

Wpływ terapii fotodynamicznej na ekspresję *TGF-β1*, *TβR-I*, *TβR-II* i *TβR-III* w hodowlach czerniaka

The influence of photodynamic therapy
on *TGF-β1*, *TβR-I*, *TβR-II* and *TβR-III* expression
in melanoma cell cultures

Małgorzata Latocha, Dariusz Kuśmierz, Monika Rybarz

STRESZCZENIE

WSTĘP

W początkowym stadium kancerogenezy transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor β* – TGF- β) silnie hamuje proliferację komórek nablónkowych i określany jest mianem supresora nowotworów. Jednak w późniejszych etapach tego procesu, czynnik ten może promować rozwój nowotworu: wpływać na jego inwazyjność oraz zdolność do naciekania prawidłowych tkanek. Przez stymulację czynników proangiogennych, takich jak IL-8 i VEGF, może także przyczyniać się do angiogenezy na obwodzie guza. Podwyższony poziom TGF- β silnie modyfikuje odpowiedź immunologiczną organizmu – hamuje proliferację limfocytów T oraz ogranicza możliwości prezentacji antygenów przez wyspecjalizowane komórki. Celem pracy była ocena ekspresji genów kodujących: TGF- $\beta 1$ oraz jego receptory I, II i III w hodowlach komórek czerniaka, które poddano, w warunkach *in vitro*, terapii fotodynamicznej z Fotolonem.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano trzy linie czerniaka: C-32, Colo-892 i SH-4 (ATCC). Ekspresję genów kodujących TGF- $\beta 1$ i jego receptory oceniano na etapie transkryptów (mRNA).

WYNIKI

Zastosowanie przyjętych w pracy warunków terapii fotodynamicznej w przypadku wszystkich badanych linii czerniaka skutkuje znaczącą redukcją liczby kopii mRNA *TGF-β1* i jego receptorów w przeliczeniu na μg RNA całkowitego.

WNIOSKI

W świetle informacji dotyczącej roli TGF- β w nabywaniu złośliwego charakteru komórek nowotworowych zmniejszenie liczby kopii mRNA *TGF-β1* po przeprowadzeniu terapii fotodynamicznej może być korzystne dla przebiegu procesu terapeutycznego.

Zakład Biologii Komórki
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Dr hab. n. med. Małgorzata Latocha
Zakład Biologii Komórki
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Jedności 8
41-206 Sosnowiec
tel. +48 32 364 12 10
fax. +48 32 364 12 11
e-mail: mlatocha@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2013, 67, 4, 238–248
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
eISSN 1734-025X

SŁOWA KLUCZOWE

PDT-Fotolon, TGF- β 1, receptory TGF- β , czerniak

ABSTRACT

INTRODUCTION

In the early stages of cancerogenesis, TGF- β strongly inhibits the proliferation of epithelial cells and is described as a tumor suppressor. However, in further stages of this process, TGF- β can even promote the formation of a neoplasm. It can influence the tumor invasiveness and the ability of cancer to infiltrate the area of surrounding normal tissue. Stimulating proangiogenic factors such as IL-8 and VEGF can also contribute to angiogenesis in the tumor periphery. An elevated level of TGF- β strongly modifies the immune response of the organism through inhibiting the proliferation of T-cells and limiting the possibility of antigen presentation by specialized cells. Aim of the study.

The aim of the study was to evaluate the expression of genes encoding TGF- β 1 and its receptors: type I, II and III in melanoma cell culture after photodynamic therapy with Photolon in vitro.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in three melanoma cell lines: C-32, Colo-892 and SH-4 (ATCC). The expression of genes encoding TGF- β 1 and its receptors was estimated at the transcript stage (mRNA).

RESULTS

All of the photodynamic therapy parameters applied in the study resulted in a significant reduction of TGF- β 1 and its receptors mRNA copy numbers per μ g of the total RNA.

CONCLUSIONS

According to the data connected with the role of TGF- β in expressing a more *malignant character in cancer cells, decreasing the* TGF- β 1 mRNA copy numbers *after photodynamic therapy may be advantageous for the therapeutic process.*

KEY WORDS

PDT-Photolon, TGF- β 1, TGF- β receptors, melanoma

WSTĘP

TGF- β

Transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor β* – TGF- β) jest cytokiną produkowaną praktycznie przez wszystkie zdrowe komórki organizmu człowieka, ale również przez komórki nowotworowe. U ssaków występują trzy z pięciu dotychczas zidentyfikowanych izoform TGF- β : β 1, β 2 oraz β 3. Izofomy te są kodowane przez różne geny, jednak charakteryzują się dużym stopniem homologii sekwencji aminokwasowej [1,2,3]. Ekspresja mRNA dla izofomy TGF- β 1 ma miejsce głównie w komórkach śródbłonna, komórkach hematopoetycznych oraz w tkance łącznej. TGF- β 2 syntetyzowane jest przede wszystkim w komórkach nabłonkowych

i neuronach, a TGF- β 3 – w komórkach mezenchymalnych [4].

Receptory błonowe dla TGF- β (T β R-I, T β R-II i T β R-III) wykryto na wszystkich rodzajach komórek [4]. TGF- β łączy się bezpośrednio z T β R-II, co prowadzi do przyłączenia T β R-I i jego fosforylacji [5]. Aktywowana zostaje kinaza białkowa T β R-I, która fosforyluje białka R-SMAD (białka aktywowane przez receptor: SMAD1, 2, 3, 5, 8), te zaś wiążą się z SMAD4. Ten hetero-oligomeryczny kompleks ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie jest wiązany ze specyficzną sekwencją regionu promotorowego DNA genów docelowych. Funkcja T β R-III sprowadza się do regulacji dostępu ligandów do T β R-I i T β R-II. Podstawową funkcją TGF- β jest stymulacja wzrostu komórek pochodzenia mezenchymalnego, hamowanie namnażania komórek pochodzenia nabłonkowego, śródbłonna i komórek krwiotwórczych, powstrzymanie

wanie procesów zapalnych – immunosupresja [3,6]. Cytokina ta ma także wpływ na apoptozę komórek oraz odgrywa istotną rolę przy odbudowie uszkodzonych tkanek, przyspieszając syntezę składników macierzy pozakomórkowej – przede wszystkim fibronektyny, kolagenu i proteoglikanów. W przypadku stanów patologicznych może jednak przyczyniać się do nadmiernego włóknienia. Odgrywa również istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego, m.in. przez wpływ na aktywność PRB (białko kodowane przez gen *RB*; przy uszkodzeniach DNA białko PRB powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1), P15 (białko wiążące CDK4 i CDK6), P27 (białko inaktywujące CDK), fosfataz CDC25 (enzymy aktywujące kinazy cyklinozależne).

