencją tego założenia jest stosowanie jednakowych terapii w leczeniu obu form czerniaka lub nie przywiązywanie wagi do stopnia melanizacji komórek linii czerniaka, na których wykonuje się badania wrażliwości tego nowotworu na chemioterapeutyki.

1.1.5.2. Biologia czerniaka amelanotycznego

Jak już wspomniano wcześniej utratę barwnika w komórkach czerniaka amelanotycznego wiąże się z mniejszym zróżnicowaniem komórek tego nowotworu i jego szybszym tempem wzrostu [61]. Nie zostało jednak dotąd ustalone na ile jest to wynik zwiększonej proliferacji, a na ile mniejszej liczby komórek ginących w czerniaku.

Jednocześnie podkreśla się, iż proliferacja i zdolność do apoptozy mogą być czynnikami prognostycznymi w wielu nowotworach [72, 106, 134, 210]. Niektórzy badacze zwracają uwagę na wartość indeksu mitotycznego jako dodatkowego elementu, który powinien być brany pod uwagę przy prognozach czerniaka [19, 93, 181]. Czerniak zaliczany jest do nowotworów o wysokim stopniu proliferacji komórek [61].

Na podstawie badań doświadczalnych należy również rozważać, co zyskuje komórka czerniaka przez zablokowanie syntezy melaniny. Costa i wsp. zwracają uwagę, iż brak melanogenezy oznacza mniejsze zróżnicowanie komórek, co sprzyja proliferacji komórek [61], zaś Slingluff i wsp. stwierdzili, iż komórki czerniaka nie wykazując ekspresji antygenów związanych z melanogenezą unikają rozpoznania i zniszczenia przez limfocyty cytotoksyczne [276].

Bardzo mało prac porównuje biologiczne cechy takie jak np. proliferację komórek, ekspresję antygenów i receptorów w komórkach czerniaka melanotycznego i amelanotycznego [59, 155, 236]. Costa i wsp. zaobserwowali, iż przerzuty czerniaka amelanotycznego wykazują tendencję do wzrostu liczby komórek proliferujących (8,3%) w porównaniu z przerzutami czerniaka melanotycznego (5,9%), a jednocześnie przerzuty z większym odsetkiem komórek proliferujących wiązały się z krótszym czasem przeżycia pacjentów [61]. Autorzy tej pracy podkreślają, iż badane komórki pochodzące z wszystkich przerzutów wykazywały duże zróżnicowanie w zawartości komórek dzielących się od 0,01% do 31,7% (średnia 8,0%). Ten rozrzut nie zależał od żadnej wyróżnianej w patologii cechy czerniaka np. typu hi-

stologicznego, grubości zmiany, obecności lub braku owrzodzenia. Zatem, odsetek komórek dzielących się może odzwierciedlać indywidualne biologiczne zróżnicowanie tego nowotworu, nie związane z wyróżnianymi powyżej patologicznymi cechami [61].

Obserwacje te wyraźnie wskazują, iż cechy biologiczne czerniaka powinny być brane pod uwagę w patologii jako czynnik rokowniczy, jak również determinujący wybór terapii. Na konieczność podjęcia badań porównawczych nad biologią czerniaka melanotycznego i amelanotycznego zwracano już uwagę od ponad dziesięciu lat [4].

1.1.5.3. Mechanizm amelanizacji komórek czerniaka

Etiologia czerniaka amelanotycznego jest niewyjaśniona; nie poznany jest bowiem mechanizm utraty melaniny przez komórki czerniaka. W piśmiennictwie zwraca się uwagę, iż zmiany wydają się dotyczyć głównie postranslacyjnej modyfikacji tyrozynazy – enzymu melanogenezy, ponieważ w komórkach czerniaka amelanotycznego stwierdzano aktywność tego enzymu, pomimo braku melaniny.

Próby wyjaśnienia tego problemu podjął prof. Andrzej Bomirski badając linię melanotyczną i amelanotyczną czerniaka przeszczepialnego chomika. W swojej rozprawie habilitacyjnej postawił hipotezę, iż u podstaw powstania linii amelanotycznej był brak melanosomów – organelli, w których zachodzi synteza melaniny oraz zatrzymanie tyrozynazy – głównego enzymu melanogenezy – w pęcherzykach Aparatu Golgiego [30].

Dwadzieścia lat później, obserwacje te potwierdzili Halaban i wsp. wykazując zatrzymanie tyrozynazy w siateczce szorstkiej i podwyższoną jej degradację w proteasomach komórek czerniaka amelanotycznego [121]. Proteoliza tyrozynazy w proteasomie zachodzi również w komórkach czerniaka melanotycznego, ale w znacznie mniejszym stopniu, a jej wynikiem jest pojawienie się na powierzchni komórek czerniaka charakterystycznych antygenów, rozpoznawanych przez limfocyty T, takich jak TRP1/gp75; gp100. Poza tym, tyrozynaza w komórkach czerniaka amelanotycznego ma nieco mniejszą masę cząsteczkową około 70 kD w porównaniu z tyrozynazą melanocytów (około 80 kDa) i tworzy dimery [121]. Zmieniona tyrozynaza jest transportowana do proteasomu, gdzie ulega degradacji [121].

Kontynuując te badania Halaban i wsp. w roku 2002 wykazali, iż obniżenie aktywności tyrozynazy i zatrzymanie enzymu w siateczce jest spowodowane zmianami metabolicznymi obserwowanymi w komórkach czerniaka amelanotycznego, w porównaniu z komórkami czerniaka melanotycznego i melanocytami [122]. Komórki czerniaka amelanotycznego charakteryzują się podwyższonym transportem protonów wodoru na zewnątrz, co prowadzi do zakwaszania środowiska zewnętrznego – cecha bardzo wyraźnie obserwowana w hodowlach

in vitro. Wyższa aktywność pomp protonowych w komórkach tego czerniaka w porównaniu z melanocytami oraz zależność aktywności tyrozinazy od wartości pH wskazują, iż aktywność tego enzymu może być również regulowana w komórkach czerniaka na poziomie posttranslacyjnym poprzez zmiany we-wnętrzkomórkowego pH [122].

Zaobserwowano również, iż komórki czerniaka amelanotycznego mają podwyższoną zdolność do glikolizy [10, 122], w tym i komórki linii amelanotycznej czerniaka przeszczepialnego chomika [265]. Zwiększenie tej zdolności traktowane jest jako adaptacja komórek nowotworowych do pogarszających się warunków tlenowych mogąca poprzedzać stadium tworzenia przerzutów. Przy podwyższonej glikolizie dochodzi do zakwaszania środowiska zewnętrznego i selekcji komórek nowotworowych zdolnych do przeżycia w warunkach obniżonego pH [99]. Wiadomo, iż komórki prawidłowe w zakwaszonym środowisku poniżej 7,2 pH giną na drodze apoptozy lub nekrozy [99, 122]. Zatem komórki nowotworowe z podwyższoną glikolizą muszą wykształcić mechanizmy broniące je przed śmiercią w wyniku zmian stężenia jonów wodorowych w cytoplazmie lub podwyższać aktywność mechanizmów transportujących protony na zewnątrz.

Komórki nowotworowe zakwaszając środowisko przyczyniają się do śmierci otaczających je komórek prawidłowych, aktywują metaloproteazy i katepsyny ułatwiające inwazję do przylegających tkanek, a także promują tworzenie nowych naczyń [99, 122]. Przypuszcza się, iż do wzrostu glikolizy przyczynia się system czynników transkrypcyjnych HIF (*Hypoxia Induced Factors*), związanych z hipoksją – chociaż dokładny mechanizm ich działania nie jest wyjaśniony [99]. Istnieją też doniesienia, iż serynowo-treoninowa kinaza Akt, której wzrost ekspresji obserwowano w wielu nowotworach, w tym i w czerniaku [44], stymuluje glikolizę w komórkach nowotworowych [83]. Amelanizacja wydaje się być zatem jednym z czynników adaptacji komórek czerniaka amelanotycznego do warunków obniżonej zawartości tlenu.

Zmiany pH w komórce nowotworowej wpływają również na jej proliferację i apoptozę [99, 122, 206], co z punktu widzenia naszych badań wydaje się szczególnie godne podkreślenia. W apoptozie obserwowano obniżenie pH w komórkach ginących, ale dokładnie nie określono znaczenia tego parametru dla przebiegu apoptozy [201, 206].

W komórkach czerniaka amelanotycznego poza obniżoną aktywnością tyrozinazy zwraca się uwagę na:

- działanie onkogenów obniżających aktywność czynnika transkrypcyjnego – MITF – związanego z melanogenezą [121, 236, 323],
- obniżenie zawartości białka TRP-1 (*Tyrosinase-Related Protein-1*) koniecznego do syntezy melaniny [323].

Zatem brak pigmentacji w komórkach czerniaka amelanotycznego jest procesem złożonym i jeszcze nie do końca wyjaśnionym.

Z przeglądu piśmiennictwa dotyczącego biologii czerniaka amelanotycznego wynika, iż sporo wiadomo o mechanizmie utraty melaniny, ale nadal bardzo mało

wiemy o przebiegu innych procesów w komórkach tego nowotworu, a prace porównujące biologię czerniaka amelanotycznego z melanotycznym są nieliczne. Wydaje się, iż ten niedobór informacji o biologii czerniaka amelanotycznego wynikać może z niedostatecznej liczby odpowiednich modeli badawczych pozwalających porównywać czerniaka melanotycznego i amelanotycznego.

Powstaje zatem pytanie jakie znaczenie dla biologii czerniaka ma utrata barwnika, w aspekcie klinicznym, dla wyboru sposobu leczenia, prognozowania czasu przeżycia, obserwowana w dużej części przerzutów czerniaka melanotycznego. Wskazują na to istotne braki w informacji dotyczącej formy amelanotycznej czerniaka, o której istnieniu nawet w podręcznikach onkologicznych zaledwie wspomina się. Czasami umieszcza się tam tylko informację, iż forma amelanotyczna jest formą czerniaka rzadko spotykaną zapominając, że to stwierdzenie dotyczy głównie czerniaka pierwotnego. Nie bierze się pod uwagę faktu, iż amelanizacja komórek czerniaka melanotycznego towarzyszy progresji tego nowotworu, czego przejawem mogą być przerzuty amelanotyczne, występujące stosunkowo często.

Modele zwierzęce czerniaka przeszczepialnego choć nie są kopią czerniaka u człowieka, to jednak mają z nim wiele cech wspólnych pozwalających badać proces powstawania czy progresji nowotworu. W świetle przytoczonych powyżej danych należy jeszcze raz podkreślić, iż badany w obecnej pracy czerniak przeszczepialny chomika z linią melanotyczną i amelanotyczną stanowi bardzo cenny model w badaniach nad biologią czerniaka, testowaniem nowych metod terapii czy rozwoju technik diagnostycznych szczególnie dla formy amelanotycznej, głównie ze względu na brak takich badań nad czerniakiem u człowieka.

1.2. Czerniak przeszczepialny chomika jako model badawczy do badań nad biologią czerniaka

Ze spontanicznie powstałego czerniaka przeszczepialnego chomika wyprowadzono kilka linii, z których linia melanotyczna i amelanotyczna są liniami zasadniczymi.

Linia melanotyczna została wyprowadzona z czerniaka skóry, który pojawił się spontanicznie w hodowli chomików zlocistych w 1959 r. i opisana została przez Bomirskiego w 1977 r. jako linia Ma [30].

Linia amelanotyczna powstała na skutek samoistnej przemiany z formy melanotycznej, w 1963 r. i została opisana przez Bomirskiego w 1977 r. jako linia Ab [30]. Utrata barwnika, a więc zmniejszenie zróżnicowania komórek łączyło się ze zwiększoną agresywnością formy amelanotycznej i przejawiało się m.in. szybszym tempem wzrostu nowotworu oraz szybszą śmiercią zwierząt obarczonych tym nowotworem [30, 31].

Najważniejsze różnice pomiędzy komórkami czerniaka melanotycznego i amelanotycznego zestawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Patobiologiczne cechy dwóch linii: melanotycznej i amelanotycznej czemiaka przeszczepialnego chomika syryjskiego.

	LINIA MELANOTYCZNA /Ma/	LINIA AMELANOTYCZNA /Ab/
Pochodzenie [31]	spontaniczny czerniak skóry chomika złocistego.	spontaniczna przemiana z czemiaka melanotycznego.
Rok pojawienia się nowotworu [31]	1959	1963
Ilość masy nowotworu zapewniająca 100% przeszczepialność (mg) [31]	200	50
Średni czas przeszczepu (dni)	21 ± 3	12 ± 2
Czas przeżycia chomika z przeszczepionym czerniakiem (dni) [31]	81 ± 5,8	27 ± 1,5
Najczęstsze miejsca lokalizacji przerzutów [31]	płuca, lokalne węzły chłonne	nerki, wątroba
Histologiczna struktura i ultrastruktura [31,28]	Komórki nabłokopodobne. Obecne są melanosomy i pre-melanosomy. Aparat Golgiego słabo rozbudowany. Liczne rybosomy. Mitozy nieliczne. RER i SER skąpa. Mitochondria nieliczne.	Komórki wieloboczne. Brak melaniny i melanosomów. Aparat Golgiego dobrze rozbudowany. DOPA i tyrozynaza obecne w pęcherzykach rejonu trans-AG. Bardzo liczne rybosomy. Mitozy liczne. RER skąpa, a SER obfita. Mitochondria nieliczne
Budowa błony komórkowej 1. zawartość glikoprotein (nmol/mg białka) [168] 2. heterogenność [171] 3. płynność i uporządkowanie fosfolipidów błony komórkowej [173] 4. zawartość P-glikoproteiny [174] 5. zawartość gangliozydów [248]	1702 3 frakcje białkowe 6 frakcji glikoprotein P-gp obecna w 70% komórek. Wyższa zawartość GM3, obniżona GD3.	631 1 frakcja białkowa 8 frakcji glikoprotein Obniżony stopień uporządkowania fosfolipidów; większa płynność błony. P-gp obecna w 10% komórek. Obniżona zawartość GM3, podwyższona GD3.
Antygenowość [169]		Zmieniona
Immunogenność [170,172]		Silniejsza niż linii Ma
Ploidia [321]	4n	3n
Promieniowrażliwość [228]		wyższa
Wybrane cechy biochemiczne 1. aktywność tyrozynazy [31] 2. glikoliza [265] 3. aktywność enzymów antyoksydacyjnych [331]	Wysoka aktywność tyrozynazy. Wyższa aktywność dysmutazy nadtlenkowej i peroksydazy glutationowej	Zachowana aktywność tyrozynazy, ale zdecydowanie niższa niż w Ma. Wyższa zdolność do glikolizy tlenowej i beztlenowej.

Tab. 1. Pathobiological data on Syrian hamster transplantable melanotic and amelanotic melanoma lines.

	MELANOTIC MELANOMA /Ma/	AMELANOTIC MELANOMA /Ab/
Manner of appearance [31]	Developed from a spontaneous malignant melanoma of the skin.	Formed by a spontaneous alteration of melanotic melanoma.
Year of appearance [31]	1959	1963
Amount of tissue causing 100% transplantability (mg) [31]	200	50
Transplantation interval (days)	21 ± 3	12 ± 2
Survival time of implanted hamster (days) [31]	$81 \pm 5,8$	$27 \pm 1,5$
Most frequent location of metastases [31]	Lung and regional lymph nodes	Kidneys, liver
Histological structure and ultra-structure [31,28]	Epithelioidal cells Melanosomes and premelanosomes. Golgi area is extensive. Many ribosomes Mitosis are rare. RER and SER developed. Mitochondria are scarce.	Polygonal cells Without melanin and melanosomes Golgi area is very extensive DOPA and tyrosinase in the vesicles of the trans GA area A lot of ribosomes. Mitosis are frequent RER developed and SER very well developed. Mitochondria are scarce.
Plasma membrane structure: 1. content of carbohydrates (nmol/mg of protein) [168] 2. heterogeneity [171] 3. membrane fluidity and molecular mobility in the plasmatic membrane [173] 4. expression of P glycoprotein [174] 5. gangliosides content [248]	1702 3 protein fractions 6 glycoprotein fractions 70% cells were Pgp positive higher content of GM3 lower content of GD3	631 1 protein fraction 8 glycoprotein fractions Lower degree of order in the phospholipid bilayer; increase in membrane fluidity 10% cells were Pgp positive lower content of GM3 higher content of GD3
Antigenicity [169]		Altered in comparison to Ma
Immunogenicity [170, 172]		Stronger than in Ma
Ploidy [321]	4n	3n
Radiosensitivity [228]		Higher than in Ma
Main biochemical features 1. tyrosinase activity [31] 2. glycolysis [265] 3. antioxidant enzymes activity [331]	High tyrosinase activity Higher activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase	Tyrosinase activity much lower than in Ma Higher ability to glycolysis

Jak wykazał prof. Bomirski, w ciągu kilkunastu lat pasażowania, zostały zachowane fenotypowe różnice między linią Ma i Ab, dotyczące m.in. zawartości melaniny i tempa wzrostu tych nowotworów [30].

Jak już wspomniano cechą zmiany zróżnicowania komórek czerniaka amelanotycznego, w porównaniu z linią rodzimą – Ma, jest brak melaniny przy zachowaniu tyrozynazy, chociaż o zdecydowanie niższej aktywności w porównaniu z komórkami linii melanotycznej [30]. Trzeba podkreślić, iż zachowanie aktywności tyrozynazy jest unikalną cechą komórek linii Ab, wśród opisywanych innych zwierzęcych linii czerniaka amelanotycznego [30] i upodabnia te komórki do komórek czerniaka amelanotycznego u człowieka w których stwierdza się tyrozynazę [30, 121]. Komórki linii Ab wykazują szereg zmian w ultrastrukturze, w tym i w budowie błony komórkowej (tab. 1). Należy podkreślić, iż zasadnicze cechy takie jak zawartość melaniny, agresywność (złośliwość) obu linii czerniaka przeszczepialnego chomika są podobne do opisywanych cech czerniaka melanotycznego i amelanotycznego człowieka [30].

Ze względu na trudności w pozyskiwaniu materiału u człowieka model ten jest szczególnie przydatny do badań biologii tych dwóch form czerniaka. Dotychczasowe badania nad czerniakiem przeszczepialnym chomika dotyczyły głównie charakterystyki morfologicznej, biochemicznej, immunologicznej komórek linii Ma i Ab [28, 31, 168-174, 248, 265, 331].

Wobec niekwestionowanej roli apoptozy w rozwoju nowotworów celowe wydaje się porównanie parametrów charakteryzujących ten proces w komórkach obu linii i określenie czy obserwowane wraz z rozwojem czerniaka zmiany jego cech biologicznych takich jak np. tempo wzrostu, stopień zróżnicowania komórek mogą być związane ze zmianami w zdolności do apoptozy komórek nowotworowych.

1.3. Apoptoza

Jednym z zagadnień w biologii nowotworów bardzo intensywnie badanym w ostatnich latach jest śmierć komórek nowotworowych, zachodząca drogą apoptozy. Apoptoza uważana jest za jedną z najczęstszych dróg usuwania komórek nieprawidłowych np. komórek zmienionych genetycznie, zainfekowanych wirusami. Wyniki badań nad apoptozą mają umożliwić opracowanie metod eliminacji komórek nowotworowych właśnie tą drogą. Prowadzone są poszukiwania czynników indukujących apoptyczną śmierć komórek nowotworowych. Jednocześnie wobec doniesień, iż komórki nowotworowe potrafią skutecznie bronić się przed zniszczeniem drogą apoptozy, trwają badania nad zmianami w przebiegu apoptozy w tych komórkach.

Znalezienie zmian odpowiedzialnych za obniżenie zdolności komórek nowotworowych do apoptozy umożliwi poszukiwanie nowych metod w leczeniu nowotworów opartych być może na odblokowywaniu zdolności do apoptozy w komórkach nowotworowych i ich zniszczeniu tą drogą.

1.3.1. Ogólna charakterystyka procesu

Historia badań nad śmiercią komórki sięga XIX wieku. Termin „apoptoza” w roku 1971 został wprowadzony przez australijskiego badacza Johna Kerr’a [158]. Opisał on charakterystyczną morfologię komórki ginącej spontanicznie: komórka traciła wodę, organella nie zmieniały się, a chromatyna ulegała kondensacji. Kilka lat później opisano degradację DNA prowadzoną przez aktywowane w czasie apoptozy endonukleazy, a powstający obraz tzw. drabinki przez wiele lat był podstawowym markerem apoptozy [334]. Przełomem w badaniach nad śmiercią komórki było odkrycie, iż jest to proces regulowany genetycznie – śmierć zaprogramowana komórek *Caenorhabditis elegans* w czasie rozwoju tego nicienia [110]. Molekularny mechanizm programowanej śmierci jest ewolucyjnie konserwatywny i przebiega podobnie u zwierząt wyższych, w tym i u człowieka. Ostatnie lata wskazują, iż zachodzi on także w komórkach roślinnych [82, 272].

Powszechnie przyjmuje się, że wraz z przemianą komórki prawidłowej w nowotworową, komórka rozwija mechanizmy, które pozwalają jej skutecznie bronić się przed apoptozą [125]. Rozregulowanie programu śmierci komórek może leżeć u podstaw wielu procesów patologicznych, w tym powstawania nowotworów [38, 117, 125, 133, 159, 344]. Poznanie dokładnych zaburzeń mechanizmu apoptozy w procesie nowotworzenia jest problemem niezmiernie interesującym, gdyż stwarza możliwość nowych terapeutycznych interwencji.

Komórka apoptyczna daje również sygnały innym komórkom o swojej śmierci np. poprzez eksternalizację fosfatydyloseryny, co jest sygnałem dla komórek fagocytyzujących. Sekwencja molekularnych zdarzeń zachodzących w czasie apoptozy komórki, zależy od typu komórki oraz rodzaju czynnika wywołującego śmierć, dotyczy to zarówno komórek prawidłowych, jak i nowotworowych [9].

Apoptoza jest procesem złożonym, w którym istotną rolę odgrywają mechanizmy epigenetyczne, regulujące aktywność białek biorących udział w tym procesie [86]. Obecność różnych form danego białka (jako wynik alternatywnego składania transkryptu w czasie dojrzewania mRNA) oraz postranslacyjna modyfikacja białek (fosforylacja, defosforylacja, proteoliza) sprawiają, iż dane białko może pełnić funkcje zarówno pro- jak i antyapoptyczne [9].

Podstawowe drogi prowadzące do śmierci apoptycznej komórki to:

- droga receptorowa (zewnętrzna)
- droga mitochondrialna (wewnętrzna)

W drodze zewnętrznej następuje aktywacja powierzchniowych receptorów śmierci, wśród których najlepiej poznane to: TNFR1, Fas, TRAILR1/R2. Aktywacja tych receptorów przez odpowiednie ligandy: TNF- α (czynnik martwicy nowotworów), FasL (ligand dla receptora Fas), TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) wydzielane przez np. komórki układu immunologicznego, prowadzi do aktywacji prokaspazy 8, a następnie głównej kaspazy wykonawczej – kaspazy 3, aktywującej dalsze czynniki zaangażowane w fazę samozniszczenia komórki [34, 108, 116].

W drodze wewnątrzpochodnej czynnik indukujący apoptozę pochodzi z wnętrza komórki np. z uszkodzenia DNA. W drodze tej zasadniczą rolę odgrywają mitochondria [107, 109, 177, 225]. Jedną z najwcześniej występujących zmian w tych organellach jest spadek potencjału transblonowego ($\Delta\Psi$), po którym następuje uwolnienie z przestrzeni międzyblonowej do cytoplazmy czynników apoptogennych takich jak np. cytochromu c, czynnika indukującego apoptozę (AIF – *Apoptosis Inducing Factor*). Cytochrom c wraz z Apaf-1 (*Apoptosis Protease Activating Factor*) tworzy kompleks zwany apoptosomem, gdzie zachodzi aktywacja prokaspazy 9, która następnie powoduje aktywację prokaspazy 3; dalszy przebieg fazy niszczenia komórki jest podobny jak w drodze zewnętrznej [49, 108, 117].

Prokaspazy efektorowe, do których należy m. in. prokaspaza 3, ulegając w cytoplazmie aktywacji, w efekcie doprowadzają do protelizy ważnych dla życia komórek białek m.in. polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP), białek cytoszkieletu oraz aktywacji endonukleazy tnącej DNA na fragmenty oligonukleosomalne [89, 106, 250, 297, 324, 325, 343]. Poznano wiele białek – substratów kaspaz [89, 343], których charakterystyczne fragmenty powstałe w wyniku proteolizy z udziałem aktywowanych kaspaz efektorowych pozwalają określić zmiany apoptyczne w komórce i tak np. obecność fragmentu PARP o m.cz. 89 kDa w komórce oznacza aktywację prokaspazy 3, a charakterystyczne cięcie DNA na fragmenty dające obraz tzw. drabinki świadczy o aktywacji endonukleazy CAD (*Caspase Activated DNase*).

W przebiegu apoptozy kaspazy – proteazy cysteinowe odgrywają rolę zasadniczą, zarówno w zapoczątkowaniu tego procesu, jak i jego efekcie końcowym, prowadzącym do śmierci komórek [89, 161, 250, 282, 342, 343].

Komórka może jednak kontrolować aktywację kaspaz przy pomocy różnych białek, do których głównie należą białka rodziny IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) jak np. surwiwina, X-IAP (*X-linked mammalian IAP*), ML-IAP (*Melanoma IAP*); białko cytoplazmatyczne FLIP (*FLICE/caspase 8 inhibitory protein*); białko Smac/DIABLO (*Second Mitochondrial-derived Activator of Caspase/ Direct IAP Binding protein with Low PI*) uwalniane z mitochondriów oraz białka szoku termicznego (HSP – *Heat Shock Proteins*) [7, 146, 176, 209, 218, 227, 319, 320].

Komórka może również uruchomić apoptozę bez aktywacji kaspaz np. poprzez czynnik indukujący apoptozę – AIF. Wielu autorów podkreśla szczególną rolę AIF, ponieważ białko to przemieszcza się z mitochondriów do jądra i tam aktywuje endonukleazy, z pominięciem kaspaz, co mogłoby tłumaczyć fakt, iż niektóre komórki ulegają apoptozie bez udziału kaspaz [22, 43, 196].

Wraz ze zmianami w błonach mitochondrialnych dochodzi do zahamowania syntezy ATP, zaburzeń procesów oksydoredukcyjnych i tworzenia reaktywnych form tlenu, co ma również wpływ na przebieg apoptozy [36, 65, 225].

Wiele uwagi w badaniach nad apoptozą poświęca się białkom regulującym ten proces, głównie z rodziny Bcl-2, wśród których są zarówno białka hamujące apoptozę np. Bcl-2, Bcl-XL jak i promujące ten proces np. Bax, Bad, Puma, Noxa. Białka te poprzez regulację przepuszczalności błon mitochondrialnych wpływają na uwal-

nianie cytochromu c, AIF i innych czynników zgromadzonych w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [162, 247, 310].

Zasadnicze etapy procesu apoptozy zostały dość dokładnie opisane, ale wiele molekularnych aspektów tego procesu nadal jest niewyjaśnionych np. mechanizm uwalniania czynników apoptogennych z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, czy udział innych organelli np. siateczki szorstkiej.

1.3.2. Zmiany w przebiegu apoptozy w komórkach nowotworowych

Od początku badań nad apoptozą zwracano uwagę na rolę tego procesu w rozwoju nowotworów. W roku 1972 Kerr – autor terminu apoptoza – tłumaczył spowolnienie wzrostu niektórych nowotworów zachodzącą spontanicznie apoptozą komórek nowotworowych [158]. W kolejnych latach opisywano nasilenie apoptozy w komórkach nowotworowych po ich radio- i chemioterapii [20, 291]. Udowodniono, iż apoptoza jest główną drogą niszczenia komórek nowotworowych w wyżej wymienionych terapiach. Jednak okazało się, iż komórki wielu nowotworów są oporne na indukcję apoptozy [26, 38, 127, 132, 133, 246, 269, 296, 316]. Poszukiwania odpowiedzi na pytanie dlaczego komórki nowotworowe są niewrażliwe na indukcję apoptozy doprowadziło do wykazania wielu zmian w przebiegu apoptozy w komórkach nowotworowych umożliwiających im unikanie śmierci samobójczej [117, 144, 159, 246]. W roku 2000 zostało to na tyle udokumentowane, że Hanahan i Weinberg uznali obniżenie zdolności do śmierci apoptycznej za jedną z sześciu cech charakteryzujących fizjologię komórki nowotworowej [125].

Podkreśla się, iż główną rolę w apoptozie komórek nowotworowych odgrywa białko p53 rozpoznając uszkodzenia DNA. Gen p53 jako „strażnik genomu”, uruchamia apoptozę komórki w przypadku nienaprawialnych zmian w DNA. Jeżeli zatem, przyjmuje się, iż u podstaw procesu nowotworzenia leżą zmiany w DNA, to można by w komórkach nowotworowych spodziewać się inaktywacji białka p53 uruchamiającego procesy naprawcze DNA i rzeczywiście w ponad 50% nowotworów wykazano mutacje w genie p53. W pozostałej części nowotworów może dochodzić do inaktywacji białka p53 innymi drogami np. poprzez jego postranslacyjne modyfikacje i zmiany w aktywności białek regulujących aktywność białka p53 [142, 260, 318, 330]. Rola białka p53 w apoptozie komórek czerniaka nie została określona; mutacje genu dla p53 w czerniaku są rzadkie [258, 289], ale obserwowano wzrost ekspresji białka Hmd2 transportującego p53 do proteasomu, gdzie następuje degradacja białka p53 [142, 260].

Innym elementem apoptozy, który często ulega zmianie w komórkach nowotworowych jest inaktywacja drogi indukcji apoptozy przez receptory błonowe. Z unieczynnianiem drogi zewnętrznej apoptozy wiążą się zmiany w receptorach: Fas i TRAILR1/R2 [14, 94, 144, 292], ale także obniżona zawartość kaspazy 8 [96, 304] oraz podwyższona zawartość inhibitora tej kaspazy – białka FLIP [139, 147, 209, 227].

Tab. 2. Zmiany w apoptozie komórek czerniaka skóry oraz różnych nowotworów (na podstawie piśmiennictwa).

Zmiany w przebiegu apoptozy	Dotyczące genu/białka	Zmiana w genie/białku komórki czerniaka	Zmiana w genie/białku komórek różnych nowotworów
Zmiany w przebiegu apoptozy wywołane wpływem na ekspresję genów kodujących białka biorące udział w apoptozie np. Fas, Bax, Noxa, Puma	p53	Mutacje rzadkie [258,289]	Mutacja w 50-70% [317]
Zablokowanie drogi mitochondrialnej	Białka antyapoptyczne: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 itd.	Podwyższona zawartość [40,141,240]	Podwyższona zawartość [63]
Zablokowanie drogi mitochondrialnej	Białka proapoptyczne: Bax,Bak	Obniżona zawartość [141]	Obniżona zawartość [63]
Aktywacja drogi pozamitochondrialnej	Bad Bik	wyższa zawartość w porównaniu z melanocytami [224]	Hiperfosforylacja [63]
Zablokowanie aktywacji kaspaz	Apaf-1	Inaktywacja [283,284]	Obniżona zawartość [150,217,231]
Obniżenie aktywacji kaspazy	Kaspaza-9	Hipermetylacja [96]	Obniżona zawartość [193]
Zablokowanie drogi receptorowej	Kaspaza-8		Hipermetylacja, utrata lub mutacje genu [96,192,202,270,288,299,304]
Zablokowanie fazy wykonawczej	Kaspaza-3		Brak translokacji do jądra [152] Obniżona zawartość [327]
Oporność na indukcję apoptozy	Białka hamujące aktywację kaspaz: Surwiwina	Podwyższona zawartość [112,113]	Podwyższona zawartość [7,176]
Hamowanie kaspaz:-3,6,7,9	ML-IAP	Podwyższona zawartość [319]	Podwyższona zawartość [176] Podwyższona zawartość [146,147,209]
Zablokowanie drogi receptorowej	X-IAP	Podwyższona zawartość [147]	
Zablokowanie drogi receptorowej	FLIP	Podwyższona zawartość [147]	Obniżona ekspresja i mutacje [94,144,292]
Zablokowanie drogi receptorowej	Fas	Obniżona ekspresja [120]	Mutacje [14]
Zablokowanie drogi receptorowej	TRAIL R1/R2	Różna ekspresja [258,131]	Brak uwalniania cyt. c [48]
Zablokowanie drogi wewnętrznej	Cytochrom c	Defekt uwalniania cyt. c [239]	Podwyższona zawartość [290]
Hamowanie aktywacji kaspaz i translokacji AIF do jądra	Białka szoku termicznego (HSP)	Podwyższona zawartość [141,127]	

Tab. 2. Changes in apoptosis of skin melanoma and other tumor cells (according to literature).

<i>Change in apoptosis process</i>	<i>Gene/protein</i>	<i>Gene/protein change in melanoma cell</i>	<i>Gene/protein change in other tumor cell</i>
<i>Changed expression of genes for proteins: Fas, Bax, Noxa, Puma</i>	<i>p53</i>	<i>Mutations are rare [258,289]</i>	<i>Mutations in w 50-70% [317]</i>
<i>Inhibition of mitochondrial way</i>	<i>Antiapoptotic proteins: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 and others</i>	<i>Increased content [40,141,240]</i>	<i>Increased content [63]</i>
<i>Inhibition of mitochondrial way</i>	<i>Proapoptotic proteins: Bax, Bak</i>	<i>Decreased content [141]</i>	<i>Decreased content [63]</i>
	<i>Bad</i>		<i>Hyperphosphorylation [63]</i>
<i>Activation of extramitochondrial way</i>	<i>Bik</i>	<i>Increased content in comparison to melanocyte [224]</i>	
<i>Caspase activation inhibition</i>	<i>Apaf-1</i>	<i>Inactivation [283,284]</i>	<i>Decreased content [150,193,217,231]</i>
<i>Decreased caspase activity</i>	<i>Caspases: Caspase-9</i>		<i>Decreased content [193]</i>
<i>Inhibition of the extrinsic way</i>	<i>Caspase-8</i>	<i>Hypermethylation [96]</i>	<i>Hypermethylation or genes mutations [96,192,202,270,288,299,304]</i>
<i>Inhibition of the effector phase</i>	<i>caspase-3</i>		<i>Lack of translocation into nucleus [152]</i>
			<i>Decreased content [327]</i>
<i>Insensitivity to induced-apoptosis</i>	<i>Caspase inhibitors; Survivin</i>	<i>Increased content [112,113]</i>	<i>Increased content [7,176]</i>
<i>Caspase 3,6,7,9 activation inhibition</i>	<i>ML-IAP</i>	<i>Increased content [319]</i>	
	<i>XLAP</i>		<i>Increased content [176]</i>
<i>Inhibition of the extrinsic way</i>	<i>FLIP</i>	<i>Increased content [147]</i>	<i>Increased content [146,147,209]</i>
<i>Inhibition of the extrinsic way</i>	<i>Fas</i>	<i>Decreased expression [120]</i>	<i>Decreased expression and mutations [94,144,292]</i>
<i>Inhibition of the extrinsic way</i>	<i>TRAIL R1/R2</i>	<i>Different expression [258,131]</i>	<i>Mutations [14]</i>
<i>Inhibition of the intrinsic way</i>	<i>Cytochrome c</i>	<i>Releasing defect [239]</i>	<i>Lack of releasing [48]</i>
<i>Caspase activation, inhibition of AIF translocation to nucleus</i>	<i>Heat shock proteins (HSP)</i>	<i>Increased content [141,127]</i>	<i>Increased content [290]</i>

Inne zmiany zachodzące w komórkach nowotworowych a dotyczące apoptozy zestawiono w tabeli 2. Dane te opublikowane w ostatnich latach wskazują, że obniżenie zdolności do apoptozy komórek nowotworowych może być wynikiem zmian zachodzących na niemal wszystkich etapach przebiegu apoptozy.

Jednak nadal brak odpowiedzi na pytanie czy zmiany zdolności do apoptozy komórek nowotworowych są typowe dla wszystkich nowotworów czy być może zależą od rodzaju nowotworu i jego cech biologicznych.

1.3.3. Zmiany w przebiegu apoptozy w komórkach czerniaka

Zmiany obniżające zdolność do apoptozy komórek czerniaka zasadniczo nie odbiegają od opisywanych w innych komórkach nowotworowych (tab. 2). Należy jednak podkreślić, iż obserwowane w komórkach czerniaka zmiany stosunku białek pro- i antyapoptycznych z rodziny Bcl-2 [240], inaktywacja Apaf-1 [283, 284], zaburzenia w uwalnianiu cytochromu c z mitochondriów [239], wysoka ekspresja białek takich jak surwiwina i ML-IAP (*Melanoma Inhibitor of Apoptosis Proteins*) hamujących aktywność kaspaz [113, 319], wskazują iż modyfikowana jest przede wszystkim droga wewnętrzna apoptozy i aktywność białek Bcl-2 jako głównych jej regulatorów [141, 224, 240].

W komórkach czerniaka zaobserwowano zwiększoną ekspresję Bcl-2 i tym m.in. tłumaczy się oporność na chemioterapię [40, 141, 302], a stosunek proapoptycznego białka Bax do antyapoptycznego białka Bcl-2 ma determinować decyzję komórek o wkraczaniu na drogę apoptozy [36, 225, 240].

Również dotychczasowe dane dotyczące udziału poszczególnych kaspaz w apoptozie spontanicznej i indukowanej czerniaków są bardzo zróżnicowane [88, 96, 239, 295]. Komórki czerniaka poprzez obniżoną ekspresję Apaf-1 [283, 284] i podwyższoną zawartość białek z rodziny IAP np. surwiwiny [112, 113], ML-IAP [319] oraz białka FLIP [147] mogą regulować aktywność kaspaz.

Surwiwina hamuje aktywność kaspaz (-3,-7,-9) [113, 207, 222, 300], a hamując przemieszczenie AIF z mitochondriów do jądra inaktywuje również drogę apoptozy niezależną od kaspaz [194]. Obecność surwiwiny w komórkach nowotworowych hamuje ich apoptozę i jednocześnie sprzyja proliferacji tych komórek, chociaż dokładny mechanizm działania tego białka jest niewyjaśniony.

ML-IAP hamuje aktywność kaspazy 9,-7 i -3, co sprzyja oporności komórek czerniaka na chemioterapię [284].

Podwyższona zawartość białka FLIP hamując aktywację kaspazy 8 inaktywuje drogę receptorową apoptozy, a tym samym chroni komórki czerniaka przed działaniem czynników np. FasL wydzielanych przez komórki układu immunologicznego [284].

Pomimo iż przybywa faktów świadczących o zaburzeniach w przebiegu apoptozy komórek czerniaka, to wyjaśnianie molekularnych podstaw obniżonej zdolności do apoptozy komórek tego nowotworu dopiero się rozpoczęło, a zupełnie nie

wyjaśnione są jeszcze zmiany w przebiegu tego procesu w zależności od cech biologicznych czerniaka. Zagadnienie to ze względów terapeutycznych jest bardzo ważne, ponieważ czerniak charakteryzuje się szczególną opornością na chemioterapię, która jak wiadomo indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych [127, 260, 268].

Z obserwacji dotyczących zmian w przebiegu apoptozy w komórkach czerniaka (tab. 2) wynika również, iż nie poznano jeszcze zdolności do apoptozy komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, jak i ewentualnych różnic w przebiegu apoptozy w tych dwóch formach czerniaka.

Badania nad zmianami apoptozy w komórkach nowotworowych są dynamicznie rozwijającą się częścią badań nad procesem śmierci komórki. Głównym ich celem jest znalezienie swoistych dla danego typu nowotworu zmian w przebiegu apoptozy świadczących, w jaki sposób komórka nowotworowa broni się przed tą drogą śmierci. Uzyskanie takich informacji pozwoliłoby na opracowanie metod skutecznej eliminacji komórek nowotworowych poprzez indukcję drogi apoptozy.

1.4. Apoptoza a proliferacja

Prowadzone badania nad rozwojem nowotworów aktualnie wydają się wskazywać, iż ich wzrost jest wypadkową zdolności komórek nowotworowych do proliferacji i śmierci, zwłaszcza drogą apoptozy [42, 53, 56].

Wiadomo, iż komórki nowotworowe mają zwiększoną zdolność do proliferacji między innymi dzięki autokrynnej produkcji czynników wzrostu, podwyższonej ekspresji receptorów dla tych czynników oraz zmianom w przekazywaniu do komórki sygnałów o proliferacji – szczególnie hamujących ten proces [16, 56, 121, 261], ale okazuje się, iż nie tylko proliferacja komórek jest elementem warunkującym wzrost nowotworu.

Wraz z udokumentowaniem obniżenia zdolności do apoptozy komórek nowotworowych zwraca się uwagę na zaburzenia cyklu komórkowego w różnych nowotworach, prowadzące do zwiększenia tempa proliferacji, co traktuje się jako elementy składowe procesu progresji nowotworu [56, 135].

Czas trwania cyklu i zasadnicze elementy mechanizmu kontroli tego procesu wydają się być nie zmienione w komórkach nowotworowych, zmiany dotyczą głównie możliwości przejścia komórki z fazy spoczynkowej do faz związanych z proliferacją [135]. Wskazuje się przy tym głównie na mutacje genów supresorowych oraz genów kodujących cykliny i kinazy zależne od cyklin związane z punktami kontrolującymi przejście faz G0/G1 i G1/S w cyklu komórkowym [56, 135]. W regulacji cyklu komórkowego bierze również udział wcześniej już wspomnianie białko – surwiwina. Białko to ulega ekspresji w fazie G2/M cyklu i wiąże się z mikrotubulami wrzeczona kariokinetycznego, biorąc prawdopodobnie udział w procesie rozdziału chromatyd do komórek potomnych [185]. W komórkach prawidłowo-

wych, zróżnicowanych, nie dzielących się, a więc i w melanocytach, brak jest surowiny [112].

Obserwacje proliferacji komórek nowotworowych wskazują na wyższy odsetek komórek dzielących się w porównaniu z komórkami prawidłowymi, ale bez zmian długości trwania cyklu komórkowego [135].

Pomimo wielu dowodów na istnienie powiązań między cyklem komórkowym a apoptozą charakter ich jest mało poznany [42, 97, 121, 198, 315]. Gdyż tak jak już wspomniano wzrost nowotworów nie zależy bowiem wyłącznie od dynamiki proliferacji jego klonów komórkowych, ale również od zdolności tych komórek do śmierci – szczególnie drogą apoptozy [53].

Nadal jednak pozostaje kwestią sporną, który z tych procesów przeważa i decyduje o rozwoju poszczególnych nowotworów [42, 72, 106, 134, 210, 301]. Nie wiadomo również dotąd, w jakiej fazie cyklu komórki nowotworowe najłatwiej ulegają apoptozie.

