

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Daiva Dabkevičienė

**CITOTOKSINIO POVEIKIO SKATINAMA
CITOKINŲ VEGFA IR IL-1 α RAIŠKA
IN VITRO IR *IN VIVO***

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2005 – 2010 metais Vilniaus Universitete, Gamtos mokslų fakulteto
Biochemijos ir Biofizikos katedroje

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Vida Kirvelienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	6
MOKSLINIS NAUJUMAS.....	8
GINAMIEJI TEIGINIAI	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA. Fotodinaminė terapija ir kai kurie jos stimuliuojami citokinai	10
1.1 Fotodinaminės terapijos veikimo principai	12
1.2 Citokinių raiškos pokyčiai po PDT	18
1.3 VEGF šeimos baltymai ir jų receptoriai	26
1.4 Interleukino-1 šeimos baltymai	42
1.5 PDT derinimas su imunoterapija	51
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	54
2.1 Medžiagos.....	54
2.2 Ląstelių kultūros, eksperimentiniai gyvūnai.....	55
2.3 Ląstelių gyvybingumo testai.....	56
2.4 LLC1 naviko įskiepijimas ir stebėjimas	57
2.5 Fotodinaminio poveikio ir citostatikų derinimo schema	58
2.6 Fotodinaminės terapijos ir imuninės terapijos derinimo schema	59
2.7 Kaspazės 3 aktyvumo matavimas.....	61
2.8 Mėginių genų raiškos tyrimams paruošimas	62
2.9 Kiekybinė PGR.....	63
2.10 Imunofermentinis metodas <i>ELISA</i>	64
2.11 BCA metodas baltymo koncentracijai nustatyti	66
2.12 Fluorescencinė mikroskopija.....	67
2.13 Tėkmės citometrija	68
2.14 Kombinuoto poveikio vertinimas taikant sudėtinės adityvios tiesės analizę	68
2.15 Kitų eksperimentinių duomenų statistinė analizė.....	72
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	73
3.1 Ląstelių gyvybingumo pokyčiai po FP ir / arba citostatikų poveikio.....	73
3.2 Kaspazės 3 aktyvumo pokyčiai po FP ir / arba citostatikų poveikio.....	81
3.3 Citokino VEGF raiška fotosensibilizuotose ir / arba citostatikais veiktose ląstelėse <i>in vitro</i>	85
3.4 Citokino IL-1 α raiška fotosensibilizuotose ir / arba citostatikais veiktose ląstelėse <i>in vitro</i>	96
3.5 PDT stimuliuota VEGF ir IL-1 α raiška pelių LLC navikuose.....	107
3.6 Eksperimentinis PDT derinimas su imunoterapija, slopinančia VEGF ir IL-1 α	109
IŠVADOS	116
PRIEDAI	117
LITERATŪROS ŠALTINIAI	132
Publikacijų sąrašas.....	151

SANTRUMPOS

λ_{em} - išspinduliuotos šviesos bangos ilgis
 λ_{ex} - žadinimo šviesos bangos ilgis
A-431 - žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelių linija
Ac-DEVD-AFC - acetil-aspartil-glutamil-valil-aspartil-7-amino-4-trifluorometilkumarinas
ACTB – β -aktino genas (*Homo sapiens*)
Actb - β -aktino genas (*Mus musculus*)
AIF-1 - uždegimo veiksnys (*allograft inflammatory factor 1*)
ALA – 5-aminolevulino rūgštis
AISPc – aliuminio ftalocianino sulfonatas
ANOVA – dispersinės analizės metodas (*ANalysis Of VAriance*)
AP-1 – transkripcijos veiksnys (*activator protein 1*)
bFGF - bazinis fibroblastų augimo veiksnys
BPD - benzoporfirino darinys
CD – citotoksinė dozė
CTGF - jungiamojo audinio augimo veiksnys
DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindolas
DMEM - Dulbecco modifikuota Eagle terpė
Dox – doksorubicinas
FCS - fetalinis veršelio serumas (*foetal calf serum*)
FGF1 - fibroblastų augimo veiksnys 1
FP – fotodinaminis poveikis
FS – fotosensibilizatorius
GAPDH - glicerolio aldehido 3-fosfato dehidrogenazės genas (*Homo sapiens*)
G-CSF - granulocitus stimuliuojantis veiksnys (*granulocyte-colony stimulating factor*)
gp130 - glikoproteinas 130
Grb2 - pritaikymo baltymas (*Growth factor receptor-bound protein 2*)
HEPES - 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfoninė rūgštis
HGF - hepatocitų augimo veiksnys
HP - hematoporfirinas
HPPH - 2-(1-heksiloksietil)-2-devinil pirofeoforbidas-a
HUVEC - žmogaus bambagyslės endotelio ląstelės
Hprt - hipoksantino guanino fosforibozilo transferazės 1 genas (*Mus musculus*)
i.p. – (švirkštimas) į pilvo ertmę
i.v. – (švirkštimas) į veną
IFN- γ - interferonas gama
IL1A –interleukino-1 α genas (*Homo sapiens*)
Il1a - interleukino-1 α genas (*Mus musculus*)
IL-1R1 – interleukino 1 receptorių, I tipo
IL-1 α –interleukinas-1 α
KC - keratinocitų chemokinas
 K_{ow} – pasiskirstymo tarp oktanolio ir vandens koeficientas
KV - kristalini violetinis
LDL – mažo tankio lipoproteinai
LIF - leukemiją slopinantis veiksnys
LIFR α - leukemiją slopinančio veiksnio receptorių α
LLC1 - pelės Lewis plaučių karcinomos ląstelių linija
MAPK – mitogeno aktyvinama kinazė (*mitogen-activated protein kinase*)
MEK - mitogeno aktyvintos baltymų kinazės kinazė
MH arba MH-22A - pelių hepatomos epiteliškų ląstelių linija
mTHPC - mezo-tetrakis-hidroksifenilchlorinas

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio bromidas
 NF- κ B – transkripcijos veiksnys (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
 NL637 - *NorthernLights* fluorescuojanti žymė, žadinama 637 nm bangos ilgiu
 Np - neuropilinas
 NPe6 - mono-L-aspartil chlorinas e6
 OD - optinis tankis
 PBS - fosfatinis buferis su NaCl
 pCMV-IL-6 - IL-6 koduojanti plazmidė
 PDGFA - trombocitų augimo veiksnio subvienetas A
 PDT - fotodinaminė terapija
 PE - fikoeritinas
 PGR - polimerazinė grandininė reakcija
 PIGF – placentos augimo veiksnys
 PKC - baltymų kinazė C
 PLC- γ - fosfolipazė C- γ
 Raf - serino / treonino kinazė
 ROS – aktyvios deguonies formos
 SFV - santykiniai fluorescencijos vienetai
 Shb - SH2 turintis pritaikymo baltymas B (*SH2 domain-containing adapter protein B*)
 Shc - PTB ir SH2 domenų turintis pritaikymo baltymas
 siRNR - trumpos interferuojančios RNR (*small interfering RNA*)
 SN - standartinis nuokrypis
 SP - standartinė paklaida
 Tax – taxoteras
 TGF α - transformuojantis augimo veiksnys α
 TGI - navikų augimo slopinimas (*Tumor Growth Inhibition*)
 TNF- α - naviko nekrozės veiksnys alfa
 TPPS_{2a} - *mezo*-tetrakis(di-sulfonatofenil)-porfinas
 TSAd - T ląstelėms savitas pritaikymo baltymas
 tVEGFR1 - tirpus VEGF receptorių 1
 VEGF - kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A (VEGFA) sinonimas
 VEGF - VEGFA genas (*Homo sapiens*)
 VEGFA - kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (*vascular endothelial growth factor A*)
 VEGFA-120 - 120 aminorūgščių ilgio VEGFA izoforma
 VEGFA-164 - 164 aminorūgščių ilgio VEGFA izoforma
 Z_{add} - veiksmų, teoriškai derinyje veikiančių adityviai, koncentracijų suma
 Z_{mix} – eksperimentinėje kombinacijoje veikiančių veiksmų koncentracijų suma
 Z_t - kombinacijoje veikiančių veiksmų koncentracijų suma
 ŽSA - žmogaus serumo albuminas

IVADAS

Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenimis Europoje vėžiniai susirgimai sudaro penktadalį visų ligų – daugiau nei 3 milijonai naujų susirgimų per metus. Vėžys užima antrą vietą tarp visų mirties priežasčių – per metus nusineša apie 1,7 milijonus gyvybių. Visame pasaulyje daug dėmesio skiriama malignizacijos ir onkogenezės vyksmų tyrimams, ieškoma vis veiksmingesnių ir gydymo priemonių ir metodų kovai su šia sunkia ir pragaištinga liga, tačiau visos su vėžiu susijusios problemos dar nėra galutinai suprastos ir išspręstos.

Pagrindiniai vėžio gydymo būdai yra chirurgija, spindulinė terapija ir chemoterapija. Pastarąjį dešimtmetį sparčiai vystosi naujas gydymo būdas – fotodinaminė terapija (PDT). PDT derinimas su kitais vėžio gydymo būdais pradėtas tirti vos pradėjus ryškėti naujojo PDT metodo perspektyvoms. Veiksmingai suderinus gydymo būdus, galima mažinti naudojamų priemonių dozes, kad susilpnėtų nepageidaujami šalutiniai reiškiniai, pvz., PDT sukeliamas odos jautrumas šviesai. Gydymo rezultatai ypatingai pagerėja, kai derinami priešvėžiniai veiksniai, kurių veikimo mechanizmai yra skirtingi. Šiuo požiūriu chemoterapinio vaisto derinimas su PDT yra perspektyvus. Kad tokia kombinuota terapija būtų pradėta naudoti gydymui, reikalingi nuodugnūs tyrimai *in vitro* ir *in vivo*.

Šiame darbe ląstelių membranose kaupiamo fotosensibilizatoriaus mezo-tetrakis-hidroksifenilchlorino (mTHPC, temoporfinas) ir šviesos fotodinaminį poveikį derinome su įprastu priešvėžiniu vaistu doksorubicinu iš antraciklinų grupės ir taksoteru iš taksanų grupės. Abu chemoterapiniai vaistai stabdo ląstelių dalijimąsi. Skirtingi PDT ir citostatikų taikiniai turėtų sudaryti prielaidas didesnam bendram veiksmingumui. Tačiau pastebėta, kad atsako į PDT metu padidėja naviko augimui palankių prouždegiminių ir proangiogeninių citokinų raiška, kas siūlytų PDT derinti su imunine terapija, nukreipta prieš šiuos veiksnius.

Ankstesniuose tyrimuose nustatėme, kad kombinuotas citostatikų doksorubicino arba taksotero ir PDT temoporfinu poveikis yra labiau toksiškas žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelėms *in vitro* negu kiekvienas iš minėtųjų poveikių atskirai, o kombinacijos pobūdis yra adityvus, kaip nustatėme savitais statistiniais metodais. DNR makrogardelių metodu buvo ištirti 2 135 genų raiškos pokyčiai citostatikais bei mTHPC ir šviesa, kartu ar pavieniui, veiktose

ląstelėse, praėjus 3,5 val. po poveikio. Gauti rezultatai buvo patikrinti kiekybinės PGR metodu. Visais atvejais, kai ląstelės buvo veiktos mTHPC ir šviesa (vien tik fotodinaminis poveikis ar kartu su citostatikais), nustatyta padidėjusi kraujagyslių endotelio augimo veiksnio VEGF-A ir uždegimą skatinančio citokino interleukino 1 α (IL-1 α) iRNR raiška.

Šio **darbo tikslas** buvo nuodugnai ištirti citokinų VEGFA ir IL-1 α raišką po fotodinaminio poveikio ir jo derinio su citostatikais vėžinėse ląstelėse *in vitro* bei įvertinti PDT derinimo su imunine terapija, nukreipta prieš šiuos citokinus, perspektyvumą *in vivo*.

Tiksliui pasiekti buvo išskelti tokie **uždaviniai**:

- Ištirti mTHPC sukkelto fotodinaminio poveikio ir jo derinio su citostatinais vaistais doksorubicinu bei taksoteru įtaką žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431, pelės hepatomos MH-22A bei pelės plaučių karcinomos LLC1 ląstelių žūčiai *in vitro* ir statistinės analizės metodais įvertinti kombinuoto poveikio pobūdį;
- Ištirti citokinų VEGFA ir IL-1 α iRNR ir baltymo raiškos pokyčius A-431, MH-22A ir LLC1 ląstelėse po fotodinaminio poveikio ir jo derinio su citostatikais *in vitro*;
- Nustatyti ir įvertinti IL-1 α poveikį VEGFA raiškai A-431 ląstelėse *in vitro*;
- Ištirti ir įvertinti PDT indukuojamus citokinų VEGFA ir IL-1 α raiškos pokyčius pelės LLC1 navikuose;
- Sekti ir įvertinti pelės LLC1 navikų tūrio dinamiką po PDT bei anti-VEGFA ar anti-IL-1 α imuninės terapijos ir šių poveikių derinių.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Šio darbo metu kombinuoto poveikio pobūdžio vertinimui pritaikėme naują sudėtinės adityvios tiesės statistinį metodą. Šio metodo pagalba parodėme, kad vaistų derinio dozė gali lemti poveikio pobūdį.

Kad fotodinaminis poveikis skatina VEGF raišką vėžinėse ląstelėse, buvo parodyta kitose laboratorijose (Bhuvanewari et al., 2007a). Kad fotodinaminis poveikis skatina IL-1 α raišką vėžinėse ląstelėse, pirmą kartą buvo parodyta mūsų laboratorijoje. Šiame darbe šių citokinių raišką ištyrėme trijose skirtingose žmogaus ir pelės ląstelių linijose. Įvertinome sąsają tarp citokinių IL-1 α ir VEGF raiškos. Tyrimų rezultatus *in vitro* patvirtinome tyrimais *in vivo*. Parodėme, kad PDT skatina citokinių IL-1 α ir VEGF raišką pelių navikuose.

Pritaikę imuninę terapiją antikūnu prieš pelės VEGF-120 ir VEGF-164 izoformas veiksmingai slopinome navikų augimą. Stipriausiai navikų augimą slopino imuninė terapija su tirpiu VEGF receptoriumi 1, kuris neutralizuoja visas VEGF izoformas ir PlGF. Šie rezultatai rodo, kad navikų augimui svarbi ne vieno, bet keleto kraujagyslių endotelio augimo veiksnių raiška.

Citokino IL-1 α svarba navikų augimui pirmą kartą parodyta šiame darbe: imuninė terapija antikūnu prieš pelės IL-1 α veiksmingai slopino navikų augimą. Nors šis poveikis buvo silpnesnis nei imuninės terapijos prieš angiogenezę, svarbu atkreipti dėmesį, jog IL-1 α gali būti reikšmingas navikų terapijos prognozei.

Šio darbo metu gauti rezultatai svarbūs priešvėžinio gydymo metodų tobulinimui ir naujų gydymo strategijų kūrimui. Veiksmingas prouždegiminio citokino IL-1 α ir proangiogeninio citokino VEGFA raiškos slopinimas galėtų pagerinti PDT citotoksinį poveikį navikams.

GINAMIEJI TEIGINIAI

- mTHPC sukkelto fotodinaminio poveikio ir doksorubicino derinys, kai doksorubicino tirpalas pilamas iškart po švitinimo, A-431 ląstelių gyvybingumą *in vitro* mažina adityviai; mTHPC sukkelto fotodinaminio poveikio ir taksotero derinio, kai ląstelės su takosoteru inkubuojamos prieš švitinimą, poveikio pobūdis A-431 ląstelių gyvybingumui *in vitro* priklauso nuo poveikio dozės;
- mTHPC sukeltas fotodinaminis poveikis, vienas arba kartu su doksorubicinu ar taksoteru, skatina citokinų VEGF ir IL-1 α raišką A-431 ir LLC1 ląstelėse *in vitro*;
- Citokinas IL-1 α skatina VEGF sekreciją A-431 ląstelėse *in vitro*;
- mTHPC sukeltas fotodinaminis poveikis skatina citokinų VEGF ir IL-1 α raišką LLC1 navikuose;
- Citokinų VEGF ir IL-1 α raiškos slopinimas lėtina LLC1 navikų augimą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Fotodinaminė terapija ir kai kurie jos stimuliuojami citokinai

Naviko audinį sudaro vėžinės ir kitos su naviku susijusios ląstelės: fibroblastai, endotelio ląstelės ir uždegiminės ląstelės. Visos šios ląstelės gamina tarpląstelinį naviko užpildą (ECM), kuris svarbus sklisti signalams, valdantiems ląstelių judėjimą, morfogenezę, diferenciaciją ir proliferaciją (apžv. (Pazos and Nader, 2007)). ECM ir su naviku susijusios ląstelės sudaro naviko stromą.

Pastebėta, kad negydyto naviko stromos ląstelės ir jų gaminami citokinai labiau linkę skatinti naviko augimą ir angiogenezę nei organizmo atsaką į naviką (Kaler et al., 2009; Liao et al., 2009; Neiva et al., 2009), apžv. (Wu and Zhou, 2009). Nuosavos naviko kraujagyslės yra reikšmingos jo augimui. Be jų navikas tegali augti iki 2 mm. Angiogenezę valdo augimo veiksniai. Vienas iš svarbiausių yra kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (VEGF).

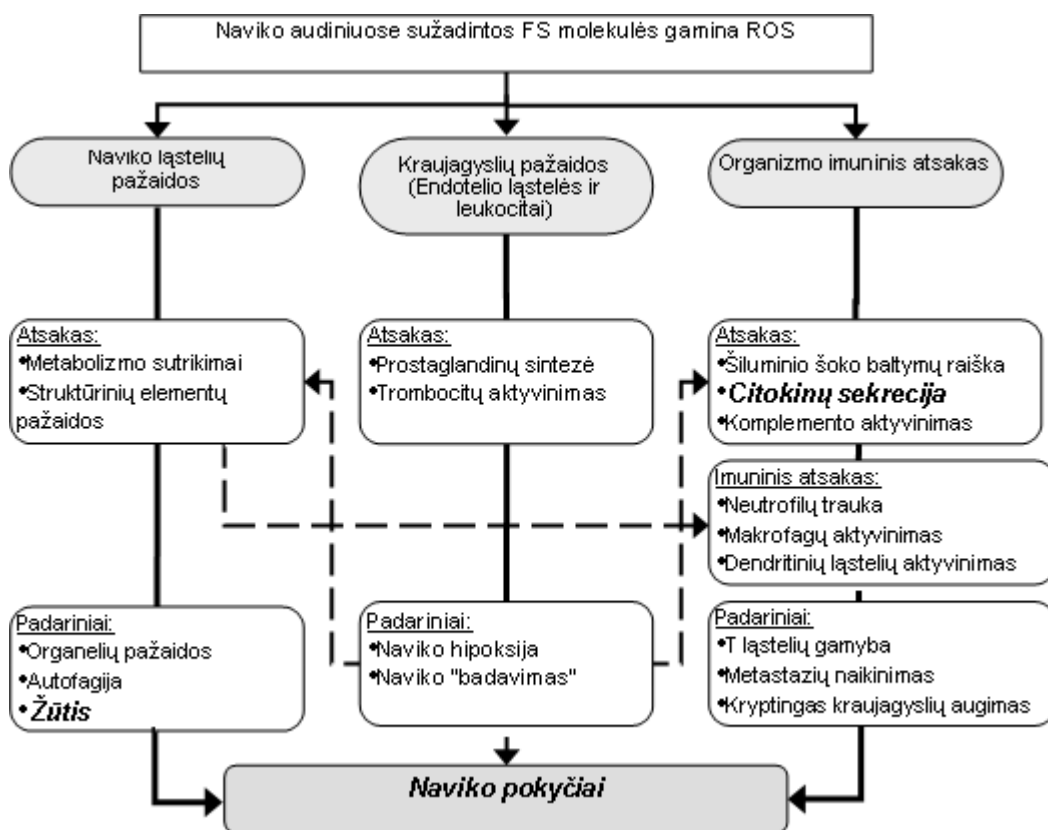
Vėžinės ląstelės gali skatinti kitas stromos ląsteles gaminti citokinus (Ara et al., 2009; Neiva et al., 2009) ir taip sukelti normalių ląstelių proliferaciją, pvz., IL-6/JAK/STAT3 keliu (Lieblein et al., 2008).

Fotodinaminė navikų terapija (PDT) yra veiksmingas ir patrauklus būdas vėžiui gydyti. Metodo esmė – tam tikrais cheminiais junginiais, fotosensibilizatoriais (FS), sukiamas ląstelių jautrumas matomai šviesai, kuri be FS ląstelių ar audinių neveikia. PDT gali betarpiškai sukelti naviko ląstelių žūtį ir naviko kraujagyslių pažaidas, bei aktyvinti organizmo imuninį atsaką ((Abels, 2004; Golab et al., 2000; van Duijnhoven et al., 2003).

Schema, pateikta 1.1 pav., apibendrina ląstelių atsakus į PDT sukeltas pažaidas ir rodo, kad daugelis jų baigiasi naviko žūtimi. Ląstelių žūties kelias po PDT priklauso nuo poveikio stiprumo, energetinių išteklių, savitos FS lokalizacijos, ląstelių genotipo (Davids et al., 2008; Dellinger, 1996; Kiesslich et al., 2005; Wyld et al., 2001). Naudojant tyrimams įvairias ląstelių linijas ir įvairius FS parodyta, kad apoptozė yra greitas ir vyraujantis ląstelių žūties kelias po PDT (Oleinick et al., 2002). Galbūt dėl to *in vitro* daugiausia tyrinėjami apoptozės vyksmai, o nekrozės tyrimams skiriama mažiau dėmesio. Situacija *in vivo* yra sudėtingesnė, ir navikas žūsta tiek nekrozės, tiek apoptozės būdu.

Naujausi tyrimai *in vitro* rodo, kad PDT sukeltos pažaidos gali lemti ne tik „klasikinę“ ląstelių žūtį, bet ir tam tikru požiūriu silpnesnį atsaką - autofagiją (Kessel and Reiners, 2007; Sasnauskiene et al., 2009), kuri nebūtinai sukels ląstelių žūtį, jeigu ląstelės įveiks sukeltas pažaidas. Mat gilesniuose naviko audinių sluoksniuose sužadinama mažiau FS molekulių, nes iki jų prasisikverbia mažiau šviesos. Be to, švitinimo metu veiklaus FS kiekis mažėja dėl fotooksidacijos, sutrikusios kraujotakos, naviko edemos ir kt. Dėl šių priežasčių PDT veiksmingumas sumažėja, ir naviko ląstelės turi galimybę ištaisyti PDT sukeltas pažaidas – navikas vėl gali atsinaujinti, atkurti pažeistą savo audinių kraujotaką, jeigu nežus nuo išemijos arba imuninio atsako (apžv. (Nowis et al., 2005)).

Šiame darbe nagrinėjome vėžinių ląstelių ir paties naviko atsaką į fotodinaminį poveikį šiais aspektais: betarpišką naviko ląstelių žūtį ir citokinų raiškos pokyčius. Didžioji darbo dalis buvo skirta PDT sukeltiems citokinų raiškos tyrimams, todėl kiek atidžiau apžvelgsime PDT veikimo principus ir jos įtaką citokinų raiškos pokyčiams.



1.1 pav. PDT sukelti vyksmai vėžiniame audinyje (pagal (Robertson et al., 2009)).
Kursyvas – šiame darbe nagrinėti aspektai

1.1 Fotodinaminės terapijos veikimo principai

PDT yra gydymo būdas, bene mažiausiai pažeidžiantis sveikus audinius. Ji patvirtinta gydyti vėžį ir kraujagyslių ligas. Šiam gydymui būtini trys elementai: 1) vietiniu arba sisteminiu būdu į audinį ar organizmą įvestas FS, 2) šviesa ir 3) molekulinis deguonis, iš kurio fotoreakcijų metu susidaro aktyvios deguonies formos (ROS). Manoma, kad fotodinaminiam poveikiui svarbiausia ROS yra vienlypis deguonis ($^1\text{O}_2$) (Price et al., 2009).

PDT netaikoma didelių navikų gydymui, tačiau mažus ir neišplitusius navikus ji sunaikina veiksmingai. Su moderniomis optinėmis sistemomis galima švitinti net sunkiai pasiekiamas kūno dalis (apžv. (Nowis et al., 2005)).

Nors fotosensibilizacijos reiškinio tyrimai pradėti prieš šimtmetį, o pirmą kartą gydymui jis panaudotas 1968 metais, šis metodas vis dar plačiai tiriamas ir vystomas.

Tarp perspektyviausių reikėtų paminėti šiuos sparčiai tobulinamus PDT metodus: 1) vadinamoji metronominė PDT, kurios metu fotodinaminis poveikis taikomas kelis kartus, naudojant labai mažas FS ir šviesos dozes; 2) dvifotonė PDT, kurios metu FS sinchroniškai žadinamas dviem mažesnės energijos fotonais; 3) PDT su nanodalelėmis, kai geresniam FS patekimui į audinius yra naudojamos nanodalelės. PDT atrankumą galima padidinti, naudojant FS su prijungtu gesikliu. Toks FS bus aktyvus tik tada, kai saviti fermentai suskaidys jungtį tarp FS ir gesiklio, gesiklis nutols nuo FS ir neslopins jo aktyvumo (Wilson and Patterson, 2008).

PDT veiksmingumą galima didinti derinant ją su kitais klasikiniiais vėžio gydymo būdais. PDT derinimas su chirurgija (Herrera-Ornelas et al., 1986), radioterapija (Kostron et al., 1988) ar chemoterapija (Gonzalez et al., 1986) imtas tirti vos pradėjus ryškėti naujojo PDT metodo privalumams bei trūkumams. Veiksmingai suderinus gydymo būdus, galima mažinti naudojamų priemonių dozes, ir sumažėtų nepageidaujami šalutiniai reiškiniai, pvz., PDT sukeliamas odos jautrumas šviesai. Be to, siūloma PDT derinti su imunine terapija, nes imuninis atsakas svarbus naviko augimui ir plitimui (žr. 1.5 sk.).

1.1.1 Fotosensibilizatoriai

PDT yra pagrįsta FS savybe atrankiai kauptis navikiniame audinyje. Atrankumą lemia didesnis navikinių ląstelių proliferacijos greitis, LDL receptorių, prie kurių jungiasi hidrofobiniai FS, gausi raiška (Allison et al., 1994), naviko audinių skysčio

žemesnis pH, padidėjęs naviko kraujagyslių pralaidumas, pakitusi naviko stromos struktūra, padidėjusi kolageno, prie kurio jungiasi porfirininiai FS, gamyba (apžv. (Dougherty et al., 1998)). Yra parodyta, kad navikuose susikaupę makrofagai reikšmingai didina FS fotofrino kaupimąsi navikiniame audinyje (Korbelik et al., 1996; Korbelik et al., 1991). Atrankumą galima dar labiau padidinti prijungiant FS prie molekulių pernašos sistemų, tokių kaip augimo veiksniai ar monokloniniai antikūnai, giminingi gydomiems audiniams (Konan et al., 2002).

Didžiąją dalį FS, taikomų ikiklinikiniams tyrimams ir gydymui, sudaro porfirininės kilmės FS (apžv. (O'Connor et al., 2009)). Idealiai FS keliama nemažai reikalavimų (1.1 lent).

1.1 lentelė. Idealaus fotosensibilizatoriaus savybės (O'Connor et al., 2009)

Grynumas	Vienalytė cheminė sudėtis, žinoma struktūra, stabilumas
Toksiškumas	Netoksiškas tamsoje, nesudaro toksiškų metabolitų ir nesukelia šalutinio poveikio
Metabolizmas ir farmakokinetika	Optimalios patekimo į audinius, pasiskirstymo, metabolizmo ir šalinimo savybės (<i>angl. ADME</i>)
Žadinimas	Gerai sugeria raudoną šviesą (700-850 nm) audinių skaidrumo lange
Kvantinis našumas	Didelis vienlypio deguonies generavimo kvantinis našumas
Selektyvumas	Geresnis kaupimasis navikiniuose audiniuose. Subląstelinė lokalizacija turėtų lemti ląstelių apoptozę, bet ne nekrozę
Mutageniškumas ir karcinogeniškumas	Neturėtų sukelti vėžio ar mutacijų
Kaina ir naudojimo galimybės	Nebrangus ir komerciškai prieinamas

Paprastai FS skirstomi į porfirinus ir neporfirinus. Porfirinų kilmės FS toliau skirstomi į pirmosios, antrosios ir trečiosios kartos FS. Pirmosios kartos FS – tai nevienalytės sudėties hematoporfirino dariniai (HpD), greitai blykstantys nuo šviesos. Tačiau, tai pirmieji junginiai, pritaikyti gydymui – pirmasis FS, leistas naudoti gydymui, buvo fotofrinas. Antrosios kartos FS yra vienalytės sudėties, žinomos struktūros junginiai, sugeriantys ilgesnių bangų raudoną šviesą, mažiau toksiški, didesniu kvantiniu našumu generuojantys vienlypį deguonį. Trečiosios kartos FS – tai antros kartos fotosensibilizatorių dariniai, gaunami sujungiant juos su monokloniniais antikūnais ar liposomomis ir tokiu būdu pagerinant jų atrankų kaupimąsi. Perspektyviausi FS parodyti 1.2 pav., o jų fotofizikinės, fotocheminės, farmakologinės ir fotobiologinės savybės apibendrintos 1.2 ir 1.3 lent.

Šiame darbe naudojome antrosios kartos FS mezo-tetrakis-hidroksifenilchloriną (mTHPC), arba temoporfiną. Jo vaistinis preparatas vadinamas foskanu. Tai

homogeniškas chlorino darinys, gerai sugeriantis šviesą raudonojoje spektro srityje ($\lambda_{\max} = 652 \text{ nm}$; $\varepsilon = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bonnett, 1995)). Šis junginys yra hidrofobinis ($K_{\text{ow}} = 40$ (Bourre et al., 2003)). mTHPC gyvavimo pusperiodis žmogaus kraujo plazmoje yra apie 45-65 val. (Ronn et al., 1996), o pelės ir žiurkės - apie 7–21 val. (Triesscheijn et al., 2007). mTHPC yra labai fototoksiškas FS, todėl naudojamos šio vaisto dozės (apie 0,1 mg/kg) ir švitinimo dozės (apie 10 J/cm^2) yra labai mažos, palyginus su kitais FS (Mitra and Foster, 2005). Europos Sąjungoje leista jį naudoti galvos ir kaklo navikams gydyti.

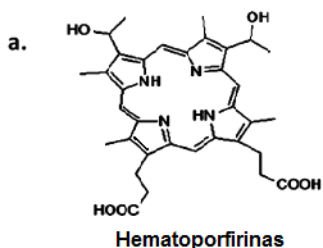
1.1.2 Šviesa ir aktyvios deguonies formos

Fotodinaminiam gydymui naudojama 600-900 nm bangos ilgio šviesa. PDT veiksmingumą lemia šviesos prasiskverbimo į audinį gylis, kuris priklauso nuo audinio savybių ir storio. Paprastai 630-800 nm bangos ilgio šviesa prasiskverbia nuo 3 iki 8 mm.

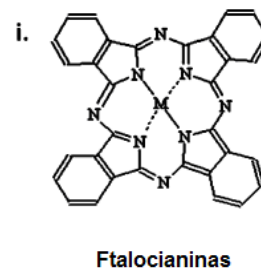
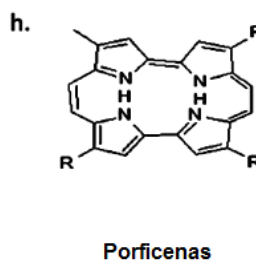
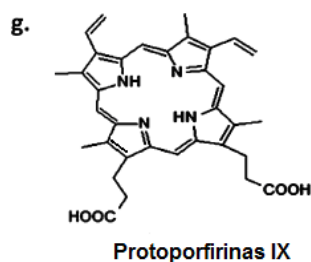
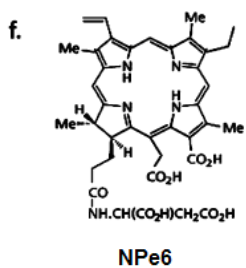
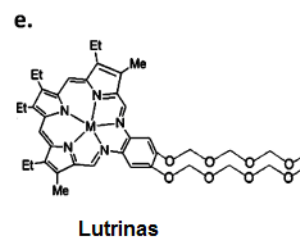
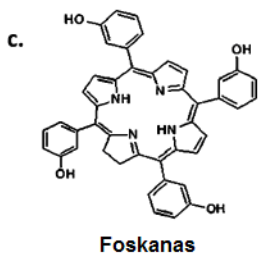
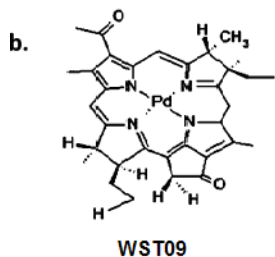
Sužadinus FS tinkamo bangos ilgio šviesa, FS molekulės iš pagrindinės vienlypės būsenos S_0 peršoka į sužadintą vienlypę būseną S_1 . Jos gyvavimo laikas per trumpas (1-100 ns), kad FS molekulė galėtų perduoti energiją gretimoms molekulėms. Tačiau, iš sužadintos vienlypės būsenos FS molekulės gali pereiti į palyginus ilgai gyvuojančią (iki kelių milisekundžių) trilypę būseną T_1 .

