

## STRESZCZENIE

Rak jelita grubego jest istotnym problemem onkologicznym w Polsce, a analiza trendów epidemiologicznych pokazuje, że zachorowalność na raka okrężnicy stale rośnie. Rocznie zostaje stwierdzonych ponad 15 000 nowych zachorowań. Jest to też jedyny nowotwór przewodu pokarmowego, w kierunku którego prowadzone są badania przesiewowe pozwalające na zmniejszenie umieralności. Indywidualizacja postępowania pozwala na zwiększenie skuteczności leczenia i zminimalizowanie działań niepożądanych. Rokowanie zależy od stopnia zaawansowania choroby, podtypu histopatologicznego, radykalności zabiegu chirurgicznego, stopnia odpowiedzi na zastosowane leczenie systemowe oraz molekularne wskaźniki predykcyjne i prognostyczne, takie jak status genów z rodziny RAS. Stosowane w obecnej praktyce klinicznej leczenie chemiczne, terapie celowane oraz radioterapia (w raku odbytnicy), pozwalają na znamienne wydłużenie czasu przeżyć wieloletnich. Wciąż jednak poszukiwane są nowe metody terapii poprawiające rokowanie pacjentów oraz charakteryzujące się jak najkorzystniejszym profilem bezpieczeństwa.

Terapia fotodynamiczna jest małoinwazyjną metodą leczenia nowotworów. Do jej przeprowadzenia wymagana jest obecność trzech składników: fotouczulacza, który lokalizując się w tkance nowotworowej uczula ją na działanie światła, źródła światła o odpowiedniej długości fali, które wzbudza skumulowany w tkance nowotworowej fotouczulacz, a także tlenu rozpuszczonego w tkance. Po wzbudzeniu, związek przenosi energię z fali świetlnej na tlen cząsteczkowy, a następnie powoduje uwalnianie jego reaktywnych form. Powstają one w miejscu gdzie zlokalizowany był fotouczulacz i poprzez bezpośredni efekt cytotoksyczny, niszczenie naczyń krwionośnych oraz wywołanie efektu zapalnego, prowadzą do śmierci komórki.

Jednym z mechanizmów śmierci komórki aktywowanym w wyniku zastosowania terapii fotodynamicznej jest autofagia. Jest to główny proces degradacji składników wewnątrzkomórkowych przez lizosomy, odpowiedzialny za utrzymanie homeostazy w komórce. Rola autofagii w kontekście procesu nowotworzenia oraz terapii przeciwnowotworowej jest dwójaka: może ona pełnić funkcję supresora transformacji nowotworowej lub być jej promotorem, umożliwiając komórkom nowotworowym wykorzystanie tego mechanizmu jako alternatywnego źródła energii w czasie stresu, niedotlenienia i braku substancji odżywczych.

Celem niniejszej pracy była analiza ekspresji markerów autofagii (białka: LC3, Bekliny 1 oraz ATG7) w odpowiedzi na zastosowanie terapii fotodynamicznej w warunkach *in vitro* na ludzkiej linii komórkowej raka jelita grubego SW620.

Po 4-godzinnej inkubacji z 3mM kwasem 5-aminolewulinowym (5-ALA), komórki były naświetlane dawką promieniowania  $60 \text{ mW/cm}^2$  i mocy  $4,5 \text{ J/cm}^2$ ; czas naświetlania – 75 sekund. Proces autofagii został oceniony przy użyciu metody immunohistochemicznej z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych dla LC3, Bekliny 1 oraz ATG7. Ocena została powtórzona w określonych punktach czasowych po przeprowadzeniu naświetlania, kolejno w godzinie 0, 4, 8 i 24.

Indukcja procesu autofagii była obserwowana bezpośrednio po naświetlaniu i utrzymywała się w kolejnych godzinach. Najsilniejszą ekspresją w godzinie 0 charakteryzowało się ATG7 (IRS=9) i na takim poziomie pozostawało do godziny 4, ulegając następnie zmniejszeniu w godzinie 8 (do IRS=6) i osiągając poziom IRS=4 w godzinie 24. Ekspresja LC3 oraz Bekliny1 bezpośrednio po naświetlaniu była miernie nasiloną, wynosząc odpowiednio: IRS=2 oraz IRS=1. Wraz z upływem czasu uległa ona znacznemu nasileniu. W godzinie 4 i 8 zaobserwowano wzmożoną ekspresję LC3 (IRS=9), która nieznacznie zmalała w godzinie 24 do poziomu IRS=6. Wzrost ekspresji Bekliny 1 następował stopniowo, osiągając w godzinie 4 poziom IRS=4, a w kolejnych godzinach (tj. 8 i 24) IRS=6.

W powyższym eksperymencie udowodniono, iż proces autofagii jest zaangażowany w śmierć komórek linii komórkowej raka jelita grubego SW620 w odpowiedzi na 5-ALA PDT.

Według dostępnego piśmiennictwa, jest to pierwsze badanie oceniające ekspresję LC3, ATG7 oraz Bekliny 1 jako odpowiedzi na zastosowanie terapii fotodynamicznej. Rola autofagii, w szczególności w powiązaniu z terapią fotodynamiczną nadal pozostaje niejasna i konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań celem określenia najkorzystniejszych parametrów PDT.