

Joanna Weźgowiec
Katedra Inżynierii Biomedycznej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wroclawska

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Tytuł: Wpływ elektroporacji na aktywność wybranych związków przeciwnowotworowych w ludzkich komórkach gruczolaka guzolu sutkowego

A.1. Wprowadzenie

A.1.1. Elektroporacja

Błona komórkowa stanowi barierę oddzielającą wnętrze komórki od przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Umożliwia selektywny transport cząsteczek, w związku z czym jest istotnym czynnikiem warunkującym skuteczność terapii opartych na dostarczaniu leków do wnętrza komórek. W celu ułatwienia transportu cząsteczek do wnętrza komórek może zostać wykorzystana metoda elektroporacji (EP). Polega ona na poddaniu komórek działaniu impulsów elektrycznych, w efekcie czego zmienia się potencjał transbłonowy oraz może nastąpić utrata ciągłości błony komórkowej. Defekty powstające w błonie komórkowej są nazywane nano-porami, gdyż mają średnicę rzędu 1-10 nm. Reorganizacja struktury błony komórkowej może być procesem nieodwracalnym lub odwracalnym, w zależności od doboru parametrów pola elektrycznego.

Elektroporacja znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach biologii i medycyny, umożliwiając m.in. ułatwiony transport leków i znaczników do wnętrza komórek, transfekcję komórek, czy ich fuzję. Klinicznie zastosowanie elektroporacji odwracalnej do wspomagania chemioterapii nosi nazwę elektrochemioterapii (ECT). Korzyści wynikające z wytworzenia dodatkowych dróg transportu cząsteczek do wnętrza komórek wiążą się z możliwością zastosowania nowych leków, skrócenia czasu kontaktu tkanki z lekiem oraz zmniejszenia stężenia podawanego leku. Pozwala to uzyskać poprawę efektywności terapii oraz zmniejszenie niepożądanych skutków ubocznych. Oprócz bezpośredniego efektu cytotoksycznego, na skuteczność elektrochemioterapii

wpływa również efekt zmniejszonego przepływu krwi w uszkodzonych naczyniach krwionośnych guza nowotworowego poddanego ECT oraz reakcja układu immunologicznego.

Standardy procedury elektrochemioterapii zostały zdefiniowane jako procedura ESOPE (European Standard Operating Procedures for Electrochemotherapy) i opublikowane w 2006 r. Lekiem najpowszechniej stosowanym podczas zabiegu ECT jest bleomycyna, antybiotyk glikopeptydowy niszczący szybko dzielące się komórki, poprzez uszkodzenie ich nici DNA. Ze względu na słabą przenikalność tego leku przez błony komórkowe, korzyści wynikające z zastosowania elektroporacji w celu poprawy dostarczania bleomycyny do komórek są szczególnie istotne. Drugim lekiem często stosowanym w zabiegach ECT jest cisplatyna – cytostatyk, którego działanie jest oparte na sieciowaniu DNA, w następstwie czego nie jest możliwy podział komórki.

Obecnie ECT jest stosowana głównie jako leczenie paliatywne u pacjentów z czerniakiem, rakiem piersi, rakiem podstawnkomórkowym skóry oraz nowotworami regionu głowy i szyi (Breton i Mir, 2012). Perspektywy rozwoju tej techniki wiążą się z leczeniem guzów zlokalizowanych głębiej, co wymaga projektowania nowych typów elektrod oraz precyzyjnego planowania terapii (Soden i in., 2006), (Linnert i Gehl, 2009).

A.1.2. Terapia fotodynamiczna

Koncepcja połączenia działania światła i leku dla celów terapeutycznych sięga czasów antycznych. Jej rozwój doprowadził do powstania nowej metody, nazwanej terapią fotodynamiczną (PDT, ang. *photodynamic therapy*). Jest to małoinwazyjna metoda lecznicza stosowana w wielu chorobach nowotworowych oraz schorzeniach nienowotworowych. PDT wymaga współistnienia trzech elementów: substancji światłoczułej, światła oraz tlenu zgromadzonego w tkance. Gdy wszystkie te elementy są obecne, reakcja fototoksyczna umożliwia lokalne niszczenie tkanek patologicznych.

Procedura zabiegu PDT składa się z kilku etapów. Związek światłoczuły, nazywany fotouczulaczem, jest dostarczany ogólnoustrojowo lub lokalnie i akumuluje się głównie w tkance nowotworowej. Jest aktywowany światłem o odpowiedniej długości fali, dopasowanej do maksimum absorpcji fotouczulacza. Wzbudzone cząsteczki fotouczulacza mogą oddziaływać z substratami biologicznymi lub tlenem zgromadzonym w tkance, w wyniku czego generowane są reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Następuje indukcja stresu oksydacyjnego, w wyniku czego zachodzi utlenianie lipidów, białek i DNA. Procesy te mogą prowadzić do śmierci komórek

na drodze apoptozy, nekrozy lub autofagii (Agostinis i in., 2011). Typ śmierci komórek zależy od kilku czynników, takich jak właściwości fotouczulacza, typ komórek, dawka leku oraz światła (Wyld i in., 2001). Fotouczulacze zlokalizowane mitochondrialnie wywołują najczęściej apoptozę, podczas gdy związki akumulujące się w lizosomach lub błonach komórkowych mogą indukować zarówno apoptozę, jak i nekrozę (Juzeniene i in., 2007). Efekt terapeutyczny PDT wynika z bezpośredniej cytotoksyczności, jak również z uszkodzenia naczyń krwionośnych w pobliżu guza oraz z odpowiedzi immunologicznej (stymulacji lub supresji układu immunologicznego).

Fotouczulacze

Idealny fotouczulacz powinien posiadać określone własności. Najważniejsze cechy to: silna fototoksyczność, minimalna "ciemna" toksyczność oraz selektywna akumulacja w tkankach nowotworowych. Związek światłoczuły powinien również być efektywnie usuwany z organizmu oraz wykazywać maksimum absorpcji w tzw. oknie terapeutycznym tkanki.

Selektywność PDT wynika zarówno z selektywnej akumulacji fotouczulacza w tkance patologicznej, jak również dostarczania światła lokalnie do leczonego obszaru. Uważa się, że selektywna lokalizacja fotouczulacza w tkance nowotworowej związana jest z nieszczelnymi naczyniami krwionośnymi, słabym drenażem limfatycznym, niskim pH i silną ekspresją receptorów lipoproteiny niskiej gęstości (LDL, ang. *low-density lipoprotein*). Z drugiej strony selektywność PDT ogranicza zastosowanie tej metody wyłącznie do zmian bez przerzutów (Agostinis i in., 2011).

Jednym z najbardziej znanych i najczęściej stosowanych fotouczulaczy jest Photofrin® (Porfimer Sodium, Ph) – komercyjna, oczyszczona mieszanina pochodnych hematoporfiryny. Photofrin jest fotouczulaczem pierwszej generacji, dopuszczonym do zastosowań klinicznych, który daje dobre efekty w leczeniu różnych typów nowotworów. Jest to związek lipofilny akumulujący się głównie w mitochondriach, retikulum endoplazmatycznym, błonie cytoplazmatycznej i jądrowej oraz okołojądrowym rejonie cytoplazmy komórek (Peng i in., 1996) (Choudhary i in., 2009) (Berg i in., 2011) (Ferreira i in., 2009) (Samia i in., 2006).

A.1.2.1. Cyjaniny

Barwniki z rodziny cyjanin składają się z dwóch pierścieni heterocyklicznych zawierających centra azotowe powiązane wiązaniami metinowymi. Większość z nich jest

barwnikami kationowymi i ma charakter hydrofobowy (Delaey i in., 2000). Dotychczas cyjaniny były stosowane w przemyśle fotograficznym i obrazowaniu biomedycznym (Frangioni, 2003) (Yang i in., 2010), (Zhang i in., 2010). Jednakże, ze względu na silną absorpcję w obszarze bliskiej podczerwieni, cyjaniny mogą być również atrakcyjnymi kandydatami do zastosowania w terapii fotodynamicznej (El-Shishtawy, 2009).