Trilypės būsenos FS molekulės gali dalyvauti dviejų tipų reakcijose. I tipo reakcijų metu FS molekulės betarpiškai sąveikauja su substratais, ląstelės membranomis ar molekulėmis, ir pernešdamos protonus ar elektronus formuoja joninius radikalus. Šie radikalai toliau reaguoja su deguonimi ir sudaro aktyvias deguonies formas. II tipo reakcijų metu FS tiesiogiai perneša energiją molekuliniam deguoniui (pagrindinė šios molekulės būseną yra trilypė) ir susidaro sužadintos būsenos vienlypis deguonis. Tuo pačiu metu gali vykti abiejų tipų reakcijos, ir dominuojantį tipą lems FS molekulinės savybės, substrato ir deguonies koncentracijos. Gyvoje ląstelėje $^1\text{O}_2$ gyvavimo pusperiodis yra $\sim 3 \mu\text{s}$ (Hatz et al., 2007), o sklidimo koeficientas yra $2-4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ($\sim 100 \text{ nm}$) (Hatz et al., 2008).

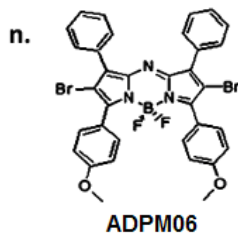
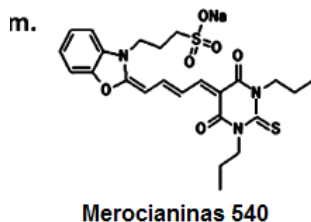
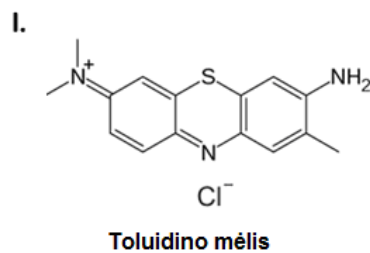
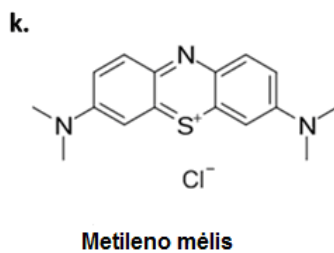
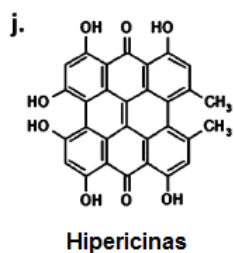
Pirmos kartos porfirinų kilmės fotosensibilizatoriai



Antros kartos porfirinų kilmės fotosensibilizatoriai



Neporfirinų kilmės fotosensibilizatoriai



1.2 pav. Vėžiui gydyti naudojamų fotosensibilizatorių cheminės struktūros (pagal - (O'Connor et al., 2009))

1.2 lentelė. Porfirininės prigimties fotosensibilizatorių savybės (O'Connor et al., 2009)

Fotosensibilizatorius	Fotofrinas	WST09	Foskanas	SnET2	Lutrinas	NPe6	Levulanas	Metviksas
Cheminio junginio pavadinimas	Dihematoporfirino eteris	Paladžio bakterio-feoforbidas	Mezo-tetra-hidroksifenil-chlorinas	Alavo etil-etiopurpurinas	Liutecio moteksafinas	Mono-L-aspartil-chlorinas 6	5-aminolevulino rūgštis	5-aminolevulino rūgšties metilo esteris
Sugerties bangos ilgis (nm)	630	763	652	664	732	664	635	635
Lokalizacija	Goldžio kompleksas, plazminė membrana	Kraujagyslės	Endoplazminis tinklas, mitochondrijos	Mitochondrijos, lizosomos	Lizosomos	Lizosoma, endosoma	Mitochondrija, citozolis, citozolio membranos	Mitochondrija, citozolis, citozolio membranos
Veikimo machanizmas	Kraujagyslių pažaidos, naviko ląstelių nekrozė	Kraujagyslių pažaidos	Kraujagyslių pažaidos, betarpiškas citotoksinis poveikis navikui	Betarpiškas citotoksinis poveikis navikui	Kraujagyslių pažaidos, betarpiškas citotoksinis poveikis navikui	Kraujagyslių sąstovis, betarpiškas citotoksinis poveikis navikui	Betarpiškas citotoksinis poveikis navikui	Betarpiškas citotoksinis poveikis navikui
Laiko tarpas tarp FS suleidimo ir švitinimo	24-48 val	15 min	96 val	24 val	3 val	2-4 val	4-6 val	3 val
Klinikinis / ikiklinikinis panaudojimas	<u>Patvirtinta:</u> stemplės, plaučių, bronchų, skrandžio vėžys, šlapimo pūslės ir gimdos kaklelio displazija ir vėžys	<u>Klinikiniai tyrimai:</u> prostatos vėžys	<u>Patvirtinta:</u> galvos ir kaklo vėžys	<u>Klinikiniai tyrimai:</u> metastazavęs krūties vėžys, Kapoši sarkoma, bazoląstelinė odos karcinoma	<u>Klinikiniai tyrimai:</u> recidyvinis prostatos vėžys, gimdos kaklelio vėžys <u>Ikiklinikiniai tyrimai:</u> recidyvinis krūties vėžys	<u>Patvirtinta:</u> ankstyvos stadijos plaučių vėžys <u>Klinikiniai tyrimai:</u> hepatoceliulinis vėžys, metastazės kepenyse	<u>Patvirtinta:</u> aktininė keratozė	<u>Patvirtinta:</u> aktininė keratozė, bazoląstelinė odos karcinoma
Vietinis šalutinis poveikis	Silpna-vidutinė eritema	—	Patinimas, kraujavimas, opėjimas,	—	—	—	Dilgčiojimas, deginimas, perštėjimas	Deginimas, paraudimas
Sisteminis šalutinis poveikis	Fotojautrumas, silpna konstipacija	—	Fotojautrumas	Fotojautrumas	Silpnas fotojautrumas	—	—	—
Ar patvirtintas leidimas gydyti	Taip	Ne	Taip	Ne	Ne	Taip	Taip	Taip

1.3 lentelė. Nporfirininės prigimties fotosensibilizatorių savybės (O'Connor et al., 2009)

Fotosensibilizatorius	Hipericinas	Chalkogeninių pirilų kilmės dažikliai	Metileno mėlis	Toluidino mėlis	Nilo mėlis	Cianinai	ADPM06
Cheminių junginių klasė	Chinonas	Chalkogeniniai pirilai	Fenotiazinas	Fenotiazinas	Fenotiazinas	Cianinai	Tetra-aril-azadipirometenai
Sugertis (nm)	595	592-746	666	626, 632	650-660	535-574	680
Lokalizacija	GK ir ET membranos	Lizosomos	Lizosomos	GK, ET	Lizosomos	Mitochondrijos, plazminė membrana	ER, mitochondrija
Veikimo machanizmas	Citotoksinis poveikis navikui ir kraujagyslių pažeidimas	Citotoksinis poveikis navikui	Citotoksinis poveikis navikui	Citotoksinis poveikis navikui	Citotoksinis poveikis navikui	Citotoksinis poveikis navikui	Kraujagyslių pažeidimas
Laiko tarpas tarp FS suleidimo ir švitinimo	0,5-6 val	24 val.	1-4 val	1 val	30 min	1 val	< 5 min
Klinikinis / ikiklinikinis panaudojimas	<u>Ikiklinikiniai tyrimai:</u> šlapimo pūslės, nosies ir ryklės vėžys	<u>Ikiklinikiniai tyrimai:</u> prostatos, krūties, storžarnos vėžys	<u>Ikiklinikiniai tyrimai:</u> šlapimo pūslės, storžarnos vėžys, Kapoši sarkoma	<u>Ikiklinikiniai tyrimai:</u> Kapoši sarkoma, T limfocitų leukemija	<u>Ikiklinikiniai tyrimai:</u> Šlapimo pūslės vėžys, pelės pienliaukės karcinoma	<u>Ikiklinikiniai tyrimai:</u> leukemija, limfoma	<u>Ikiklinikiniai tyrimai:</u> krūties vėžys, pelės plaučių vėžys
Vietinis šalutinis poveikis	Aplinkinių sveikų audinių nežymios pažeidimas	—	—	—	—	—	—
Sisteminis šalutinis poveikis	—	Toksiškumas tamsoje	—	Nežymus šalutinis poveikis	Nežymus šalutinis poveikis	Nežymus šalutinis poveikis	—
Ar patvirtintas leidimas gydyti	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne

Žmogaus ląstelės skersmuo yra 10-100 μm , tad $^1\text{O}_2$ gali sukelti pažeidimą tik tose ląstelės vietose, šalia kurių jis gaminamas (FS kaupimo vietose).

Subląstelinė FS lokalizacija lemia, kurios organelės bus pažeistos. Retai kada FS būna sulaikomi tik vienoje organelėje. Mūsų tyrimuose naudotas FS mTHPC kaupiasi membranose (Boyle and Dolphin, 1996), daugiausia endoplazminio tinklo, Goldžio komplekso (Teiten et al., 2003) bei mitochondrijų membranose (Kirveliėne et al., 2003). Parodyta, kad mTHPC-PDT, priklausomai nuo poveikio stiprumo gali sukelti tiek apoptozę (Bourre et al., 2002; Kirveliėne et al., 2003; Lilge et al., 2000), tiek nekrozę (Gharehbaghi et al., 2000).

1.2 Citokinų raiškos pokyčiai po PDT

Kaip jau minėta, tiesioginis PDT poveikis navikui yra vietinės reikšmės dėl savito FS kaupimosi naviko audinyje, tačiau šis gydymo būdas pasižymi ir sisteminiu poveikiu, susijusiu su organizmo atsaku į gydymą. Imuninį, su leukocitais susijusį organizmo atsaką po PDT aktyvina žuvusių ląstelių liekanos, pažeistų ląstelių gaminami uždegimo tarpininkai (citokinai, komplemento sistemos komponentai, ūmios fazės baltymai) (apžv. (van Duijnhoven et al., 2003)), (Cecic and Korbelik, 2002; Coutier et al., 1999).

Citokinus – valdymo peptidus – gamina visų tipų ląstelės, turinčios branduolį. Citokinai valdo kraujo ir kitų ląstelių diferenciacijos ir proliferacijos vyksmus bei limfocitų aktyvumą imuninio atsako metu.

Žinoma, kad PDT moduliuoja citokinų biosintezę tiek vėžinėse, tiek su jomis susijusiose ląstelėse naviko audinyje (1.4 lent.). Įvairūs veiksniai (VEGFA, bFGF, TNF- α), interleukinai (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10) lemia PDT veiksmingumą (Bhuvanewari et al., 2008; Gollnick et al., 1997; Henderson et al., 2004; Yom et al., 2003). Citokinai ir uždegiminis atsakas į PDT sukeltą oksidacinį stresą gali sumažinti gydymo veiksmingumą.

Kita vertus, hipoksijos išstiktos ląstelės paleidžia kaskadą signalų, skatinančių angiogenezę. Todėl angiogenezės slopikliai galėtų pagerinti PDT gydomąjį poveikį navikams (1.5 sk.).

Toliau apžvelgsime PDT poveikį šiame darbe tirtų citokinų VEGFA, IL-1 α bei kitų citokinų raiškai įvairiose ląstelių linijose ir šių baltymų reikšmę naviko atsakui į fotocitotoksinį poveikį *in vitro* ir *in vivo*.

1.2.1 VEGFA raiškos pokyčiai po PDT

Kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (VEGFA) skatina endotelio ląsteles proliferuoti, diferencijuotis, formuoti vamzdelius ir yra vienas svarbiausių angiogenezę valdančių citokinų (1.3 sk.). Angiogenezę skatinančius signalus VEGFA aktyvina per savitus receptorius - tirozino kinazes VEGFR1 ir VEGFR2 (Kowanetz and Ferrara, 2006). Parodyta, kad atsako į PDT poveikį metu padidėja VEGFA raiška (Bhuvanewari et al., 2007a; Ferrario and Gomer, 2006; Yee et al., 2005; Jiang et al., 2008). Pavyzdžiui, fotofrinu sensibilizuotose pelės pienliaukės karcinomos navikuose dėl PDT sukeltos ląstelių hipoksijos padidėja hipoksijos indukuojamo veiksnio- α (HIF-1 α) ir vieno iš jo valdomų genų produkto - baltymo VEGFA - raiška (Ferrario et al., 2000). Hipericinu sensibilizuoti žmogaus nosiaryklės navikai CNE2 taip pat gamina angiogenezę skatinančius veiksnius: HIF-1 α , VEGFA, ciklooksigenazę-2 (COX-2) ir bazinį fibroblastų augimo veiksnių bFGF (Zhou et al., 2005). Žinoma, kad COX-2 skatina angiogenezę daugiausia per VEGFA baltymą. Pavyzdžiui, žmogaus prostatos vėžio ląstelėse prostaglandinas E2 (PGE-2), vienas iš COX-2 produktų, VEGFA biosintezę skatina, sąveikaudamas su E prostanoidų 2 ir 4 receptoriais (Jain et al., 2008). Slopinant 90 kDa šiluminio streso baltymo (Hsp-90) šaperono funkcijas, sumažėja antiapoptozinių ir proangiogeninių baltymų (survivino, baltymų kinazės Akt, HIF-1 α , tarpląstelinio užpildo metaloproteinazės MMP-2 ir VEGFA) raiška ir sustiprėja PDT citotoksinis poveikis navikui (Ferrario and Gomer). Hematoporfirinu sensibilizuotuose pelės žvyninio epitelio karcinomos navikuose reikšmingas VEGFA raiškos padidėjimas išlieka 6 val. po poveikio, ir tik po 24 val. susilygina su negydytų pelių VEGFA kiekiu navikuose (Uehara et al., 2001). Sveikame smegenų audinyje fotodinaminis poveikis taip pat skatina VEGFA raišką, kas lemia endotelio ląstelių proliferaciją (Zhang et

al., 2005) ir pakitusių kraujagyslių susidarymą (Jiang et al., 2004). Be to, padidėjusi VEGFA raiška buvo stebėta ne tik fotofrinu sensibilizuotose navikuose (smegenų glioma 9L), bet ir šalia jų esančiuose sveikuose audiniuose (Zhang et al., 2007). PDT panaudojus prostatos vėžiui LNCaP gydyti, dėl navikuose padidėjusio VEGFA kiekio vėžys išplito į limfinius mazgus (Kosharsky et al., 2006).

Parodyta, kad VEGFA slopinimas stiprina PDT citotoksinį poveikį navikams. Panaudojus PDT su fotofrinu kartu su VEGFA receptorių slopikliais, sustiprėjo glioblastomos naviko U87 apoptozė ir padidėjo jo jautrumas PDT bei sumažėjo VEGFA kiekis šalia naviko esančiuose audiniuose (Jiang et al., 2008). Derinant PDT ir antiangiogeninę terapiją svarbu atkreipti dėmesį į tai, kad angiogenezę skatinančių veiksnių genų raiškos pobūdžiui svarbus intervalas tarp FS suleidimo ir švitinimo (*delivery-light interval*), o per 30 dienų po PDT keičiasi angiogenezę skatinančių veiksnių sudėtis (Bhuvanewari et al., 2008).

Apibendrinant galima teigti, kad įvairiais FS fotosensibilizuotose naviko ląstelėse didėja proangiogeninio citokino VEGFA raiška, kas galėtų skatinti naviko atsinaujinimą.

Kita vertus, kai kuriuose navikuose PDT slopina angiogenezę skatinančius vyksmus. Pavyzdžiui, po PDT su ALA plaučių karcinomos navikuose 3LL sumažėjo VEGFA kiekis kraujo serume, o naviko kraujagyslių pažaidos sulėtino vėžio plėtrą (sumažėjo metastazių) (Lisnjak et al., 2005). PDT su hipokrelinu (*hypocrellin*) žmogaus smegenų naviko ląstelėse padidino ne tik angiogenezę skatinančių, bet ir ją slopinančių veiksnių raišką (Deininger et al., 2002).

1.2.2 Interleukino-1 raiškos pokyčiai po PDT

Interleukino-1 (IL-1) šeimą sudaro mažiausiai vienuolika citokinių (1.4.1 sk.). Plačiai tiriamas šių molekulių vaidmuo su uždegimu susijusiose ligose, tokiose kaip reumatinis artritas.

Negydytuose naviko audiniuose IL-1 β gali veikti kaip prouždegiminis (Evans et al., 1992), angiogenezę skatinantis veiksnys (Kimura et al., 2007). Iš IL-1 šeimos, PDT gydytuose navikuose *in vitro* ir *in vivo* pastebėti tik IL-1 β raiškos pokyčiai (Cecic and Korbelik, 2002; Ferrario et al., 2005; Sun et al., 2002). Dažniausiai šio citokino raiška padidėja, didėjant angiogenezę skatinančių veiksnių raiškai. Tačiau nėra aišku, ką lemia toks IL-1 β raiškos padidėjimas naviko audiniuose. Žinoma, kad COX slopikliai mažina IL-1 β bei kitų proangiogeninių veiksnių raišką, todėl padidėja ląstelių jautrumas PDT poveikiui (Ferrario et al., 2005). Kitas mokslinis darbas rodo, kad po PDT IL-1 β galėtų skatinti neutrofilų migraciją link naviko ir tokiu būdu didinti šios terapijos veiksmingumą (Sun et al., 2002).

Nepavyko rasti nė vieno straipsnio apie citokino IL-1 α vaidmenį PDT metu. Paskelbta tik pora darbų apie PDT poveikį citokino IL-1 α raiškai nevėžinėse ląstelėse: tyrimai su uždegimo pažeistos odos (sklerodermos) keratinocitais parodė, kad ALA fotosensibilizuoti keratinocitai sekretuoja IL-1 α , kuris skatina fibroblastus gaminti tarpląstelinio užpildo metaloproteinazes (MMP)-1 ir MMP-2 (Karrer et al., 2004). Čia reikėtų pabrėžti, kad tarpląstelinį užpildą ardančios MMP paprastai siejamos su angiogeneze (Ferrario et al., 2004). Kita vertus, egzogeninis IL-1 α didina endotelio ląstelių jautrumą AISPc sukeltai PDT *in vitro* (Breider et al., 1993).

Negydyto kasos vėžio ląstelėse IL-1 α autokrininiu būdu lemia naviko augimui ir plitimui palankaus transkripcijos veiksnio NF- κ B konstitutyvią raišką (Melisi et al., 2009; Niu et al., 2004). Be to, egzogeninis IL-1 α skatina kasos vėžio ląsteles gaminti IL-8 per MAPK/AP-1 ir ROS/NF- κ B kelius; šie parakrininiai signalai skatina bambagyslės endotelio ląstelių HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) proliferaciją (Sawai et al., 2005). Su IL-1 α parakrininiu signalu siejamas skrandžio vėžinių ląstelių gebėjimas proliferuoti (IL-1 α /COX-2 kelias) (Uefuji et al., 2005) ir skatinti endotelio ląstelių proliferaciją (IL-1 α /IL-1R1/VEGFA) (Ma et al., 2008).

Čia pateikti duomenys leidžia prognozuoti, kad po PDT naviko ląstelėse padidėjusi citokino IL-1 α biosintezė skatins naviko atsinaujinimą lemiančius procesus.

1.2.3 Kitų citokinių raiškos pokyčiai po PDT

PDT sukelti uždegimo vyksmai gali būti siejami su padidėjusia prouždegiminių citokinių raiška. Daugelis šių citokinių skatina neutrofilų judėjimą link naviko, kas, manoma, turėtų sustiprinti PDT priešvėžinį poveikį. IL-6 gamyba padidėja įvairiose ląstelėse, sensibilizuotose įvairiais FS (Du et al., 2006; Gollnick et al., 1997; Kick et al., 1995). Tikslus IL-6 vaidmuo PDT sukeltame uždegime nėra žinomas, bet parodyta, kad, nuslopinus citokino raišką fotofrinu sensibilizuotose pelės pienliaukės karcinomos EMT6 navikuose, žymiai sumažėja kraujotakoje cirkuliuojančių neutrofilų kiekis (Cecic and Korbelik, 2002). Tokius pačius EMT6 navikus paveikus pirofeoforbidu-a ir šviesa, vėžinėse ląstelėse padidėja kai kurių citokinių, tarp jų ir IL-6, raiška, o naviko kraujagyslių endotelio ląstelėse – ląstelių sąveikos baltymų raiška. Įdomu, kad neutrofilų traukai svarbūs buvo tik citokinas MIP-2 (makrofagų uždegiminis baltymas; žmogaus IL-8 analogas) ir ląstelių sąveikos baltymas E-selektinas (Gollnick et al., 2003). Nustatyta, kad IL-10 taip pat svarbus neutrofilų traukai link naviko po PDT (Cecic and Korbelik, 2002).

Kuriant vakciną prieš vėžį, nustatyta, kad PDT veiktų vėžinių ląstelių lizatai gali aktyvinti dendritines ląsteles ir skatinti jas gaminti IL-12 (Gollnick et al., 2002). Žinoma, kad PDT aktyvintos antigeną pateikiančios ląstelės sekretuoja IL-12 (Gollnick et al., 2006). IL-12 sukelia ląstelinį imuninį atsaką, slopina angiogenezę ir tokiu būdu stabdo naviko augimą (Akhtar et al., 2004; Wolf et al., 1994). Neseniai parodyta, kad adenovirusas su IL-12 koduojančiu genu (AdIL-12) reikšmingai padidina naviko jautrumą PDT; taip pat nustatyta, kad šis derinys reikšmingai didina kitų prouždegiminių citokinių IFN- γ ir TNF- α sekreciją (Park et al., 2008).

Nustatyta, kad citokinai IL-6 ir TNF- α gali valdyti vėžinių ląstelių žūtį apoptozės būdu, ir taip didinti PDT priešvėžinį poveikį. Pavyzdžiui, IL-6

skatina NPe6 sensibilizuotos pelės plaučių karcinomos LLC ląstelių apoptozę (Usuda et al., 2001), rekombinantinis TNF- α indukuoja apoptozę bei sustiprina ftalocianino Pc4 fotocitotoksinį poveikį žmogaus epidermoidinės karcinomos A431 ląstelėms (Azizuddin et al., 2001), foskanu sensibilizuotų makrofagų TNF- α sukelia fibroblastų citolizę (Coutier et al., 1999).

Uždegiminis atsakas yra sudėtingas procesas. Sunku nuspėti, kokius FS sensibilizuoto naviko pokyčius jis gali sukelti, nes uždegiminio atsako į PDT metu padidėja ne vieno ar dviejų, bet keleto citokinų – tiek proangiogeninių, tiek ir prouždegiminių – raiška (Bhuvanewari et al., 2008). Kita vertus, pastebėta grįžtamoji vėžinių ir endotelio ląstelių nejautra citokinams. Ją lemia PDT sukeltos pažaidos: baltymų defosforilinimas ir baltymų sąsiuvos, sumažėjusi receptorių, tarp jų ir epidermio augimo veiksnio (EGF) receptoriaus, raiška (Liu et al., 2004; Wong et al., 2003).

Apibendrinant galima teigti, kad daugelio mokslinių grupių pastangomis yra nustatyta, kad po PDT pakinta įvairių citokinų ir jų receptorių raiška (1.4 lent.). PDT aktyvintas uždegiminis atsakas yra savitas daugeliui veiksnių – ląstelių tipui, FS ir fotocitotoksinio poveikio stiprumui, ir gali lemti tiek naviko nykimą, tiek jo atsinaujinimą. Mes pastebėjome, kad mTHPC indukuotas fotodinaminis poveikis ir jo deriniai su taksoteru arba doksorubicinu skatina citokinų VEGFA ir IL-1 α raišką *in vitro*. VEGFA reikšmė PDT teigiamai prognozei nėra visiškai aiški. Intensyvesnė kraujotaka ne tik geriau aprūpina naviką maisto medžiagomis, bet gali ir sutrikdyti naviko augimą, sudarydama palankesnes sąlygas imuniniam organizmo atsakui prieš vėžį. Citokino IL-1 α raiškos pokyčiai ir jų svarba po PDT beveik netirti. Todėl šiame darbe siekėme įvertinti VEGFA ir IL-1 α raiškos pokyčius ir jų reikšmę po fotocitotoksinio poveikio vėžinėse ląstelėse *in vitro* ir navikuose *in vivo*.

Norint vertinti citokinų raišką, būtina žinoti tiriamųjų citokinų molekulių savybes. Abu tiriamieji citokinai yra gerai ištirti biocheminiu požiūriu ir jų molekulinė sąranga yra žinoma.

1.4 lentelė. Citokinai ir jų receptoriai, kurių raiška tirta po PDT

Vėžinių ląstelių tipas	FS	Tirtų citokinių ir jų receptorių raiškos pokyčiai	Pasekmės	Šaltinis
Pienliaukės karcinoma EMT6	Fotofrinas	↑ IL-6, ↑ IL-10, TNF- α raiška nepakito	Funkcija netirta	(Gollnick et al., 1997)
		↑(IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, G-CSF, KC ir kt.)	Neutrofilijos valdymas	(Cecic and Korbelik, 2002)
	HPPH	↑(MIP-2, IL-6, KC)	MIP-2: neutrofilų migracija link naviko	(Gollnick et al., 2003)
Ryklės karcinoma FaDu, gimdos kaklelio adenokarcinoma HeLa, kepenų karcinoma HepG2	ALA, Fotofrinas	↓ (EGFR, LIFR α , gp130)	Ląstelių nejautra EGF, LIF, IL-6 citokinams	(Wong et al., 2003)
Plaučių karcinoma LLC	NPe6	↑ (IL-6, IL-2, TNF- α)	IL-6: apoptozės iniciacija	(Usuda et al., 2001)
Gimdos kaklelio karcinoma HeLa	Fotofrinas	↑IL-6	Uždegimas, imuninis atsakas	(Kick et al., 1995)
Karcinoma su pCMV-IL-6 (BCC)/IL-6	ALA	↑ pCMV-IL-6	Apoptozės slopinimas, uždegimo ir angiogenezės iniciacija	(Jee et al., 2001)
Plokščiojo epitelio karcinoma SCCVII	Fotofrinas, mTHPC	↑(IL-1 β , IL-6, TNF- α)	IL-1 β : didesnis ląstelių jautrumas PDT, neutrofilų migracija link naviko	(Sun et al., 2002)
Storosios žarnos karcinoma Colo 26	HPPH	↑(IL-6, MIP-2, MIP-1)	IL-6: neutrofilų migracija link naviko	(Henderson et al., 2004)
Ryklės karcinoma FaDu, plaučių karcinoma A549, hepatoma H-35	ALA, HPPH	↓ EGFR	Ląstelių nejautra onkostatiniui M ir IL-6	(Liu et al., 2004)
Šlapimo pūslės karcinoma MGH	hipericinas	↑(IL-6, VEGFA, TNF- α , bFGF, IFN- α ir - γ , HGF, PDGFA, TGF α)	Funkcija netirta	(Bhuvaneswari et al., 2008)
Limfoma U937 Φ	mTHPC	↑TNF- α	L929 fibroblastų citolizė	(Coutier et al., 1999)
Kapoši sarkoma	Fotofrinas	↑ (HIF-1 α , VEGFA, PGE2, TNF- α , IL-1 β)	Anti-VEGFA terapija (AVASTINAS):	(Ferrario and Gomer, 2006)
Pienliaukės karcinoma BA	Fotofrinas	↑VEGFA, ↑HIF-1 α	Anti-VEGFA terapija: PDT citotoksinio poveikio stiprėjimas	(Ferrario et al., 2000)
		↑(VEGFA, TNF- α , IL-1 β , IL-10)	Cox-2 slopikliai : mažino TNF- α , IL-1 α , VEGFA raiškos mažėjimas ir ląstelių jautrumo PDT didėjimas	(Ferrario et al., 2005)

1.4 lentelė. Citokinai ir jų receptoriai, kurių raiška tirta po PDT (tęsinys)

Vėžinių ląstelių tipas	FS	Tirtų citokinių ir jų receptorių raiškos pokyčiai	Pasekmės	Šaltinis
Nosiaryklės karcinoma CNE2	Hipericinas	↑(HIF-1 α , VEGFA, COX-2, bFGF)	Proangiogeninių veiksnių raiškos didėjimas dėl PDT sukeltų pažeidimų naviko kraujagyslėse; RTK slopiklis SU6668: PDT citotoksinio poveikio stiprinimas	(Zhou et al., 2005)
		↑VEGFA	Anti-VEGF terapija: PDT citotoksinio poveikio stiprinimas	(Bhuvaneswari et al., 2007a; Yee et al., 2005)
		↑IL-6	Funkcija netirta	(Du et al., 2006)
Glioblastoma U87	Fotofrinas	↑VEGFA	Anti-VEGFA terapija: PDT citotoksinio poveikio stiprinimas	(Jiang et al., 2008)
Galvos ir kaklo karcinoma NR-S1	Hp	↑VEGFA	Funkcija netirta	(Uehara et al., 2001)
Plaučių karcinoma 3LL	ALA	↓VEGFA	Metastazių mažėjimas	(Lisnjak et al., 2005)
Prostatos karcinoma LNCaP	Liposominis BPD	↑VEGFA	Vėžio išplitimas į limfinius mazgus	(Kosharsky et al., 2006)
Glioma LN229	Hipokrelinas	↑(VEGFA ir antiangiogeniniai veiksniai: tVEGFR1, angiostatinas, AIF-1, CTGF)	Funkcija netirta	(Deininger et al., 2002)

1.3 VEGF šeimos baltymai ir jų receptoriai

VEGF šeimos baltymai priklauso cistino mazgą turinčių augimo veiksnių didšeimei (*cystine knot growth factor superfamily*), ir valdo vaskulogenezę, angiogenezę ir limfoangiogenezę.

Yra žinoma nemažai kitų angiogenezę valdančių veiksnių. Angiogenezę skatina fibroblastų augimo veiksniai aFGF ir bFGF, transformuojantys augimo veiksniai TGF- α ir TGF- β , hepatocitų augimo veiksnys HGF, naviko nekrozės veiksnys TNF- α , angiogeninas, interleukinas-8 (IL-8) ir angiopoetiniai (Ferrara, 2000). Neigiami reguliatoriai, tokie kaip trombospondinas, endostatinas ar tumstatinas, slopina angiogenezę (Sund et al., 2005).

VEGF šeimos baltymai yra homodimeriniai glikoproteinai (Potgens et al., 1994). Šie augimo veiksniai turi N galo signalo seką, lemiančią aktyvią sekreciją (apžv. (Thomas, 1996)).

VEGF šeimą sudaro mažiausiai 7 nariai: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, PIGF, VEGFE, ir VEGFF. Žinduolių genome užkoduoti visi šios šeimos baltymai, išskyrus *Parapoxvirus* genčiai charakteringą VEGFE ir iš gyvačių nuodų išskirtą VEGFF (kitai vadinamą svVEGF).

Dar daugiau, dėl informacinės RNR (iRNR) splaisingo susidaro VEGFA, VEGFB, PIGF izoformos, turinčios skirtingą aminorūgščių kiekį. VEGF šeimos citokinai gali jungtis prie trijų receptorinių tirozino kinazių (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) ir dviejų fermentinio aktyvumo neturinčių koreceptorių (neuropilino-1 ir -2). Keletas šios šeimos baltymų jungiasi prie heparano sulfato proteoglikanų (HSPG), esančių plazminėje membranoje ir ECM (apžv. (Reigstad et al., 2005; Roskoski, 2007)). VEGF receptoriams ir HSPG saviti citokinai pateikti 1.5 lent.

1.3.1 VEGFA baltymų struktūra ir savybės

VEGFA funkcijos

Kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A tyrimai prasidėjo XX a. devintajame dešimtmetyje: 1983 m. pirmą kartą nustatytas kraujagyslių

1.5 lentelė. VEGF receptoriams, koreceptoriams ir heparano sulfato proteoglikanams saviti citokinai (pagal (Roskoski, 2007), jeigu nepažymėta kitaip)

VEGFR1	VEGFR2	VEGFR3	Np-1	Np-2	Sindekanas ^a
VEGFA	VEGFA (110-165) ^b	Pro- ir brandus VEGFC	VEGFA-165	VEGFA (145-165) ^b	VEGFA (145-206) ^b
VEGFB	VEGFC	Pro- ir brandus VEGFD	PIGF-152	PIGF-152	PIGF (152, 224) ^b
PIGF	VEGFD		Pro-VEGFC	Pro- ir brandus VEGFC	VEGFB-167
VEGFF ^c	VEGFE		Pro-VEGFD	Pro-VEGFD	
	VEGFF ^d		VEGFB		
			VEGFE		

^a Toks heparano sulfato proteoglikanas. ^b Izoformos su skirtingu aminorūgščių skaičiumi. ^c Pagal (Takahashi et al., 2004); ^d pagal (Yamazaki et al., 2003).

ląstelių proliferaciją skatinantis veiksnys (Ferrara and Henzel, 1989). Dabar VEGFA baltymas žinomas kaip svarbus angiogenezės reguliatorius (Kim et al., 2010), apžv. (Adams and Alitalo, 2007).

VEGFA valdo angioblastų - endotelio ląstelių pirmtakų - chemotaksį ir diferenciaciją, endotelio ląstelių proliferaciją ir susirinkimą į vamzdelius, kraujagyslių persitvarkymo procesus. Ląstelių atsaką į jų aplinkoje esantį citokiną VEGFA sunku prognozuoti, nes jis priklauso nuo daugelio kitų baltymų raiškos: VEGFA izoformų santykio, kitų šios baltymų šeimos narių, VEGF receptorių raiškos. Be to, daugelis kitų veiksnių valdo angiogenezės procesus: 1) kraujagysles supantį ECM sudarantys komponentai gali skatinti arba slopinti angiogenezę; 2) VEGFA izoformų, sujungtų su tarpląstelinium užpildu, proteolizė sudaro VEGFA gradientą, ir tokiu būdu skatinamas kraujagyslių augimas; 3) fizinė sąveika tarp endotelio ląstelių ir pericitų užtikrina kraujagyslių stabilumą ir slopina angiogenezę.