Problemy powyższe dotyczą również czerniaka, gdzie nie wykazano bezpośredniego związku między zdolnością do proliferacji i apoptozy komórek czerniaka [274, 294] i zależnością tych procesów od cech biologicznych tego nowotworu. Jednak wskazuje się, iż liczba komórek dzielących się w tym nowotworze może być istotnym markerem prognostycznym w ocenie czasu przeżycia osoby chorej [19, 93].

W związku z ciągle nie rozstrzygniętą kwestią roli apoptozy i proliferacji komórek we wzroście czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, to zagadnienie również stało się przedmiotem obecnej pracy.

1.5. Apoptoza, progresja czerniaka a jego cechy biologiczne

Procesy biologiczne takie jak zdolność do proliferacji i śmierci komórek danego nowotworu są bardzo intensywnie badane, w celu ich ewentualnego wykorzystania jako czynników oceniających progresję nowotworu, jego odpowiedź na terapię, czy szanse przeżycia pacjenta. Należy podkreślić, iż badania te dotychczas nie przyniosły zadowalających wyników, a w przypadku czerniaka praktycznie sterowanie żadnym z wyżej wymienionych procesów nie zostało jeszcze wykorzystane w terapii.

Jak już wspomniano wcześniej, w prognozowaniu czasu przeżycia chorych z czerniakiem głównie brane są pod uwagę parametry morfologiczne nowotworu takie jak: grubość zmiany, obecność przerzutów. Jednak w świetle ostatnich doniesień, iż zmiana o grubości 1,5–4 mm w 30% daje już przerzuty [80], istnieje konieczność poszukiwania nowych markerów prognostycznych.

W badaniach dotyczących apoptozy i zmian w jej przebiegu w trakcie progresji czerniaka, najczęściej porównywane są komórki barwnikowe ze znamion atypowych lub zmian pierwotnych o poziomym charakterze wzrostu z komórkami pochodzącymi z przerzutów. Obserwacje pochodzące z tego typu badań zestawione

w tabeli 3, wskazują na nasilającą się tendencję do upośledzonego przebiegu apoptozy wraz z rozwojem czerniaka, ale ze względu na brak standaryzacji układów doświadczalnych, wyniki są niejednoznaczne i fragmentaryczne. Widać to chociażby ze zróżnicowanych wyników badań dotyczących roli białka Bcl-2 w progresji czerniaka; część prac wskazuje na podwyższoną, a część na obniżoną jego zawartość w przerzutach w porównaniu do zmian pierwotnych [40, 47, 55, 85, 184, 298, 313, 335]. Jednocześnie istnieje zgodność, iż zawartość białek proapoptycznych: Bax, Bak, Puma ulega obniżeniu [40, 85, 157, 237]. Należy przy tym podkreślić, iż obniżenie zawartości białek proapoptycznych: Bax i Bad w komórkach czerniaka, w zmianach o grubości 1,5–4 mm, jest uważane za negatywny marker prognostyczny [85], podobnie jak podwyższona zawartość surwiwiny [105]. Interesujące są również doniesienia o szczególnej roli białka antyapoptycznego Bcl-2 w progresji czerniaka. Białko Bcl-2 podwyższając aktywność metaloproteaz sprzyja migracji komórek czerniaka, a podwyższając sekrecję czynnika angiogennego VEGF, umożliwia komórkom czerniaka indukcję tworzenia nowych naczyń [309]. Oba wymienione zjawiska zwiększają „złośliwość” komórek tego nowotworu.

Wraz z progresją czerniaka dochodzi do podwyższenia zawartości surwiwiny [105, 113]. Surwiwina poza zdolnością do hamowania aktywacji kaspaz pełni funkcje w regulacji proliferacji, chociaż mechanizm jej działania nie jest poznany [114, 284].

Tab. 3. Zmiany w zawartości i/lub aktywności białek biorących udział w apoptozie komórek czerniaka w trakcie progresji tego nowotworu (na podstawie piśmiennictwa).

Białko	Zmiana w trakcie progresji czerniaka
P53	Wzrost zawartości [24] Brak zmian zawartości [142,340]
Białka antyapoptyczne: Bcl-2, Bcl-XL	Wzrost zawartości [40,47,55,184,298,313,335] Brak zmian w zawartości [267] Obniżenie zawartości [85,115,294,335]
Białka proapoptyczne: Bax, Bak, Puma	Obniżenie zawartości [40,85,237] Obniżenie zawartości [157]
Apaf-1	Obniżenie zawartości białka [11,17,219]
Kaspaza 3	Wyższa aktywność w czerniaku amelanotycznym [175]
Białka hamujące aktywację kaspaz: Surwiwina ML-IAP	Wzrost zawartości [105,113] Brak zmian zawartości [102]
Fas	Obniżenie zawartości Fas, wzrost zawartości FasL [79,148,213,287]
TRAIL R1/R2	Brak zmian zawartości [85]

Tab. 3. Changes in the content and/or activity of apoptosis proteins in melanoma cells during this tumor progression (according to literature).

<i>Protein</i>	<i>Change during melanoma progression</i>
<i>P53</i>	<i>Increased content [24] Lack of changes [142,340]</i>
<i>Antiapoptotic proteins: Bcl2-, Bcl-XL</i>	<i>Increased content [40,47,55,184,298,313,335] Lack of changes [267] Decreased content [85,115,294,335]</i>
<i>Proapoptotic proteins: Bax, Bak Puma</i>	<i>Decreased content [40,85,237] Decreased content [157]</i>
<i>Apaf-1</i>	<i>Decreased content [11,17,219]</i>
<i>Caspase-3</i>	<i>Higher activity in amelanotic melanoma [175]</i>
<i>Proteins inhibiting cas- pase activation: Survivin ML-IAP</i>	<i>Increased content [105,113] Lack of changes [102]</i>
<i>Fas</i>	<i>Decreased Fas and increased FasL content [79,148,213,287]</i>
<i>TRAIL R1/R2</i>	<i>Lack of changes [85]</i>

Obniżenie ekspresji receptora Fas (chroni komórki czerniaka przez apoptozą wywołaną przez czynnik FasL wydzielany przez limfocyty) wraz z wzrostem ekspresji FasL na komórkach czerniaka (w celu zniszczenia komórek układu immunologicznego) jest jednym z elementów obrony komórek tego nowotworu przed atakiem ze strony układu immunologicznego [148, 284].

Wobec doniesień o różnym charakterze zmian w zawartości białka p53 w trakcie progresji czerniaka nie można jednoznacznie określić jego roli w tym procesie [24, 142, 340]. Wiadomo, iż białko p53 indukuje transkrypcję genów białek proapoptycznych: Bax, Noxa, Puma i hamuje transkrypcję genu Bcl-2, a także podwyższa ekspresję receptorów Fas i TRAILR1, co aktywuje drogę receptorową apoptozy [148, 284].

W progresji czerniaka poza tendencją do obniżania zdolności do apoptozy, dochodzi do wielu innych zmian, z których najważniejsze zestawiono w tabeli 4, a dotyczą one regulacji proliferacji, zmian zawartości cząstek adhezyjnych, procesu angiogenezy i innych.

Tab. 4. Zmiany w procesach innych niż apoptoza w trakcie progresji czerniaka (na podstawie piśmiennictwa).

Proces/białko/gen	Zmiana w trakcie progresji czerniaka	Znaczenie biologiczne dla komórek czerniaka
Prolifercja: p21 p16 pRB	Wzrost [212,237] Utrata [123,234] Hiperfosforylacja genu [123]	Wzrost proliferacji Wzrost proliferacji Wzrost proliferacji
Adhezja: - MIA (<i>melanoma inhibitory activity</i>) - kadheryny, integryny - L1	Wzrost [33] Spadek E-kadheryny wzrost N-kadheryny; Wzrost $\alpha\beta 3$ [128,138,151] Wzrost [211]	Zwiększona zdolność komórek do migracji. Zdolność komórek czerniaka do tworzenia struktur przypominających naczynia (<i>vasculogenic mimicry</i>). Zwiększona zdolność komórek do migracji.
Metaloproteazy	Wzrost aktywności [136]	Wzrost zdolności do migracji
Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne: - RAS/BRAF/MAPK - PI3K/AKT/PTEN - NFkB	Mutacje BRAF w 60% czerniaków [45,148,234,284] mutacje PTEN [45,234,284] aktywacja [45,234,284]	Konstitutywna aktywacja dróg przeżycia
Transkrypcja – czynniki transkrypcyjne: AP-1 AP-2 α MITF	Zmiana składu kompleksu AP1 – obniżenie zawartości c-Jun [338] Obniżenie zawartości [329] Wzrost zawartości białka, amplifikacja genu [45,286]	Aktywacja sygnałów antyapoptycznych
Receptor c-Kit	Obniżenie ekspresji [329]	Rola nie wyjaśniona
Angiogeneza	Wzrost sekrecji cz. angiogennych np. VEGF, IL-8 [286]	Stymulacja angiogenezy
Produkcja reaktywnych pochodnych tlenu (ROS)	Obniżenie zawartości enzymów odpowiedzialnych za degradację ROS [73]	Rola nie wyjaśniona

Tab. 4. Changes in other than apoptosis processes during melanoma progression (according to literature).

<i>Process/protein/gene</i>	<i>Change during melanoma progression</i>	<i>Biological significance for melanoma cells</i>
<i>Proliferation: p21 p16 pRB</i>	<i>Increase [212,237] Lack [123,234] Gene hyperphosphorylation [123]</i>	<i>Proliferation increase Proliferation increase Proliferation increase</i>
<i>Adhesion:</i> - <i>MIA (melanoma inhibitory activity)</i> - <i>cadherines, integrines</i> - <i>L1</i>	<i>Increase [33] E-cadherine decrease and N-cadherine increase; increase of integrine $\alpha\beta3$ [128,138,151] Increase [211]</i>	<i>Higher mobility Ability to „vessels like structures” formation by melanoma cells (vascuologenic mimicry) Higher mobility</i>
<i>Metalloproteinases</i>	<i>Increased activity [136]</i>	<i>Higher mobility</i>
<i>Intracellular ways of signaling:</i> - <i>RAS/BRAF/MAPK</i> - <i>PI3K/AKT/PTEN</i> - <i>NFkB</i>	<i>BRAF mutations in 60% of melanoma [45,148,234,284] PTEN mutation[45,234,284] activation [45,234,284]</i>	<i>Activation of the survival ways</i>
<i>Transcription – transcription factors:</i> <i>AP-1</i> <i>AP-2α</i> <i>MITF</i>	<i>Changed content of AP1 – decrease c-Jun [338] Decreased content [329] Increased content; gene amplification[45,286]</i>	<i>Antiapoptotic signals activation</i>
<i>Receptor c-Kit</i>	<i>Decreased expression [15]</i>	<i>Unexplained role</i>
<i>Angiogenesis</i>	<i>Angiogenic factors secretion increase e.g. VEGF, IL-8 [286]</i>	<i>Angiogenesis stimulation</i>
<i>Reactive oxygen substance (ROS) production (ROS)</i>	<i>Decreased content of enzymes responsible for ROS degradation [73]</i>	<i>Unexplained role</i>

Należy jeszcze raz podkreślić, iż opisane powyżej zmiany w przebiegu apoptozy wywodzą się głównie z porównań komórek pochodzących ze zmian pierwotnych i z przerzutów.

Dotychczas nie opisano powiązań zmian zdolności do apoptozy z cechami biologicznymi badanych form czerniaka. Brak porównań zdolności do apoptozy komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, pomimo obserwowanych wyraźnych różnic biologicznych między tymi dwoma typami czerniaka (dotyczących tempa wzrostu nowotworów, stopnia zróżnicowania komórek, zróżnicowanej złośliwości), stał się inspiracją do podjęcia w obecnych badaniach próby oceny wpływu zmienionych cech biologicznych na zdolności do apoptozy komórek tych dwóch form czerniaka. Zagadnienie to wydaje się szczególnie istotne, jeżeli weźmie się pod uwagę, iż amelanizacja komórek czerniaka melanotycznego towarzyszy progresji tego nowotworu u człowieka, czego przejawem mogą być przerzuty amelanotyczne, występujące stosunkowo często, o czym pisano już wcześniej.

1.6. Kamptotecyna jako induktor apoptozy

Wielokrotnie w obecnej pracy wspomniano o braku skutecznego leku w terapii czerniaka, pomimo testowania wielu grup nowych leków.

W związku z tym, iż w obecnej pracy poza oceną zdolności komórek czerniaka do apoptozy spontanicznej badano również reaktywność tych komórek na działanie kamptotecyny, poniżej zostanie przedstawiona krótka charakterystyka tej substancji.

Kamptotecynę (CPT) odkryto w latach 60 przy okazji prowadzenia poszukiwań naturalnych leków antynowotworowych, kiedy to Wall i wsp. zauważyli silny efekt cytotoksyczny ekstraktu z drzewa *Camptotheca acuminata* (pochodzącego z Chin) w stosunku do komórek białaczki mysiej L1210 [322]. W kolejnych latach udowodniono cytotoksyczne działanie tej substancji *in vitro* (w stosunku do wielu komórek nowotworowych w tym i komórek czerniaka) [104, 189]. Jednakże w próbach *in vivo* CPT wywoływała szereg niekorzystnych objawów, dlatego na pewien czas zaniechano dalszych badań klinicznych.

Dopiero odkrycie w roku 1985 topoizomerazy I jako głównego celu działania CPT [137], spowodowało ponowne zainteresowanie tą substancją i powrót do badań klinicznych nad jej przeciwnowotworowym działaniem. Poza tym, farmakolodzy rozpoczęli poszukiwania mniej toksycznych form CPT, co zaowocowało w następnych latach wprowadzeniem topotekanu i irinotekanu do leczenia niektórych nowotworów [2, 95, 235]. W ciągu kolejnych lat badań wykazano, iż CPT hamuje działanie topoizomerazy I – enzymu biorącego udział w procesie relaksacji nici DNA podczas replikacji i transkrypcji, co prowadzi do powstania pęknięć w nici chromatyny, zablokowania przejścia komórki do dalszych faz cyklu i w efekcie jej śmierci, głównie drogą apoptozy [259].

W związku z tą ostatnią informacją CPT stała się jednym z najczęściej używanych *in vitro* induktorów apoptozy w wielu komórkach nowotworowych [52, 188,

235], w tym i w komórkach czerniaka [104, 188, 189]. Jednakże okazało się, iż komórki nowotworowe wykazują bardzo zróżnicowaną wrażliwość na działanie CPT, a mechanizm tego zjawiska nadal pozostaje nie wyjaśniony [235].

W związku z przedstawionymi powyżej informacjami dotyczącymi kamptotecyny, postanowiono wykorzystać tę substancję do indukcji apoptozy w komórkach badanych linii: melanotycznej i amelanotycznej czerniaka przeszczepialnego chomika, porównując podatność komórek obu linii czerniaka na proapoptyczne działanie CPT.

2. UZASADNIENIE I CEL PODJĘTYCH BADAŃ

Wyniki badań różnych autorów wskazują, iż mechanizm apoptozy w komórkach czerniaka oraz jego ewentualne zmiany w czasie progresji tego nowotworu nie są w pełni poznane.

Dotyczy to szczególnie badań porównawczych czerniaka melanotycznego i amelanotycznego – form różniących się wieloma cechami biologicznymi, a w terapii traktowanych w taki sam sposób, o czym wspomniano we wstępie tej pracy.

Nie znane są dane porównujące zdolność do apoptozy spontanicznej komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, jak i ewentualnych różnic w przebiegu tego procesu w obu typach komórek czerniaka.

Stwierdzone przez innych autorów zmiany w przebiegu apoptozy komórek czerniaka, opisane w rozdziale 1.3.3. dotyczą przede wszystkim drogi wewnętrznej i czynników regulujących jej przebieg, natomiast wyjaśnianie molekularnych podstaw obniżonej zdolności do apoptozy komórek tego nowotworu dopiero się rozpoczęło. Zagadnienie to jest ważne tak ze względów poznawczych, jak i terapeutycznych, raz jeszcze należy zaznaczyć, że czerniak charakteryzuje się szczególną opornością na chemioterapię, w której za główną drogę niszczenia komórek uważa się apoptozę.

Wobec niejednoznacznych danych na temat zmian w przebiegu apoptozy w progresji czerniaka, określenie roli mitochondriów i innych elementów drogi wewnętrznej apoptozy w komórkach czerniaka melanotycznego i amelanotycznego wydaje się szczególnie potrzebne dla uzyskania odpowiedzi na pytanie: czy wraz z progresją czerniaka przejawiającą się powstaniem formy amelanotycznej, dochodzi do dalszego obniżenia zdolności do apoptozy tych komórek.

Czerniak zaliczany jest do nowotworów o wysokim stopniu proliferacji komórek i niskiej zdolności do apoptozy spontanicznej, ale nie wykazano jak dotąd bezpośredniego związku między zdolnością do proliferacji i apoptozy komórek czerniaka a progresją tego nowotworu; choć wskazuje się, iż liczba komórek dzielących się może być istotnym marker prognostycznym w ocenie czasu przeżycia osoby chorej.

Udział kaspaz w przebiegu apoptozy jest niekwestionowany, ale wobec doniesień o ich roli w procesie różnicowania komórek i regulacji cyklu komórkowego, interesujące wydaje się również określenie udziału tych proteaz w apoptozie komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, nowotworów różniących się tempem wzrostu i stopniem zróżnicowania komórek.

Ze względu na stosowane w badaniach nad apoptozą komórek czerniaka zróżnicowane układy doświadczalne (komórki czerniaka pochodzące z bardzo różnych źródeł: od komórek czerniaków zwierząt – najczęściej B16, po komórki pozyskiwane od osób chorych oraz linie komórkowe dostępne w bankach komórek – najczęściej A375), a także fakt, iż nie brany jest pod uwagę stopień melanizacji komórek czerniaka, przeprowadzenie badań porównawczych z wykorzystaniem dwóch linii:

melanotycznej i amelanotycznej czerniaka przeszczepialnego chomika, o wspólnym pochodzeniu, ale różnych cechach biologicznych, stwarza możliwość:

1. porównania zdolności do apoptozy spontanicznej komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego
2. porównania reaktywności na kamptotecynę (czynnik indukujący apoptozę) komórek wyżej wymienionych linii czerniaka
3. oceny dynamiki przebiegu apoptozy w komórkach obu linii czerniaka
4. określenia z jakich faz cyklu komórkowego pochodzą komórki w czerniaku melanotycznym i amelanotycznym ginące spontanicznie i pod wpływem kamptotecyny
5. oceny udziału elementów wewnętrznej i zewnętrznej drogi apoptozy w śmierci komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego
6. oceny udziału wybranych białek antyapoptycznych i proapoptycznych w apoptozie badanych komórek czerniaka.

Wyniki z przedstawionych powyżej założeń badawczych pozwolą uzyskać odpowiedź na zasadniczy cel obecnej pracy: **czy i w jakim stopniu zmiany zdolności do apoptozy spontanicznej i indukowanej można powiązać z obserwowanymi różnymi cechami biologicznymi czerniaka melanotycznego i amelanotycznego.**

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Zwierzęta

Badania wykonywano na samcach chomików syryjskich (*Mesocricetus auratus waterhouse*) odmiany złocistej (*agouti*), w wieku 3-4 miesięcy, pochodzących z hodowli niewsobnych. Chomiki karmiono *ad libitum* paszą granulowaną oraz poiono wodą.

3.1.2. Linie czerniaka przeszczepialnego

Do badań używano komórki izolowane z dwóch linii czerniaka przeszczepialnego:

- **linii melanotycznej (Ma)** – wyprowadzonej ze spontanicznie powstałego czerniaka skóry u chomika syryjskiego.
- **linii amelanotycznej (Ab)** – powstałej na skutek samorzutnej przemiany z formy melanotycznej.

Obie linie czerniaka różnią się wieloma cechami biologicznymi, z których najważniejsze przedstawiono we wstępie pracy w tabeli 1 (str. 24).

Przeszczepy wykonywano według metody opracowanej przez Bomirskiego [30] polegającej na podskórnym wstrzykiwaniu zawiesiny komórek nowotworowych, uzyskanych z fragmentów nowotworu roztartych w szklanym homogenizatorze; ilość zhomogenizowanej masy czerniaka melanotycznego przeszczepianej jednemu chomikowi wynosi 200 mg, czerniaka amelanotycznego – 50 mg. Czerniak melanotyczny pasażowany był co 21 dni, natomiast czerniak amelanotyczny – po 11 dniach wzrostu nowotworu.

3.1.3. Izolacja komórek czerniaka przeszczepialnego

Stosowane w badaniach komórki czerniaka uzyskiwano z nowotworu według opracowanej wcześniej przez Bomirskiego i wsp. metody nieenzymatycznego uzyskiwania zawiesiny pojedynczych komórek [29]. W tym celu z rozdrobnionej mechanicznie masy nowotworu komórki izolowano na mieszaninie fikolu (7,6 części 9% fikolu; ICN Biomedicals) z uropoliną (1 część 75% uropolicy; Polfa Starogard) o gęstości roztworu: 1,072 g/cm³.

Komórki czerniaka linii melanotycznej izolowano po 20–22 dniach wzrostu nowotworu; natomiast komórki czerniaka linii amelanotycznej po 10–12 dniach

wzrostu nowotworu. Żywotność tak izolowanych komórek określana w każdym doświadczeniu testem z błękitem trypanu – wynosiła 80% – 95%.

3.1.4. Inkubacja komórek czerniaka

Komórki czerniaka inkubowano w odpowiedniej pożywce hodowlanej (RPMI 1640, 10% płodowa surowica cielęca, 100 µg/ml streptomycyny, 100 jednostek/ml penicyliny) w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ przez 4, 8, 12 i 24 godziny. Do oceny apoptozy indukowanej badane komórki czerniaka inkubowano z roztworem 4 µg/ml kamptotecyny (Sigma-Aldrich) w warunkach opisanych powyżej. Następnie komórki poddawano odpowiednim testom oceniającym parametry charakteryzujące apoptozę.

3.2. Metody oceniające odsetek komórek apoptycznych

Ze względu na bardzo złożony mechanizm apoptozy i różne drogi jego przebiegu Komitet ds. Nomenklatury Śmierci Komórki (*Nomenclature Committee on Cell Death*) utworzony przez najwybitniejszych badaczy apoptozy zaleca, aby przy ocenie tego procesu wybierać kilka testów oceniających różne parametry apoptozy i precyzyjnie je nazywać opisując wyniki [178]. Jest to ogromnie ważne, żeby móc później porównywać wyniki różnych prac dotyczących śmierci komórek.

W związku z powyższym zaleceniem w obecnej pracy, aby określić zdolność do apoptozy komórek badanych linii czerniaka wybrano ocenę zmian potencjału transblonowego mitochondriów i zmian w strukturze błony komórkowej polegających na przemieszczaniu się fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej (tzw. eksternalizacja PS) oraz ocenę aktywacji kaspaz i degradację DNA (ocena pęknięć nici DNA wykrywanych metodą TUNEL).

3.2.1. Zmiany potencjału transblonowego mitochondriów ($\Delta\Psi$) – barwienie JC-1

Zmiany potencjału transblonowego mitochondriów ($\Delta\Psi$), prowadzące do otwarcia megakanalów w błonie mitochondrialnej i uwolnienia z mitochondriów takich czynników apoptycznych jak np. cytochromu c, czynnika indukującego apoptozę (AIF), zaliczane są również do wczesnych zmian apoptycznych w komórce.

Zmiany $\Delta\Psi$ mierzono znakując komórki barwnikiem fluorescencyjnym kationowego fluorochromu jodku 5,5',6,6'–tetrachloro-1,1'3,3'tetraetylbenzoimidazolo-karbocyanu (JC-1; Promega Probes).

Barwnik ten przy wysokim negatywnym potencjale transblonowym mitochondriów wnika do ich wnętrza tworząc agregaty emitujące czerwoną fluorescencję

wykrywaną w kanale FL2 cytometru przepływowego. W przypadku spadku potencjału transblonowego barwnik tworzy monomery emitujące zieloną fluorescencję wykrywaną w kanale FL1 cytometru przepływowego. Metoda ta poprzez ocenę stosunku średniej fluorescencji komórek z mitochondriami o wysokiej wartości $\Delta\Psi$ (mitochondria z dużą ilością ATP; wysokoenergetyczne; czerwona fluorescencja) do średniej wartości fluorescencji komórek z mitochondriami o niskiej wartości $\Delta\Psi$ (mitochondria z małą ilością ATP; niskoenergetyczne; zielona fluorescencja) pozwala również na określenie stanu energetycznego komórek [60]. Obniżająca się wartość FL2/FL1 odzwierciedla spadek $\Delta\Psi$.

Jako pozytywną kontrolę obniżenia wartości $\Delta\Psi$ zastosowano rozprzeczacz łańcucha oddechowego – karbonylcyjanek-m-chlorofenylohydrazonu (CCCP; 100 μM ; Sigma-Aldrich), który dodawano do komórek 15 minut przed barwieniem JC-1; $0,5 \times 10^6$ komórek/ml PBS inkubowano z 10 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 przez 15 min w 37 °C.

Po inkubacji komórki płukano dwukrotnie zimnym PBS, a wartość fluorescencji oceniano w cytometrze przepływowym FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA, Katedra i Zakład Fizjopatologii AMG).

Dane z 10000-20000 komórek w każdym oznaczeniu analizowano programem WinMDI 2.6 (J. Trotter, Scripps).

3.2.2. Zmiany w strukturze błony komórkowej (eksternalizacja fosfatydyloseryny) – jednoczesne barwienie aneksyną V oraz jodkiem propidyny

Jedną z wczesnych zmian apoptycznych w komórce jest przemieszczenie fosfatydyloseryny (PS) z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej błony komórkowej (tzw. eksternalizacja fosfatydyloseryny).

Obecność fosfatydyloseryny w błonie komórkowej wykrywana jest dzięki aneksynie V swoście wiążącej się z fosfatydyloseryną. Zastosowanie jednoczesnego barwienia aneksyną V sprzężoną z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) i jodkiem propidyny (PI) (PI wiążąc się z DNA wykrywa komórki z uszkodzoną błoną komórkową) pozwoliło na rozróżnienie komórek apoptotycznych i nekrotycznych (zestaw AnnexinV-FITC; Boehringer-Mannheim).

Komórki w liczbie 1×10^6 inkubowano 15 min w 100 μl roztworu aneksyny V-FITC w buforze HEPES z PI w temperaturze pokojowej.

Metoda ta pozwalała wyróżnić następujące populacje komórek:

- nie wiążące aneksyny i nie wiążące PI (An-/PI-); komórki uznawane za komórki żywe
- wiążące aneksynę i nie wiążące PI (An+/PI-); komórki wczesnoapoptyczne
- wiążące aneksynę i wiążące PI (An+/PI+); komórki te przyjmowane są za komórki późnoapoptyczne.

Wiązanie aneksyny V-FITC oceniano w cytometrze przepływowym.

Dane z 10000–20000 komórek w każdym oznaczeniu analizowano programem WinMDI 2.6 (J. Trotter, Scripps).

3.2.3. Aktywacja kaspaz – metoda FLICA

Do oceny odsetka komórek z aktywnymi kaspazami zastosowano test FLICA (*Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases*) [238, 280]. W metodzie tej znakowany fluorochromem inhibitor kaspaz/y swoście wiąże się z centrum aktywnym enzymu. W wykonywanych badaniach zastosowano znakowany FITC pan-inhibitor VAD-FMK (Promega Probes), który wykrywa większość zaktywowanych kaspaz. Jednoczesne barwienie metodą FLICA i jodkiem propidyny pozwala na wyróżnienie komórek:

- wczesnoapoptycznych (kaspazo+/PI–; mają zaktywowane kaspazy przy nie uszkodzonej błonie komórkowej)
- późnoapoptycznych (kaspazo+/PI+; mają zaktywowane kaspazy oraz wykazują uszkodzenia w błonie komórkowej pozwalające na wnikanie PI do komórki)
- w końcowej fazie apoptozy (kaspazo–/PI+; komórki barwią się PI, ale nie wykazują już aktywności kaspaz)

Wyróżnienie wyżej wymienionych komórek znajdujących się na różnych etapach apoptozy pozwala na prześledzenie dynamiki przebiegu procesu apoptozy [238, 280]

Komórki w liczbie 1×10^6 inkubowano z 5 μM FITC-VAD-FMK (caspACETM-FITC-VAD-FMK, Promega Probes) przez 30 minut, w temperaturze pokojowej, w ciemności; po odpłukaniu zawieszano je w PBS z PI, a natężenie fluorescencji oceniano w cytometrze przepływowym.

Dane z 10000–20000 komórek w każdym oznaczeniu analizowano programem WinMDI 2.6 (J. Trotter, Scripps).

3.2.4. Degradacja DNA oceniana metodą TUNEL

Istotną cechą komórek apoptycznych jest fragmentacja DNA na odcinki nukleosomalne pod wpływem endonuleaz aktywowanych przez kaspazy.

Jedną z metod wykrywania pęknięć DNA jest metoda TUNEL (*Terminal deoxynukleotidyl transferase mediated d-UTP Nick End-Labeling*) [100], w której enzym, terminalna transferaza, dołącza w miejscach pęknięć chromatyny, znakowane nukleotydy Br-dUTP. Obecność znakowanych nukleotydów wykrywana była przeciwciałem anti-BrdU sprzężonym z FITC (Test APO-BRDU Kit; Becton Dickinson Bioscience Pharmingen).

Jednoczesne barwienie komórek PI w obecności Rnazy A, pozwala określić z jakich faz cyklu pochodzą komórki wykazujące apoptyczną fragmentację DNA

wykrywaną metodą TUNEL [66]. Komórki przygotowane zgodnie z załączoną do zestawu procedurą analizowano w cytometrze przepływowym.

Dane z 10000-20000 komórek w każdym oznaczeniu analizowano programem WinMDI 2.6 (J. Trotter, Scripps).

3.3. Analiza cyklu komórkowego

Cytometryczna ocena utrwalonych komórek, barwionych jodkiem propidyny wiążącym się z DNA pozwoliła na oznaczenie zawartości DNA i określenie odsetka komórek znajdujących się w fazach cyklu komórkowego: G0/G1 oraz S+G2/M.

Metoda ta umożliwiła także określenie odsetka komórek o obniżonej zawartości DNA (komórki apoptyczne będące w fazie rozpadu na ciała apoptyczne), lokalizujących się w obszarze określanym jako sub G0/G1, który również, oprócz wykrywanych metodą TUNEL pęknięć DNA, odzwierciedla liczbę komórek z apoptycznymi zmianami w DNA. Przygotowanie komórek czerniaka do cytometrycznego oznaczania zawartości DNA przeprowadzono według metody Darzynkiewicza i wsp. [66].

Izolowane komórki czerniaka zawieszano w roztworze PBS i utrwalano przez 24 godziny, w temperaturze -20 °C, w 70% roztworze alkoholu etylowego, zachowując następujące proporcje: 1×10^6 komórek/ 1 ml PBS/ 10 ml alkoholu.

Po odplukaniu roztworem PBS alkoholu etylowego z utrwalonych komórek, zawieszano je w 1 ml roztworu barwiącego (RNaza A 100 µg/ml, PI 40 µg/ml w PBS) i inkubowano 30 minut w 37 °C, w ciemności, a natężenie fluorescencji oceniano w cytometrze przepływowym.

Dane z pomiarów 10000-20000 komórek w każdej próbie analizowano przy pomocy programu WinMDI 2.6 (J. Trotter, Scripps).

3.4. Oznaczenie obecności receptora Fas i ligandu FasL w błonie komórkowej badanych komórek czerniaka

Komórki czerniaka w liczbie 5×10^6 znakowano w 100 µl roztworu, monoklonalnego przeciwciała sprzężonego z fikoerytryną (PE) przeciwko mysiemu białku: Fas lub FasL (Becton Dickinson Bioscience Pharmingen), przez 40 min, w temperaturze pokojowej, w ciemności, a natężenie fluorescencji oceniano w cytometrze przepływowym. Przeprowadzono również barwienie z odpowiednimi kontrolami izotypowymi dla obu przeciwciał.

Dane z pomiarów 10000-20000 komórek w każdej próbie analizowano przy pomocy programu WinMDI 2.6 (J. Trotter, Scripps).

3.5. Identyfikacja metodą Western blot: cytochromu c, prokaspazy 8 i 9, PARP, Bcl-2, surwiwiny, AIF, białka p53 w lizatach badanych komórek czerniaka

Izolowane komórki dwóch linii czerniaka przeszczepialnego w liczbie 2×10^6 inkubowano w 20 μ l hipotonicznego roztworu lizującego {Tris/Nonidet 40/Tween-100 z inhibitorami proteaz: 100 μ g/ml aprotyniną, 100 μ g/ml leupeptyną, 1,8 mg/ml jodoacetamidem i 1 mM fluorkiem fenylometylosulfonowym (PMSF)} przez 1 godzinę, w 4 °C. Następnie próby wirowano 5 minut (12 tys. obrotów/min.) w 4 °C, a zebrany supernatant przechowywano w temperaturze -70 °C do czasu identyfikacji badanych czynników metodą Western blot; 60 μ g białka z uzyskanych lizatów komórkowych rozdzielano elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym: 8% dla PARP, 15% dla: cytochromu c, Bcl-2, p53, surwiwiny, kaspazy 8 i 9, AIF przy stałym napięciu 120 V.

Rozdzielone elektroforetycznie białka przenoszono na błonę nitrocelulozową przy pomocy elektrotansferu trwającego 2 godziny, przy stałym napięciu 60 V; następnie błonę inkubowano w buforze blokującym (3% albumina wołowa w buforze TBS: 50mM Tris – HCl pH 7,5; 0,5M NaCl) przez noc w 4°C.

Do identyfikacji badanych białek na błonie nitrocelulozowej zastosowano przeciwciała zestawione w tabeli 5.

Błony nitrocelulozowe inkubowano przez noc ze swoistym wykrywającym przeciwciałem, a następnie po odplukaniu, z drugim przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową i po 2 godzinach inkubacji wykrywano obecność badanego białka metodą chemiluminescencyjną z użyciem zestawu Pierce SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology).

W wybranych próbach wykrywano również obecność β -aktyny (przeciwciała anty β -aktyna, stężenie 1:6000, Sigma-Aldrich) w celu potwierdzenia jednakowej ilości białka w oznaczanych próbach oraz aby przedstawić zawartość badanych białek w stosunku do zawartości aktyny.

Intensywność zaciemnienia prążków na kliszy rentgenowskiej oceniano densytometrycznie używając programu Quantity One software (BioRad) oraz GelDoc2000 systemu (BioRad, UK) (Katedra i Zakład Biochemii AMG).

Tab. 5. Przeciwciała stosowane przy wykrywaniu białek metodą Western blot.

Tab. 5. *Antibodies used in Western blot protein detection.*

Wykrywany czynnik <i>Detecting factor</i>	Przeciwciało pierwsze (identyfikujące) Nazwa, producent/stężenie <i>Primary antibody (name, manufacturer, concentration)</i>		Przeciwciało drugie (wykrywające); nazwa, producent/stężenie <i>Secondary antibody (name manufacturer, concentration)</i>	
PARP	Mysie monoklonalne Oncogene Research Product	0,5 µg/ml	Anty mysie	1:10 000 Sigma-Aldrich
Bcl-2	Mysie monoklonalne Santa Cruz Biotechnology	1:300	Anty mysie	1:10 000 Sigma-Aldrich
p53	Mysie monoklonalne Becton Dickinson	1 µg/ml	Anty mysie	1:10 000 Sigma-Aldrich
Surwiwina	Królicze poliklonalne Chemicon International	1 µg/ml	Anty królicze	1:3000 Santa Cruz Biotechnology
Kaspaza 8	Kozie poliklonalne Santa Cruz Biotechnology	1:300	Anty kozie	1:3000 Santa Cruz Biotechnology
Kaspaza 9	Królicze poliklonalne StressGen Biotechnologies	2 µg/ml	Anty królicze	1:3000 Santa Cruz Biotechnology
Cytochrom c	Mysie monoklonalne Oncogene Research Product	0,5 µg/ml	Anty mysie	1:10 000 Sigma-Aldrich
AIF	Mysie monoklonalne Santa Cruz Biotechnology	1:300	Anty mysie	1:10 000 Sigma-Aldrich

3.6. Ocena morfologii komórek – barwienie oranżem akrydyny (AO) i jodkiem propidyny

Izolowane komórki czerniaka zawieszano w 1 ml roztworu barwiącego 3,6-dimetylaminoakrydyny i PI (10 µg/ml oranżu akrydyny – AO; PI 10 µg/ml, RNaza A 100 µg/ml) i inkubowano przez 30 minut w 37°C, w ciemności [326]; analizowano przy pomocy systemu mikroskopii konfokalnej (Nikon, Japonia) oraz programów: Laser Sharp 2000 i Laser Pix V. 4. 001 (BioRad, GB) (Katedra Anatomii AMG).

3.7. Ocena masy mitochondriów

Masę mitochondriów w komórkach badanych czerniaków oceniano wykorzystując barwnik fluorescencyjny 3,6-bis(dimetylamino)-10-nonyl akrydynę (N-nonylo oranż akrydyny – NAO; Molecular Probes) wiążący się z mitochondriami [243]. Natężenie fluorescencji mierzonej w kanale FL1 odzwierciedla masę mitochondriów w komórce.

Komórki 2×10^6 w 1 ml PBS z 2 μ M NAO inkubowano 10 minut w 37°C i po płukaniu analizowano w cytometrze przepływowym.

Dane z 10000-20000 komórek w każdym oznaczeniu analizowano programem WinMDI 2.6 (J. Trotter, Scripps).

3.8. Ocena statystyczna uzyskanych wyników

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu STATISTICA 7.1 (StatSoft, Inc. 2005).

Dane w tabelach i na wykresach przedstawiono w postaci średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe.

Zgodność rozkładów wyników dla badanych oznaczeń z rozkładem normalnym sprawdzano za pomocą Testu Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji Testem Levene'a.

Analizę znamienności różnic pomiędzy badanymi grupami przeprowadzono testami nieparametrycznymi: Testem ANOVA Friedmana oraz Testem U Mann'a-Whitney'a, z zastosowaniem poprawki Bonfferoniego, przyjmując za różnicę statystycznie istotną wartość $p < 0,025$ (przy dwóch testach) i $p < 0,012$ (przy czterech testach).

4. WYNIKI

4.1. Ocena apoptozy spontanicznej komórek linii melanotycznej i amelanotycznej czerniaka

W apoptozie spadek potencjału transbłonowego błony mitochondrialnej, powodujący uwolnienie z mitochondriów wielu czynników prowadzących do apoptycznej śmierci komórki, uważany jest za jedną z pierwszych oznak rozpoczęcia tego procesu.

4.1.1. Komórki o obniżonym potencjale transbłonowym mitochondriów ($\Delta\Psi$); ocena potencjału transbłonowego mitochondriów we wszystkich komórkach

Zastosowana w niniejszej pracy metoda pozwoliła ocenić odsetek komórek wykazujących obniżoną wartość $\Delta\Psi$, jak również pozwoliła porównać względną wartość $\Delta\Psi$ oraz ocenić ogólny stan energetyczny mitochondriów w badanych komórkach poprzez określenie stosunku FL2 do FL1, gdzie FL2 (fluorescencja czerwona) jest wskaźnikiem wysokospolaryzowanych, z dużą ilością ATP (wysokoenergetycznych) mitochondriów, a FL1 (fluorescencja zielona) niskospolaryzowanych, z małą ilością ATP (niskoenergetycznych) mitochondriów.

Wśród badanych komórek czerniaka po 4 godzinach inkubacji stwierdzono, iż około 6% w linii rodzimej Ma (tab. 6 pkt 1, ryc. 1a) i tylko około 3% komórek linii Ab (tab. 6 pkt 1, ryc. 1b) wykazywało obniżenie $\Delta\Psi$.

Wydłużenie czasu inkubacji do 24 godzin powodowało wzrost odsetka tych komórek w linii Ma do prawie 17% (tab. 6, ryc. 1c), a w linii Ab do około 10% (tab. 6 pkt 1, ryc. 1d). Wśród komórek linii Ma zawsze było znamienne więcej komórek o obniżonej wartości $\Delta\Psi$ w porównaniu z linią Ab (tab. 6 pkt 1, $p < 0,025$).

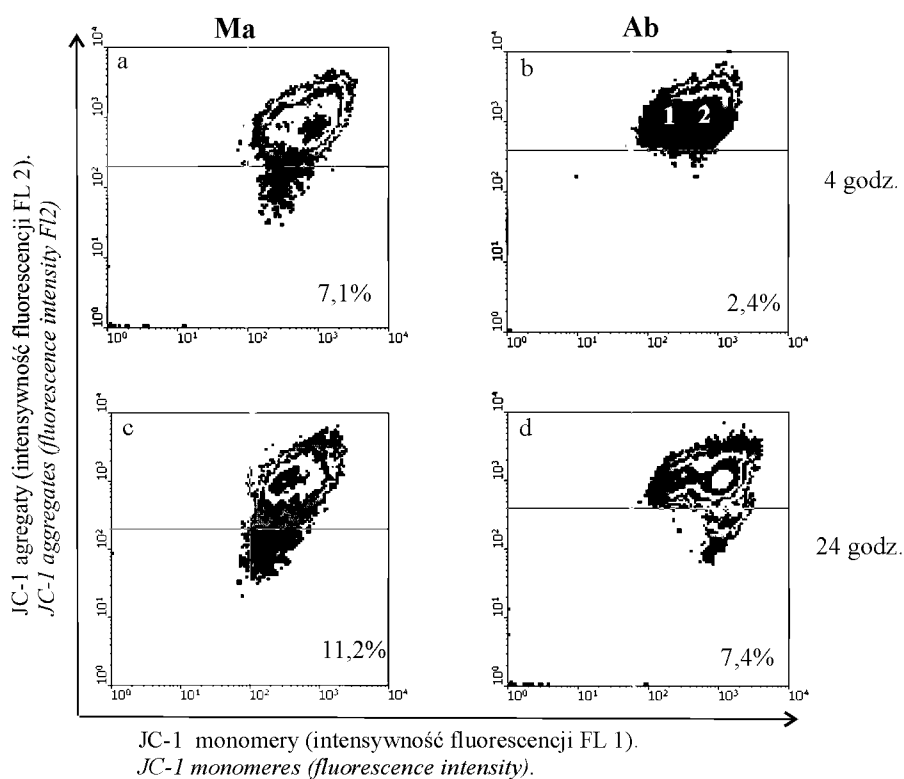
Tempo przyrostu komórek o obniżonym $\Delta\Psi$ w komórkach obu linii było podobne, a wartość FL2/FL1 dla tych komórek wynosiła około 0,5.

Tab. 6. Zawartość procentowa komórek linii Ma i Ab wykazujących cechy komórek ginących drogą apoptozy.

Tab. 6. Percentage of Ma and Ab melanoma line cells with apoptotic features.