Zastosowania PDT

Obecnie PDT jest wykorzystywana w leczeniu nowotworowych oraz nienowotworowych schorzeń dermatologicznych, urologicznych, ginekologicznych, oftalmologicznych, pulmonologicznych i gastrologicznych. Jest stosowana jako kontynuacja chirurgii, chemioterapii, radioterapii czy immunoterapii. PDT znajduje również nieonkologiczne zastosowania, m.in. w stomatologii, leczeniu zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem, chorób naczyniowych, łuszczycy czy trądziku. Zalety tej metody to niewielka toksyczność względem komórek prawidłowych, niepodleganie mechanizmom oporności oraz bardzo dobre efekty kosmetyczne (Agostinis i in., 2011), (Josefsen i Boyle, 2008).

Oprócz leczenia, metoda fotodynamiczna znajduje również zastosowanie w rozpoznawaniu stanów przednowotworowych i nowotworowych. Metoda ta jest nazywana diagnostyką fotodynamiczną (PDD, ang. *photodynamic diagnosis*), (Nowak-Stępniewska i in., 2013).

A.1.3. Rak piersi

Charakterystyka

Rak piersi jest jednym z najczęstszych typów nowotworów. Każdego roku na świecie diagnozowanych jest 1,3 mln nowych przypadków zachorowań. Wśród kobiet, nowotwór ten jest odpowiedzialny za niemal 15% wszystkich zgonów związanych z chorobami nowotworowymi (Shajahan-Haq i in., 2015). Z postępem raka piersi związanych jest kilka czynników: mutacje germinalne, bezdzietność, wczesna pierwsza miesiączka, wiek. Na podstawie typu histologicznego, nowotwory piersi są klasyfikowane do jednej z pięciu grup: przewodowe, zrazikowe, brodawkowate, inne oraz niesklasyfikowane (Kuźma-Richert i in., 2011).

Rutynowo, jako metoda badań przesiewowych pod kątem występowania raka piersi stosowana jest mammografia. Dodatkowych informacji może dostarczyć badanie USG, MRI, CT lub PET. Oprócz metod obrazowania, w celu klasyfikacji typu nowotworu

stosuje się również immunohistologiczną detekcję markerów nowotworowych (Kuźma-Richert i in., 2011).

Leczenie

Podjęcie terapeutyczne dobierane jest w zależności od typu nowotworu, jego wielkości, inwazyjności, stanu węzłów chłonnych, statusu hormonalnego oraz ogólnego stanu zdrowia. Każda z metod leczenia (chirurgia, chemioterapia, radioterapia, hormonoterapia, terapia celowana) może być stosowana oddzielnie lub łączona z innymi terapiami.

W leczeniu zlokalizowanych guzów standardową opcją jest chirurgia, która może być łączona z radioterapią. Leczenie ogólnoustrojowe (chemioterapia, hormonoterapia lub terapia celowana) umożliwia kontrolę wzrostu guza. Chemioterapia poprzedzona chirurgią (terapia adjuwantowa) jest zalecana w przypadku nowotworów z przerzutami. Chemioterapia może być również stosowana przed chirurgią (terapia neoadjuwantowa) w przypadku dużych guzów, stanów zapalnych, guzów naciekających na mięśnie oraz przerzutów do węzłów chłonnych (Shajahan-Haq i in., 2015).

A.1.4. Oporność wielolekowa

Mechanizm oporności wielolekowej

Oporność wielolekowa (MDR, ang. *multi drug resistance*) jest zjawiskiem jednoczesnej niewrażliwości komórek na różne leki o odmiennej strukturze i mechanizmach działania. Jest czynnikiem ograniczającym skuteczność chemioterapii. Może mieć uwarunkowania genetyczne (oporność pierwotna) lub komórki mogą ją nabywać pod wpływem terapii (oporność wtórna) (Borst, 1991).

Szczegółowy mechanizm oporności lekowej komórek nowotworowych jest nadal przedmiotem badań. Uważa się, że oporność może wynikać ze zmian w akumulacji i metabolizmie leków. Zmiany w akumulacji leków (zmniejszony wychwyt lub zwiększone usuwanie) mogą być związane zarówno z właściwościami leków, jak i strukturą błony komórkowej. Najlepiej poznany mechanizm polega na zwiększonym usuwaniu leków z komórek przez białka błonowe zwane transporterami ABC. Niepowodzenie chemioterapii może również wynikać ze zmian w metabolizmie leków na skutek zmniejszonej ekspresji enzymów aktywacyjnych lub zwiększonej ekspresji enzymów detoksykacyjnych. Inne mechanizmy są oparte na mutacjach obniżających powinowactwo leku do celu komórkowego oraz na zmniejszonej zdolności komórek

do naprawy uszkodzonych struktur (DNA, białek lub błon) (Borst, 1991), (Longley i Johnston, 2005).

Metody przewyciężenia oporności lekowej

Podjmowane są różne próby przewyciężenia problemu oporności lekowej komórek nowotworowych. Obiecującą metodą wydawały się modulatory dostarczane równocześnie z lekami i rywalizujące z nimi o dostęp do transporterów błonowych (Gottesman i in., 2002). Inna strategia jest oparta na hamowaniu ekspresji genów MDR poprzez zastosowanie siRNA w celu wyciszenia genów (Han i in., 2012). Jednakże brak bezpiecznych nośników utrudnia osiągnięcie efektywnej inhibicji.

Liczne nowe próby przewyciężania oporności lekowej są związane z dostarczaniem nanocząsteczek, które mogą akumulować się w komórkach nowotworowych i nie są rozpoznawane przez transportery ABC. Kolejną proponowaną metodą jest internalizacja fotochemiczna (PCI, ang. *photochemical internalization*) – technologia oparta na fotochemicznym przebicju pęcherzyków endocytarnych z uwięzionym lekiem. Lou i in. wykazali zmniejszoną oporność na doksorubicynę w komórkach raka piersi poddanych PCI. Wnioskowali, że jest to nowa, obiecująca metoda przewyciężenia oporności lekowej (Lou i in., 2006).

Inną metodą może być odwracalna elektroporacja zastosowana w celu dostarczania leków lub genów. Cemazar i wsp. badali wpływ elektroporacji na efektywność dostarczania różnych leków opartych na cisplatynie do lekoopornych komórek nowotworowych. Wykazali zwiększoną cytotoksyczność w komórkach lekoopornych poddanych elektroporacji (Cemazar i in., 2006). Meschini i wsp. badali potencjał zastosowania elektroporacji do przewyciężania oporności na doksorubicynę w komórkach raka jelita. Wykazali, że zastosowanie impulsów elektrycznych zwiększyło wewnątrzkomórkową akumulację doksorubicyny, co skutkowało obniżeniem przeżywalności komórek (Meschini i in., 2012). Inna strategia związana jest z terapią elektro-genową. Xiao i wsp. pokazali, że elektroporacja umożliwiła skuteczne dostarczanie RNAi ukierunkowanego na geny MDR1, skutkując odwróceniem oporności lekowej (Xiao i in., 2008).

A.2. Cel i tezy rozprawy

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie, w szczególności rak gruczołu sutkowego stanowi w Polsce ok. 20% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe wśród kobiet. Obecnie stosowane terapie przeciwnowotworowe często okazują się nieskuteczne lub wykazują znaczną toksyczność względem komórek zdrowych. Liczne skutki uboczne stosowanych cytostatyków oraz wrodzona lub nabyta oporność komórek nowotworowych na podawane leki stanowią poważne ograniczenia chemioterapii. W związku z tym konieczne jest opracowanie i rozwój nowych strategii leczenia nowotworów. Prace w tym kierunku polegają głównie na poszukiwaniu bardziej skutecznych terapii, innowacyjnych, mniej toksycznych leków oraz metod ich selektywnego dostarczenia. Jedną z metod poprawiających skuteczność dostarczenia związków do wnętrza komórek jest elektroporacja.

Celem niniejszej rozprawy była ocena wpływu elektroporacji na poprawę skuteczności działania związków o aktywności przeciwnowotworowej na komórki raka piersi, w tym komórki z wykształconą opornością wielolekową.