Aiškėja, kad VEGFA ne tik skatina naviko indukuotą angiogenezę, bet ir slopina organizmo imuninį atsaką. Neseniai pastebėta, kad šis citokinas didina reguliacinių T ląstelių (T_{regs}), slopinančių imuninį atsaką, kiekį storžarnės navikuose (Wada et al., 2009). Be to, VEGFA slopina dendritinių ląstelių diferenciaciją (Alfaro et al., 2009; Dikov et al., 2005).

VEGFA geno ir baltymo struktūra

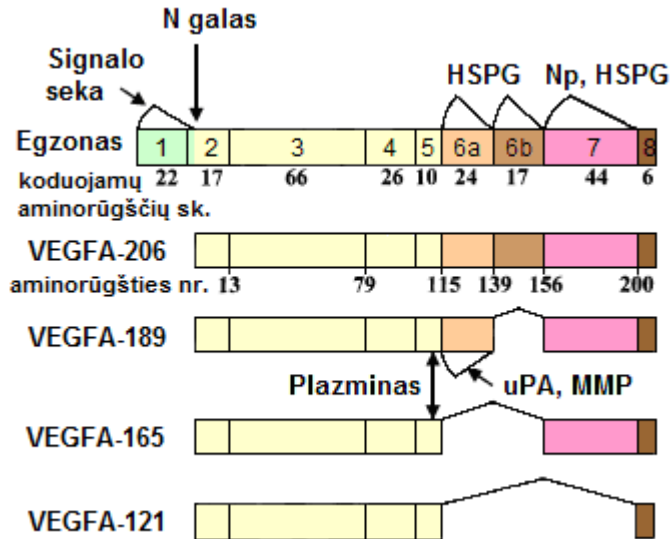
Žmogaus VEGFA genas yra 6-tosios chromosomos trumpojo peties 21.3 segmente (6p21.3) (Vincenti et al., 1996). Baltymą koduojančią sritį (~14 kb) sudaro aštuoni egzonai (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991). Pirminį žmogaus VEGFA baltymą sudaro 232 aminorūgštys. Dėl iRNR 6 ir 7-to egzonų alternatyvus splaisingo susidaro keturios pagrindinės VEGFA izoformos, turinčios 206, 189, 165 ir 121 aminorūgštis (VEGFA-206, -189, -165 ir -121) (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991) (1.3 pav.).

VEGFA-165, plačiausiai tiriama izoforma, neturi 6-to egzono koduojamų aminorūgščių, o VEGFA-121 izoforma neturi 6 ir 7-to egzonų koduojamų aminorūgščių. Aptikta ir retesnių izoformų VEGFA-145 (Poltorak et al., 1997), VEGFA-183 (Jingjing et al., 1999), VEGFA-162 (Lange et al., 2003) ir angiogenezę slopinančių izoformų (VEGFA-165b ir kitos) (Woolard et al., 2004), apžv. (Harper and Bates, 2008). Pelės VEGFA izoformos yra viena aminorūgštimi trumpesnės nei žmogaus baltymai dėl glicino delecijos.

VEGFA glikozilinto dimero molekulinė masė yra apie 47 kDa (Peretz et al., 1992). Baltymų elektroforezės geliuose gali būti registruojamos kelios įvairaus dydžio VEGFA baltymo juostos dėl alternatyvaus splaisingo, skirtingo N-glikozilinimo laipsnio ir dalinai dėl proteolizės: neredukuoto baltymo molekulinė masė gali būti apie 34-42 kDa, o redukuoto – apie 17-24 kDa (Connolly et al., 1989; Senger et al., 1990).

Rentgeno kristalografijos būdu (skiriamoji geba 1,9 Å) nustatyta VEGFA 8-109 aminorūgščių fragmento struktūra (1.4 pav., A) (Muller et al., 1997a). Parodyta, kad VEGFA monomerų struktūra atitinka cistino mazgą turinčių augimo veiksnių struktūrą: trys disulfidiniai tilteliai Cys57-Cys102, Cys61-Cys104 ir Cys26-Cys68 monomero viduje sudaro mazgo struktūrą.

Cistino mazgą turinčių baltymų monomerų topologijos panašios, tačiau dimerų formavimo būdai skiriasi (Sun and Davies, 1995). VEGFA monomerai išsidėsto antilygiagrečiai ir dimerizuojasi vienas šalia kito (*side-by-side*).



1.3 pav. Žmogaus VEGFA dominuojančios izoformos ir jų funkciniai sandai.

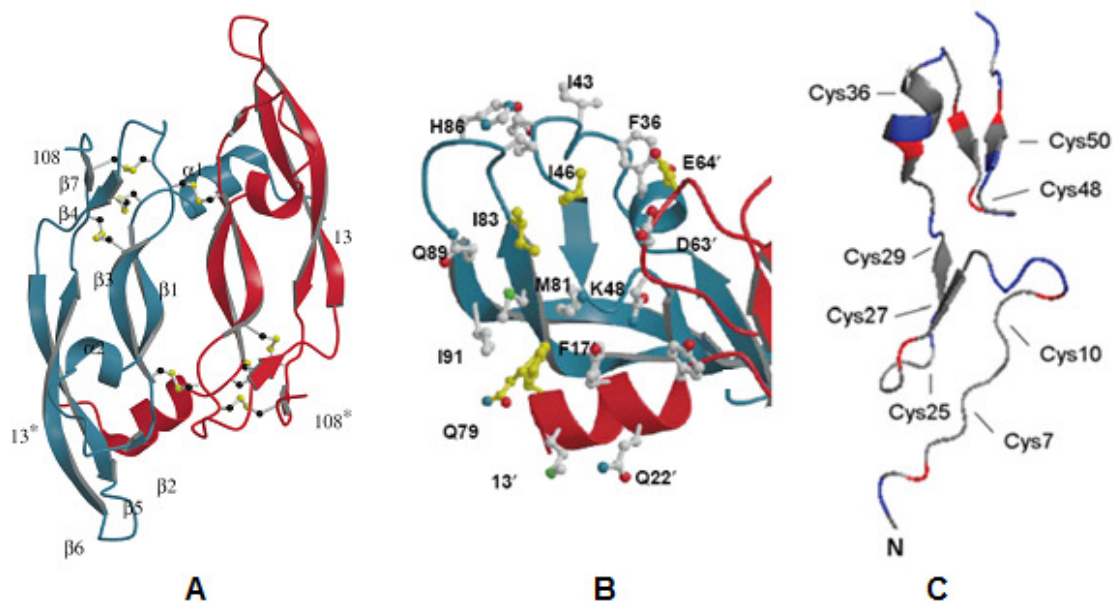
Pirminis baltymas parodytas schemos viršuje, brandūs baltymai parodyti žemiau, rodyklė žymi vietą, ties kuria skeliama baltymo polipeptidinė grandinė. Pelės izoformos yra viena aminorūgštimi trumpesnės dėl glicino delecijos 2 egzono koduojamoje sekoje. HSPG - heparino sulfato proteoglikanai; MMP - tarpląstelinio užpildo metalo proteinazės; Np - neuropilinas; uPA - urokinazės tipo plazminogeno aktyvatorius (pagal (Roskoski, 2007)).

VEGFA monomerus kovalentiškai jungia simetriški disulfidiniai ryšiai tarp Cys51 ir Cys60.

VEGFA jungiasi prie VEGFR1 ir VEGFR2. Skirtinguose dimero poliuose VEGFA baltymas turi po vieną sąveikos su receptoriaumi paviršių. Toks išsidėstymas svarbus receptoriaus dimerizacijai, transfosforilinimui ir signalo perdavimui (Siemeister et al., 1998).

Kryptingos mutagenezės metodu nustatytos aminorūgštys, svarbios VEGFA sąveikai su VEGFR2: vieno monomero Phe17 ir Glu64, kito monomero Ile46, Gln79 ir Ile83 (Muller et al., 1997b) (1.4 pav., B). VEGFA jungimuisi su VEGFR1 svarbiausios yra Asp63, Glu64, Glu67 aminorūgštys, esančios kilpoje tarp $\beta 3$ ir $\beta 4$ juostų (Key et al., 1996b).

Taip pat išspręsta ir VEGFA-165 baltymo su heparinu sąveikaujančio domeno (HBD) struktūra (Fairbrother et al., 1998) (1.4 pav., C). Šio domeno seka, kurią koduoja 7 egzonas, ir struktūra yra unikalios ir nehomologiškos kitiems, VEGF šeimai nepriklausantiems baltymams (Keck et al., 1997).



1.4 pav. VEGFA 8–109 ir jo funkcinių sandų struktūra.

A - VEGFA 8–109 dimero struktūra (Muller et al., 1997a). Antrinės struktūros elementai pažymėti: α 1 (16-24 aminorūgštys), β 1 (27-34), α 2 (35-39), β 2 (46-48), β 3 (51-58), β 4 (67-69), β 5 (73-83), β 6 (89-99) ir β 7 (103–105); vienas monomeras yra mėlynas, kitas – raudonas; disulfidinės jungtys yra baltos, o sieros atomai – geltoni.

B - VEGFA molekulės paviršius, dalyvaujantis sąveikoje su receptoriumi (pagal (Muller et al., 1997a)). Sąveikos paviršių sudaro vieno monomero (mėlyno) β 2, β 5 ir β 6 juostos ir kito monomero (raudono) α 1, bei šalia esančios kilpos. VEGFA susirišant su VEGFR2 svarbios aminorūgštys (Phe17', Gln 79, Ile46, Glu64', Ile83) yra geltonos spalvos (Muller et al., 1997b). Sąryšos su receptoriumi savitumui svarbios aminorūgštys pažymėtos pilkai. VEGFA susirišant su VEGFR1 svarbios aminorūgštys yra Asp63', Glu64' (pažymėta) ir Glu67' (yra toje pačioje kilpoje) (Keyt et al., 1996b).

C - VEGFA-165 HBD (*heparin-binding domain*) struktūra (pagal (Krilleke et al., 2009)). HBD sudaro 55 aminorūgštys (atitinka VEGFA-165 baltymo 111-165 aminorūgštis). N galo ir C galo subdomenai (1-29 ir 29-55 aminorūgštys, atitinkamai) aiškiai atskirti, ir kiekvieną jų sudaro mažas dviejų antilygiagrečių juostų β lakštas ir du disulfidiniai ryšiai. Papildomai, C galo domenas turi α spiralę. Visos parodytos cisteino aminorūgštys formuoja disulfidines jungtis. Teigiamą krūvį turinčios aminorūgštys pažymėtos mėlynai, neigiamą krūvį turinčios aminorūgštys – raudonai.

HBD sudaro 55 aminorūgštys (atitinka VEGFA-165 baltymo 111-165 aminorūgštis). Šiame domene vyrauja bazinės aminorūgštys (pI~11 (Keck et al., 1997)), tačiau paviršiaus krūvis pasiskirstęs nevienodai: vienose vietose sutelktos teigiamą krūvį turinčios aminorūgštys, kitose – neigiamą krūvį turinčios aminorūgštys (1.4 pav., C). Elektrostatinei sąveikai su heparinu

svarbiausios aminorūgštys Arg13, Arg14 ir Arg49 (atitinka VEGFA-165 Arg123, Arg124 and Arg159) (Krilleke et al., 2007) yra išsidėsčiusios viena šalia kitos išilgai domeno ir sudaro vientisą sąveikos paviršių (Stauffer et al., 2002).

VEGFA-164 kryptinga mutagenėzė parodė, kad HBD sąveikai su heparinu ir neuropilinu-1 (Np1) svarbios tiek skirtingos, tiek tapačios domeno sritys (Krilleke et al., 2007). Taip pat šie tyrimai parodė, kad HBD mutacijos mažina VEGFA baltymo giminingumą VEGFR1. VEGFA / VEGFR1 kelias valdo leukocitų migraciją (Barleon et al., 1996). Todėl buvo iškelta hipotezė, kad VEGFA izoformos, turinčios HBD domeną, galėtų veikti kaip uždegiminių ląstelių chemokinai (Krilleke et al., 2009).

VEGFA izoformų, turinčių HBD, proteolizė

Visos VEGFA izoformos yra hidrofiliškos, vandeniniuose tirpaluose laisvai difunduojančios molekulės. Tačiau, VEGFA-165, VEGFA-189 ir VEGFA-206 turi sąveikos su heparano sulfato proteoglikanais domenus. 6a, 6b ir 7 egzoni koduoja baltymo HBD sritis (1.3 pav). Pastarosios jungiasi prie neigiamą krūvį turinčių HSPG, ir neleidžia baltymams laisvai judėti *in vivo* (Robinson and Stringer, 2001). VEGFA-121 neturi šių domenų ir laisvai juda *in vivo*. VEGFA-165 neturi 6a ir 6b egzonų koduojamų sričių, bet turi 7 egzono koduojamą HBD segmentą. VEGFA-165 pasižymi tarpinėmis savybėmis: tai sekretuojamas baltymas, bet nemaža jo dalis lieka prisijungusi prie ląstelės paviršiaus ir ECM (Houck et al., 1992). Didesnės izoformos turi visų trijų egzonų (6a, 6b ir 7) koduojamas sritis ir negali laisvai judėti. Šios izoformos būna prikibusios prie ląstelių paviršiaus ir įstrigusios ECM.

Užląstelinės peptidazės, tokios kaip plazminas ir MMP, valdo augimo veiksmų atpalaidavimą (Mignatti and Rifkin, 1993). Parodyta, kad plazminas skelia VEGFA-165 baltymą tarp Arg110 ir Ala111, ir susidaro mitogeninė funkcija pasižymintis N galo fragmentas (VEGFA-110) bei neaktyvus C galo fragmentas (111–165 aminorūgštis) (Keyt et al., 1996a). VEGFA-110

nesijungia, o VEGFA-165 ir C galo fragmentas jungiasi su heparinu. Tai pirmieji tyrimai, rodantys, kad HBD sritį sudaro 111–165 aminorūgštys.

VEGFA 6a egzono koduojamoje baltymo dalyje yra uPA skėlimo sritis (Plouet et al., 1997). Taigi, VEGFA-165 baltymo, kuriame nėra 6a egzono koduojamos srities, ši peptidazė neskaldo. Be to, minimojo straipsnio autoriai parodė, kad uPA atskeltas VEGFA-189 izoformos N galo fragmentas ir VEGFA-165 jungiasi prie VEGFR2 ir skatina ląstelių proliferaciją. Paprastai, VEGFA-189 nesijungia prie VEGFR2, todėl autoriai spėjo, kad 6a egzone esančios aminorūgštys trukdo baltymams jungtis prie VEGFR2.

Parodyta, kad VEGFA-164 baltymo HBD kryptingos mutacijos nepakeičia baltymo giminingumo VEGFR2 ir nesutrikdo biologinės funkcijos – 7 egzono aminorūgštys (Arg13, Arg14 and Arg49) nėra svarbios VEGFA ir VEGFR2 sąveikai (Krilleke et al., 2007). Kita vertus, parodyta, kad heparinas nėra svarbus VEGFA-121 biologinės funkcijos veiksmingumui, bet padeda VEGFA-165 baltymui skatinti endotelio ląsteles (HUVEC) proliferuoti ir formuoti vamzdelius bei indukuoti VEGFR2 autofosforilinimą (Ashikari-Hada et al., 2005). Šio straipsnio autoriai pasiūlė heparino / HSPG, VEGFA-165 ir VEGFR2 komplekso modelį; šių molekulių sąveika sustiprina VEGFA-165 biologinį poveikį. Tačiau šiam modeliui pagrįsti reikia detalesnių biocheminių tyrimų.

Parodyta, kad MMP skelia pelės VEGFA-164 ir VEGFA-188 baltymus *in vitro* (Lee et al., 2005). Šie autoriai nustatė, kad MMP katalizuoja VEGFA-164 hidrolizę tarp 135–136, 120–121 ir 113–114 aminorūgščių. Taip pat šie autoriai parodė, kad su ECM surištos ir proteolizuotos VEGFA izoformos jungiasi su tuo pačiu receptoriu, bet lemia skirtingus kraujagyslių fenotipus.

1.3.2 Kiti žinduolių VEGF šeimos baltymai ir jų savybės

VEGFB

Dėl iRNR alternatyvaus splaisingo susidaro dvi VEGFB izoformos, turinčios 167 ir 186 aminorūgštis, atskėlus signalo seką (VEGFB-167 ir, VEGFB-186) (Olofsson et al., 1996). VEGFB-186 yra laisvai difunduojantis

baltymas, o VEGFB-167 jungiasi su HSPG ir negali laisvai judėti. Abi VEGF-B izoformos yra disulfidiniais ryšiais sujungti homodimerai. VEGFB ir VEGFA erdvinės struktūros panašios (Iyer et al., 2006). Šiek tiek skiriasi VEGFB ir VEGFA kilpų tarp $\beta 5$ ir $\beta 6$ juostų struktūros. Manoma, kad dėl to VEGFB nesijungia su VEGFR2.

Daugiausia VEGFB iRNR nustatyta pelių embrionų ir suaugusių gyvūnų centrinės nervų sistemos ir širdies audiniuose (Lagercrantz et al., 1998). Taip pat, VEGFB iRNR raiška stebima ir kai kuriuose navikuose (karcinomose, fibrosarkomose, melanomose, limfomose) (Salven et al., 1998). Pelės su išveiklintu VEGFB yra gyvos, bet jų širdies ritmas būna sutrikęs (Aase et al., 2001). Manoma, kad VEGFB reikalingas normaliam širdies funkcionavimui, bet ne širdies vystymuisi ar angiogenezei. Naujausi tyrimai rodo, kad VEGFB veikia kaip „išgyvenimo“, o ne „angiogeninis“ veiksnys. Įdomu, kad VEGFB stabilizuoja ne tik kraujagyslių endotelio ir pagalbines ląsteles (Zhang et al., 2009), bet ir neuronus (Poesen et al., 2008).

VEGFC

VEGFC sintetinamas kaip 419 aminorūgščių prepro-baltymas, kuris sudėtingos proteolizės metu virsta brandžia augimo veiksnio forma (Joukov et al., 1996; Joukov et al., 1997). Pro-baltymas (388 aminorūgščių) susidaro pašalinus signalo seką. Du pro-baltymo antilygiagretūs monomerai, sujungti disulfidiniais ryšiais, formuoja homodimerą. Prieš sekreciją šis dimeras skeliamas tarp Arg227 ir Ser228. C galo fragmentas (228-419 aminorūgštys) lieka susijungęs su kito monomero N galo fragmentu disulfidiniais ryšiais. Kai VEGFC atsiduria už ląstelės ribų, pašalinamos 32-111 aminorūgštys ir suformuojamas brandus VEGFC baltymas. Brandaus baltymo monomerai sujungti nekovalentiniais ryšiais. ProVEGF-C jungiasi su VEGFR3 ir dalyvauja limfangiogenezeje (Joukov et al., 1997). Brandus VEGFC jungiasi su VEGFR3 ir VEGFR2 receptoriais (1.5 lent.).

Daugiausia VEGFC iRNR nustatyta žmogaus širdies, kiaušidžių, placentos, griaučių raumenų ir plonosios žarnos audiniuose (Joukov et al.,

1996). Pelės embrionuose VEGFC nustatytas mezenchimos ląstelėse, ypač limfos indų formavimosi vietose (Kukk et al., 1996). Taip pat, VEGFC iRNR raiška stebima ir krūties, storosios žarnos, gimdos kaklelio, plaučių, prostatos navikuose (Siegfried et al., 2003; Su et al., 2006). Pelės su išveiklintu VEGFC žūva embriono stadijoje, bet kraujotaka formuojasi normaliai (Karkkainen et al., 2004).

VEGFD

VEGFD, panašiai kaip ir VEGFC, sintetinas kaip prepro-baltymas, ir proteolizės metu subrandinamas (Stacker et al., 1999). VEGFD struktūra labai panaši į VEGFC struktūrą. Brandus VEGFD yra nekovalentinis homodimeras. Pro-VEGFD jungiasi su limfangiogenezei svarbiu VEGFR3. VEGFD jungiasi su VEGFR3 ir VEGFR2 (1.5 lent.).

Daugiausia VEGFD iRNR nustatyta žmogaus širdies, placentos, griaučių raumenų ir plonosios žarnos audiniuose (Achen et al., 1998). Pelės su išveiklintu VEGFD genu yra gyvybingos, o jų limfos sistema normaliai formuojasi embriono stadijoje ir normaliai funkcionuoja suaugusiuose gyvūnuose (Baldwin et al., 2005). Taip pat, VEGFD raiška padidėja krūties, storžarnės ir skrandžio karcinomos, glioblastomos, melanomos ir kitose vėžinėse ląstelėse. Šio citokino raiška susijusi su storžarnės, plaučių ir kiaušidžių karcinomos ląstelių išplitimu limfmazgiuose (apžv. (Roskoski, 2007)).

Placentos augimo veiksnys

Placentos augimo veiksnys (PIGF) yra homodimerinis glikoproteinas, ir jo seka yra 42% homologiška citokino VEGFA sekai (Maglione et al., 1991). PIGF turi konservatyvias aštuonias cisteino aminorūgštis, kurios, kaip ir VEGFA, formuoja disulfidinius ryšius tiek tarp monomerų, tiek jų viduje (Iyer et al., 2001). Dėl iRNR alternatyvaus splaisingo susidaro keturios PIGF izoformos, turinčios 131, 152, 203 ir 224 aminorūgštis (Cao et al., 1997; Yang et al., 2003; Maglione et al., 1993). PIGF-152 ir PIGF-224 gali jungtis su HSPG. PIGF intensyvi biosintezė pirmiausiai vyksta placentoje. Be to, šis

citokinas svarbus ir patologinei angiogenezei (Li et al., 2006). Krūties, skrandžio, prostatos ir plaučių vėžinėse ląstelėse vyksta PIGF biosintezė (apžv. (Roskoski, 2007)). Parodyta, kad PIGF nėra svarbus angiogenezei pelės embrionuose (Carmeliet et al., 2001). Pelės su išveiklintu PIGF būna gyvybingos ir vaisingos, tik akies tinklainėje ir vidaus sekrecijos liaukoje geltonkūnyje būna nepakankamai išsivysčiusi kraujotakos sistema (Carmeliet et al., 2001).

1.3.3 VEGF šeimos baltymų receptoriai

VEGF šeimos baltymų receptoriai (VEGFR) priklauso receptorinių tirozino kinazių (RTK) didšeimii. Dėl sandaros savitumo jie priskiriami atskirai šeimai. VEGFR, kaip ir kitos RTK, yra transmembraniniai baltymai. VEGFR yra homologiški baltymai: turi septynis imunoglobulino (Ig) tipo užląstelinius domenų, vieną transmembraninę α spiralę, kinazės intarpo seką (maždaug 70 aminorūgščių), perskirtą viduląstelinį tirozino kinazės domeną ir C galo dalį (Shibuya et al., 1990; Terman et al., 1991) (1.5 pav).

Be to, VEGF šeimos citokinai gali jungtis su kitos klasės receptoriais - neuropilinais (Np). Manoma, kad Np yra VEGF koreceptoriai, stiprinantys šio citokino sąveiką su VEGFR2 (Fantin et al., 2009).

VEGFR1

Kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptorių 1 (VEGFR1), dar vadinamas Flt-1 (*fms-like tyrosyl kinase-1*), jungiasi su VEGFA, PIGF, VEGFB ir VEGFF (1.5 lent.). VEGFR1 molekulinė masė yra apie 210 kDa. Įvairiais organizmo vystymosi etapais VEGFR1 pasižymi skirtingomis funkcijomis (de Vries et al., 1992).

VEGFA baltymas yra labiau giminingas VEGFR1 ($K_{dis} \sim 10$ pM) nei VEGFR2 ($K_{dis} \sim 75-750$ pM) (de Vries et al., 1992; Peters et al., 1993; Quinn et al., 1993; Waltenberger et al., 1994). Tačiau VEGFA aktyvinamo VEGFR1 kinazinis aktyvumas yra visa eile mažesnis nei VEGFR2 (Waltenberger et al., 1994).

Aktyvintas VEGFR1 neskatina ląstelių proliferuoti, ir nesukelia jokių ląstelės griaučių pokyčių (Waltenberger et al., 1994), bet didina endotelio ląstelėse urokinazės tipo plazminogeno aktyviklio (uPA) ir plazminogeno aktyviklio slopiklio 1 (PAI-1) raišką (Olofsson et al., 1998). Šios molekulės svarbios ECM skaidymui ir molekulių migracijai. Be to, VEGFR1 valdo monocitų chemotaksį (Barleon et al., 1996).

Žmogaus VEGFR1 genas yra 13 chromosomos ilgojo peties 12 segmente (13q12). iRNR alternatyvaus splaisingo metu susidaro tirpi receptoriaus izoforma (tVEGFR1), kuri gali jungtis su VEGFA ir slopinti jo funkcijas (Kendall and Thomas, 1993). Nuskėlus signalo seką, tVEGFR1 turi 661 aminorūgštį, kurios atitinka pirmus šešis iš septynių užląstelinius imunoglobulino domenų. Padidėjusi tVEGFR1 raiška nėščiujų placentoje ir kraujo serume sukelia preeklampsiją (nėščiujų hipertenziją su proteinurija) (Levine et al., 2004). Tai rodo, kad per didelis receptoriaus kiekis mažina normalų VEGFA kiekį. Manoma, kad VEGFR1 surišdamas VEGFA slopina jo biologines funkcijas ir neleidžia jungtis su VEGFR2 (Park et al., 1994).

VEGFA aktyvinto VEGFR1 autofosforilinimas vyksta labai silpnai ir gali būti registruojamas tik ląstelėse, kuriose yra padidėjusi VEGFR1 raiška (Waltenberger et al., 1994). Daugelio RTK fermentinį aktyvumą lemia 2 domene esančios kinazės aktyvinimo kilpos, autofosforilinimas. Tačiau VEGFR1 aktyvinimo kilpa nėra autofosforilinama (Ito et al., 1998). Nustatyta, kad C galo dalyje gali būti fosforilintos šešios tirozino aminorūgštys: 1169, 1213, 1242, 1309, 1327, 1333 (apžv. (Olsson et al., 2006)) (Ito et al., 1998; Sawano et al., 1997) (1.5 pav.). Fosfotirozinas1169 aktyvina fosfolipazę C- γ 1 (PLC- γ 1), kuri paleidžia MAP kinazės signalinį kelią (Sawano et al., 1997). Parodyta, kad žmogaus VEGFA skatina Tyr1213 fosforilinimą, kai PIGF-152 skatina tik Tyr1309 fosforilinimą (Autiero et al., 2003). Šie citokinai skirtingai aktyvina receptorių: VEGFA sąveika su receptoriumi neveikia genų raiškos, o PIGF keičia daugiau kaip 50 genų raišką.

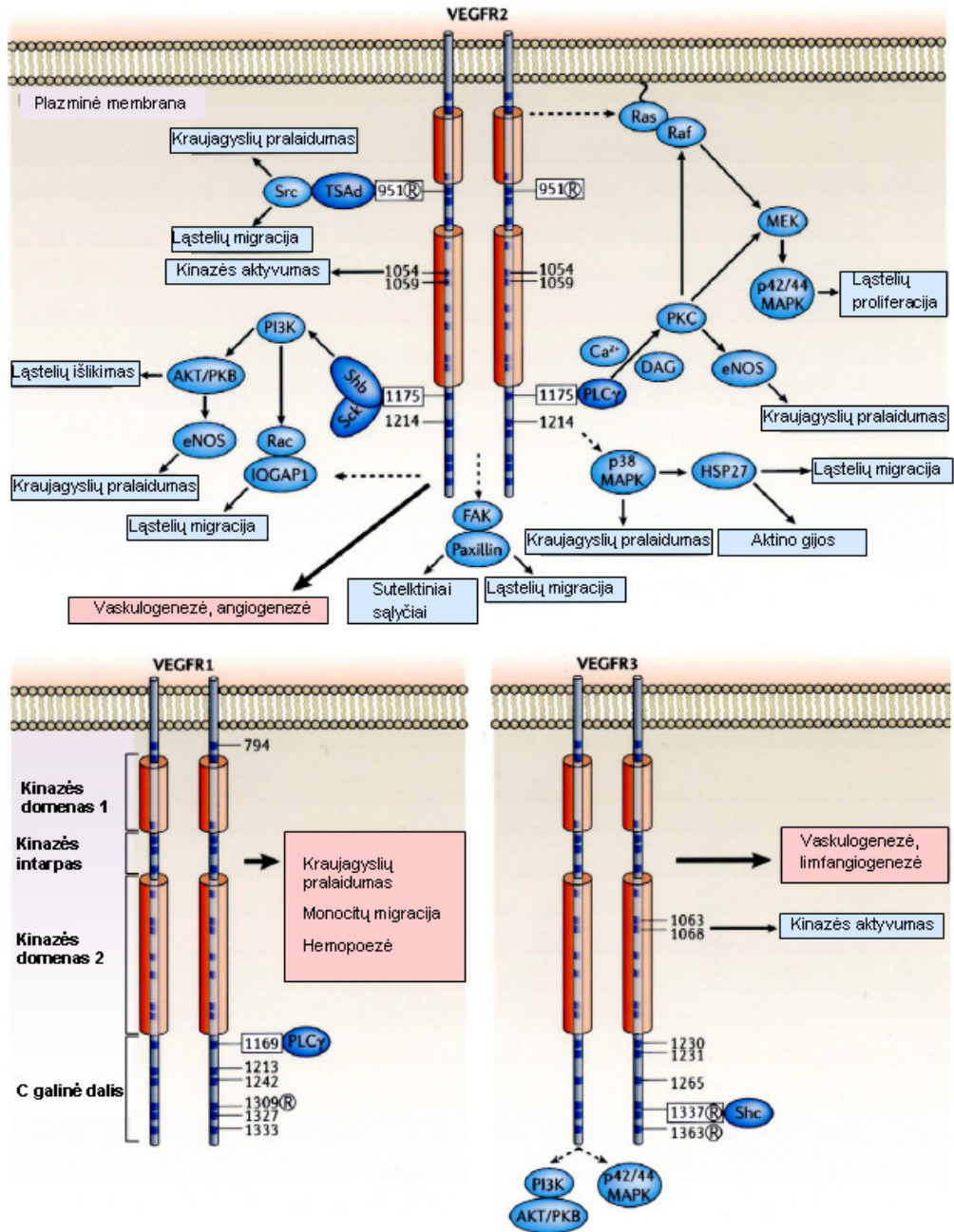
VEGFR2

Kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptorių 2 (VEGFR2), dar vadinamas Flk-1 / KDR (*Fetal liver kinase-1 / Kinase Domain-containing Receptor*), jungiasi su VEGFA mažesnės molekulinės masės izoformomis (110-165 aminorūgštys), VEGFC, VEGFD, VEGFE ir VEGFF (1.5 lent.). VEGFR2 molekulinė masė yra apie 210 kDa (Waltenberger et al., 1994). Citokino VEGFA aktyvintas receptorių skatina endotelio ląstelių migraciją, proliferaciją, išgyvenimą ir didina kraujagyslių pralaidumą (Bernatchez et al., 1999; Gille et al., 2001; Takahashi et al., 2001). Nors VEGFA yra mažiau giminingas VEGFR2 nei VEGFR1, VEGFR2 veikia kaip labai aktyvi kinazė.

VEGFA indukuoja VEGFR2 dimerizaciją, kas skatina receptoriaus autofosforilinimą ir aktyvinimą. Aktyvacijos kilpoje esančių tirozino aminorūgščių autofosforilinimas skatina fermentinį receptoriaus aktyvumą, o kitose vietose esantys fosfotirozinai jungiasi su baltymais per jų SH2 (*Src Homology 2*) ir PTB (*PhosphoTyrosine Binding*) domenų (1.5 pav.). Svarbiausios VEGFR2 fosforilinimo vietos yra Tyr1175 ir Tyr1214 (Takahashi et al., 2001). Kiti tirozinai - Tyr951, Tyr1054, Tyr1059 - taip pat fosforilinami (apžv. (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006)) (Bernatchez et al., 1999; Matsumoto et al., 2005).

Kinazinį receptoriaus aktyvumą lemia aktyvacijos kilpoje esančių Tyr1054 ir Tyr1059 fosforilinimas (Kendall et al., 1999). Fosforilintas Tyr1175 jungiasi su PLC γ ir aktyvina PLC γ /PKC/Raf/MEK/MAPK kelią, kuris inicijuoja DNR sintezę ir angiogenezę (Takahashi et al., 2001).

Pastebėta, kad citokinu VEGFA aktyvinto endotelio ląstelių receptoriaus Tyr1175 jungiasi su fosforilintu Shb pritaikymo baltymu, kuris valdo įtampos pluoštų sąranką, ląstelių migraciją ir aktyvina fosfatidilinozitolio-3 kinazę (PI3K) (Holmqvist et al., 2004). Pritaikymo baltymo TSAd sąveika su VEGFR2 fosforilintu Tyr951 skatina ląstelių migraciją (Matsumoto et al., 2005).



1.5 pav. VEGFR fosforilavimo sritys ir signalo keliai.