W przypadku komórek transformowanych nowotworowo działanie TGF- β jest złożone. We wczesnych etapach kancerogenezy hamuje on proliferację komórek nowotworowych, gdy jednak dojdzie do rozwoju choroby, zaczyna działać pobudzająco na te same komórki. Wzrasta lokalne stężenie TGF- β . Prowadzi to do zmian w oddziaływaniach komórka – macierz pozakomórkowa, niekontrolowanego namnażania się komórek i wzrostu inwazyjności nowotworu. W komórkach czerniaka stwierdzono ekspresję zarówno TGF- β 1, TGF- β 2, jak i TGF- β 3. Analiza *in situ* TGF- β oraz jego receptorów wskazuje na dodatnią korelację między progresją czerniaka i innych nowotworów skóry a nadekspresją tej cytokiny. Potwierdzono parakryne mechanizmy oddziaływania między komórkami nowotworowymi a keratynocytami i fibroblastami zrębu guza [7]. Udowodniono autokrynną stymulację syntezy integryny i metaloproteinazy-9 oraz hamowanie syntezy E-kadheryn przez TGF- β . Ułatwia to migrację komórek nowotworowych oraz adhezję do śródbłónka. Wykazano, że cytokina ta ma zdolność modulacji funkcji wielu proteaz oraz ich inhibitorów. Zaobserwowano też, że TGF- β 1 hamuje proces melanogenezy, wzmagając proteolityczną degradację tyrozynazy i TYRP-1 (*tyrosinase-related protein-1*) oraz znacząco ogranicza wpływ α -MSH (hormon α -melanotropowy) na komórki barwnikowe [8]. Potwierdzono również zwiększoną ekspresję TGF- β 1 w komórkach czerniaka i jego udział w angiogenezie [9], cytokina ta zwiększa m.in. wydzielanie proangiogenego VEGF. Dużą uwagę przywiązuje się też do immunosupresyjnych właściwości TGF- β w rozwoju nowotworów. Jak wykazano, hamuje on dojrzewanie komórek dendrytycznych i aktywność limfocytów T, co powoduje wytworzenie tzw. stanu tolerancji immunologicznej [4,10].

Terapia fotodynamiczna (PDT)

Metody fotodynamiczne stosuje się do rozpoznawania i leczenia nowotworów skóry, przewodu pokarmowego, pęcherza moczowego, narządów rodnych. Znajdu-

ją też zastosowanie w leczeniu łuszczycy, choroby Bowena, nabłoniaków podstawnokomórkowych, zarówno powierzchniowych, jak i guzkowych, zmian naczyniowych płaskich, rogowacenia słonecznego, twardziny, zwyrodnienia plamki żółtej, zakażeń bakteryjnych, grzybic, hirsutyizmu. Metoda ta jest nie tylko skuteczna, ale również daje dobre efekty kosmetyczne [11,12]. Od ponad 15 lat prowadzone są badania dotyczące możliwości zastosowania terapii fotodynamicznej (*photodynamic therapy* – PDT) w leczeniu czerniaka. Początkowo prace te realizowano w układzie *in vitro* na hodowlach komórkowych oraz *in vivo* na zwierzętach (ksenotransplantacje). Od niedawna pojawiają się też pierwsze doniesienia o efektach terapii fotodynamicznej stosowanej u pacjentów z czerniakiem [13,14,15,16,17]. Są to głównie przypadki stadium czy postaci uniemożliwiającej podjęcie innych działań terapeutycznych i nieoperowalne guzy znajdujące się miejscach, w których interwencja chirurgiczna jest niemożliwa. Najczęściej są to czerniaki narządu wzroku lub zmiany w okolicy nosa i wrażliwych części twarzy.

Celem prezentowanej pracy była ocena ekspresji genu kodującego TGF β 1 oraz genów kodujących receptory dla TGF- β (*T β R-I*, *T β R-II* i *T β R-III*) w hodowlach komórek czerniaka poddanych terapii fotodynamicznej z Fotolonem.

MATERIAŁ I METODY

Hodowla komórkowa

Do badań wykorzystano trzy linie czerniaka zakupione w ATCC (American Type Culture Collection): C-32 (komórki czerniaka amelanotycznego wyizolowane ze skóry), Colo-892 (komórki czerniaka melanotycznego wyizolowane ze skóry) oraz SH-4 (komórki z przerzutów czerniaka melanotycznego do płuc).

Hodowle prowadzono na pożywkach: EMEM (Lonza) – czerniak C-32, RPMI 1640 – czerniak Colo 892 oraz DMEM (Lonza) – czerniak SH-4. Stosowano dodatek 10% surowicy płodowej wołu (FBS; Gibco) oraz roztworu antybiotyków (Lonza): penicylina 10 000 U/ml i streptomycyna 10 mg/ml.

PDT

Jako fotouczulacz zastosowano Fotolon (Belmedpreparaty, Białoruś) w stężeniu 0,01 mg/ml pożywki. Po 1-godzinnej inkubacji komórek w pożywce z fotouczulaczem hodowle naświetlano laserem PDT-662 (Kriomed) emitującym światło o długości fali $\lambda = 662$ nm. Stosowane dawki promieniowania to: 5, 10 oraz 20 J/cm². Po zakończeniu naświetlania, hodowle komórkowe umieszczono w inkubatorze na 3 godziny.

Po upływie wyznaczonego czasu (doświadczalnie dobrany, optymalny czas najwyższej ekspresji badanych genów), zbierano pożywki z dna hodowli, a z komórek przylegających do dna naczynia hodowlanego ekstrahowano RNA.

Ekspresja genów kodujących TGF- β 1 i jego receptory

Ekstrakcja RNA

Całkowity RNA z komórek ekstrahowano z wykorzystaniem odczynnika TRIzol (Invitrogen) zgodnie z protokołem producenta. Komórki poddawano lizie bezpośrednio w naczyniu hodowlanym. Uzyskano osad całkowitego RNA przechowywano w temperaturze -70°C w postaci wysuszonej do czasu analizy. Ekstrakty RNA oceniano pod względem jakościowym i ilościowym. Integralność wyizolowanego całkowitego RNA sprawdzano elektroforetycznie w 1,2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. Natomiast pomiar stężenia całkowitego RNA w ekstraktach dokonano spektrofotometrem HP8452A firmy Hewlett Packard. Stężenie RNA wyznaczono przy założeniu, że $1,0 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g RNA w ml ekstraktu}$. Uzyskane ekstrakty całkowitego RNA stanowiły matrycę w analizie ekspresji genów techniką QRT-PCR.

QRT-PCR

Do wyznaczenia liczby cząsteczek mRNA badanych genów w ekstraktach całkowitego RNA zastosowano detektor fluorescencji DNA Engine OPTICON™ (MJ Research). Ilość amplikonów PCR wyznaczano po każdym cyklu amplifikacji na podstawie intensywności fluorescencji barwnika SYBR Green I. Do przygotowywania mieszaniny reakcyjnej QRT-PCR wykorzystywano gotowy zestaw odczynników QuantiTect™ SYBR® RT-PCR Kit firmy Qiagen. Reakcję QRT-PCR prowadzono jednostopniowo w 20 μl roztworu zawierającego 10 μl 2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen), 0,2 μl QuantiTect RT Mix (Qiagen), 1 μM każdego z danej pary startów oraz 250 ng całkowitego RNA.

Kontrolę wewnętrzną QRT-PCR dla wszystkich analizowanych próbek stanowiły mieszaniny reakcyjne zawierające poszczególne ekstrakty całkowitego RNA, w których wyznaczano liczbę kopii mRNA β -aktyny. Równocześnie z próbkami badanymi amplifikowano komercyjnie dostępny fragment genu β -aktyny w stężeniach od 200 do 20 000 kopii. Identyfikację produktów amplifikacji oparto na elektroforetycznych rozdzielach w 8% żelach poliakrylamidowych wybarwianych metodą srebrową. Wielkość uzyskanych produktów amplifikacji określano na podstawie wartości współczynników R_f dla danych amplimerów i dla wzorca DNA będącego fragmentami restrykcyjnymi plazmidu pBR322 poddane działaniu

endonukleazy *Hae* III. Specyficzność reakcji RT-PCR potwierdzano także na podstawie analizy profilu termicznej denaturacji produktu amplifikacji. Krzywą denaturacji wyznaczano w zakresie $50\text{--}95^{\circ}\text{C}$.