Odsetek komórek wykazujących następującą cechę procesu apoptozy: <i>Percentage of cells with apoptotic feature</i>	4 godz.		24 godz.	
	Ma	Ab	Ma	Ab
1. Obniżony potencjał transbłonowy mitochondriów – $\Delta\Psi$ <i>Decreased mitochondrial potential</i>	6,4±2,5*	3,1±0,9	16,7±7,5*	9,7±5,4
2. Aktywne kaspazy; komórki : <i>Activated caspases; cells:</i>				
2.1. z całkowitą aktywnością kaspazo+ <i>with all caspase activity</i>	14,0±3,3	12,2±5,8	11,3 ±3,5	14,2±4,4
2.2. wczesnoapoptyczne kaspazo+/PI- <i>early apoptotic</i>	5,4±1,8	3,1±2,6	6,0±2,2*	2,7±1,9
2.3. późnoapoptyczne kaspazo+/PI+ <i>late apoptotic</i>	8,5±2,6	9,0±5,0	5,3±1,4	11,6±4,3*
2.4. w końcowym stadium apoptozy kaspazo-/PI+ <i>in the final stage of apoptosis</i>	8,5±3,7	10,2±5,5	9,0±2,5	11,2±3,3
3. Eksternalizację fosfatydyloseryny; komórki: <i>Phosphatidylserine externalization; cells:</i>				
3.1. wczesnoapoptyczne An+/PI- <i>early apoptotic</i>	37,8±6,4*	9,1±1,4	39,0±7,2*	7,6±2,1
3.2. późnoapoptyczne An+/PI+ <i>late apoptotic</i>	18,4±5,0	22,7±4,2	13,6±3,5	28,0±7,5
4. Zmiany w DNA wykrywane metodą TUNEL <i>DNA changes determined by TUNEL</i>	16,2±7,1*	6,8±1,6	27,3±9,5*	13,7±5,0
5. Hypodiploidalną zawartość DNA (komórki z obszaru sub G0/G1) <i>Hypodiploid cells from sub G0/G1</i>	11,7±2,7*	4,4±1,3	17,6±2,8*	8,6±3,0

n – liczba doświadczeń; 1. n=8 dla Ma, n=7 dla Ab; 2. n=4 dla Ma, n=7 dla Ab; 3. n=6; 4. n=7; 5. n=7; *p<0,025 zmienna różnica w porównaniu z linią Ab

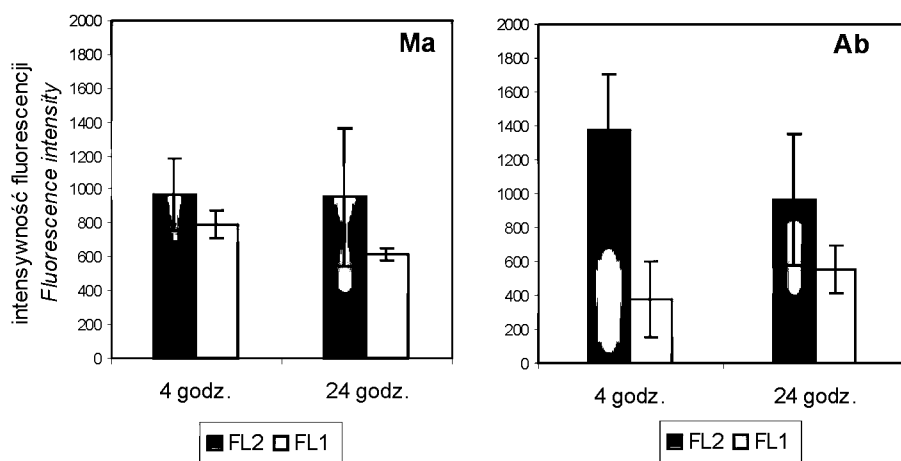


Ryc. 1. Ilustracja zmian zawartości komórek z obniżonym $\Delta\Psi$ (dolna część wykresów) w trakcie spontanicznej śmierci komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) po 4 i 24 godzinach inkubacji w jednym z 8 (dla Ma) i 7 (dla Ab) wykonanych doświadczeń. 1 i 2 - populacje komórek czerniaka linii Ab różniące się wartością FL2/FL1.

Fig. 1. Changes in the percentage of cells with low $\Delta\Psi$ (lower part of each figure) during spontaneous death of melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells after 4 and 24 hrs incubation in one of 8 (for Ma) and 7 (for Ab) done experiments. 1 and 2 Ab line cell populations differing in the FL2/FL1 value.

Wyjściowa średnia wartość FL2 we wszystkich komórkach linii Ab była wyższa, a FL1 niższa w porównaniu z linią Ma (ryc. 2A), co wyrażało się wyższą wartością stosunku FL2/FL1, który dla wszystkich komórek linii Ab wynosił 3,8 a dla wszystkich komórek linii Ma 1,2 (ryc. 2B, $p < 0,025$). Oznacza to, iż komórki linii Ma mają niższą wyjściową wartość $\Delta\Psi$, niż komórki linii Ab, co w powiązaniu z powszechnie przyjmowanym faktem, iż wartość $\Delta\Psi$ decyduje o syntezie ATP, może wskazywać na różnice w stanie energetycznym komórek obu linii czerniaka. Po 24 godzinach inkubacji wartość ta dla komórek linii Ma nie zmienia się istotnie, ale w komórkach linii Ab obniża się do 1,8, co może wskazywać, iż komórki linii

Ma zachowują energię na stałym poziomie, zaś komórki linii Ab w czasie inkubacji tracą ją.

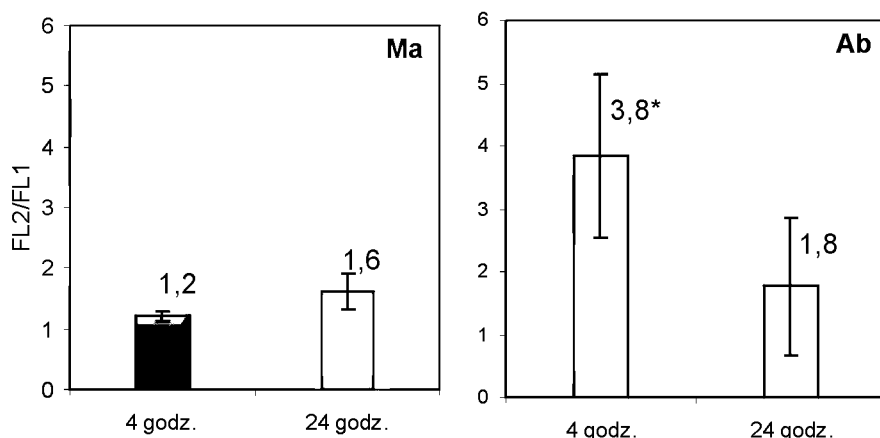


Ryc. 2A. Zmiany fluorescencji JC-1 w mitochondriach wysokospolaryzowanych (FL2) i niskospolaryzowanych (FL1) jako przejaw zmian $\Delta\Psi$ podczas spontanicznej śmierci komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab). Zielona fluorescencja (FL1) odzwierciedla niskoenergetyczny, a czerwona (FL2) wysokoenergetyczny stan mitochondriów w komórkach. Wyniki pochodzą z 8 (dla Ma) i 7 (dla Ab) doświadczeń.

Fig. 2A. Changes of JC-1 fluorescence in high polarized (FL2) and low polarized (FL1) mitochondria in spontaneous death among melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells. The green fluorescence (FL1) refers to the JC-1 monomers and the red fluorescence (FL2) corresponds to the formation of JC-1 aggregates. Results are from 8 for Ma and 7 for Ab line experiments.

Zauważono ponadto, że wśród komórek linii Ab, poza komórkami o obniżonym $\Delta\Psi$, można wyróżnić dwie populacje komórek, których stosunek FL2/FL1 wynosił odpowiednio $6,6 \pm 1,8$ (ryc. 1b 1) i $2,2 \pm 0,4$ (ryc. 1b 2). Wartości FL2/FL1 obu wyróżnionych populacji były wyższe od wartości dla komórek linii Ma ($1,2 \pm 0,1$), gdzie obserwowano tylko jedną populację komórek.

Zatem wśród komórek linii Ab obecne były populacje różniące się wyjściową wartością $\Delta\Psi$.



Ryc. 2B. Zmiany stosunku FL2/FL1 podczas spontanicznej śmierci komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab). Wyniki pochodzą z 8 (dla Ma) i 7 (dla Ab) doświadczeń. *statystycznie znacznie wyższa wartość FL2/FL1 w komórkach linii Ab w porównaniu z komórkami linii Ma; $p < 0,025$.

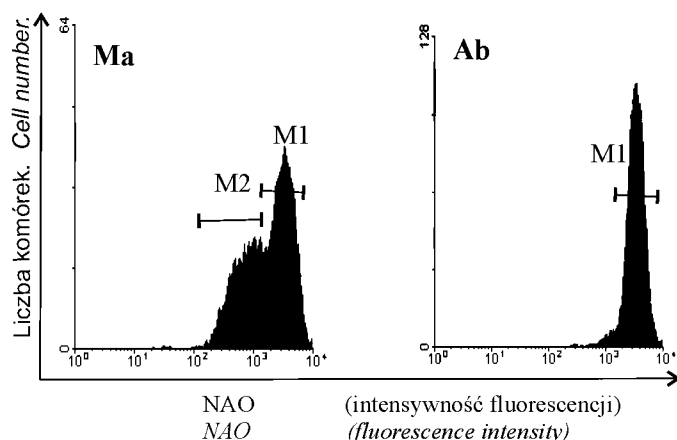
*Fig. 2B. Changes of the ratio of FL2/FL1 during spontaneous death among melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells. Results are from 8 for Ma and 7 for Ab line experiments. *statistically significant higher FL2/FL1 ratio of amelanotic melanoma cells in comparison to Ma line; $p < 0.025$.*

Ocena masy mitochondriów w komórkach obu linii czerniaka wykazała, iż komórki linii melanotycznej przy mniejszej średniej masie mitochondriów (średnia fluorescencja 1890 ± 307), w porównaniu z linią amelanotyczną (średnia fluorescencja 3635 ± 189), są zróżnicowane pod względem masy tych organelli. W linii melanotycznej zaobserwowano występowanie dwóch populacji komórek: jednej o masie mitochondriów, podobnej jak w komórkach czerniaka amelanotycznego (średnia wartość fluorescencji zbliżona do komórek linii Ab; ryc. 3 M1) i drugiej o niższej masie mitochondriów (obniżona fluorescencja do około 700 jednostek umownych; ryc. 3 M2), do której należało ponad 40% komórek linii Ma.

Zatem obecność dwóch populacji o różnej masie mitochondriów wśród komórek linii Ma, przy obserwowanej tylko jednej populacji komórek o podobnym wyjściowym $\Delta\Psi$, wskazuje, iż masa mitochondriów nie wpływa na wartość potencjału transblonowego tych komórek (ryc. 1a i 3).

W komórkach linii amelanotycznej czerniaka pomimo podobnej masy mitochondriów, obserwowano wyraźne dwie populacje różniące się wyjściową wartością $\Delta\Psi$ (ryc. 1b i 3), co wskazuje, iż wartość $\Delta\Psi$ również w komórkach tej linii nie zależy od masy mitochondriów.

Oznacza to, iż masa mitochondriów w komórkach obu linii nie wpływa na wartość potencjału transbłonowego błony mitochondrialnej.



Ryc. 3. Ilustracja zróżnicowania komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) pod względem masy mitochondriów oznaczanej przy pomocy NAO. M1 i M2 populacje komórek o różnej masie mitochondriów. Jedno z 8 (dla Ma) i 7 (dla Ab) wykonanych doświadczeń.

Fig. 3. Mitochondrial mass in melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells estimated by NAO staining. M1 and M2 populations of cells with different mitochondrial mass. One of 8 (for Ma) and 7 (for Ab) done experiments.

W podsumowaniu wyników dotyczących potencjału transbłonowego mitochondriów można stwierdzić, że komórki obu linii różnią się wyjściową wartością $\Delta\Psi$, a linia Ma w porównaniu z linią Ab, charakteryzuje się większą liczbą komórek o obniżonym $\Delta\Psi$ (uznawanych za komórki wchodzące na drogę apoptozy z udziałem mitochondriów).

Obniżenie $\Delta\Psi$ powoduje uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów substancji aktywujących podstawowe proteazy procesu apoptozy – kaspazy, dlatego odsetek komórek wykazujących obecność aktywnych kaspaz stanowi kolejny element oceny apoptozy spontanicznej.

4.1.2. Komórki z aktywnymi kaspazami

Oceniony metodą FLICA procent wszystkich komórek z aktywnymi kaspazami wśród komórek obu linii czerniaka był podobny i nie zmieniał się istotnie w czasie prowadzenia obserwacji (tab. 6 pkt 2.1).

Jednak gdy oceniano liczbę komórek: kaspazo+/PI- (komórek wczesnoapoptycznych) i kaspazo+/PI+ (późnoapoptycznych), stwierdzono istotne różnice między linią melanotyczną i amelanotyczną czerniaka. W linii rodzimej komórki kaspazo+/PI- stanowiły prawie 50% wszystkich komórek kaspazo+ (tab. 6 pkt 2.2); natomiast w linii amelanotycznej – szybciej rosnącej – komórek tych było o połowę mniej niż w linii rodzimej (tab. 6 pkt 2.2; $p < 0,025$). Po 24 godzinach inkubacji niewielki wzrost odsetka komórek kaspazo+/PI+ (tab. 6 pkt 2.3) obserwowano tylko wśród komórek linii Ab. Komórki kaspazo-/PI+, które można uznać za komórki znajdujące się w końcowej fazie apoptozy (nie wykazujące już aktywności kaspaz, przy jednoczesnym uszkodzeniu błony plazmatycznej powodującym penetrację jodku propidyny do jądra) stanowiły w obu liniach około 10% (tab. 6 pkt 2.3).

Zatem uzyskane wyniki wskazują, iż komórki obu linii czerniaka przy zbliżonej liczbie komórek z aktywnymi kaspazami różnią się liczbą komórek wczesno- i późnoapoptycznych: linia amelanotyczna – o bardziej agresywnym fenotypie – ma obniżony odsetek komórek wczesnoapoptycznych. Oznacza to, iż mniej komórek linii Ab w porównaniu z linią rodzimą jest na etapie aktywacji kaspaz w przebiegu apoptozy.

Aktywacja kaspaz prowadzi do zmiany w morfologii komórek przejawiającej się m.in. zmianą w strukturze błony plazmatycznej polegającą na przemieszczeniu fosfatydyloseryny (PS) do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej błony tzw. eksternalizację PS.

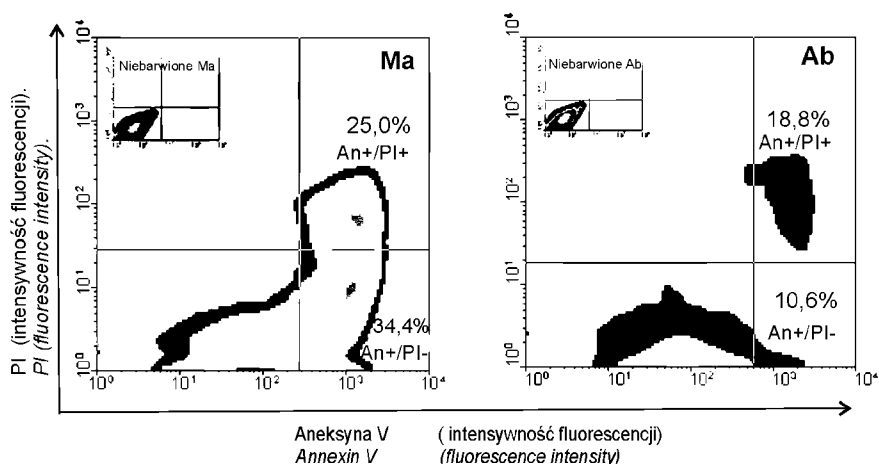
4.1.3. Komórki ze zmianami w błonie komórkowej (eksternalizacja fosfatydyloseryny)

Test z użyciem aneksyny V (wiąże się z fosfatydyloseryną) i jodku propidyny (PI) pozwolił ocenić apoptyczne zmiany w strukturze błony komórkowej, wyróżnić komórki An+/PI- (wczesnoapoptyczne – wykazujące eksternalizację PS) i An+/PI+ (późnoapoptyczne – poza eksternalizacją PS wykazujące również zmiany w przepuszczalności błony dla PI).

Komórki An+/PI- wśród komórek linii Ma stanowiły około 38%, zaś w linii amelanotycznej tylko około 9% (tab. 6 pkt 3.1, ryc. 4A). Komórki późnoapoptyczne: An+/PI+ w linii Ma stanowiły po 4 godzinach 18% a po 24 godzinach 14 % (tab. 6 pkt 3.2). Zaś ich odsetek wśród komórek linii Ab był nieco wyższy niż w linii Ma i wynosił od 22 do 28% (tab. 6 pkt 3.2).

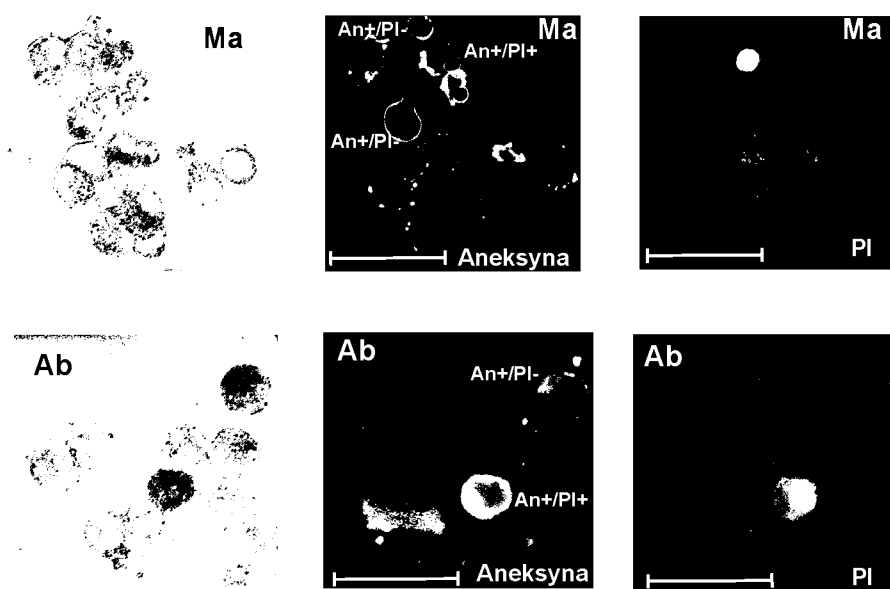
Apoptyczne zmiany w strukturze błony komórkowej zilustrowano na zdjęciach z mikroskopu konfokalnego przedstawionych na rycinie 4B.

Zatem liczba komórek z wczesnoapoptycznymi zmianami w błonie komórkowej (An+/PI-), wśród komórek linii Ma jest znamienne wyższa niż w linii Ab. Natomiast więcej komórek An+/PI+ zaobserwowano w linii Ab (tab. 6 pkt 3.2).



Ryc. 4A. Zróznicowanie komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) pod względem eksternalizacji fosfatydyloseryny i integralności błony komórkowej na komórki wczesnoapoptyczne (An+/PI-) oraz późnoapoptyczne (An+/PI+) po 4 godzinach inkubacji w analizie cytometrycznej. Jedno z 6 wykonanych doświadczeń.

Fig. 4A. Externalization of phosphatidylserine and plasma membrane integrity in early apoptotic (An+/PI-) and late apoptotic (An+/PI+) melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells in spontaneous apoptosis after 4 hrs incubation in cytometric analysis. One of 6 done experiments.



Ryc. 4B. Obraz, w mikroskopie konfokalnym, komórek wczesno- (An+/PI-) oraz późno-apoptycznych (An+/PI+) czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) po 4 godzinach inkubacji. Skala 50 μ m.

Fig. 4B. Confocal microscope analysis of early apoptotic (An+/PI-) and late apoptotic (An+/PI+) melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells in spontaneous apoptosis after 4 hrs incubation in. Scale bar 50 μ m.

4.1.4. Komórki wykazujące pęknięcia nici DNA wykrywane metodą TUNEL

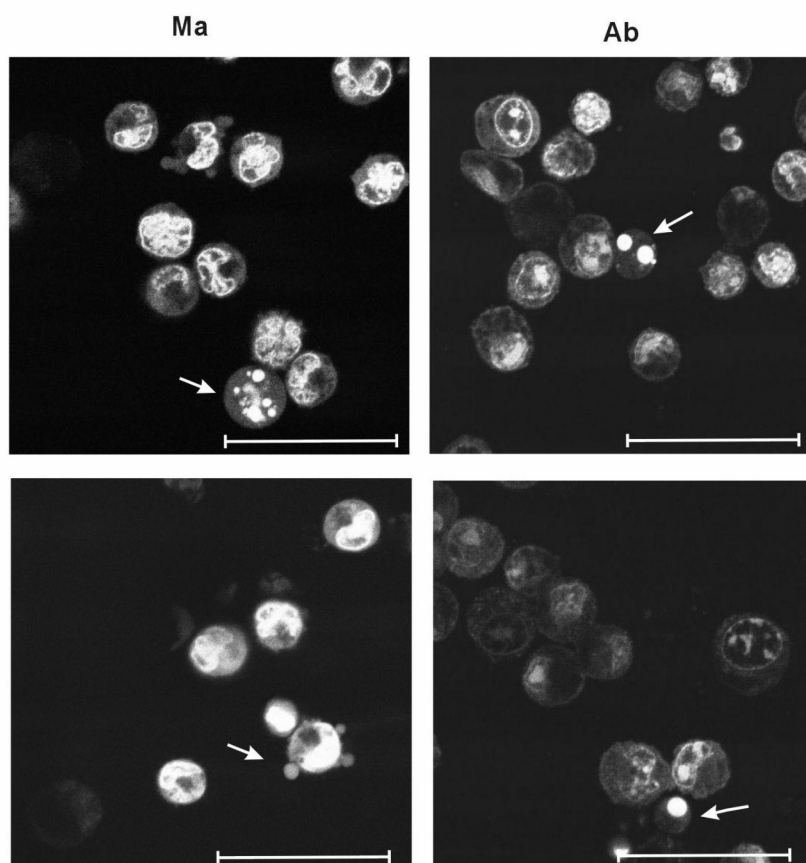
Przeprowadzone oznaczenia wykazały, że około 16% komórek linii Ma i tylko 7% wśród komórek linii Ab stanowiły komórki TUNEL-pozytywne (tab. 6 pkt 4; $p < 0,025$). Po 24 godzinach inkubacji w obu liniach wzrastał odsetek tych komórek, ale nadal było ich znacznie więcej w linii rodzimej (tab. 6 pkt 4). Oznacza to, iż komórek w których dochodzi do apoptycznej degradacji DNA było również więcej w linii Ma niż w linii Ab.

4.1.5. Komórki o obniżonej zawartości DNA (komórki lokalizujące się w obszarze sub G0/G1)

W wyniku kondensacji chromatyny i jej cięcia na fragmenty w dalszych etapach apoptozy dochodzi do rozpadu komórek na ciała apoptyczne, co przy analizie zawartości DNA widoczne jest jako pojawianie się komórek o obniżonej zawartości DNA, lokalizujących się w obszarze określanym jako sub G0/G1.

W linii melanotycznej czerniaka około 12% komórek znajdowało się w obszarze sub G0/G1, zaś w linii Ab tylko 4%. Po kolejnych 20 godzinach inkubacji wartości te wzrastały, ale nadal komórek o obniżonej zawartości DNA było więcej wśród komórek linii rodzimej (tab. 6 pkt 5), co świadczy iż również komórek znajdujących się w finalnej fazie apoptozy – rozpadających się na ciała apoptyczne – wśród komórek linii Ma jest więcej niż w linii Ab.

Morfologicznym potwierdzeniem apoptycznych zmian w DNA opisanych powyżej w punkcie 4.1.4 i 4.1.5 są obrazy komórek obu linii czerniaka z mikroskopu konfokalnego z widoczną kondensacją chromatyny i jej rozpadem na ciała apoptyczne, przedstawiono na ryc. 5.



Ryc. 5. Morfologia apoptycznych komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) w apoptozie spontanicznej barwionych oranżem akrydyny – widoczna kondensacja chromatyny i rozpad na ciała apoptyczne (komórki oznaczone strzałką). Skala 50 μm .

Fig. 5. Morphology of the apoptotic melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells during spontaneous apoptosis stained by acridine orange to show chromatin condensation and apoptotic bodies. Arrows point of cells with chromatin condensation. Scale bar 50 μm .

Wyniki oznaczeń procentowej zawartości komórek wykazujących cechy komórek apoptycznych takich jak: obniżony potencjał transbłonowy mitochondriów, aktywację kaspaz, eksternalizację fosfatydyloseryny czy zmiany w DNA, wyraźnie wskazują, iż wśród komórek linii rodzimej – Ma jest więcej komórek apoptycznych, niż w powstałej z niej linii Ab – o bardziej agresywnym fenotypie.

Wraz z wydłużaniem czasu inkubacji nie wykazano istotnych różnic w tempie wzrostu odsetka komórek o cechach apoptycznych wśród komórek obu linii czerniaka.

4.2. Ocena apoptozy indukowanej kamptotecyną (CPT) w komórkach linii melanotycznej i amelanotycznej czerniaka

Wrażliwość komórek obu linii czerniaka na indukcję apoptozy przez CPT określano poprzez ocenę procentowej zawartości komórek o cechach charakterystycznych dla śmierci komórek drogą apoptozy, tak jak przy ocenie apoptozy spontanicznej. Wyniki tych oznaczeń zestawiono w tabeli 7.

Tab. 7. Zawartość procentowa komórek linii Ma i Ab wykazujących cechy komórek ginących drogą apoptozy indukowanej działaniem kamptotecyny (+CPT) w porównaniu z apoptozą spontaniczną (-CPT).

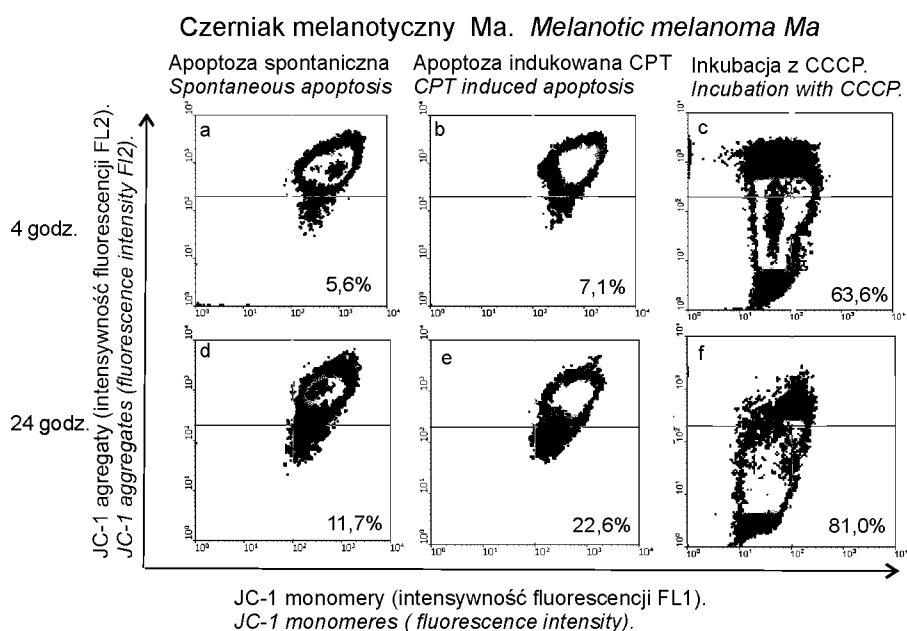
Tab. 7. Percentage of Ma and Ab melanoma line cells with apoptotic features dying by spontaneous (-CPT) and CPT-induced (+CPT) apoptosis.

Odsetek komórek o następujących cechach procesu apoptozy: <i>Percentage of cells with apoptotic features:</i>	Czerniak melanotyczny Ma <i>Melanotic melanoma Ma</i>				Czerniak amelanotyczny Ab <i>Amelanotic melanoma Ab</i>			
	4 godz.		24 godz.		4 godz.		24 godz.	
	-CPT	+CPT	-CPT	+CPT	-CPT	+CPT	-CPT	+CPT
1. Obniżony $\Delta\Psi$ <i>Decreased $\Delta\Psi$</i>	6,4±2,5	9,5±4,7	16,7±7,5	20,8±4,5	3,1±0,9	4,8±0,7*	9,7±5,4	58,3±11,6*
2. Aktywne kaspazy; komórki: <i>Activated caspases; cells</i>								
2.1. z całkowitą aktywnością kaspaz kaspazo+ <i>with all activated caspases</i>	14,0±3,3	13,3±1,6	11,3 ±3,5	10,6±1,7	12,2±5,8	22,7±9,1*	14,2±4,4	55,4±19,8*
2.2. wczesnoapoptyczne kaspazo+/PI- <i>early apoptotic</i>	5,4±1,8	4,7±0,9	6,0±2,2	4,8±1,3	3,1±2,6	10,2±5,2*	2,7±1,9	1,7±1,7
2.3. późnoapoptyczne kaspazo+/PI+ <i>late apoptotic</i>	8,5±2,6	8,5±1,9	5,3±1,4	5,8±1,5	9,0±5,0	12,4±4,6	11,6±4,3	53,6±18,8*
2.4. w końcowej fazie apoptozy kaspazo-/PI+ <i>in the final stage of apoptosis</i>	8,5±3,7	10,2±5,5	9,0±2,5	11,2±3,3	10,2±5,5	10,5±5,5	11,2±3,3	40,9±21,9*
3. Eksternalizacja fosfatydyloseryny, komórki: <i>Phosphatidylserine externalization; cells:</i>								
3.1. wczesnoapoptyczne An+/PI- <i>early apoptotic</i>	37,8±6,4	40,6±6,2	39,0±7,2	36,0±4,8	9,1±1,4	9,5±1,9	7,6±2,1	6,9±2,6
3.2. późnoapoptyczne An+/PI+ <i>late apoptotic</i>	18,4±5,0	20,1±3,4	13,6±3,5	15,6±4,7	22,7±4,2	26,4±4,1	28,0±7,5	77,1±7,3*
4. Zmiany w DNA (metoda TUNEL) <i>DNA changes (TUNEL method)</i>	16,2±7,1	23,3±7,3	27,3±9,5	37,2±6,9	6,8±1,6	14,5±3,6*	13,7±5,0	73,5±9,6*
5. Hypodiploidalna zawartość DNA (komórki z obszaru sub G0/G1) <i>Hypodiploid DNA content sub G0/G1</i>	11,7±2,7	11,9±3,3	17,6±2,8	21,7±3,1	4,4±1,3	5,1±1,9	8,6±3,0	38,0±8,1*

Liczba wykonanych doświadczeń taka jak w Tabeli 6, * p<0,025 znamionna różnica w porównaniu z apoptozą spontaniczną.

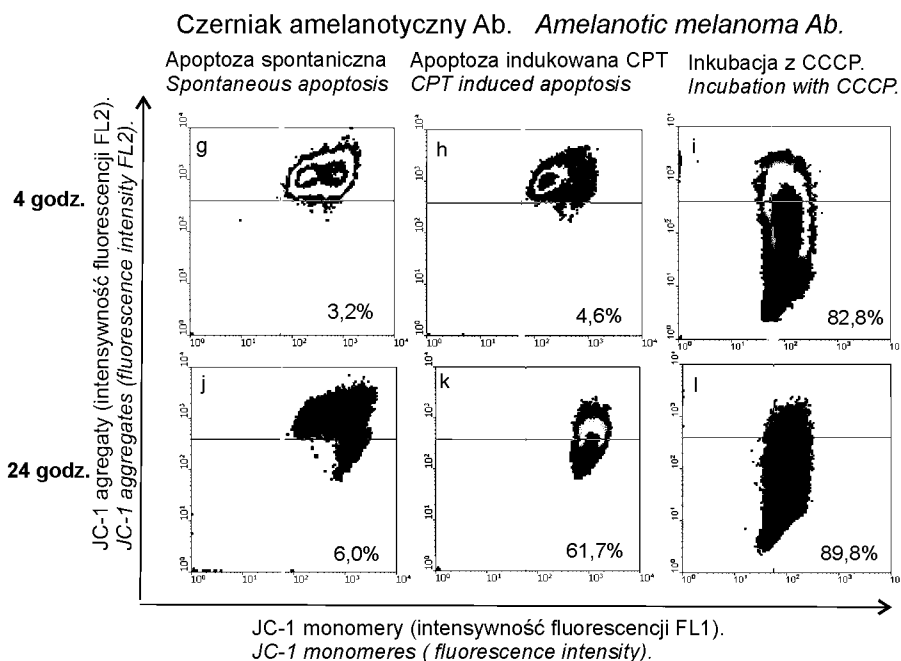
4.2.1. Komórki o obniżonym potencjale transblonowym mitochondriów ($\Delta\Psi$); ocena potencjału transblonowego mitochondriów we wszystkich komórkach

Gdy do hodowli komórek dodawano CPT – induktora apoptozy komórek wielu nowotworów (w tym komórek czerniaka) to po 4 godzinach wśród komórek linii rodzimej Ma liczba komórek o obniżonym $\Delta\Psi$ wzrastała do około 10% (tab. 7 pkt 1, ryc. 6A-b), a wśród komórek linii Ab do 5% (tab. 7 pkt 1, ryc. 6B-h). Dla komórek linii Ab był to wzrost znamieny statystycznie w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez kamptotecyny ($p < 0,025$; tab. 7 pkt. 1).



Ryc. 6A Zmiany zawartości komórek czerniaka melanotycznego (Ma) o obniżonym $\Delta\Psi_m$ (poniżej linii poziomej) w apoptozie indukowanej CPT w porównaniu z apoptozą spontaniczną po 4 i 24 godzinach inkubacji. W kontroli pozytywnej redukcji $\Delta\Psi$ komórki inkubowano z rozprzęgaczem łańcucha oddechowego CCCP (100 μM). Jedno z 7-8 wykonanych doświadczeń.

Fig. 6A. Changes in the percentage of melanotic (Ma) melanoma cells. with low $\Delta\Psi_m$ (lower part of each figure) during CPT-induced apoptosis in comparison to spontaneous apoptosis after 4 and 24 hrs incubation. As a positive control for reduction of $\Delta\Psi$ CCCP (100 μM) was used. Representative results of 7-8 done experiments.

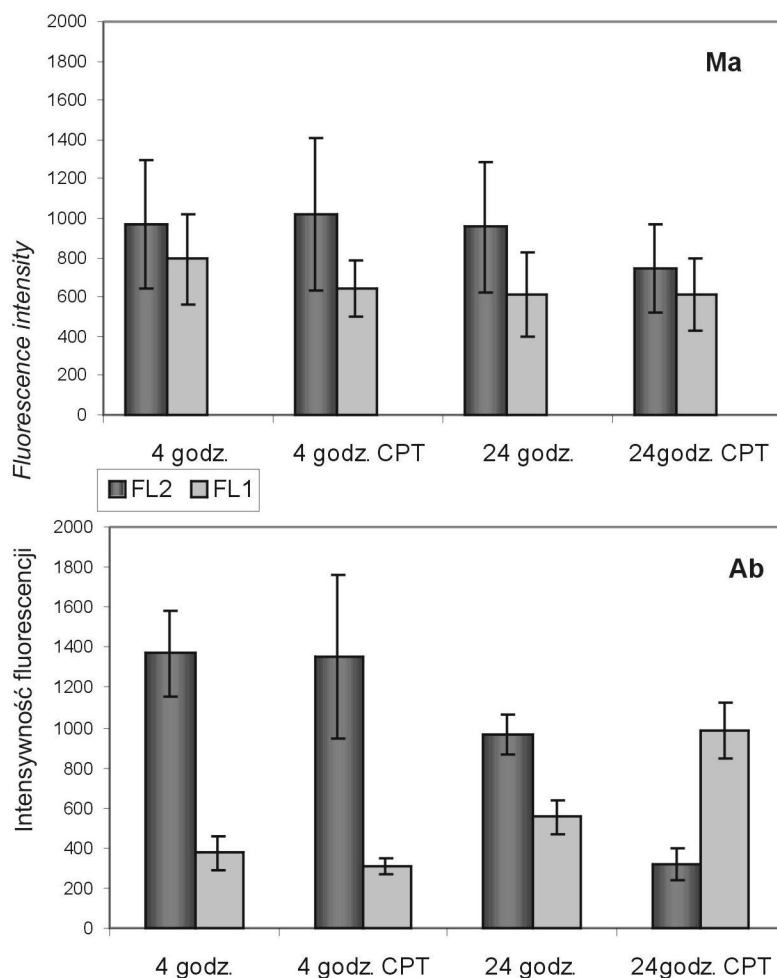


Ryc. 6B. Zmiany zawartości komórek czerniaka amelanotycznego (Ab) o obniżonym $\Delta\Psi$ (poniżej linii poziomej) w apoptozie indukowanej CPT w porównaniu z apoptozą spontaniczną po 4 i 24 godzinach inkubacji. W kontroli pozytywnej redukcji $\Delta\Psi$ komórki inkubowano z CCCP (100 μM). Jedno z 7-8 wykonanych doświadczeń.

Fig. 6B. Changes in the percentage of amelanotic (Ab) melanoma cells with low $\Delta\Psi$ (lower part of each figure) during CPT-induced apoptosis in comparison to spontaneous apoptosis after 4 and 24 hrs incubation. As a positive control for reduction of $\Delta\Psi$ CCCP (100 μM) was used. Representative results of 7-8 done experiments.

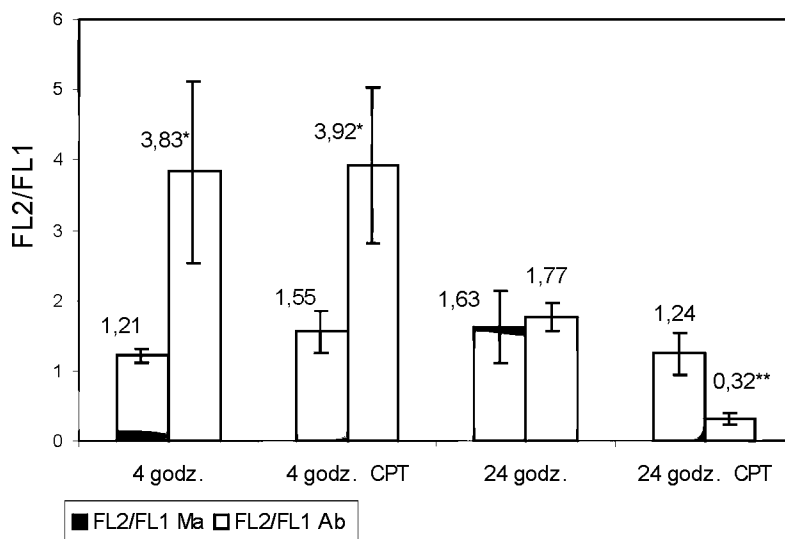
Z przedstawionych na rycinach 6A i 6B wyników jednego z wykonanych doświadczeń, wyraźnie widać, iż w komórkach obu linii czerniaka inkubowanych z CPT, występują komórki o obniżonym $\Delta\Psi$, ale w porównaniu z inkubacją z CCCP – substancją znoszącą potencjał mitochondrialny – w komórkach badanych czerniaków nigdy nie dochodzi do tak dużej utraty $\Delta\Psi$ (ryc. 6A-c, f oraz 6B-i, l). Oznacza to, że choć CPT powoduje obniżenie $\Delta\Psi$, to nie dochodzi do całkowitego spadku wartości $\Delta\Psi$.

We wszystkich komórkach obu linii czerniaka po 4 godzinach inkubacji z CPT nie obserwowano istotnych zmian wartości FL1 i FL2 (ryc. 7A) oraz stosunku FL2/FL1 wyrażającego wyjściową wartość $\Delta\Psi$ (ryc. 7B).



Ryc. 7A. Zmiany fluorescencji JC-1 w mitochondriach wysokospolaryzowanych (FL2) i niskospolaryzowanych (FL1) jako przejaw zmian $\Delta\Psi$ podczas apoptozy indukowanej CPT (4 godz. CPT, 24 godz. CPT) komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) w porównaniu z apoptozą spontaniczną (4 godz., 24 godz.) tych komórek. Wyniki pochodzą z 8 (dla Ma) i 7 (dla Ab) doświadczeń.

Fig. 7A. Changes of JC-1 fluorescence in high polarized (FL2) and low polarized (FL1) mitochondria as an indicator of $\Delta\Psi$ changes in spontaneous (4 godz., 24 godz.) and CPT-induced (4 godz. CPT, 24 godz. CPT) apoptosis among melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells. Results are from 8 for Ma and 7 for Ab line experiments.



Ryc. 7B. Zmiany stosunku FL2/FL1 podczas apoptozy indukowanej CPT (4 godz.CPT, 24 godz.CPT) komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) w porównaniu z apoptozą spontaniczną (4 godz., 24 godz.) tych komórek. Zielona fluorescencja (FL1) odzwierciedla wysokoenergetyczny, a czerwona (FL2) niskoenergetyczny stan mitochondriów w komórkach. Stosunek czerwonej do zielonej fluorescencji przedstawiono jako FL2/FL1. Wyniki pochodzą z 8 (dla Ma) i 7 (dla Ab) doświadczeń. *statystycznie znamienne $p < 0,025$ wyższa wartość FL2/FL1 w komórkach linii Ab w porównaniu z komórkami linii Ma; **statystycznie znamienne $p < 0,025$ obniżenie wartości FL2/FL1 w komórkach linii Ab w porównaniu ze spontaniczną śmiercią.

*Fig. 7B. Changes of the ratio of FL2/FL1 during spontaneous (4 godz., 24 godz) and CPT-induced (4 godz.CPT, 24 godz.CPT) apoptosis among melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells. The green fluorescence (FL1) refers to the JC-1 monomers and the red fluorescence (FL2) correspondence to the formation of JC-1 aggregates. The ratio of red/green fluorescence of JC-1 is depicted as FL2/FL1. Results are from 8 for Ma and 7 for Ab line experiments. *statistically significant higher FL2/FL1 ratio of amelanotic melanoma cells in comparison to native – Ma line; $p < 0.025$; **statistically significant decrease of the FL2/FL1 ratio in comparison to spontaneous apoptosis in Ab melanoma line cells; $p < 0.025$.*

Obserwacje komórek badanych czerniaków po 24 godzinach wykazały, iż wśród komórek linii Ma inkubowanych bez kamptotecyny komórki o obniżonym $\Delta\Psi$ stanowiły około 17%, a po dodaniu CPT liczba ich wzrastała tylko o około 4% (tab. 7 pkt 1; ryc. 6A-e). Towarzyszył temu także spadek stosunku FL2/FL1 z 1,6 do 1,2, ale nadal jego wartość wynosiła powyżej 1 (ryc. 7 B).