Skaičiai - tirozinų vieta aminorūgščių sekoje. ® žyma rodo, kad fosforilavimo sritis savita ląstelės būsenai (VEGFR2), ligandui (VEGFR1) arba heterodimerizacijai (VEGFR3). Tamsiai mėlyni taškai - tirozinų padėtys. Punktyrinė linija - neaiškus signalinio kelio mechanizmas. DAG - diacilglicerolis; EC - endotelio ląstelės; eNOS - endotelio azoto oksido sintazė; FAK - sutelktinio sąlyčio kinazė (*focal adhesion kinase*); HSP27 - šiluminio streso baltymas-27; IQGAP - GTPazė su keliais IQ baltymo motyvais; MAPK - mitogeno aktyvinama baltymų kinazė; MEK, MAPK ir ERK – tokios kinazės; PI3K - fosfatidilinozitolio 3-kinazė; PKC - baltymų kinazė C; PLC γ - fosfolipazė C- γ ; Sck - į Shc panašus pritaikymo baltymas (*Shc-related adaptor protein*); Shb - SH2 domeną turintis pritaikymo baltymas B; TSAd - T ląstelėms savitas pritaikymo baltymas (pagal (Roskoski, 2007)).

Placentos augimo veiksnys gali skatinti VEGFR1 ir VEGFR2 tarpmolekulinę sąveiką bei molekulių sąveiką VEGFR1/VEGFR2 komplekso viduje (Autiero et al., 2003). PIGF homodimeru aktyvintas VEGFR1 gali transfosforilinti VEGFR2 ir tuo būdu skatinti VEGFA valdomą angiogenezę. Endotelio ląstelėse VEGFR1 ir VEGFR2 kompleksai gali susidaryti savaime.

Šį procesą ypač skatina receptorių sąveika su ligandais. Homodimerinis PIGF neveikia VEGFR1/VEGFR2 komplekso. Tačiau, veikiant VEGFA/PIGF heterodimerams, kaip ir VEGFA homodimerams, aktyvus VEGFR1/VEGFR2 kompleksas susidaro.

Aptikta ne tik VEGFR1, bet ir VEGFR2 tirpi, laisvai difunduojanti forma (Ebos et al., 2004), tačiau fiziologinės ir galimos patologinės šio tirpaus receptoriaus funkcijos nežinomos.

VEGFR3

VEGFR3 (molekulinė masė 170 kDa) yra pagrindinis limfangiogenozės reguliatorius. Embriono stadijoje VEGFR3 būna svarbus pirminio kapiliarų tinklo persitvarkymui (Kaipainen et al., 1995).

Mutacijos kinazės domeno aktyvacijos kilpoje lemia paveldimą limfedemą (Milroy ligą); VEGFR3 yra vienintelis VEGF receptorių, kuriame aptikta natūraliai egzistuojančių mutacijų (apžv. (Olsson et al., 2006)).

Buvo tirtas citokinu VEGFC aktyvinto VEGFR3 fosforilinimas kiaulės aortos endotelio ląstelėse su padidinta VEGFR3 raiška ir žmogaus pirminėse limfagyslių endotelio ląstelėse su fiziologine VEGFR3 raiška (Dixelius et al., 2003). Nustatyta, kad buvo autofosforilinimos C galo dalies penkios tirozino aminorūgštys (1230, 1231, 1265, 1337, 1363). Fosfotirozinas1337 reikalingas sąveikai su Shc ir Grb2 baltymais, kurie toliau gali aktyvinti MAP kinazių signalą. Pirminėse limfinio endotelio ląstelėse VEGFC skatino VEGFR2/VEGFR3 kompleksų su nefosforilintais Tyr1337 ir Tyr1363 susidarymą. Šie rezultatai rodo, kad dviejų receptorių sąveika gali keisti fosforilinimo ir signalo perdavimo pobūdį.

Priešingai, citokiniais VEGFA, VEGFC, VEGFD aktyvinto VEGFR3 fosforilinimo tyrimai žmogaus HEK293T ląstelėse su VEGFR2 ir / arba VEGFR3 parodė, kad šie citokinai neindukuoja VEGFR3 fosforilinimo. Šiose ląstelėse VEGFC ir VEGFA taip pat skatina VEGFR2/VEGFR3 kompleksų susidarymą (Alam et al., 2004).

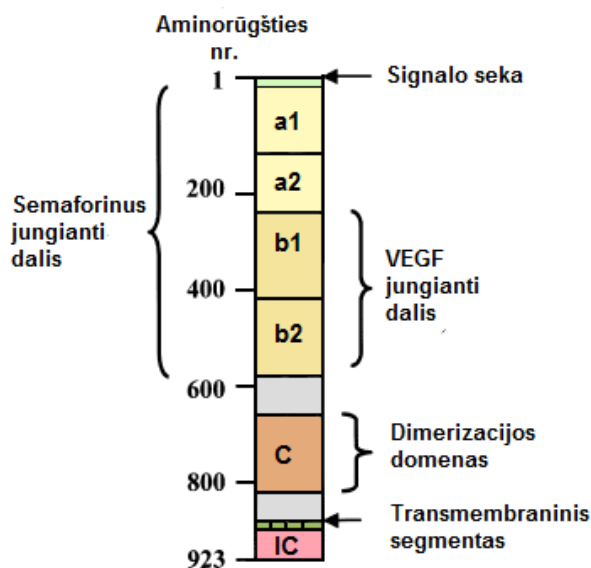
1.3.4 VEGF ko-receptoriai: neuropilinas-1 ir neuropilinas-2

Neuropilinais yra 120-140 kDa molekulinės masės glikoproteinai (Chen et al., 2000). Tai transmembraniniai koreceptoriai be kinazinio aktyvumo. Juos sudaro didelis užląstelinis sandas, transmembraninis segmentas, ir trumpa (apie 40 aminorūgščių) citozolinė dalis (Mamluk et al., 2002). Pastarasis domenai per trumpas, kad turėtų katalizinį aktyvumą, bet jis galėtų jungtis su kitomis signalinėmis molekulėmis. Neuropilino sandara ir funkciniai sandai parodyti 1.6 pav. Šių koreceptorių veikimo pobūdis labai neįprastas, nes jie jungiasi su dviejų skirtingų šeimų ligandais (kraujagyslių endotelio augimo veiksniais ir semaforiniais) ir su dviejų skirtingų klasių receptoriais (VEGF receptoriais ir pleksiniais).

Semaforinai yra glikoproteinai, kurie per pleksinus reguliuoja neurogenezę (apžv. (Roskoski, 2007)). Neuropilinus gamina neuronai (Takahashi et al., 1998), endotelio (HUVEC) (apžv. (Bielenberg et al., 2006)) ir kitų tipų ląstelės (kaulų čiulpų fibroblastai ir adipocitai, dendritinės ląstelės, osteoblastai) (apžv. (Ellis, 2006)).

VEGFA-165, PIGF-152 ir abi VEGFB izoformos jungiasi su neuropilinu-1 (Makinen et al., 1999; Migdal et al., 1998). VEGFA-145, VEGFA-165, PIGF-152 jungiasi su neuropilinu-2 (Gluzman-Poltorak et al., 2000; Karkkainen et al., 2001). VEGFC ir VEGFD jungiasi su abiem koreceptoriais (Karpanen et al., 2006). VEGFA-121 nesijungia su šiais koreceptoriais.

Parodyta, kad neuropilinas-2 yra svarbus endotelio ląstelių atsakui į VEGFA ir VEGFC poveikį. Šiose ląstelėse abu citokinai skatina VEGFR2 ir Np-2 kompleksų susidarymą, kas siejasi su VEGFR2 autofosforilinimo laipsniu.



1.6 pav. Neuropilinų-1 ir -2 struktūra.

Pavaizduoti a1, a2, b1, b2 ir c užląsteliniai domenai. IC (*intracellular segment*) - citozolyje esantis segmentas (pagal (Roskoski, 2007)).

Be to, neuropilino-2 raišką mažinanti siRNR slopina VEGFA ir VEGFC indukuotą ląstelių judėjimą (Favier et al., 2006).

Taip pat žinoma, kad *in vitro* gali susidaryti Np-1/VEGFR1, Np-2/VEGFR1, Np-2/VEGFR2 ir Np-2/VEGFR3 kompleksai (apžv. (Ellis, 2006)) (Favier et al., 2006; Karpanen et al., 2006), tačiau neaišku, ar šie kompleksai susidaro fiziologinėmis sąlygomis ir naviko genėzės metu.

Tyrimai rodo, kad neuropilinai labai svarbūs naviko augimui (apžv. (Bielenberg et al., 2006; Ellis, 2006)). Kelių tipų navikuose neuropilinai betarpiškai skatina jų augimą arba indukuoja angiogenezę. Žiurkės prostatos karcinomos AT2.1 ląstelėse Np-1 skatina navikų augimą ir angiogenezę (Miao et al., 2000). Žmogaus krūties vėžio MDA-MB-231 ląstelėse, kurios negamina VEGFR1 ir VEGFR2, bet gamina Np-1, VEGFA veikia kaip ląstelių išgyvenimą skatinantis veiksnys; gi neuropilino-1 slopinimas peptidu, atitinkančiu VEGFA-165 7-to egzono koduojamą seką, sukelia ląstelių apoptozę (Barr et al., 2005). Be to, semaforinas-3B slopina naviko augimą ir sukelia MDA-MB-231 ląstelių apoptozę, o VEGFA-165, bet ne VEGFA-121,

panaikina semaforino-3B poveikį (Castro-Rivera et al., 2004). Taip pat, Np-1 ir Np-2 yra svarbūs VEGFA-165 valdomam žmogaus krūties vėžio ląstelių (MCF7 ir C100, atitinkamai) judėjimui (Nasarre et al., 2003).

Aptikta Np-1, kaip ir VEGFR1 bei VEGFR2, tirpi, laisvai difunduojanti forma, turinti ligandą prijungiančius a1a2 ir b1b2 domenus (Gagnon et al., 2000). Manoma, kad tirpus Np-1 jungiasi su VEGFA ir slopina šio citokino signalą, tačiau tikslus šio receptoriaus veikimo mechanizmas nėra aiškus.

1.4 Interleukino-1 šeimos baltymai

Žinoma apie 20 baltymų, kurie sudaro interleukino-1 (IL-1) ligandų ir receptorių šeimą. Ligandai yra pleiotropiniai citokinai, kurie valdo uždegimo ir imuninį atsakus, reguliuoja organizmo homeostazę ir yra svarbūs ligų patogenezei. Padidėjusi šių baltymų biosintezė lemia ūmias ir chroniškas uždegimines ligas bei skatina atsirasti navikus.

IL-1 šeimos citokinai valdo procesus, susijusius su ląstelių piktybėjimu. Viena vertus, jie gali skatinti naviko augimą, plitimą ir metastazavimą, kita vertus, jie gali aktyvinti imuninį organizmo atsaką, slopinti naviko augimą. Naviko audiniuose IL-1 šeimos citokinų biosintezė vyksta tiek stromos, tiek ir vėžinėse ląstelėse.

1984 m. nustatytos žmogaus ir pelės IL-1 šeimos baltymų aminorūgščių sekos (Auron et al., 1984; Lomedico et al., 1984). Pasirodė, kad žmogaus ir pelės baltymai yra ~80% homologiški (Telford et al., 1986).

1.4.1 Interleukino-1 šeimos citokinai

IL-1 šeimai priklauso mažiausiai 11 citokinų (1.6 lent.). Jų genai lokalizuoti žmogaus 2 chromosomos ilgojo peties (2q) viename lokuse. Keturi citokinai (IL-1 α , IL-1 β , IL-18 ir IL-1Ra) plačiai tiriami. Kitų šešių baltymų raiška nustatyta įvairiuose žmogaus audiniuose, bet jų funkcijos nėra aiškios. Citokinai IL-18 ir IL-33 neseniai buvo priskirti šiai šeimai.

Citokinai IL-1 α ir IL-1 β yra heterodimerinio receptoriaus ligandai. Jų receptorius yra sudarytas iš I tipo IL-1 receptoriaus (IL-1R1) ir papildomo baltymo AcP (IL-1R3) (Greenfeder et al., 1995).

1.6 lentelė. IL-1 šeimos citokinai (Dinarello, 2003; Dinarello, 2009). Naujajame pavadinime „IL-1F“ reiškia, kad baltymas priklauso IL-1 šeimai arba yra į ją panašus

Senieji pavadinimai	Naujieji pavadinimai	Veikimo būdas
IL-1 α	IL-1F1	Agonistas
IL-1 β	IL-1F2	Agonistas
IL-1Ra	IL-1F3	Antagonistas
IL-18; IFN γ indukuojantis veiksnys	IL-1F4	Agonistas
IL-1Hy1, FIL1 δ , IL-1H3, IL-1RP3, IL-1L1, IL-1 δ	IL-1F5	Agonistas
FIL-1 ϵ , IL-1 ϵ ,	IL-1F6	Agonistas
FIL-1 ζ , IL-1H4, IL-1RP1	IL-1F7	Agonistas
FIL-1h, IL-1H2	IL-1F8	Agonistas
IL-1H1, IL-1RP2	IL-1F9	Agonistas
IL-1Hy2, FKSG75	IL-1F10	Antagonistas
IL-33	IL-1F11	Agonistas

Kitas šio receptoriaus ligandas – IL-1 receptoriaus antagonistas (IL-1Ra) – konkuruoja su IL-1 α ir IL-1 β dėl jungimosi prie IL-1R1. Komplexas IL-1R1/IL-1Ra neaktyvina signalo perdavimo (Eisenberg et al., 1991).

Citokinas IL-18, kitas IL-1 šeimos atstovas, jungiasi su IL-18 receptoriumi IL-R5 ir dalyvauja uždegimo procesuose (Born et al., 1998; Dinarello, 1999). Šiai sistemai svarbus yra baltymas IL-18bp (*IL-18-binding protein*). Jis veikia kaip antagonistas - neleidžia IL-18 jungtis su receptoriumi ir tokiu būdu slopina jo funkcijas (Novick et al., 1999). IL-18bp nepriklauso IL-1 šeimai, o jo veikimo mechanizmas yra kitoks negu IL-1Ra.

IL-1 šeimai priskirti dar šeši baltymai, pavadinti nuo IL-1F5 iki IL-1F10. Pastarųjų baltymų ir IL-1Ra aminorūgščių sekos yra labai homologiškos, o egzonų ir intronų struktūra rodo, kad šie citokinai galėtų būti IL-1Ra geno duplikacijos rezultatas. IL-1F10 aminorūgščių seka 37% atitinka IL-1Ra seką, šių baltymų tretinės struktūros labai panašios (Lin et al., 2001). IL-1F5 ir -1F10 molekulės labiausiai panašios į IL-1Ra (Lin et al., 2001). Apskritai, IL-1F5 - IL-1F10 citokinų veikimo būdas – agonistinis ar antagonistinis – nėra visiškai aiškus ir griežtai apibrėžtas. Pastebėta, kad IL-1F5 nepasižymi nei IL-1 būdinga agonisto savybe, nei IL-1Ra būdinga antagonisto savybe (Barton et al., 2000). IL-1F7 jungiasi su IL-18 receptoriumi, bet neindukuoja IFN γ biosintezės kraujo ir kitose ląstelėse, kas būdinga IL-18 baltymui (Pan et al., 2001). IL-1F10 jungiasi su IL-1R1 ir, manoma, kad šis citokinas galėtų veikti kaip I tipo IL-1R antagonistas.

Toliau apžvelgsime mūsų tyrimams svarbiausius citokinus IL-1 α , IL-1 β ir IL-1Ra, kurių vaidmuo navikų genezėje plačiai tiriamas.

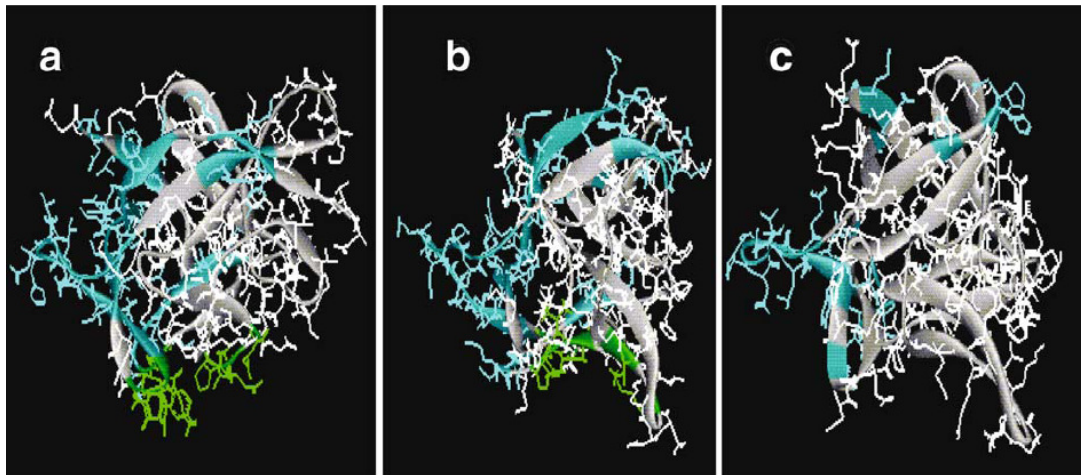
IL-1 α , IL-1 β ir IL-1Ra sąrangos ypatybės

Citokinai IL-1 α ir IL-1 β yra atskirų genų produktai. Jų aminorūgščių sekas sieja tik 20-30 % homologija, bet tretinės struktūros labai panašios (žiūr. žemiau). Citokinų IL-1 α ir IL-1 β pirmtakai (proIL-1 α ir proIL-1 β) sintetinami kaip 31 kDa glikoproteinai be signalo sekos. Proteolizės metu susidaro 17 kDa sekretuojami baltymai. (Dinarello, 1996).

Žmogaus ląstelėse vyksta keturių IL-1Ra geno produktų biosintezė: viena sekretuojamoji 17 kDa forma (sIL-1Ra) su signalo seka, ir trys viduląstelinės izoformos (icIL-1Ra1, icIL-1Ra2 ir icIL-1Ra3) (Arend and Guthridge, 2000). Pastarosios susidaro dėl alternatyvaus iRNR splaisingo (icIL-1Ra1) ir alternatyvios transliacijos iniciacijos (icIL-1Ra3) (apžv. (Arend and Guthridge, 2000)).

IL-1 α , IL-1 β ir IL-1Ra, kaip ir kitų IL-1F baltymų, tretinės struktūros panašios: kiekvienas citokinas formuoja statinę iš 12 β juostų (1.7 pav.). Kryptingos mutagenozės metodu parodyta, kad β statinės šoninėje pusėje esanti visų IL-1 baltymų sąveikos su receptoriais sritis yra struktūriškai ir funkciškai homologiška. Cheminė šios srities prigimtis labai svarbi ligando ir receptoriaus sąveikos stiprumui. Citokinai IL-1 α ir IL-1 β turi du sąveikos su IL-1R1 receptoriais paviršius: statinės viršuje ir šone. IL-1 α statinės viršuje esanti sritis panaši, bet ne identiška IL-1 β sričiai. IL-1Ra neturi statinės viršuje esančios sąveikos su receptoriais srities, todėl negali aktyvinti signalo perdavimo (Evans et al., 1995).

Parodyta, kad citokinai IL-1 α ir IL-1 β gali jungtis su skirtingomis oligosacharidų struktūromis: IL-1 α jungiasi su jam savitu N-glikanu, pasibaigiančiu sialo rūgštimi, o IL-1 β jungiasi su jam savitu gangliozidu GM₄ (Cebo et al., 2001). Metodais *in silico* nustatyta, kad spėjamos citokinų IL-1 α



1.7 pav. IL-1 α (a), IL-1 β (b) ir IL-1Ra (c) tretinių struktūrų lyginimasis vaizdas (Vergoten and Zanetta, 2007).

Molekulių sąveikos su IL-1R1 sritys yra šviesiai mėlynos spalvos. Statinės viršuje esančią sąveikos su receptoriumi sritį sudaro šios aminorūgštys: **IL-1 β** - Arg4, Leu6, Phe46, Ile56, Lys92, Lys93, Lys103, Glu105; **IL-1 α** - Arg16, Ile18, Asp64, Asp65, Ile68, Lys100, Asn108, Trp113, Gly117, Gln136; šioms aminorūgštims homologiškos **IL-1Ra** aminorūgštys sąveikoje su receptoriumi nedalyvauja. Statinės šone esančią sąveikos su receptoriumi sritį sudaro šios svarbiausios aminorūgštys: **IL-1 β** - Gln15, **IL-1 α** - Asn99, **IL-1Ra** - Gln20; kitos svarbios aminorūgštys yra 1) **IL-1 β** His30 ir **IL-1Ra** Tyr34, homologiškos **IL-1 α** Ala44, ir 2) **IL-1 β** Gln32 bei **IL-1Ra** Gln36, homologiškos **IL-1 α** His46 (Evans et al., 1995) (neparodyta). Spėjami sąveikos su angliavandeniais domenai CRD yra molekulių apatinės dalies įduboje ir pažymėti žaliai. Nustatyta metodu *in silico*: tarp **IL-1 α** CRD aminorūgščių ir savito glikoproteino ligando susidaro vandenilinės jungtys (Gln38, Tyr39, Asp85, Asp87, Gln88, Trp139) ir van der Waalso sąveika (Tyr39, Pro89, Tyr138, Trp139); tarp **IL-1 β** CRD aminorūgščių ir savito lipoproteino ligando susidaro vandenilinės jungtys (Thr137, Ser123, Ser125, Leu134, Asp142) ir van der Waalso sąveika (Pro131, Phe133, Trp120) (neparodyta); IL-1Ra taip pat turi įdubą toje pačioje srityje, bet ji negali jungtis su oligosacharidais (Vergoten and Zanetta, 2007).

ir IL-1 β sritys, sudarančios sąveikos su angliavandeniais domeną (CRD), sutampa ir yra šalia sąveikos su receptoriumi srities; IL-1Ra neturi CRD (1.7 pav.). Siūloma, kad dėl šių priežasčių IL-1Ra/IL-1R1 kompleksas negali jungtis su kitais signalų perduodančiais kompleksais, o IL-1 α , -1 β /IL-1R1 kompleksas gali jungtis su kitais signalų perduodančiais kompleksais, kurie turi šiems citokinams savitus oligosacharidų ligandus (Vergoten and Zanetta, 2007).

Ši hipotezė taip pat galėtų paaiškinti tai, kad IL-1 α ir IL-1 β aktyvina tik šiems citokinams savitų ląstelių atsaką, pvz., IL-1 β , bet ne IL-1 α , gali aktyvinti

astrocitus. Žinoma, kad astrocitai yra vienintelės CNS ląstelės, turinčios IL-1R1 ir GM₄ glikolipidą (apžv. (Vergoten and Zanetta, 2007)).

Citokinių IL-1 α ir IL-1 β sekrecija

Ląstelių atsako į mikroorganizmų ir jų produktų, citokinių, pažeistų audinių produktų ir kitų aplinkos veiksnių poveikį metu aktyvinama citokinių biosintezė ir sekrecija. Monocitai sekretuoja daug IL-1 α ir IL-1 β , tuo tarpu nefagocituojančios ląstelės –labai nedaug, iš esmės tik IL-1 β . Kadangi ląstelės, net aktyvinti monocitai, sekretuoja labai mažus IL-1 α kiekius, sunku sekti šio citokino raišką audinių skysčiuose (apžv. (Apte and Voronov, 2008)).

Citokinai IL-1 neturi signalo sekos, todėl negali būti sekretuojami ET ir GK keliu. sIL-1Ra turi signalo seką ir gali būti sekretuojamas klasikiniu keliu. Tačiau, keratinocitai, ir kitos epitelio ląstelės, gali sekretuoti icIL1RaI izoformą kol kas nežinomu sekrecijos keliu (apžv. (Arend and Guthridge, 2000)).

Įdomu, kad apoptozės peptidazė kaspazė 1 skaido ląstelės viduje esantį neaktyvų proIL-1 β baltymą (taip pat IL-18 ir IL-33), dėl ko susidaro sekretuojama 17 kDa IL-1 β aktyvi forma (apžv. (Dinarello, 2002)). Taigi, priklausomai nuo dirgiklio, kaspazė 1 gali sukelti citokinių sekreciją ir uždegimą arba, priešingai, apoptozę.

Neaišku, koku būdu sekretuojamosios IL-1 β , IL-18 ir IL-33 baltymų formos patenka iš citozolio į užląstelinę aplinką. Manoma, kad mikropūslelės galėtų lemti IL-1 β sekreciją. Infilamosomos taip pat gali būti svarbios sekrecijai, nes IL-1 β išmetimas iš ląstelės susijęs su kaspazės 1 aktyvinimu. IL-1 β sekrecija nėra naši, ir dauguma citokino molekulių lieka citozolyje. Sekrecijai reikalingas papildomas signalas. Parodyta, kad K⁺ koncentraciją mažinantys ir jo išnašą iš ląstelės skatinantys veiksniai sukelia IL-1 β sekreciją. Parodyta, kad vienas iš ATP receptorių, P2X-7R, dalyvauja IL-1 β sekrecijoje. Veikiant ATP, membranoje atsidaro pora, ir K⁺ išeina iš ląstelės. Dėl to laikinai sumažėja membranos elektros įtampa, ir IL-1 β gali būti išmestas iš ląstelės. Pastebėta, kad atsako į stresą metu ląstelės išleidžia į aplinką viduląstelinius

nukleotidus, dažniausiai ATP, kurie per makrofagų ir kitų ląstelių P2X-7R receptorių veikia kaip pavojaus signalas. Šis signalas gali sukelti uždegimą ir IL-1 β sekreciją (apžv. (Apte and Voronov, 2008; Ferrari et al., 2006)).

IL-1 α sekrecija yra mažiau tyrinėta. Kalpainas (Ca²⁺ valdoma peptidazė) skaido ląstelės viduje esantį proIL-1 α baltymą, dėl ko susidaro sekretuojamoji 17 kDa IL-1 α forma ir 17 kDa prodalelė IL-1-NTP (*IL-1 α N-terminal peptide*). Latentinė kalpaino forma aktyvinama uždegimo metu, tačiau daugelis ląstelių turi kalpaino slopiklių, todėl negali sekretuoti citokino IL-1 α . Parodyta, kad IL-1 α sekrecija vyksta dalyvaujant P2X-7R sistemai, tačiau neaišku, ar tai pagrindinis sekrecijos kelias.

„Membraninio“ IL-1 α savybės

Parodyta, kad ląstelėse vyksta biologiškai aktyvaus „membraninio“ IL-1 α (23 kDa) biosintezė (Kaplanski et al., 1994; Kurt-Jones et al., 1985). proIL-1 α neturi hidrofobinės sekos, tačiau su membrana šis citokinas gali jungtis dėl įvairių potransliacinių modifikacijų: miristoilinimo (Stevenson et al., 1993) ar palmitoilinimo (Bakouche et al., 1991).

Pastebėta, kad dviejų proangiogeninių citokinių, FGF1 ir IL-1 α , pernašoje per plazminę membraną dalyvauja nuo vario jonų priklausomas baltymų kompleksas, kuris jungiasi prie rūgštinių fosfolipidų vidinėje membranos pusėje. Pastarieji perverčiami į kitą membranos pusę, ir tokiu būdu citokinai atsiduria išorinėje plazminės membranos pusėje (Prudovsky et al., 2008).

Ląstelės viduje esančio IL-1 α savybės

Kaip jau minėta, proIL-1 α neturi signalo sekos, todėl po transliacijos lieka citozolyje. Imunohistocheminiu metodu parodyta, kad endotoksinu aktyvintuose monocituose proIL-1 α yra pasklidęs citozolyje, o signalo seką turintis IL-1Ra kaupiasi Goldžio komplekse (Andersson et al., 1992).

proIL-1 α baltymo proteolizės metu susidariusi prodalelė IL-1-NTP turi kreipimo į branduolį seką. Parodyta, kad žinduolių ląstelių branduolyje esantis

IL-1-NTP gali veikti kaip transkripciją aktyvinantis veiksnys (Buryškova et al., 2004), skatinti ląstelių proliferaciją (Hu et al., 2003) ir piktybęją (Stevenson et al., 1997).

1.4.2 Interleukino-1 šeimos receptoriai

IL-1 šeimą sudaro mažiausiai devyni receptoriai (1.7 lent.). Žinoma, kad IL-1R1, IL-1R2, IL-1R5 ir IL-1R7 genai lokalizuoti 2 chromosomos ilgojo peties 12 lokuse, 2q12. IL-1R3 baltymą koduojantis genas yra 3 chromosomos ilgojo peties 28 lokuse, 3q28 (Subramaniam et al., 2004).

1.7 lentelė. IL-1 šeimos receptoriai (Dinarello, 2003; Dinarello, 2009)

Ankstesni pavadinimai	Nauji pavadinimai	Ligandai	Koreceptoriai
IL-1RI	IL-1R1	IL-1 α , IL-1 β ir IL-1Ra	IL-1R AcP (IL-1R3)
IL-1RII	IL-1R2	IL-1 α , IL-1 β ir IL-1Ra	IL-1R AcP (IL-1R3)
ST2/Fit-1	IL-1R4	IL-33	IL-1R AcP (IL-1R3)
IL-18R α /IL-1Rrp1	IL-1R5	IL-18	IL-1R18 β (IL-1R7)
IL-1Rrp2	IL-1R6	IL-1 ϵ , IL-1 δ	IL-1R AcP (IL-1R3)
TIGIRR-2/IL-1RAPL	IL-1R8	nežinoma	nežinoma
TIGIRR-1	IL-1R9	nežinoma	nežinoma

Citokinių IL-1 α , IL-1 β ir IL-1Ra receptoriai yra IL-1R1 ir IL-1R2 (Subramaniam et al., 2004). IL-1 citokinai stipriau jungiasi prie IL-1R1 nei prie IL-1R2. IL-1R1 biosintezė vyksta T limfocituose, fibroblastuose, keratinocituose, endotelio ląstelėse, hepatocituose. IL-1R2 stipriau jungiasi su IL-1 β nei su IL-1 α , ir silpnai jungiasi su IL-1Ra. Šio receptoriaus biosintezė ryškiausiai vyksta neutrofiluose, monocituose, makrofaguose, B limfocituose, kaulų čiulpų ląstelėse. Tirpi IL-1R2 forma taip pat jungiasi su proIL-1 β ir slopina šio citokino proteolizę ir aktyvinimą (Pietrzak et al., 2008).

Neseniai nustatyta, kad citokinas IL-33 indukuoja uždegimą ir imuninį atsaką per IL-1R4 receptorių (apžv. (Liew et al.)). Manoma, kad IL-1F6 yra IL-1R6 agonistas, o IL-1F5 – jo antagonistas. IL-1R5 ir IL-1R7 sudaro veiksmingą IL-18 receptorių (Born et al., 1998). IL-1R8 ir IL-1R9 (IL-1R3 ir IL-1R7 homologai) – vieninteliai receptoriai, kurių genai yra lokalizuoti X chromosomoje (apžv. (Dinarello, 2003)).

IL-1R1

I tipo IL-1 receptorius yra 80 kDa molekulinės masės baltymas. IL-1R1, kaip ir daugelio kitų IL-1 receptorių, užląstelinį segmentą sudaro trys Ig tipo domenai. Citoplazminis šio receptoriaus segmentas yra ypatingas - jis turi Toll homologišką domeną, svarbų signalo perdavimui (Heguy et al., 1992). Šis domenas būdingas Toll tipo receptoriams (TLR). Pastarieji žinduolių ląstelėse perduoda mikroorganizmų endotoksinų ir kitų produktų aktyvintą signalą (apžv. (Dinarello, 2003)). Kai IL-1 prisijungia prie IL-1R1, tada IL-1/IL-1R1 kompleksas jungiasi su IL-1R3 (Greenfeder et al., 1995). Šių receptorių užląstelinių ir viduląstelinių segmentų, kaip ir Toll tipo domeno, sekos homologiškos. IL-1 ligandas sukelia IL-1R1 konformacinius pokyčius, dėl ko IL-1R3 gali jungtis prie IL-1R1 (Casadio et al., 2001). Taigi, toks kompleksas sukelia IL-1 signalą, kuris prasideda IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*) aktyvinimu ir galiausiai baigiasi branduolyje, kur aktyvinama genų raiška per branduolio veiksnį (NF)-κB. Tokiu būdu, įvairios dėl streso susidariusios signalinės molekulės, toksinai, pažeistų audinių produktai jungiasi su makrofagų ir kitų įgimtojo imuniteto ląstelių TLR. Taip pradedamas signalas, aktyvinantis organizmo įgimtąjį imuninį atsaką, kuris toliau skatina savitąjį imunitetą (apžv. (Apte and Voronov, 2008)).

IL-1R2

II tipo IL-1 receptorius yra 68 kDa molekulinės masės baltymas. IL-1R2, kaip ir IL-1R1, užląstelinį segmentą sudaro trys Ig tipo domenai. Citoplazminis šio receptoriaus segmentas yra trumpas, neturi Toll homologiško domeno ir negali inicijuoti signalo (McMahan et al., 1991). Pelės, kaip ir žmogaus, ląstelių receptoriaus citoplazminį segmentą sudaro tik 29 aminorūgštys (Bristulf et al., 1994), ir jis negali perduoti signalo.