Analiza statystyczna wyników

W analizie statystycznej wyników wykorzystano pakiet statystyczny Statistica PL. Wyniki dotyczące ekspresji badanych genów scharakteryzowano za pomocą średniej arytmetycznej oraz odchylenia standardowego. Wszystkie hodowle prowadzono w trzech powtórzeniach i każdą próbkę (każdy ekstrakt) oznaczano również w trzech powtórzeniach. Zgodność próby z rozkładem normalnym lub logarytmiczno-normalnym weryfikowano testem Shapiro-Wilka. W celu porównania dwóch grup badanych zastosowano test T-Studenta.

WYNIKI

Wyekstrahowano RNA ze wszystkich prowadzonych hodowli. Uzyskane ilości RNA przedstawiono na rycinie 1.

W badaniach zakładano możliwość wykorzystania aktywności transkrypcyjnej genu kodującego β -aktynę, jako genu referencyjnego do przeliczeń liczby kopii mRNA badanych genów: *TGF- β 1*, *T β RI*, *T β RII*, *T β RIII*. Jednak statystycznie istotne różnice w liczbie kopii mRNA β -aktyny dla poszczególnych hodowli (ryc. 2, tab. I) spowodowały odrzucenie wcześniej planowanej możliwości wykorzystania ekspresji genu β -aktyny jako genu referencyjnego.

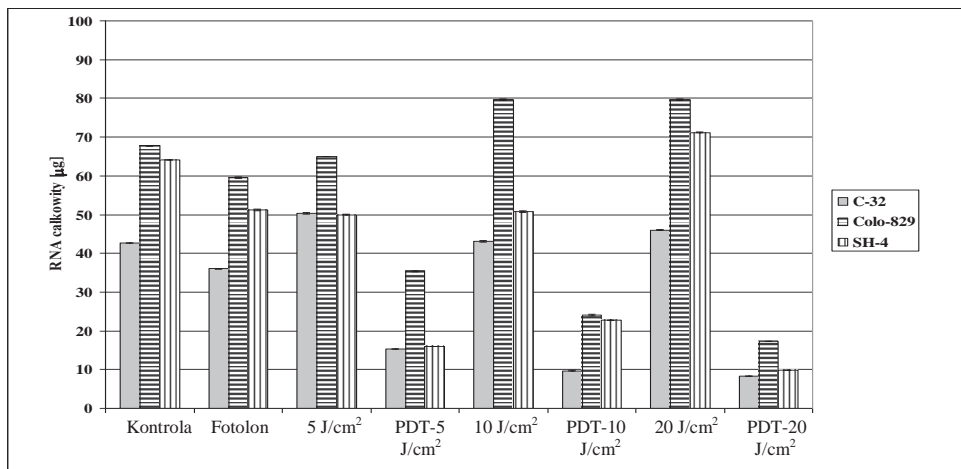
We wszystkich badanych liniach komórkowych po terapii fotodynamicznej (zarówno PDT-5 J/cm^2 , PDT-10 J/cm^2 , jak i PDT-20 J/cm^2) zaobserwowano znaczący spadek ekspresji mRNA *TGF- β 1* w przeliczeniu na całkowity mRNA (ryc. 3a, ryc. 4a, ryc. 5a, tab. II, III, IV).

Największe zmiany dotyczą komórek linii czerniaka SH-4 – obniżenie ekspresji o blisko 98% (hodowle kontrolne – 25 623 kopii mRNA genu *TGF- β 1*/ $\mu\text{g RNA całkowitego}$ i hodowle poddane terapii fotodynamicznej: PDT-5 J/cm^2 1137 kopii, PDT-10 J/cm^2 388 kopii, PDT-20 J/cm^2 480 kopii mRNA genu *TGF- β 1* ($\mu\text{g RNA całkowitego}$; ryc. 5a).

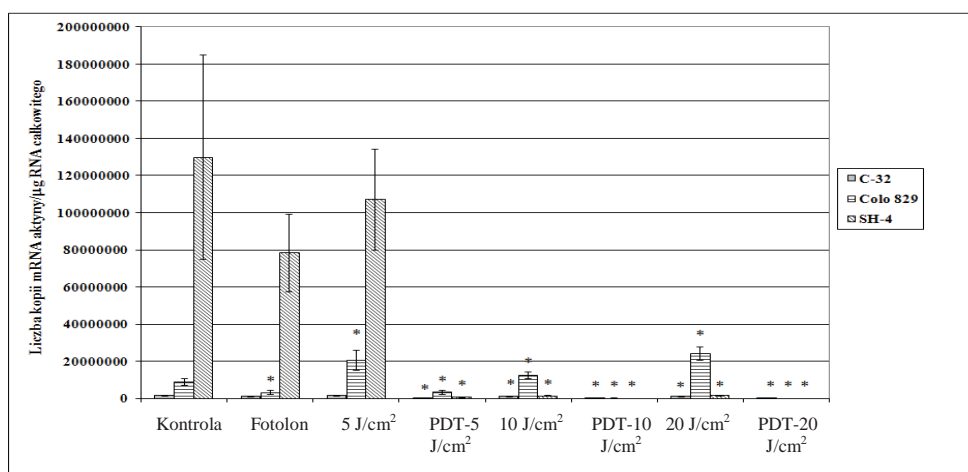
Zastosowanie terapii fotodynamicznej ma również znaczący wpływ na zmianę ekspresji genów kodujących receptory dla TGF- β 1 (*T β R-I*, *T β R-II* i *T β R-III*) (ryc. 3b–d, ryc. 4b–d, ryc. 5b–d). W każdej z badanych linii czerniaka liczba transkryptów genu kodującego *T β R-I*, po PDT w porównaniu z próbą kontrolną, znacznie się zmniejsza. Spadek liczby kopii *T β R-I* w przeliczeniu na $\mu\text{g RNA całkowitego}$ jest wprost proporcjonalny do zastosowanej dawki promieniowania (ryc. 3b, ryc. 4b, ryc. 5b). W przypadku komórek

amelanotycznego czerniaka C-32, uzyskiwane wartości liczby kopii mRNA *TβR-I* w przeliczeniu na μg RNA całkowitego wyniosły odpowiednio dla:

PDT-5 J/cm² – 21%, PDT-10 J/cm² – 9,7% i dla PDT-20 J/cm² – 6% wartości uzyskanych dla prób kontrolnych (ryc. 3b).



Ryc. 1. Ilość całkowitego RNA [w μg] wyekstrahowana z komórek czerniaka C-32, Colo-829 i SH-4 poddanych PDT.
Fig. 1. Amount of total RNA extracted from C-32, Colo-829 and SH-4 melanoma cells after PDT.



Ryc. 2. Liczba kopii mRNA β-aktyny na μg całkowitego RNA dla poszczególnych hodowli badanych linii czerniaka.
Fig. 2. Number of RNA copies for β-actin per μg of total RNA in examined cultures.