Wśród komórek linii Ab inkubowanych z CPT przez 24 godziny, liczba komórek o obniżonym $\Delta\Psi$ wzrosła do prawie 60% ($p < 0,025$; tab. 7 pkt 1, ryc. 6B-k), a stosunek FL2/FL1 obniżył się z 1,77 do wartości 0,3 (ryc. 7B). Wynik istotnego

obniżenia wartości FL2 i wzrostu wartości FL1 (ryc. 7A) w sposób wyraźny ilustruje obniżanie wartości $\Delta\Psi$ w komórkach apoptycznych czerniaka amelanotycznego pod wpływem CPT.

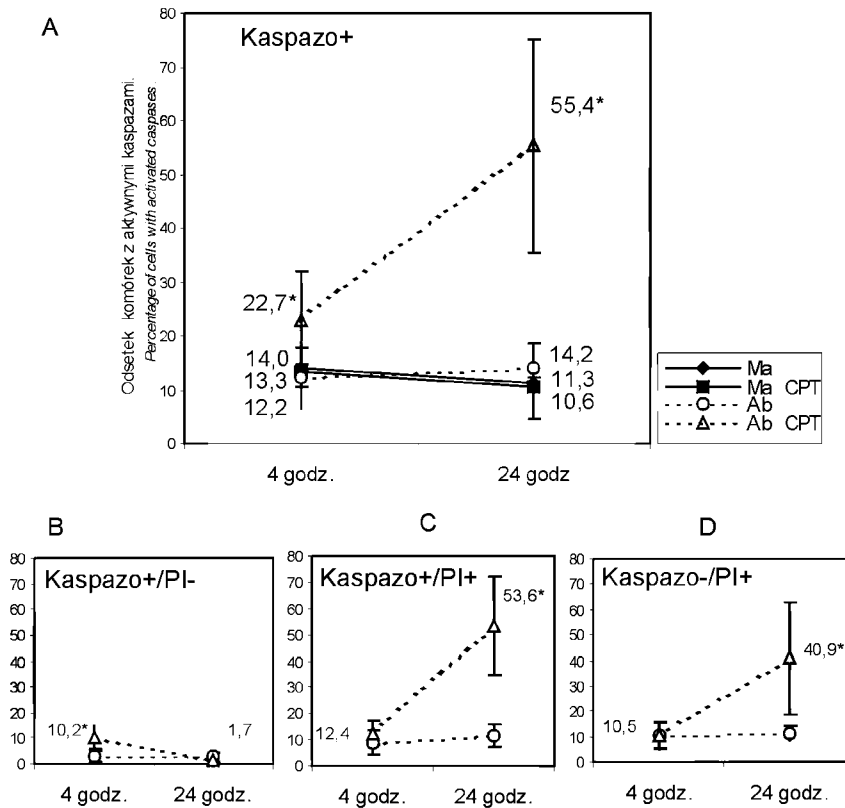
4.2.2. Komórki z aktywnymi kaspazami

4.2.2.1. Zawartość procentowa komórek z aktywnymi kaspazami oceniana metodą cytometryczną

W ciągu 24 godzin obserwacji komórek inkubowanych z CPT stwierdzono wzrost liczby komórek z aktywnymi kaspazami, ale tylko w linii amelanotycznej czerniaka – charakteryzującej się szybszym tempem wzrostu i większą agresywnością w porównaniu z linią melanotyczną (tab. 7 pkt 2, ryc. 8 i 9B).

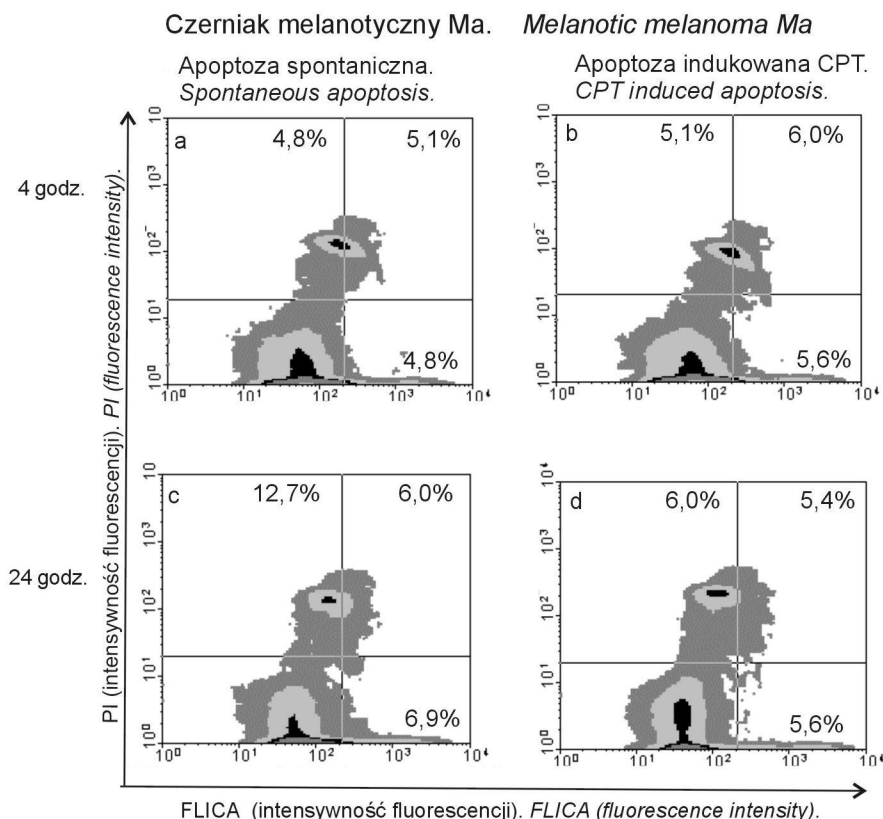
W komórkach czerniaka melanotycznego inkubowanych z CPT liczba komórek z aktywnymi kaspazami była taka jak w hodowli bez CPT (tab. 7 pkt 2.1; ryc. 8A i 9A).

Natomiast w komórkach linii amelanotycznej już po 4 godzinach od dodania do hodowli CPT zaobserwowano wzrost o około 10% komórek z aktywnymi kaspazami w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez CPT i wartość ta po 24 godzinach wzrastała do 55%. (tab. 7 pkt 2.1; ryc. 8A). Wśród komórek czerniaka amelanotycznego wykazujących aktywność kaspaz, po 4 godzinach inkubacji z CPT wzrasta liczba komórek wczesnoapoptycznych (kaspazo+/PI-) (ryc. 8B i 9B-f), zaś po 24 godzinach – późnoapoptycznych (kaspazo+/PI+) (ryc. 8C i 9B-h; tab. 7 pkt 2.3). Jednocześnie prawie 40% komórek tego czerniaka po tym czasie nie wykazywało już aktywności kaspaz, ale barwiło się PI, były to komórki w końcowym stadium apoptozy (kaspazo-/PI+; tab. 7 pkt 2.4; ryc. 8D, ryc. 9-h).



Ryc. 8. Procentowa zawartość komórek z aktywnymi kaspazami (kaspazo+; A) oraz populacji komórek: kaspazo+/PI- (B); kaspazo+/PI+ (C); kaspazo-/PI+ (D) wśród komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) po 4 i 24 godzinach inkubacji z CPT. Wyniki pochodzą z 4 (dla Ma) i 7 (dla Ab) doświadczeń. *statystycznie znamieny $p < 0,025$ wzrost po inkubacji z CPT.

Fig. 8. Percentage of all cells with caspase activity (kaspazo+; A) and populations of cells: early apoptotic (kaspazo+/PI-; B), late apoptotic (kaspazo+/PI+; C), in the final stage of apoptosis (kaspazo-/PI+; D) in melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma line after 4 and 24 hrs incubation with CPT. Data are from 4 (for Ma) and 7 (for Ab) experiments. *significant increase after incubation with CPT; $p < 0.025$.



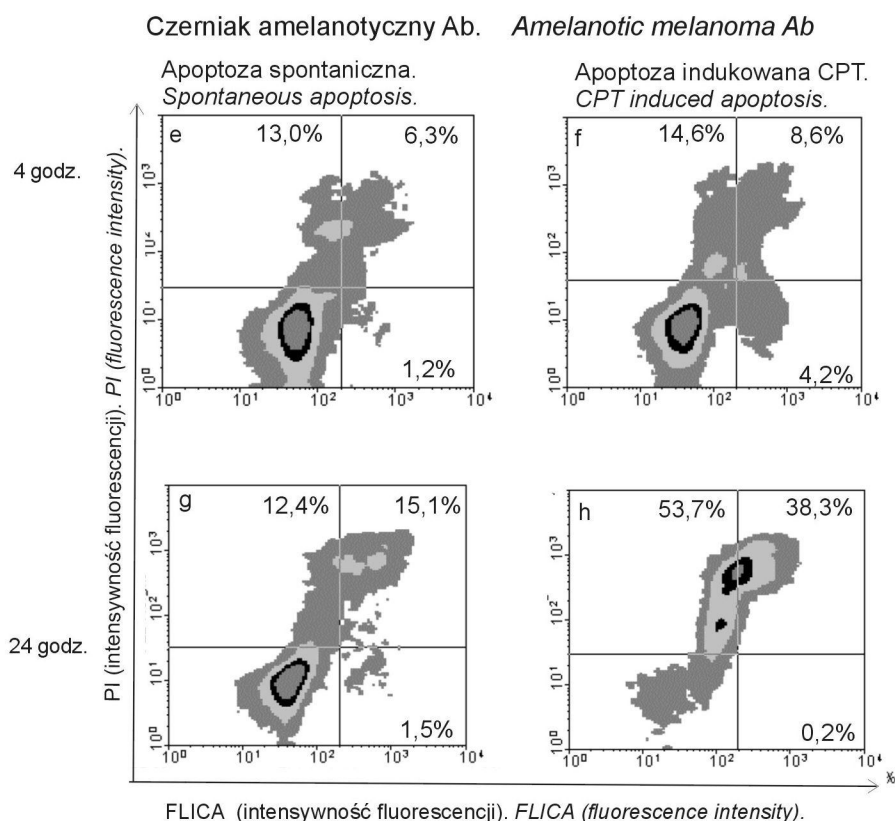
Ryc. 9A. Oznaczenia cytometryczne komórek z aktywnymi kaspazami podczas spontanicznej i indukowanej CPT apoptozy komórek czerniaka melanotycznego (Ma) po 4 i 24 godzinach inkubacji. Jedno z 4 wykonanych doświadczeń.

Populacje komórek lokalizujące się w obszarze:

dolnym lewym	kaspazo-/PI-	komórki żywe
dolnym prawym	kaspazo+/PI-	komórki wczesnoapoptyczne
górnym prawym	kaspazo+/PI+	komórki późnoapoptyczne
górnym lewym	kaspazo-/PI+	komórki w końcowym stadium apoptozy

Fig. 9A. Flow cytometry analysis of cells with active caspases in spontaneous and CPT-induced apoptosis of melanotic (*Ma*) melanoma cells after 4 and 24 hrs incubation. Density plots of representative results for 4 experiments. Each plot is divided into identical quadrants containig:

lower left	caspase-/PI-	alive cells
lower right	caspase+/PI-	early apoptotic cells
upper right	caspase+/PI+	late apoptotic cells
upper left	caspase-/PI+	cells in the final stage of apoptosis



Ryc. 9B. Oznaczenia cytometryczne komórek z aktywnymi kaspazami podczas spontanicznej i indukowanej CPT apoptozy komórek czerniaka amelanotycznego (Ab) po 4 i 24 godzinach inkubacji. Jedno z 7 wykonanych doświadczeń.

Populacje komórek lokalizujące się w obszarze:

dolnym lewym	kaspazo-/PI-	komórki żywe
dolnym prawym	kaspazo+/PI-	komórki wczesnoapoptyczne
górnym prawym	kaspazo+/PI+	komórki późnoapoptyczne
górnym lewym	kaspazo-/PI+	komórki w końcowym stadium apoptozy

Fig. 9B. Flow cytometry analysis of cells with active caspases during spontaneous and CPT-induced apoptosis of amelanotic (Ab) melanoma cells after 4 and 24 hrs incubation. Density plots of representative results for 7 experiments. Each plot is divided into identical quadrants containig:

lower left	caspase-/PI-	alive cells
lower right	caspase+/PI-	early apoptotic cells
upper right	caspase+/PI+	late apoptotic cells
upper left	caspase-/PI+	cells in the final stage of apoptosis

Po 24 godz. inkubacji wśród komórek czerniaka amelanotycznego obserwowano również wyraźne obniżenie parametru FSC (określającego wielkość komórek), co świadczy o obkurczeniu komórek (obrazy nie pokazane), zjawisku charakterystycznym dla zachodzącego procesu apoptozy.

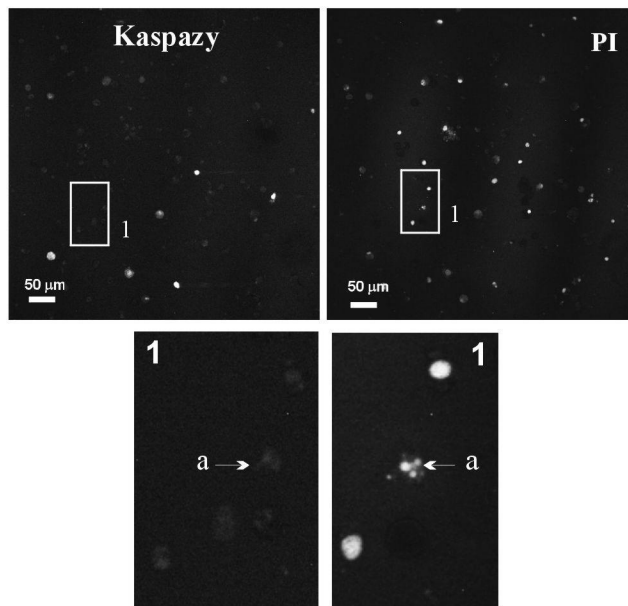
Powyższe obserwacje z cytometru przepływowego wskazują, że CPT powoduje śmierć komórek czerniaka amelanotycznego drogą apoptozy z udziałem kaspaz. Natomiast w komórkach linii rodzimej CPT nie powodowała aktywacji kaspaz.

4.2.2.2. Obraz w mikroskopie konfokalnym komórek inkubowanych z CPT

Na rycinach: 10A i 10B przedstawiono obrazy z mikroskopu konfokalnego komórek obu linii czerniaka po 24 godzinach inkubacji z CPT, które odzwierciedlają stwierdzone w cytometrze przepływowym różnicowanie komórek pod względem aktywności kaspaz.

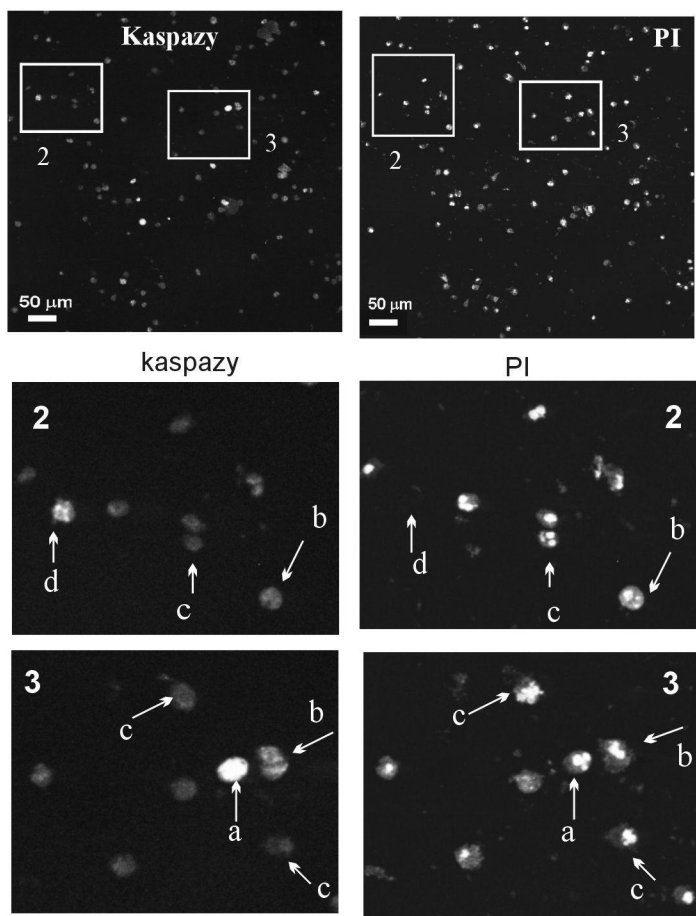
Wśród komórek czerniaka melanotycznego widać pojedyncze komórki z aktywnymi kaspazami (ryc. 10A), a na szczególną uwagę zasługuje obraz komórki z wyraźnymi zmianami apoptycznymi w chromatynie bez widocznej aktywacji kaspaz (ryc. 10A 1a).

Wśród komórek linii Ab (ryc. 10B), przeważają komórki wykazujące aktywność kaspaz {choć są tu komórki silniej (3a) i słabiej świecące (2b, 3b)} oraz wyraźne zmiany apoptyczne w chromatynie (3a, 3b, 2b), co wskazuje, że są to komórki kaspazo+/PI+. Można również zobaczyć komórki silnie barwiące się jodkiem propidyny przy braku aktywności kaspaz (3c) – były to komórki kaspazo-/PI+. Godna uwagi jest komórka oznaczona jako 2d, która po 24 godzinach inkubacji z CPT wykazuje aktywność kaspaz bez oznak zmian w chromatynie – komórka kaspazo+/PI-. Wyniki te wskazują, iż po 24 godzinach działania CPT na komórki linii amelanotycznej przeważają komórki kaspazo+/PI+, co jest zgodne z wynikami z cytometru przepływowego.

Czerniak melanotyczny Ma. *Melanotic melanoma Ma.*

Ryc. 10A. Komórki czerniaka melanotycznego (Ma) z aktywnymi kaspazami po 24 godzinach inkubacji z CPT oglądane w mikroskopie konfokalnym. Komórki z aktywnymi kaspazami (Kaspazy) oraz barwiące się jodkiem propidyny (PI) zaznaczono strzałkami. Skala 50 μm . 1a – zmiany w chromatynie i brak aktywacji kaspaz (kaspazo-/PI+).

Fig. 10A. Confocal microscope images of melanotic (Ma) melanoma cells stained for active caspases (Kaspazy) and with propidium iodide (PI) after 24 hrs incubation with CPT. Arrows point of cells with caspase activity (on the images named „Kaspazy”) or characteristic apoptotic changes in DNA (on the images named „PI”). Scale bar 50 μm . 1a – chromatin changes without caspases activity (kaspazo-/PI+).

Czerniak amelanotyczny Ab. *Amelanotic melanoma Ab.*

Ryc. 10B. Komórki czerniaka amelanotycznego (Ab) z aktywnymi kaspazami po 24 godzinach inkubacji z CPT oglądane w mikroskopie konfokalnym. Komórki z aktywnymi kaspazami (Kaspazy) oraz barwiące się jodkiem propidyny (PI) zaznaczono strzałkami. Skala 50 μm . Komórki: 2d wczesnoapoptyczne (kaspazo+/PI-); 3a-b i 2b: późnoapoptyczne (kaspazo+/PI+); 3c w końcowej fazie apoptozy (kaspazo-/PI+).

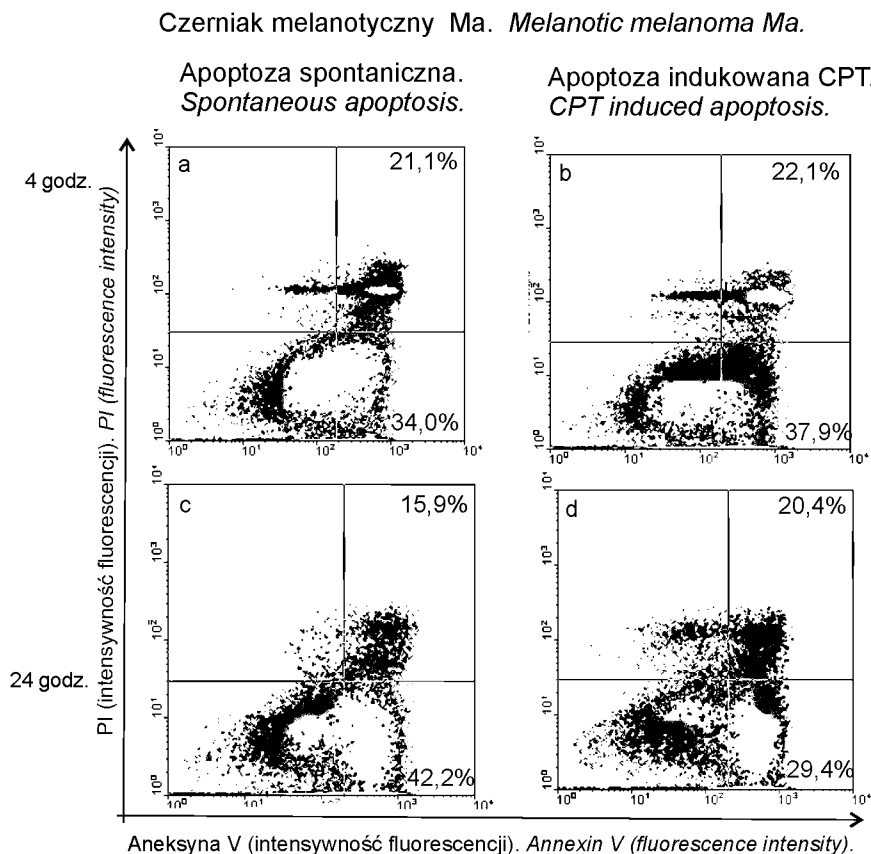
Fig. 10B. Confocal microscope images of amelanotic (Ab) melanoma cells stained for active caspases (Kaspazy) and with propidium iodide (PI) after 24 hrs incubation with CPT. Arrows point of cells with caspase activity (on the images named „Kaspazy”) or characteristic apoptotic changes in DNA (on the images named „PI”). Scale bar 50 μm . Cells: early apoptotic: 2d; late apoptotic: 3a-b, 2b; in the final stage of apoptosis: 3c.

4.2.3. Komórki ze zmianami w błonie komórkowej (eksternalizacja fosfatydyloseryny)

Inkubacja komórek czerniaka melanotycznego z CPT zarówno po 4 jak i 24 godzinach, nie powodowała znaczących wyżej wymienionych zmian w błonie komórkowej w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez CPT (tab. 7 pkt.3.1 i 3.2, ryc. 11A: a-d).

Natomiast w tych samych warunkach komórki czerniaka amelanotycznego po 24 godzinach inkubacji z CPT wykazywały znamienny wzrost (do 77%) komórek An+/PI+ wykazujących późnoapoptyczne zmiany w błonie komórkowej (tab.7 pkt.3.2, ryc. 11B-h), co oznacza, iż po 24 godzinach działania CPT, poza eksternalizacją fosfatydyloseryny dochodzi do dalszych zmian w błonie komórkowej charakteryzujących się wzrostem jej przepuszczalności dla PI.

Obraz komórek obu linii czerniaka z populacji An+/PI- (wczesnoapoptycznych) oraz An+/PI+ (późnoapoptycznych) w mikroskopie konfokalnym przedstawiony na rycinie 12 potwierdza obserwacje z cytometru przepływowego.



Ryc. 11A. Zmiany zawartości komórek z eksternalizacją fosfatydyloseryny w apoptozie indukowanej CPT w porównaniu z apoptozą spontaniczną po 4 i 24 godzinach inkubacji komórek czerniaka melanotycznego (Ma) w ocenie cytometrycznej. Jedno z 6 wykonanych doświadczeń.

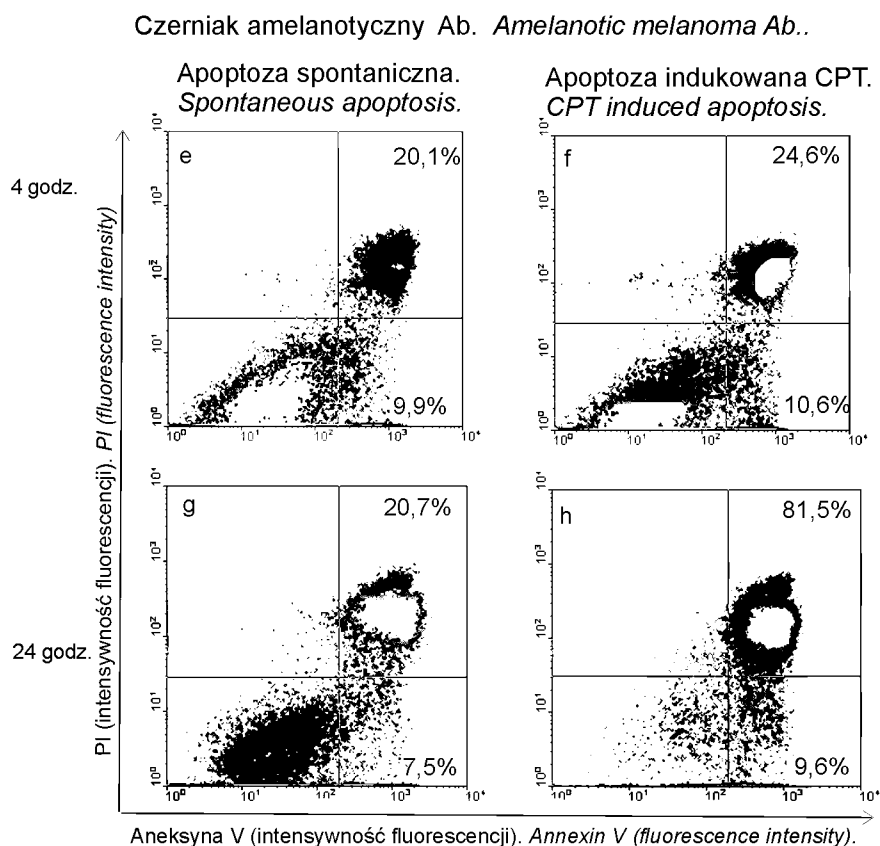
Populacje komórek lokalizujące się w obszarze:

dolnym lewym	An-/PI-	komórki żywe
dolnym prawym	An+/PI-	komórki wczesnoapoptyczne
górnym prawym	An+/PI+	komórki późnoapoptyczne

Fig. 11A. Cytometric analysis of cells with externalized phosphatidylserine among melanotic (Ma) melanoma cells incubated with CPT for 4 and 24 hrs. One of 6 done experiments.

Each plot is divided into identical quadrants containig:

Lower left	An-/PI-	alive cells
Lower right	An+/PI-	early apoptotic cells
Upper right	An+/PI+	late apoptotic cells



Ryc. 11B. Zmiany zawartości komórek z eksternalizacją fosfatydyloseryny w apoptozie indukowanej CPT w porównaniu z apoptozą spontaniczną po 4 i 24 godzinach inkubacji komórek czerniaka amelanotycznego (Ab) w ocenie cytometrycznej. Jedno z 6 wykonanych doświadczeń.

Populacje komórek lokalizujące się w obszarze:

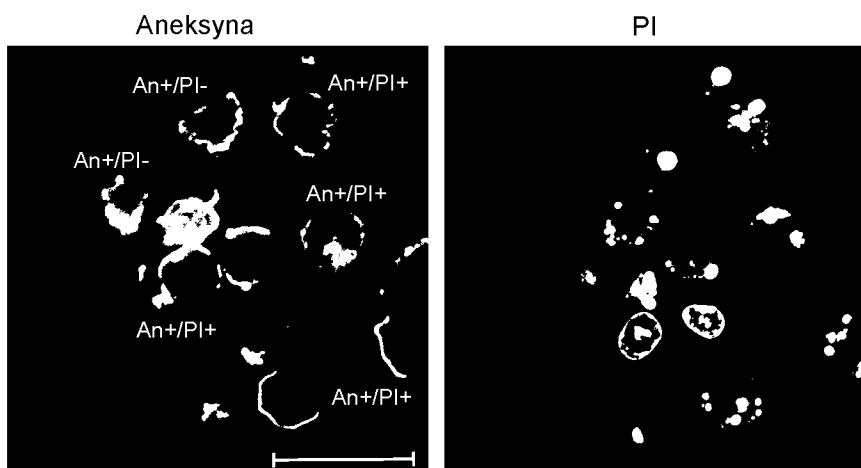
dolnym lewym	An-/PI-	komórki żywe
dolnym prawym	An+/PI-	komórki wczesnoapoptyczne
górnym prawym	An+/PI+	komórki późnoapoptyczne

Fig. 11B. Cytometric analysis of cells with externalized phosphatidylserine among amelanotic (Ab) melanoma cells incubated with CPT for 4 and 24 hrs. One of 6 done experiments.

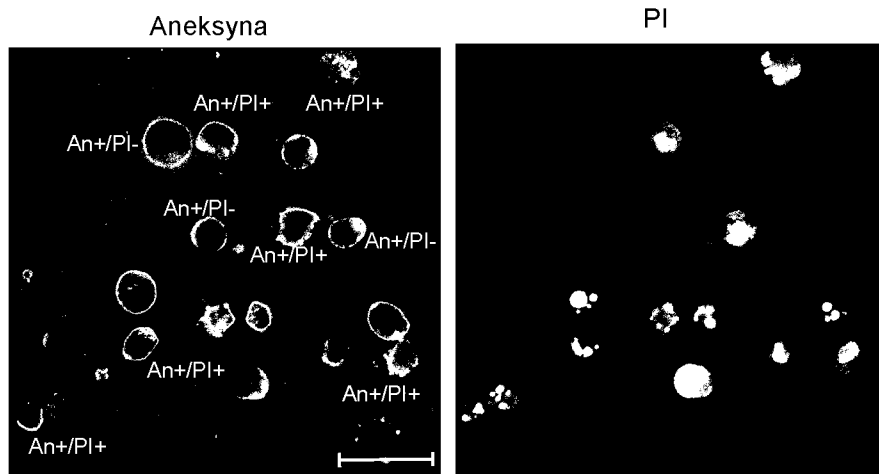
Each plot is divided into identical quadrants containig:

Lower left	An-/PI-	nonapoptotic cells
Lower right	An+/PI-	early apoptotic cells
Upper right	An+/PI+	late apoptotic cells

A. Czerniak melanotyczny Ma.

Melanotic melanoma Ma

B. Czerniak amelanotyczny Ab.

Amelanotic melanoma Ab.

Ryc. 12. Komórki wczesnoapoptyczne (An+/PI-) oraz późnoapoptyczne (An+/PI+) wśród komórek czerniaka melanotycznego (Ma; A) i amelanotycznego (Ab; B) w apoptozie indukowanej CPT po 24 godzinach inkubacji oglądane w mikroskopie konfokalnym. Skala 50 μm .

Fig. 12. Early apoptotic (An+/PI-) and late apoptotic (An+/PI+) melanotic (Ma; A) and amelanotic (Ab; B) melanoma cells in CPT – induced apoptosis after 24 hrs incubation in the confocal microscope. Scale bar 50 μm .

4.2.4. Komórki wykazujące pęknięcia nici DNA wykrywane metodą TUNEL

Przeprowadzone oznaczenia wykazały, że po 4 godzinach inkubacji z CPT około 23% komórek linii Ma i 15% wśród komórek linii Ab stanowiły komórki TUNEL-pozytywne (tab. 7 pkt 4). Po 24 godzinach inkubacji w obu liniach wzrasta zawartość komórek TUNEL-pozytywnych, ale w linii Ma tylko do 37%, zaś w linii Ab aż do 74% (tab. 7 pkt 4). Zatem, pod wpływem CPT w komórkach obu linii pojawiają się pęknięcia DNA uznawane za apoptyczne zmiany w chromatynie, ale jak widać dotyczą one różnej liczby komórek.

4.2.5. Komórki o obniżonej zawartości DNA (komórki lokalizujące się w obszarze sub G0/G1)

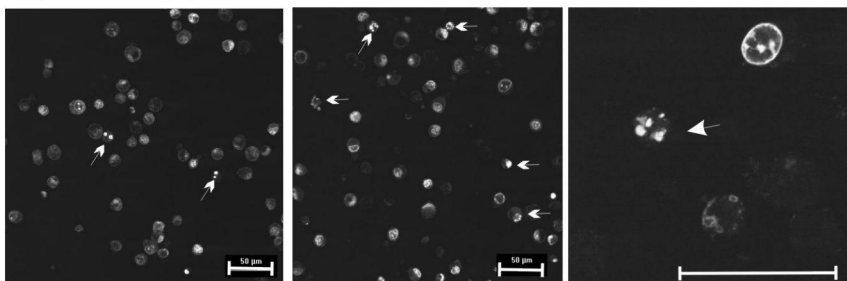
Komórki linii Ma po inkubacji z CPT nie wykazują znaczących zmian w liczbie komórek z obniżoną zawartością DNA. Natomiast w komórkach linii Ab po 24 godzinach działania CPT stwierdzono wyraźny wzrost odsetka tych komórek do około 38% (tab. 7 pkt 5).

Morfologicznym potwierdzeniem apoptycznych zmian w DNA opisanych powyżej w punktach 4.2.4 i 4.2.5 jest obraz w mikroskopie konfokalnym komórek obu linii czerniaka z widoczną kondensacją chromatyny i jej rozpadem na ciała apoptyczne przedstawiony na rycinach 13.A i 13.B. Zwracają tu uwagę wyraźne apoptyczne zmiany w DNA komórek linii Ab po inkubacji z CPT w porównaniu z apoptozą spontaniczną (ryc. 13B).

A. Czerniak melanotyczny Ma. *Melanotic melanoma Ma.*

Apoptoza spontaniczna.
Spontaneous apoptosis.

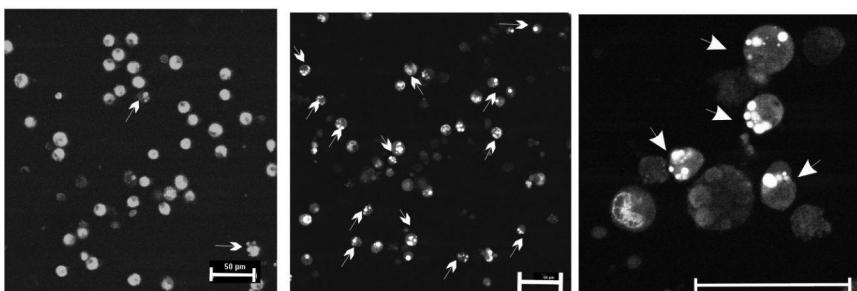
Apoptoza indukowana CPT. *CPT induced apoptosis.*



B. Czerniak amelanotyczny Ab. *Amelanotic melanoma Ab.*

Apoptoza spontaniczna.
Spontaneous apoptosis.

Apoptoza indukowana CPT. *CPT induced apoptosis.*



Ryc. 13. Apoptyczne komórki czerniaka melanotycznego (Ma; A) i amelanotycznego (Ab; B) po 24 godzinach inkubacji z CPT barwione AO – widoczna kondensacja chromatyny i rozpad na ciała apoptyczne (komórki oznaczone strzałkami). Skala 50 μm .

Fig. 13 Apoptotic cells of melanotic (Ma; A) and amelanotic (Ab; B) melanoma cells after 24 hrs incubation with CPT stained by AO to show chromatin condensation and apoptotic bodies (cells pointed of by arrows). Scale bar 50 μm .

W podsumowaniu obserwowanych zmian apoptycznych wywoływanych przez CPT opisanych powyżej w punkcie 4.2, można stwierdzić, iż komórki czerniaka amelanotycznego wykazują zdecydowanie wyższą wrażliwość na działanie tej substancji w porównaniu z komórkami czerniaka melanotycznego. Już po 4 godzinach inkubacji z CPT zaobserwowano znamienne wzrost odsetka komórek z obniżonym potencjałem transbłonowym mitochondriów oraz z aktywnymi kaspazami, ale jeszcze bez zmian w błonie komórkowej (cechy komórek we wczesnej apoptozie), przy jednoczesnym wzroście liczby komórek z apoptycznymi pęknięciami nici DNA.

Natomiast po wydłużeniu do 24 godzin inkubacji z CPT ponad 70% stanowiły komórki z późnoapoptycznymi zmianami w błonie komórkowej i pęknięciami DNA, ponad 50% komórki z obniżonym potencjałem transbłonowym mitochondrów i z aktywnymi kaspazami oraz 40% komórki nie wykazujące już aktywności kaspaz i z obniżoną zawartością DNA.

4.3. Dynamika procesu apoptozy oznaczana poprzez zmiany zawartości wczesno- i późnoapoptycznych komórek

Wobec opisanych w poprzednim punkcie zmian, które po 4 godzinach miały głównie charakter zmian wczesnoapoptycznych, a po 24 godzinach późnoapoptycznych, postanowiono ocenić dynamikę apoptozy pod wpływem CPT w porównaniu z apoptozą spontaniczną w komórkach obu linii.

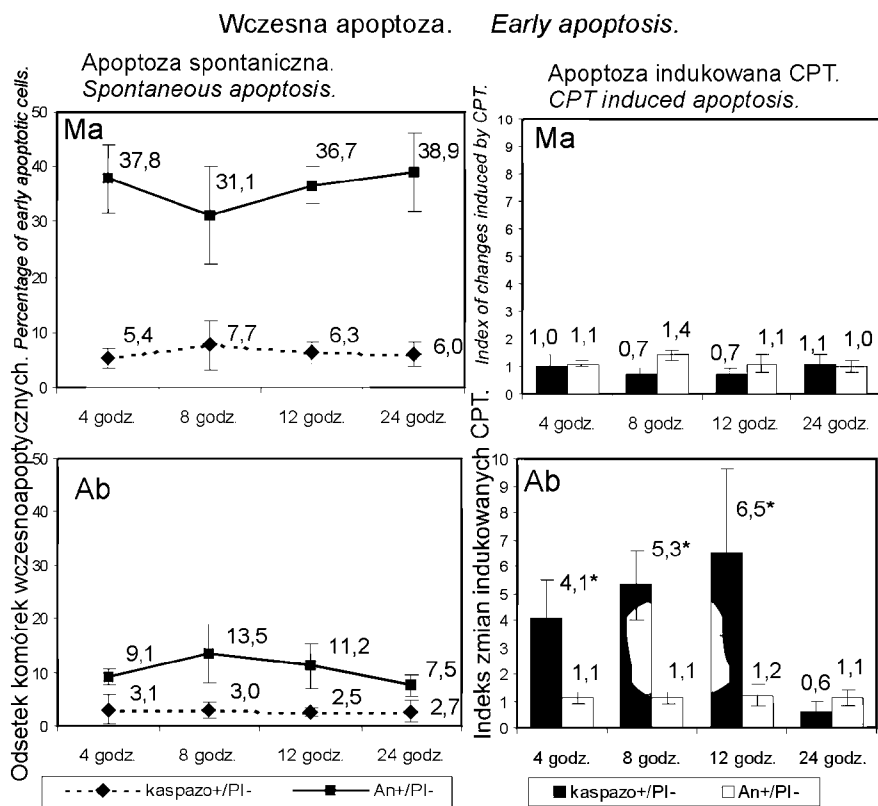
Test FLICA identyfikujący aktywne kaspazy oraz test z użyciem aneksyny V oceniający eksternalizację fosfatydyloseryny, przy jednoczesnym barwieniu jodkiem propidyny (PI; uszkodzenie błony pozwalające przenikać PI do komórki) pozwalają na wyróżnienie komórek:

- wczesnoapoptycznych (kaspazo+/PI–, An+/PI–)
- późnoapoptycznych (kaspazo+/PI+; kaspazo–/PI+; An+/PI+)

W związku z powyższym oceniając odsetek komórek wczesno- i późnoapoptycznych po 4, 8, 12 i 24 godzinach inkubacji bez oraz w obecności CPT uzyskano dane dotyczące dynamiki przebiegu apoptozy w komórkach badanych czerniaków. Wyniki wykonanych oznaczeń przedstawiono na rycinach 14A i 14B oraz w tabeli 7.

4.3.1. Dynamika apoptozy spontanicznej

W ciągu 24 godzin obserwacji komórki wczesnoapoptyczne An+/PI– wśród komórek linii Ma stanowiły ponad 30%, przy około 6% zawartości komórek kaspazo+/PI– (ryc. 14A). Natomiast wśród komórek linii amelanotycznej komórki z eksternalizacją fosfatydyloseryny stanowiły około 9% (z niewielkim wzrostem do około 14% po 8 godzinach), przy prawie 3% zawartości komórek kaspazo+/PI– (ryc. 14A).

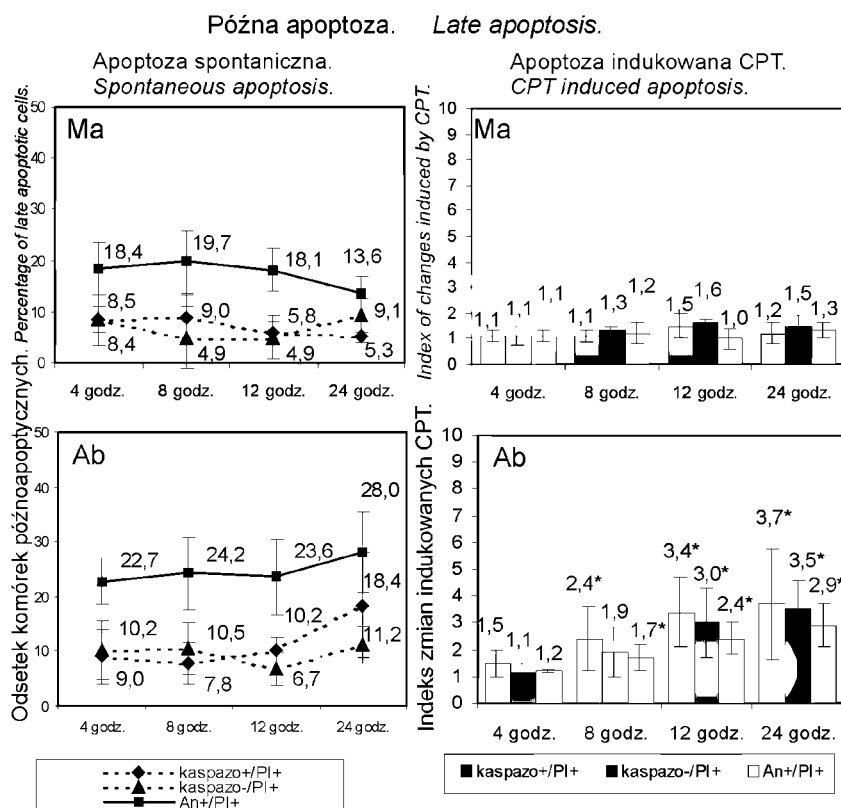


Ryc. 14A. Dynamika procesu apoptozy – zmiany wczesnoapoptyczne (kaspazo+/PI-, An+/PI-) w ciągu 4, 8, 12 i 24 godzin inkubacji komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab). Wyniki pochodzą z 4-6 (dla Ma) i 6-7 (dla Ab) doświadczeń. *statystycznie istotne $p < 0,012$ zmiany po inkubacji z CPT w porównaniu z apoptozą spontaniczną.