Manoma, kad pagrindinė IL-1R2 funkcija yra nuslopinti IL-1β aktyvumą. Citokino IL-1β giminingumas šiam receptoriui yra didelis ($K_{dis} = 1-5 \cdot 10^{-10}$ M), lyginant su IL-1α ir IL-1Ra: IL-1α sąryšio su IL-1R2 $K_{dis} = 1-3 \cdot 10^{-8}$ M. Tuo tarpu prie IL-1R1 receptoriaus IL-1α jungiasi 100 kartų stipriau (K_{dis}

= 2-3 10^{-10} M). Įdomu, kad IL-1 β sąveika su IL-1R2 praktiškai negrįžtama, nes komplekso disociacijos greitis yra 2 valandos (apžv. (Dinarello, 2003)).

Parodyta, kad IL-1R2 sudaro trimerinį kompleksą su IL-1 β ir IL-1R3. Šis mechanizmas padeda slopinti IL-1R1 aktyvumą (Lang et al., 1998).

1.4.3 Citokinų IL-1 α ir IL-1 β panašumai ir skirtumai

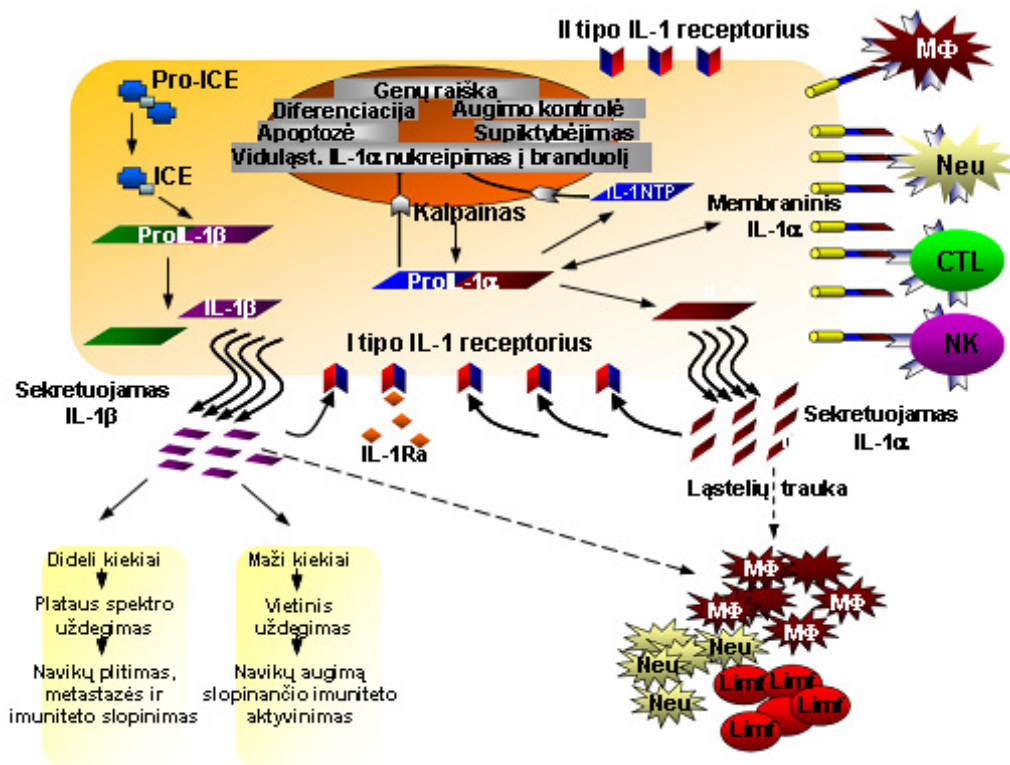
Dažnai IL-1 α ir IL-1 β molekulės yra tapatinamos, nes jungiasi prie tų pačių receptorių ir todėl manoma, kad ir jų biologinės funkcijos yra panašios. Šių citokinų raiškos ir biologinio aktyvumo pabūdis nėra visiškai suprastas, bet plačiai tiriamas. Daugelis tyrimų rodo, kad visgi IL-1 α ir IL-1 β savybės skiriasi (apžv. (Dinarello, 1996; Dinarello, 2009)).

Kitaip negu IL-1 α , IL-1 β raiška ir sekrecija yra griežtai valdoma transkripcijos, transliacijos, baltymo brendimo ir sekrecijos lygiais. Be to, IL-1 β biosintezė ir sekrecija vyksta tik uždegimo metu. IL-1 α biosintezė vyksta konstitutyviai, pavyzdžiui, epitelio ląstelėse (Cooper et al., 1990), ir padidėja uždegimo metu. Paprastai IL-1 α registruojamas tik ląstelėse ar prisijungęs prie jų paviršiaus, išskyrus tuos atvejus, kai šis citokinas išeina iš žūstančių ląstelių stipraus uždegimo metu (apžv. (Dinarello, 1996)).

Parodyta, kad įvairiuose audiniuose, įvairiomis fiziologinėmis sąlygomis bei uždegimo metu IL-1 α ir IL-1 β raiška yra skirtinga (Hacham et al., 2000; Hacham et al., 2002). Tai galėtų reikšti, kad šių citokinų fiziologinės funkcijos yra skirtingos.

Ryškiai skiriasi IL-1 α ir IL-1 β aktyvumas ląstelėje. IL-1 β tik sekretuojamoji forma yra aktyvi, o citozolinis pirmtakas yra neaktyvus ir nėra „membraninės“ šio citokino formos. IL-1 α „membraninė“ forma ir citozolinis pirmtakas yra aktyvūs baltymai, bet šis citokinas retai sekretuojamas.

Manoma, kad IL-1 molekulių lokalizacija ląstelėse ir mikroaplinka lemia jų biologines funkcijas homeostazės ir vėžinių procesų metu (1.8 pav.).



1.8 pav. Citokinių IL-1 veikla naviko ląstelėse (vėžinėse, stromos, pritrauktuose leukocituose) ir jų reikšmė imuniniam atsakui (pagal - (Apte and Voronov, 2008)).

Mφ, makrofagai; Neu, neutrofilai; CTL, citotoksiniai T limfocitai; NK, NK (*natural killer*) ląstelės; Limf, limfocitai.

„Membraninis“ IL-1α skatina imuninį atsaką, o citozolinis proIL-1α valdo ląstelių genų raišką, proliferaciją, diferenciaciją ir kitus vyksmus. Sekretuojamo IL-1, daugiausia IL-1β, maži kiekiai indukuoja vietinį uždegimą, o dideli kiekiai indukuoja plačiai paplitusį uždegimą, siejamą su audinių pažaidomis ir naviko plitimu.

IL-1α ir IL-1β raiškos ir funkcijų tyrimai normaliose ir vėžinėse ląstelėse bei įvairiuose ląstelių piktybėjimo proceso etapuose yra bekrastis kelias navikų imunoterapijos optimizacijos link (Apte and Voronov, 2008).

1.5 PDT derinimas su imunoterapija

PDT sukeltas imuninio atsako postūmis labai svarbus naviko augimui ir plitimui. PDT gali slopinti (Matthews and Damian, 2009) arba skatinanti (Gollnick et al., 2006) imuninį atsaką, todėl manoma, kad imunoterapija galėtų žymiai padidinti PDT veiksmingumą. Imunoterapijos esmė – organizmas imunizuojamas medžiagomis (pvz., vakcinomis ar citokiniais), sukeliančiomis

imunines reakcijas prieš naviką, arba į organizmą įvedamos imuniniu aktyvumu pasižyminčios ir tokiu būdu naviko augimą slopinančios medžiagos (pvz., monokloniniai antikūnai). Ikiklinikiniai ir klinikiniai tyrimai rodo, kad šis gydymo būdas gali būti sėkmingai pritaikytas navikų terapijai (Matar et al., 2009; Rapidis and Wolf, 2009).

Viena iš naviko atsinaujinimo priežasčių, dažnai siejamų su uždegiminiu atsaku, gali būti PDT poveikio stimuliuojama angiogenezė. Todėl gali būti naudinga PDT derinti su šio proceso slopikliais (Eichholz et al., 2010). Dviejų angiogeninių veiksnių – VEGFA ir COX-2 – slopiklių ir PDT derinių perspektyvumas navikų gydymui yra plačiausiai tiriamas.

Nustatytas *in vivo* PDT ir monokloninių antikūnų prieš VEGFR1 ir VEGFR2 (Jiang et al., 2008), monokloninio antikūno avastino prieš VEGFA (Ferrario and Gomer, 2006) derinių veiksmingumas. Parodyta, kad avastino ir PDT su hipericinu derinys slopina ne tik VEGFA, bet ir kitų angiogeninių baltymų (angiogenino, bFGF, EGF, IL-6 ir IL-8), raišką ir padidina šlapimo pūslės navikų jautrumą PDT (Bhuvaneswari et al., 2007b). Taip pat *in vivo* parodyta, kad PDT veiksmingumą galima didinti derinant ją su COX-2 slopikliais (Ferrario et al., 2002). Nuslopinus pastarąjį fermentą, PDT veiktuose navikuose sumažėja ir kitų proangiogeninių veiksnių (HIF-1 α , VEGFA, IL-1 β ir TNF- α) raiška (Ferrario et al., 2005; Yee et al., 2005). Klinikiniai tyrimai patvirtina PDT ir avastino derinio perspektyvumą akių kraujagyslių ligų gydymui (Lazic and Gabric, 2007; Sagong et al., 2009), PDT ir imunomodulatoriaus imikvimodo perspektyvumą ikivėžinių ir vėžinių odos susirgimų gydymui (Winters et al., 2008) (apžvelgta (Nikkels et al., 2005).

Imunoterapijos derinimas su PDT teikia daug vilčių kaip veiksmingas vėžio gydymo būdas, tačiau šio derinio naudojimas vis dar yra eksperimentinis (Park et al., 2008). Be to, vieno ar poros signalų blokavimas gali būti neveiksmingas, nes daugybė kelių reguliuoja naviko ląstelių migraciją ir proliferaciją. Todėl, perspektyvia terapine strategija siekiant visiškai sunaikinti naviką galėtų būti netoksiška kombinuota terapija, nutaikyta į daugelį signalų.

Kaip jau minėta, esame pastebėję, kad PDT su mTHPC reikšmingai didina proangiogeninio VEGFA ir prouždegiminio IL-1 α raišką A-431 ląstelėse. Šių citokinų įtaka naviko augimui nėra visiškai suprasta, bet apžvelgtų tyrimų rezultatai pasiūlė prielaidą, kad šie citokinai yra palankūs naviko augimui. Todėl šiame darbe tyrėme VEGFA ir IL-1 α raišką po fotodinaminio poveikio įvairiose ląstelėse *in vitro* ir *in vivo* bei siekėme įvertinti, kaip šių citokinų raiškos slopinimas antikūnais veikia eksperimentinių gyvūnų navikų fotodinaminio gydymo veiksmingumą.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

Darbe naudoti reagentai, ląstelių auginimo terpės, jų priedai pirkti iš Sigma, jei nepamėta kitaip.

2.1.1 Citostatikai

Darbe naudotos citostatikų vaistinės formos. Doksorubicino hidrochloridas – 2 mg/ml (Ebewe Arzneimittel, Austrija); taksoteras (taxotere®) – 40 mg/ml (Rhone-Poulenc Rorer, Prancūzija). Tirpalai laikomi steriliai 4°C temperatūroje. Eksperimentams pradiniai tirpalai buvo skiedžiami ląstelių auginimo terpe.

2.1.2 Fotosensibilizatorius

Foskanas (mTHPC) (mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorinas) - prof. R.Bonett'o (Londono Universitetas, Didžioji Britanija) dovana. Pradiniai mTHPC tirpalai eksperimentams *in vitro* (1 mg/ml) ir *in vivo* (3 mg/ml) buvo ruošiami 96% etanolyje. Tirpalai ruošiami steriliai ir laikomi -20°C temperatūroje. Eksperimentams *in vitro* pradinis tirpalas buvo skiedžiamas ląstelių auginimo terpe. Eksperimentams *in vivo* pradinis tirpalas buvo skiedžiamas 0,9% NaCl tirpalu.

2.1.3 Medžiagos ląstelių kultivavimui

Antibiotikai: penicilinas, streptomocinas (milteliai, laikomi kambario temperatūroje), gentamicinas, vaistinė forma 40 mg/ml, laikomas 4°C temperatūroje (Chinoin, Vengrija);

DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle terpė, paruošta laikoma 4°C temperatūroje (Biochrom AG, Vokietija);

FCS - fetalinis veršelio serumas (*foetal calf serum*) , laikomas -20°C arba 4°C temperatūroje (Gibco BRL, Australija);

HEPES - 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfoninė rūgštis (milteliai, laikomi kambario temperatūroje);

Indai ląstelių kultivavimui: flakonai (25 cm², 75 cm²), **lėkštelės** – 9 cm² (TPP, Šveicarija).

2.1.4 Kitos medžiagos

Agarozės gelis: 1% agarozė (Chemapol, Lenkija) tirpinta 1x TAE buferyje, pridėta 1 µg/ml etidžio bromido; naudotas RNR elektroforezei.

Dažai: etidžio bromidas (5-etil-3,8-diamino-6-fenilfenantreno bromidas), pradiniai tirpalai: 100 µg/ml DPBS'e arba 10 mg/ml vandenyje, laikomi 4°C; **kristalinis violetinis** (genciano violetas, N-[4-[bis[4-(dimetilamino)-fenil]metilen]-2,5-cikloheksadien-1-ilidin]-N-metilmetanamino chloridas), pradinis 0,05% tirpalas ruošiamas 20% etanolyje, laikomas kambario temperatūroje (Reachim, Rusija); **MTT** (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio bromidas) tirpintas DPBS'e, pradinis tirpalas 5mg/ml, laikomas 4°C temperatūroje.

Detergentai: tritonas X-100 (oksifenoldekaetilenglikolio eteris) (Ferak, Vokietija); **CHAPS** (3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonatas), pradinė koncentracija - 1%, laikomas 4°C (Roth, Vokietija), **DTT** – ditioneitolis, milteliai, laikomas kambario temp. (Roth, Vokietija),

Druskų tirpalai: DPBS – druskų tirpalas: 40 ml PBS, 5 ml 0.1% CaCl₂ (Lvovfarm, Ukraina) ir 5 ml 0,1% MgSO₄ (Moschimfarm preparaty, Rusija), vandeniui skiesta iki 100 ml, laikomas 4°C arba kambario temperatūroje; **PBS** – druskų tirpalas: 1 g NaCl, 25 mg KCl, 2 mg KH₂PO₄, 144 mg Na₂HPO₄, ištirpinta 100 ml H₂O, pH 7,3, laikomas 4°C temperatūroje; **BCA-Na₂** (bicinchonino rūgšties dinatrio druska) – 4,4'-dikarboksi-2,2'-bichinolininės rūgšties dinatrio bruska; **CuSO₄×5H₂O** – vario sulfatas (Reachim, Rusija);

2.2 Ląstelių kultūros, eksperimentiniai gyvūnai

A-431 – žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelės (ATCC: CRL-1555). Ląstelės kultivuojamos DMEM su 5% FCS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino (arba vietoj šių antibiotikų – 50 µg/ml gentamicino), 2 mM glutamino (kartą per dvi savaites) ir 10 mM HEPES, 37°C

temperatūroje ir 5% CO₂ bei 95% drėgmės atmosferoje. Ląstelės persėjamos triskart per savaitę. Tam tikslui jos pakeliamos 0,025% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir praskiedžiamos iki 10⁵ ląst./ml.

MH-22A - epiteliškos pelių hepatomos ląstelės (Rusijos Mokslų Akademijos Citologijos institutas, Sankt Peterburgas, Rusija). Ląstelės kultivuojamos DMEM su 10% FCS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino (arba vietoj šių antibiotikų – 50 µg/ml gentamicino), 2 mM glutamino (kartą per dvi savaites), 37°C temperatūroje ir 5% CO₂ bei 95% drėgmės atmosferoje. Ląstelės persėjamos triskart per savaitę. Tam tikslui jos pakeliamos 0,025% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir praskiedžiamos santykiu 1:3.

LLC1 – pelių plaučių karcinomos ląstelės (ATCC: CRL-1642). Ląstelės kultivuojamos iki 60-70% monosluoksniu DMEM su 10% FCS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino. (arba vietoj šių antibiotikų – 50 µg/ml gentamicino), 2 mM glutamino (kartą per dvi savaites), 37°C temperatūroje ir 5% CO₂ bei 95% drėgmės atmosferoje. Ląstelės persėjamos triskart per savaitę. Tam tikslui jos pakeliamos 0,025% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir praskiedžiamos santykiu 1:6.

Ląstelių augimas stebimas invertuotu optiniu mikroskopu (Carl Zeiss, Vokietija).

C57BL/6 pelės (Imunologijos Institutas, Lietuva) – tyrimams *in vivo* naudotos vyriškos lyties linijinės 8-10 savaičių amžiaus ir 20-25 g kūno svorio pelės. Gyvūnai buvo naudojami pagal Lietuvos gyvūnų globos draugijos rekomendacijas.

2.3 Ląstelių gyvybingumo testai

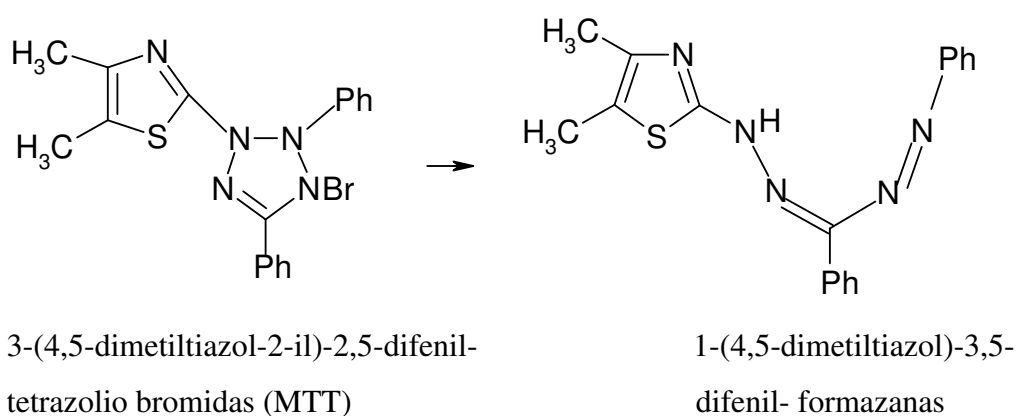
2.3.1 Dažymas kristaliniu violetiniu (KV)

Metodas pagrįstas kristalinio violetinio dažo prisijungimu prie baltymo. Atšokusios negyvybingos ląstelės atsargiai nuplaunamos, likusios ląstelės 1x praplaunamos 0,9 % NaCl tirpalu (1ml į 9 cm² lėkštelę) ir užpilamos 2 ml 0,05

% kristalinio violetinio tirpalu 20% etanolyje. Po 30 min dažas nuplaunamas, ląstelių monoslouksnis 5-7x praplaunamas vandeniu ir dažas ištirpinamas 0,1% acto rūgšties tirpale 50% etanolyje (2 ml į 9 cm² lėkštelę). Spektrofotometru Perkin Elmer λ20 (Perkin Elmer, JAV) matuojamas tirpalo OD₅₈₅. Kontrolinių ląstelių OD₅₈₅ vidurkis prilyginamas 100% gyvybingumui ir ląstelių gyvybingumas po poveikio išreiškiamas procentais kontrolinių ląstelių gyvybingumą laikant 100%.

2.3.2 MTT metodas

Metodas pagrįstas MTT redukcija iki violetinės spalvos produkto 1-(4,5-dimetiltiazol)-3,5-difenilformazano. Nuo ląstelių nusiurbama terpė, užpilama 0,8 ml MTT tirpalo (0,1 mg/ml) ir inkubuojama 1 val., 37°C, 5% CO₂ aplinkoje. Po inkubacijos įpilama 1,5 ml izopropanolio. Tirpalo optinis tankis matuojamas esant 570 nm bangos ilgiui su mikroplokštelių skaitytuvu UVM 340 (ASYS, Jungtinė Karalystė).



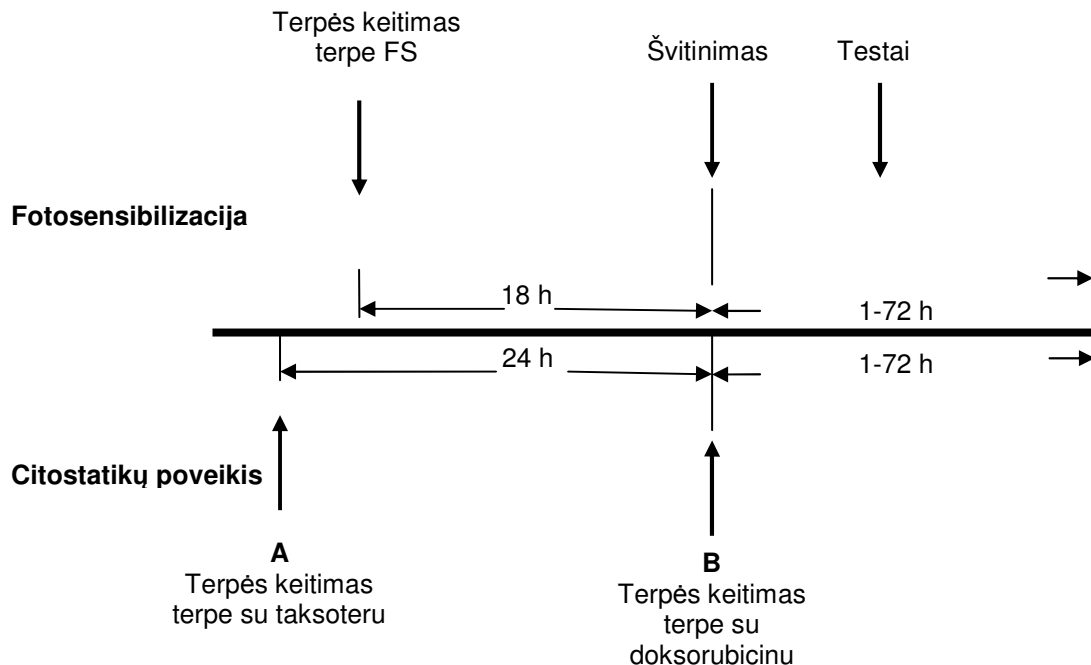
2.4 LLC1 naviko įskiepijimas ir stebėjimas

Pelėms po oda dešinės kirkšnies srityje buvo įskiepyta po 0,2 ml suspensijos, kuri pagaminta iš penkis kartus praskiestos plaučių karcinomos LLC naviko masės. Naviko tūris (NT) buvo nustatomas slankmačiu matuojant naviko ilgį (L), plotį (B) ir aukštį (H) ir apskaičiuojamas pagal formulę $V = L \times B \times H \times \pi/6$. Naviko tūris po gydymo buvo matuojamas tris kartus per savaitę.

Veiksnių poveikis navikų augimui vertintas naudojant TGI rodiklį: $TGI = 100 - (\text{gydytos pelės NT} / \text{negydytų pelių NT vidurkis} \times 100)$.

2.5 Fotodinaminio poveikio ir citostatikų derinimo schema

Eksperimentai buvo atliekami pagal 2.1 pav. pateiktą schemą. Ląstelės (A-431, MH-22A ir LLC1) buvo auginamos lėkštelėse arba flakonuose. Ląstelių tankis buvo: A-431 – $1,2 \times 10^5$ ląst./ml, MH-22A – $3,5 \times 10^5$ ląst./ml, LLC1 – $0,7 \times 10^5$ ląst./ml. Kiekvienam eksperimentiniam taškui buvo imamos dvi arba trys lėkštelės gyvybingumo matavimui, viena lėkštelė – fermentinio aktyvumo tyrimui, vienas flakonas - iRNR ir baltymų raiškos tyrimui.



2.1 pav. Citostatikų ir fotosensibilizacijos derinimo schemas.

Ląstelės inkubuotos su mTHPC DMEM be serumo, tamsoje. Po inkubacijos, terpę su mTHPC pakeista į DMEM su serumu; ląstelės švitintos ir inkubuotos tamsoje: 1) 24 val. tamsoje iki gyvybingumo nustatymo; 2) skirtingą laiko tarpą, tiriant ląstelių žūties kelius; 3) 1-24 val. iRNR raiškos tyrimuose, 4) 6 ir 24 val. baltymų pokyčių tyrimose. Fotosensibilizacijos ir citostatikų derinimo atveju:

A - taksoteris dėtas į terpę 24 val. prieš švitinimą (6 val. DMEM su serumu ir 18 val. kartu su FS DMEM be serumo); terpę pakeista, ląstelės švitintos ir inkubuotos kaip fotosensibilizacijos atveju.

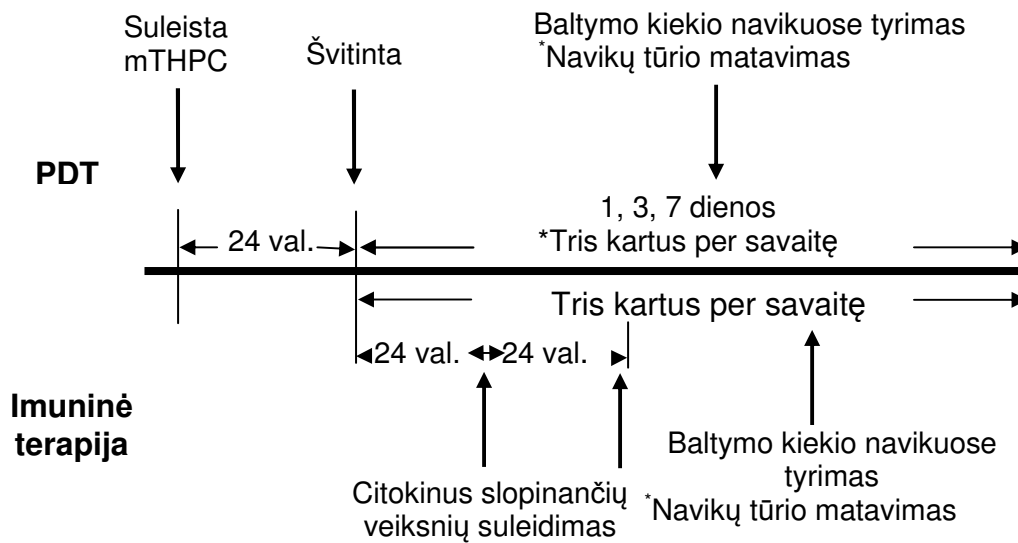
B - iki švitinimo laikytasi fotosensibilizacijos schemas; doksorubicinas dėtas į DMEM su serumu tuoj pat po švitinimo; toliau ląstelės inkubuotos kaip fotosensibilizacijos atveju.

Fotosensibilizacijos atveju, nuo paruoštų eksperimentui ląstelių nusiurbiamą inkubacijos terpę, praplaunama 2 kartus 37°C temperatūros DPBS tirpalu. Praplovus DPBS, užpilama DMEM terpė be serumo su mTHPC tirpalu (A-431 14-500 ng/ml, MH-22A 150 ng/ml, LLC1 200 ng/ml). Inkubuojama 18 val. (37°C). Po to terpė be serumo su fotosensibilizatoriumi nusiurbiamą, ląstelės 2 kartus praplaunamos DPBS tirpalu ir užpilama terpė su serumu. Švitinama (A-431 30-90 s, MH-22A 30-120 s, LLC1 30 s ir 60 s) diodiniu šviesos šaltiniu UNIMELA-1, kurio $\lambda=660\pm 20$ nm (VU Lazerių tyrimo centras), šviesos intensyvumas ląstelių lygyje 1,6 mW/cm². Po švitinimo ląstelės inkubuojamos 24 val. 37°C temperatūroje tamsoje iki gyvybingumo nustatymo KV metodu; 1, 3, 5, 7, 9, 24, 30, 48, 54 ir 72 val. tiriant kaspazės aktyvumą, 4 val. tiriant iRNR kiekio pokyčius, 6 ir 24 val. tiriant baltymų kiekio pokyčius.

Fotosensibilizacijos ir chemoterapinių vaistų derinimo atveju, buvo laikytasi dviejų skirtingų schemų: 1) 24 val. prieš švitinimą ląstelės užpilamos DMEM terpe su taksotero tirpalu (A-431 0,5-5 ng/ml, MH-22A 5-250 ng/ml, LLC1 2 ir 7 ng/ml) (6 val. Tax DMEM su serumu ir 18 val. Tax kartu su mTHPC DMEM be serumo); po 24 val. terpė pakeista, ląstelės švitintos ir inkubuotos tamsoje; 2) Iki švitinimo laikytasi fotosensibilizacijos schemos; tuoj po švitinimo į DMEM su serumu dėta doksorubicino, kad jo koncentracija būtų: A-431 32-500 ng/ml, MH-22A 100-500 ng/ml, LLC1 200 ir 500 ng/ml; toliau inkubuota tamsoje.

2.6 Fotodinaminės terapijos ir imuninės terapijos derinimo schema

Praėjus 7 dienoms po naviko įskiepijimo, kai naviko tūris (NT) buvo 90 ± 10 mm³ (*vidurkis*±*SE*), pelės buvo pažymėtos ir suskirstytos į grupes (n=5-6 kiekvienoje grupėje). Eksperimentai buvo atliekami pagal 2.2 pav. pateiktą schemą.



2.2 pav. PDT ir imuninės terapijos eksperimentų schemas.

PDT atveju, suleista 0,2 ml i.v. 0,25 mg/kg fotosensibilizatoriaus mTHPC ir po 24 val. navikai buvo švitinami diodinio lazerio šviesa (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas), 650 ± 2 nm bangos ilgiu, 135 mW galia 15 min, pasiekiant 120 J/cm^2 .

Imuninės terapijos atveju, suleista i.p. po $2 \times 10 \mu\text{g}$ citokinus slopinančių veiksnių.

2.6.1 Citokinių raiškos navikų ląstelėse po PDT tyrimų schema

Buvo pasirinktos šios eksperimentinių gyvūnų grupės: I – negydytos pelės; II - fotodinamine terapija (PDT) gydytos pelės. II grupei paskirta 0,2 ml i.v. 0,25 mg/kg fotosensibilizatoriaus mTHPC ir po 24 val. navikai buvo švitinami diodinio lazerio šviesa (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas), 650 ± 2 nm bangos ilgiu, 135 mW galia 15 min, pasiekiant 120 J/cm^2 .

Praėjus 1, 3 ir 7 dienoms po švitinimo, pelės dekapituotos, jų navikai išoperuoti ir homogenizuoti. Homogenizuotų navikų ląstelės lizuotos ląstelių suardymo buferiu pagal gamintojų pateiktas rekomendacijas (PARIS™ Kit, Ambion) ir supernatantai užšaldyti -80°C temperatūroje. Imunofermentiniu ELISA metodu buvo sekami citokinių baltymo pokyčiai po PDT.

2.6.2 PDT moduliacija citokinių slopikliais

Buvo pasirinktos šios grupės: I – negydytos pelės; II – imunoglobulinu G (IgG) veiktos pelės; III – antikūnu prieš VEGF-A gydytos pelės; IV – tirpiu VEGFR1 gydytos pelės; V – antikūnu prieš IL-1 α gydytos pelės; VI – PDT

gydytos pelės; VII – PDT ir IgG kombinuotu poveikiu gydytos pelės; VIII - PDT ir antikūno prieš VEGF-A kombinuotu poveikiu gydytos pelės; IX – PDT ir tirpaus VEGFR1 kombinuotu poveikiu gydytos pelės; X – PDT ir antikūno prieš IL-1 α kombinuotu poveikiu gydytos pelės.

PDT atveju, paskirta 0,2 ml i.v. 0,25 mg/kg fotosensibilizatoriaus mTHPC ir po 24 val. navikai buvo švitinami diodinio lazerio šviesa (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas), 650 \pm 2 nm bangos ilgiu, 135 mW galia 15 min, pasiekiant 120 J/cm²; PDT derinimo su imunine terapija atveju laikytasi PDT eksperimento plano, ir praėjus vienai dienai po švitinimo dvi dienas iš eilės pelėms suleista i.p. po 10 μ g imunoglobulino G (R&D Systems), arba antikūno prieš VEGF (AF-493-NA, R&D Systems), arba tVEGFR1 (471-F1, R&D Systems), arba antikūno prieš IL-1 α (AB-108-C, R&D Systems).

2.7 Kaspazės 3 aktyvumo matavimas

Kaspazės 3 aktyvumo matavimui naudotas rinkinys Caspase-3 Cellular Activity Assay Kit PLUS (AK-703) (Biomol GmbH, Vokietija). Metodas pagrįstas fluorescencinio dažo AFC atskėlimu nuo peptido (Ac-DEVD-AFC) C-galo. Atskėlus AFC nuo substrato, padidėja jo fluorescencijos intensyvumas ties 505 nm. Buvo matuota kaspazės 3 aktyvumo pokyčių priklausomybė nuo laiko (1-72 val.), kontrolinėse ląstelėse ir ląstelėse po FP, citostatikais ar mTHPC-FP ir citostatikų deriniu. Pagal gamintojo rekomenduotą protokolą, maždaug 10⁶ ląstelių atkeliamos nuo substrato 0,25% tripsino/0,02% EDTA tirpalu, pridedamos prie jau pakilusių ląstelių ir nucentrifuguojamos (10 min, 1000 g, 4°C). Po centrifugavimo ląstelės suspenduojamos 4°C PBS, skaičiuojamos ir dar kartą nusodinamos centrifuguojant. Toliau ląstelės (10⁷ ląst./ml) 5 min lizuojamos leduose ląstelių lizės buferiu (50 mM HEPES, pH 7,4, 0,1% CHAPS, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA). Citozolinis ekstraktas (supernatantas) gryninamas centrifuguojant 10 min, 10000 g, 4°C. Į 96 šulinėlių plokštelės šulinėlį pilama 80 μ l matavimo buferio (50 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerolis), 10 μ l citozolinio ekstrakto (kiekvienam pavyzdžiui imami du

šulinėliai) ir 10 μ l kaspazei savito substrato (0,2 mM). AFC fluorescencijos pokytis (tiesiogiai proporcingas kaspazės 3 aktyvumui) matuojamas ($\lambda_{\text{ex}}=390$ nm, $\lambda_{\text{em}}=510$ nm) 60 min, 3 min intervalu fluoroskanu Ascent FL (Labsystems, Suomija).