Tabela I. Poziomy istotności (p) jako wyniki porównania poziomu ekspresji genu kodującego β-aktynę w hodowlach komórek czerniaka podanych terapii fotodynamicznej z udziałem Fotolonu z poziomem ekspresji tego genu w hodowlach kontrolnych (obserwowane efekty są istotne statystycznie, gdy p < 0,05)
Table I. Levels of significance as result of comparison of β-actin gene expression levels in melanoma cell cultures after photodynamic therapy using Photolon with β-actin gene expression levels in control cell cultures (observed results were considered statistically significant for p < 0.05)

Hodowla	C-32	Colo-829	SH-4
Kontrola	–	–	–
Fotolon	0,00799	0,00127	0,13027
5 J/cm ²	0,32493	0,00627	0,48622
PDT-5 J/cm ²	0,00006	0,00143	0,00332
10 J/cm ²	0,01505	0,03152	0,00343
PDT-10 J/cm ²	0,00004	0,00005	0,00324
20 J/cm ²	0,01901	0,00025	0,00345
PDT-20 J/cm ²	0,00004	0,00005	0,00324

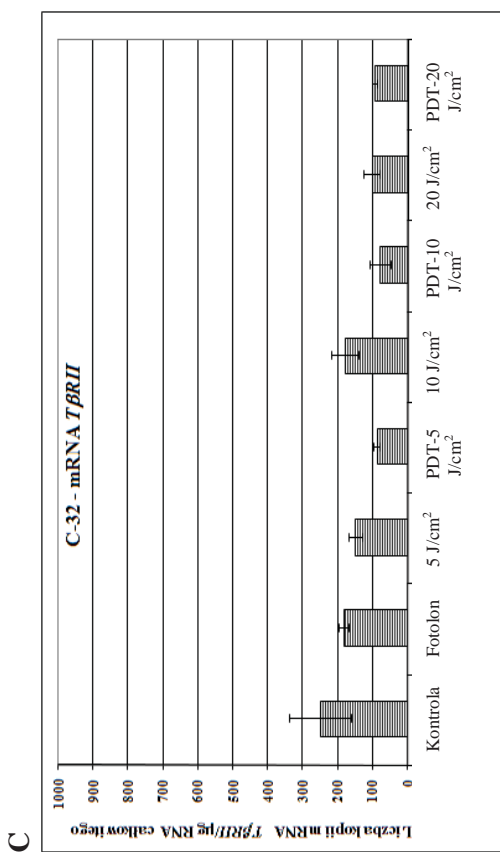
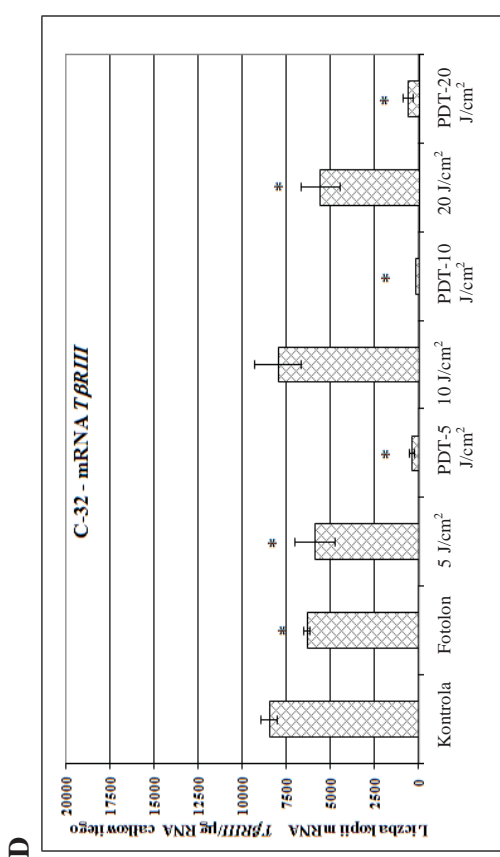
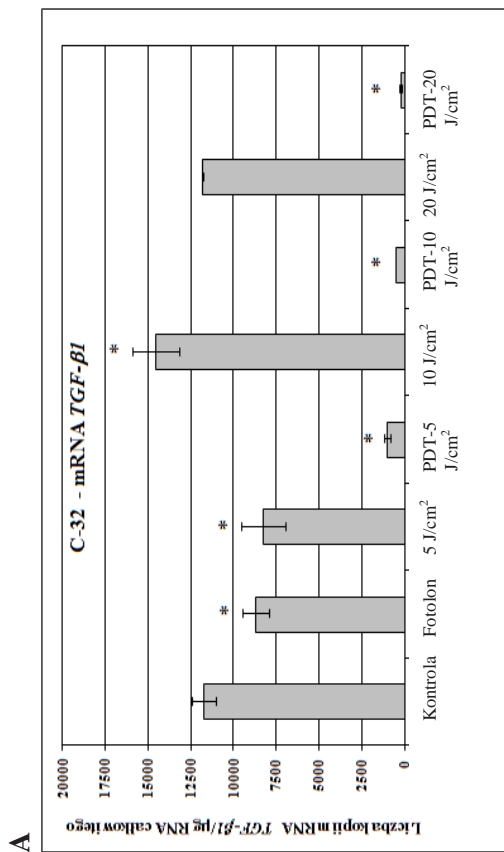
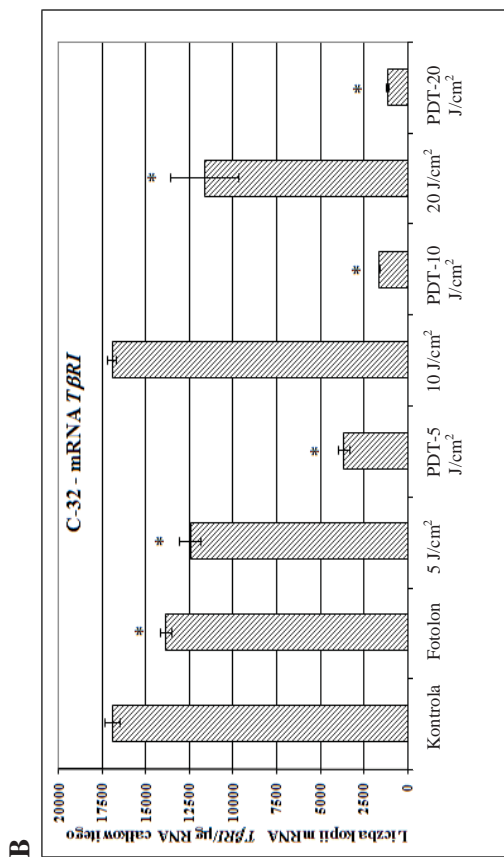


Fig. 3. Ekspresja genu kodującego TGF- β 1 (A) oraz genów kodujących: T β R-I (B), T β R-II (C) i T β R-III (D) w hodowlach komórek czerniaka C-32 poddanych terapii fotodynamicznej z Fotolonem. Fig. 3. Expression of genes encoding TGF- β 1 (A) and its receptors: T β R-I (B), T β R-II (C) i T β R-III (D) in melanoma cell cultures C-32 exposed to photodynamic therapy with Photolon.