Fig. 14A. Dynamic of apoptosis – the early apoptotic changes (kaspazo+/PI-, An+/PI-) after 4, 8, 12 and 24 hrs of melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells incubation. Results are from 4-6 (for Ma) and 6-7 (for Ab) experiments. *statistically significant $p < 0.012$ changes after incubation with CPT in comparison to spontaneous apoptosis.

Komórki późnoapoptyczne An+/PI+ w linii Ma stanowiły od 14 do 18% i nie wykazywały istotnych zmian zawartości w ciągu 24 godzin inkubacji, przy od 5 do 8% zawartości komórek kaspazo+/PI+ (ryc. 14B).

Wśród komórek linii Ab obserwowano tendencję do wzrostu komórek An+/PI+ o 5% oraz kaspazo+/PI+ o 8% po 24 godzinach inkubacji (ryc. 14B).



Ryc. 14B. Dynamika procesu apoptozy – zmiany późnoapoptyczne (kaspazo+/PI+, An+/PI+) w ciągu 4, 8, 12 i 24 godzin inkubacji komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab). Wyniki pochodzą z 4-6 (dla Ma) i 6-7 (dla Ab) doświadczeń. *statystycznie znamienne $p < 0,012$ zmiany w porównaniu z apoptozą spontaniczną.

Fig. 14B. Dynamic of apoptosis – the late apoptotic changes (kaspazo+/PI+, An+/PI+) after 4, 8, 12 and 24 hrs of melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells incubation. Results are from 4-6 (for Ma) and 6-7 (for Ab) experiments. *statistically significant $p < 0.012$ changes after incubation with CPT in comparison to spontaneous apoptosis.

Zatem wśród komórek linii Ma obserwowano znamienne wyższy odsetek komórek ze zmianami wczesnoapoptycznymi (kaspazo+/An+/PI–), w porównaniu z linią Ab (ryc. 14), ale w ciągu 24 godzin prowadzenia obserwacji liczba tych komórek w obu liniach nie zmieniała się.

Natomiast odsetek komórek późnoapoptycznych (kaspazo+/An+/PI+) w obu liniach w ciągu pierwszych 12 godzin inkubacji był podobny, jednak po tym czasie obserwowano tendencję do wzrostu liczby późnoapoptycznych komórek w czerniaku amelanotycznym (ryc. 14B); może to wskazywać, iż apoptoza spontaniczna (na etapie aktywacji kaspaz i zmian w błonie plazmatycznej) w komórkach tej linii przebiega szybciej niż w komórkach linii Ma.

Komórki znajdujące się w finalnej fazie apoptozy: kaspazo–/PI+ w obu liniach stanowiły około 10% i podczas 24 godzin obserwacji ich zawartość nie zmieniała się.

4.3.2. Dynamika apoptozy indukowanej przez CPT

Wzrost zawartości komórek wczesno- (kaspazo+/PI–, An+/PI–) i późnoapoptycznych (kaspazo+/PI+, kaspazo–/PI+, An+/PI+) pod wpływem CPT przedstawiono na rycinach: 14A i 14B, jako indeks zmian indukowanych CPT (indeks obliczono dzieląc procent komórek inkubowanych z CPT przez procent komórek inkubowanych bez CPT).

Inkubacja komórek czerniaka melanotycznego z CPT nie zmieniała zawartości komórek wczesnoapoptycznych – wartości indeksu zmian wynosiły około 1 (ryc. 14A). Natomiast wśród komórek późnoapoptycznych zauważono tendencję do wzrostu liczby komórek kaspazo–/PI+ po 8, 12 i 24 godzinach inkubacji z CPT (indeks zmian wynosił odpowiednio: 1,3; 1,6; 1,5; ryc. 14B) przy nie zmieniającej się liczbie komórek kaspazo+/PI+ oraz An+/PI+ (ryc. 14B).

W przeciwieństwie do komórek linii Ma, wśród komórek linii Ab już po 4 godzinach inkubacji z CPT trzykrotnie wzrastała liczba komórek kaspazo+/PI– (indeks 4,1), a po 12 godzinach ponad pięciokrotnie (indeks 6,5) w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez CPT (ryc. 14A, $p < 0,012$). Natomiast po 24 godzinach inkubacji z CPT komórek kaspazo+/PI– było mniej niż w apoptozie spontanicznej (indeks 0,6) (ryc. 14A). W tym samym czasie nie obserwowano zmian w liczbie komórek z wczesnoapoptycznymi zmianami w błonie komórkowej An+/PI– (ryc. 14A).

Wartość indeksu zmian dla komórek późnoapoptycznych – kaspazo+/PI+ dopiero po 24 godzinach (3,7) była zbliżona do wartości obserwowanej dla komórek wczesnoapoptycznych już po 4 godzinach (4,1).

Liczba komórek kaspazo–/PI+, uznanych za komórki w finalnym stadium apoptozy, wzrastała w podobnym tempie, jak komórek kaspazo+/PI+ i po 24 godzinach było ich ponad dwukrotnie (indeks 3,5) więcej w porównaniu z apoptozą spontaniczną (ryc. 14B).

Wzrostowi odsetka komórek z aktywnymi kaspazami towarzyszył wzrost komórek An+/PI+, ale wartości indeksu zmian w błonie komórkowej były niższe niż dla zmian aktywacji kaspaz (ryc. 14B). Oznacza to, iż aktywacja kaspaz wyprzedza eksternalizację fosfatydyloseryny w czasie apoptozy komórek czerniaka amelanotycznego indukowanej CPT.

W podsumowaniu oceny dynamiki zmian apoptycznych indukowanych przez CPT w komórkach linii amelanotycznej stwierdzono, iż w ciągu pierwszych 12 godzin CPT indukuje aktywację kaspaz i znamienny wzrost zawartości komórek wczesnoapoptycznych: kaspazo+/PI- (indeks od 4,1 do 6,5); po 8 godzinach wzrasta liczba komórek późnoapoptycznych: kaspazo+/PI+, które po 24 godzinach już dominują wśród komórek linii Ab. Po 24 godzinach inkubacji z CPT wśród komórek linii Ab około 40% stanowią komórki martwe nie wykazujące już aktywności kaspaz (kaspazo-/PI+), pozostałe ponad 50% to głównie komórki kaspazo+/PI+. Spośród tych komórek około 80% to komórki wykazujące również późnoapoptyczne zmiany w błonie komórkowej An+/PI+.

4.4. Analiza zawartości komórek w poszczególnych fazach cyklu oraz ocena z jakiej fazy cyklu komórkowego pochodzą komórki ginące na drodze spontanicznej i indukowanej CPT apoptozy

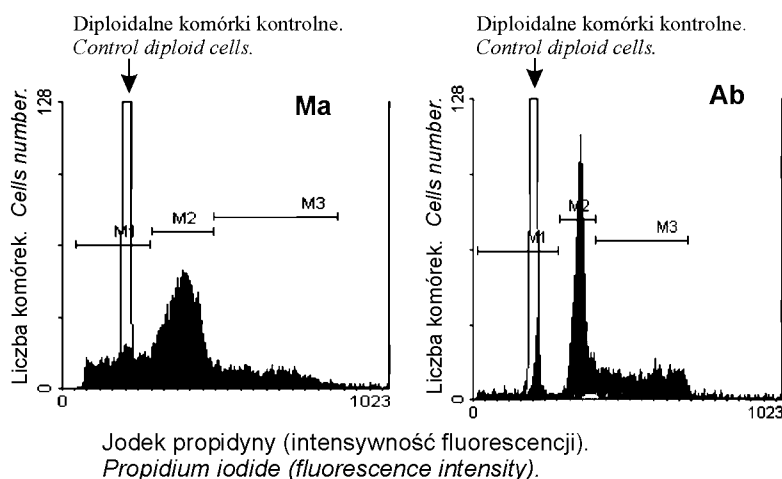
Opisana w punktach 4.1.4 i 4.2.4 analiza komórek TUNEL-pozytywnych wykazała wyższą ich liczbę wśród komórek linii Ma w porównaniu z linią Ab oraz znaczący wzrost liczby tych komórek po indukcji apoptozy przez CPT, szczególnie w linii Ab. W związku z tymi obserwacjami postanowiono przeanalizować z jakich faz cyklu pochodzą komórki ulegające apoptozie spontanicznej, jak i indukowanej kamptotecyną. W tym celu wykorzystano metodę TUNEL do barwienia apoptycznych pęknięć DNA wraz z jednoczesną oceną ilości DNA w komórkach przy pomocy barwienia jodkiem propidyny (PI).

4.4.1. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu wśród komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego

Oceniana cytofotometrycznie zawartość DNA w komórkach linii Ma wykazała, iż łączna liczba komórek w fazach S i G2/M wynosiła około 30% i była znamienne niższa w porównaniu z mniej zróżnicowaną, ale szybciej rosnącą linią Ab, gdzie prawie 40% komórek było w fazach S i G2/M (tab. 8, $p < 0,025$; M3 na ryc. 15).

W wolniej rosnącej, bardziej zróżnicowanej linii Ma 50% komórek znajdowało się w fazie G0/G1, zaś w linii Ab komórki takie stanowiły około 55% (tab. 8, M2 na ryc. 15).

Na histogramach przedstawiających zawartość DNA w komórkach, widoczne są również komórki o obniżonej zawartości DNA – zlokalizowane poniżej fazy G0/G1 (ryc. 15 M1). Obszar ten określany jako sub G0/G1 zawiera komórki apoptyczne w końcowej fazie apoptozy- na etapie rozpadu na ciała apoptyczne, dlatego ich zawartość została przedstawiona w punktach 4.1.5 i 4.2.5 jako jeden z elementów oceny liczby komórek ginących drogą apoptozy spontanicznej i indukowanej CPT.



Ryc. 15. Przykładowe histogramy oznaczeń cytometrycznych ilości DNA w celu określenia zawartości komórek w poszczególnych fazach cyklu komórek czerniaka melanicznego (Ma) i amelanotycznego (Ab). Komórki w sub G0/G1 reprezentują m.in. komórki apoptyczne wykazujące hypodiploidalną zawartość DNA (fragmentację DNA). Komórki ze śledziony chomika wykorzystano jako komórki z diploidalną zawartością DNA. Jedno z 7 wykonanych doświadczeń.

M1 komórki w sub G0/G1; M2 komórki w fazach G0/G1; M3 komórki w fazach S+G2/M

Fig. 15. Histograms of DNA content in cells to estimate the cell percentage in cycle phases of melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma lines. Cells with lower DNA content located below G0/G1 phase, among which are apoptotic cells with chromatin fragmentation. Spleen cells from hamster were used as control diploid cells. One of 7 done experiments.

M1 sub G0/G1; M2 G0/G1; M3 S+G2/M.

Tab. 8. Zawartość komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego oraz komórek ginących na drodze apoptozy w poszczególnych fazach cyklu (metoda TUNEL).

Tab. 8. *Percentage of melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells in cell cycle phases and TUNEL-positive cells in particular phases.*

Komórki czerniaka chomika <i>Hamster melanoma cells</i>		Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu <i>Percentage of cells in cell cycle phases</i>				Odsetek komórek TUNEL-pozytywnych w fazach cyklu <i>Percentage of TUNEL-positive cells from cell cycle phases</i>			
		G0/G1		S + G2/M		G0/G1		S+G2/M	
Czas inkubacji w godz. <i>Incubation time in hrs</i>		4	24	4	24	4	24	4	24
Ma	Apoptoza spontaniczna <i>Spontaneous apoptosis</i>	50,9±6,7	60,1±4,9	30,4±4,9	19,0 ^{***} ±2,7	5,0±2,2	12,4 ^{***} ±5,1	8,1±4,6	8,2±2,2
	Apoptoza indukowana CPT <i>CPT- induced apoptosis</i>	51,1±6,0	52,9 [*] ±3,9	30,5±5,2	22,2±4,0	6,9±2,3	14,3±2,4	12,0±5,4	12,8 [*] ±4,1
Ab	Apoptoza spontaniczna <i>Spontaneous apoptosis</i>	54,9±4,7	56,7±2,1	39,0^{**}±4,7	33,0 ^{***} ±2,8	2,4 ^{**} ±0,8	4,0 ^{***} ±1,8	3,7 ^{**} ±2,3	5,9 ^{***} ±2,0
	Apoptoza indukowana CPT <i>CPT- induced apoptosis</i>	54,2±2,5	34,4 [*] ±6,3	38,9±3,4	25,9 [*] ±4,2	4,3±2,4	27,6 [*] ±11,7	7,3 [*] ±3,4	20,7 [*] ±5,3

Wartości pochodzą z 7 doświadczeń

*znamiennie statystycznie różnice w porównaniu z apoptozą spontaniczną na poziomie $p<0,025$

**znamiennie statystycznie różnice między linią Ma i Ab na poziomie $p<0,025$

***znamienna różnica wraz z wydłużaniem czasu inkubacji na poziomie $p<0,025$

4.4.2. Analiza spontanicznej apoptozy komórek badanych czerniaków znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego

Komórki apoptyczne w obu liniach pochodziły z wszystkich faz cyklu komórkowego, ale liczba komórek ginących w poszczególnych fazach cyklu była różna dla komórek badanych linii czerniaka.

Po 24 godzinach inkubacji w linii Ma następował wzrost do prawie 60% komórek w fazie cyklu G0/G1 przy jednoczesnym spadku o około 11% komórek w fazach S+G2/M i wzroście o 6% komórek w sub G0/G1 (tab. 8, ryc. 16A).

Wśród komórek linii Ab po tym samym czasie obserwowano spadek o około 6% komórek S+G2/M i wzrost o 5% komórek w sub G0/G1 (tab. 8, ryc. 17A).

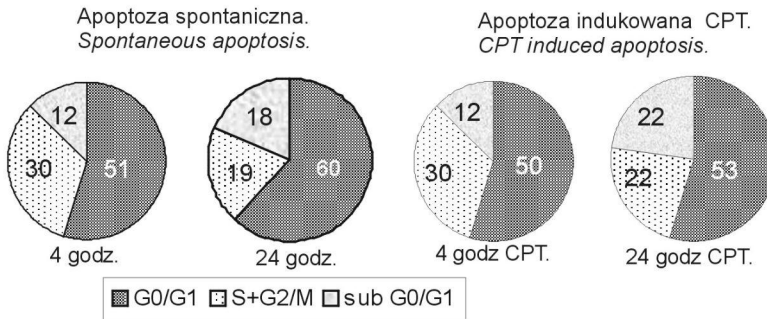
Ponieważ w czasie inkubacji komórek dochodziło do opisanych powyżej zmian liczby komórek w poszczególnych fazach cyklu, procent komórek TUNEL-pozytywnych odniesiono do odsetka komórek w poszczególnych fazach cyklu w danym czasie.

Tak przeliczone wartości wykazały, iż wśród komórek linii Ma po 4 godzinach 10% komórek z faz G0/G1 i 27% z faz S+G2/M ginie drogą apoptozy (ryc. 16 B), podczas gdy w linii Ab odpowiednio 4% w fazie G0/G1 i tylko 9% z pozostałych faz (17B; $p < 0,025$). Po wydłużeniu inkubacji do 24 godzin wartości te wzrastają, ale nadal znamienne więcej komórek z faz G0/G1 oraz S/G2/M ginie w linii Ma.

Na szczególną uwagę zasługuje obserwacja, iż w linii Ma drogą apoptozy spontanicznej ginie trzy razy więcej komórek z faz S+G2/M niż w linii Ab (ryc. 16B. i 17B).

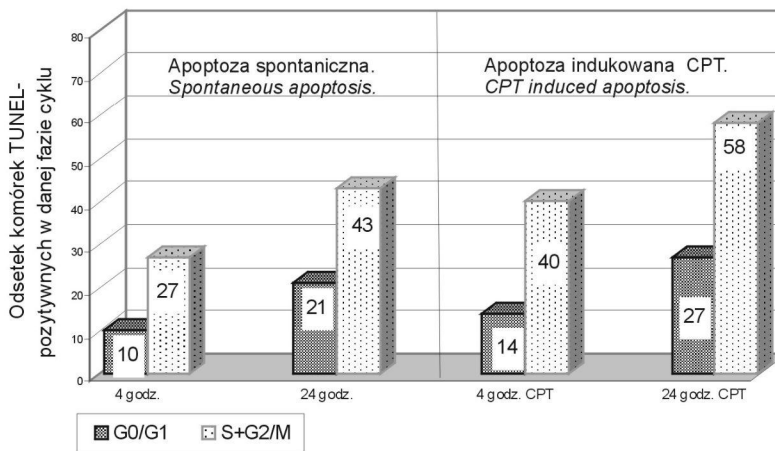
A. Procentowa zawartość komórek czerniaka linii Ma w G0/G1; S+G2/M i subG0/G1.

Percentage of melanotic melanoma cells in G0/G1; S+G2/M and subG0/G1.



B. Procent komórek TUNEL-pozytywnych czerniaka linii Ma z faz : G0/G1 i S/G2/M.

Percentage of TUNEL-positive melanotic melanoma cells in G0/G1 and S/G2/M.

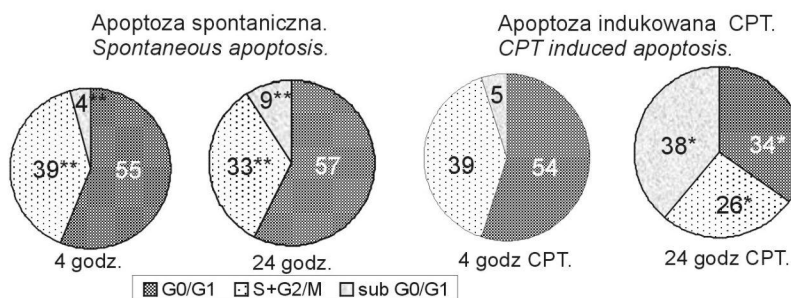


Ryc. 16. Ilustracja zmian procentowej zawartości komórek czerniaka melanotycznego (Ma) w poszczególnych fazach cyklu oraz w sub G0/G1 (A) wraz z procentem komórek TUNEL-pozytywnych w poszczególnych fazach cyklu (B).

Fig. 16. Cell cycle changes (A) and the proportion of TUNEL-positive cells in these cycle phases (B) during spontaneous and CPT-induced death of melanotic melanoma cells (Ma).

A. Procentowa zawartość komórek czerniaka linii Ab w G0/G1; S+G2/M i subG0/G1.

Percentage of amelanotic melanoma cells in G0/G1; S+G2/M and subG0/G1.

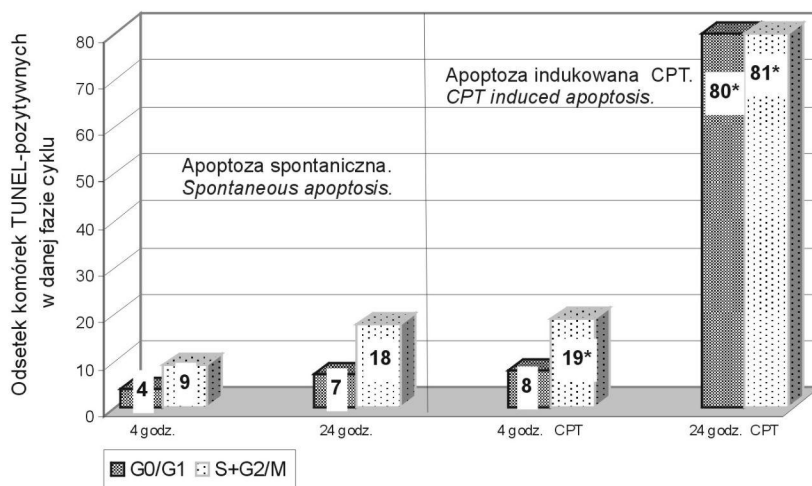


** istotna różnica w porównaniu z linią Ma na poziomie $p < 0,025$

* istotna różnica w porównaniu z apoptozą spontaniczną na poziomie $p < 0,025$

B. Procent komórek TUNEL-pozytywnych czerniaka linii Ab z faz : G0/G1 i S/G2/M.

Percentage of TUNEL-positive amelanotic melanoma cells in G0/G1 and S/G2/M.



* istotna różnica w porównaniu z apoptozą spontaniczną na poziomie $p < 0,025$

Ryc. 17. Ilustracja zmian procentowej zawartości komórek czerniaka amelanotycznego (Ab) w poszczególnych fazach cyklu oraz w sub G0/G1 (A) wraz z procentem komórek TUNEL-pozytywnych w poszczególnych fazach cyklu (B).

Fig. 17. Cell cycle changes (A) and the proportion of TUNEL-positive cells in these cycle phases (B) during spontaneous and CPT-induced death of amelanotic melanoma cells (Ab).

4.4.3. Analiza apoptozy komórek z poszczególnych faz cyklu komórkowego po działaniu CPT

W wynikach opisanych w rozdziale 4.2.4. stwierdzono, iż CPT powoduje znamienny statystycznie wzrost liczby komórek TUNEL-pozytywnych w linii Ab, przy jednoczesnej tendencji do wzrostu liczby tych komórek w linii Ma.

Analizując odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu w linii Ma po inkubacji z CPT, dopiero po 24 godzinach zaobserwowano niewielki około 7% spadek liczby komórek w fazie G0/G1 w porównaniu z apoptozą spontaniczną. Towarzyszył temu wzrost prawie o 10% komórek w sub G0/G1 (ryc. 16A). Jednakże zawartość komórek TUNEL-pozytywnych w fazie G0/G1 po działaniu CPT była podobna jak w apoptozie spontanicznej (ryc. 16B). Natomiast pomimo braku zmian w zawartości komórek S+G2/M obserwowano wśród nich wzrost liczby komórek TUNEL-pozytywnych o ponad 10% zarówno po 4, jak i po 24 godzinach inkubacji z CPT w porównaniu z apoptozą spontaniczną (ryc. 16B).

W linii Ab po 4 godzinach inkubacji komórek z CPT, pomimo braku istotnych zmian w odsetkach komórek w poszczególnych fazach cyklu w porównaniu z apoptozą spontaniczną (ryc. 17A), zaobserwowano, iż 19% komórek z faz S+G2/M to komórki wykazujące apoptyczne pęknięcia DNA (ryc. 17B, $p < 0,025$) i liczba ich wzrasta prawie pięciokrotnie po 24 godzinach inkubacji. Interesujące jest to, iż po tym samym czasie liczba komórek TUNEL-pozytywnych w fazie G0/G1 wzrasta aż jedenastokrotnie w porównaniu z apoptozą spontaniczną (ryc. 17B; $p < 0,025$). Jednocześnie zdecydowanie obniżyła się o około 23% liczba komórek w fazie G0/G1 i o około 7% w fazach S+G2/M przy równoczesnym wzroście o około 30% komórek w sub G0/G1 w porównaniu z apoptozą spontaniczną (ryc. 17A; $p < 0,025$). Taka analiza zmian apoptycznych wskazuje, iż w ciągu pierwszych 4 godzin CPT powoduje pęknięcia nici DNA głównie w komórkach z faz S+G2/M, ale wraz z wydłużaniem inkubacji wzrasta liczba ginących komórek z faz G0/G1.

Podsumowując działanie apoptyczne CPT na komórki badanych czerniaków stwierdzono, iż w linii Ma substancja ta powoduje apoptyczne zmiany w DNA głównie w komórkach pochodzących z faz S+G2/M w ciągu 24 godzin obserwacji. Natomiast w linii Ab w wyniku działania CPT, w początkowych 4 godzinach również giną głównie komórki z faz S+G2/M, lecz przy wydłużonym do 24 godzin działaniu CPT, komórki te pochodzą również z faz G0/G1.

4.5. Ocena udziału elementów drogi zewnętrznej i wewnętrznej w przebiegu apoptozy

4.5.1. Zawartość receptora Fas i cząsteczki FasL w błonie komórkowej

Cytofotometryczna ocena obecności receptora Fas w błonie komórkowej wykazała, iż tylko od 2 do 4% wśród komórek obu linii czerniaka posiadało ten receptor. Jednocześnie ani czas inkubacji, ani obecność induktora apoptozy – CPT nie wpływała na zmianę zawartości komórek z receptorem Fas (tab. 9).

Natomiast analiza zawartości FasL w błonie komórkowej wykazała, iż po 24 godzinach w około 34% komórek linii Ma i tylko w około 12% komórek linii Ab obecny był FasL (tab. 9, $p < 0,025$). Inkubacja z CPT nie zmieniała zawartości komórek FasL pozytywnych wśród komórek linii Ma, ale znamienne obniżała do 1% zawartość tych komórek w linii Ab (tab. 9, $p < 0,025$).

Tab. 9. Ocena obecności Fas i FasL w błonie plazmatycznej komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) po 4 i 24 godzinach inkubacji.

Tab. 9. Fas and FasL expression in the plasma membrane of melanotic (Ma) and melanotic (Ab) melanoma cells after 4 and 24 hrs incubation.

Linia czerniaka <i>Melanoma line</i>	Procentowa zawartość komórek wykazujących obecność w błonie komórkowej: <i>Percentage of cells with the expression of:</i>							
	FasL				Fas			
	4 godz.		24 godz.		4 godz.		24 godz.	
	-CPT	+CPT	-CPT	+CPT	-CPT	+CPT	-CPT	+CPT
Ma	7,0±4,7	1,7±1,5	34,2±7,1*	26,1±14,5*	3,1±1,3	2,8±0,7	2,1±0,9	1,6±0,6
Ab	2,4±2,0	2,2±2,1	11,6±4,7	1,1±0,7**	4,6±1,6	4,1±1,5	5,2±3,3	3,6±2,4

Wartości pochodzą z 4 (dla Ma) i 6 (dla Ab) doświadczeń.

*statystycznie znamienne $p < 0,025$ wyższa zawartość komórek z FasL wśród komórek linii Ma w porównaniu z linią

**statystycznie znamienne $p < 0,025$ obniżenie zawartości FasL w komórkach linii Ab po inkubacji z CPT

4.5.2. Obecność prokaspazy 8 i prokaspazy 9 oraz fragmentów powstających w czasie aktywacji tych kaspaz w badanych komórkach

Wyniki wykonanych oznaczeń metodą Western blot wykazały, iż w komórkach obu linii czerniaka prokaspaza 8 występuje w śladowych ilościach, a widoczne produkty proteolizy świadczyły o aktywacji tej kaspazy tylko w apoptozie spontanicznej, gdyż w komórkach nie stwierdzono wzrostu zawartości tych produktów po inkubacji z CPT (ryc. 18 A).

W przeciwieństwie do prokaspazy 8, prokaspaza 9 była wyraźnie obecna, ale nie zaobserwowano istotnych różnic w jej zawartości między komórkami czerniaka melanotycznego i amelanotycznego. Charakterystyczne produkty proteolizy prokaspazy 9 świadczyły o jej aktywacji w trakcie apoptozy spontanicznej komórek obu linii czerniaka (ryc. 18A). Natomiast w apoptozie indukowanej CPT stwierdzono wyraźny wzrost zawartości tych fragmentów tylko w komórkach linii Ab (ryc. 18A).

4.5.3. Uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytosolu

W czasie inkubacji komórek obu linii czerniaka bez CPT, jak i w obecności CPT dochodziło do uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytosolu (ryc. 18B).

Śmierci komórek linii melanotycznej towarzyszy uwalnianie cytochromu c, ale nie zauważono wyraźnych różnic między zawartością cytochromu c w cytosolu komórek inkubowanych bez CPT i z CPT (ryc. 18B). Oznacza to, iż CPT w tych komórkach nie zwiększa uwalniania cytochromu c, a więc nie dochodzi do aktywacji drogi wewnętrznej.

Natomiast w komórkach linii amelanotycznej obserwowano wyraźny wzrost uwalniania cytochromu c do cytosolu komórek widoczny już po 4 godzinach inkubacji z CPT (ryc. 18B), co świadczy o aktywacji drogi wewnętrznej apoptozy i permabilizacji błony mitochondrialnej.

4.5.4. Proteoliza PARP jako przejaw aktywacji kaspaz efektorowych

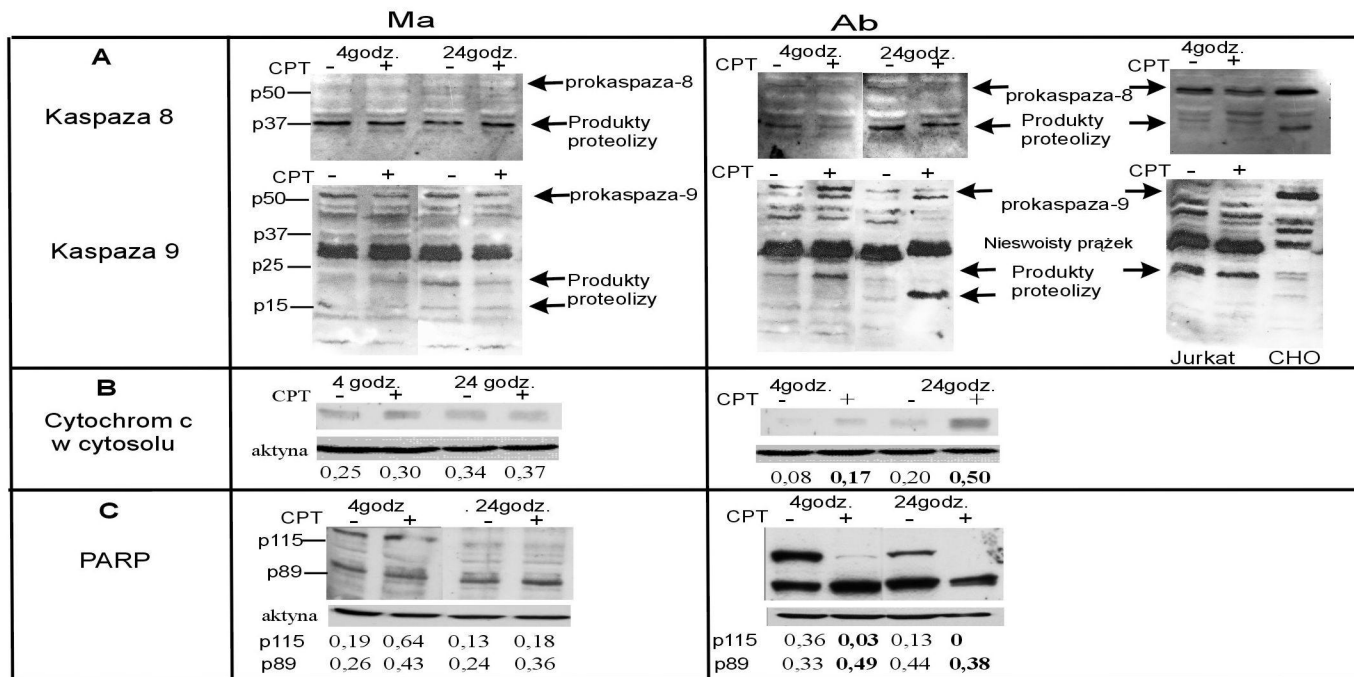
Ocena zawartości fragmentu PARP o m.c. 89, powstającego w wyniku proteolizy tej polimerazy przez kaspazy efektorowe, w lizatach komórek czerniaka melanotycznego nie wykazała znaczących różnic po inkubacji z CPT w porównaniu z inkubacją bez CPT (ryc. 18C).

Natomiast w komórkach linii amelanotycznej nastąpił wyraźny wzrost zawartości tego fragmentu już po 4 godzinach inkubacji z CPT, co świadczy o aktywności kaspaz efektorowych i koreluje ze wzrastającą ogólną zawartością komórek z aktywnymi kaspazami, o której pisano w rozdziale 4.2.2.1.

W wykonanych oznaczeniach poza fragmentem p89 stwierdzano obecność formy niezdegradowanej PARP o m. cz. 115 kDa w komórkach obu linii. Przy czym wraz z wydłużaniem inkubacji komórek z CPT zawartość PARP o m.c. 115 kDa malała, ale tylko w komórkach czerniaka amelanotycznego i po 24 godzinach formy natywnej PARP nie obserwowano, co świadczy o całkowitej proteolizie PARP przez zaktywowane kaspazy efektorowe w komórkach tej linii czerniaka (ryc. 18C).

Niewielka ekspresja receptora Fas, śladowa zawartość prokaspazy 8 oraz fragmentów świadczących o jej aktywacji, wydają się świadczyć, iż droga zewnętrzna z udziałem układu Fas/FasL w apoptozie spontanicznej, jak i indukowanej CPT nie odgrywa istotnej roli. Natomiast uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytosolu, aktywacja prokaspazy 9, wskazują, iż droga wewnętrzna apoptozy jest aktywna w komórkach obu linii czerniaka w trakcie apoptozy spontanicznej. Natomiast po działaniu CPT droga ta ulega jeszcze większej aktywacji, ale tylko w komórkach linii Ab, o czym świadczy wzrost uwalniania cytochromu c do cytosolu, wyraźna aktywacja prokaspazy 9 w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez CPT.

Obserwowana proteoliza PARP świadczy o aktywności kaspaz efektorowych w komórkach obu linii czerniaka.



Ryc. 18. Udział kaspazy 8 i 9 (A), cytochromu c (B), kaspaz efektorowych (proteoliza PARP; C) w apoptozie spontanicznej (CPT-) i indukowanej CPT (CPT+) po 4 i 24 godzinach inkubacji komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab). Komórki Jurkat pozytywna kontrola apoptozy indukowanej CPT. CHO (cells hamster ovary) pozytywna kontrola swoistości gatunkowej przeciwciał.

Fig. 18. Caspase 8 and 9 (A), cytochrome c (B), effector caspases (PARP proteolysis; C) in spontaneous (CPT-) and CPT-induced (CPT+) apoptosis after 4 and 24 hours melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells. Jurkat cells were used as positive control for CPT-induced death. CHO (cells hamster ovarian) were used as a species control for antibodies.

4.6. Ocena udziału wybranych białek regulujących przebieg apoptozy: białka Bcl-2, surwiwiny, białka p53 w apoptozie badanych komórek

Aby określić rolę białek antyapoptycznych w apoptozie spontanicznej i indukowanej CPT w komórkach czerniaka melanotycznego i amelanotycznego oceniano zawartość białka Bcl-2 oraz surwiwiny w lizatach tych komórek.

CPT jest czynnikiem uszkadzającym DNA, a zatem w komórkach wrażliwych na jej działanie można się spodziewać udziału białka p53, które po aktywacji hamuje cykl komórkowy i uruchamia apoptozę. W związku z powyższym oceniano zawartość białka p53 w lizatach komórek obu linii czerniaka.

Zawartość badanych białek wyrażono w jednostkach umownych w przeliczeniu na zawartość aktyny.

Natomiast zmiany w zawartości tych białek pod wpływem CPT określano jako indeks zmian indukowanych CPT, czyli wartość chemiluminescencji po inkubacji z CPT do wartości chemiluminescencji bez CPT mierzonej densytometrycznie.

4.6.1. Apoptoza spontaniczna

4.6.1.1. Białko Bcl-2

Komórki obu linii czerniaka wykazują podobną zawartość antyapoptycznego białka Bcl-2, przy jednocześnie stwierdzanej wraz z wydłużaniem czasu inkubacji tendencji do wzrostu zawartości tego białka, ale tylko w komórkach czerniaka amelanotycznego (tab. 10, ryc. 19A).

4.6.1.2. Surwiwina

Podobnie jak w przypadku opisywanej powyżej zawartości Bcl-2, również nie wykazano różnic w zawartości kolejnego białka antyapoptycznego – surwiwiny między komórkami czerniaka melanotycznego i amelanotycznego. Jednakże wraz z wydłużaniem inkubacji obserwowano tendencję do wzrostu surwiwiny: już po 12 godzinach w komórkach czerniaka melanotycznego, a po 24 godzinach również w komórkach czerniaka amelanotycznego (tab. 10, ryc. 19B).

4.6.1.3. Białko p53

W badanych lizatach komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego metodą Western blot obserwowano tylko śladową zawartość białka p53, przy wyraźnej pozytywnej reakcji w lizatach komórek śledziony chomika i z rekombinowanym białkiem p53 (kontrola pozytywna, ryc. 19C).

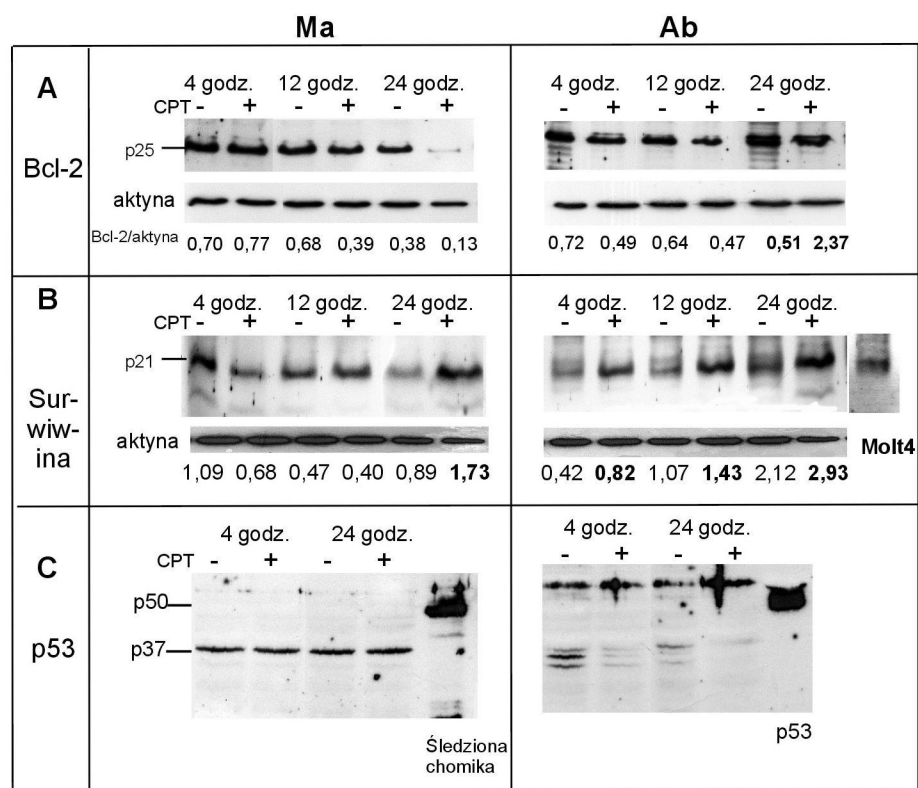
Jednakże w komórkach obu linii czerniaka stwierdzono obecność formy zdegradowanej o masie cząsteczkowej około 37 kDa. W linii melanotycznej było jedno białko o takiej masie cząsteczkowej zaś w linii amelanotycznej oprócz białka o m.cz. 37 kDa były fragmenty o mniejszej masie cząsteczkowej, co może świadczyć o różnych sposobach degradacji tego białka w komórkach badanych linii czerniaka (ryc. 19C).

Tab. 10. Zawartość białka Bcl-2 i surwiwiny w komórkach czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) po 4, 12 i 24 godzinach inkubacji wyrażona jako stosunek do zawartości aktyny.

Tab. 10. The content of Bcl-2 and survivin in melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma after 4, 12 and 24 hrs incubation divided by the content of actin.

Linia czerniaka <i>Melanoma line</i>	Białko <i>Protein</i>	Czas inkubacji w godzinach <i>Incubation time in hours</i>		
		4	12	24
Ma	Bcl-2	0,46±0,21	0,46±0,26	0,33±0,04
	Surwiwina	1,80±1,48	2,77±2,03	2,65±2,36
Ab	Bcl-2	0,48±0,22	0,45±0,26	0,96±0,74
	Surwiwina	1,72±1,89	1,71±0,98	3,62±2,61

Wartości pochodzą z 3 doświadczeń.



Ryc. 19. Zawartość białka Bcl-2 (A), surwiwiny (B) oraz białka p53 (C) w komórkach czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) po 4 i 24 godzinach inkubacji bez CPT (CPT-) oraz w obecności tego induktora apoptozy (CPT+). Molt4 kontrola pozytywna obecności surwiwiny; p53 rekombinowane ludzkie białko p53; śledziona chomika jako kontrola pozytywna obecności białka p53 w komórkach chomika.

Fig. 19. The content of proteins: Bcl-2 (A), survivin (B), p53 (C) in melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells after 4 and 24 hrs incubation without (CPT-) and with CPT (CPT+). Molt4 positive control for survivin; p53 human recombinant protein p53; hamster spleen was used as positive control for protein p53 presence.

4.6.2. Apoptoza indukowana CPT

4.6.2.1. Białko Bcl-2

W apoptozie indukowanej CPT stwierdzono, wraz z wydłużaniem czasu inkubacji, tendencję do wzrostu zawartości białka Bcl-2, ale tylko w komórkach czerniaka amelanotycznego (tab. 11, ryc. 19A.).

Wiadomo, iż biologiczny efekt antyapoptycznego działania polega na wbudowaniu Bcl-2 w błonę mitochondrialną i blokowaniu uwalniania cytochromu c.

Zatem postanowiono jeszcze przyjrzeć się, co dzieje się z Bcl-2 w cytosolu i czy wzrasta jego zawartość we frakcji mitochondrialnej.

Rycina 20 przedstawiająca wyniki immunoblotingu wskazuje, iż w cytosolu komórek obu linii czerniaka znajduje się forma zdegradowana Bcl-2 o masie cząsteczkowej około 15 kDa (ryc. 20B). W komórkach linii Ma, po inkubacji z CPT, stosunek zawartości natywnego białka Bcl-2 do formy zdegradowanej tego białka nie zmienia się istotnie. Podczas gdy w komórkach linii Ab stwierdzono wyraźny wzrost zawartości zdegradowanego białka Bcl-2 po inkubacji z CPT (ryc. 20B).

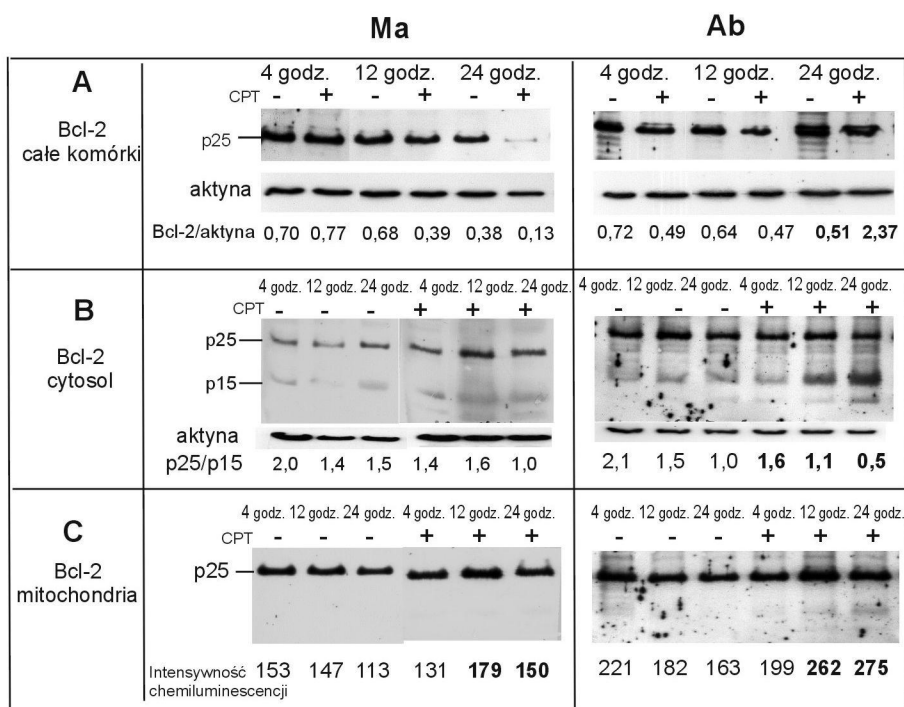
Poza wzrostem proteolizy Bcl-2 w apoptozie indukowanej CPT, część tego białka wbudowuje się w błonę mitochondrialną, co przejawia się wzrostem chemiluminescencji we frakcji mitochondrialnej po 12 i 24 godzinach (ryc. 20C).