Modelem, na którym były prowadzone badania, są ludzkie linie komórek nowotworowych gruczolakoraka gruczołu sutkowego MCF-7/WT i MCF-7/DX (linia oporna na dokсорubicynę). Elektroporacja wykorzystana została do wspomagania dwóch typów terapii przeciwnowotworowych: chemioterapii oraz terapii fotodynamicznej. Badanymi związkami były bleomycyna, Photofrin oraz cyjanina IR-775.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej zbadane zostały mechanizmy zachodzące w komórkach pod wpływem elektroporacji w obecności cyjaniny IR-775, Photofrinu oraz bleomycyny. Przeprowadzona została optymalizacja warunków doświadczeń dla wybranych linii komórkowych. Oceniono wpływ natężenia pola elektrycznego i stężenia związków na procesy wewnątrzkomórkowe oraz na poprawę transportu badanych substancji do wnętrza komórek. Dokonana została również charakterystyka porównawcza badanych linii komórkowych pod względem morfologii oraz wykształconych mechanizmów związanych z opornością lekową (ekspresja białek transportowych). Odpowiedzi komórkowe wywołane elektroporacją i działaniem badanych związków oceniane były metodą spektrofotometryczną na poziomie zmian integralności błony komórkowej (pomiar zewnątrzkomórkowej dehydrogenazy

mleczanowej), aktywności enzymów związanych z metabolizmem (test MTT), funkcjonowania lizosomów (test NR) oraz zdolności komórek do syntezy białek (test SRB). Do określenia śmierci komórek wykorzystana została metoda barwienia błękitem trypanowym.

Tezy:

- Zastosowanie elektroporacji umożliwi zmniejszenie stężenia oraz czasu oddziaływania badanych leków podawanych do komórek nowotworowych gruczołu sutkowego, przy zachowaniu tej samej skuteczności.
- Tworzenie alternatywnych dróg transportu leku do wnętrza komórki za pomocą elektroporacji przyczyni się do osłabienia efektów zjawiska oporności wielolekowej w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego opornych na standardową chemioterapię.

A.3. Materiały i metody

Badania były wykonywane w warunkach *in vitro* na dwóch liniach ludzkich komórek gruczolakoraka gruczołu sutkowego: wrażliwych (MCF-7/WT) i opornych (MCF-7/DX) na doksorubicynę. Ponadto, komórki jajnika chomika chińskiego (CHO-WTT) o niskiej ekspresji kanałów jonowych posłużyły jako model do badań nad elektroporacją.

W badaniach stosowano trzy związki chemiczne: Photofrin (fotouczulacz stosowany klinicznie), cyjaninę IR-775 (komercyjny związek światłoczuły, który nie był dotychczas stosowany w terapii fotodynamicznej) oraz bleomycynę (cytostatyk stosowany w ECT). Wybrane substancje światłoczułe (Photofrin oraz cyjanina IR-775) nie mają charakteru hydrofilnego, jednak wstępne badania pokazały, że zastosowanie elektroporacji poprawia ich transport do wnętrza komórek. Ze względu na własności korzystne pod kątem zastosowania w PDT, związki te zostały zatem wybrane do dalszych badań.

Zawiesinę komórek w roztworze buforu do elektroporacji z dodatkiem badanych związków chemicznych umieszczano w kuwecie do elektroporacji i poddawano działaniu impulsów elektrycznych o wybranych parametrach. Następnie, w przypadku eksperymentów reakcji elektro-fotodynamicznej (EP-PDR), po zadanym czasie inkubacji,

komórki były naświetlane promieniowaniem elektromagnetycznym o odpowiedniej długości fali.

Efekty komórkowe po zastosowanych procedurach terapeutycznych oceniano po 24 godzinach następującymi metodami:

- 1) analiza transportu molekularnego metodami mikroskopii fluorescencyjnej (wychwyty IR-775, Photofrinu oraz jodku propidyny) oraz cytometrii przepływowej (wychwyty jodku propidyny),
- 2) analiza zmian morfologicznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej (znakowanie jąder komórkowych, błon komórkowych oraz mitochondriów),
- 3) analiza śmierci komórek metodą mikroskopii świetlnej (barwienie błękitem trypanowym),
- 4) analiza efektów cytotoksycznych metodą spektrofotometrii:
 - a) ocena integralności błon komórkowych (test LDHe),
 - b) ocena aktywności mitochondriów (testy MTT i XTT),
 - c) ocena aktywności lizosomów (test NR),
 - d) ocena zdolności komórek do syntezy białek (test SRB),
- 5) analiza immunocytochemiczna wpływu reakcji na układ antyoksydacyjny (ekspresję GST) metodą mikroskopii świetlnej,
- 6) analiza immunocytochemiczna wpływu na oporność lekową (ekspresję transporterów błonowych MDR1 i MRP7) metodą mikroskopii świetlnej.

Wyniki analiz ilościowych były wyrażane jako średnia \pm odchylenie standardowe. Istotność statystyczną wyników dla poszczególnych prób w stosunku do grupy kontrolnej (nie poddanej działaniu pola elektrycznego ani leku) oceniano za pomocą testu t-Studenta dla $p \leq 0.05$ lub $p \leq 0.005$.

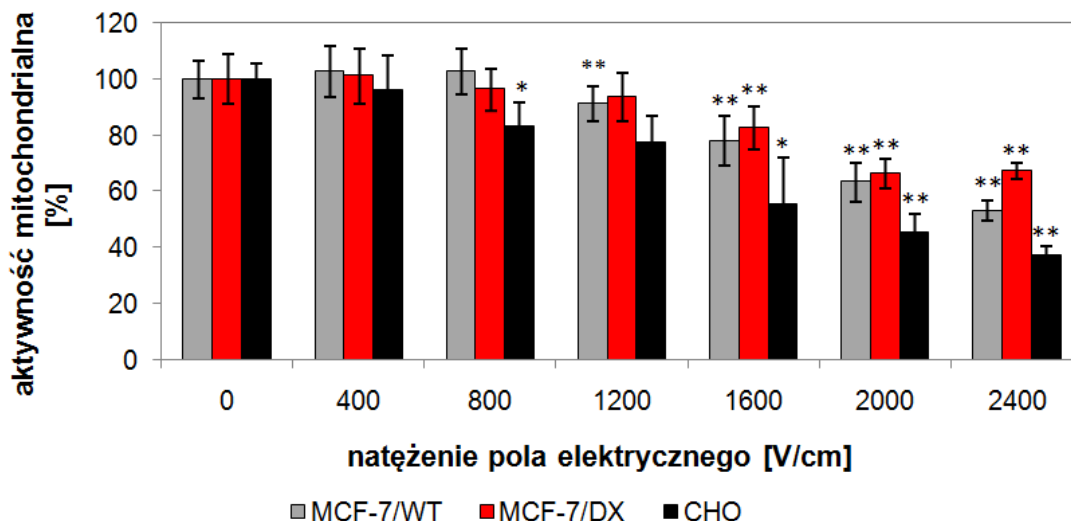
A.4. Wybrane wyniki

W niniejszym streszczeniu zaprezentowano wybrane wyniki spośród wszystkich, które zostały przedstawione w zasadniczej części rozprawy doktorskiej.

A.4.1. Elektroporacja

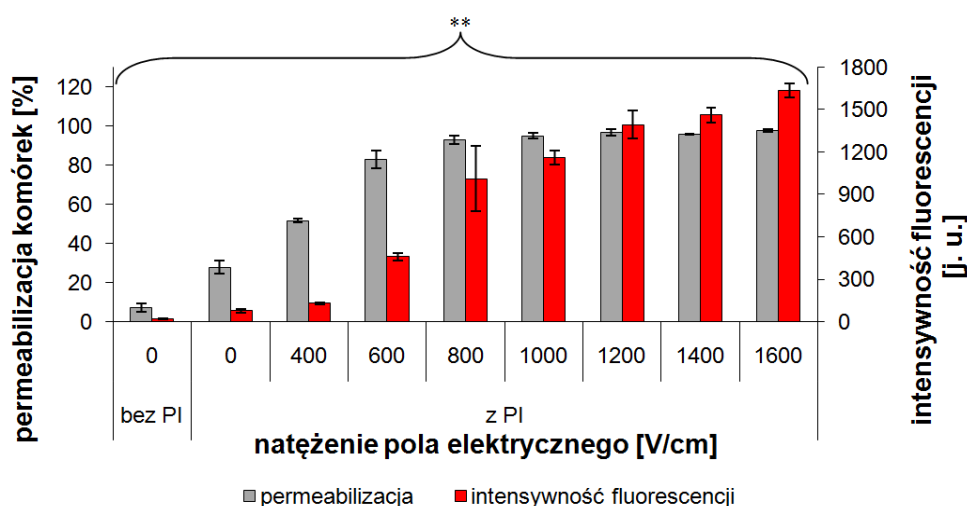
Oceniano wpływ elektroporacji na aktywność mitochondriów w komórkach MCF-7/WT, MCF-7/DX i CHO. Dla wszystkich linii komórkowych aktywność

mitochondriów malała w miarę wzrostu natężenia pola elektrycznego (rys. 1). Do dalszych eksperymentów (EP-PDR oraz ECT) wybrano wartości natężenia pola elektrycznego równe 800 V/cm i 1200 V/cm dla linii komórkowych MCF-7/WT i MCF-7/DX oraz 600 V/cm i 800 V/cm dla linii komórkowej CHO.