Pagal gautus duomenis kiekvienam pavyzdžiui brėžiama kreivė, ordinatėse atidedant santykinius fluorescencijos vienetus (SFV), abscisėse – laiką (min). Iš tiesės lygties apskaičiuojamas kreivės nuokrypis. Fermento aktyvumas apskaičiuojamas pagal šią lygtį: kaspazės aktyvumas (pmol/min) = kreivės nuokrypis (SFV/min) \times perskaičiavimo koeficientas (μ M/SFV) (iš kalibracinės kreivės) \times reakcijos tūris (μ l), kur perskaičiavimo koeficientas yra 1/kreivės nuokrypio, gauto iš AFC kalibracinės kreivės, ordinatėse atidėjus SFV, abscisėse - skirtingas AFC kalibravimo standarto (μ M) koncentracijas, kur SFV yra santykiniai fluorescencijos vienetai. Toliau kaspazės aktyvumas (pmol/min), koreguojamas pagal pavyzdžio ląstelių skaičių ir pateikiamas kaip keturių nepriklausomų eksperimentų vidurkis \pm SP (pmol/min/ 10^6 ląstelių).

2.8 Mėginių genų raiškos tyrimams paruošimas

2.8.1 RNR išskyrimas

Suminė RNR buvo skiriama iš 2×10^6 kontrolinių ląstelių ir ląstelių po poveiko. Ląstelės buvo atkeliamos nuo substrato 0,25% tripsino/0,02% EDTA tirpalu, sujungiamos su jau pakilusiomis ir centrifuguojamos (10 min, 1000 g, 4°C). Po centrifugavimo ląstelės suspenduojamos 4°C TE buferyje (10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA), skaičiuojamos ir dar kartą nusodinamos centrifuguojant. Iki RNR skyrimo ląstelių nuosėdos laikomos -70°C. RNR skyrimui buvo naudotas rinkinys: Total RNA isolation kit Purescript® (Gentra Systems, JAV) ir gamintojo rekomenduotas protokolas suminės RNR išskyrimui iš 3-5 mln ląstelių. RNR koncentracija ir švarumas tikrinti elektroforezės agarozės gelyje pagalba ir spektrofotometriškai, nustatant $OD_{260/280}$ santykį. Iš kiekvieno pavyzdžio išskirta RNR buvo padalinta į

keturias dalis ir naudota tiriamų genų (*VEGF* ir *IL1A*) ir dviejų ‘naminių’ genų (*ACTB* ir *GAPD* arba *HPRT1*) nustatymui.

2.8.2 cDNR sintezė

cDNR sintezei buvo naudotas rinkinys RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (AB Fermentas). Darbas atliktas laikantis gamintojo rekomendacijų. Reakcijos mišinys buvo ruošiamas ledo-vandens vonioje. Į 5 µg RNR pridedama oligo(dT)₁₈ pradmenų - 1 µl, mišinys atsargiai sumaišomas ir inkubuojamas 5 min 70°C, po to atšaldomas ir centrifuguojamas. Po centrifugavimo mėginys buvo grąžinamas į ledo-vandens vonią. Vėliau į mišinį įdedami kiti reakcijos komponentai: 5X reakcijos buferio (4 µl); 20 u/µl ribonukleazės slopiklio (1 µl); 10 mM dNTP mišinio (2 µl). Mišinys centrifuguojamas, 5 min inkubuojamas 37°C temperatūroje, pridedama 200 u/µl RevertAidTM H Minus M-MuLV RT (1 µl). Mėginio amplifikacija vykdoma 60 min 42°C temperatūroje, o sustabdoma inkubuojant 10 min 70°C temperatūroje. Susintetinta cDNR iki naudojimo laikoma -20°C temperatūroje.

2.9 Kiekybinė PGR

Kiekybinės PGR reakcijos buvo atliekamos remiantis SybrGreen I metodu. Genų ekspresijos tyrimai buvo atlikti Nacionalinėje veterinarijos laboratorijoje, naudojant ABI Prism 7900HT prietaisą (Applied Biosystems). Reakcijos tūris buvo 50 µl, kiekvienai reakcijai naudota 2 µl cDNR (1,5 karto skiestos), po 2,5 µl tiesioginio ir atvirkštinio pradmens (10µM) (AB Fermentas), ir 25 µl Master Mix‘o (Applied Biosystems) ir 18 µl vandens. Reakcija buvo vykdoma 96 šulinėlių plokštelėse. Amplifikacija registruojama pagal fluorescencinio dažo SYBR-Green, kuris jungiasi prie dvigrandinės DNR mažojo griovio, fluorescenciją (Master Mix‘o sudėtinis komponentas).

Suminės RNR kiekio kiekvienoje reakcijoje ir atvirkštinės transkripcijos efektyvumo varijavimui normalizuoti buvo amplifikuojami dviejų ‘naminių’ genų (*ACTB* ir *GAPDH* arba *HPRT1*) fragmentai.

Santykinis genų raiškos pokytis (palyginus su kontrole) buvo apskaičiuotas $\Delta\Delta C_t$ metodu: Genų ekspresijos pokytis kartais = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, kur $\Delta\Delta C_t$ yra (C_t tiriamo geno - C_t naminio geno)_{po poveikio} - (C_t tiriamo - C_t naminio geno)_{kontrolė} (Applied Biosystems Inc.). Rezultatai pateikiami kaip genų raiškos pokyčių kartais, pagal 'naminių' genų raišką, trijų matavimų vidurkis \pm SN.

Naudoti pradmenys pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Oligonukleotidiniai pradmenys, naudoti kiekybinei PGR

Genas	Genų banko numeriai	Tiesioginiai pradmenys	Atvirkštiniai pradmenys
<i>ACTB</i>	NM_001101	5'-ACAGAGCCTCGCCTTTGC-3'	5'-CATCATCCATGGTGAGCTG-3'
<i>Actb</i>	NM_007393.2	5'-ATTGTTACCAACTGGGACGA-3'	5'-ACATGATCTGGGTCATCTTT-3'
<i>GAPDH</i>	NM_002046	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
<i>Hprt</i>	NM_013556.2	5'-GCTGACCTGCTGGATTACAT-3'	5'-CAATCAAGACATCTTTCCAGT-3'
<i>IL1A</i>	NM_000575.3	5'-GCTGCTGAAGGAGATGCCTGA-3'	5'-CAGACCTACGCCTGGTTTTTC-3'
<i>Il1a</i>	NM_010554.4	5'-TGAAACGTCAAAGATGTCAA-3'	5'-TGGATGGTCTCTTCCAGATCA-3'
<i>VEGF</i>	NM_003376.3	5'-AAATGTGAATGCAGACCAAAGA-3'	5'-ACACGTCTGCGGATCTTGTA-3'
<i>Vegf</i>	NM_001025250.2	5'-TGAGACCCTGGTGGACATCT-3'	5'-TGATCCGCATGATCTGCAT-3'

2.10 Imunofermentinis metodas *ELISA*

Tyrimų in vitro atveju, A-431 ir LLC1 ląstelių inkubavimo terpė surenkama į centrifugavimo mėgintuvėlius ir valoma nuo pakilusių ląstelių bei jų nuolaužų centrifuguojant (10 min 1000 g 4°C). Supernatantas užšaldomas -80°C temperatūroje, jeigu tuoj pat nenaudojamas baltymų raiškos tyrimams. Ląstelės atkeliamos nuo substrato 0,02% EDTA tirpalu, pridedamos prie jau pakilusių ir nucentrifuguojamos (10 min 1000 g 4°C). Po centrifugavimo ląstelės suspenduojamos 4°C PBS, skaičiuojamos ir dar kartą nusodinamos centrifuguojant. Toliau ląstelės (5×10^6 ląst./ml) 15 min lizuojamos leduose ląstelių lizės buferiu (50 mM Tris- HCl, pH 7,4, 1% NP-40, 0,25% Na-deoksicholatas, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). Peptidazių slopikliai (1 mM PMSF, 1mM NaF, 1 µg/ml aprotininas, 1 µg/ml leupeptinas) dedami į ląstelių lizės buferį kiekvieną kartą prieš ląstelių lizavimą. Supernatantas gryninamas centrifuguojant 15 min 14000 g 4°C. Supernatantas užšaldomas

-80°C temperatūroje, jeigu tuoj pat nenaudojamas baltymų raiškos tyrimams.

Tyrimų *in vivo* atveju, naudojome eksperimentinių gyvūnų navikų lizatus, kurių paruošimas aprašytas 2.6.1 sk.

Toliau į 96 šulinėlių plokštelės (Maxisorp, Nunc, Vokietija) šulinėlius pilama po 50 µl pirminių antikūnų tirpalo (PBS, pH 7,4) (0,4 µg/ml ir 2,0 µg/ml Ak prieš pelės VEGF ir IL-1α; po 2,0 µg/ml Ak prieš žmogaus VEGF ir IL-1α (R&D Systems). Plokštelė su pirminiais antikūnais inkubuojama +4°C temperatūroje per naktį. Plokštelės šulinėliai 3 kartus plaunami PBS/0,05% Tween 20, pH 7,4 buferiu. Po plovimo, į plokštelės šulinėlius pilamas PBS buferis su 2% BSA ir inkubuojama 1 val. 37°C temperatūroje. Plokštelės šulinėliai plaunami PBS/0,05% Tween 20, pH 7,4 buferiu. Į plokštelės šulinėlius pilama antigeno tirpalai: IL-1α raiškos A-431 ląstelėse *in vitro* tyrimams pilama po 50 µl 2 ir 4 kartus PBS/2% BSA tirpalu skiesta ląstelių inkubavimo terpė, 100, 200, 400 kartų skiestas ląstelių lizatas, 250-15,625 pg/ml koncentracijos žmogaus rekombinantinio IL-1α baltymo tirpalai PBS/2% BSA; VEGF raiškos A-431 ląstelėse *in vitro* tyrimams pilama po 50 µl 2 ir 4 kartus PBS/2% BSA tirpalu skiesta ląstelių inkubavimo terpė, 5, 10, 20 kartų skiestas ląstelių lizatas ir 1000-62,5 pg/ml koncentracijos žmogaus rekombinantinio VEGF baltymo tirpalai; VEGF ir IL-1α raiškos LLC1 ląstelėse *in vitro* tyrimams pilama po 50 µl neskiesta, 2, 4 ir 8 kartus PBS/2% BSA tirpalu skiesta ląstelių inkubavimo terpė, tiek pat kartų skiestas ląstelių lizatas ir po 500-15,625 pg/ml koncentracijos pelės rekombinantinių VEGF ir IL-1α baltymų tirpalai. VEGF ir IL-1α *in vivo* tyrimams pilama po 50 µl 2, 4, 8 kartus PBS/2% BSA tirpalu skiesto navikų lizato ir 61-500 pg/ml koncentracijos pelės rekombinantinių VEGF ir IL-1α baltymų tirpalo PBS/2% BSA. Inkubuojama 1,5 val. 37°C temperatūroje. Antigeno tirpalas nupilamas. Plokštelės šulinėliai plaunami PBS/0,05% Tween 20, pH 7,4 buferiu. Į šulinėlius pilama po 50 µl 0.1 µg/ml koncentracijos antrinių biotinu žymėtų antikūnų tirpalo (PBS, pH 7,4) (po 50 ng/ml Ak prieš pelės VEGF ir IL-1α; 50,0 ir 12,5 ng/ml Ak prieš žmogaus VEGF ir IL-1α (R&D Systems). Plokštelė su antriniais antikūnais inkubuojama 2 val. 37°C temperatūroje.

Antrinių antikūnų tirpalas nupilamas. Plokštelės šulinėliai plaunami PBS/0,05% Tween 20, pH 7,4 buferiu. Į šulinėlius pilama 50 µl streptavidino ir šarminės fosfatazės konjugato tirpalo (Amersham Biosciences, Anglija) (skiedžiama 10 mM HEPES, pH 7,5/0,15M NaCl/0,1% Tween 20 buferiu santykiu 1:1000) ir inkubuojama 40 min, 37°C temperatūroje. Streptavidino ir šarminės fosfatazės konjugato tirpalas nupilamas. Plokštelės šulinėliai plaunami šarminės fosfatazės nuplovimo buferiu (10 mM HEPES, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20). Į šulinėlius pilama po 50 µl 3mM koncentracijos p-nitrofenolio fosfato tirpalo substratiniame buferyje (100 mM dietanolaminas, 5 mM MgCl₂×6H₂O, pH 9,5) ir inkubuojama tamsoje per naktį kambario temperatūroje. Stebima spalvinė reakcija, kurios intensyvumas matuojamas ASYS UVM 340 plokštelių skaitytuvu, esant 405 nm bangos ilgiui. Pagal gautus duomenis, brėžiama standartinio baltymo kreivė, ordinatėse atidedant optinio tankio vienetų, abscisėse – standartinio baltymo koncentracijas. Iš kalibracinės kreivės apskaičiuojamas tirto baltymo kiekis (ng/ml). *In vitro* šis baltymo kiekis normalizuojamas milijonui ląstelių, *in vivo* – 1 mg baltymo. Lizatų bendras baltymo kiekis nustatomas bicinchonino rūgšties (BCA) metodu.

2.11 BCA metodas baltymo koncentracijai nustatyti

BCA (Smith et al., 1985) baltymo koncentracijos nustatymo metodas paremtas kompleksų sudarymo reakcija, kurios metu šarminėje terpėje bicinchonino rūgšties natrio druska (BCA-Na₂) sudaro violetinės spalvos kompleksinius junginius su Cu⁺ jonais, kurie susidaro, baltymams sąveikaujant su Cu²⁺ jonais (Biureto reakcija).

Baltymų kiekio matavimui 50 µl ląstelių suspensijos sumaišyta su 950 µl darbinio reagento ir inkubuota 30 min 37°C, po to tirpalas atvėsintas iki kambario temp. Tirpalo OD₅₆₂ matuotas spektrofotometru Perkin Elmer λ20 (Perkin Elmer, JAV). Nežinomas baltymo kiekis nustatytas iš kalibracinės kreivės, gautos abscisėse atidėjus ŽSA koncentraciją 0 – 900 µg/ml, ordinatėse - OD₅₆₂.

Darbinis reagentas ruošiamas 100 tūrių reagento A sumaišius su 2 tūriais reagento B. Reagento A sudėtis: 1% BCA-Na₂, 2% Na₂CO₃×H₂O, 0.16% vyno rūgšties natrio druska, 0.4% NaOH, 0.95% NaHCO₃, pH 11.25. Reagentas B yra 4% CuSO₄×5H₂O tirpalas.

2.12 Fluorescencinė mikroskopija

Mikroskopijos eksperimentams ląstelės kultivuojamos ant dengiamųjų stiklelių lėkštelėse. Nuo ląstelių nusiurbama inkubavimo terpė ir praplaunama 2 kartus su PBS. Ląstelės 10 min fiksuojamos 4% paraformaldehido tirpalu 4°C temperatūroje ir praplaunamos 3x5 min su PBS. Fiksuotos ląstelės gali būti laikomos užpiltos 4°C PBS temperatūroje keletą dienų.

Ląstelės permeabilizuojamos 3 min 0,1% tritono X-100 tirpalu PBS'e ir greitai praplaunamos tuo pačiu tirpalu.

Fiksuotos ir permeabilizuotos ląstelės perkeliamos į dėžutę su sudrėkinta sevetėle. Jos 15 min inkubuojamos su 0,5% BSA blokavimo tirpalu. Toliau ląstelės 30 min kambario temperatūroje inkubuojamos su pirminių antikūnų prieš VEGF (R&D Systems) ir IL-1α (R&D Systems) tirpalais, atitinkamai praskiestais santykiu 1:30 ir 1:35. Praplaunama 3x5 min PBS. Tuomet 30 min kambario temperatūroje žymima antrinio antikūno prieš pelės IgG tirpalu PBS, skiestu santykiu 1:200 (NL008, R&D).

Branduoliai žymimi 3 min kambario temperatūroje inkubuoiant su DAPI (Molecular probes) tirpalu PBS (1 μg/ml). Ląstelės 3 kartus praplaunamos su PBS.

Dengiamieji stikleliai su imunofluorescenciniu būdu nudažytomis ląstelėmis Dako tvirtinimo terpe priklijuojami prie objektinių stiklelių. Stikleliai saugomi 4 °C temperatūroje.

Imunofluorescencijai stebėti naudotas Leica SP5 lazerinis skenuojamasis mikroskopas (Leica, Vokietija), 63x HCX PLAPO lambda blue 1.4 aliejaus imersijos objektyvas. Žadinimo/emisijos bangos ilgiai buvo 633/640-700 nm ir 405/406-535 nm.

2.13 Tėkmės citometrija

LLC ląstelių inkubavimo terpė su atkibusiomis ląstelėmis surenkama į centrifugavimo mėgintuvėlius ir centrifuguojama 10 min 1000 g 4°C. Ląstelės atkeliamos nuo substrato 0,02% EDTA tirpalu, pridedamos prie jau atkibusių ir centrifuguojamos 10 min 1000 g 4°C. Supernatantas nusiurbiamas, ląstelės suspenduojamos ir 10 min fiksuojamos 2% paraformaldehido (28906, Thermo Scientific) tirpalu 4°C temperatūroje. Praplaunama 2 kartus su PBS/BSA 1% tirpalu. Toliau ląstelės užpilamos 1 ml 0,1% saponino tirpalo PBS/BSA 1%. Ląstelės inkubuojamos 10 min leduose ir centrifuguojamos 10 min 1000 g 4°C. Supernatantas nusiurbiamas, ląstelės suspenduojamos fikoeritrinu (PE) žymėto žiurkėno antikūno prieš pelės IL-1 α tirpale (559810, BD, 100 μ l, 0,25 μ g antikūno milijonui ląstelių) () ir inkubuojamos 30 min 4°C tamsoje. Pažymėtos ląstelės 3 kartus praplaunamos su PBS/0,5 % BSA. Nuosėdos suspenduojamos 1 ml Cell Wash (BD Biosciences) tirpalo ir mėginiai matuojami tėkmės citometru BD FACS Calibur (BD) naudojant „Cell quest“ programinę įrangą.

2.14 Kombinuoto poveikio vertinimas taikant sudėtinės adityvios tiesės analizę

Fotosensibilizacijos su mTHPC ir citostatikų (Dox/Tax) kombinuoto poveikio A431 ląstelių gyvybingumui vertinimas atliktas pagal literatūroje rekomenduojamą metodiką (Tallarida, 2000; Tallarida, 2001).

2.14.1 Vienfaktorinė tiesinė regresinė analizė

A-431 ląstelių atsakas į vaistų pavienius poveikius buvo netiesinio pobūdžio (hiperbolės tipo koncentracijos–poveikio priklausomybė), todėl duomenis pakeitėme į tiesinę priklausomybę, logaritmuodami dešimtainiu pagrindu vaistų koncentracijas. Logaritmuoti vaistų koncentracijų intervalai: mTHPC 50-500 ng/ml, Dox 50-1000 ng/ml, Tax 0,5-7 ng/ml, mažinantys ląstelių gyvybingumą apie 20%-80%, buvo optimaliausi ląstelių gyvybingumo priklausomybei nuo vaistų poveikio aprašyti vienfaktorine tiesine regresine lytimi:

$$y = a + b \times x, \quad (2.1)$$

kur **a** – laisvasis narys, **b** – koeficientas, žymintis veiksnio poveikio pobūdį ir svorį. Kai **b**<0, neigiamas, veiksnys mažina ląstelių gyvybingumą, kai **b**>0, teigiamas, - didina.

Remdamiesi vienfaktorinės tiesinės regresijos lygtimis, nustatėme vaistų stiprumus (*potency*), t.y. koncentracijas, mažinančias ląstelių gyvybingumą 50% maksimalaus poveikio. Kuo koncentracija didesnė, tuo vaisto stiprumas mažesnis. Vaistų stiprumų santykis **A/B** vadinamas santykiniu stiprumu **R**, kur **A** ir **B** vienodai veiksmingos koncentracijos mažesnio stiprumo ir didesnio stiprumo vaistų atitinkamai.

2.14.2 Sudėtinės adityvios kreivės konstravimas

Nekintančių vaistų dalių kombinacijoje eksperimento planas. Vaistų dalys kombinacijoje nustatomos pagal formulę:

$$f = \frac{V(B)}{V(A) + V(B)}, \quad (2.2)$$

kur $V(\log(x))$ – prognozuojamos 50% maksimalaus poveikio logaritmuotos koncentracijos dispersija, skaičiuojama pagal formulę:

$$V(\log(x)) = \frac{s^2}{b^2} \left[\frac{1}{N} + \frac{(\log(x_i) - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right] \quad (2.3)$$

kur s^2 – dispersija, **b** – regresinės lygties nepriklausomo kintamojo koeficientas, **N** - imties dydžio skaitinė vertė, \bar{x} - koncentracijų vidurkis, S_{xx} - koncentracijos nuokrypio nuo vidurkio kvadratų suma.

Dispersija skaičiuojama pagal formulę:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - a - bx_i)^2}{N - 2} \quad (2.4).$$

Nustčius **f** reikšmę, skaičiuojama pavieniui veikiančių vaistų vienodo veiksmingumo vaistų koncentracijų dalys, p_A ir p_B , to pačio aktyvumo kombinacijoje:

$$p_A = fA / Z_{add} \quad (2.5)$$

$$p_B = (1-f)B / Z_{add}, \quad (2.6)$$

kai suminė adityvi kombinacijos koncentracija Z_{add} lygi:

$$Z_{add} = fA + (1-f)B = a + b, \quad (2.7)$$

kur a ir b, vaistų koncentracijos kombinacijoje, vienodai efektyvioje pavieniui veikiančių vaistų A ir B koncentracijų poveikių atžvilgiu. Adityvi suminė kombinacijos koncentracijų suma skaičiuojama naudojantis abiejų pavieniui veikiančių vaistų regresinėmis lygtimis:

$$Z_{add} = \frac{z_1}{p_1 + Rp_2}, \quad (2.8)$$

kur z_1 – mažiau potencialaus vaisto tam tikro poveikio y_i koncentracija, nustatoma naudojant atskirai veikiančių vaistų eksperimentinius duomenis, $R = A/B$, kur A ir B - y_i poveikiu pasižyminčios vaistų koncentracijos, išskaičiuotos iš atskirai veikiančių vaistų regresijos kreivių, p_1 ir p_2 – vaistų A B koncentracijų dalys adityvioje suminėje koncentracijoje, atitinkamai.

$$Z_{add} = \frac{z_2}{p_1 / R + p_2}, \quad (2.9)$$

kur z_2 – labiau potencialaus vaisto tam tikro y_i poveikio eksperimentų metu nustatyta koncentracija naudojant atskirai veikiančių vaistų eksperimentinius duomenis, $R = A/B$, kur A ir B - y_i poveikiu pasižyminčios vaistų koncentracijos, išskaičiuotos iš atskirai veikiančių vaistų regresijos kreivių, p_1 ir p_2 – vaistų A B koncentracijų dalys adityvioje suminėje koncentracijoje, atitinkamai.

Santykinė potencija skaičiuojama kiekvienam pasirinktam poveikio stiprumui y_i .

Tokiu būdu nustatytų suminių adityvių koncentracijų tikrieji poveikiai tikrinami eksperimentiškai.

Teorinių ir eksperimentinių duomenų regresinė analizė. Teoriniai ir eksperimentiniai duomenys aproksimuojami tiesinėmis regresinėmis lygtimis (2.1), kuriose sistemos atsakas į poveikį paprastai būna logaritmuoto nepriklausomo kintamojo funkcija; ordinačių ašyje atidedamos sistemos atsako į poveikį skaitinės vertės, o abscisių ašyje - logaritmuotos suminės kombinacijos koncentracijos skaitinės vertės.

mTHPC ir citostatinių vaistų kombinuoto poveikio ląstelių gyvybingumui eksperimentinės ir teorinės tiesių grafinis vaizdas parodo poveikio pobūdį: kai tikro poveikio tiesė yra žemiau adityvios, poveikis sinergistinis, nes poveikiui y_i pasiekti reikia mažesnės suminės koncentracijos nei prognozuoja adityvi tiesė; kai tikro poveikio kreivė yra aukščiau adityvios, vaistų poveikis antagonistinis, nes didesnės suminės eksperimentinės koncentracijos reikia pasiekti poveikiui y_i , nei prognozuoja adityvi tiesė; kai abi tiesės sutampa, poveikis vadinamas adityviu.

2.14.3 F kriterijaus taikymas regresinių kreivių lyginimui

Ar tikro kombinuoto poveikio sudėtinė tiesė statistiškai patikimai skiriasi nuo adityvios sudėtinės tiesės, galima įvertinti nuodojant F kriterijų.

Pirmiausia, pagal visus, tikros ir teorinės tiesių, duomenis skaičiuojami koncentracijų ir atsako į poveikį skaitinių verčių vidurkiai \bar{x} ir \bar{y} , atitinkamai. Tada skaičiuojamos kvadratų sumų SS_t ir SS_p skaitinės vertės pagal šias formules:

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (2.10)$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \quad (2.11)$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 \quad (2.12)$$

$$SS_t = S_{yy} - \frac{(S_{xy})^2}{S_{xx}}. \quad (2.13)$$

SS_p skaičiuojamos naudojant regresinių tiesių likučių kvadratų sumas $SS_{res(1)}$ ir $SS_{res(2)}$:

$$SS_p = SS_{res(1)} + SS_{res(2)} \quad (2.14)$$

Naudojant šias išraiškas, skaičiuojamas F kriterijus:

$$F = \frac{\frac{SS_t - SS_p}{2}}{\frac{SS_p}{N_1 + N_2 - 4}} \quad (2.15)$$

F kriterijaus laisvės laipsniai yra 2 (skersai) ir $(N_1 + N_2 - 4)$ (žemyn).

Pasinaudojus kompiuterinių programų tikimybių skaičiavimo moduliui, galima rasti pirmos rūšies klaidos tikimybę, p reikšmę. Kai $p < 0,05$, yra pagrindo atmesti H_0 hipotezę ir teigti, kad tikro ir teorinio kombinuoto poveikio tiesės statistiškai patikimai skiriasi.

Rezultatų statistiniam apdorojimui naudoti Sigma Plot 2001/W versija 7.101, Sigma Stat 3.0.1, Statistica 5.0/W ir Microsoft Excel programiniai paketai.

2.15 Kitų eksperimentinių duomenų statistinė analizė

Rezultatų statistiniam apdorojimui naudoti Sigma Plot 10 ir Microsoft Excel programiniai paketai. Kaspazės 3 aktyvumo, baltymų ir iRNR pokyčiai po fotodinaminio, citostatikų ir jų derinių poveikių buvo vertinti naudojant aprašomąją statistiką bei trijų ir daugiau imčių lyginimui skirtą vienfaktorinės ANOVA metodą, *post hoc* kriterijų. Dviejų grupių lyginimui naudotas t kriterijus.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe mTHPC fotodinaminį poveikį (FP) deriname su priešvėžiniu vaistu doksorubicinu (Dox) iš antraciklinų grupės (Priebe, 1995) arba taksoteru (Tax) iš taksanų grupės (Ferlini et al., 2003). mTHPC kaupiasi ląstelių membranose (Boyle and Dolphin, 1996; Teiten et al., 2003), todėl šiuo atveju ląstelių žūčiai reikšmingiausios yra membranų pažaidos. Tuo tarpu Tax trikdo ląstelės griaučių baltymo tubulino polimerizaciją ir pasižymi antimitoziniu veikimu (Spencer and Faulds, 1994), o Dox daugiausiai kaupiamas branduolyje ir pagrindiniu jo veikimo mechanizmu yra laikoma sąveika su topoizomerazės II ir DNR kompleksu (Wang, 1996; Weaver et al., 1991). Abu chemoterapiniai vaistai stabdo ląstelių dalijimąsi. Skirtingi šių poveikių taikiniai turėtų sudaryti prielaidas didesniai dviejų suderintų poveikių bendram veiksmingumui.

Ištyrėme ir vertinome FP, Tax ir Dox pavienį ir kombinuotą* poveikį vėžinių ląstelių gyvybingumui, bei angiogenezę skatinančių citokinų IL-1 α ir VEGFA (toliau žymėsime VEGF) raiškai *in vitro*. Taip pat įvertinome šių citokinų svarbą navikų augimui *in vivo*.

Siekdami bendresnių išvadų apie FP ir citostatikų derinių veiksmingumą, eksperimentams pasirinkome tris skirtingos kilmės monosluoksnį sudarančių vėžinių ląstelių linijas: žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ląsteles, pelės hepatomos MH-22A (MH) ląsteles ir pelės plaučių karcinomos LLC1 (LLC) ląsteles.

3.1 Ląstelių gyvybingumo pokyčiai po FP ir / arba citostatikų poveikio

Kaip jau minėjome, darbe naudoti FP ir citostatikai sukelia skirtingas ląstelių pažaidas. Skirtingai veikiančių vaistų kombinuoto poveikio pobūdis gali būti adityvus (nulinė sąveika, suminis poveikis), sinergistinis (didesnis nei suminis poveikis) arba antagonistinis (mažesnis nei suminis poveikis).

*FP ir Dox derinį toliau žymėsime FP+Dox, kai Dox buvo dėtas į terpę po FP, o FP ir Tax derinį – Tax+FP, kai Tax buvo dėtas į terpę prieš FP

Pastebėta, kad kombinuoto poveikio pobūdžiui svarbi vaistų derinimo seka. Derinimo sekos reikšmingumas yra registruotas, tiriant FS fotohemo ir doksorubicino (Strečkyte et al., 1999), FS (fotofrino, TPPS_{2a}) ir mikrovamzdelių slopiklių (vinkristino, taksolio) (Ma et al., 1996) kombinuoto poveikio pobūdį *in vivo*.

Statistiniai metodai padeda optimaliai planuoti tokių tyrimų eksperimentus ir žymiai sumažina jų sąnaudas. Kombinuoto poveikio pobūdžio vertinimui sukurta nemažai statistinių metodų. Vieni metodai sukurti pagal poveikių adityvumo principą, pvz., ANOVA, regresinė analizė, o kiti pagal dozių adityvumo principą, pvz., adityvios sudėtinės tiesės analizė, reakcijos paviršiaus analizė. Nėra bendro sutarimo, kokį kriterijų kokiais atvejais geriau naudoti. Paprastai kombinuoto poveikio pobūdis vertinamas naudojant vieną derinio dozę, ir lyginant kombinuotą poveikį su pavieniais poveikiais. Visgi, manome, kad patikimos išvados gali būti daromos tik tada, kai kombinuoto poveikio pobūdžio vertinimui naudojamos kelios derinio dozės.

Poveikio adityvumo principu grįsti statistiniai metodai (ANOVA ir regresinė analizė) leidžia analizuoti eksperimento rezultatus, priklausomus nuo įvairių vienu metu veikiančių veiksnių, atrinkti reikšmingus veiksnius ir įvertinti jų veikimą. Šiuo atveju eksperimentams naudojamos įvairios dozės, tačiau statistinė išvada būna bendra visoms dozėms. Naudodami šiuos metodus, jau anksčiau buvome parinkę veiksmingiausias FP derinimo su Dox ir Tax sekas. Nustatėme, kad deriniai yra veiksmingiausi, kai Tax dedamas į terpę 24 val. iki švitinimo, o Dox – betarpiškai po švitinimo (Kirveliėne et al., 2006; Mickė, 2004).

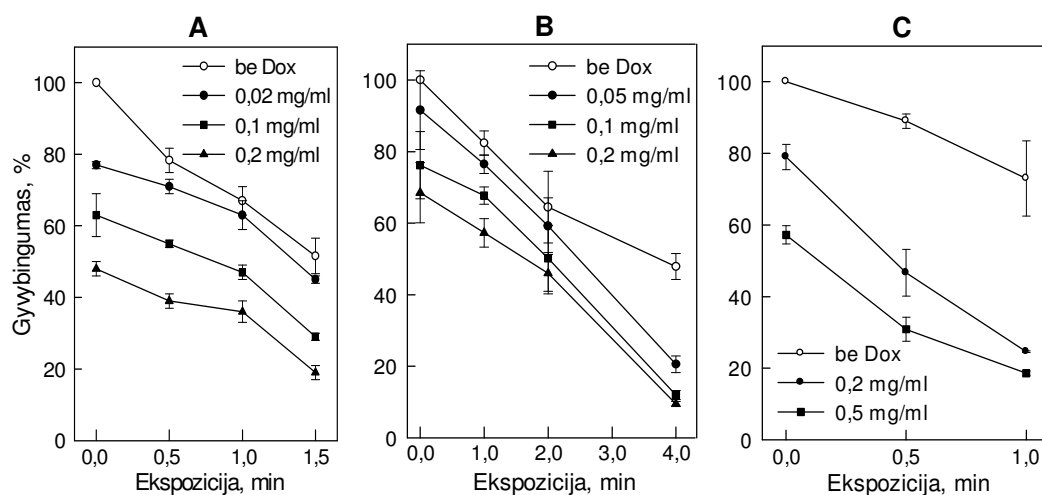
Tačiau pastebėta, kad vaistų kombinuoto poveikio pobūdį – adityvų ar sinergistinių / antagonistinių – gali lemti ne tik vaistų tipas ir derinimo seka, bet ir derinamų poveikių dozės (Tallarida, 2000). Todėl buvo įdomu detaliau įvertinti, ar skirtingų dozių kombinuotas poveikis yra to paties pobūdžio. Manoma, kad tokio tipo tyrimams vienas iš tinkamiausių yra sudėtinės adityvios tiesės metodas (Tallarida, 2001). Be to, šis metodas, kitaip nei anksčiau naudoti, sudarytas dozių adityvumo principu, kas leistų palyginti

rezultatus, gautus naudojant statistinius metodus, sudarytus skirtingais principais.