4.6.2.2. Surwiwina

W trakcie inkubacji z CPT tendencję do wzrostu zawartości surwiwiny obserwowano wcześniej, bo już po 12 godzinach, w komórkach czerniaka amelanotycznego (indeks zmian 1,4) (tab. 11, ryc. 19B). Podczas gdy w komórkach czerniaka melanotycznego tendencja ta uwidaczniała się dopiero po 24 godzinach.

4.6.2.3. Białko p53

Brak wzrostu zawartości białka p53 po działaniu CPT wydaje się wskazywać na brak akumulacji tego białka w komórkach badanych linii czerniaka w odpowiedzi na działanie CPT. Po inkubacji z CPT, w komórkach linii Ma nie zaobserwowano zmian w zawartości zdegradowanego białka p53, natomiast w komórkach linii Ab zaznacza się tendencja do obniżania jego zawartości (ryc. 19C).



Ryc. 20. Zawartość białka Bcl-2 w lizatach z całych komórek (A), we frakcji cytosolowej (B) oraz mitochondrialnej (C) komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) po 4, 12 i 24 godzinach inkubacji bez CPT (CPT-) oraz w obecności tego induktora apoptozy (CPT+). Ilość białka na ścieżkę w A i B 40 μ g, a w C 20 μ g.

Fig. 20. The content of protein Bcl-2 in lysates from whole cells (A), cytosolic fraction of cells (B) and mitochondrial fraction (C) of melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells after 4, 12 and 24 hrs incubation without (CPT-) and with CPT (CPT+). In A and B 40 μ g,; in C 20 μ g of proteins were used.

Tab. 11. Zmiany zawartości białka Bcl-2 i surwiwiny w komórkach czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) po 4, 12 i 24 godzinach inkubacji z CPT wyrażone jako indeks zmian indukowanych CPT.

Tab. 11. Changes in the protein Bcl-2 and survivin content in melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells after 4, 12, 24 hrs incubation with CPT as index of CPT-induced changes.

Linia czerniaka <i>Melanoma line</i>	Białko <i>Protein</i>	Czas inkubacji w godzinach <i>Incubation time in hours</i>		
		4	12	24
Ma	Bcl-2	0,92±0,24	1,13±0,77	0,94±0,37
	Surwiwina	1,14±0,35	1,16±0,42	1,49±0,24
Ab	Bcl-2	1,12±0,12	0,94±0,42	1,87±0,68
	Surwiwina	1,27±0,47	1,40±0,29	1,42±0,92

Wartości pochodzą z 4 (dla Bcl-2) i 5 (dla surwiwiny) doświadczeń.

Podsumowując ocenę udziału wyżej opisanych białek w apoptozie komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, można powiedzieć, iż komórki obu linii nie różnią się znacząco wyjściową zawartością antyapoptycznych białek: Bcl-2, surwiwiny. Jednakże w trakcie apoptozy spontanicznej wzrasta zawartość surwiwiny w komórkach obu linii czerniaka, a w komórkach linii Ab dochodzi jeszcze do wzrostu białka Bcl-2. W apoptozie indukowanej CPT również obserwowano w komórkach linii Ma nieznaczny wzrost surwiwiny, zaś w komórkach linii Ab wzrastała surwiwina i Bcl-2.

Jednocześnie nie obserwowano akumulacji białka p53 w badanych komórkach w trakcie apoptozy spontanicznej, jak i indukowanej CPT.

4.7. Ocena udziału AIF – czynnika pozakaspazowej drogi apoptozy – w śmierci badanych komórek czerniaka

Komórki linii Ma pod wpływem CPT wykazywały pęknięcia nici DNA wykrywane metodą TUNEL, przy jednoczesnym braku aktywacji kapaz, dlatego postanowiono również ocenić uwalnianie z mitochondriów do cytosolu AIF – czynnika, który indukuje apoptyczne zmiany w komórce bez aktywacji kaspaz tzw. droga pozakaspazowa apoptozy. Zawartość AIF we frakcji cytosolowej oceniano metodą Western blot.

4.7.1. AIF w apoptozie spontanicznej

AIF znajdował się głównie we frakcji mitochondrialnej, a tylko pewna jego część była uwalniana do cytosolu (ryc. 21). W komórkach czerniaka amelanotycznego stwierdzono wyższą zawartość AIF w cytosolu w porównaniu z komórkami czerniaka melanotycznego, ale wraz z wydłużaniem inkubacji różnica ta zanikała (tab. 12).

4.7.2. AIF w apoptozie indukowanej CPT

W komórkach linii Ma inkubowanych z CPT zawartość AIF nie ulegała zmianie (tab. 12, ryc. 21).

Natomiast obserwowana po 4 godzinach inkubacji z CPT w komórkach linii Ab niższa zawartość AIF w cytosolu, w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez CPT (indeks zmian 0,79), może odzwierciedlać translokację AIF z cytoplazmy do jądra, gdzie czynnik ten bierze udział w degradacji DNA. Po 24 godzinach inkubacji z CPT obserwowano wśród komórek linii amelanotycznej wzrost zawartości AIF (indeks zmian 1,1) (tab. 12, ryc. 21).

Tab. 12. Zawartość AIF we frakcji cytosolowej komórek.

Tab. 12. The content of AIF in cytosolic fraction of cells.

Linia czerniaka <i>Melanoma line</i>	AIF	Czas inkubacji w godzinach <i>Incubation time in hours.</i>		
		4	12	24
Ma	Zawartość w przeliczeniu na aktynę <i>AIF/actin</i>	$0,50 \pm 0,12$	$0,97 \pm 0,49$	$0,86 \pm 0,65$
	Indeks zmian indukowanych CPT. <i>Index CPT-induced changes</i>	$1,21 \pm 0,66$	$0,92 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,38$
Ab	Zawartość w przeliczeniu na aktynę <i>AIF/actin</i>	$1,02 \pm 0,28$	$0,95 \pm 0,56$	$0,80 \pm 0,20$
	Indeks zmian indukowanych CPT. <i>Index CPT-induced changes</i>	$0,79 \pm 0,09$	$0,84 \pm 0,12$	$1,13 \pm 0,31$

Wartości pochodzą z 3 doświadczeń.



Ryc. 21. Obecność AIF we frakcji cytosolowej komórek czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) w apoptozie spontanicznej (-) i indukowanej CPT (+) (w przeliczeniu na zawartość aktyny) w obrazach uzyskanych metodą Western blot. Ścieżka „cale komórki” lizat z całych komórek. Ścieżka „mito” lizat z frakcji mitochondrialnej.

Fig. 21. One of representative Western blots of AIF in the cytosolic fraction of melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells in spontaneous (-) and CPT-induced (+) apoptosis (content of AIF/ content of actin). „whole cells” – lysate from whole cells „mito” – lysate from mitochondrial fraction.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Wyniki obecnych badań dotyczących zdolności do apoptozy spontanicznej komórek dwóch linii czerniaka przeszczepialnego potwierdziły poprzednie sugestie [175], iż wyraźnie wyższy odsetek komórek o cechach charakterystycznych dla apoptozy takich jak: obniżony potencjał transbłonowy mitochondriów, aktywne kaspazy, eksternalizacja fosfatydyloseryny i zmiany w DNA, wykazuje linia rodzi-ma w porównaniu z komórkami linii amelanotycznej. Wskazuje to, iż spontanicznej przemianie linii melanotycznej w linię charakteryzującą się szybszym tempem wzrostu, mniejszym zróżnicowaniem komórkowym, towarzyszy obniżenie zdolności do apoptozy.

W komórkach czerniaka u człowieka niektórzy autorzy opisywali ich niską zdolność do apoptozy spontanicznej [141, 261, 294]. Jednakże jak dotąd brak informacji czy i jak zmienia się ta właściwość komórek czerniaka, wtedy gdy zmieniają się cechy fenotypowe nowotworu, wtedy gdy staje się on bardziej agresywny. Brak takich informacji sprawia, że choć wyników obecnych badań nie można konfrontować z innymi, to jednak mogą one sugerować, że zdolność do apoptozy zmienia się wraz z nabywaniem przez czerniaka nowych cech biologicznych.

Omawiając szczegółowo wyniki świadczące o różnej podatności komórek dwóch linii czerniaka na apoptozę należy zwrócić uwagę na uzyskane dane dotyczące mitochondriów, z uwagi na podkreślaną ważną rolę tych organelli w procesie apoptozy [107, 109, 178, 225, 244].

Na uwagę zasługują stwierdzone w obecnej pracy różnice w liczbie komórek z obniżonym potencjałem transbłonowym mitochondriów, wyjściowej wartości potencjału transbłonowego i związanego z tym stanu energetycznego komórek, występujące między komórkami dwóch badanych linii czerniaka. Obniżenie $\Delta\Psi$, uważane jest bowiem za wczesny i prawdopodobnie nieodwracalny etap w przebiegu apoptozy [339], prowadzący do depolaryzacji mitochondriów, przerwania oddychania oraz uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów wielu czynników apoptogennych [49, 203, 244, 293]. Zaobserwowany zatem w obecnych badaniach wyższy odsetek komórek o obniżonym $\Delta\Psi$, wśród komórek linii melanotycznej, wydaje się odzwierciedlać także intensywniejszą apoptozę spontaniczną tych komórek w porównaniu z komórkami czerniaka amelanotycznego.

Natomiast trudno wyjaśnić stwierdzoną niższą wyjściową wartość wskaźnika potencjału transbłonowego mitochondriów i ich stanu energetycznego (FL2/FL1) w komórkach czerniaka melanotycznego, w porównaniu z linią amelanotyczną. Nieliczni autorzy poruszający problem wartości potencjału transbłonowego mitochondriów w różnych komórkach podkreślają, iż wartość tego parametru wydaje się być cechą swoistą danych komórek [74, 91] i w głównej mierze zależy od intensywności syntezy ATP i reaktywnych pochodnych tlenu [153, 154].

Mitochondria komórki zużywającej ATP mają niską wartość $\Delta\Psi$, ponieważ w odpowiedzi na spadek ATP aktywnie muszą go syntetyzować, co zgodnie z teorią chemiosmotyczną wiąże się z wpompowywaniem jonów wodorowych (element decydujący o wartości $\Delta\Psi$) przez syntazę ATP do wnętrza mitochondriów. Zatem niższa wartość FL2/FL1, będąca wykładnikiem wartości $\Delta\Psi$, świadcząca o niskiej zawartości ATP [35] w komórkach czerniaka melanotycznego mogłaby wynikać ze zużywania energii w trakcie zachodzącej melanogenezy.

Natomiast wyniki pracy Scislowskiego i wsp. stwierdzające wyższy poziom glikolizy tlenowej i beztlenowej (dostarczającej substratu do syntezy ATP w mitochondriach) w komórkach linii amelanotycznej [265], mogłoby również częściowo wyjaśniać wyższą wartość $\Delta\Psi$ tych komórek w porównaniu z komórkami linii melanotycznej.

Należy dodać, iż obserwowane różnice wartości FL2/FL1 w komórkach obu badanych linii czerniaka nie zależały od masy mitochondriów, co jest zgodne z obserwacją Kluzy i wsp. [164].

Wartość $\Delta\Psi$ i związany z tym stan energetyczny mitochondriów w komórce, mogą mieć wpływ na indukcję i przebieg apoptozy, szczególnie wobec opinii wskazujących, iż od stanu energetycznego komórki może zależeć wybór drogi jej śmierci [35, 36, 69, 74, 109].

Tak więc, w badanych liniach czerniaka, komórki czerniaka amelanotycznego, wyższym wyjściowym $\Delta\Psi$ mitochondriów, w mniejszym stopniu ulegają apoptozie spontanicznej niż komórki czerniaka melanotycznego, charakteryzujące się niższą wartością $\Delta\Psi$.

Istotną rolę w apoptozie pełnią jak wiadomo kaspazy, dlatego ocena ich aktywności dostarczyła nowych danych wskazujących na istotne różnice w zdolności do apoptozy komórek linii melanotycznej i amelanotycznej.

O tym, iż w apoptozie komórek czerniaka biorą udział kaspazy wiadomo od dawna, ale zawartość tych proteaz w komórkach czerniaka jest mało poznana; Fink i wsp. zaobserwowali w komórkach tego nowotworu wyższy poziom prokaspaz: 7, 10 i 8 w porównaniu z melanocytami [88], a Svingen i wsp. stwierdzili bardzo niską zawartość kaspazy 6 w komórkach badanych czerniaków, w porównaniu z komórkami innych nowotworów [295]. Wiadomo również, iż komórki czerniaków poprzez obniżoną ekspresję Apaf-1 [284] i podwyższoną zawartość białek z rodziny IAP mogą regulować aktywność kaspaz w swoich komórkach [112]. Jednakże jak dotąd brakuje oceny udziału tych enzymów w apoptozie komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego.

Wyniki obecnej pracy stwierdzające, iż przy zbliżonej ogólnej zawartości komórek z aktywnymi kaspazami w obu liniach czerniaka, około 50% tych komórek w czerniaku melanotycznym i tylko 20% z komórek w czerniaku amelanotycznym stanowią komórki wczesnoapoptyczne (tzn. z aktywnymi kaspazami i nie uszkodzoną błoną komórkową – kaspazo+/PI-), mogą wskazywać, iż liczba komórek wchodzących na drogę apoptozy, w linii rodzimej jest ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu z linią amelanotyczną.

Poza tym podobna zawartość komórek z aktywnymi kaspazami w komórkach linii amelanotycznej, przy stwierdzonej we wcześniejszych badaniach trzykrotnie wyższej aktywności kaspaz efektorowych w tych komórkach, w porównaniu z komórkami linii melanotycznej [175], może sugerować, iż komórki linii amelanotycznej wykształciły mechanizmy hamujące zaktywowane kaspazy, jak to sugerują inni autorzy w obserwacjach dotyczących komórek czerniaka człowieka [112]. Można zatem przypuszczać, iż kaspazy w komórkach tej linii biorą udział w innych niż apoptoza procesach [1, 337].

Zdaniem Yanga i wsp. niewielka aktywacja kaspaz w komórkach HeLa i komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc może, zamiast uruchamiać ich apoptozę, aktywować drogi przeżycia np. poprzez proteolizę niektórych białek np. Ras [337].

Aktywacja kaspaz i zachodzące przemieszczanie się fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy lipidowej błony komórkowej, uważane są za wczesnoapoptyczne zmiany w komórce. Zdecydowanie niższa zawartość komórek o wyżej wymienionych cechach wśród komórek czerniaka amelanotycznego, wskazuje również na obniżenie liczby komórek spontanicznie wchodzących na drogę apoptozy w tej linii.

Natomiast wśród komórek linii rodzimej, wysoka zawartość komórek wykazujących eksternalizację fosfatydyloseryny, w porównaniu z niższym odsetkiem komórek wykazujących także inne badane cechy apoptyczne, wydaje się wskazywać, iż obserwowane zmiany w błonie komórkowej, oprócz zmian apoptycznych mogą odzwierciedlać inne zmiany w funkcjach komórek. Niektórzy autorzy podkreślają, że przejście fosfatydyloseryny na zewnętrzną stronę błony komórkowej towarzyszy wielu procesom fizjologicznym takim jak np. interakcje między komórkami, endocytoza, egzocytoza [347]. Należy zwrócić również uwagę, iż w czerniaku amelanotycznym przy niższym odsetku komórek apoptycznych tempo przyrostu liczby komórek apoptycznych wraz z wydłużaniem czasu inkubacji było podobne jak w linii rodzimej, co wydaje się wskazywać, iż w przypadku komórek tej linii sygnał o rozpoczęciu apoptozy dociera do mniejszej liczby tych komórek.

Trudno wskazać czynnik odpowiedzialny za wyższą liczbę komórek apoptycznych wśród komórek linii melanotycznej. Jednak wobec zachodzącej melanogenezy w komórkach tej linii i braku tego procesu w komórkach linii amelanotycznej, można brać pod uwagę ewentualny udział w apoptozie spontanicznej komórek linii melanotycznej – substancji cytotoksycznych powstających w procesie melanogenezy [205, 278, 279]. Jest to prawdopodobne, szczególnie wobec obserwacji, iż melanogeneza w komórkach czerniaka w porównaniu z melanogenezą zachodzącą w melanocytach wykazuje szereg zmian np. dotyczących budowy melanosomów [251, 279]. Wobec stwierdzeń tych autorów, nieprawidłowo przebiegającą melanogenezę możnaby traktować jako jeden z czynników zwiększających podatność komórek czerniaka linii melanotycznej na apoptozę spontaniczną.

Wyniki obecnych badań porównujących reaktywność komórek dwóch linii czerniaka na działanie induktora apoptozy – kamptotecyny, wyraźnie wskazują, iż wrażliwe na to działanie są tylko komórki linii amelanotycznej. Indukowane zmiany w komórkach czerniaka amelanotycznego, występują już po 4 godzinach, wykazując charakter zmian wczesnoapoptycznych (obniżenie $\Delta\Psi$, aktywacja kaspaz), by już po 24 godzinach inkubacji, aż u 70% komórek można było zaobserwować zmiany późnoapoptyczne (zmiany w strukturze błony komórkowej, degradacja DNA).

Autorzy badający działanie kamptotecyny na komórki czerniaka człowieka wskazują na apoptozę jako główny sposób niszczenia komórek tego nowotworu przez kamptotecynę [188, 229].

W obecnych badaniach, po inkubacji komórek czerniaka amelanotycznego z kamptotecyną występujący wzrost liczby komórek z aktywnymi kaspazami oraz proteoliza PARP, wraz ze wcześniej opisanym wzrostem aktywności kaspazy 3 [175] sugerują, że stwierdzony wzrost odsetka komórek z aktywnymi kaspazami odzwierciedla głównie aktywację kaspaz efektorowych, w tym aktywację kaspazy 3.

Zmiany w mitochondriach (spadek $\Delta\Psi$, uwalnianie cytochromu c) oraz aktywacja kaspaz (w tym aktywacja kaspazy 9) po inkubacji z kamptotecyną, wskazują, iż substancja ta powoduje śmierć apoptyczną komórek czerniaka amelanotycznego poprzez indukcję drogi wewnętrznej apoptozy i aktywację kaspaz z nią związanych.

Przeprowadzone badania dynamiki występowania zmian apoptycznych pod wpływem kamptotecyny wykazały, że już w ciągu 12 godzin substancja ta indukuje wzrost aktywności kaspaz w komórkach czerniaka amelanotycznego. Obserwacje Teodori i wsp [305] i Smolewskiego i wsp.[281] wskazują, iż w komórkach białaczki HL60 aktywacja kaspaz zachodziła już po 8 godzinach działania kamptotecyny; natomiast z doniesienia Rodriqueza i wsp. wynika, iż komórki H460– niedrobnokomórkowego raka płuc, reagują wzrostem aktywności kaspaz pod wpływem kamptotecyny dopiero po 48 godzinach [252].

Zatem wyniki obecnych i przytoczonych powyżej badań wskazują, iż reaktywność komórek różnego typu nowotworów na ten sam czynnik indukujący apoptozę jest dla nich swoista. I choć na razie nie znane są mechanizmy tej swoistości wydaje się, że obserwacje opisywane w obecnej pracy oznaczają, iż w trakcie rozwoju nowotworu wraz ze zmianami fenotypu może także dochodzić do zmian wrażliwości jego komórek na działanie czynników zewnętrznych prowadzących do zniszczenia tych komórek.

Wyniki powyższe zatem wydają się stanowić niezmiernie istotny element budowania nowego spojrzenia na zindywidualizowane terapeutyczne działania wobec różnego typu nowotworów, nawet wtedy kiedy będzie to dotyczyło indukowania tego samego procesu w komórkach nowotworowych – jak np. apoptozy.

Interpretując wyniki uzyskane w obecnych badaniach, dotyczących większej podatności na proapoptyczne działanie kamptotecyny wobec komórek linii ame-

lanotycznej, można by próbować wyjaśniać wysoką liczbą komórek dzielących się, które są według niektórych autorów [229, 235, 275, 336] szczególnie wrażliwe na kamptotecynę, gdyby nie fakt, że z tych samych badań wynika, iż komórki tej linii czerniaka znajdujące się w fazach S/G2/M giną głównie w ciągu pierwszych godzin, a w ciągu 24 godzin inkubacji z kamptotecyną zachodzi sukcesywny wzrost liczby komórek apoptycznych również z fazy G0/G1. Może to zatem oznaczać, że nie tylko komórki dzielące się są wrażliwe na działanie kamptotecyny indukujące apoptozę, co sugerują również wyniki prac innych autorów [39, 62, 81, 235].

Ostatnio podkreśla się, iż kamptotecyna działa efektywniej proapoptycznie przy obniżonym pH [2, 103], co w zestawieniu z obserwacjami, iż komórki czerniaka amelanotycznego wykazują zdolność do zakwaszania otaczającego środowiska [122] może również w jakiejś mierze wyjaśniać większą wrażliwość tych komórek na działanie kamptotecyny.

Wobec doniesienia Follstad i wsp., iż o wrażliwości na działanie chemioterapeutyków może decydować wartość potencjału transbłonowego mitochondriów w trakcie działania leku [91], obserwowane różnice w wartości FL2/FL1 między linią melanotyczną i amelanotyczną czerniaka, mogłyby również wpływać na stwierdzoną różną wrażliwość na apoptyczne działanie kamptotecyny. Pommier i wsp. zwracają poza tym uwagę, iż o wrażliwości na działanie kamptotecyny mogą decydować również zmiany w systemach naprawczych DNA komórek nowotworowych [235].

Wyższą wrażliwość komórek czerniaka amelanotycznego na gimatekan-pochodną kamptotecyny, w porównaniu z komórkami czerniaka melanotycznego u człowieka zaobserwowali również De Cesare i wsp. [70].

Natomiast wyniki obecnych badań świadczące o niskiej wrażliwości komórek linii rodzimej – melanotycznej na indukujący apoptozę wpływ kamptotecyny są trudne do interpretacji. Choć pozostają one w zgodzie z sugestią, iż rodzaj nowotworu i jego cechy fenotypowe mogą determinować wrażliwość komórek na indukcję apoptozy, to jednak trudno wyjaśnić dlaczego w komórkach podatniejszych na spontaniczną apoptozę trudniej ten proces zaindukować kamptotecyną.

Można przypuszczać, że tak jak donoszą Xu i wsp. w komórkach czerniaka melanotycznego funkcjonują mechanizmy odpowiadające za ich oporność na proapoptyczne działanie kamptotecyny np. wypompowywanie kamptotecyny z komórki przez glikoproteinę P, obniżona zawartość topoizomerazy I (enzymu docelowego dla kamptotecyny) lub zmiany w strukturze tego enzymu będące efektem mutacji genu dla topoizomerazy I [336].

Obecność glikoproteiny P w większości komórek czerniaka melanotycznego, w porównaniu ze znacznie niższym odsetkiem komórek linii amelanotycznej wykazujących obecność tej makrocząsteczki [174, 328] mogłaby być jedną z przyczyn braku wrażliwości tych komórek na kamptotecynę.

Brak wrażliwości komórek czerniaka melanotycznego na apoptyczne działanie kamptotecyny można również wiązać z aktywnymi w tych komórkach mechanizmami chroniącymi je przed powstającymi w procesie melanogenezy substancjami toksycznymi np. nadtlakiem wodoru, co sugerują niektórzy badacze [51, 277], a także z możliwością adsorpcji kamptotecyny przez melaninę, co wykazano dla niektórych leków [37].

Jednakże pomimo powyższych prób wyjaśnienia obserwowanego zjawiska, jego biologiczny sens pozostaje nadal trudny do wytłumaczenia. Zaobserwowana w obecnych badaniach różna zdolność do apoptozy spontanicznej i indukowanej komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego raz jeszcze, wydaje się wskazywać, iż konieczne jest uwzględnianie cech biologicznych komórek czerniaka, gdy wykorzystuje się je do testowania potencjalnych leków przeciwnowotworowych.

Jak już podkreślano wcześniej, przeprowadzone w obecnej pracy badania wykazały wyraźnie wyższy odsetek komórek apoptycznych wśród komórek czerniaka melanotycznego w porównaniu z linią amelanotyczną – charakteryzującą się szybszym tempem wzrostu i komórkami o mniejszym stopniu zróżnicowania.

Z drugiej strony wiadomo, iż komórki nowotworowe wykazują zwiększoną zdolność do proliferacji między innymi dzięki autokrynnnej produkcji czynników wzrostu, podwyższonej ekspresji receptorów dla tych czynników [56, 123, 261] oraz zmianom w przekazywaniu do komórki sygnałów o proliferacji – głównie dotyczących jej zahamowania [125]. Pomimo wielu dowodów na istnienie powiązań między cyklem komórkowym a apoptozą [42, 97, 123, 198, 315], charakter tych zależności także nie jest poznany.

Ciągle nie rozstrzygnięty pozostaje problem, który z procesów: proliferacja czy apoptoza, przeważa i decyduje o wzroście poszczególnych nowotworów [42, 72, 106, 134, 210, 301] oraz w jakiej fazie cyklu życiowego komórki nowotworowe giną najłatwiej. Dotyczy to również czerniaka, gdzie nie wykazano jednoznacznej zależności między zdolnością komórek do proliferacji i apoptozy, a progresją tego nowotworu [274, 294], przy jednoczesnym wskazywaniu na liczbę komórek dzielących się w tym nowotworze jako ewentualnym czynnikiem prognostycznym w ocenie czasu przeżycia osoby chorej [19, 93].

Wyniki obecnej pracy wskazujące na wyższą liczbę komórek linii amelanotycznej (o szybszym tempie wzrostu), znajdujących się w fazach S+G2/M, w porównaniu z wolniej rosnącą linią melanotyczną, są zgodne z doniesieniami wykazującymi, iż wzrost nowotworu zależy od liczby komórek dzielących się [135] a tempo wzrostu jest wyższe w mniej zróżnicowanych nowotworach [134, 210], do których należy czerniak amelanotyczny. Większa liczba komórek w fazach związanych z proliferacją w linii amelanotycznej odzwierciedla również bardziej agresywny charakter wzrostu komórek tej linii w porównaniu z linią melanotyczną, co obserwowali również inni autorzy w czerniaku u człowieka [21, 181].

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały ponadto, iż apoptozie spontanicznej ulegają w obu liniach głównie komórki z faz S/G2/M z tym, że w linii melanotycznej ginie ich zdecydowanie więcej niż w linii amelanotycznej.

Powyższych obserwacji nie można odnieść do spostrzeżeń innych autorów, bo w dostępnej literaturze nie znaleziono doniesień wskazujących z jakich faz cyklu pochodzą komórki nowotworowe ulegające apoptozie spontanicznej, przy jednocześnie istniejącej dużej liczbie informacji dotyczących zmian zawartości komórek w poszczególnych fazach cyklu pod wpływem działania różnych chemicznych substancji [42, 53, 66, 188, 311].

Stwierdzony w obecnych badaniach stosunek komórek czerniaka melanotycznego znajdujących się w fazie S i G2M do komórek apoptycznych (ze zmianami w chromatynie wykrywanymi metodą TUNEL) wynoszący 2:1 oraz fakt, iż około 27% komórek dzielących się (tzn. znajdujących się w fazach S i G2/M) ulega apoptozie mogą świadczyć o tym, iż wolniejszy wzrost formy rodzimej czerniaka jest wynikiem mniejszej aktywności proliferacyjnej i większej zdolności do apoptozy spontanicznej komórek tej linii nowotworu.

Natomiast liczba komórek proliferujących w linii amelanotycznej czerniaka w wyniku samorzutnej przemiany wyższa tylko o około 9% oraz fakt, iż na drodze apoptozy ginie ich prawie o 20% mniej w porównaniu z komórkami linii rodzimej, pozwala przypuszczać, iż ekspansywność wzrostu linii amelanotycznej czerniaka, zależy głównie od obniżenia zdolności komórek do samoistnej apoptozy, w tym szczególnie komórek dzielących się.

Gdyby obserwacja o szybszym tempie wzrostu czerniaka amelanotycznego chomika w wyniku obniżenia zdolności do apoptozy komórek dzielących się, znalazła potwierdzenie również w czerniaku u człowieka, to stymulacja apoptozy w komórkach dzielących się mogłaby być szczególnie obiecującą drogą w poszukiwaniach skutecznej terapii czerniaka amelanotycznego.

Wyniki badań innych autorów postulujące istnienie zależności między wzrostem nowotworu a proliferacją komórek i ich spontaniczną apoptozą są kontrowersyjne; od wykazujących, iż wzrost nowotworu zależy głównie od proliferacji komórek [42, 210], poprzez obserwacje, iż wraz z nasileniem tempa proliferacji wrasta również zdolność do apoptozy [72, 106, 301], aż do stwierdzenia, że zwiększona proliferacja wraz z obniżoną apoptozą prowadzą do progresji nowotworu [72, 134].

W czerniaku u człowieka obserwowano bardzo niską zdolność komórek do apoptozy spontanicznej [141, 215], przy jednocześnie wysokiej aktywności proliferacyjnej tych komórek; około 20-40% komórek czerniaka stanowią komórki dzielące się [188, 220, 294], jednak jak dotąd brak było porównania tych dwóch ważnych procesów, jak zdolność do apoptozy i proliferacji w czerniaku w zależności od jego zróżnicowania i progresji, co stało się m. in. celem obecnych badań.

Nieliczne prace poruszające problem zależności wzrostu czerniaka i proliferacji podkreślają, iż za wzrost czerniaka melanotycznego człowieka odpowiada głównie

aktywność proliferacyjna komórek [215, 274], co nie jest do końca zgodne z wynikami obecnej pracy dotyczącymi czerniaka melanotycznego i amelanotycznego chomika, które wykazały, iż nie tylko liczba komórek dzielących się, ale i liczba komórek ginących drogą apoptozy, może wpływać na wzrost czerniaka, szczególnie w linii amelanotycznej – charakteryzującej się bardziej agresywnym fenotypem.

O ile apoptozie spontanicznej ulegały komórki badanych linii czerniaka będące w fazach S/G2/M cyklu, to po indukcji kamptotecyną, poza komórkami z tych faz, ginęły również komórki z faz G0/G1, ale przy liczbowej przewadze komórek związanych z proliferacją

Wrażliwość na działanie kamptotecyny komórek czerniaka linii BRO oraz innych nowotworów znajdujących się w fazie S została opisana również przez innych autorów [229, 275].

Kamptotecyna w komórkach linii melanotycznej powodowała wzrost liczby komórek z faz S/G2/M wykazujących pęknięcia DNA wykrywane metodą TUNEL dopiero po 24 godzinach, zaś w linii amelanotycznej już po 4 godzinach, co potwierdza szczególną wrażliwość tych komórek na działanie apoptyczne tej substancji.

Jednakże wraz z wydłużaniem czasu inkubacji komórek czerniaka amelanotycznego z kamptotecyną wzrasta liczba komórek apoptycznych z faz G0/G1, co potwierdza obserwacje innych autorów, iż nie tylko komórki w fazie S są wrażliwe na działanie kamptotecyny, chociaż mechanizm działania kamptotecyny w tych komórkach nadal pozostaje niewyjaśniony [39, 62, 81, 235].

Wydaje się zatem, że przemianie linii melanotycznej w amelanotyczną towarzyszy obniżenie zdolności do apoptozy spontanicznej przede wszystkim komórek dzielących się, co może wpływać na szybszy wzrost czerniaka amelanotycznego. Jednakże komórki te jednocześnie stają się bardziej wrażliwe na działanie kamptotecyny, co na razie jest trudne do wytłumaczenia, na co zwracano uwagę powyżej.

Należy przy tym dodać, iż utrata barwnika przez komórki czerniaka u człowieka uważana jest za przejaw obniżenia zróżnicowania tych komórek i prowadzi do szybszego wzrostu czerniaka amelanotycznego w porównaniu z formą melanotyczną [61]. Jednak, tak jak wspomniano we wstępie, nie ma zgodności w kwestii czy ocena stopnia melanizacji komórek czerniaka powinna być elementem prognostycznym w ocenie rozwoju czerniaka oraz wyborze terapii, pomimo powszechnie panującej opinii o większej agresywności formy amelanotycznej. Niektórzy autorzy wskazują, że zahamowanie melanogenezy mogłoby uwrażliwiać komórki czerniaka na działanie chemioterapeutyków [277].

Prowadzone przez prof. Kozłowską i wsp. od trzydziestu lat badania porównawcze komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, jak już opisywano we wstępie, wykazały liczne różnice w ultrastrukturze tych komórek, budowie błony komórkowej, aktywności wielu enzymów [168-175, 321, 346], ale wyniki obecnej pracy wykazały istnienie innych cech wskazujących na większą heterogenność komórek linii rodzimej, a więc większe ich zróżnicowanie.

O wyższym zróżnicowaniu komórek czerniaka melanotycznego, poza wcześniej opisanymi, świadczą także zaobserwowane w obecnych badaniach różnice w masie mitochondriów komórek tej linii, w porównaniu z jednakową masą tych organelli w komórkach linii amelanotycznej. Zważywszy na udział mitochondriów w przebiegu apoptozy, można przypuszczać iż masa tych organelli mogłaby mieć znaczenie w wyjaśnieniu obserwowanych różnic w podatności na apoptozę komórek linii melanotycznej i amelanotycznej, jednakże aktualnie trudno określić, które komórki: czy te z mniejszą liczbą mitochondriów, czy te z większą liczbą mitochondriów łatwiej wchodzi na drogę apoptozy.

Wysoka zawartość komórek wykazujących zmiany w błonie komórkowej przejawiające się przemieszczeniem fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej, wśród komórek linii melanotycznej, może być kolejnym elementem ilustrującym opisywane we wcześniejszych pracach różnice w budowie błony komórkowej w komórkach obu linii czerniaka (tab. 1). Wysoki odsetek komórek czerniaka melanotycznego z obecną po stronie zewnętrznej błony komórkowej fosfatydyloseryną może również być związany z obserwowaną egzocytozą melanosomów z komórek czerniaka do otaczającego środowiska [25, 182, 312], gdyż na eksternalizację fosfatydyloseryny w procesach egzocytozy zwracają uwagę inni autorzy [347].

Wyniki obecnej pracy wskazujące, iż liczba komórek z aktywnymi kaspazami w obu liniach jest podobna wraz z wcześniejszą obserwacją o wyższej aktywności kaspazy 3 w komórkach linii amelanotycznej [175], mogą wskazywać na znaczenie tej kaspazy w przemianie formy melanotycznej w amelanotyczną np. poprzez wpływ na zahamowanie procesu melanogenezy. Wydaje się to prawdopodobne wobec obserwacji Woenckaus i wsp. wykazującej zależność między aktywacją kaspazy 3, a obniżeniem ekspresji receptora c-Kit [329], co uważane jest za przejaw progresji czerniaka [44] i może prowadzić do zahamowania syntezy melaniny w komórkach, gdyż ligandem dla tego receptora jest SCF (stem cell factor) stymulujący m.in. melanogenezę w melanocytach [5]. O tym, iż utrata receptora c-Kit może mieć znaczenie przy przemianie formy melanotycznej w amelanotyczną świadczy obserwacja Potti i wsp. wskazująca, iż komórki w ponad 95% przerzutach czerniaka amelanotycznego wykazują brak ekspresji receptora c-Kit [236]. Jednakże wobec braku w piśmiennictwie danych na temat udziału kaspaz w procesie melanogenezy, na podstawie przesłanek wynikających z rezultatów obecnej pracy można tylko domniemywać, iż kaspazy mogłyby odgrywać rolę w procesie odróżnicowania komórek czerniaka.

Jak już wspomniano, na udział kaspaz nie tylko w apoptozie, ale i w różnicowaniu komórek prawidłowych wskazują coraz liczniejsze prace, chociaż mechanizm działania kaspaz w regulacji tych procesów jest jeszcze mało poznany [1, 183, 337, 342].

W związku z ogólnie przyjmowanym schematem przebiegu drogi wewnętrznej apoptozy [203, 293], zaobserwowane w obecnych badaniach obniżenie potencjału transbłonowego mitochondriów w komórkach obu linii czerniaka

wraz z uwalnianiem cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy i aktywacją kaspazy 9, wskazują, iż w apoptozie spontanicznej zarówno komórek linii melanotycznej, jak i amelanotycznej dochodzi do aktywacji drogi wewnętrznej, co przy jednocześnie większej liczbie komórek apoptycznych w czerniaku melanotycznym może wskazywać, iż w komórkach tej linii łatwiej dochodzi do uruchamiania tej drogi apoptozy. Może to oznaczać, iż komórki czerniaka melanotycznego są wrażliwe na jakiś czynnik indukujący apoptozę spontaniczną związany z zachodzącą tam melanogenezą, o czym pisano już wcześniej.

Po indukcji apoptozy kamptotecyną również droga wewnętrzna ulega wyrażonej aktywacji, ale tylko w komórkach czerniaka amelanotycznego, o czym świadczy wzrost liczby komórek z obniżonym potencjałem transbłonowym mitochondriów, wzrost zawartości cytochromu c w cytosolu oraz wzrost zawartości fragmentów kaspazy 9 świadczących o jej aktywacji, w porównaniu z komórkami czerniaka amelanotycznego inkubowanymi bez kamptotecyny.

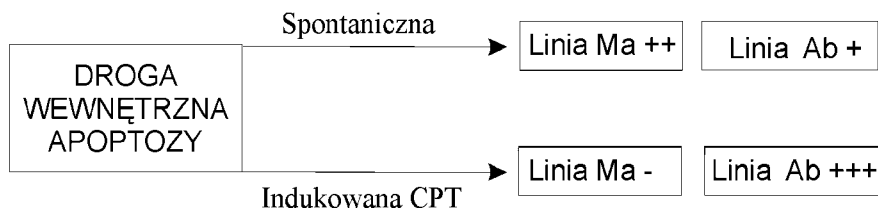
Na drogę wewnętrzną w przebiegu apoptozy wywołanej działaniem kamptotecyny wskazują obserwacje innych autorów badających mechanizm apoptycznego działania tej substancji w komórkach różnych nowotworów [188, 235, 252, 275], w tym i w czerniaku [188].

Analiza obecności wybranych zasadniczych elementów drogi wewnętrznej: cytochromu c, kaspazy 9 nie wykazała istotnych różnic w udziale tych czynników w apoptozie spontanicznej komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, jednakże ta droga ulegała wzmocnieniu w komórkach linii amelanotycznej pod wpływem kamptotecyny, przy braku wzrostu jej aktywacji w komórkach czerniaka melanotycznego.

Poza drogą wewnętrzną, w której główną rolę pełnią mitochondria, w indukcji apoptozy biorą udział receptory błonowe związane ze śmiercią komórki np. receptor Fas, który po połączeniu z ligandem – FasL aktywuje kaspazę 8. Stwierdzona w obecnej pracy w komórkach obu badanych linii czerniaka niska zawartość prokaspazy 8 wraz z opisaną wcześniej na tych komórkach niską ekspresją receptora Fas [346], wydaje się świadczyć o niewielkim udziale drogi receptorowej w apoptozie komórek obu badanych linii czerniaka przeszczepialnego i jest to zgodne z doniesieniami o wyłączeniu tej drogi apoptozy w komórkach czerniaka u człowieka jako elementu obrony tych komórek przed czynnikami wydzielanymi przez komórki układu immunologicznego [79, 141].

W piśmiennictwie zwraca się uwagę, iż za wyłączenie drogi zewnętrznej apoptozy w komórkach czerniaka u człowieka może odpowiadać obserwowana wysoka ekspresja białka FLIP uniemożliwiającego aktywację prokaspazy 8 [147].

Wzrost ekspresji cząsteczki FasL wraz z wydłużaniem inkubacji komórek czerniaka melanotycznego, wobec braku różnic w zawartości kaspazy 8 i produktów jej aktywacji, również nie wydaje się być związany z istotnymi zmianami w apoptozie tych komórek, a raczej mógłby być wyrazem opisywanego udziału tej cząsteczki w eliminacji limfocytów cytotoksycznych [148, 284].



Ryc. 22. Ilustracja różnic w nasileniu drogi wewnętrznej apoptozy w komórkach czerniaka melanotycznego (Ma) i amelanotycznego (Ab) w trakcie apoptozy spontanicznej i indukowanej CPT.

Fig. 22. The intensity of intrinsic way of spontaneous and CPT-induced apoptosis in melanotic (Ma) and amelanotic (Ab) melanoma cells.

Wobec nie stwierdzenia różnic dotyczących obecności zasadniczych elementów drogi wewnętrznej apoptozy w komórkach czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, podjęto próbę określenia udziału wybranych czynników regulujących przebieg apoptozy, co mogłoby wyjaśnić obserwowaną różną zdolność do apoptozy komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego (ryc. 22).

Wielokrotnie już w tej pracy wspomiano, iż za regulację apoptozy w komórkach odpowiadają białka rodziny Bcl-2, wśród których są białka działające pro- jak i antyapoptycznie [3, 247]. Białka Bax i Bak uważane za główne czynniki proapoptyczne rodziny białek Bcl-2 biorą udział w tworzeniu porów w błonie mitochondrialnej (co prowadzi do uwalniania znajdujących się tam czynników apoptogennych), ale proces ten może być hamowany przez białko Bcl-2, od którego pochodzi nazwa całej rodziny [48, 247]. Powszechnie uważa się, iż wzrost zawartości białka Bcl-2 przedłuża życie komórki poprzez blokowanie apoptozy indukowanej przez różne czynniki [3].

Badane w obecnej pracy komórki czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, różniące się zdolnością do apoptozy spontanicznej, wykazywały jednak podobną zawartość białka antyapoptycznego Bcl-2, co mogłoby sugerować, iż obserwowana niższa zdolność do apoptozy spontanicznej komórek czerniaka amelanotycznego nie zależy od ilości białka Bcl-2. Należy jednak pamiętać, iż aktywność białka Bcl-2 w komórce jest regulowana poprzez np. fosforylację [78, 191], zatem ilość białka nie musi odzwierciedlać jego aktywności biologicznej. Doniesienia na temat roli białka Bcl-2 w apoptozie komórek czerniaka i rozwoju tego nowotworu są niejednoznaczne [184, 223, 241, 267, 302, 317]. Trzeba tu również dodać, iż białko Bcl-2 współdziała z innymi białkami rodziny, do której należy, a ostateczny efekt w postaci zahamowania apoptozy jest wynikiem skomplikowanych i jeszcze nie do końca poznanych oddziaływań [166, 167, 247, 256, 310].