Rys. 1. Wyniki testu MTT na komórkach MCF-7/WT, MCF-7/DX oraz CHO poddanych elektroporacji; *p < 0,05, **p < 0,005.

Następnie oceniano wpływ elektroporacji na poprawę transportu molekularnego. Efektywność elektroporacji błon komórkowych oceniano na modelu komórek CHO elektroporowanych w obecności jodku propidyny (PI). Za pomocą cytometru przepływowego FACS mierzono liczbę komórek zabarwionych jodkiem propidyny oraz intensywność fluorescencji w paśmie emisji tego znacznika (rys. 2). Obecność jodku propidyny w komórkach świadczyła o zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych. Permeabilizacja komórek zwiększała się wraz ze wzrostem natężenia stosowanego pola elektrycznego. Dla wartości 800 V/cm ponad 90% komórek było wyznakowanych jodkiem propidyny. Intensywność emisji fluorescencji również zwiększała się wraz ze wzrostem natężenia stosowanego pola elektrycznego.



Rys. 2. Wyniki analizy metodą cytometrii przepływowej komórek CHO elektroporowanych z jodkiem propidyny (PI) ; ** $p < 0,005$.

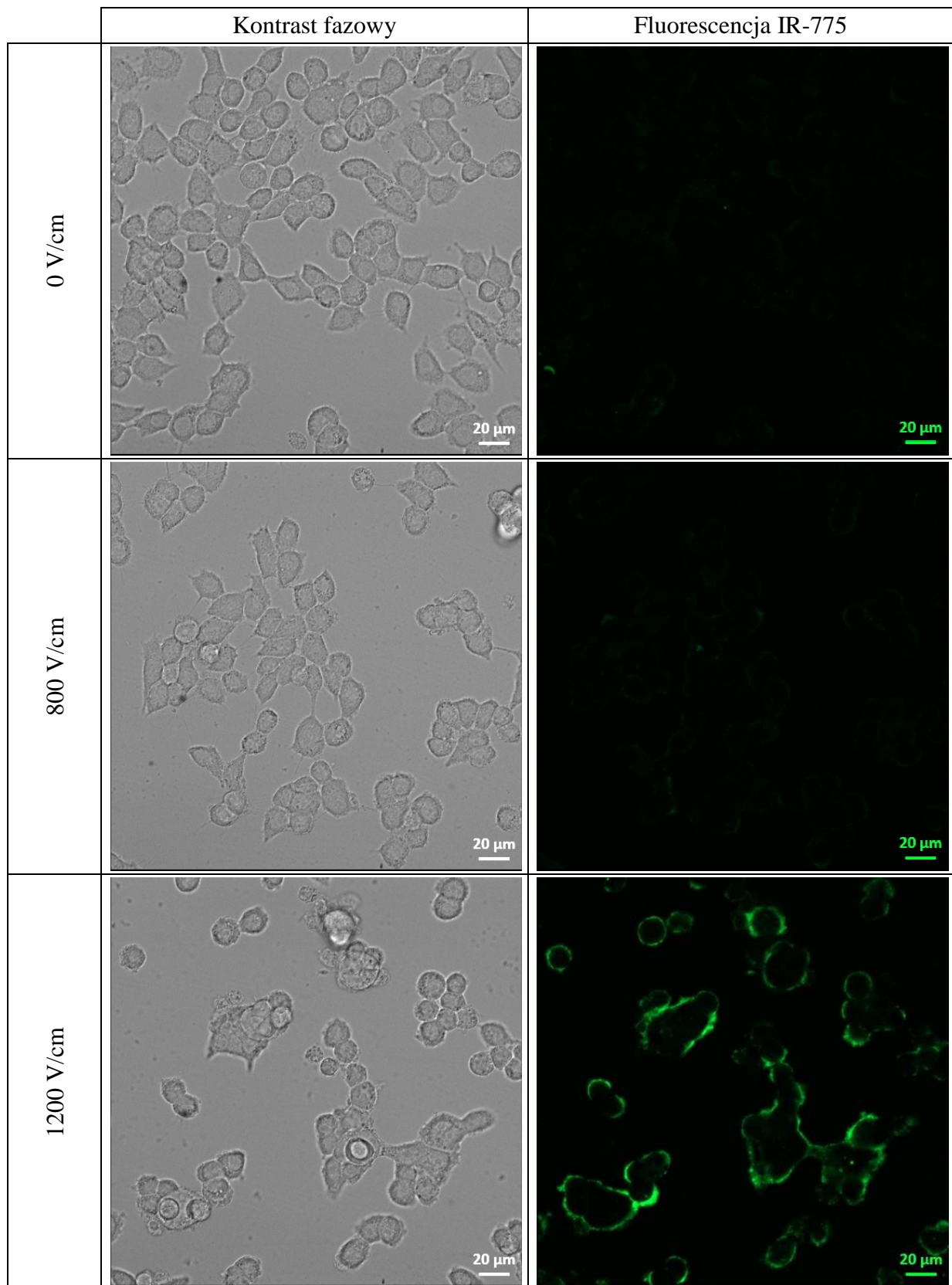
Wybrane parametry pola elektrycznego (natężenie 800 V/cm oraz 1200 V/cm) zastosowano w celu poprawy transportu badanych związków do komórek nowotworowych. Lokalizacja cyjaniny IR-775 w komórkach MCF-7/DX została oceniona za pomocą konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego (rys. 3). Dla komórek nieelektroporowanych (0 V/cm) transport IR-775 był utrudniony, zaobserwowano jedynie słaby sygnał fluorescencyjny. Zastosowanie elektroporacji poprawiło skuteczność dostarczania cyjaniny, szczególnie dla natężenia pola elektrycznego 1200 V/cm. Po elektroporacji komórek MCF-7/DX najwięcej cyjaniny IR-775 zakumulowało się w obszarze błon komórkowych.

A.4.2. Reakcja elektro-fotodynamiczna oraz elektrochemioterapia *in vitro*

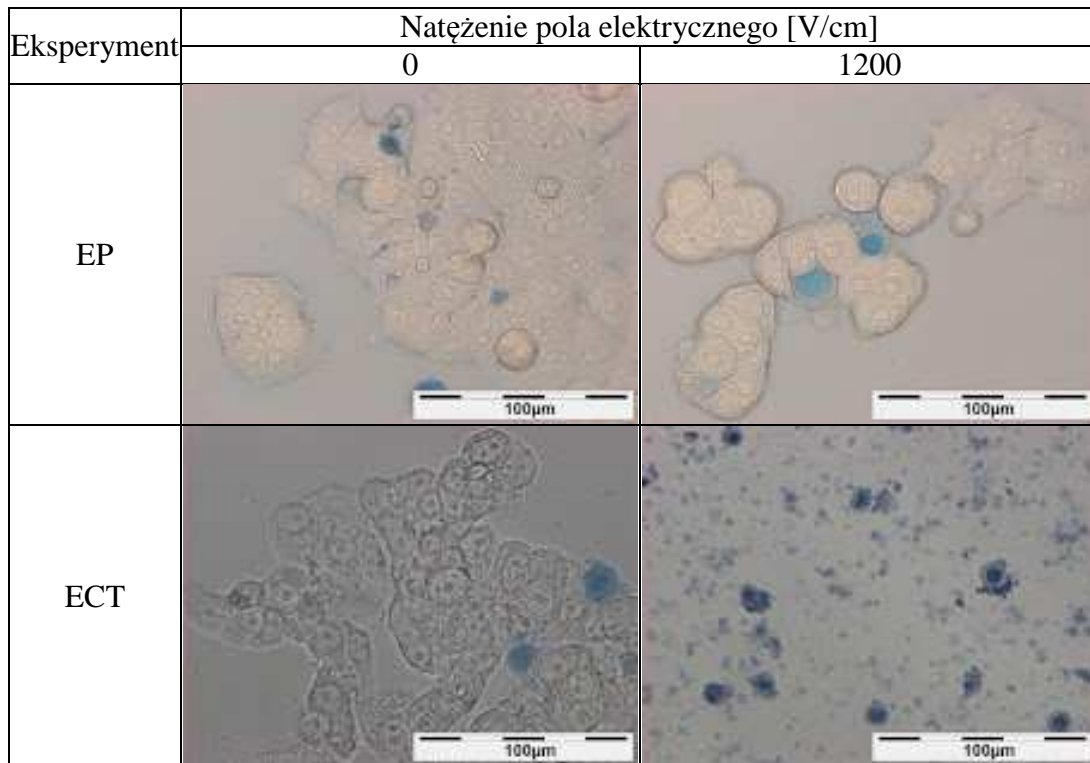
Wpływ zastosowanych metod terapeutycznych na przeżywalność komórek oceniano metodą barwienia martwych komórek błękitem trypanowym. Na rys. 4. przedstawiono obrazy mikroskopowe komórek MCF-7/DX barwionych błękitem trypanowym 24 godziny po zastosowaniu ECT z bleomycyną. Kolor niebieski wskazuje na komórki martwe. Wykazano, że elektrochemioterapia z bleomycyną wywołała silny efekt toksyczny, w przeciwieństwie do samej elektroporacji oraz samej bleomycyny bez EP.