Šiame darbe naudodami anksčiau nustatytas veiksmingiausias FP ir vaistų derinimo sekas, papildomai įvertinome ląstelių gyvybingumo pokyčius, kaip atsaką į FP ir citostatikų kombinuotą poveikį, adityvios sudėtinės tiesės metodu. Tikėjomės, kad tokia statistinė analizė išryškins veiksmingiausias derinio dozes. Gyvybingumo matavimams pasirinkome ląstelių linijoms optimaliausius gyvybingumo nustatymo būdus ir toliau taikėme KV (A-431, MH) arba MTT (LLC) metodus (žiūr. 2.3 sk.).

3.1.1 Ląstelių gyvybingumo pokyčiai po FP ir / arba doksorubicino poveikio

FP ir Dox kombinuotą poveikio pobūdį A-431 ir MH ląstelių gyvybingumui nustatėme anksčiau. Tik trumpai paminėsime, kad poveikių adityvumo principu grįstų statistinių metodų pagalba įvertinome gautus rezultatus (3.1 pav., A, B) ir parodėme, kad, kai Dox į ląstelių inkubavimo terpę dedamas po švitinimo, FP ir Dox kombinuotas poveikis abiejų linijų ląstelių gyvybingumui yra adityvaus pobūdžio (Mickė, 2004).



3.1 pav. FP, Dox ir jų derinio poveikis A-431 (A), MH (B) ir LLC (C) ląstelėms.

Į terpę pridėta 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (A), 0,15 $\mu\text{g/ml}$ (B) ir 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (C) mTHPC, po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20 \text{ nm}$, $1,6 \text{ mW/cm}^2$), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV (A ir B) ir MTT (C).

Brūkšniai, \pm SN.

Toliau šiame darbe naudodami tuos pačius statistinius metodus įvertinome FP+Dox poveikį LLC ląstelių, kurias laboratorijoje įdiegėme tik šio darbo metu, kaip tinkamą liniją darbams *in vitro* ir *in vivo*, gyvybingumui. Pirmiausiai, nustatėme kombinuotam poveikiui tirti optimaliausias FS prikaupusių ląstelių švitinimo dozes ir Dox koncentracijas, reikšmingai mažinančias ląstelių gyvybingumą apie 10-40 % (3.1 pav., C). Po to, sudarėme pilną faktorinį eksperimento planą, t.y. kiekvieną Dox koncentraciją (200 ir 500 ng/ml) derinome su kiekviena ląstelių švitinimo trukme (0,5 ir 1,0 min). Eksperimentų metu naudojome vieną FS koncentraciją (0,2 µg/ml mTHPC). Atlikę gyvybingumo testus po plane numatytų poveikių, gautus rezultatus išnagrinėjome dvifaktorinės dispersinės analizės metodu, kuris leido įvertinti dviejų kombinuojamų veiksnių poveikių citotoksiškumo reikšmingumą ir derinio adityvumą. Dispersinės analizės rezultatai parodė, kad ląstelių gyvybingumo pokyčiai tiek dėl FP, tiek dėl Dox kombinuojamų atskirų poveikių, buvo statistiškai patikimai reikšmingi ($p=0,01$ ir $p=0,04$, atitinkamai), o FP ir Dox sąveikos įtaka ląstelių gyvybingumui buvo statistiškai nepatikima ($p=0,26$). Tai reiškia, kad FP+Dox poveikis LLC ląstelėms, kaip ir A-431 bei MH ląstelėms, buvo adityvaus pobūdžio.

Tyrimams sudėtinės adityvios tiesės metodu reikia savito eksperimento plano: naudojamos įvairios kombinuoto poveikio dozės, tačiau pavienių veiksnių dozių santykis kombinacijoje turi išlikti pastovus. Jeigu vieno vaisto poveikio stiprumas (*potency*) yra daug didesnis lyginant su kito vaisto poveikio stiprumu, metodas gali siūlyti tokį vaistų dozių santykį kombinacijoje, kad vieno iš jų poveikis bus visai nereikšmingas ląstelių gyvybingumui. Todėl galėjome naudoti ne visas ląstelių linijas, nes tik A-431 ląstelių atsakas į pavienių veiksnių skirtingų dozių poveikius buvo tinkamas eksperimento plano sudarymui ir teorinės sudėtinės adityvios tiesės konstravimui (žiūr. 2.14.2 sk.):

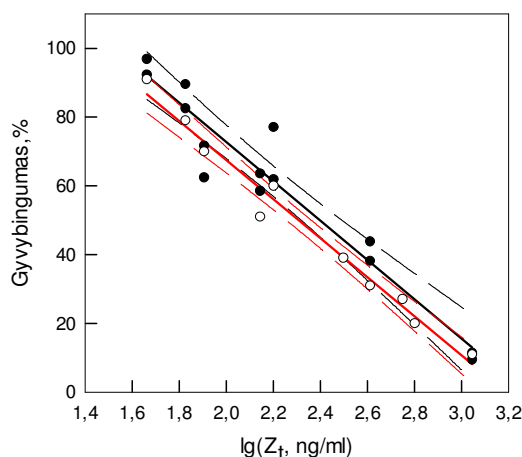
- 1) ląstelių gyvybingumas kito panašiose ribose po FP ar Dox poveikių įvairiomis dozėmis (1 priedas, 1 pav.),
- 2) tiesinių regresinių lygčių, aprašančių ląstelių atsaką į mTHPC ar Dox poveikį (CD15-CD90), krypties koeficientų įverčiai buvo tos pačios eilės ir skyrėsi nežymiai (1 priedas, 2 pav.),
- 3) vaistų

poveikių stiprumai taip pat buvo optimalūs adityvios sudėtinės tiesės konstravimui.

FP ir Dox kombinuoto poveikio atveju didesniu poveikio stiprumu pasižymėjo FP: gyvybingumas sumažėjo 50%, kai ląstelės buvo inkubuojamos 120 ng/ml mTHPC tirpale, o Dox tolygų veiksmingumą pasiekė inkubuojant ląsteles terpėje su 290 ng/ml tirpalu. Taigi, Dox koncentraciją žymėjome A raide, o mTHPC koncentraciją – B raide, ir nustatėme santykinio poveikio stiprumo ($R=A/B$) skaitinę vertę, kas toliau leido parinkti abiejų vaistų koncentracijų kombinacijas ir atlikti nekintančių vaistų dalių kombinacijoje testą. Naudodami 2.2 lygtį (žiūr. 2.14.2 sk.) nustatėme vaistų koncentracijų santykį kombinacijoje, $f = 0,5$. Toliau 2.5 ir 2.6 lygčių pagalba nustatėme Dox ir mTHPC koncentracijų dalis kombinacijoje: $pA = 0,7$, $pB = 0,3$ atitinkamai. Sudėtinę adityvią tiesę konstravome naudodami pavieniui veikiančių vaistų eksperimentinius duomenis, vienfaktorinės tiesinės regresijos modelio lygtis ir (2.8) bei (2.9) lygtis. Skaičiavimų rezultatus, naudotus sudėtinės adityvios tiesės konstravimui, pateikėme lentelėje (1 priedas, 1 lent.).

Duomenų sklaidos diagrama (3.2 pav.) parodė, kad FP+Dox eksperimentinė sudėtinė tiesė buvo išsidėsčiusi aukščiau adityvios sudėtinės tiesės, bet šis nuokrypis nuo adityvumo buvo statistiškai nepatikimas ($p=0,147$) (1 priedas, 2 lent.).

Kai eksperimentinė tiesė yra aukščiau adityvios, poveikis vadinamas antagonistiniu, nes eksperimentinės koncentracijos, ekvivalenčios adityvios sudėtinės tiesės koncentracijoms, silpniau mažina ląstelių gyvybingumą negu prognozuoja adityvi sudėtinė tiesė. FP+Dox poveikio vertinimas daugialypės regresinės analizės būdu, taip pat rodė statistiškai nepatikimą antagonistinę komponentę (Kirveliėne et al., 2006). Taigi, verta suabejoti, ar antagonistinės sąveikos komponentė tikrai yra atsitiktinė. Tiriant FS fotohemo ir doksorubicino kombinuotą poveikį *in vivo*, autoriai aiškino silpnesnį derinio poveikį naviko augimui, kai Dox buvo leidžiamas gyvuliukams prieš švitinimą, sąveika tarp Dox ir fotohemo (Strečkyte et al., 1999). Kadangi į A-431 ląstelių inkubavimo terpę Dox buvo dedamas iš karto po FP, negalime atmesti



3.2 pav. Teorinė adityvi sudėtinė tiesė (raudona) ir eksperimentinio kombinuoto poveikio sudėtinė tiesė (juoda) FP ir Dox deriniui.

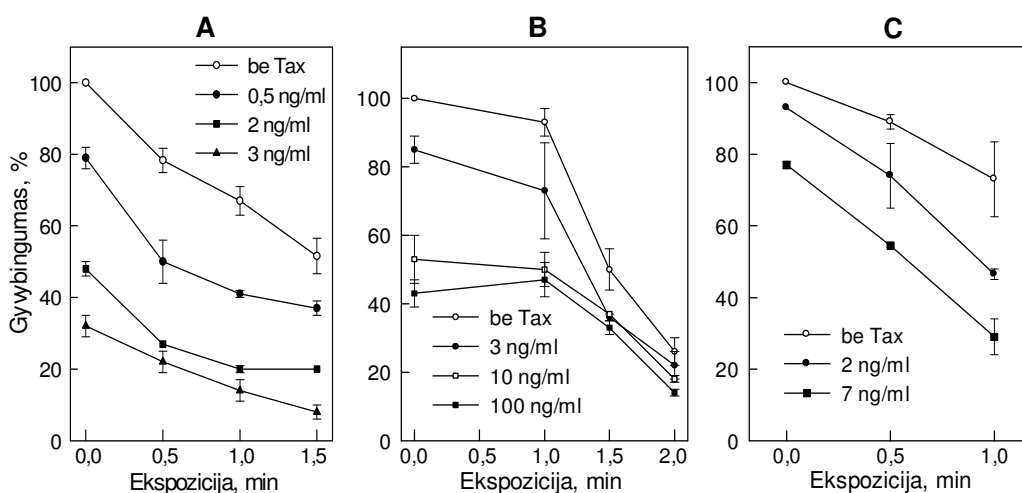
Ląstelės su įvairiomis mTHPC koncentracijomis švitintos 60 s (660 ± 20 nm, $1,6$ mW/cm²). Balti simboliai – teoriniai duomenys, juodi simboliai – eksperimentiniai duomenys, ištisa linija – regresinė tiesė, punktyrinė linija – pasikliautiniai intervalai. Teorinės adityvios tiesės regresinė lygtis: $LG=(181\pm 7,0)-(57\pm 2,9)\times \lg(Z_{add})$, $r^2=0,98$. Eksperimentinės tiesės regresinė lygtis: $LG=(187\pm 10,2)-(57\pm 4,6)\times \lg(Z_{mix})$, $r^2=0,93$. LG – ląstelių gyvybingumas, %; Z_{add} , Z_{mix} , Z_t – mTHPC ir Dox kombinacijos koncentracijų suma, ng/ml.

prielaidos, kad ir šiuo atveju mTHPC ir Dox sąveika lėmė nereikšmingą antagonistinę komponentę.

Apibendrinę rezultatus, gautus statistiniais metodais vertinant trijų skirtingų linijų ląstelių gyvybingumo pokyčius, galime pasakyti, kad įvairių dozių FP+Dox poveikis yra adityvaus pobūdžio, ir tokį derinį taikant gydymui būtų galima sumažinti pavienių poveikių dozes ir pašalinių poveikių daromą žalą organizmui.

3.1.2 Ląstelių gyvybingumo pokyčiai po FP ir / arba taksotero poveikio

FP ir Tax kombinuoto poveikio pobūdis A-431 ir MH ląstelių gyvybingumui taip pat buvo nustatytas ankstesniuose darbuose. Analogiškai įvertinome gautus rezultatus (3.3 pav., A, B) ir nustatėme, kad Tax+FP poveikis abiejų linijų ląstelių gyvybingumui buvo adityvaus pobūdžio (Mickė, 2004).



3.3 pav. FP, Tax ir jų derinio poveikis A-431 (A), MH (B) ir LLC (C) ląstelėms.

Į terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (A) 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (B) ir 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (C) mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20 \text{ nm}$, $1,6 \text{ mW/cm}^2$); gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV (A ir B) ir MTT (C). Brūkšniai, $\pm \text{SN}$.

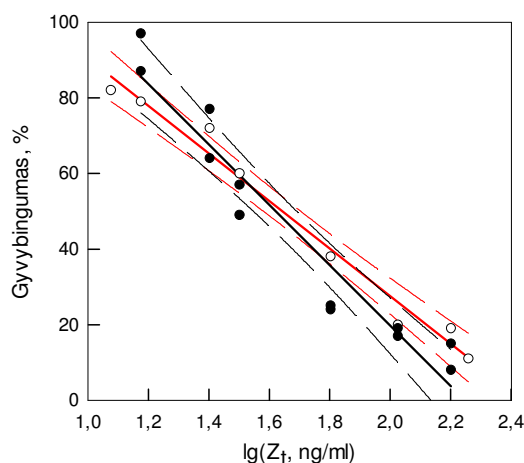
Tax+FP poveikį LLC ląstelių gyvybingumui šiame darbe taip pat vertinome dvifaktoriškos dispersinės analizės metodu. Nustatėme kombinuotam poveikiui tirti optimaliausias FS prikaupusių ląstelių švitinimo dozes ir Tax koncentracijas, kurios reikšmingai mažino ląstelių gyvybingumą apie 10-30 % (3.3 pav., C). Sudarėme pilną faktoriškos eksperimento planą, t.y. kiekvieną Tax koncentraciją (2 ir 7 ng/ml) derinome su kiekviena švitinimo trukme (0,5 ir 1,0 min). Eksperimentų metu naudojome vieną FS koncentraciją (0,2 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC). Atlikę gyvybingumo testus, gautus rezultatus įvertinome dvifaktoriškos dispersinės analizės metodu. Dispersinės analizės rezultatai parodė, kad FP ir Tax reikšmingai mažino ląstelių gyvybingumą ($p=0,007$ ir $p=0,024$, atitinkamai), o švitinimo dozės ir Tax sąveika buvo statistiškai nepatikima ($p=0,857$). Tad Tax+FP poveikis LLC ląstelėms, kaip ir A-431, MH ląstelėms, buvo adityvaus pobūdžio.

Kaip ir FP+Dox atveju, sudėtinės adityvios tiesės metodu analizavome ir Tax+FP poveikį A-431 ląstelėms. Remdamiesi vienfaktoriškos tiesinės regresijos analizės rezultatais (1 priedas, 2 pav.) sudarėme nekintančio dozių santykio kombinacijoje eksperimento planą. Veiksnių dozių santykis

kombinacijoje buvo 0,3 ($f=0,3$) (žiūr. 2.14.2 sk., 2.2 lygtį). Atlikę gyvybingumo testus po plane numatytų poveikių, gautus rezultatus įvertinome sudėtinės adityvios tiesės metodu (1 priedas, 3 lent.). Eksperimentinės sudėtinės tiesės nuokrypį nuo sudėtinės teorinės adityvios tiesės įvertinome naudodami F kriterijų. Pagrindinius statistinio vertinimo rezultatus pateikėme lentelėje (1 priedas, 4 lent.).

Duomenų sklaidos diagrama (3.4 pav.) parodė, kad eksperimentinių duomenų ir teorinė adityvi tiesės kryžiuojasi, t.y., silpno poveikio deriniai veikia antagonistiškai, o stipraus poveikio deriniai – sinergistiškai. Nors F kriterijus parodė, kad šie nukrypimai nuo adityvaus poveikio yra statistiškai nepatikimi ($F=2,26$; $p=0,136$), literatūroje toks tiesių išsidėstymas vadinamas probleminiu (Tallarida, 2000), – šiuo atveju kombinuoto poveikio pobūdis priklauso nuo dozės.

Tax+FP taikant gydymui, dėl stipriau nei adityviai veikiančių kombinuojamų poveikių dar labiau sumažėtų skiriamų veiksmų kiekiu kas dar labiau turėtų sumažinti pašalinių poveikių daromą žalą organizmui.



3.4 pav. Teorinė adityvi sudėtinė tiesė (raudona) ir eksperimentinio kombinuoto poveikio sudėtinė tiesė (juoda) FP ir Tax deriniui.

Ląstelės su įvairiomis mTHPC koncentracijomis švitintos 60 s (660 ± 20 nm, $1,6$ mW/cm²). Balti simboliai – teoriniai duomenys, juodi simboliai – eksperimentiniai duomenys, ištisa linija – regresinė tiesė, punktyrinė linija – pasikliautinieji intervalai. Teorinės adityvios tiesės regresinė lygtis: $LG=(153\pm 6,0)-(63\pm 4)\times \lg(Z_{add})$, $r^2=0,98$. Eksperimentinės tiesės regresinė lygtis: $LG=(180\pm 12)-(80\pm 7)\times \lg(Z_{mix})$, $r^2=0,93$.

LG – ląstelių gyvybingumas, %; Z_{add} , Z_{mix} , Z_t – mTHPC ir Tax kombinacijos koncentracijų suma, ng/ml.

Kaip matysime 3.2.2 sk., gavome ir kitų duomenų, remiančių sinergistinio Tax+FP poveikio prielaidą.

3.2 Kaspazės 3 aktyvumo pokyčiai po FP ir / arba citostatikų poveikio

Ląstelės žūtis apotozės būdu yra svarbus terapinio atsako į poveikį rodiklis (Dive and Hickman, 1991). Apotozės fermentų aktyvumo ir ląstelių gyvybingumo rodikliai susiję; abu atspindi ląstelių žūties vyksmus. Taigi, siekdami tvirtų išvadų, tyrėme kaspazės 3, pagrindinio apotozės vykdymo fermento, aktyvumo pokyčius, kaip ląstelių atsaką į priešvėžinį poveikį. Kaspazių aktyvumo matavimas plačiai naudojamas tiriant terapinio poveikio vėžinėms ląstelėms inicijuojamus žūties kelius (Mickè et al., 2005; Oleinick et al., 2002; Sasnauskiene et al., 2009).

3.2.1 Kaspazės 3 aktyvumo pokyčiai po FP ir / arba doksorubicino poveikio

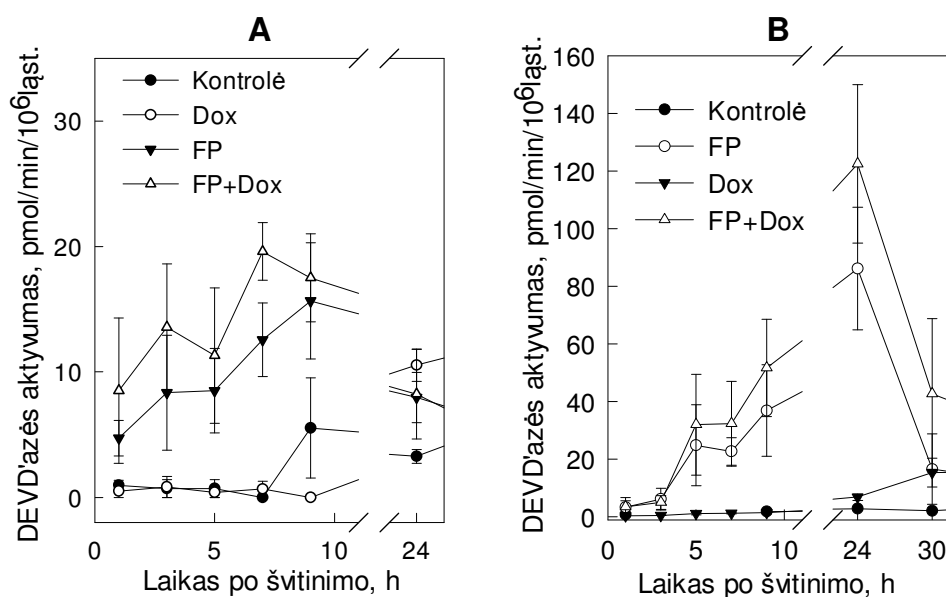
Vykdydami kaspazės 3 aktyvumą tyrėme pagal savitojo peptido DEVD darinio skaidymo greitį A-431 ir MH ląstelėse, veiktose pavieniais FP ar Tax poveikiais ir jų deriniu. Eksperimentai buvo atliekami pagal 2.5 skyriuje aprašytą derinimo schemą.

Tyrimų rezultatai rodė, kad abiejų linijų ląstelėse Dox indukuotos kaspazės 3 aktyvumas buvo didžiausias, praėjus 54 val. po švitinimo (neparodyta). FP veiktose A-431 ląstelėse, didžiausias fermento aktyvumas buvo registruotas praėjus 9 val. po švitinimo ląstelėse, o akivaizdesni kaspazės 3 aktyvumo pokyčiai buvo stebėti praėjus 3 val. po švitinimo (3.5 pav.). FP veiktose MH- 22A ląstelėse, didžiausias fermento aktyvumas buvo registruotas praėjus 24 val. po švitinimo, o akivaizdesni kaspazės 3 aktyvumo pokyčiai buvo stebėti praėjus 5 val. po švitinimo. FP+Dox atveju stebėjome šiek tiek didesnę kaspazės 3 aktyvumą, palyginus su vien FP poveikiu abiejų linijų ląstelėse.

Dėl mažų imčių, negalėjome statistiškai įvertinti skirtumų tarp skirtingą poveikį patyrusių ląstelių atskiro kaspazės 3 aktyvumo matavimo metu, todėl FP+Dox kombinuoto poveikio įtaką kaspazės 3 aktyvumui statistiškai įvertinome laiko intervale, naudodami trijų ir daugiau imčių lyginimui skirtą neparametrinį q kriterijų pagal Duno metodą (2 priedas, 1 lent.).

Kai p -reikšmė buvo mažesnė už 0,05, teigėme, kad skirtumas yra statistiškai patikimas. Detaliau, tyrimų duomenis, registruotus 1-7 valandų laiko tarpe po švitinimo A-431 ląstelėse arba 5-9 valandų laiko tarpe po švitinimo MH ląstelėse, priskyrimė vienai grupei, ir tokiu būdu vertinome skirtumus tarp Dox, FP, bei jų derinio inicijuojamų kaspazės 3 aktyvumų. Mat, šiais laiko tarpais po švitinimo fermentas jau buvo aktyvintas visose FP patyrusiose grupėse ir aktyvumas toliau didėjo.

Statistinės analizės rezultatai parodė, kad abiejų linijų ląstelėse FP ir FP+Dox patikimai stipriau aktyvino kaspazę 3. Dox veiktose ląstelėse



3.5 pav. Ląstelių atsakas į FP ir Dox poveikį.

A – kaspazės 3 aktyvumas A-431 ląstelėse: ląstelės inkubuotos su 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC; po 18 val. ląstelės švitintos 1 min ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2); tuoj po švitinimo į terpę dėta 50 ng/ml Dox.

B - kaspazės 3 aktyvumas MH ląstelėse: ląstelės inkubuotos su 0,15 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC; po 18 val. ląstelės švitintos 45 s ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2); tuoj po švitinimo į terpę dėta 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Dox.

Brūkšniai, $\pm\text{SP}$, $n=3$.

fermentinis aktyvumas nesiskyrė nuo kontrolinių ląstelių. FP+Dox indukuojamas kaspazės 3 aktyvumas nebuvo patikimai didesnis lyginant su fermentiniu aktyvumu FP patyrusiose ląstelėse, tačiau buvo patikimai didesnis už Dox indukuojamą aktyvumą.

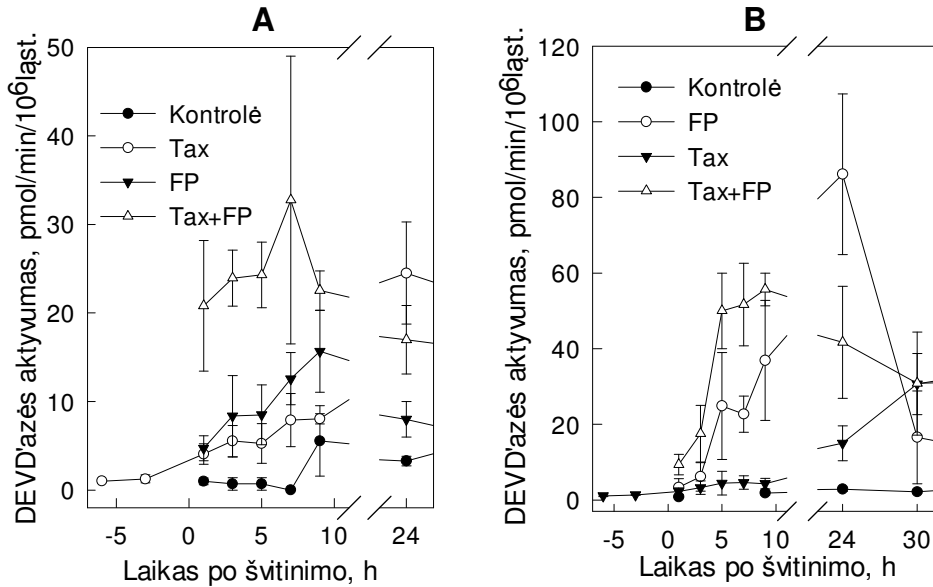
FP+Dox derinio atveju, kombinuotas poveikis ląstelių gyvybingumui buvo adityvaus pobūdžio, tačiau Dox vėliau aktyvino kaspazę 3, todėl pirmomis po švitinimo valandomis derinio poveikis kaspazės 3 aktyvumui priklausė tik nuo FP.

Apibendrinami galime pasakyti, kad, palyginus su FP, subletalų dozių FP+Dox deriniu veiktų MH ir A-431 ląstelių žūčiai būdinga stipresnė apoptozė.

3.2.2 Kaspazės 3 aktyvumo pokyčiai po FP ir / arba taksotero poveikio

A-431 ląstelėse citostatiko Tax indukuotos kaspazės 3 didžiausias aktyvumas buvo 24-ą val. po švitinimo (3.6 pav.). Vien tik FP veiktose ląstelėse didžiausią fermento aktyvumą užregistravome praėjus 9 val. po švitinimo, o reikšmingus kaspazės 3 aktyvumo pokyčius stebėjome praėjus 1 val. po švitinimo. Tax+FP atveju stebėjome ankstesnę ir stipresnę kaspazės 3 aktyvinimą, palyginus su vien FP ar Tax poveikiu.

MH ląstelėse citostatiko Tax indukuotos kaspazės 3 aktyvumas buvo didžiausias 54-ą poveikio valandą (neparodyta). Vien tik FP veiktose ląstelėse didžiausias fermento aktyvumas buvo registruotas praėjus 24 val. po švitinimo, o reikšmingi kaspazės 3 aktyvumo pokyčiai buvo stebėti praėjus 5 val. po švitinimo. Tax+FP atveju stebėjome ankstesnę kaspazės 3 aktyvinimą, palyginus su vien FP poveikiu. Tax+FP kombinuoto poveikio, taip pat kaip ir FP+Dox poveikio, įtaka kaspazės 3 aktyvumui įvertinome neparometriniu q kriterijumi (2 priedas, 2 lent.). Kai p-reikšmė buvo mažesnė už 0,05, teigėme, kad skirtumas yra statistiškai patikimas.



3.6 pav. Ląstelių atsakas į FP ir Tax poveikį.

A – kaspazės 3 aktyvumas A-431 ląstelėse: ląstelės su 2 ng/ml Tax inkubuotos 24 val. prieš švitinimą (6 val. terpėje su serumu ir 18 val. DMEM be serumo ir su 0,1 μg/ml mTHPC); ląstelės švitintos 1 min ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²).

B - kaspazės 3 aktyvumas MH ląstelėse: ląstelės su 0,25 μg/ml Tax inkubuotos 24 val. prieš švitinimą (6 val. terpėje su serumu ir 18 val. DMEM be serumo ir su 0,15 μg/ml mTHPC); ląstelės švitintos 45 s ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²).

Brūkšniai, \pm SP, n=3.

Statistinės analizės rezultatai parodė, kad FP, Tax ir jų deriniu veiktose A-431 ląstelėse kaspazė 3 buvo statistiškai patikimai stipriau aktyvesnė. FP ir Tax pavieniui veiktose ląstelėse fermento aktyvumas buvo panašus, o derinio indukuojamas kaspazės 3 aktyvumas buvo didesnis negu po pavienių poveikių.

MH ląstelėse, FP, Tax ir jų derinys reikšmingai stipriau aktyvino kaspazę 3. FP veiktose ląstelėse fermentinis aktyvumas buvo apie 4,5 karto didesnis lyginant su Tax poveikiu, bet skirtumas buvo statistiškai nepatikimas. Derinio indukuojamas kaspazės 3 aktyvumas buvo didesnis palyginus su pavieniais poveikiais, bet statistiškai patikimas skirtumas buvo tik tarp Tax+FP ir Tax grupių.

Ypatingo dėmesio verti Tax+FP indukuoto kaspazės 3 aktyvumo tyrimų rezultatai A-431 ląstelėse. Tax ir FP poveikio ląstelių gyvybingumui pobūdžio vertinimo sudėtinės adityvios tiesės analizės metodu rezultatai rodė, kad Tax+FP veikė adityviu principu. Tačiau duomenų sklaidos diagrama (žiūr. 3.2

pav.) rodė kad derinio poveikio pobūdis gali priklausyti nuo dozės, t.y. lyginant su adityvumu, mažos dozės lėmė šiek tiek mažesnę poveikį, o didelės dozės lėmė šiek tiek stipresnę poveikį. Reikėtų pažymėti, kad Tax+FP veiktų A-431 ląstelių kaspazės 3 aktyvumas ryškiai padidėjo, praėjus 1 val. po švitinimo, palyginus su fermento aktyvumu kontrolinėse ląstelėse ir pavienį poveikį patyrusiose ląstelėse: pavienių poveikių indukuoto aktyvumo vidurkių suma ($4,1 + 4,7 = 8,8$ pmol/min/ 10^6 ląst.) mažesnė už kombinuoto poveikio ($8,8 < 20,8$ pmol/min/ 10^6 ląst.). Kadangi kaspazės 3 aktyvumas Tax+FP veiktose ląstelėse viršijo aktyvumų sumą pavienius poveikius patyrusiose ląstelėse, galėjome teigti, kad poveikio pobūdis buvo sinergistinis.

Tax+FP koncentracijų kombinacija, artimiausia kaspazės 3 aktyvumo tyrimui naudotai derinio koncentracijų kombinacijai ($Z_{mix} = 64$ ng/ml), buvo žemiausiai nutolusi nuo adityvios sudėtinės tiesės, o sąveikos rodiklis mažesnis už vienetą, $\alpha = 0,825$ ($\alpha = Z_{mix} \setminus Z_{add}$, kai $\alpha > 1$, poveikis antagonistinio pobūdžio; kai $\alpha < 1$, poveikis sinergistinio pobūdžio (Tallarida, 2000)). Šie rezultatai rodė derinio sinergistinį poveikį ląstelių gyvybingumui. Taigi, kaspazės 3 aktyvumo tyrimai papildė derinio poveikio pobūdžio gyvybingumui analizę ir leido detaliau įvertinti dviejų poveikių sąveiką, atskleisdami galimą nukrypimą nuo adityvumo. Remdamiesi ląstelių gyvybingumo ir apoptozės fermento aktyvumo tyrimų rezultatais, galėjome daryti išvadą, kad Tax+FP poveikio pobūdis A431 ląstelėms priklausė nuo poveikio stiprumo.

3.3 Citokino VEGF raiška fotosensibilizuotose ir / arba citostatikais veiktose ląstelėse in vitro

Jau buvome nustatę, kad subletalios FP, FP+Dox ir Tax+FP dozės sukelia citokinų VEGF ir IL-1 α iRNR raiškos padidėjimą A-431 ląstelėse (Mickė, 2004). Citokinų VEGF ir IL-1 α raiška paprastai siejama su nepalankia navikų terapijos prognoze (Apte and Voronov, 2008; Bhuvanewari et al., 2009).