Brak wzrostu zawartości antyapoptycznego białka Bcl-2 w komórkach czerniaka melanotycznego pod wpływem kamptotecyny może wskazywać, iż białko to nie odpowiada za obserwowany brak aktywacji drogi wewnętrznej w tych komórkach.

Natomiast stwierdzony, ale dopiero po 24 godzinach inkubacji z kamptotecyną, wzrost zawartości Bcl-2 w komórkach linii amelanotycznej – przy prawie 60% komórek wykazujących cechy późnej apoptozy – może sugerować, iż białko Bcl-2 nie hamuje skutecznie apoptozy indukowanej kamptotecyną. Wydaje się, że istotne znaczenie dla wyjaśnienia braku efektywnego hamowania apoptozy przez białko Bcl-2 w komórkach czerniaka amelanotycznego inkubowanych z kamptotecyną, może mieć obserwowana przez innych autorów proteoliza tego białka w czasie apoptozy indukowanej przez różne substancje [71, 163, 341] w tym i przez kamptotecynę [191]. Powstający w wyniku proteolizy Bcl-2 fragment o m.cz. około 20 kDa ma właściwości proapoptyczne podobne do Bax i powoduje zwiększenie uwalniania cytochromu c z mitochondriów [71, 163]. Zatem wysoka zawartość Bcl-2 nie zawsze musi być związana z hamowaniem apoptozy, a wręcz może jej sprzyjać jeżeli w wyniku proteolizy z udziałem kaspaz pojawiają się fragmenty o działaniu proapoptycznym [71].

Wyniki obecnej pracy stwierdzające zachodzenie proteolizy Bcl-2, przy obserwowanej jednocześnie aktywacji kaspazy 3 i 9 i wzroście uwalniania cytochromu c, mogą wskazywać, iż kamptotecyna w komórkach czerniaka amelanotycznego powoduje proteolizę Bcl-2 z udziałem kaspaz, o czym donoszą również inni autorzy [163, 307, 341]. Wydaje się zatem, iż sugestia, że w komórkach czerniaka amelanotycznego białko Bcl-2 nie hamuje skutecznie apoptozy indukowanej kamptotecyną, a raczej ją wzmacnia, wspomagając proces niszczenia komórek, w terapii tego nowotworu mogłaby stanowić wskazówkę przy indukowaniu apoptozy kamptotecyną.

Wobec podkreślanej roli surwiwiny w regulacji apoptozy i proliferacji [6, 185, 227] (a intensywnością tych procesów, jak już podkreślano, różnią się badane linie czerniaka), stwierdzona podobna zawartość tego białka w komórkach czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, wydaje się sugerować, iż nie decyduje ono o obserwowanych różnicach w tempie wzrostu i zdolności do apoptozy spontanicznej tych komórek. Chociaż inni autorzy wykazali, że obniżanie zawartości surwiwiny w komórkach nowotworowych *in vitro* np. poprzez zablokowanie jego transkrypcji, podwyższa wrażliwość komórek różnych nowotworów, w tym i czerniaka, na działanie niektórych chemioterapeutyków [113, 145, 227, 345], w tym pochodnej kamptotecyny – topotekanu [230].

Podwyższoną zawartość surwiwiny w komórkach czerniaka u człowieka w porównaniu z melanocytami wykazano już wcześniej [105, 112], ale brak było w piśmiennictwie do tej pory porównania zawartości tego białka w komórkach czerniaka melanotycznego i amelanotycznego. Należałoby jednak dodać, że obserwowana tendencja do wzrostu zawartości surwiwiny w trakcie wydłużania czasu inkubacji komórek badanych czerniaków mogłaby sugerować, iż komórki obu linii czerniaka

odpowiadają wzrostem zawartości surwiwiny – ale pomimo to apoptoza jest kontynuowana. Wyjaśnienie tego zagadnienia jest bardzo trudne na tym etapie badań, ponieważ wiadomo już z wyników prac innych autorów, iż surwiwina występuje w komórce w różnych formach, wykazując różną lokalizację, co może prowadzić do różnych efektów biologicznych np. surwiwina zlokalizowana w mitochondriach działa antyapoptycznie, zaś inna forma określana jako surwiwina 2B – proapoptycznie [41, 187]. Lokalizację surwiwiny w jądrze uważa się obecnie za negatywny czynnik w prognozowaniu przebiegu choroby nowotworowej [186], a w czerniaku wraz z progresją, surwiwina lokalizuje się głównie w jądrze [75]. Poza tym nawet pojedyncza mutacja w genie może zmienić właściwości antyapoptyczne w proapoptyczne surwiwiny [285]. W obecnej pracy nie oceniano występowania różnych form surwiwiny, zatem nie wiadomo która jej forma pojawia się w komórkach w apoptozie spontanicznej, a która w indukowanej kamptotecyną.

Przedstawione powyżej dane z piśmiennictwa dotyczącego surwiwiny wskazują, iż niewątpliwie surwiwina jest białkiem zaangażowanym w regulację apoptozy komórek nowotworowych, to jednak pomimo prawie dziesięciu lat badań nad tym białkiem nadal mechanizm antyapoptycznego działania jest nie wyjaśniony.

Na uwagę jednak w komórkach czerniaka amelanotycznego chomika zasługuje obserwowana tendencja wzrostu surwiwiny w trakcie inkubacji tych komórek z kamptotecyną, co wraz ze stwierdzonym wyraźnym wzrostem zawartości komórek z aktywnymi kaspazami może sugerować nieskuteczną blokadę aktywacji kaspaz przez surwiwinę, za co zgodnie z obserwacjami innych autorów mogłoby odpowiadać uwalnianie z mitochondriów białko Smac/Diablo hamujące antyapoptyczne działanie białek IAP do których należy surwiwina [185, 207].

Biorąc pod uwagę obserwacje innych autorów stwierdzające obecność surwiwiny głównie w komórkach znajdujących się w fazach cyklu G2/M [6, 8, 92, 185], możnaby obserwowane w obecnej pracy obniżenie apoptozy komórek z faz S/G2/M czerniaka amelanotycznego próbować wyjaśnić działaniem tego białka. Być może, że pomimo podobnej zawartości surwiwiny w komórkach obu linii czerniaka, w linii amelanotycznej, o większej liczbie komórek dzielących się, surwiwina znajduje więcej komórek docelowych dla swojego antyapoptycznego działania. Na antyapoptyczną rolę surwiwiny wobec dzielących się komórek czerniaka amelanotycznego mogłaby wskazywać również obserwacja o wzroście zawartości tego białka w trakcie inkubacji z kamptotecyną i wzrastającej liczbie komórek apoptycznych pochodzących z faz G0/G1.

W świetle powyższych rozważań nad rolą surwiwiny w apoptozie komórek wykonane w obecnej pracy oznaczenia wskazują, że nie ilość tego białka decyduje o różnym nasileniu apoptozy w komórkach obu badanych linii czerniaka.

Ważnym czynnikiem związanym z uruchamianiem apoptozy, szczególnie w przypadku uszkodzenia DNA – jest gen p53 zwany „strażnikiem genomu” i jego produkt białko – p53 [253, 264]. Wyniki obecnych badań z zastosowaniem metody Western blot, nie wykazały obecności białka p53 w lizatach komórek czerniaka

przeszczepialnego chomika, co może wskazywać, iż zarówno w apoptozie spontanicznej, jak i indukowanej kamptotecyną, nie dochodzi do akumulacji tego białka w cytoplazmie. Za przyczynę obserwowanego braku akumulacji białka p53 w niektórych liniach czerniaka człowieka, uważa się mutacje w genie INK4A (charakterystyczna mutacja zachodząca w formie rodzinnej czerniaka), którego produkt – zmutowane białko p14 zwiększa degradację białka p53 w proteasomie [260]. Publikowane wyniki wielu badań nad rolą białka p53 w śmierci komórek czerniaka indukowanej różnymi chemioterapeutykami, są bardzo zróżnicowane i nie pozwalają na jednoznaczne określenie jego roli w apoptozie komórek tego nowotworu [77, 126, 142, 160, 208, 260].

W obecnych badaniach, przy braku akumulacji białka p53, wykryto fragmenty tego białka o masie cząsteczkowej około 37 kDa, które wydają się wskazywać, iż w komórkach obu badanych linii czerniaka zamiast akumulacji może dochodzić do degradacji białka p53.

W ostatnim czasie pojawiło się doniesienie o proteolizie białka p53 przy udziale kaspaz, głównie kaspazy 3, w trakcie apoptozy, innych niż czerniak, komórek nowotworowych [263]. W wyniku tej proteolizy niektóre fragmenty (m.in. o m.cz. 37 kDa – a taki obserwowano w naszych badaniach) przemieszczają się do mitochondriów i indukują spadek potencjału transblonowego mitochondriów [263]. Obserwacja ta jest szczególnie interesująca wobec stwierdzenia w obecnej pracy wzrostu liczby komórek z obniżonym potencjałem transblonowym mitochondriów w apoptozie spontanicznej i indukowanej czerniaka melanotycznego i amelanotycznego.

Aby wyjaśnić obserwowaną śmierć komórek czerniaka melanotycznego (wzrost liczby komórek z pęknięciami DNA wykrywanymi metodą TUNEL) przy jednoczesnym braku wzrostu aktywacji kaspaz, oceniano w cytoplazmie komórek badanych linii czerniaka zawartość białka AIF – uważanego za główne białko powodujące śmierć apoptyczną komórek bez konieczności aktywacji kaspaz tzw. drogą mitochondrialną niezależną od kaspaz [43, 197], o czym pisało wcześniej. Wyniki niniejszej pracy stwierdzające obecność AIF w cytoplazmie zarówno komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego wskazywały na możliwość udziału tego czynnika w apoptozie spontanicznej badanych komórek, co byłoby zgodne z obserwacją Loefflera i wsp. o udziale AIF w spontanicznej apoptozie komórek linii COS i Rat1 wykazujących wysoką zawartość AIF [195].

Jednak wyższa zawartość AIF w komórkach linii amelanotycznej, charakteryzującej się niższą apoptozą spontaniczną, w porównaniu z linią melanotyczną, wydaje się świadczyć, iż czynnik ten nie odgrywa decydującej roli w apoptozie spontanicznej badanych komórek czerniaka, ponieważ komórki te giną głównie drogą apoptozy z udziałem kaspaz.

Natomiast obniżenie zawartości AIF w cytosolu komórek czerniaka amelanotycznego, po inkubacji z kamptotecyną, w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez kamptotecyny, można próbować wyjaśnić przemieszczaniem się

AIF z mitochondriów, poprzez cytoplazmę, do jądra – miejsca proapoptycznego działania tego czynnika jako endonukleazy, na co wskazują inni autorzy [67, 214, 293]. Obserwowana tendencja do wzrostu zawartości AIF w czasie inkubacji komórek linii amelanotycznej z kamptotecyną, może świadczyć, iż poza wyraźną aktywacją drogi mitochondrialnej z udziałem kaspaz, dochodzi w tych komórkach także do aktywacji drogi niezależnej od kaspaz przebiegającej z udziałem AIF, na co wskazują istniejące doniesienia o udziale AIF w apoptozie innych komórek nowotworowych [64, 95, 252].

Natomiast wobec braku wzrostu zawartości AIF w cytoplazmie komórek linii melanotycznej inkubowanych z kamptotecyną, obserwowany wzrost komórek wykazujących pęknięcia DNA wykrywane metodą TUNEL przy jednoczesnym braku aktywacji kaspaz, nie wydaje się być efektem działania AIF. Może to oznaczać, iż wzrost liczby komórek z wyżej opisanymi zmianami w DNA w linii melanotycznej pod wpływem kamptotecyny może być efektem działania innego niż AIF czynnika uwalnianego z mitochondriów w trakcie apoptozy np. endonukleazy G [190, 197, 325].

Biorąc pod uwagę sugerowany przez innych autorów udział AIF (ma aktywność oksydoreduktazy i lokalizuje się w łańcuchu oddechowym mitochondriów) w produkcji ATP w mitochondriach [214], nie można wykluczyć, iż obserwowana wyższa zawartość AIF w komórkach czerniaka amelanotycznego może wiązać się ze stwierdzoną również w tej pracy wyższą wartością FL2/FL1 w porównaniu z komórkami czerniaka melanotycznego. Mogłoby to sugerować, iż AIF w komórkach czerniaka amelanotycznego bierze również udział w procesach związanych z produkcją energii w mitochondriach.

6. WNIOSKI

1. Wraz ze spontaniczną przemianą czerniaka melanotycznego w formę amelanotyczną, o bardziej agresywnym fenotypie, następuje obniżenie zdolności do apoptozy spontanicznej komórek tego nowotworu.
2. Wyniki wskazujące, że najbardziej wrażliwe na apoptozę były komórki dzielące się (z faz S/G2/M) i dotyczyło to głównie linii melanotycznej, upoważniają do stwierdzenia, iż śmierć komórek obu linii czerniaka zachodząca drogą apoptozy zależy od fazy cyklu w jakiej komórki się znajdują oraz od typu czerniaka.
3. Choć stopień zróżnicowania komórek czerniaka nie wpływa na zmianę, w zakresie elementów badanych w obecnej pracy, drogi przebiegu apoptozy zarówno spontanicznej jak i indukowanej oraz w niewielkim tylko zakresie wpływa na zmianę pod wpływem kamptotecyny udziału badanych czynników regulujących ten proces, to jednak w komórkach słabiej zróżnicowanych następuje wyraźna aktywacja drogi wewnętrznej.
4. Przemiana linii melanotycznej w amelanotyczną formę czerniaka zdecydowanie zwiększa reaktywność komórek tego nowotworu na indukcję apoptozy przez kamptotecynę, co zasługuje na szczególne podkreślenie wobec niezgodności poglądów czy stopień zróżnicowania komórek czerniaka powinien być brany pod uwagę przy wyborze terapii i upoważnia do wyciągnięcia następnego wniosku, że:
5. Cechy biologiczne czerniaka powinny być brane pod uwagę jeśli terapia tego nowotworu prowadzona przez indukcję apoptozy ma być w pełni efektywna.

7. STRESZCZENIE

Czerniak jest jednym z nowotworów wykazujących ciągłą tendencję do wzrostu wskaźnika zachorowalności, przy jednocześnie mało poznanej biologii komórek i przyczynach powstawania tego nowotworu. W związku z niepowodzeniami terapeutycznymi trwają intensywne badania nad poznaniem biologii czerniaka, aby wykryć cele molekularne, które stanowiłyby pomoc w wyborze terapii dla danego pacjenta i pozwalały na monitorowanie jej skuteczności.

Jedną z form czerniaka najmniej poznaną jest czerniak amelanotyczny charakteryzujący się brakiem melaniny, co wiąże się z mniejszym zróżnicowaniem komórek tego nowotworu i szybszym tempem wzrostu, a także większą złośliwością i gorszym rokowaniem, w porównaniu z formą melanotyczną czerniaka. Z powodu jednak braku systematycznych badań nad biologią czerniaka amelanotycznego powstaje pytanie jakie znaczenie dla biologii czerniaka ma utrata barwnika, w aspekcie klinicznym, dla wyboru sposobu leczenia, prognozy.

Jednym z zagadnień w biologii nowotworów bardzo intensywnie badanym w ostatnich latach jest śmierć komórek nowotworowych, zachodząca drogą apoptozy. Wobec niekwestionowanej roli apoptozy w rozwoju nowotworów celowe wydaje się porównanie parametrów charakteryzujących ten proces w komórkach czerniaka melanotycznego i amelanotycznego i określenie czy obserwowane wraz z rozwojem czerniaka zmiany jego cech biologicznych takich jak np. tempo wzrostu, stopień zróżnicowania komórek mogą być związane ze zmianami zdolności do apoptozy komórek nowotworowych.

Zagadnienie to ze względów terapeutycznych jest bardzo ważne, ponieważ czerniak charakteryzuje się szczególną opornością na chemioterapię, która jak wiadomo indukuje apoptozę w komórkach.

Zatem wykorzystane w obecnych badaniach dwie linie: melanotyczna i amelanotyczna (powstała w wyniku spontanicznej przemiany z linii melanotycznej) czerniaka przeszczepialnego chomika umożliwiły przeprowadzenie badań porównawczych nad biologią tych dwóch form czerniaka, różniących się cechami biologicznymi.

Badania nad rozwojem nowotworów aktualnie wydają się wskazywać, iż ich wzrost jest wypadkową zdolności komórek nowotworowych do proliferacji i śmierci, ale nadal pozostaje kwestią sporną, który z tych procesów przeważa i decyduje o rozwoju poszczególnych nowotworów, dotyczy to również czerniaka.

Dotychczas brak było prób powiązania zmian zdolności do apoptozy z cechami biologicznymi badanych form czerniaka.

Zagadnienie to wydaje się szczególnie istotne jeżeli weźmie się pod uwagę, iż amelanizacja komórek czerniaka melanotycznego towarzyszy progresji tego nowotworu u człowieka, czego przejawem mogą być obserwowane przerzuty amelanotyczne.

W celu określenia zdolności do apoptozy komórek badanych linii czerniaka wybrano ocenę zmian potencjału transbłonowego mitochondriów (barwienie JC-1) i zmian w strukturze błony komórkowej polegających na przemieszczaniu się fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej (tzw. eksternalizacja PS; test wiązania Aneksyny V) oraz ocenę aktywacji kaspaz (metodą FLICA) i degradację DNA (ocena pęknięć nici DNA wykrywana metodą TUNEL). Badania te dotyczyły apoptozy spontanicznej i indukowanej kamptotecyną.

Poza oceną zdolności do apoptozy komórek czerniaka melanotycznego i amelanotycznego, oceniano dynamikę przebiegu apoptozy, określano z jakich faz cyklu komórkowego pochodzą komórki ginące drogą apoptozy, oceniano udział elementów wewnętrznej i zewnętrznej drogi apoptozy oraz udział wybranych białek antyapoptycznych i proapoptycznych w apoptozie tych komórek.

Wyniki oznaczeń procentowej zawartości komórek wykazujących cechy komórek apoptycznych wyraźnie wykazały, iż wśród komórek linii melanotycznej jest więcej komórek apoptycznych, niż w powstałej z niej linii amelanotycznej – bardziej agresywnej. Jednocześnie komórki czerniaka amelanotycznego wykazywały zdecydowanie wyższą reaktywność na indukcję apoptozy przez kamptotecynę, a ginące komórki pochodziły w początkowych godzinach z faz S/G2/M, a potem również z faz G0/G1.

Na szczególną uwagę zasługuje obserwacja, iż w linii Ma drogą apoptozy spontanicznej ginie trzy razy więcej dzielących się komórek (z faz S/G2/M) niż w linii Ab.

Niewielka ekspresja receptora Fas, śladowa zawartość prokaspazy-8 oraz fragmentów świadczących o jej aktywacji, wydają się świadczyć, iż droga wewnętrzna z udziałem układu Fas/FasL w apoptozie spontanicznej, jak i indukowanej kamptotecyną nie odgrywa istotnej roli.

Natomiast uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytosolu oraz aktywacja prokaspazy 9, wskazują, iż droga wewnętrzna apoptozy jest aktywna w komórkach obu linii czerniaka w trakcie apoptozy spontanicznej. Natomiast po działaniu kamptotecyny droga ta ulega jeszcze większej aktywacji, ale tylko w komórkach linii Ab, o czym świadczy wzrost uwalniania cytochromu c do cytosolu, wyraźna aktywacja prokaspazy 9 w porównaniu z komórkami inkubowanymi bez tego induktora.

Obserwowana proteoliza polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) świadczy o aktywności kaspaz efektorowych w komórkach badanych linii czerniaka.

Komórki obu linii nie różnią się znacząco zawartością antyapoptycznych białek: Bcl-2, surwiwiny. Jednakże w trakcie apoptozy spontanicznej i indukowanej wzrasta zawartość surwiwiny w komórkach obu linii czerniaka, a w komórkach linii Ab dochodzi jeszcze do wzrostu białka Bcl-2.

Jednocześnie nie obserwowano akumulacji białka p53 w badanych komórkach w trakcie apoptozy spontanicznej, jak i indukowanej kamptotecyną.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań porównawczych można stwierdzić, że wraz ze spontaniczną przemianą czerniaka melanotycznego

w formę amelanotyczną, o bardziej agresywnym fenotypie, następuje obniżenie zdolności do apoptozy spontanicznej komórek tego nowotworu, przy jednocześnie zdecydowanie wyższej reaktywności komórek tego nowotworu na indukcję apoptozy przez kamptotecynę, co wydaje się szczególnie cenną obserwacją wobec braku zgodności czy melanizacja komórek czerniaka, a więc stopień ich zróżnicowania, powinna być brana pod uwagę przy wyborze terapii.

Obserwacja iż, najbardziej wrażliwe na apoptozę były komórki dzielące się (z faz S/G2/M) i fakt, że zdecydowanie więcej tych komórek ginęło w linii melanicznej, upoważnia do stwierdzenia, iż śmierć komórek obu linii czerniaka zachodząca drogą apoptozy zależy od fazy cyklu, w jakiej te komórki się znajdują oraz od typu czerniaka.

Zaś główną drogą apoptozy spontanicznej w komórkach czerniaka jest droga wewnętrzna i nie ulega ona zmianom (w zakresie elementów badanych w obecnej pracy) wraz z nabywaniem nowych cech biologicznych przez komórki czerniaka. Jednakże w komórkach czerniaka amelanotycznego dochodzi do wyraźnej aktywacji tej drogi pod wpływem kamptotecyny.

Regulacja apoptozy przez czynniki badane w niniejszej pracy (białko Bcl-2, surwiwinę, białko p53) w nieznacznym stopniu zmieniała się wraz z nabywaniem nowych cech biologicznych przez komórki czerniaka.

W świetle wyników uzyskanych w obecnej pracy wydaje się, iż cechy biologiczne czerniaka powinny być brane pod uwagę, jeśli terapia tego nowotworu prowadzona przez indukcję apoptozy ma być w pełni efektywna.

8. SUMMARY

Melanotic melanoma is a tumor about whose development and biology we still little know, although we observe an increasing number of people with melanoma. Because of ineffective tumor therapies intensive investigations are carried out concerning the biology of this tumor, to establish the molecular targets for individual therapies and ways of monitoring the effectiveness of them.

Amelanotic melanoma is one of the less known forms of melanoma which is characterized by a lack of melanin, indicating a lower level of differentiation of the cells of this tumor and a higher growth rate, higher malignancy and worse prognosis than in the case of melanotic melanoma.

Since there have not been any systematic investigations on the biology of amelanotic melanoma the question arises, as to whether the lack of melanin should be taken into account during the choosing of therapy or estimating the prognosis.

Tumor cell death by apoptosis is one of the very intensively investigated problems in tumor biology. The decreased ability of tumor cells to undergo apoptosis is well documented. But it seems to be of some purpose to determine the parameters of the apoptosis of melanotic and amelanotic melanoma cells and establish if the changes of the biological features (the growth rate, cell differentiation) observed during melanoma progression could be connected with a changed ability of tumor cells to undergo apoptosis.

This problem is very important in melanoma therapy because of the special insensitivity of melanoma cells to chemotherapy, in which apoptosis is the main way of tumor cell death.

Thus two lines: melanotic and amelanotic (developed by a spontaneous alteration from melanotic line) of hamster transplantable melanoma seem to be a good model for comparative investigations into the biology of these melanoma lines.

Investigations on tumor development indicate that tumor growth is the result of tumor cells' ability to proliferate and die, but we do not know yet which of these processes determines tumor development. This also applies to melanoma.

There were no works trying to find some interrelationship between changes in the ability to undergo apoptosis and the biological features of melanoma.

This problem seems to be very important, especially in the context of the observation that amelanization of melanotic melanoma cells is connected with this tumor progression during metastatic phase.

Melanoma cells' ability to undergo apoptosis has been determined by estimating changes in mitochondrial transmembrane potential (JC-1 staining), changes in the plasma membrane structure (phosphatidylserine serine externalization determined by Annexin V binding); percent of cells with activated caspases (FLICA method) and DNA degradation (TUNEL method). Spontaneous and camptothecin induced apoptosis of melanoma cells was examined. Apart

from the ability to undergo apoptosis, the dynamics of this process and cell cycle phases at which cells died were investigated. Elements of extrinsic and intrinsic ways of apoptosis, as chosen proapoptotic and antiapoptotic regulators of this process, were also examined.

The results clearly showed that the percentage of apoptotic cells was higher among melanotic than among amelanotic melanoma cells. But simultaneously, this amelanotic – more malignant melanoma line was more sensitive to camptothecin-induced apoptosis. At the beginning of the experiment dying cells came mainly from S/G2/M phases, but with extended time cells also came from G0/G1 phase.

Very interesting is the observation that in the melanotic melanoma line three times more cells from S/G2/M phases die by apoptosis than in the faster growing amelanotic melanoma line.

The low expression of Fas receptor and only a trace of procaspase 8 seem to indicate that the with Fas/FaL system extrinsic way of apoptosis does not play a significant role in spontaneous or camptothecin induced apoptosis of the melanoma cells examined.

Cytochrome c release from mitochondria into cytosol and procaspase 9 activation, indicate that intrinsic way plays the main role in the spontaneous apoptosis of melanotic and amelanotic melanoma cells. The observed increase in cytochrome c release and activation of procaspase 9 in amelanotic melanoma cells, under the influence of camptothecin, show that this way is overactivated in comparison to spontaneous apoptosis.

In both melanoma cells the content of antiapoptotic protein Bcl-2 and survivin was similar, but during spontaneous and camptothecin-induced apoptosis survivin increased in both lines, and, additionally, Bcl-2 increased in amelanotic melanoma.

No accumulation of protein p53 has been observed during spontaneous and camptothecin-induced apoptosis of both melanoma lines examined.

The results from these comparative investigations show that with a spontaneous alteration of melanotic melanoma into a more malignant amelanotic form, the ability to undergo spontaneous apoptosis of this tumor decreases simultaneously with the increased reactivity to camptothecin-induced apoptosis.

In view of the controversy whether melanoma cell melanization should be taken into consideration when choosing therapy, this observation is worth notice.

The observations that mainly proliferating cells (from phases S/G2/M) were sensitive to apoptosis and that less proliferating cells died in amelanotic melanoma, indicate that the process of apoptosis depends on the cell cycle phase and type of melanoma cells.

Melanotic and amelanotic melanoma spontaneously died mainly by intrinsic way of apoptosis, and this way seemed not to change (according to examined elements) with a spontaneous alteration of melanotic into amelanotic melanoma

cells. The intrinsic way is also the way of amelanotic melanoma cell death, induced by camptothecin.

The content of apoptosis regulators (protein Bcl-2, survivine, protein p53) does not change significantly with new biological features of melanoma cells.

The results of this work seem to indicate that the biological features of melanoma cells should be taken into consideration during the therapy of this tumor, to improve its effectiveness.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Abraham M, Shaham S. Death without caspases, caspases without death, *Trends Cell Biol*, 2004, 14, 184.
2. Adams D, Wahl M, Flowers J, Sen B, Colvin M, Dewhirst M, Manikumar G, Wani M. Camptothecin analogs with enhanced activity against human breast cancer cells. II. Impact of the tumor pH gradient, *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57, 145.
3. Adams J, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science*, 1998, 281, 1322.
4. Adler M, White C. Amelanotic malignant melanoma, *Sem Cutan Med Surg*, 1997, 16, 2, 122.
5. Alexeev V, Yoon K. Distinctive role of the c-Kit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes, *J Invest Dermatol*, 2006, 126, 1102.
6. Altieri D. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer, *Oncogene*, 2003, 22, 8581.
7. Ambrosini G, Adida C, Altieri D. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma, *Nat Med*, 1997, 3, 917.
8. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri D. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting, *J Biol Chem*, 1998, 273, 18, 11177.
9. Ameisen J. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years, *Cell Death Differ*, 2002, 9, 367.
10. Ancans J, Thody A. Activation of melanogenesis by vacuolar type H⁺-ATPase inhibitors in amelanotic, tyrosinase positive human and mouse melanoma cells, *FEBS Lett*, 2000, 478, 57.
11. Anichini A, Mortarini R, Sensi M, Zanon M. APAF-1 signalling in human melanoma, *Cancer Lett*, 2006, 238, 2, 168.
12. Ariel I. Malignant melanoma of the upper extremities, *J Surg Oncol*, 1981, 16, 2, 125.
13. Ariel I. Malignant melanoma of the trunk: a retrospective review of 1128 patients, *Cancer*, 1982, 49, 6, 1070.
14. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily, *Nat Rev Cancer*, 2002, 2, 420.
15. Atkins M, Lotze M, Dutcher J, Fisher R, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L, Rosenberg S. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993, *J Clin Oncol*, 1995, 17, 2105.
16. Azzola M, Shaw H, Thompson J, Soong S, Scolyer R, Watson G, Colman M, Zhang Y. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator

- than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma. An analysis of 3661 patients from a single center, *Cancer*, 2003, 97, 6, 1488.
17. Baldi A, Santini D, Russo P, Catricala C, Amantea A, Picardo M, Tatan-gelo F, Botti G, Dragonetti E, Murace R, Tonini G, Natali P, Baldi F, Paggi M. Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression, *Exp Dermatol*, 2004, 13, 2, 93.
 18. Banerjee S, Harris M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma, *Histopathol*, 2000, 36, 387.
 19. Barnhill R, Katzen J, Spatz A, Fine J, Berwick M. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma, *J Cutan Pathol*, 2005, 32, 4, 268.
 20. Barry M, Behnke C, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia, *Biochem Pharmacol*, 1990, 40, 2353.
 21. Bartkowiak P, Schumann J, Otto F, Lippold A, Drepper H. DNA flow cytometry in the prognosis of primary malignant melanoma, *Oncology*, 1991, 48, 39.
 22. Bednarek J, Kiliańska Z. Białka przestrzeni międzybłonowej mitochondriów uczestniczące w procesie apoptozy, *Post Bioch*, 2005, 51, 4, 447.
 23. Bennett D, Medrano E. Molecular regulation of melanocytes senescence, *Pigment Cell Res*, 2002, 15, 242.
 24. Bergman R, Shemer A, Levy R, Friedman-Birnbaum R, Trau H, Lichtig C. Immunohistochemical study of p53 protein expression in Spitz nevus as compared with other melanocytic lesions, *Am J Dermatopathol*, 1995, 17, 547.
 25. Bhatnagar V, Srirangam A, Abburi R. In vitro modulation of proliferation and melanization of melanoma. *Mol Cell Biochem*, 1998, 187, 1-2, 57.
 26. Bielak-Żmijewska A. Mechanizmy odporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos*, 2003, 52, 2-3, 157.
 27. Blagosklonny M. Molecular theory of cancer, *Cancer Biol Ther*, 2005, 4, 621.
 28. Bomirski A, Zawrocka-Wrzolek T, Pautsch F. Electron microscopic studies on transplantable melanotic and amelanotic melanomas in hamster, *Arch Derm Forsch*, 1973, 246, 284.
 29. Bomirski A, Kozłowska K, Żurawska-Czupa B. An attempt to prepare nonenzymatically a single cell suspension from solid transplantable melanomas, *Proceedings of the IX th International Conference of Pigment Cell*, Houston, Texas, 1975, 5.
 30. Bomirski A. Biological properties of transplantable melanomas in the Syrian hamster during 16 years of maintenance by several passages, *Gdansk, Medical Academy*, 1977.

31. Bomirski A, Slomiński A, Bigda J. The natural history of a family of transplantable melanomas in hamsters, *Cancer Metastasis, Rev*, 1988, 7, 95.
32. Bono A, Maurichi A, Moglia D, Camerini T, Tragni G, Lualdi M, Bartoli C. Clinical and dermatoscopic diagnosis of early amelanotic melanoma, *Melanoma Res*, 2001, 11, 491.
33. Bossernhoff A. Melanoma inhibitory activity (MIA): an important molecule in melanoma development and progression, *Pigment Cell Res*, 2005, 18, 411.
34. Bouchier-Hayes L, Martin S. CARD games in apoptosis and immunity, *EMBO Rep*, 2002, 3, 616.
35. Bradbury D, Simmons T, Slater K, Crouch S. Measurement of the ADP/ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis, *J Immunol Methods*, 2000, 240, 79.
36. Bras M, Queenan B, Susin S. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying, *Biochemistry (Moscow)*, 2005, 70, 284.
37. Bridelli M, Ciatì A, Crippa P. Binding of chemicals to melanin re-examined: adsorption of some drugs to the surface of melanin particles, *Biophys Chem*, 2006, 119, 137.
38. Brown J, Attardi L. The role of apoptosis in cancer development and treatment response, *Nature Rev*, 2005, 5, 231.
39. Bruno S, Giaretti W, Darzynkiewicz Z. Effect of camptothecin on mitogenic stimulation of human lymphocytes involvement of DNA topoisomerase I in cell transition from G0 to G1 phase of the cell cycle and in DNA replication, *J Cell Physiol*, 1992, 151, 478.
40. Bush J, Li G. The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma, *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20, 531.
41. Caldas H, Jiang Y, Holloway M, Fangusaro J, Mahotka C, Conway E, Altura R. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death, *Oncogene*, 2005, 24, 12, 1994.
42. Cameron D, Ritchie A, Miller W. The relative importance of proliferation and cell death in breast cancer growth and answer to tamoxifen, *Eur J Cancer*, 2001, 37, 1545.
43. Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzani N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria, *Biochimie*, 2002, 84, 2-3, 215.
44. Carlson J, Ross J, Slomiński A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, Mihm M. Molecular diagnostic in melanoma, *J Am Acad Dermatol*, 2005, 52, 743.
45. Carr K, Bittner M, Trent J. Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma, *Oncogene*, 2003, 22, 3076.

46. Cascinelli N, Heerlyn M, Schneeberger A, Kuwert C, Slominski A, Armstrong C, Belli F, Lukiewicz S, Maurer D, Ansel J, Stingl G, Saida T. What is the most promising strategy for the treatment of metastasizing melanoma?, *Exp Dermatol*, 2000, 9, 439.
47. Cerroni L, Soyer H, Kerl H. Bcl-2 protein expression in cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi, *Am J Dermatopathol*, 1995, 17, 7.
48. Chandra J, Mansson E, Gogvadze V, Kaufmann S, Albertioni F, Orrenius S. Resistance of leukemic cells to 2-chlorodeoxyadenosine is due to lack of calcium-dependent cytochrome c release, *Blood*, 2002, 99, 655.
49. Chipuk J, Bouchier-Hayes L, Green D. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario, *Cell Death Differ*, 2006, 13, 1396.
50. Chorąży M. Biologia molekularna chorób nowotworowych– oczekiwania, możliwości, granice, *Nowotwory*, 2002, 52, 6, 512.
51. Chu W, Pak B, Bani M, Kapoor M, Lu S, Tamir A, Kerbel R, Ben-david Y. Tyrosinase-related protein 2 as a mediator of melanoma specific resistance to Cis-diamminedichloroplatinum II: therapeutics implications, *Oncogene*, 2000, 19, 395.
52. Ciesielska E. Inhibitory topoizomerazy I – nowa klasa leków przeciwnowotworowych, *Post Biol Kom*, 1998, 25, 4, 613.
53. Cinti C, Trimarchi C, Giordano A. G1 phase progression and apoptosis. W: *G1 phase progression*, J. Boonstra, New York, Landes Bioscience/Kluwer Academic, 2004, 199-235.
54. Clark W, From L, Bernardino E, Mihm M. The histogenesis and biological behaviour of primary human malignant melanoma of the skin, *Cancer Res*, 1969, 29, 705.
55. Collins K, White W. Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM1) and bcl-2 are differentially expressed in early evolving malignant melanoma, *Am J Dermatopathol*, 1995, 17, 429.
56. Compagni A, Christofori G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis, *Br J Cancer*, 2000, 83, 1.
57. Connor F, Bertwistle D, Mee J, Ross G, Swift S, Grigorieva E, Tybulewicz V, Ashworth A. Tumorigenesis and DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation, *Nature Genet*, 1997, 17, 423.
58. Cornil I, Theodorescu D, Man S, Herlyn M, Jambrosic J, Kerbel R. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88, 6028.
59. Cos A, Garcia-Bolado A, Sanchez-Barcelo E. Direct antiproliferative effects of melatonin on two metastatic cell sublines of mouse melanoma (B16BL6 and PG19), *Melanoma Res*, 2001, 11, 197.

60. Cosarriza A, Ceccarelli D, Masini A. Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorimetric analysis at a single organelle level, *Exp Cell Res*, 1996, 22, 84.
61. Costa A, Silvestrini R, Grignolio E, Clemente C, Attili A, Testori A. Cell kinetics as a prognostic tool in patients with metastatic malignant melanoma of the skin, *Cancer*, 1987, 60, 2797.
62. Cotter T, Glynn J, Echeverri F, Green D. The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle, *Anticancer Res*, 1992, 12, 773.
63. Coutlas L, Strasser A. The role of the BCL-2 protein family in cancer, *Semin Cancer Biol*, 2003, 13, 115.
64. Cregan S, Fortin A, MacLaurin J, Callaghan S, Cecconi F, Yu S, Dawson T, Dawson V, Park D, Kroemer G, Slack R. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death, *J Cell Biol*, 2002, 158, 3, 507.
65. Czarna M, Jarmuszkiewicz W. Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki, *Post Bioch*, 2006, 52, 2, 145.
66. Darzynkiewicz Z, Williamson B, Carswell E, Old L. Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor, *Cancer Res*, 1984, 44, 83.
67. Daugas E, Susin S, Zamzani N, Ferri K, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost M, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis, *FASEB J*, 2000, 14, 729.
68. Davies H, Bignell G, Cox C, Stephensens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett M, Bottomley W, Davis N et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature*, 2002, 417, 949.
69. Dearth L, Brachmann R. ATP, cancer and p53, *Cancer Biol Ther*, 2004, 3, 7, 638.
70. De Cesare M, Perego P, Righetti S, Pratesi G, Carenini N, Rivoltini L, Zupi G, Del Bufalo D, Balsari A, Zunino F. Enhanced antitumor efficiency of gimatecan in combination with Bcl-2 antisense oligonucleotide in human melanoma xenografts, *Eur J Cancer*, 2005, 41, 1213.
71. Del Bello B, Valentini M, Zunino F, Comporti M, Maellaro E. Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells, *Oncogene*, 2001, 20, 4591.
72. De Jong J, Diest van P, Baak J. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer, *Br J Cancer*, 2000, 82, 368.
73. De Souza G, Godoy L, Teixeira V, Otake A, Sabino A, Rosa J, Dinarte A, Pinheiro D, Silva W, Eberlin M, Chammas R, Greene L. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation, *Proteomics*, 2006, 6, 1460.

74. Diaz G, Setzu D, Zucca A, Isola R, Diana A, Murru R, Sogos V, Gremo F. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells, *J Cell Sci* 1999, 112, 1077.
75. Ding Y, Prieto V, Zhang P, Rosenthal S, Smith K, Skelton H, Diwan A. Nuclear expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma, *Cancer*, 2006, 106, 5, 1123.
76. Dong X, Tyler D, Johnson J, DeMatos P, Seigler H. Analysis of prognosis and disease progression after local recurrence of melanoma, *Cancer*, 2000, 88, 1063.
77. Drewa G, Powierska-Czarny J. Genetyczne podłoże czerniaka złośliwego, *Post Hig Med Dośw*, 1998, 52, 4, 367.
78. Du L, Lyle C, Chambers T. Characterization of vinblastine-induced Bcl-xL and Bcl-2 phosphorylation: evidence for a novel protein kinase and a coordinated phosphorylation/dephosphorylation cycle associated with apoptosis induction, *Oncogene*, 2005, 24, 107.
79. Eberle J, Fecker L, Hossini A, Wieder T, Daniel P, Orfanos C, Geilen C. CD95/Fas signalling in human melanoma cells: conditional expression of CD95L/FasL overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants, *Oncogene*, 2003, 22, 9131.
80. Eigentler T, Buettner P, Leiter U, Garbe C. Impact of ulceration in stages I and III cutaneous melanoma as staged by the American Joint Committee on Cancer Staging System: an analysis of the German Central Malignant Melanoma Registry, *J Clin Oncol*, 2004, 22, 4376.
81. El Alaoui S, Lawry J, Griffin M. The cell cycle and induction of apoptosis in hamster a fibrosarcoma cell line treated with anticancer drugs: its importance to solid tumor chemotherapy. *J Neurooncol*, 1997, 1-2, 195.
82. Elbaz M, Avni A, Weil M. Constitutive caspase-like machinery executes programmed cell death in plant cells, *Cell Death Differ*, 2002, 9, 726.
83. Elstrom R, Bauer D, Buzzai M, Kornauskas R, Harris M, Plas D, Zhuang H, Cinalli R, Alavai A, Rudin C, Thompson C. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells, *Cancer Res*, 2004, 64, 3892.
84. Fang D, Nguyen T, Leishear K, Finko R, Kulp R, Hotz S, Van Belle P, Xu X, Elder D, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanoma, *Cancer Res*, 2005, 65, 9328.
85. Fecker L, Geilen C, Tchemev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov B, Schwarz C, Daniel P, Eberle J. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multi-domain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis, *J Invest Dermatol*, 2006, 126, 1366.
86. Feinberg A, Tycko B. The history of cancer epigenetics, *Nature Rev*, 2004, 4, 143.

87. Ferrari A, Bono A, Baldi M, Collini P, Casanova M, Pennacchioli E, Terenziani M, Marcon I, Santinami M, Bartoli C. Does melanoma behave differently in younger children than in adults? A retrospective study of 33 cases of childhood melanoma from a single institution, *Pediatrics*, 2005, 115, 3, 649.
88. Fink D, Schlagbauer-Wadl H, Selzer E, Lucas T, Wolff K, Pehamberger H, Eichler H, Jansen B. Elevated procaspases levels in human melanoma, *Melanoma Res*, 2001, 11, 385.
89. Fischer U, Jänicke R, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase, *Cell Death Differ*, 2003, 10, 76.
90. Flaherty K. Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma, *Clin Cancer Res*, 2006, 12, 7 Suppl, 2366.
91. Follstad B, Wang D, Stephanopoulos G. Mitochondrial membrane potential differentiates cells resistant to apoptosis in hybridoma cultures, *Eur J Biochem*, 2000, 267, 6534.
92. Fortugno P, Wall N, Giodini A, O'Connor D, Plescia J, Padgett K, Tongnin S, Marchisio P, Altieri D. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function, *J Cell Sci*, 2002, 115, 575.
93. Francken A, Shaw H, Thompson J, Soong S, Accort N, Azzola M, Scolyer R, Milton G, McCathy W, Colman M, McGovern V. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up, *Ann Surg Oncol*, 2004, 11, 4, 426.
94. Friesen C, Fulda S, Debatin K. Cytotoxic drugs and the CD-95 pathway, *Leukemia*, 1999, 13, 1854.
95. Fu Y, Yi Z, Yan Y, Qiu Z. Hydroxycamptothecin-induced apoptosis in hepatoma SMMC-7721 cells and the role of mitochondrial pathway, *Mitochondrion*, 2006, 6, 4, 211.
96. Fulda S, Küfer M, Meyer E, Valen van F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin K. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer, *Oncogene*, 2001, 20, 5865.
97. Furukawa Y, Nishimura N, Furukawa Y, Satoh M, Endo H, Iwase S, Yamada H, Matsuda M, Kano Y, Nakamura M. Apaf 1 is a mediator of E2F1-induced apoptosis, *J Biol Chem*, 2002, 277, 39760.
98. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhir R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub T, Rimm D, Meyerson M, Fisher D, Sellers W. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma, *Nature*, 2005, 436, 117.
99. Gatenby R, Gillies R. Why do cancers have higher aerobic glycolysis?, *Nature Rev*, 2004, 4, 891.