Wyniki analizy ilościowej przeprowadzonej na podstawie zdjęć mikroskopowych zaprezentowano na rys. 5. Dla każdego warunku doświadczeń obliczono procentowy udział komórek zabarwionych błękitem trypanowym w całej populacji komórek. Bez elektroporacji toksyczność bleomycyny w obydwu liniach komórkowych była niska. Po zastosowaniu elektroporacji w połączeniu z bleomycyną zaobserwowano zwiększony

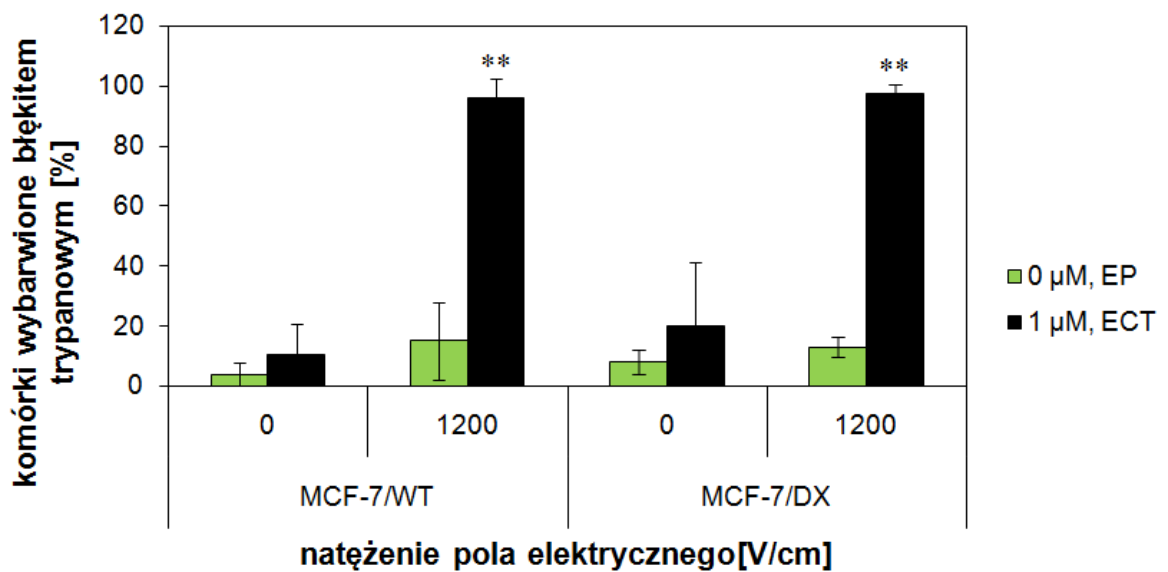
wychwył błękitu trypanowego (24 godziny po ECT *in vitro*), wskazujący na wzmocnienie cytotoksycznego efektu bleomycyny dzięki zastosowaniu elektroporacji.



Rys. 3. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja cyjaniny IR-775 w komórkach MCF-7/DX.

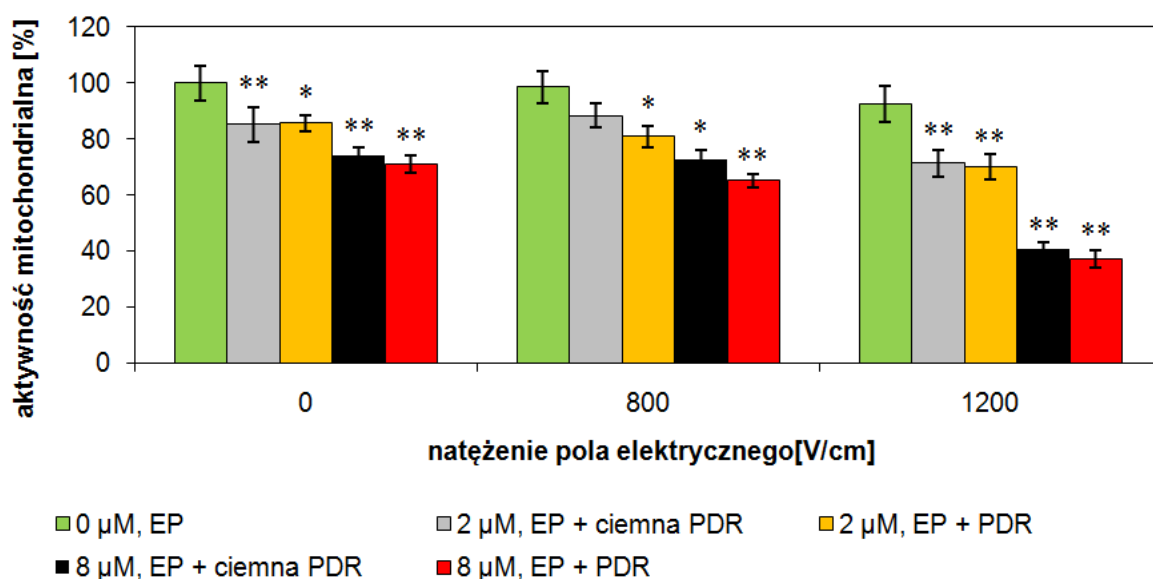


Rys. 4. Barwienie błękitem trypanowym komórek MCF-7/DX poddanych elektrochemioterapii z bleomycyną.

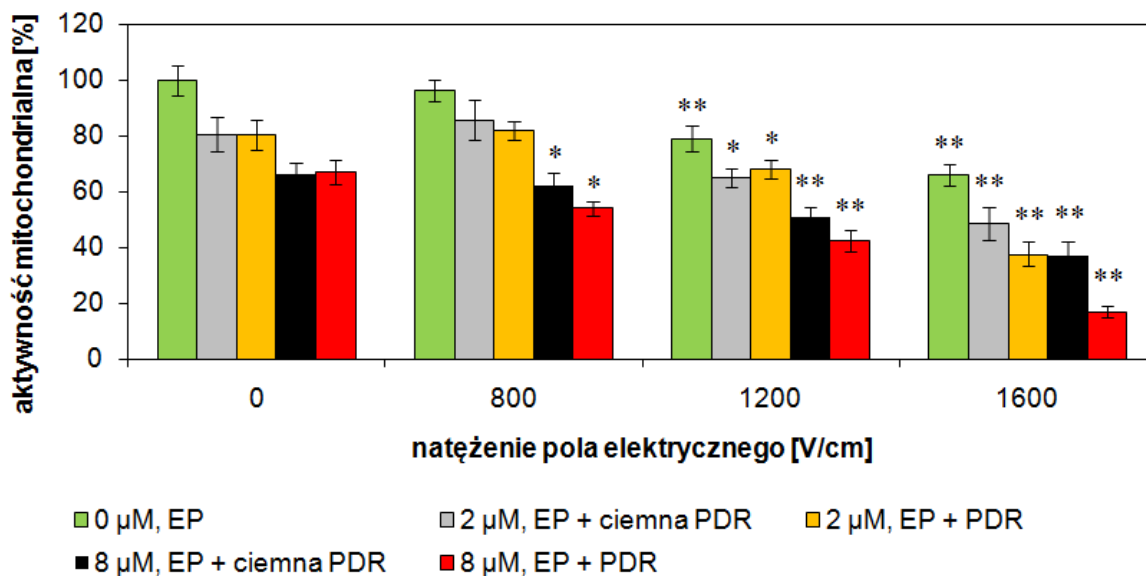


Rys. 5. Barwienie błękitem trypanowym komórek MCF-7/WT i MCF-7/DX poddanych elektrochemioterapii z bleomycyną; ** $p < 0,005$.