Tabela II. Poziomy istotności (p) jako wyniki porównania ekspresji badanych genów w hodowlach komórek czerniaka C-32 poddanych terapii fotodynamicznej z udziałem Fotolonu z hodowlą kontrolną (obserwowane efekty są istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$)
Table II. Levels of significance as result of comparison of examined genes expression levels in C-32 melanoma cell culture after photodynamic therapy using Photolon with control cell culture (observed results were considered statistically significant for $p < 0.05$)

Hodowla C-32	mRNA			
	TGF- β 1	T β R-I	T β R-II	T β R-III
Kontrola	–	–	–	–
Fotolon	0,00247	0,00050	0,37921	0,02235
5 J/cm ²	0,01498	0,00045	0,33784	0,02387
PDT-5 J/cm ²	0,00001	0,00004	0,07781	0,00001
10 J/cm ²	0,03481	0,94702	0,38594	0,56175
PDT-10 J/cm ²	0,00023	0,00000	0,07216	0,00018
20 J/cm ²	0,94066	0,01070	0,10048	0,01485
PDT-20 J/cm ²	0,00001	0,00002	0,08288	0,00002

Tabela III. Poziomy istotności (p) jako wyniki porównania ekspresji badanych genów w hodowlach komórek czerniaka Colo-829 podanych terapii fotodynamicznej z udziałem Fotolonu z hodowlą kontrolną (obserwowane efekty są istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$)
Table III. Levels of significance as result of comparison of examined genes expression levels in Colo-829 melanoma cell culture after photodynamic therapy using Photolon with control cell culture (observed results were considered statistically significant for $p < 0.05$)

Hodowla Colo-829	mRNA			
	TGF- β 1	T β R-I	T β R-II	T β R-III
Kontrola	–	–	–	–
Fotolon	0,12811	0,01819	0,06377	0,00102
5 J/cm ²	0,01935	0,95781	0,30153	0,43676
PDT-5 J/cm ²	0,00086	0,01511	0,10410	0,00148
10 J/cm ²	0,20505	0,51453	0,35785	0,27320
PDT-10 J/cm ²	0,00024	0,00057	0,06670	0,00032
20 J/cm ²	0,10782	0,06596	0,87800	0,08745
PDT-20 J/cm ²	0,00015	0,00037	0,05636	0,00017

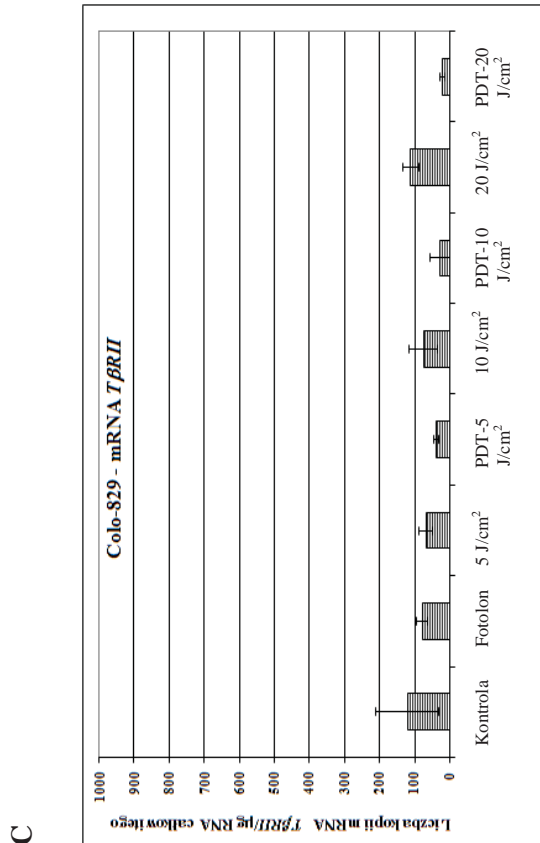
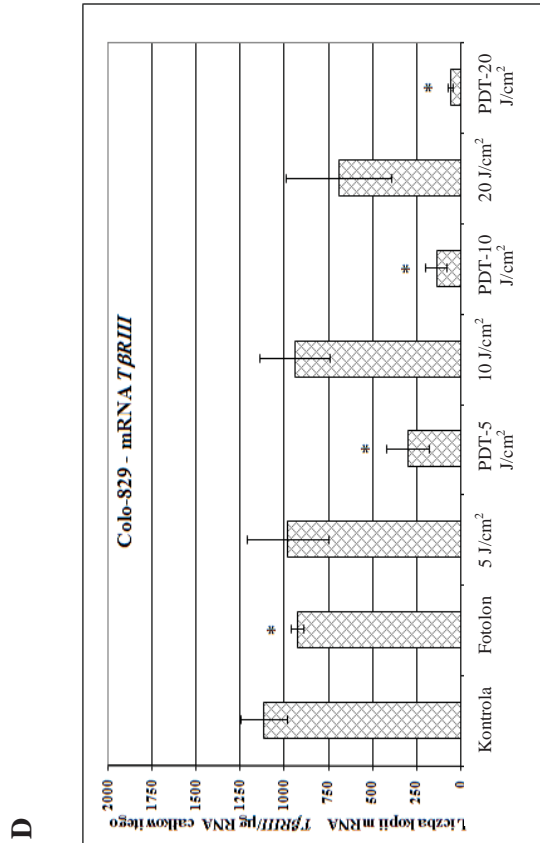
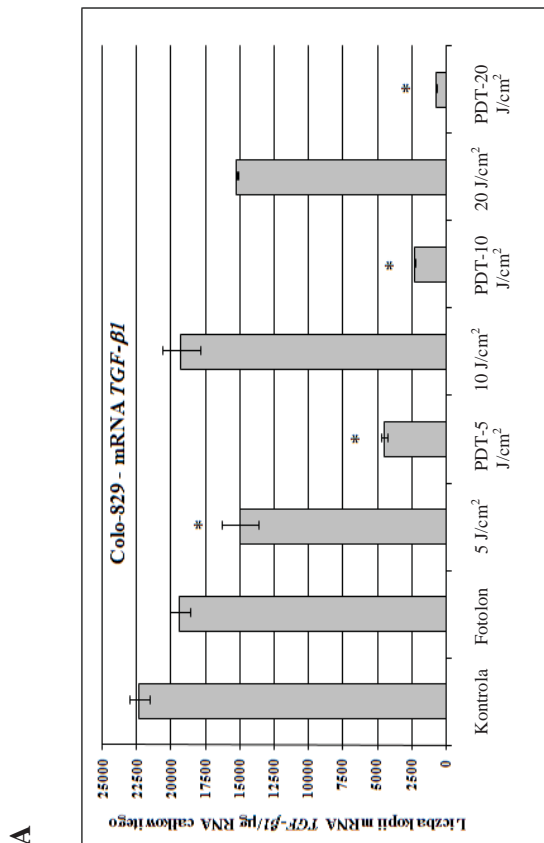
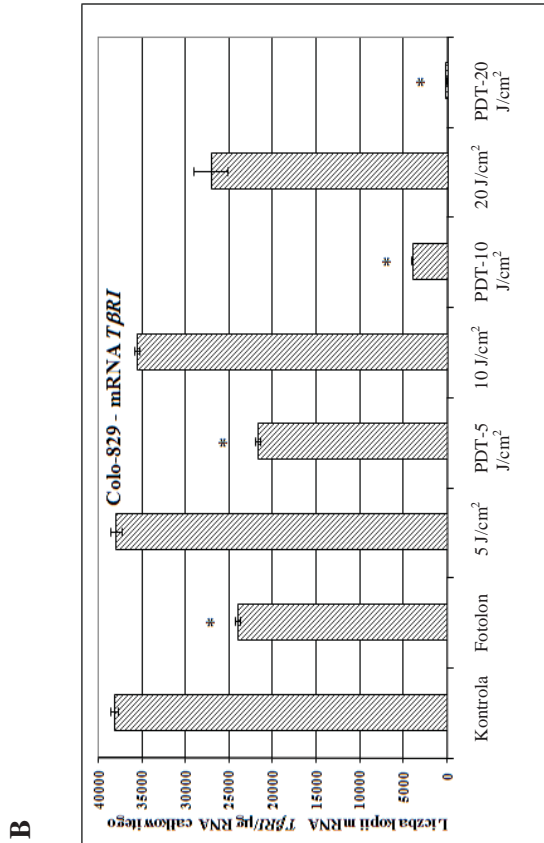
Tabela IV. Poziomy istotności (p) jako wyniki porównania ekspresji badanych genów w hodowlach komórek czerniaka SH-4 podanych terapii fotodynamicznej z udziałem Fotolonu z hodowlą kontrolną (obserwowane efekty są istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$)
Table IV. Levels of significance as result of comparison of examined genes expression levels in SH-4 melanoma cell culture after photodynamic therapy using Photolon with control cell culture (observed results was considered statistically significant for $p < 0.05$)