100. Gavrielli, Sherman Z, BenSasson S. Identification of programmed cell death in situ specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Cell Biol*, 1992, 148, 493.
101. Gibson L, Goellner J. Amelanotic melanoma: cases studied by Fontana stain, S-100 immunostatin, and ultrastructural examination, *Mayo Clin Proc*, 1988, 63, 8, 777.
102. Gong J, Chen N, Zhou Q, Yang B, Wang Y, Wang X. Melanoma inhibitor of apoptosis protein is expressed differentially in melanoma and melanocytic naevus, but similarly in primary and metastatic melanomas, *J Clin Pathol*, 2005, 58, 1081.
103. Goossens J, Henichart J, Dassonneville L, Facompre M, Bailly C. Relation between intracellular acidification and camptothecin-induced apoptosis in leukemia cells, *Eur J Pharm Sci*, 2000, 10, 125.
104. Gottlieb J, Luce J. Treatment of malignant melanoma with camptothecin (NSC 100880), *Cancer Chemother Rep*, 1972, 56, 103.
105. Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, Scarpa S, Cigna E, Vasaturo F, Bottoni U, Innocenzi D, Calvieri S, Scuderi N, Frati L, Agliano A. Survivin, bcl-2, bax and bcl-x gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients, *J Clin Oncol*, 2003, 21, 2, 306.
106. Grasl-Kraupp B, Luebeck G, Wagner A, Low-Baselli A, Gunst de M, Waldhor T, Moolgavkar S, Schulte-Hermann R. Quantitative analysis of tumor initiation in rat liver: role of cell replication in cell death (apoptosis), *Carcinogenesis*, 2000, 21, 1411.
107. Grądzka I. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium, *Post Bioch* 2000, 46, 1, 2.
108. Grądzka I. Mechanizmy i regulacja programowanej śmierci komórek, *Post Bioch*, 2006, 52, 2, 157.
109. Green D, Reed J. Mitochondria and apoptosis, *Science*, 1998, 281, 1309.
110. Greenwald I, Sterberg P, Horvitz H. The lin-12 locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*, *Cell*, 1983, 34, 2, 435.
111. Grichnik J, Burch J, Schulteis R, Shan S, Liu J, Darrow T, Vervaert C, Seigler H. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell, *J Invest Dermatol*, 2006, 126, 142.
112. Grossman D, McNiff J, Li F, Altieri D. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma, *J Invest Dermatol*, 1999, 113, 1076.
113. Grossman D, Altieri D. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets, *Cancer Metastasis Rev*, 2001, 20, 3.
114. Grossman D, Kim P, Schechner J, Altieri D. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting, *PNAS*, 2001, 98, 2, 635.
115. Grover R, Wilson G. Bcl-2 expression in malignant melanoma and its prognostic significance, *Eur J Surg Oncol*, 1996, 4, 1865.

116. Grzelakowska-Sztabert B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R, *Post Bioch*, 1998, 44, 1, 8.
117. Grzelakowska-Sztabert B. Apoptoza i nowotwory, *Post Biol Kom*, 2000, 27, Supp 15, 9.
118. Guliano A, Cochran A, Morton D. Melanoma from unknown primary site and amelanotic melanoma, *Sem Oncol*, 1982, 442.
119. Haass N, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma, *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2005, 10, 2, 153.
120. Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French L, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD-95) ligand: implications for tumor immune escape, *Science*, 1996, 274, 1363.
121. Halaban R, Cheng E, Zhang Y, Moellmann G, Hanlon D, Michalak M, Setaluri V, Hebert D. Abberant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 6210.
122. Halaban R, Patton R, Cheng E, Svedine S, Trombetta E, Wahl M, Ariyan S, Hebert D. Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway, *J Biol Chem*, 2002, 277, 17, 14821.
123. Halaban R. Rb/E2F: a two-edged sword in melanocytic system, *Cancer Metastasis Rev*, 2005, 24, 339.
124. Haliday G. Skin immunity and melanoma development, W: *Textbook of Melanoma*, J. Thompson, D. Morton, B. Kroon, London, New York, Taylor&Francis Group, 2004, 25-42.
125. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer, *Cell*, 2000, 100, 57.
126. Hartmann A, Blaszyk H, Cunningham J, McGovern R, Schroeder J, Helander S, Pittelkow M, Sommer S, Kovach J. Human Cancer. Overexpression and mutations of p53 in metastatic malignant melanomas, *Int J Cancer*, 1996, 67, 3, 313.
127. Helmbach H, Sinha P, Schadendorf D. Human melanoma: drug resistance, *Rec Results Cancer Res*, 2003, 161, 93.
128. Hendrix M, Seftor E, Hess A, Seftor R. Molecular plasticity of human melanoma cells, *Oncogene*, 2003, 22, 3070.
129. Herlyn M. Emerging concepts and technologies in melanoma research, *Melanoma Res*, 2002, 12, 3.
130. Herlyn M. Molecular targets in melanoma: strategies and challenges for diagnosis and therapy, *Int J Cancer*, 2006, 118, 523.
131. Hersey P, Zhang X. How human melanoma evade TRAIL-induced apoptosis?, *Nature Rev Cancer*, 2001, 1, 142.

-
132. Hersey P. Apoptosis and melanoma: how new insights are effecting the development of new therapies for melanoma, *Curr Opin Oncol*, 2006, 18, 189.
 133. Hickman J. Apoptosis and tumourigenesis, *Curr Opin GenetDev*, 2002, 12, 67.
 134. Hindermann W, Berndt A, Wunderlich H, Katekamp D, Kosmehl H. Quantitative evaluation of apoptosis and proliferation in renal cell carcinoma. Correlation of tumor subtype, cytological grade according to thoenes-classification and the occurrence of metastasis, *Pathol Res Pract*, 1997, 193, 1.
 135. Ho A, Dowby S. Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes, *Curr Opin Gene Dev*, 2002, 12, 47.
 136. Hofmann U, Houben R, Brocker E, Becker J. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion, *Biochimie*, 2005, 87, 307.
 137. Hsiang Y, Liu L. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin, *Cancer Res*, 1988, 48, 1722.
 138. Hsu M, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host, *Differentiation*, 2002, 70, 522.
 139. Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit V. I-Flice, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1 and CD-95-induced apoptosis, *J Biol Chem*, 1997, 272, 17255.
 140. Hunter T. Oncoprotein networks, *Cell*, 1997, 88, 333.
 141. Hussein M, Haemel A, Wood G. Apoptosis and melanoma: molecular mechanism, *J Pathol*, 2003, 199, 275.
 142. Hussein M. The TP53 tumor suppressor gene and melanoma tumorigenesis: is there a relationship?, *Tumour Biol*, 2004, 25, 4, 200.
 143. Huvos A, Shah J, Goldsmith M. A clinicopathologic study of amelanotic melanoma, *Sur Gynecol Obst*, 1972, 135, 917.
 144. Igney F, Krammer P. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis, *Nat Rev Cancer*, 2002, 2, 277.
 145. Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment, *Apoptosis*, 2002, 7, 1, 23.
 146. Irisarri M, Plumas J, Bonnefoix T, Jacob M, Roucard C, Pasquier M, Sotto JJ, Lajmanovich A. Resistance to CD-95-mediated apoptosis through constitutive FLIP expression in non-Hodgkin's lymphoma B cell line, *Leukemia*, 2000, 14, 2149.
 147. Irmeler M, Thome M, hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer J, Schroter M, Burns K, Mattman C, Rimoldi D, French L, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP, *Nature*, 1997, 388, 19.

148. Ivanov V, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptor and melanoma resistance to apoptosis, *Oncogene*, 2003, 22, 3152.
149. Jędrzejczak W. Immunoterapia czerniaka złośliwego. W: Czerniak złośliwy, Skowronek J, Mackiewicz A, Żygulska-Mach H, Poznań, Termedia Wydawnictwa Medyczne, 1998, 105-120.
150. Jia L, Srinivasula M, Liu F, Newland A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri E, Kelsey S. Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells, *Blood*, 2001, 98, 414.
151. Johnson J. Cell adhesion molecules in the developmental and progression of malignant melanoma, *Cancer Metastasis Rev*, 1999, 18, 345.
152. Joseph B, Ekedahl J, Sirzen F, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Differences in expression of pro-caspases in small-cell and non-small-cell lung carcinoma, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262, 381.
153. Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Huttemann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases, *Biochem Biophys Acta*, 2004, 1655, 400.
154. Kalbacova M, Vrbacky M, Drahota Z, Melkova Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell line using flow cytometry and spectrofluorometry, *Cytometry*, 2003, 52A, 110.
155. Kameyama K, Vieira W, Tsukamoto K, Law L, Hearing V. Differentiation and metastatic phenotype of murine melanoma cells, *Int J Cancer*, 1990, 45, 6, 1151.
156. Kapila K, Kharbanda K, Verma K. Cytomorphology of metastatic melanoma – use of S-100 protein in the diagnosis of amelanotic melanoma, *Cytopathology*, 1991, 2, 5, 229.
157. Karst A, Dai D, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas, *Oncogene*, 2005, 24, 6, 1111.
158. Kerr J, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figure, *J Pathol*, 1972, 107, 41.
159. Kerr J, Winterford C, Harmon B. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer*, 1994, 73, 2013.
160. Kichina R, Green A, Bratescu L, Das Gupta T. Establishment of a human melanoma cell line lacking p53 expression and spontaneously metastasizing in nude mice, *Anticancer Res*, 1994, 14, 6B, 2457.
161. Kiliańska Z, Miśkiewicz A. Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy, *Post Biol Kom*, 2003, 30, 1, 129.
162. Kim R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333, 336.
163. Kirsch D, Doseff A, Chau B, Lim D, de Souza-Pinto N, Hansford R, Kastan M, Lazebnik Y, Hardwick J. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c, *J Biol Chem*, 1999, 274, 30, 21155.

164. Kluza J, Lansiaux A, Wattez N, Hildebrand M, Leonce S, Pierre A, Hickmann J, Bailly C. Induction of apoptosis in HL-60 and B16 melanoma cells by the acronycine derivative S23906-1, *Biochem Pharmacol* 2002, 63, 1443.
165. Koch S, Lange J. Amelanotic melanoma: The great masquerader, *J Am Acad Dermatol*, 2000, 42, 731.
166. Kops G, Weaver B, Cleveland D. On the road to cancer aneuploidy and the mitotic checkpoint, *Nature Rev Cancer*, 2005, 5, 773.
167. Korsmeyer S, Wei M, Saito M, Weiler S, Oh K, Schlesinger P. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c, *Cell Death Differ*, 2000, 7, 12, 1166.
168. Kozłowska K, Bomirski A, Żurawska-Czupa B. Comparison of the isolated cells of hamsters melanotic and amelanotic melanoma, *Arch Dermatol Res*, 1976, 256, 197.
169. Kozłowska K, Żurawska-Czupa B, Kostulak A. Comparison of the antigenicity of melanotic and amelanotic melanoma cells after the release of surface glycoproteins by trypsin, *Arch Immunol Ther Exp*, 1980, 28, 641.
170. Kozłowska K, Żurawska-Czupa B, Mierzewski P, Kostulak A. Use of macrophages migration inhibition test to evaluate antigenic differences in golden hamster transplantable melanomas, *Int J Cancer*, 1980, 26, 211.
171. Kozłowska K, Żurawska-Czupa B. Heterogeneity of the surface material in isolated cells of transplantable hamster melanomas, *Cancer Res*, 1983, 43, 1168.
172. Kozłowska K, Kostulak A, Żurawska-Czupa B. Comparative analysis of surface antigens of transplantable melanoma in hamster. I. Studies of sera with isolated melanocytes by using the immunoadherence test, *Arch Immunol Ther Exp*, 1984, 32, 59.
173. Kozłowska K, Nowak J, Kwiatkowski B, Cichorek M. ESR study of plasmatic membrane of the transplantable melanoma cells in relation to their biological properties, *Exp Toxic Pathol*, 1998, 50, 482.
174. Kozłowska K, Witkowski J, Zarzeczna M, Cichorek M. Diversity of the plasma membrane properties of transpalantable hamster melanomas with regard to the expression of P-glycoprotein, *Folia Histochem Cytobiol*, 1999, 37, 3, 173.
175. Kozłowska K, Cichorek M, Zarzeczna M, Brożek J, Witkowski J. Heterogenous susceptibility to spontaneous and induced apoptosis characterizes two related transplantable melanomas with different biological properties, *Pigment Cell Res*, 2002, 15, 233.
176. Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Huang X, Turner B, Bubendorf L, Kallioniemi O, Shabaik A, Vitiello A, Peehl D, Gao G, Reed J. Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer, *Clin Cancer Res*, 2003, 9, 4914.

177. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis, *Ann Rev Physiol*, 1998, 60, 619.
178. Kroemer G, El-Deiry W, Golstein P, Petre M, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny M, Malorni W, Knight R, Piacenti M, Nagata S, Melino G. Classification of cell death: recommendation of the nomenclature committee on cell death, *Cell Death Differ*, 2005, 12, 1463.
179. Kyrcer W, Grodecka-Gazdecka S, Bręborowicz J, Filas V, Teresiak M. Prognostic value of selected immunohistochemical markers in skin melanoma, *Nowotwory*, 2002, 52, 6, 487.
180. Lai R, Redburn J, Nguyen G. Cytodiagnosis of metastatic amelanotic melanomas by fine-needle aspiration biopsy. Adjunctival value of immunocytochemistry and electron microscopy, *Cancer Cytopathol*, 1998, 84, 92.
181. Laing J, Wilson G, Martindale C. Proliferation rates in human malignant melanoma: relationship to clinicopathological features and outcome, *Melanoma Res*, 2003, 13, 271.
182. Laskin J, Piccinini L, Engelhardt D, Weisnstein B. Control of melanin synthesis and secretion by B16/C3 melanoma cells. *J Cell Physiol*, 2005, 113, 3, 481.
183. Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases, *Oncogene* 2005, 24, 5137.
184. Leiter U, Schmid R, Kaskel P, Peter R, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xl in advanced malignant melanoma, *Arch Dermatol Res*, 2000, 292, 225.
185. Li F. Survivin study: what is the next wave?, *J Cell Physiol*, 2003, 197, 8.
186. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle M, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance?, *Int J Cancer*, 2005, 114, 4, 509.
187. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis, *Br J Cancer*, 2005, 92, 212.
188. Li G, Bush J, Ho V. P53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin, *J Invest Dermatol*, 2000, 114, 514.
189. Li L, Fraser T, Olin E, Bhuyan B. Action of camptothecin on mammalian cells in culture, *Cancer Res*, 1972, 32, 2643.
190. Li L, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature*, 2001, 412, 6842, 95.
191. Ling Y, Liebes L, Ng B, Buckley M, Elliott P, Adams J, Jiang J, Muggia F, Perez-Soler R. PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G₂-M phase arrest and apoptosis, *Mol Cancer Therap*, 2002, 1, 841.
192. Liu B, Peng D, Lu Y, Jin W, Fan Z. A novel single amino acid deletion caspase-8 mutant in cancer cells that lost pro-apoptotic activity, *J Biol Chem*, 2002, 277, 30159.

193. Liu J, Opipari A, Tan L, Jiang Y, Zhang Y, Tang H, Nunez G. Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance, *Cancer Res*, 2002, 62, 924.
194. Liu T, Brouha B, Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in survivin-targeted melanoma cells, *Oncogene*, 2004, 23, 39.
195. Loeffler M, Daugas E, Susin S, Zamzani N, Metivier D, Nieminen A, Brothers G, Penninger J, Kroemer G. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor, *FASEB J*, 2001, 15, 758.
196. Lorenzo H, Susin S, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death, *Cell Death Differ*, 1999, 6, 6, 516.
197. Lorenzo H, Susin S. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death, *FEBS Lett*, 2004, 557, 14.
198. Lundberg A, Weinberg R. Control of the cell cycle and apoptosis, *Eur J Cancer*, 1999, 35, 531.
199. Mackiewicz A, Gorny A, Laciak M, Malicki J, Murawa P, Nowak J, Wiznerowicz M, Hawley R, Heinrich P, Rose-John S. Gene therapy of human melanoma. Immunization of patients with autologous tumor cells admixed with allogeneic melanoma cells secreting interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor, *Hum Gene Ther*, 1995, 6, 6, 805.
200. Mackiewicz K. Mackiewicz A. Fazy progresji molekularnej czerniaka złośliwego, W: Czerniak złośliwy, Skowronek J, Mackiewicz A, Żygulska-Mach H, Poznań, Termedia Wydawnictwa Medyczne, 1998, 27-32.
201. Malinowska I. Znaczenie prognostyczne i terapeutyczne zmian wewnątrzkomórkowego pH w przebiegu apoptozy blastów w ostrych białaczkach u dzieci, Warszawa, Dział Wydawnictw Akademii Medycznej, 2005.
202. Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, Bruggen van der P. A CASP-8 mutation recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma, *J Exp Med*, 1997, 186, 785.
203. Marchetti P, Castedo M, Susin S, Zamzani N, Hirsch T, Haeffner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating events of apoptosis, *J Exp Med*, 1996, 184, 1155.
204. Markowicz S. Szczepionki i immunoterapia adoptywna, W: Czerniaki skóry u dorosłych, Ruka W, Nowecki ZI, Rutkowski P, Warszawa, Medipage, 2005, 124-132.
205. Mastore M, Kohler L, Nappi A. Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine, *FEBS J*, 2005, 272, 2407.
206. Matsuyama S, Reed J. Mitochondria-dependent apoptosis cellular pH regulation, *Cell Death Differ*, 2000, 7, 1155.

207. Mc Neish I, Lopes R, Bell S, McKay T, Fernandez M, Lockley M, Wheatley S, Lemoine N. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis, *Exp Cell Res*, 2005, 302, 69.
208. McDonald A, Brown R. Induction of p53-dependent and p53-independent cellular responses by topoisomerase 1 inhibitors, *Br J Cancer*, 1998, 78, 6, 745.
209. Medema J, Jong de J, Hall van T, Melief C, Offringa R. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein, *J Exp Med*, 1999, 190, 1033.
210. Meggiato T, Calabrese F, Valente M, Favaretto E, Baliello E, Favero del G. Spontaneous apoptosis and proliferation in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 2000, 20, 117.
211. Meier F, Busch S, Gast D, Göppert A, Altevogt P, Maczey E, Riedle S, Garbe C, Schitteck B. The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression, *Int J Cancer*, 2006, 119, 549.
212. Melandsmo G, Holm R, Fodstad O, Kerbel R. Cyclin kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 in malignant melanoma: reduced expression in metastatic lesions, *J Am Pathol*, 1996, 149, 1813.
213. Melzani G, Bugari G, Parrinello G, Mori G, Manganoni A, De Panfilis G. Evaluation of soluble Fas ligand as a serological marker for melanoma, *Dermatology*, 2002, 205, 111.
214. Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal, *Trends Cell Biol*, 2006, 16, 5, 264.
215. Mooney E, Ruis Peris J, Oneill A, Sweeney E. Apoptotic and mitotic indices in malignant melanoma and basal cell carcinoma, *J Clin Pathol*, 1995, 48, 242.
216. Moorchung M, Mukherjee L, Srinivas L, Subramanya A. Metastatic amelanotic malignant melanoma with unknown primary – a case report, *MJAFI*, 2004, 60, 295.
217. Moroni M, Hickman E, Denchi E, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Iler H, Helin K. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53, *Nat Cell Biol*, 2001, 3, 552.
218. Motyl T, Gajkowska B, Górka M, Godlewski M, Lamparska-Przybysz M. Kinytyka oraz regulacja uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów komórek nowotworowych pod wpływem stymulacji apoptogennej, *Post Biol Kom*, 2004, 31, 2, 219.
219. Niedojadlo K, Labedzka K, Lada E, Milewska A, Chwirot B. Apaf-1 expression in human cutaneous melanoma progression and in pigmented nevi, *Pigment Cell Res*, 2006, 19, 1, 43.
220. Niemann T, Argenyi Z. Immunohistochemical study of Spitz nevi and malignant melanoma with use of antibody to proliferating cell nuclear antigen, *Am J Pathol*, 1993, 15, 441.

-
221. Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations, *Science*, 1976, 194, 23.
 222. O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions, *Curr Cancer Drug Targ*, 2003, 3, 131.
 223. Olie R, Christoph H, Küttel, Sigrist B, Willers J, Dummer R, Hall J, Stahel R, Zangemeister-Wittke U. Bcl-2 and bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages, *J Invest Dermatol*, 2002, 118, 505.
 224. Oppermann M, Geilen C, Fecker L, Gillisen B, Daniel P, Eberle J. Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk/Bik, *Oncogene*, 2005, 24, 7369.
 225. Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death, *Toxicol Lett*, 2004, 149, 19.
 226. Paez J, Janne P, Lee J, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers W, Johnson B, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy, *Science*, 2004, 304, 5676, 1497.
 227. Pająk B, Orzechowski A. FLIP – przeciwnik, który może przegrać pojedynkę w walce z czynnikami swoiście hamującymi translację, *Post Hig Med Dośw*, 2005, 59, 140.
 228. Pająk S, Subczyński W, Panz T, Ludkiewicz S. Rate of oxygen consumption of hamster melanoma cells as a factor influencing their radioresistance, *Folia Histochem Cytochem*, 1980, 18, 33.
 229. Pantazis P, Early J, Mendoza J, De Jesus A, Givanella B. Cytotoxic efficacy of 9-nitrocamptothecin in the treatment of human malignant melanoma cells in vitro, *Cancer Res* 1994, 54, 771.
 230. Pennati M, Binda M, De Cesare M, Pratesi G, Folini M, Citti L, Daidone MG, Zunino F, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated down-regulation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to topotecan in vitro and in vivo, *Carcinogenesis*, 2004, 25, 7, 1129.
 231. Perkins C, Kim C, Fang G, Bhalla K. Overexpression of Apaf-1 promotes apoptosis of untreated and paclitaxel- or etoposide-treated HL-60 cells, *Cancer Res*, 1998, 58, 4561.
 232. Perry M, Seigler H, Johnston W. Diagnosis of metastatic malignant melanoma by fine needle aspiration biopsy: a clinical and pathologic correlation of 298 cases, *J Natl Cancer Inst*, 1986, 77, 5, 1013.
 233. Phan G, Yang J, Sherry R, Hwu P, Topalian S, Schwartzentruber D, Restifo N, Haworth L, Seipp C, Freeze L, Morton K, Mavroukakis S, Duray P, Steinberg S, Allison J, Davis T, Rosenberg S. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 8372.

234. Polsky D, Cordon-Cardo C. Oncogenes in melanoma, *Oncogene*, 2003, 22, 3087.
235. Pomier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond, *Nature Rev Cancer*, 2006, 6, 789.
236. Potti A, Moazzam N, Langness E, Sholes K, Tendulkar K, Koch S, Kargas S. Immunohistochemical determination of HER-2/neu, c-Kit (CD117), and vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in malignant melanoma, *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130, 80.
237. Poyraz A, Akyurek N, Gonul II, Erdem O. P21 and Bax expression in cutaneous malignant melanomas: correlation with histologic prognostic parameters, *J Exp Clin Cancer Res*, 2004, 23, 4, 625.
238. Pożarowski P, Huang X, Halicka D, Lee B, Johnson G, Darzynkiewicz Z. Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation, *Cytometry Part A*, 2003, 55A, 50.
239. Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos C, Geilen C. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release, *FEBS Lett*, 2000, 473, 27.
240. Raisova M, Hossini A, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis, *J Invest Dermatol*, 2001, 117, 333.
241. Raisova M, Goltz G, Bektas M, Bielawska A, Riebeling C, Hossini A, Eberle J, Hannun Y, Orfanos C, Geilen C. Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes, *FEBS Lett*, 2002, 516, 1-3, 47.
242. Rak J. Onkogeny jako modyfikatory procesów naczyniowych w nowotworach, *Nowotwory*, 2006, 56, 1, 57.
243. Ratinaud M, Leprat P, Julien R. In situ flow cytometric analysis of nonyl acridine orange-stained mitochondria from splenocytes, *Cytometry*, 1988, 9, 206.
244. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons, *J Cell Physiol*, 2002, 192, 131.
245. Redondo P, Solano T, Bauza A, Lloret P. Amelanotic melanoma presenting as a scar, *Arch Intern Med*, 2001, 161, 15, 1912.
246. Reed J. Mechanism of apoptosis avoidance in cancer, *Curr Opin Oncol* 1999, 11, 68.
247. Reed J. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities, *Cell Death Diff*, 2006, 13, 1378.
248. Ren S, Slominski A, Yu R. Glycosphingolipids in Bomirski transplantable melanoma hamsters, *Cancer Res*, 1989, 49, 7051.

-
249. Rhodes A. Cutaneous melanoma and intervention strategies to reduce tumor-related mortality: what we know, what we do not know, and what we think we know that is not so. *Dermatol Ther*, 2006, 19, 50.
 250. Riedl S, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Nature Rev*, 2004, 5, 897.
 251. Riley PA. Melanogenesis and melanoma, *Pigment Cell Res*, 2003, 16, 548.
 252. Rodriguez-Hernandez A, Brea-Calvo G, Fernandez-Ayala D, Cordero M, Navas P, Sanchez-Alcazar J. Nuclear caspase-3 and caspase-7 activation, and Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage are early events in camptothecin-induced apoptosis, *Apoptosis*, 2006, 11, 1, 131.
 253. Rubbi C, Milner J. P53 – guardian of a genome’s guardian?, *Cell Cycle*, 2003, 2, 1, 18.
 254. Ruka W. Czerniak skóry. W: *Onkologia Kliniczna*, M. Krzakowski, tom II., Warszawa, Wydawnictwo Medyczne Borgis, 2001, 290-338.
 255. Ruka W, Nowecki Z, Rutkowski P. Czerniaki skóry u dorosłych. Warszawa, Medipage, 2005.
 256. Rupniewska Z, Bojarska-Junak A. Apoptoza: przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2, *Post Hig Med Dośw*, 2004, 58, 538.
 257. Rutkowski P. Czynniki rokownicze i klasyfikacja stopni zaawansowania. W: *Czerniaki skóry u dorosłych*, Ruka W, Nowecki Z, Rutkowski P, Warszawa, Medipage, 2005, 33-44.
 258. Saenz-Santamaria M, Mc Nutt N, Bogdany J, Shea C. P53 expression is rare in cutaneous melanoma, *Am J Dermatopathol*, 1995, 17, 344.
 259. Sane A, Bertrand R. Distinct steps in DNA fragmentation pathway during camptothecin-induced apoptosis involved caspase-benzyloxycarbonyl- and N-tosyl-L-phenylalanyl-l-chloromethyl ketone-sensitive activities, *Cancer Res*, 1998, 58, 3066.
 260. Satyamoorthy K, Chebab N, Waterman M, Lien M, El-Deiry W, Herlyn M, Halazonetis T. Abberant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells, *Cell Growth Differ*, 2000, 11, 467.
 261. Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther*, 2002, 1, 14.
 262. Satyamoorthy K, Li G, Guerrero I, Brose M, Volpe P, Weber B, Van Belle P, Elder D, Herlyn M. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation, *Cancer Res*, 2003, 63, 756.
 263. Sayan B, Sayna A, Knight R, Melino G, Cohen G. P53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria, *J Biol Chem*, 2006, 281, 19, 13566.

264. Schuler M, Green D. Mechanisms of p53-dependent apoptosis, *Biochem Soc Trans*, 2001, 29, 6, 684.
265. Scislowski P, Slomiński A, Bomirski A. Biochemical characterization of three hamster melanoma variants. II. Glycolysis and oxygen consumption, *Int J Biochem*, 1984, 16, 327.
266. Sell S. Cancer stem cells and differentiation therapy, *Tumour Biol*, 2006, 27, 59.
267. Selzer E, Schlagbauer-Wadl H, Okamoto I, Pehamberger H, Potter R, Jansen B. Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines, *Melanoma Res*, 1998, 8, 3, 197.
268. Serrone L, Hersey P. The chemoresistance of human malignant melanoma an update, *Melanoma Res*, 1999, 9, 51.
269. Sheridan J, Bishop C, Simmons R. Biophysical and morphological correlates of kinetic change and death in a starved human melanoma cell line, *J Cell Sci*, 1981, 49, 119.
270. Shivapurkar T, Toyooka S, Eby M, Huang C, Sathyanarayana U, Cunningham H, Reddy J, Brambilla E, Takahashi T, Minna J, Chaudhary PM, Gazdar AF. Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers, *Cancer Biol Ther*, 2002, 1, 65.
271. Siedlecki P, Dziwinski W. Leczenie przerzutów do odległych narządów. W: Czerniaki skóry u dorosłych, Ruka W, Nowecki Z, Rutkowski P, Warszawa, Medipage, 2005, 119-123.
272. Simeonova E, Garstka M, Koziol-Lipińska J, Mostowska A. Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll senescence, *Protoplasma*, 2004, 223, 143.
273. Skowronek J, Mackiewicz A, Żygulska-Mach H. Czerniak złośliwy. Poznań, Termedia Wydawnictwa Medyczne, 1998.
274. Slater M, Scolyer R, Gidley-Baird A, Thompson J, Barden J. Increased expression of apoptotic marker in melanoma, *Melanoma Res*, 2003, 13, 137.
275. Slichenmyer W, Rowinsky E, Donchower R, Kaufmann S. The current status of camptothecin analogues as antitumor agents, *J Nat Cancer Inst*, 1993, 85, 271.
276. Slingsluff C, Colelle T, Thompson L, Grahan D, Shipper J, Caldwell J, Brinckerhoff L, Kittlessen et al. Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation antigens: immune escape that may be overcome by targeting unique or undefined antigens, *Cancer Immunol Immunother*, 2000, 48, 661.
277. Slominski A, Paus R, Mihm M. Inhibition of melanogenesis as an adjuvant strategy in the treatment of melanotic melanomas: selective review and hypothesis, *Anticancer Res*, 1998, 18, 3709.

-
278. Slomiński A. Malignant melanoma. An update, *Arch Pathol Lab Med*, 2001, 125, 1295.
 279. Slominski A, Tobin D, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormone regulation, *Physiol Rev*, 2004, 84, 1155.
 280. Smolewski P, Grabarek J, Halicka H, Darzynkiewicz Z. Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis, *J Immunol Methods*, 2002, 265, 111.
 281. Smolewski P, Grabarek P, Lee B, Johnsosn G, Darzynkiewicz Z. Kinetics of HL-60 cell entry to apoptosis during treatment with TNF- α or camptothecin assayed by the stathmo-apoptosis method, *Cytometry*, 2002, 47, 143.
 282. Smolewski P. Rola kaspaz w procesie apoptozy, *Post Hig Med Dośw*, 2003, 57, 3, 335.
 283. Soengas M, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma, *Nature*, 2001, 409, 207.
 284. Soengas M, Lowe S. Apoptosis and melanoma chemoresistance, *Oncogene*, 2003, 22, 3138.
 285. Song Z, Liu S, He H, Hoti N, Wang Y, Feng S, Wu M. A single amino acid change (Asp 53 $\rightarrow$ Ala 53) converts survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic, *Mol Biol Cell*, 2004, 15, 1287.
 286. Sosman J, Puzanov I. Molecular targets in melanoma from angiogenesis to apoptosis, *Clin Cancer Res*, 2006, 12, 7 Suppl, 2376.
 287. Soubrane C, Mouawad R, Anttoine E, Verola O, Gil-Geldago M, Khayat D. A comparative study of Fas and FasL expression during melanoma progression, *Br J Dermatol*, 2000, 143, 307.
 288. Soung Y, Lee J, Kim S, Jang J, Park Y, Park W, Nam S, Lee J, Yoo N, Lee S. CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas, *Cancer Res*, 2005, 65, 815.
 289. Sparrow L, Soong R, Dawkins H, Iacopetta B, Heenan P. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas, *Melanoma Res*, 1995, 5, 2, 93.
 290. Sredhar A, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review, *Pharmacol Therap*, 2004, 101, 227.
 291. Stephens L, Ang K, Schulthesis T, Milas L, Meyn R. Apoptosis in irradiated murine tumors, *Radiat Res*, 1991, 127, 308.
 292. Strand S, Hofmann W, Hug H, Müller M, Otto G, Strand D, Mariani S, Stremmel W, Krammer PH, Galle P. Lymphocyte apoptosis induced by

- CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells – a mechanism of immune evasion?, *Nat Med*, 1996, 2, 1361.
293. Susin S, Lorenzo H, Zamzani N, Marzo I, Snow B, Brothers G, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett D, Aebersold R, Siderovski D, Penninger J, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, 1999, 397, 6718, 387.
294. Sviatoha V, Rundgre A, Tani E, Hansson J, Kleina R, Skoog L. Expression of CD40, CD44, bcl-2 antigens and rate of cell proliferation on fine needle aspirates from metastatic melanoma, *Cytopathol*, 2002, 13, 11.
295. Svingen P, Loegerin D, Rodriguez J, Meng X, Mesner P, Holbeck S, Monks A, Krajewski A, Scudiero D, Sausville E, Reed J, Lazebnik Y, Kaufmann S. Components of the cell death machine and drug sensitivity of the National Cancer Institute cell line panel, *Clin Cancer Res*, 2004, 10, 6807.
296. Szala S. Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych, *Nowotwory*, 2000, 50, 2, 111.
297. Śledziński T. Polimeraza poli(ADP-rybozy) i jej udział w naprawie DNA, *Post Bioch*, 2003, 49, 4, 239.
298. Takaoka A, Adachi M, Okuda H, Sato S, Yawata A, Hinoda Y, Takayama S, Reed J, Imai K. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells, *Oncogene*, 1997, 14, 2971.
299. Takita J, Yang H, Chen Y, Hanada R, Yamamoto K, Kidd V, Teitz T, Hayashi Y. Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase-8 gene in neuroblastoma, *Oncogene*, 2001, 20, 4424.
300. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero D, Vigna N, Oltersdorf T, Reed J. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), bax, caspases and anticancer drugs, *Cancer Res*, 1998, 58, 5315.
301. Tanaka F, Takata T, Yamada T, Yanagihara K, Otake Y, Miyahara R, Nakagawa T, Kawan T, Ishikawa S, Inui K, Wada H. Apoptotic tumor-cell death in response to cell proliferation is influenced by p53 status in resected non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 2002, 36, 27.
302. Tang L, Tron V, Reed J, Mah K, Krajewska M, Li G, Zhou X, Ho V, Trotter M. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma, *Clin Cancer Res*, 1998, 4, 1865.
303. Tarhini A, Agarwala S. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease, *Dermatol Ther* 2006, 19, 19.
304. Teitz T, Wei T, Valentine M, Vanin E, Grenet J, Valentine V, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase-8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN, *Nat Med*, 2000, 6, 529.
305. Teodori L, Grabarek J, Smolewski P, Ghibelli L, Bergamaschi A, De Nicola M, Darzynkiewicz Z. Exposure of cells to static magnetic field accel-

- erates loss of integrity of plasma membrane during apoptosis, *Cytometry*, 2002, 49,113.
306. Thompson J, Scolyer R, Kefford R. Cutaneous melanoma, *Lancet*, 2005, 365, 687.
307. Tomicic M, Kaina B. Hamster. Bcl-2 protein is cleaved in vitro and in cells by caspase-9 and caspase-3, *Biochem Biophys Res Com*, 2001, 281, 404.
308. Torabian S, Kashani-Sabet M. Biomarkers for melanoma. *Curr Opinion Oncol*, 2005, 17, 167.
309. Trisciuglio D, Desideri M, Ciuffreda L, Mottolese M, Ribatti D, Vacca A, del Rosso M, Marcocci L, Zupi G, del Bufalo D. Bcl-2 overexpression in melanoma cells increases tumor progression-associated properties and in vivo tumor growth, *J Cell Physiol*, 2005, 9999, 1.
310. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch, *FEBS Lett*, 2000, 466, 6.
311. Tuschl H, Schwab Ch. Flow cytometric methods used as screening tests for basal toxicity of chemicals, *Toxicol in vitro*, 2004,18,483.
312. Van den Bossche K, Naeyaert J, Lambert J. The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic*, 2006, 7, 7, 769.
313. Van den Oord J, Vandeghinste N, Ley de M, Wolf-Peeters de C. Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors, *Am J Pathol*, 1994, 145, 294.
314. Velez A, Walsh D, Karakousis C. Treatment of unknown primary melanoma, *Cancer*, 1991, 68, 12, 2579.
315. Vermeulen K, Berneman Z, Van Bockstaele D. Cell cycle and apoptosis, *Cell Prolif*, 2003, 36, 165.
316. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies, *Adv Cancer Res*, 2005, 143.
317. Vlaykova T, Talve L, Hahka-Kemppinen M, Hernberg M, Muhonen T, Collan Y, Pyrhonen S. Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in metastatic melanoma: association with survival and treatment response, *Oncology*, 2002, 62, 3, 259.
318. Vousden K, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53, *Nat Rev Cancer*, 2002, 2, 594.
319. Vucic D, Stennicke, H, Pisabarro T, Salvesen G, Dixit V. ML-IAP. A novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanoma, *Curr Biol*, 2000, 10, 1359.
320. Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, Pisabarro M, Kadkhodayan S, Fairbrother W, Dixit V. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP), *J Biol Chem*, 2002, 277, 12275.

321. Wachulska M, Kozłowska K, Cichorek M. The DNA ploidy and proliferation activity of transplantable melanoma cells in regard to their function, *Neoplasma*, 2005, 52, 280.
322. Wall I, Wani M, Cook C, Palmer K, McPhail A, Sim G. Plant antitumor agents. 1. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*, *J Am Chem Soc*, 1966, 88, 3888.
323. Watabe H, Valencia J, Yasumoto K, Kushimoto T, Ando H, Muller J, Vieira W, Apella M, Hearing V. Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH proteasome activity, *J Biol Chem*, 2004, 279, 9, 7971.
324. Widlak P. Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacja chromatyny w komórkach ulegających apoptozie, *Post Biol Kom*, 2000, 27, 4, 583.
325. Widlak P, Garrard W. Discovery, regulation and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G, *J Cell Biochem*, 2005, 94, 6, 1078.
326. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis, *J Histochem Cytochem*, 1999, 47, 9, 1101.
327. Winter R, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer, *Cancer Res*, 2001, 61, 1227.
328. Witkowski, J, Kozłowska, K, Zarzeczna, M. Expression and activity of P-glycoprotein in transplantable hamster melanomas, *Arch Dermatol Res*, 2000, 292, 354-61.
329. Woenckhaus C, Giebel J, Failing K, Fenic I, Dittberner T, Poetsch M. Expression of AP-2 α , c-kit and cleaved caspase-6 and -3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression?, *J Pathol*, 2003, 201, 2, 278.
330. Woods D, Vousden K. Regulation of p53 function, *Exp Cell Res*, 2001, 264, 56.
331. Woźniak A, Drewa T, Drewa G, Woźniak B, Schachtschabel D. Activity of antioxidant enzymes and concentrations of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in melanotic and amelanotic Bomirski melanoma tissues in golden hamster (*Mesocricetus auratus*, Waterhouse), *Neoplasma*, 2002, 49, 6, 401.
332. Wronkowski Z, Zwierko M. Epidemiologia czerniaka skóry., W: Czerniaki skóry, Ruka W, Nowecki Z, Rutkowski P, Warszawa, Medipage 2005, 9-15.
333. Wu H, Goel V, Haluska F. PTEN signaling pathways in melanoma, *Onco gene*, 2003, 22, 3113.
334. Wyllie A, Beattie G, Hargreaves A. Chromatine changes in apoptosis, *Histochem J*, 1981, 4, 681.

-
335. Xie K, Wang Y, Huang S, Xu L, Bielenberg D, Salas T, McConkey D, Jiang W, Fidler I. Nitric oxide-mediated apoptosis of K-1735 melanoma cells is associated with downregulation of Bcl-2, *Oncogene*, 1997, 15, 7, 771.
 336. Xu Y, Villalona-Calero M. Irinotecan: mechanism of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity, *Ann Oncol*, 2002, 13, 1841.
 337. Yang J, Michod D, Walicki J, Widmann C. Surviving the kiss of death, *Biochem Pharmacol*, 2004, 68, 1027.
 338. Yang S, Mc Nulty S, Meyskens J. During human melanoma progression AP-1 binding pairs are altered with loss of c-Jun in vitro, *Pigment Cell Res*, 2004, 17, 74.
 339. Zamzani N, Marchetti M, Castedo D, Zanin J, Vayssiere P, Petit P, Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo, *J Exp Med*, 1995, 181, 1661.
 340. Zhang H, Rosdahl I. Expression of oncogenes, tumor suppressor, mismatch repair and apoptosis-related genes in primary and metastatic melanoma, *Int J Oncol*, 2001, 19, 1149.
 341. Zhang X, Lin H, Chen C, Chen B. Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway activates a caspase-3-like protease and induces Bcl-2 cleavage in human M-07 leukaemic cells, *Biochem J*, 1999, 340, 127.
 342. Zhivotovsky B, Samali A, Gahm S, Orrenius S. Caspases their intracellular localization and translocation during apoptosis, *Cell Death Differ*, 1999, 6, 644.
 343. Zhivotovsky B. Caspases: the enzymes of death, *Essays Biochem*, 2003, 39, 25.
 344. Zhivotovsky B, Orrenius S. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance, *Sem Cancer Biol*, 2003, 13, 125.
 345. Zhu Z, Makhija S, Lu B, Wang M, Kaliberova L, Liu B, Rivera A, Nettelbeck D, Mahasreshti P, Leath C, Barker S, Yamaoto M, Li F, Alvarez R, Curiel D. Transcriptional targeting of tumors with a novel tumor-specific survivin promoter, *Cancer Gene Therapy*, 2004, 11, 256.
 346. Zielinska K, Kozłowska K, Cichorek M, Wachulska M. Participation of the Fas/FasL system in spontaneous apoptosis of two transplantable melanoma line cells, *Folia Histochem Cytobiol*, 2005, 43 (sup.1):75-76, Abstracts from IX Conference on Cell Biology, September, 15-17, 2005, Lodz, Poland.
 347. Zwaal R, Schroit A. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells, *Blood*, 1997, 89, 1121.