Efekt cytotoksyczny zastosowanych metod oceniono także różnymi testami kolorymetrycznymi. Na rys. 6-9 przedstawiono wyniki testu MTT polegającego na ocenie aktywności mitochondrialnej. W przypadku cyjaniny IR-775 efekt toksyczny w obydwu liniach komórkowych (MCF-7/WT i MCF-7/DX) był silniejszy dla większego stężenia cyjaniny (8 μM , w porównaniu z 2 μM) oraz po zastosowaniu większego natężenia pola elektrycznego (1200 V/cm, w porównaniu z 800 V/cm) (rys. 6, 7). Natomiast naświetlanie komórek z cyjaniną nie wpłynęło w dużym stopniu na dodatkowe zahamowanie aktywności mitochondriów. W dobranych warunkach eksperymentalnych właściwości fotouczulające cyjaniny nie były silne. Wynik ten sugeruje, że badana cyjanina może być rozważana również jako związek cytotoksyczny stosowany w chemioterapii. Wyniki testu MTT pokazują, że w linii komórek MCF-7/DX większe natężenie pola elektrycznego w połączeniu z mniejszym stężeniem IR-775 (1600 V/cm i 2 μM) wywołały taki sam efekt jak mniejsze natężenie pola elektrycznego w połączeniu z większym stężeniem IR-775 (1200 V/cm i 8 μM).

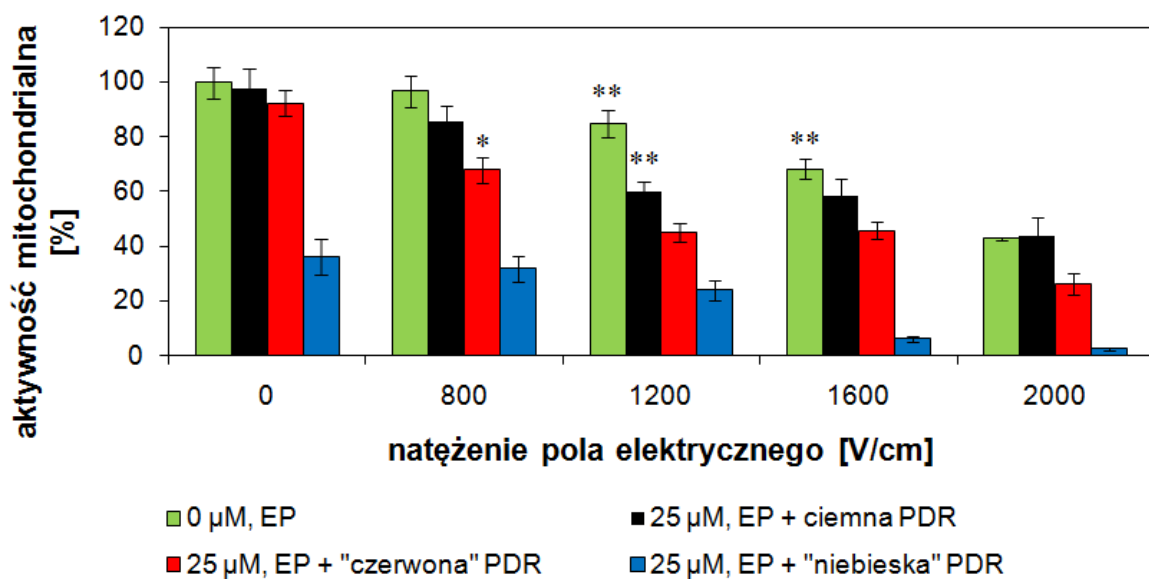


Rys. 6. Wyniki testu MTT na komórkach MCF-7/WT poddanych reakcji elektro-fotodynamicznej z IR-775 ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

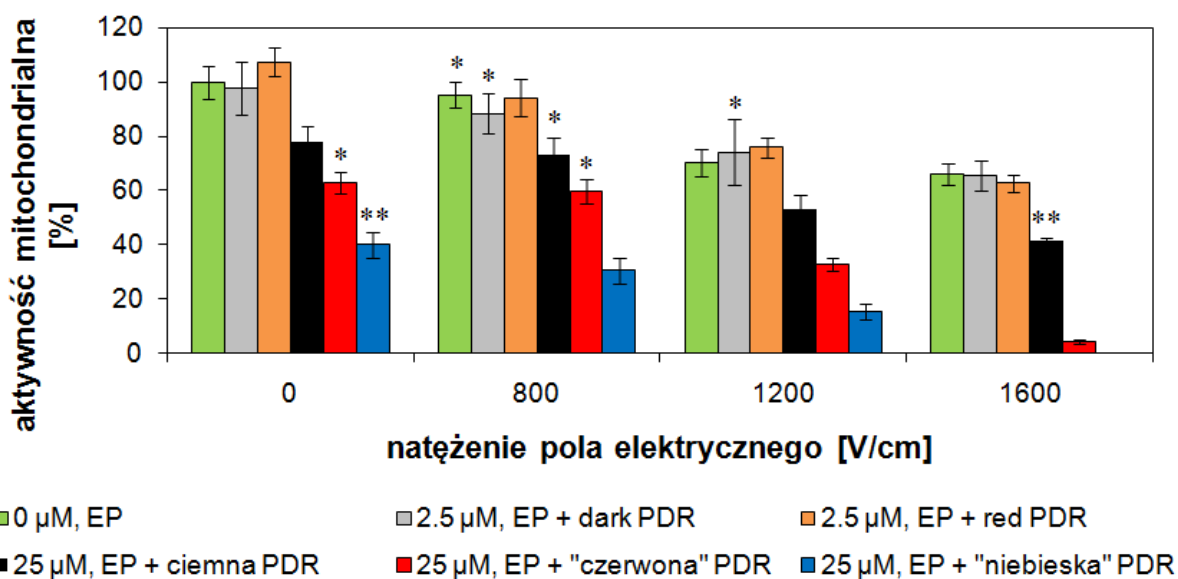


Rys. 7. Wyniki testu MTT na komórkach MCF-7/DX poddanych reakcji elektro-fotodynamicznej z IR-775 ; *p < 0,05, ** p < 0,005.

W przeciwieństwie do cyjaniny IR-775, toksyczność Photofrinu zależała silnie od naświetlania (rys. 8, 9). Światło niebieskie (450 nm) okazało się najbardziej efektywne, jednak wywoływało bardzo silny efekt toksyczny nawet bez elektroporacji. Optymalny efekt uzyskano, gdy komórki elektroporowane z Photofrinem naświetlano światłem czerwonym (630 nm). W teście MTT aktywność mitochondrialna mierzona dla nieelektroporowanych komórek MCF-7/WT pozostawała na poziomie >90%, a dla komórek MCF-7/DX >60%. Gdy komórki były elektroporowane przy 1200 V/cm i naświetlane światłem czerwonym, aktywność mitochondrialna zmalała do ok. 30% dla obydwu linii komórkowych. W komórkach MCF-7/DX dodatkowo oceniany był wpływ Photofrinu w stężeniu 2,5 μM. Wykazano, że EP-PDR dla tego stężenia Photofrinu miała podobny wpływ na aktywność mitochondriów jak sama elektroporacja. Ponadto, wykazano, że zastosowanie krótkiego czasu inkubacji komórek z Photofrinem (10 min) skutkowało zmniejszeniem toksyczności samego fotouczulacza w porównaniu ze wstępnymi eksperymentami dotyczącymi PDR bez elektroporacji (w których komórki były inkubowane z Photofrinem przez 1 godzinę).



Rys. 8. Wyniki testu MTT na komórkach MCF-7/WT poddanych reakcji elektro-fotodynamicznej z Photofrinem; *p < 0,05, ** p < 0,005.



Rys. 9. Wyniki testu MTT na komórkach MCF-7/DX poddanych reakcji elektro-fotodynamicznej z Photofrinem; *p < 0,05, ** p < 0,005.