Hodowla SH-4	mRNA			
	TGF- β 1	T β R-I	T β R-II	T β R-III
Kontrola	–	–	–	–
Fotolon	0,00758	0,04748	0,00545	0,01577
5 J/cm ²	0,00028	0,02562	0,01972	0,04067
PDT-5 J/cm ²	0,00001	0,00043	0,00002	0,01455
10 J/cm ²	0,00362	0,01054	0,09200	0,17027
PDT-10 J/cm ²	0,00001	0,00027	0,00006	0,01506
20 J/cm ²	0,00025	0,00133	0,83857	0,08470
PDT-20 J/cm ²	0,00001	0,00008	0,03419	0,01473

Podobne zależności, przy rosnącej dawce promieniowania, zaobserwowano dla komórek melanocytowego czerniaka skóry Colo-829 (ryc. 4b) i komórek pochodzących z przerzutów do płuc melanocytowego czerniaka SH-4 (ryc. 5b). Ekspresja genu *T β R-I* w komórkach Colo-829 dla stosowanych dawek promieniowania kształtuje się na poziomie: PDT-5 J/cm² – 56%, PDT-10 J/cm² – 10% i dla PDT-20 J/cm² – 0,6% w przeliczeniu na ekspresję w komórkach z hodowli kontrolnych, a dla komórek SH-4: PDT-5 J/cm² –

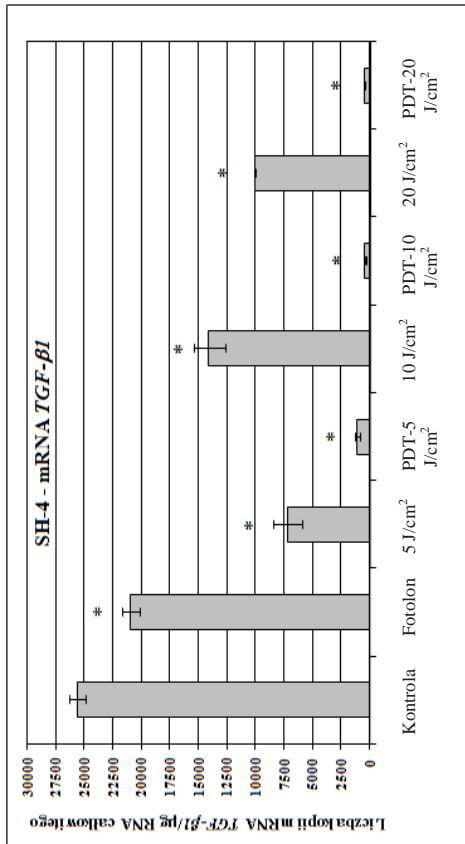
– 35%, PDT-10 J/cm² – 25% i dla PDT-20 J/cm² – 1,2% również w porównaniu z hodowlami kontrolnymi.

Analizując produkty transkrypcji genu kodującego kolejny receptor dla TGF- β 1 – T β R-II, stwierdzono, we wszystkich trzech badanych liniach komórkowych, bardzo niską ekspresję tego genu. W komórkach hodowli kontrolnych było to: dla C-32 – 252, Colo-829 – 121 i SH-4 – 261 kopii mRNA *T β R-II* na μ g RNA całkowitego (ryc. 3c, ryc. 4c, ryc. 5c).

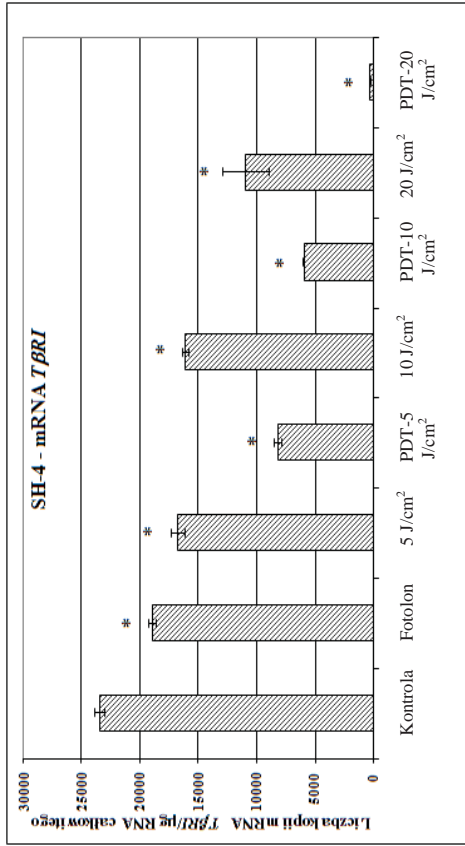


Ryc. 4. Ekspresja genu kodującego TGF- β 1 (A) oraz genów kodujących: T β R-I (B), T β R-II (C) i T β R-III (D) w hodowlach komórek czerniaka Colo-829 poddanych terapii fotodynamicznej z Fotolonem. Fig. 4. Expression of genes encoding TGF- β 1 (A) and its receptors: T β R-I (B), T β R-II (C) i T β R-III (D) in melanoma cell cultures Colo-829 exposed to photodynamic therapy with Fotolon.

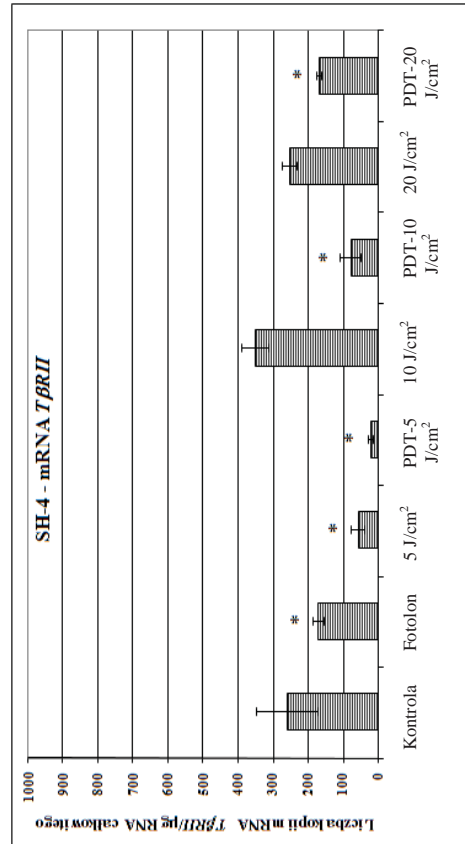
A



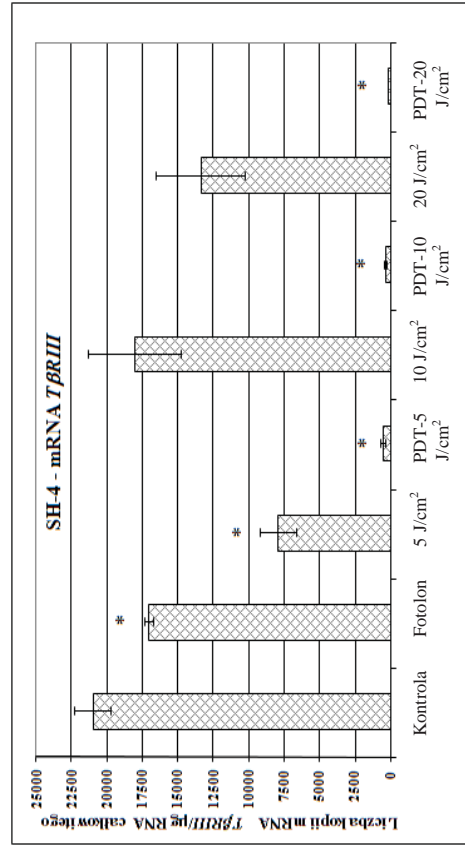
B



C



D



Ryc. 5. Ekspresja genu kodującego TGF-β1 (A) oraz genów kodujących: TβR-I (B), TβR-II (C) i TβR-III (D) w hodowlach komórek czerniaka SH-4 poddanych terapii fotodynamicznej z Fotonem. Fig. 5. Expression of genes encoding TGF-β1 (A) and its receptors: TβR-I (B), TβR-II (C) i TβR-III (D) in melanoma cell cultures SH-4 exposed to photodynamic therapy with Fotonem.

