# Streszczenie

Rak jajnika jest na czwartym miejscu wśród nowotworów względem śmiertelności. Jego biologiczne zróżnicowanie stanowi istotny problem w doborze efektywnej terapii u chorych, zwłaszcza w zaawansowanym stopniu choroby. Pomimo, że duża część pacjentów z rakiem jajnika odpowiada na pierwszą linię terapii to u większości jest odnotowywany nawrót choroby. Brak zadowalających efektów terapii u chorych na raka jajnika zapoczątkował badania mające na celu określenie cech biologicznych nowotworów, a także identyfikację biomarkerów na powierzchni komórek nowotworowych, jako potencjalnych celów terapii ukierunkowanej.

Celem pracy doktorskiej było poszukiwanie/potwierdzenie związku poziomu fosforylacji białka p53 w pozycji seryna 15, seryna 20 i seryna 392 z wrażliwością  komórek ustalonych linii raka jajnika oraz komórek nowotworowych wyizolowanych z płynów wysiękowych pacjentek z rakiem jajnika na chemioterapeutyki, w układzie *ex vivo*.

Badania przeprowadzono na dwóch liniach raka jajnika OvBH-1 oraz SW626, a także na komórkach wyizolowanych z płynów wysiękowych od czterech pacjentek chorych na raka jajnika (Pp1-Pp4). Komórki nowotworowe traktowano trzema chemioterapeutykami: cisplatyną, kamptotekanem oraz paclitaxelem w dwóch dawkach 10μM i 100nM. Po 72 godzinach inkubacji z cytostatykami komórki nowotworowe zostały poddane ocenie skuteczności działania tych leków przy pomocy testu MTT. Metodą immunocytochemiczną sprawdzono występowanie białek proapoptotycznych (BAX, Noxa, M30, kaspaza 8), białek związanych z cyklem komórkowym (p53, ser15, ser20, ser 392, Ki67, topoizomeraza I), a także markerów komórek macierzystych (CD133, SOX-2, Notch-1), białka PgP przed i po działaniu cystostatyków. Komórki nowotworowe linii komórkowych oraz komórki nowotworowe wyizolowane z płynów wysiękowych od pacjentek z rakiem jajnika oceniono również pod kątem zmian morfologicznych przed i po terapii.

Wzrost poziomu białka p53 w pozycji seryna 15, 20 i 392 był obserwowany
w linii SW626, Pp1 i Pp3 dla wszystkich zastosowanych cytostatyków oraz w OvBH-1
i Pp4 dla seryny 15. Natomiast pozostałe przypadki wykazały obecność badanych białek w zależności od zastosowanego cytostatyku i dawki. Największą skuteczność działania w odniesieniu do komórek raka jajnika wykazał paclitaxel i kamptotekan. W przypadkach tych obserwowano wyraźny wzrost białek proapoptotycznych (BAX, Noxa, kaspaza 8). Natomiast cisplatyna obok efektu cytotoksycznego indukowała fenotyp oporności wielolekowej. Wykazanie obecności biomarkerów charakterystycznych dla komórek macierzystych
w komórkach raka jajnika wskazuje, że w utkaniu raka jajnika są obecne nowotworowe komórki macierzyste. Obserwowano brak różnic w występowaniu biomarkerów takich jak CD133, SOX-2, Notch-1 przed i po terapii.

 Wyniki badań wykazały, że wzrost fosforylacji białka p53 w komórkach raka jajnika w pozycji seryna 15 i 20 po zastosowaniu terapii ma istotne znaczenie w indukcji białek proapoptotycznych, co pośrednio może skutkować wzrostem wrażliwości na terapię. W oparciu o wyniki badań istnieje możliwość wyselekcjonowania chorych na raka jajnika, u których zaburzony jest proces fosforylacji białka p53 zarówno w zróżnicowanych jak i macierzystych komórkach nowotworowych, co może stanowić podstawę do podjęcia badań zmierzających do aktywacji tego procesu i wzrostu skuteczności terapii.

# Abstract

The ovarian cancer is the fourth among the cancers relative to mortality.
The biological heterogeneity is an important issue in the selection of effective treatment
of patients, particularly in advanced stage of disease. Although a large number of patients with ovarian cancer respond to first-line therapy, for the majority is recorded recurrence of disease. The lack of satisfactory treatment effects in patients with ovarian cancer initiated a study to determine the biological characteristics of cancer, as well as the identification of biomarkers on the surface of tumor cells as potential markers for target therapies.

The aim of the doctoral thesis was to evaluate the relationship between level of p53 protein phosphorylation at serine15, serine 20, serine 392 and the sensitivity of the established cell lines of ovarian cancer and also cells isolated from ascitic fluids from patients with ovarian cancer to chemotherapeutic agents *ex vivo*.

The experiments were carried out on two ovarian cancer cell lines OvBH-1 and SW626, as well as cells isolated from ascitic fluids from patients with ovarian cancer
(Pp1-Pp4). The cancer cells were treated with three chemotherapeutic agents: cisplatin, camptothecin and paclitaxel in two doses 10μM and 100nM. The effectiveness
of cytostatics on cancer cells were verified after 72 hours by MTT assay.
By immunocytochemistry method was checked presence of proapoptotic proteins (BAX, Noxa, M30, caspase 8), proteins associated with cell cycle (p53, ser15, ser20, ser392, Ki67, topoisomerase I), stem cells markers (CD133, SOX-2, Notch-1) and PgP before and after chemotherapy. The morphological changes of the cancer cell lines and cells isolated from ascitic fluids from patients with ovarian cancer were also assessed before and after therapy with drugs.

It was observed the increase of p53 protein level at serine 15, 20, 392 in SW626, Pp1 and Pp3 for all chemotherapeutic drugs as well as in OvBH-1 and Pp4 for serine 15. While remain cases showed the presence of tested protein depending on used drug and dose. The highest effectiveness on ovarian cancer cell lines demonstrated paclitaxel and camptothecin.
In this cases was observed significant increase of proapoptotic proteins (BAX, Noxa,
Caspase 8). Next to cytotoxic effect cisplatin induced the multidrug resistant phenotype. The presence of biomarkers characteristic for stem cells in ovarian cancer cells lines and ascitic fluid cells indicates that in ovarian cancer tumor exist cancer stem cells. There was no difference in the expression of biomarkers such as CD133, SOX-2, Notch-1 before and after therapy.

The results showed, that the increase of p53 phosphorylation at serine 15 and 20 in ovarian cancer cells after treatment is important in the induction of pro-apoptotic proteins, which indirectly may result in an increased susceptibility to treatment.
Based on the results it is possible to select patients with ovarian cancer, whose p53 protein phosphorylation is disturbed in both: differentiated and cancers stem cells, which may contribute to studies toward activation of p53 phosphorylation, thereby increase efficiency of therapy.