A.4.3. Podsumowanie wyników ilościowych testów cytotoksyczności

W celu określenia „korzyści antynowotworowej” z zastosowania elektroporacji, wyniki barwienia błękitem trypanowym, testów LDHe, MTT, XTT, NR i SRB zostały użyte do obliczenia „współczynników zysku z EP”. Współczynniki te obliczano jako iloraz wyrażonej procentowo toksyczności EP-PDR lub ECT (przy 1200 V/cm) i toksyczności PDR lub CT bez EP (przy 0 V/cm). Wyniki zostały zaprezentowane w Tabeli 1. Dla 93 spośród 96 warunków doświadczeń EP zwiększyła toksyczny efekt zastosowanych metod terapeutycznych. Największy zysk odnotowano dla ECT z bleomycyną, EP-PDR z Photofrinem („ciemnej” i naświetlanej światłem czerwonym) oraz EP-PDR z IR-775 (2 μ M, naświetlanie promieniowaniem NIR).

W celu określenia, w jakim stopniu efekt cytotoksyczny wynikał jedynie z aktywności badanych związków przeciwnowotworowych, wykluczono część toksyczności wynikającą z zastosowania pola elektrycznego. „Współczynniki skuteczności leczenia” były obliczane jako iloraz wyrażonej procentowo toksyczności EP-PDR lub ECT i toksyczności samej EP (bez żadnego związku przeciwnowotworowego) przy tych samych parametrach pola elektrycznego. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 2. Dla 158 spośród 172 warunków doświadczeń współczynniki skuteczności były większe od 1.

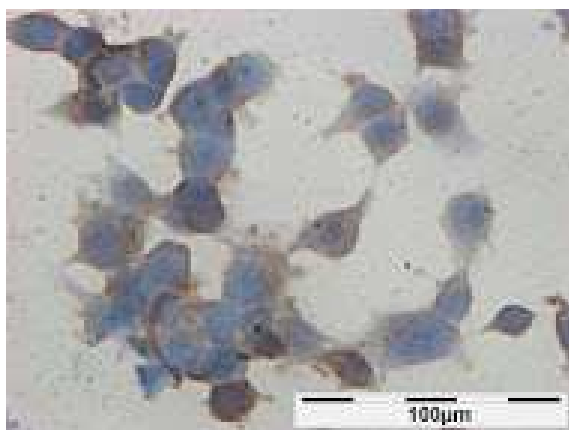
Tabela 1. Współczynniki zysku z EP dla różnych warunków doświadczeń. Kolorem zielonym oznaczono wartości >2, kolorem czerwonym – wartości <1, skrót “bd” oznacza brak danych.

Warunki doświadczeń	Barwienie błękitem trypanowym		LDHe		MTT		XTT		NR		SRB	
	MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX
IR-775, 2 μ M, ciemna EP-PDR	1,22	1,67	1,33	1,29	1,91	1,80	2,25	2,15	1,46	4,01	2,65	2,28
IR-775, 2 μ M, naświetlana EP-PDR	5,57	8,10	1,22	1,34	2,08	1,62	10,32	1,91	2,56	1,44	7,21	3,38
IR-775, 8 μ M, ciemna EP-PDR	2,87	0,86	1,58	2,59	2,27	1,46	2,49	1,34	0,98	1,64	1,91	1,27
IR-775, 8 μ M, naświetlana EP-PDR	4,17	2,18	1,81	1,59	2,16	1,75	2,10	1,13	1,24	1,17	2,60	2,25
Photofrin, 25 μ M, ciemna EP-PDR	2,35	1,21	1,44	1,15	18,24	2,14	4,59	2,89	1,50	1,45	9,09	2,18
Photofrin, 25 μ M, „czerwona” EP-PDR	16,47	1,61	1,53	1,06	7,24	1,82	3,99	5,53	1,28	1,04	2,73	2,85
Photofrin, 25 μ M, „niebieska” EP-PDR	5,05	1,17	1,06	0,99	1,19	1,41	1,10	1,13	1,06	1,03	1,36	1,49
Bleomycyna, 1 μ M	9,25	4,84	1,79	1,45	3,59	4,40	3,91	16,18	bd	bd	1,69	3,39

Tabela 2. Współczynniki efektywności dla różnych warunków doświadczeń. Kolorem zielonym oznaczono wartości >2, kolorem czerwonym – wartości <1, skrót “bd” oznacza brak danych.

Warunki doświadczeń	Natężenie pola el.	Barwienie błękitem trypanowym		LDHe		MTT		XTT		NR		SRB	
		MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX	MCF-7/WT	MCF-7/DX
IR-775, 2 μM, ciemna PDR	800 V/cm	bd	bd	0,81	0,98	8,30	3,77	1,46	2,43	1,14	0,73	1,24	0,44
IR-775, 2 μM, naśw. PDR				1,00	1,08	13,49	4,77	1,34	3,50	1,03	1,12	0,74	1,35
IR-775, 8 μM, ciemna PDR				1,04	1,27	19,52	9,96	1,96	4,30	1,98	1,47	2,14	5,20
IR-775, 8 μM, naśw. PDR				1,20	1,43	24,72	12,15	2,17	3,93	1,83	2,37	2,11	4,66
Photofrin, 25 μM, ciemna PDR				1,00	1,25	4,37	5,64	11,41	19,19	1,64	1,82	1,45	0,70
Photofrin, 25 μM, „czerwona” PDR				1,23	1,23	9,78	8,50	59,11	16,98	4,21	2,36	3,39	0,79
Photofrin, 25 μM, „niebieska” PDR				2,12	1,86	20,79	14,64	93,22	91,36	5,68	2,00	5,82	2,01
Bleomycyna, 1 μM				1,08	1,46	6,17	3,50	3,11	35,02	bd	bd	1,91	3,53
IR-775, 2 μM, ciemna PDR	1200 V/cm	1,05	1,27	1,00	1,02	3,83	1,66	4,94	0,62	1,36	1,45	1,67	1,43
IR-775, 2 μM, naśw. PDR		1,40	4,71	1,13	1,16	4,00	1,53	6,42	0,89	1,09	1,22	1,35	1,42
IR-775, 8 μM, ciemna PDR		3,57	0,98	1,40	1,50	7,93	2,34	9,41	0,82	1,58	2,20	2,96	2,03
IR-775, 8 μM, naśw. PDR		5,86	4,05	1,62	1,65	8,40	2,74	11,09	0,83	1,63	2,13	3,13	2,12
Photofrin, 25 μM, ciemna PDR		2,72	2,48	1,23	1,42	2,66	1,59	43,21	34,05	5,45	1,82	1,54	2,06
Photofrin, 25 μM, „czerwona” PDR		1,92	6,84	1,23	1,28	3,65	2,27	83,53	52,49	5,68	1,77	2,62	2,12
Photofrin, 25 μM, „niebieska” PDR		6,47	7,30	1,84	1,62	5,06	2,86	91,78	92,95	7,25	1,86	3,34	2,82
Bleomycyna, 1 μM		6,37	7,43	1,05	1,04	2,14	2,07	1,81	2,30	bd	bd	1,25	2,63

Zbadano również wpływ stosowanych metod na system antyoksydacyjny w komórkach. Na rys. 10 i rys. 11 zaprezentowano wybrane zdjęcia mikroskopowe przedstawiające wyniki reakcji immunocytochemicznej z przeciwciałem skierowanym przeciwko S-transferazie glutationowej (GST) w komórkach poddanych ECT z bleomycyną. Pozostałe zdjęcia oraz wyniki ilościowej analizy zdjęć zostały zamieszczone w zasadniczej części rozprawy. Dla wszystkich badanych substancji (bleomycyna, IR-775, Photofrin) w obydwu liniach komórkowych (MCF-7/WT i MCF-7/DX) intensywność reakcji immunocytochemicznej była większa po zastosowaniu elektroporacji w połączeniu z badanymi związkami. Wzrost ten może wynikać ze zwiększonego dostarczania molekuł do wnętrza komórek, gdyż GST bierze udział w procesie detoksykacji ksenobiotyków. Ponadto, zaobserwowano, że w wyniku poddania komórek reakcji elektro-fotodynamicznej z IR-775 przy 8 μM lub elektrochemioterapii z bleomycyną nastąpiła fragmentacja komórek. Zaobserwowano również tworzenie ciałek apoptotycznych, które są zmianami morfologicznymi typowymi dla procesu apoptozy.