Liczba transkryptów trzeciego z badanych receptorów – T β R-III, po zabiegu fotodynamicznym, tak jak i w przypadku T β R-I, znacząco się zmniejszyła w puli całkowitego RNA naświetlanych komórek (ryc. 3d, ryc. 4d, ryc. 5d). W przypadku linii C-32 przy kolejnych stosowanych dawkach było to dla: PDT-5 J/cm² 5%, PDT-10 J/cm² 2,5% i dla PDT-20 J/cm² 7,5% liczby kopii mRNA tego genu, w przeliczeniu na μ g RNA całkowitego, w odniesieniu do hodowli kontrolnych (ryc. 3d). Analogicznie dla komórek czerniaka Colo-829 uzyskano wartości: po PDT-5 J/cm² – 26%, PDT-10 J/cm² – 12% i dla PDT-20 J/cm² – 4,9% (ryc. 4d) oraz dla czerniaka SH-4 po: PDT-5 J/cm² – 2,5%, PDT-10 J/cm² – 1,7% i dla PDT-20 J/cm² – 0,7% w przeliczeniu na hodowle kontrolne (ryc. 5d).

DYSKUSJA

Terapia fotodynamiczna jest metodą stosowaną w wielu schorzeniach skóry, w tym w zmianach nowotworowych. Uzyskiwane efekty zależą z jednej strony od wrażliwości komórek, wielkości zmiany i jej położenia (głębokość), z drugiej zaś od warunków prowadzonej terapii: rodzaju i stężenia fotouczulacza, dawki promieniowania i trybu naświetlania. Zaletą metody jest selektywność działania oraz bardzo dobry efekt kosmetyczny [11].

Jeszcze kilka lat temu czerniaki uznawano za całkowicie promieniooporne i jedynym praktycznie sposobem leczenia była ingerencja chirurgiczna wspomagana chemioterapią [18,19]. Jednak doniesienia mówiące o ogromnym zróżnicowaniu wrażliwości czerniaków zarówno na radio-, jak i fototerapię sprawiły, że zainteresowano się również możliwością zastosowania PDT w ich leczeniu. Prowadzone badania dowodzą, że PDT nawet w obecności melanin może wywołać stres oksydacyjny w komórkach, co w efekcie może prowadzić do ich śmierci [20,21]. Wielokrotnie analizowano skuteczność tej metody w odniesieniu do przeżywalności i aktywności proliferacyjnej komórek różnych czerniaków oraz zmian molekularnych, do jakich dochodzi w procesie fotodynamicznym.

Opisano zarówno zjawiska apoptozy, jak i nekrozy komórek różnych linii czerniaków poddawanych działaniu różnych fotouczulaczy [21,22,23,24]. Analizując efekty terapii fotodynamicznej na hodowlach czerniaka wykazano również zmiany poziomu ekspresji mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy, katalazy i hemooksygenazy [20]. Dowiedziono, że dobre efekty w wielu przypadkach daje też zastosowanie prekursora protoporfiryny IX – kwasu δ -aminolewulinowego (ALA). Obserwuje się tu dobrą kumulację ALA i efektywne przekształcanie tego związku w fotouczulającą komórki protoporfirynę IX. W opracowaniach, w których porównywano wpływ

ALA na różne komórki (w tym komórki czerniaków) możliwe było uszeregowanie konkretnych nowotworów ze względu na szybkość tworzenia i wielkość kumulacji porfiryn (SKMel-28 > HaCaT > fibroblasty > SKMel-23Bro) [25].

Opisano też efekty działania niektórych fotouczulaczy w aspekcie obecności melanin i ich ewentualnego wpływu na skuteczność PDT [26]. W przypadkach dużej ilości melaniny zwraca się uwagę na konieczność stosowania raczej niskich dawek promieniowania [27,28]. Od niedawna pojawiają się też pierwsze doniesienia o efektach terapii fotodynamicznej stosowanej u pacjentów z czerniakiem [13,14,15,16,17]. Są to głównie przypadki, gdzie ze względu na stadium czy postać czerniaka nie ma możliwości podjęcia innych działań terapeutycznych (np. nieoperowalne guzy w miejscach, w których interwencja chirurgiczna jest niemożliwa). Najczęściej są to przypadki czerniaka narządu wzroku, małżowin, nosa i innych wrażliwych części twarzy.

Sheleg i wsp. [16] opisali 14 przypadków pacjentów z przerzutami czerniaka, u których udało się po jednym zabiegu PDT (w 8 przypadkach) lub po kilku zabiegach (w 6 przypadkach) całkowicie wyeliminować komórki nowotworowe. Wykazano też dużą skuteczność Fotolonu (fotosensybilizator drugiej generacji – kompleks: chlorin e6-poliwinylpirolidon) w leczeniu doskórnych przerzutów czerniaka [29]. Przypuszcza się ponadto, że synergistyczny efekt działania PDT i wywołanej miejscowej hipertermii, może korzystnie wpływać na efektywność terapii [29]. Istotną rolę w nabywaniu przez czerniaka złośliwego charakteru odgrywa TGF- β [7]. Zarówno w stanach fizjologicznych, jak i początkowych stadiach chorób nowotworowych hamuje on wzrost komórek nablónkowych, gdy jednak dojdzie do rozwoju choroby, zaczyna działać na nie pobudzająco, co sprzyja inwazyjności guza. TGF- β promuje rozwój nowotworu także poprzez stymulowanie angiogenezy [4] oraz pobudzanie fibroblastów do syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej, która tworzy rusztowanie i gwarantuje przetrwanie komórek nowotworowym. Reed i wsp. [30] dowiedli, iż istnieje korelacja między ekspresją TGF- β a progresją czerniaka. Syntetyzowany przez komórki TGF- β może modyfikować zachowanie się komórek po wcześniejszym połączeniu się z odpowiednimi receptorami, znajdującymi się praktycznie na wszystkich rodzajach komórek, łącznie z komórkami nowotworowymi [4].

W prezentowanej pracy badano wpływ terapii fotodynamicznej na ekspresję genów kodujących: TGF- β 1 i jego receptory: T β R-I, T β R-II i T β R-III w komórkach trzech linii czerniaka: C-32, Colo-892 oraz SH-4, które przeżyły naświetlanie w dawkach: 5, 10 oraz 20 J/cm². We wszystkich liniach komórkowych czerniaka użytych w doświadczeniu zaobserwowano znaczny spadek liczby kopii mRNA TGF- β 1 w przeli-

czeniu na μg RNA całkowitego. Jak wykazano, terapia fotodynamiczna wpływa także na liczbę mRNA receptorów TGF- β , które stanowi matrycę do syntezy odpowiedniego białka receptorowego. W każdej z badanych linii zaobserwowano znaczny spadek liczby kopii mRNA receptorów TGF- β po zastosowaniu PDT. Zwykle wzrost dawki promieniowania powoduje spadek liczby kopii mRNA badanych genów, jednak w przypadku komórek czerniaka SH-4 zależność taka nie zawsze znajduje potwierdzenie. Sytuacja ta może wynikać z właściwości samych komórek i stopnia ich złośliwości – komórki linii SH-4 wyizolowane zostały z przerzutów melanoma do płuc.