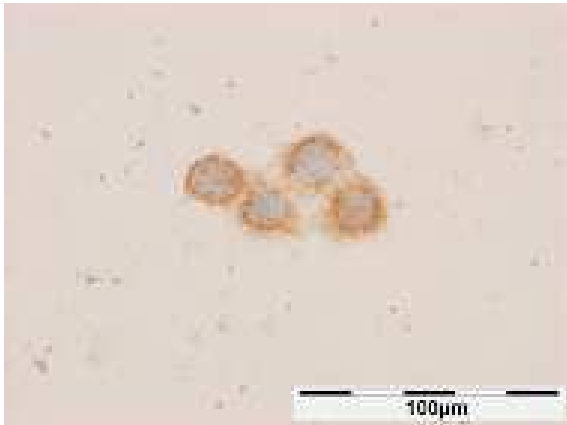
Rys. 10. Ekspresja GST w komórkach MCF-7/WT poddanych ECT z bleomycyną przy 0 V/cm.



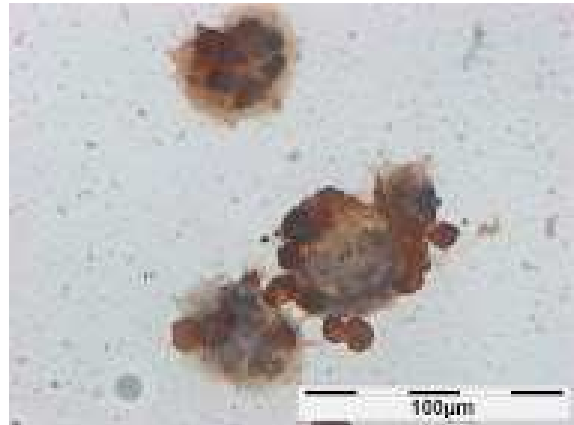
Rys. 11. Ekspresja GST w komórkach MCF-7/WT poddanych ECT z bleomycyną przy 1200 V/cm.

Oceniano także wpływ zadanych warunków terapeutycznych na oporność lekową wybranych linii komórkowych. Przykładowe wyniki immunocytochemicznej oceny ekspresji białek związanych z opornością wielolekową w komórkach poddanych EP oraz EP-PDR przedstawiono na rys. 12-13 (ekspresja MDR1) oraz rys. 14-15 (ekspresja MRP7). Pozostałe wyniki oraz posumowanie analizy ilościowej zestawiono w zasadniczej części rozprawy. W przypadku obydwu ocenianych białek obserwowano

silniejszą reakcję immunocytochemiczną w linii komórek MCF-7/DX (opornych na dokсорubicynę), niż w linii typu dzikiego (MCF-7/WT). W komórkach poddanych działaniu cyjaniny IR-775 lub bleomycyny intensywność reakcji immunocytochemicznej była większa po zastosowaniu elektroporacji. Efekt ten może być interpretowany jako odpowiedź komórkowa na podwyższone stężenie badanych związków, spowodowane ułatwieniem ich transportu poprzez zastosowanie elektroporacji. Jednakże, dla niektórych parametrów terapii ochrona ta nie była wystarczająca i zaobserwowano zmiany w morfologii komórek, sugerujące śmierć komórek na drodze apoptozy. Na podstawie wyników oceny ekspresji MDR1 i MRP7 można zatem wysunąć wnioski analogiczne jak przy analizie ekspresji GST.



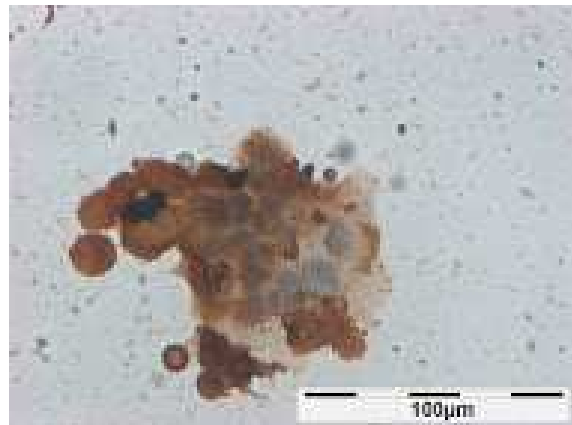
Rys. 12. Ekspresja MDR1 w komórkach MCF-7/DX poddanych elektroporacji przy 1200 V/cm.



Rys. 13. Ekspresja MDR1 w komórkach MCF-7/DX poddanych EP-PDR przy 8 μM cyjaniny IR-775, naświetlaniu w zakresie NIR oraz 1200 V/cm.



Rys. 14. Ekspresja MRP7 w komórkach MCF-7/DX poddanych elektroporacji przy 1200 V/cm.



Rys. 15. Ekspresja MRP7 w komórkach MCF-7/DX poddanych EP-PDR przy 8 μM cyjaniny IR-775, naświetlaniu w zakresie NIR oraz 1200 V/cm.

A.5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- 1) Sama elektroporacja o ustalonych parametrach (8 impulsów, 800 V/cm lub 1200 V/cm, 100 μs, 1 Hz) nie miała toksycznego wpływu na funkcjonowanie komórek.
- 2) W komórkach nie zaobserwowano istotnych zmian morfologicznych indukowanych samą elektroporacją przy ustalonych parametrach.

-
- 3) Sama reakcja fotodynamiczna oraz chemioterapia *in vitro* o ustalonych parametrach (2 μM lub 8 μM IR-775; 25 μM Photofrinu; 1 μM bleomycyny; 24 godziny inkubacji) nie miały toksycznego wpływu na funkcjonowanie komórek.
 - 4) Zaobserwowano, że elektroporacja umożliwiła zwiększenie transportu jodu propidyny, IR-775 oraz Photofrinu do komórek.
 - 5) Dzięki elektroporacji błon komórkowych wybrane związki przeciwnowotworowe (IR-775, Photofrin oraz bleomycyna) skutecznie indukowały śmierć komórek, nawet przy zastosowaniu małych stężeń oraz krótkich czasów ekspozycji.
 - 6) Zwiększenie efektu toksycznego stosowanych terapii przeciwnowotworowych, spowodowane elektroporacją, zostało wykazane szczególnie w testach opartych na pomiarze aktywności mitochondriów oraz zdolności komórek do syntezy białek.
 - 7) Połączenie chemioterapii lub terapii fotodynamicznej z elektroporacją zwiększyło także ich toksyczność ocenianą w testach opartych na pomiarze integralności błon komórkowych oraz aktywności lizosomów – jednak dla obu wielkości w mniejszym stopniu niż w przypadku pozostałych ocenianych parametrów funkcjonowania komórek.
 - 8) Połączenie reakcji fotodynamicznej lub chemioterapii *in vitro* z elektroporacją skutkowało wzrostem ekspresji GST – enzymu związanego z detoksykacją ksenobiotyków.
 - 9) Komórki o podwyższonym wewnątrzkomórkowym stężeniu badanych substancji dostarczanych metodą elektroporacji wykazywały podwyższoną ekspresję transporterów związanych z opornością lekową (MDR1 i MRP7).
 - 10) Zastosowane metody były skuteczne zarówno w komórkach wrażliwych (MCF-7/WT), jak i opornych (MCF-7/DX) na doksorubicynę.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* wykazano, że połączenie reakcji fotodynamicznej lub chemioterapii z elektroporacją zwiększyło cytotoksyczny efekt w ludzkich komórkach gruczołakoraka gruczołu sutkowego. Dzięki zastosowaniu elektroporacji tworzone były alternatywne drogi transportu substancji do komórek. Modyfikacja terapii za pomocą elektroporacji umożliwiła zastosowanie mniejszych stężeń badanych związków podawanych do komórek nowotworowych oraz krótszych czasów ekspozycji komórek na badane związki. Wspomaganie terapii przeciwnowotworowych poprzez elektroporację może zatem pozwolić na poszerzenie spektrum stosowanych leków oraz zmniejszyć skutki uboczne leczenia. Uwzględniając te efekty, elektroporacja może być

rozważana jako atrakcyjna metoda wspomagania nie tylko chemioterapii, ale również terapii fotodynamicznej. Wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* wykazały potencjał proponowanego podejścia i zachęcają do kontynuacji prac, również na modelach zwierzęcych.