WNIOSKI

1. W przypadku badanych linii czerniaka: C-32, Colo-829 i SH-4 zastosowanie terapii fotodyna-

- micznej z Fotolonem jako fotouczulaczem (PDT-Fotolon), przy dawkach promieniowania: 5, 10 oraz 20 J/cm^2 , powoduje znaczący spadek liczby kopii mRNA TGF- β i receptorów TGF- β : T β R-I, T β R-II i T β R-III w przeliczeniu na μg RNA całkowitego.
2. W świetle informacji dotyczącej roli TGF- β w nabywaniu złośliwego charakteru komórek nowotworów, zmniejszenie liczby kopii mRNA TGF- β i jego receptorów, po przeprowadzeniu PDT, może być korzystne z punktu widzenia terapeutycznego i dla dalszych losów komórek, które przeżyły naświetlanie.
3. Spadek liczby kopii RNA TGF- β może skutkować zmniejszeniem syntezy białka TGF- β przez komórki czerniaka, co z kolei może przełożyć się na lepsze wskaźniki związane z aktywnością układu immunologicznego czy obniżoną zdolnością tworzenia nowych naczyń krwionośnych w obrębie guza nowotworowego.

Praca finansowana ze środków na badania statutowe i własne SUM.

PIŚMIENNICTWO

1. Stalińska L., Ferenc T. Rola TGF- β beta w regulacji cyklu komórkowego. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2005; 59: 441–449.
2. Adler G. Cytokiny w początkowych etapach odpowiedzi odpornościowej. *Reumatologia* 2009; 47: 230–235.
3. Robak T. *Biologia i farmakologia cytokin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa–Łódź 1995: 271–272.
4. Niemczyk M., Foronczewicz B., Mucha K. Rola TGF beta. *Pol. Arch. Med. Wew.* 2005; 113: 401–408.
5. Olakowski M. Rola czynników wzrostu w patogenezie raka trzustki. *Prz. Gastroenterol.* 2007; 2: 175–180.
6. Korzon M., Liberek A., Andrzej M., Szlagatys-Sidorkiewicz A., Marek K. Rola transformującego czynnika wzrostu beta 1 (TGF- β 1) i jego polimorfizmu genowego w etiopatogenezie i przebiegu klinicznym niektórych stanów chorobowych u ludzi. *Pediatr. Pol.* 2004; 79: 963–970.
7. Schmid P., Cox D., Bilbe G. i wsp. TGF- β and TGF- β type II receptor in human epidermis: Differential expression in acute and chronic skin wounds. *J. Pathol.* 2005; 171: 191–197.
8. Murakami M., Matsuzaki F., Funaba M. Regulation of melanin synthesis by the TGF- β family in B16 melanoma cells. *Mol. Biol. Rep.* 2009; 36: 1247–1250.
9. Penafuerte C., Bautista-Lopez N., Bouchentouf M., Birman E., Forner K., Galipeau J. Novel TGF- β antagonist inhibits tumor growth and angiogenesis by inducing IL-2 receptor-driven STAT1 activation. *J. Immunol.* 2011; 186: 6933–6944.
10. Szala S. Angiogeneza i immunosupresja: jin i jang progresji nowotworów? *Post. Hig. Med. Dosw.* 2009; 63: 598–612.
11. Mackiewicz-Wysocka M. Terapia fotodynamiczna – obecne wskazania oraz efekty leczenia stanów przednowotworowych i wybranych nowotworów skóry. *Post. Dermatol. Alergol.* 2007; 24: 127–132.
12. Fornalski J. Terapia fotodynamiczna – jej oddziaływanie i zastosowanie w dermatologii. *Borgis – Nowa Medycyna* 2006; 4: 71–74.
13. Schlötzer-Schrehardt U., Viestenz A., Naumann G.O.H., Laqua H., Michels S., Schmidt-Erfurth U. Dose-related structural effects of photodynamic therapy on choroidal and retinal structures of human eyes. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2002; 240: 748–757.
14. Mroz P., Huang Y.-Y., Szokalska A. i wsp. Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy. *FASEB J.* 2010; 24: 3160–3170.
15. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00007969>.
16. Sheleg S.V., Zhavrid E.A., Khodina T.V. Photodynamic therapy with chlorin e6 for skin metastases of melanoma. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2004; 20: 21–26.
17. Trichopoulos N., Damato B. Photodynamic therapy for recurrent hyphema after proton beam radiotherapy of iris melanoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; 245: 1573–1575.
18. Ruka W., Nowecki Z.L., Rutkowski P. Czerniaki skóry u dorosłych. *Medipage*, Warszawa 2005: 16–24.
19. Krzakowski M. Leczenie systemowe czerniaka skóry. *Współcz. Onkol.* 2003; 7: 604–610.
20. Wawrzuta A., Saczko J., Kulbacka J., Chwiłkowska A. Czy terapia fotodynamiczna może być zastosowana do leczenia czerniaka? *Prz. Dermatol.* 2009; 96: 240–243.
21. Kolarova H., Nevrelouva P., Bajgar R., Jirova D., Kejlova K., Srnad M. Photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. *Toxicol. In Vitro* 2007; 21: 249–253.
22. Szurko A., Krämer-Marek G., Wideł M., Ratuszna A., Habas J., Kuś P. Photodynamic effects of two water soluble porphyrins evaluated on human malignant melanoma cells *in vitro*. *Acta Biochim. Pol.* 2003; 50: 1165–1174.
23. Nowak-Sliwinska P., Karocki A., Elas M., Pawlak A., Stochel G., Urbanska K. Verteporfin, photofrin II, and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells. *BBRC* 2006; 349: 549–555.
24. Agostinis P., Buytaert E., Breysens H., Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3: 721–729.
25. Lang K., Bolsen K., Stahl W. i wsp. The 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin biosynthesis in benign and malignant cells of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B* 2001; 65: 29–34.
26. Lim D.S., Ko S.H., Lee W.Y. Silk-worm-pheophorbide alpha mediated photodynamic therapy against B16F10 pigmented melanoma. *J. Photochem. Photobiol. B* 2004; 74: 1–6.
27. Menezes P.F.C., Bagnato V.S., Johnke R.M. i wsp. Photodynamic therapy for Photogem® and Photofrin® using different light wavelengths in 375 human melanoma cells. *Laser Phys. Lett.* 2007; 4: 546–551.
28. Menezes P.F.C., Imasato H., Ferreira J., Bagnato V.S., Sibata C., Perussi J.R. Aggregation susceptibility on phototransformation of hematoporphyrin derivatives. *Laser Phys. Lett.* 2007; 5: 227–235.
29. Istomin Y.P., Laptsevich T.P., Bizyuk S.A., Alexandrova E.N. Photodynamic efficacy of topical application of chlorin e6 – polyvinyl pyrrolidone complex in tumor-bearing rats. *Exp. Oncol.* 2006; 28: 299–302.
30. Reed J.A., McNutt N.S., Prieto V.G., Albino A.P. Expression of transforming growth factor-beta2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. Implications for tumor progression. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 97–104.