Mūsų rezultatai buvo gauti praėjus 3,5 val. po švitinimo ir naudojant po vieną vaistų dozę. Norint patvirtinti gautus rezultatus reikėjo iširti citokinų

raiškos priklausomybę nuo laiko po poveikio ir nuo veiksmių poveikių stiprumų. iRNR kiekio nustatymui pasirinkome kiekybinės PGR metodą (žiūr. 2.9 skyrių). Ekperimentus atlikome pagal 2.5 skyriuje aprašytą vaistų derinimo schemą. Mėginių paruošimą aprašėme 2.8 skyriuje. Citokinių iRNR kiekio pokyčius vertinome pagal „naminių genų“ raiškos lygį: A-431 – pagal *GAPDH* ir *ACTB* raiškos lygį, MH ir LLC – pagal *Hprt* ir *Actb* raiškos lygį. Citokinių raiškos pokyčių po įvairaus stiprumo poveikių tyrimų rezultatai, gauti vertinant iRNR pokyčius pagal abu „naminius genus“, buvo panašūs, todėl šiame darbe kai kur pateikėme tik vertinimo pagal β -aktino geno raiškos lygį rezultatus. Baltymų kiekio nustatymui naudojome imunofermenitinį ELISA metodą (žiūr. 2.9 skyrių), fluorescencinę mikroskopiją (žiūr. 2.12 skyrių) ir tėkmės citometriją (žiūr. 2.13 skyrių). Ląstelių gyvybingumą išreiškėme kaip priešvėžinio poveikio citotoksinę dozę (CD), pvz., CD50 reiškia, kad praėjus 24 val. po poveikio rasta $50\pm 5\%$ gyvybingų ląstelių, t.y. kiekvienam eksperimentui naudotų ląstelių gyvybingumo nuokrypis nuo nurodytos CD reikšmės neviršijo 10%.

3.3.1 VEGF iRNR pokyčiai

VEGF raiškos priklausomybės nuo laiko tyrimams pasirinkome 1-24 val. laiko tarpą po švitinimo. Naudojome A-431 ląstelių liniją. Tyrimų rezultatai parodė, kad Dox (CD25) ir Tax (CD60) nesukėlė reikšmingų VEGF raiškos pokyčių (3.5' pav., A ir B, atitinkamai). FP (CD65), FP+Dox (CD70) ir Tax+FP (CD90) sukėlė reikšmingą VEGF raiškos padidėjimą (3.5' pav., C, D ir E atitinkamai), ir didžiausias raiškos padidėjimas registruotas 8-ą val. po švitinimo: FP padidino VEGF raišką 9/*ACTB* ir 11/*GAPDH* kartų, FP+Dox padidino VEGF raišką 7/*ACTB* ir 5/*GAPDH* kartus, Tax+FP – 7/*ACTB* ir 5/*GAPDH* kartus. Šie rezultatai rodo, kad VEGF raiškos didėjimui svarbus buvo tik FP poveikis, bet ne FP+Dox ir Tax+FP sukeltos daugialypės pažaidos.

Mūsų rezultatai nesutampa su kai kuriais kitų autorių tyrimais - pastebėta, kad kai kurie priešvėžiniai vaistai gali keisti VEGF raišką navike:

nustatyta, kad doksorubicinas aktyvina VEGF geno raišką (Uehara et al., 2001), o taksoteras slopina angiogenezę (Grant et al., 2003).

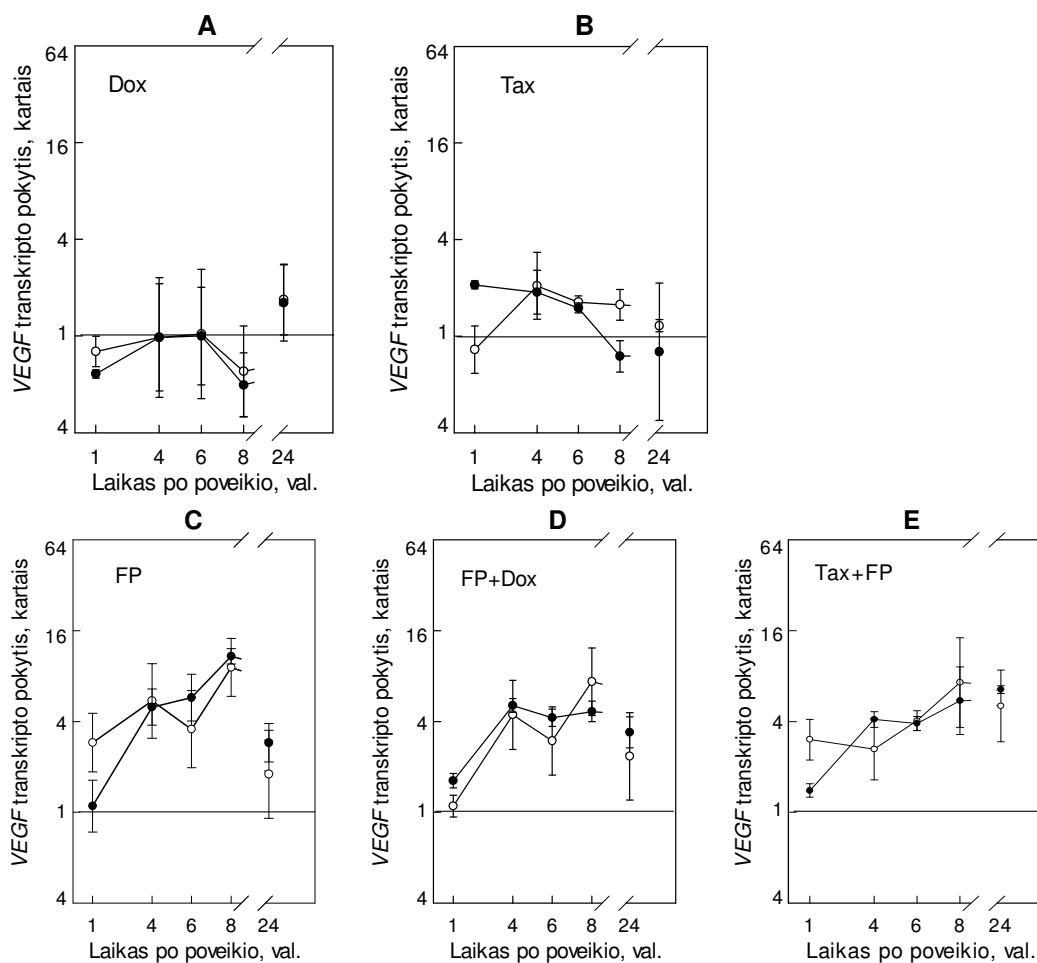
Gal stipresnis Dox ar Tax poveikis sukelia *VEGF* raiškos pokyčius? Ar skiriasi *VEGF* raiškos lygis, veikiant FS prikaupusias ląsteles silpno ir stipraus poveikio švitinimo dozėmis, bei tų pačių dozių FP+Dox bei Tax+FP deriniais? Ieškodami atsakymų į šiuos klausimus, eksperimentiškai ištyrėme ir statistinės analizės metodais įvertinome FP ir citostatikų, bei jų derinių poveikius *VEGF* raiškai, kombinuodami skirtingo poveikio dozes. Naudojome A-431, MH ir LLC ląstelių linijas.

Kaip matyti 3.5' pav., veikiant ląsteles FP ir jo deriniais su citostatikais, reikšmingas *VEGF* raiškos padidėjimas užregistruotas praėjus 4 val. po švitinimo, todėl tyrimams pasirinkome šį laiką. Eksperimentų metu gautus duomenis įvertinome naudodami vienfaktorinės ANOVA metodą, *post hoc* kriterijų.

Ar pakito *VEGF* raiška po didesnių citostatikų dozių poveikio? A-431 ląstelėse (3.6' pav.), kaip ir LLC ląstelėse (3.7 pav.), Tax ir Dox atveju neužregistravome geno raiškos pokyčių, patikimai¹ besiskiriančių nuo kontrolinių ląstelių genų raiškos.

Ar *VEGF* raiškos pokyčius lėmė skirtingos FP dozės? Ar skyrėsi *VEGF* raiška FP ir FP+Dox arba Tax+FP veiktose ląstelėse? Ar *VEGF* raiškos pokyčius lėmė skirtingos FP+Dox ar Tax+FP dozės? Statistinės analizės vienfaktorinės ANOVA metodu pateiktas atsakymas į šiuos klausimus buvo vienareikšmis: A-431 ląstelėse *VEGF* raiška buvo panaši lyginant skirtingas FP dozes ar skirtingas FP+Dox dozes patyrusias ląsteles, bei lyginant kombinuotą poveikį patyrusias ląsteles su FP veiktomis ląstelėmis ($p=0,85$). A-431 ląstelėse skirtingomis Tax+FP dozėmis veiktose ląstelėse *VEGF* raiška buvo panaši, kaip ir lyginant Tax+FP patyrusias ląsteles su FP veiktomis ląstelėmis ($p=0,05$).

¹ Daugiau kaip du kartai – priimtas slenkstinis dydis, kad geno raiškos pokytis būtų laikomas vertu detalesnės analizės



3.5' pav. VEGF transkripto A-431 ląstelėse pokyčių kinetika po priešvėžinio poveikio.

Transkripto pokyčiai vertinti pagal *ACTB* (baltas apskritimas) ir *GAPDH* (juodas apskritimas).

A – ląstelės inkubuotos 24 val. su 50 ng/ml Dox,

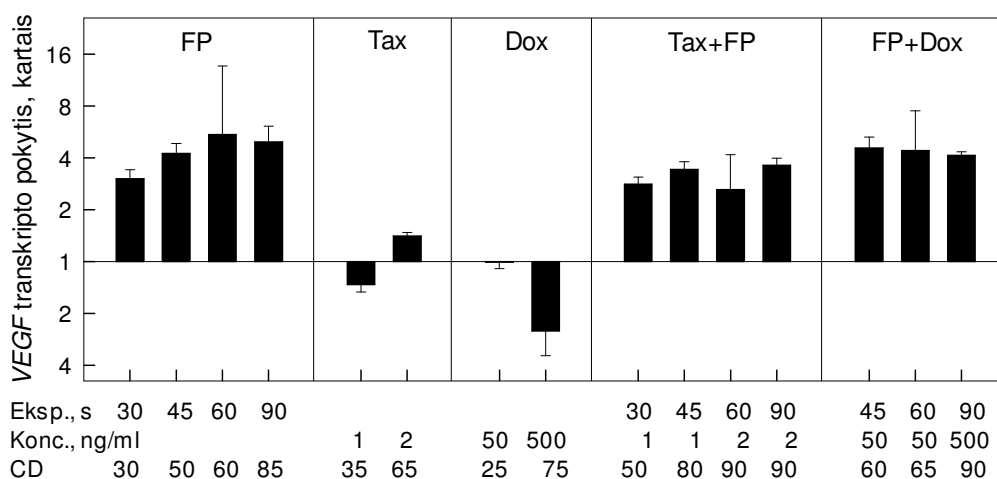
B – ląstelės inkubuotos 24 val. su 2 ng/ml Tax, **C** – ląstelės inkubuotos su 0,1 μg/ml mTHPC; po 18 val. ląstelės švitintos 1 min ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²),

D – iki švitinimo laikytasi FP schemas, tuoj po švitinimo į terpę dėta 50 ng/ml Dox.

E – ląstelės su 2 ng/ml Tax inkubuotos 24 val. prieš švitinimą (6 val. terpėje su serumu ir 18 val. DMEM be serumo ir su 0,1 μg/ml mTHPC); terpė pakeista pilnaverte ir ląstelės švitintos 1 min ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²).

Brūkšniai, ± SN.

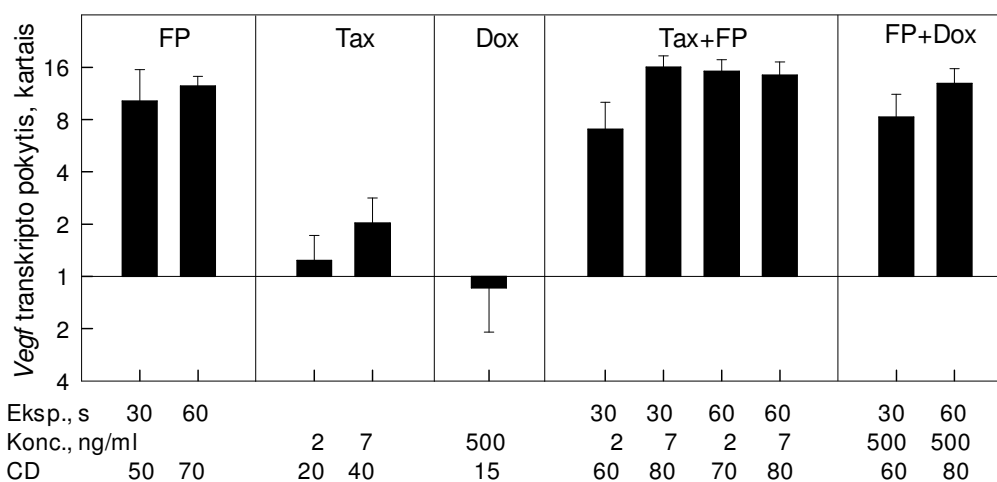
LLC ląstelėse skirtingos FP dozės ir skirtingos FP+Dox dozės reikšmingai nekeitė *Vegf* raiškos, ir, lyginant su pavieniu FP poveikiu, *Vegf* raiška po FP+Dox nebuvo reikšmingai pakitusi (p=0,29); LLC ląstelėse *Vegf* raiška nepriklausė nuo Tax+FP dozių, ir, lyginant su pavieniu FP, Tax+FP reikšmingai nekeitė *Vegf* raiškos (p=0,08).



3.6 pav. *VEGF* transkripto A-431 ląstelėse pokyčių priklausomybė nuo poveikio stiprumo praėjus 4 val. po FP.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV.

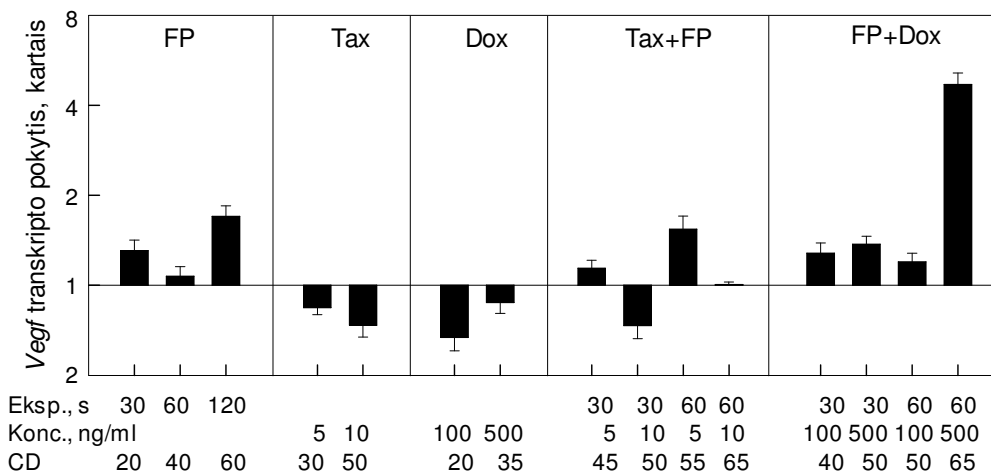
Brūkšniai, \pm SN.



3.7 pav. *Vegf* transkripto LLC ląstelėse pokyčių priklausomybė nuo poveikio stiprumo praėjus 4 val. po FP.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,2 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant MTT.

Brūkšniai, \pm SN.



3.8 pav. *Vegf* transkripto MH ląstelėse pokyčių priklausomybė nuo poveikio stiprumo praėjus 4 val. po FP.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,15 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV.

Brūkšniai, \pm SN.

Apibendrintai, A-431 ir LLC ląstelėse FP reikšmingai didino citokino VEGF iRNR kiekį, tačiau geno raiška nepriklausė nuo skirtingų FP, FP+Dox ir Tax+FP dozių. Dox ar Tax poveikiai, pavieniai ir derinyje su FP, nebuvo reikšmingi citokino VEGF geno raiškai.

MH ląstelėse, kaip ir A-431 ar LLC ląstelėse, citostatikai nedidino *Vegf* raiškos (3.8 pav.). Tačiau ir FP, pavienis ar derinyje, taip pat nedidino *Vegf* raiškos daugiau kaip 2 kartus.

Reikėtų atkreipti dėmesį, kad FP+Dox stipriausias (CD65) poveikis, didino citokino raišką 5 kartus lyginant su *Actb* (3.8 pav.), tačiau – mažiau nei 2 kartus lyginant su *Hprt* (neparodyta), todėl šio padidėjimo nelaikome patikimu.

Gali būti, kad atlikus kinetinius tyrimus pavyktų nustatyti didesnius šio citokino iRNR kiekius ir MH ląstelėse. Kita vertus, LLC ląstelėse, praėjus 4 val. po švitinimo registruotas reikšmingas *Vegf* raiškos padidėjimas. Todėl tikėtina, kad *Vegf* raiškos skirtingą tendenciją lėmė ne organizmo, iš kurio buvo išskirtos ląstelės, savybės, bet skirtingos audinių, iš kurių išskirtos ląstelės, savybės.

Nors MH ląstelėse *Vegf* buvo ekspresuojamas, jo raiška reikšmingai nekito po citotoksinių poveikių. Be to, *Il1a* nebuvo ekspresuojamas šiose ląstelėse. Todėl tolimesniems tyrimams pasirinkome A-431 ir LLC ląsteles, kuriose, kaip matysime toliau, VEGF ir IL-1 α buvo ekspresuojami ir abiejų citokininų raiška kito po citotoksinių poveikių.

3.3.2 VEGF baltymo pokyčiai A-431 ląstelėse

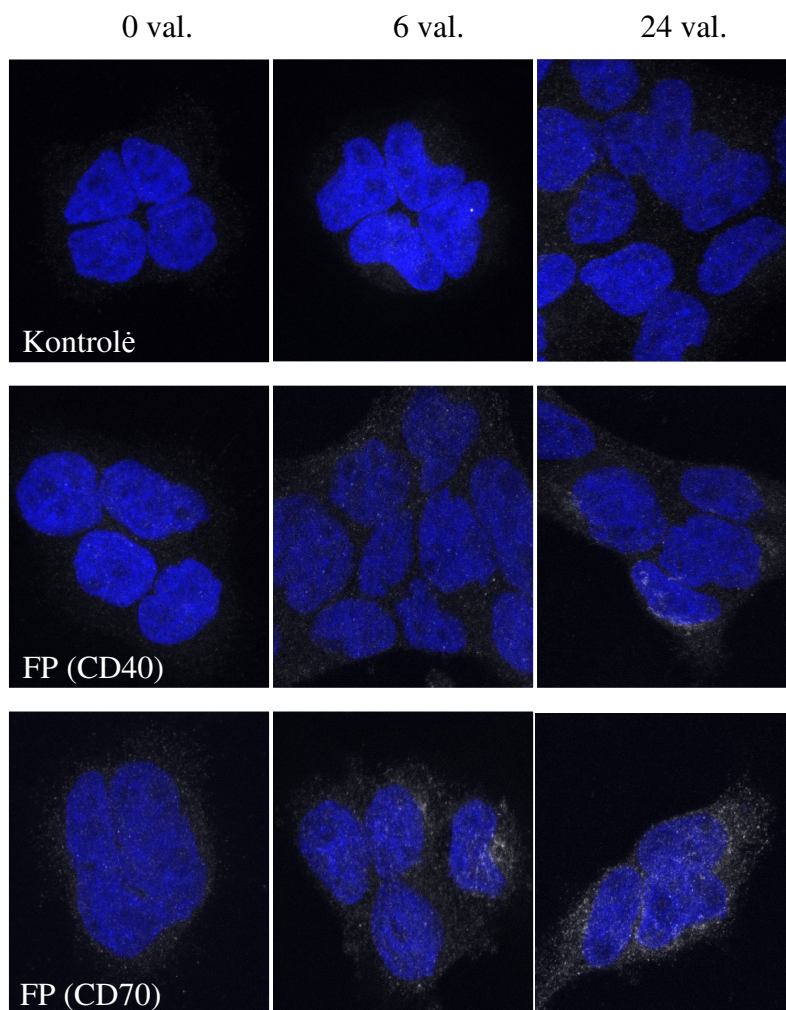
Mūsų užregistruoti padidėję *iRNR* kiekiai dar nereiškė, kad ląstelėse vyks veiksmingo VEGF baltymo sintezė ir organizmas pajus jo poveikį. Juolab šie spėjimai buvo pagrįsti mTHPC fotosensibilizuotų ląstelių atžvilgiu, kadangi, kaip minėta, mTHPC kaupiasi vidinėse ląstelių membranose, reiškia, jas ir pažeidžia švitinimo metu susidariusios aktyvios deguonies formos (Redmond and Kochevar, 2006), t. y. gali būti pažeidžiamas sekretuojamų baltymų biosintezės ir modifikacijos aparatas. Tai būtų palanku fotodinaminės terapijos taikymui, nes nesekretuojant naujų kraujagyslių augimą skatinančio veiksnio, sumažėtų tikimybė navikui ataugti. Todėl toliau siekėme iširti, ar citokino VEGF baltymo pokyčiai A-431 ir LLC ląstelėse po fotodinaminio ir kombinuoto poveikio atitinka mūsų užregistruotą padidėjusią VEGF raišką **iRNR lygiu**.

Baltymo kiekio pokyčius ląstelėse ir jų kultivavimo terpėse nustatėme po 6 ir 24 val. Kadangi anksčiau gauti VEGF *iRNR* raiškos kinetiniai duomenys rodė, kad praėjus 4 val. po švitinimo atitinkamų *iRNR* statistiškai patikimai padidėja, nusprendėme baltymų raišką matuoti praėjus dar 2 val., įvertinę laiką, reikalingą *iRNR* transliacijai.

Naudojant rekombinantinį žmogaus VEGF baltymą, nustatėme, kad mažiausia VEGF koncentracija, kurią galėjome registruoti imunofermentiniu metodu *ELISA*, buvo 62 pg/ml. Eksperimento pakartojimų variacijos koeficientai neviršijo 15%.

Imunofermentinės analizės būdu nepavyko apčiuopti VEGF baltymo A-431 ląstelių lizatuose, tačiau pro fluorescencinį mikroskopą buvo matyti didėjanti VEGF raiška A-431 ląstelėse po FP (3.9 pav.).

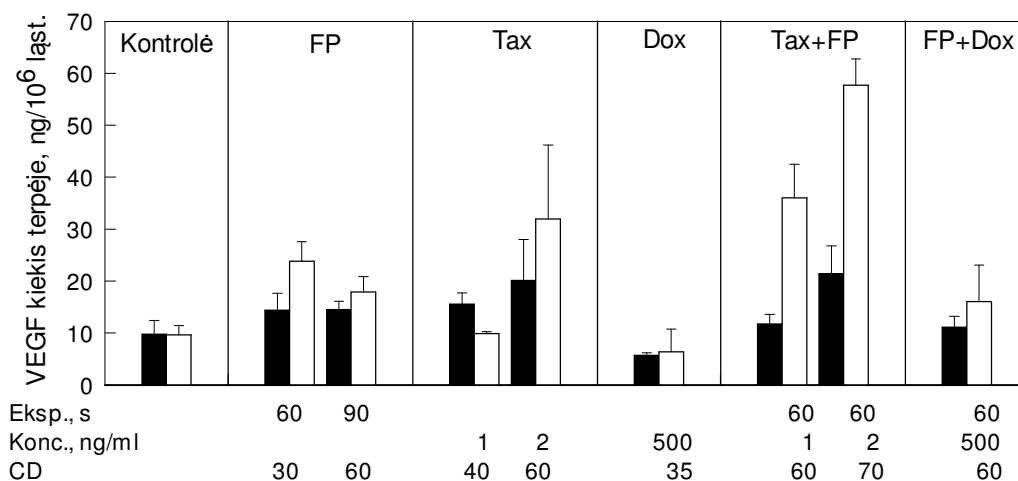
Imunofermetiniu metodu nustatėme, kad A-431 ląstelės sekretuoja VEGF į kultivavimo terpę (3.10 pav.). Koks buvo FP ir citostatikų poveikis citokino sekrecijai? FP didino VEGF baltymo sekreciją, tačiau po poveikio CD60 doze, praėjus 24 val., baltymo koncentracija terpėje buvo reikšmingai didesnė nei po poveikio didesne CD90 doze (3 priedas, 2 lent.). Dox mažino citokino sekreciją, vienas ir derinyje su FP. Tax atveju, CD40 poveikis



3.9 pav. VEGF baltymo lokalizacija A431 ląstelėse praėjus 6 val. ir 24 val. po FP.

Į inkubavimo terpę pridėta 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos 60 s (CD40) ir 90 s (CD70) ($\lambda=660 \pm 20$ nm, $1,6$ mW/cm²); gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV. VEGF baltymo lokalizacija ląstelėse stebėta 0, 6 ir 24 val. po švitinimo (žiūr virš paveikslėlių) Leica SP5 mikroskopu. Mėlyna - branduoliai dažyti DAPI ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=405/406-535$ nm), balta - VEGF molekulės žymėtos monokloniniu antikūnu prieš žmogaus VEGF, kuris sujungtas su NL637 žymėtu antriniu antikūnu ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=633/640-700$ nm).

nesukėlė statistiškai patikimų VEGF koncentracijos kultivavimo terpėje pokyčių, tačiau CD60 poveikis reikšmingai didino VEGF sekreciją (3 priedas, 1 ir 2 lent.). Tax+FP poveikis ypač didino VEGF sekreciją, ir CD70 poveikis lėmė didžiausią VEGF sekreciją praėjus 6 ir 24 val. po švitinimo, lyginant su kitais poveikiais (FP, Tax, Dox, FP+Dox). Beveik visais atvejais VEGF baltymas kaupėsi kultivavimo terpėje, ir jo kiekis, praėjus 24 val. po švitinimo, buvo didesnis, negu praėjus 6 val. Kitokia tendencija nustatyta tik dviem atvejais – Dox ir FP+Dox veiktų ląstelių kultivavimo terpėje VEGF koncentracija buvo beveik tokia pati ir po 6 val., ir po 24 val. Įdomu, kad didesnė Tax koncentracija (2 ng/ml) ypatingai skatino VEGF sekreciją, ir šios dozės poveikį suderinus su FP gauta didžiausia VEGF baltymo sekrecija. VEGF sekreciją skatinantį poveikį atskleidė ir panašaus gyvybingumo, bet skirtingai veiktų ląstelių palyginimas: Tax+FP labiau didino VEGF sekreciją negu vienas FP.



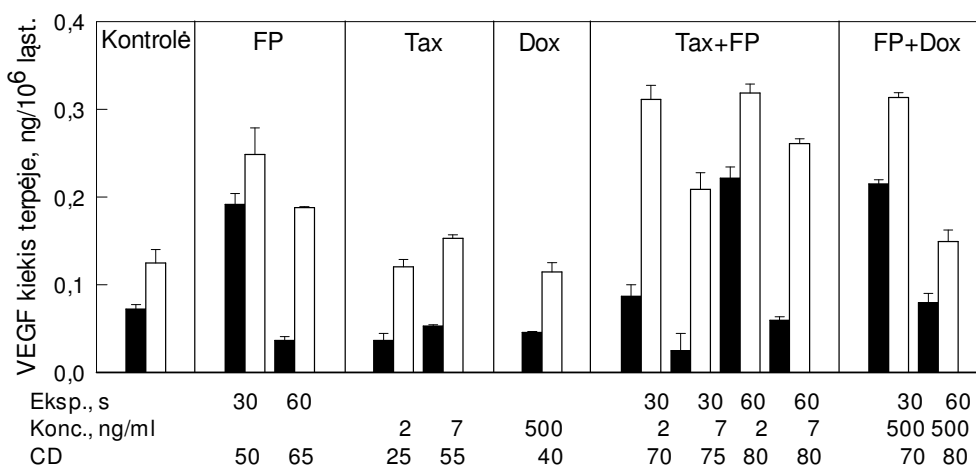
3.10 pav. VEGF baltymo kiekis A431 ląstelių terpėje praėjus 6 val. (juodi stulpeliai) ir 24 val. (balti stulpeliai) po FP.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,1 μg/ml mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV.

Brūkšniai, ± SN.

3.3.3 VEGF baltymo pokyčiai LLC ląstelėse

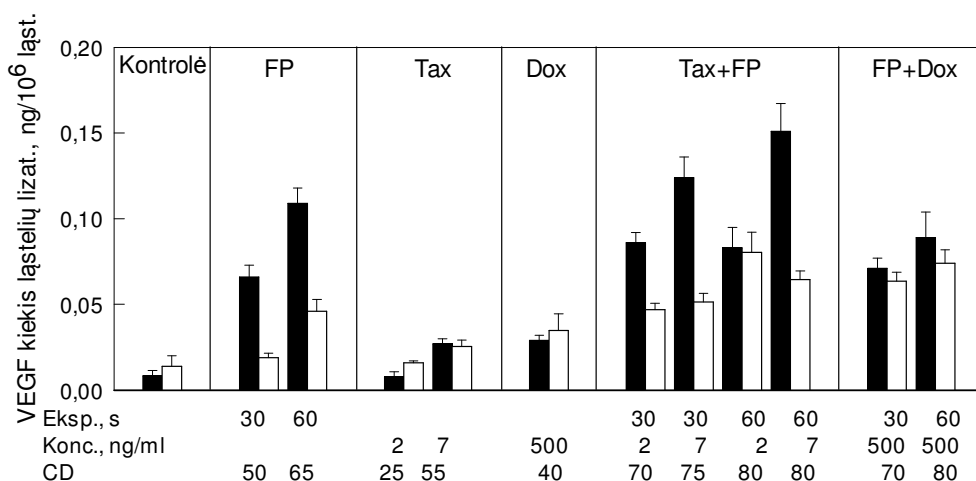
VEGF raiškos pokyčius LLC ląstelių terpėje (3.11 pav.) ir ląstelių lizatuose (3.12 pav.) po FP ir citostatikų poveikių nustatėme imunofermentinės analizės būdu. Naudodami rekombinantinį pelės VEGF baltymą, nustatėme, kad mažiausia VEGF koncentracija, kurią galėjome registruoti



3.11 pav. VEGF baltymo kiekis LLC ląstelių terpėje praėjus 6 val. (juodi stulpeliai) ir 24 val. (balti stulpeliai) po FP.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,2 µg/ml mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant MTT.

Brūkšniai, ± SN.



3.12 pav. VEGF baltymo kiekis LLC ląstelių lizatuose praėjus 6 val. (juodi stulpeliai) ir 24 val. (balti stulpeliai) po FP.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,2 µg/ml mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant MTT.

Brūkšniai, ± SN.

imunofermenčiniu metodu *ELISA*, buvo 16 pg/ml. Eksperimento pakartojimų variacijos koeficientai neviršijo 15%.

Citostatikų Dox ir Tax poveikiai reikšmingai nekeitė citokino sekrecijos. FP didino VEGF sekreciją, tačiau po poveikio CD50 doze, praėjus 6 ir 24 val., baltymo koncentracija terpėje buvo reikšmingai didesnė nei po poveikio didesne CD65 doze (3 priedas, 3 ir 4 lent.). Tax+FP reikšmingai didino VEGF sekreciją 24 val. po poveikio (3 priedas, 4 lent.). FP+Dox derinio poveikis priklausė nuo dozės: VEGF sekrecija po CD70 buvo žymiai didesnė nei po CD80. Visais atvejais VEGF baltymas kaupėsi kultivavimo terpėje, ir jo kiekis, praėjus 24 val. po švitinimo, buvo didesnis, negu praėjus 6 val. VEGF sekrecijos priklausomybės nuo poveikio stiprumo vertinimas atskleidė, kad Tax derinyje su FP slopino VEGF raišką (3 priedas, 3 ir 4 lent.).

Kaip po poveikio kito VEGF kiekis LLC ląstelių lizatuose? Tax reikšmingai nekeitė VEGF baltymo koncentracijos (3.12 pav.) (3 priedas, 5 ir 6 lent.). Dox didino citokino raišką. FP didino VEGF baltymo raišką, ir citokino kiekis ląstelėse priklausė nuo dozės stiprumo. Tax+FP ir FP+Dox reikšmingai didino VEGF raišką tiek kontrolinių, tiek FP patyrusių ląstelių atžvilgiu (3 priedas, 5 ir 6 lent.). Beveik visais atvejais, kai ląstelės buvo veiktos FP, bėgant laikui po poveikio ląstelių lizatuose mažėjo VEGF baltymo, ir jo kiekis, praėjus 24 val. po švitinimo, buvo mažesnis, nei praėjus 6 val po poveikio. Kitokia tendencija - VEGF koncentracija lizatuose po 24 val. išliko beveik tokia pati, kaip ir po 6 val., - nustatyta tik trimis atvejais: Tax+FP poveikio atveju, 2 ng/ml Tax dozę derinant su 60 s švitinimo FS prikaupusių ląstelių doze, ir FP+Dox CD70 ir CD80 poveikių atveju. VEGF sekrecijos priklausomybės nuo poveikio stiprumo vertinimas atskleidė, kad Tax derinyje su FP didino VEGF koncentraciją ląstelių lizatuose.

Apibendrinus tyrimų A-431 ir LLC ląstelėse rezultatus, galima pasakyti, kad citostatikai Tax ir Dox nesukėlė reikšmingų citokino VEGF kiekio pokyčių iRNR lygiu. Visais atvejais, kai terapijoje buvo naudotas FP, geno raiška reikšmingai padidėjo iRNR lygiu. Kita vertus, VEGF raiškos pokyčius po FP ir chemoterapinio poveikio gali lemti ir ląstelių kilmės ypatybės, nes pelės

hepatomos MH ląstelėse šie poveikiai ir jų deriniai nesukėlė reikšmingų iRNR pokyčių.

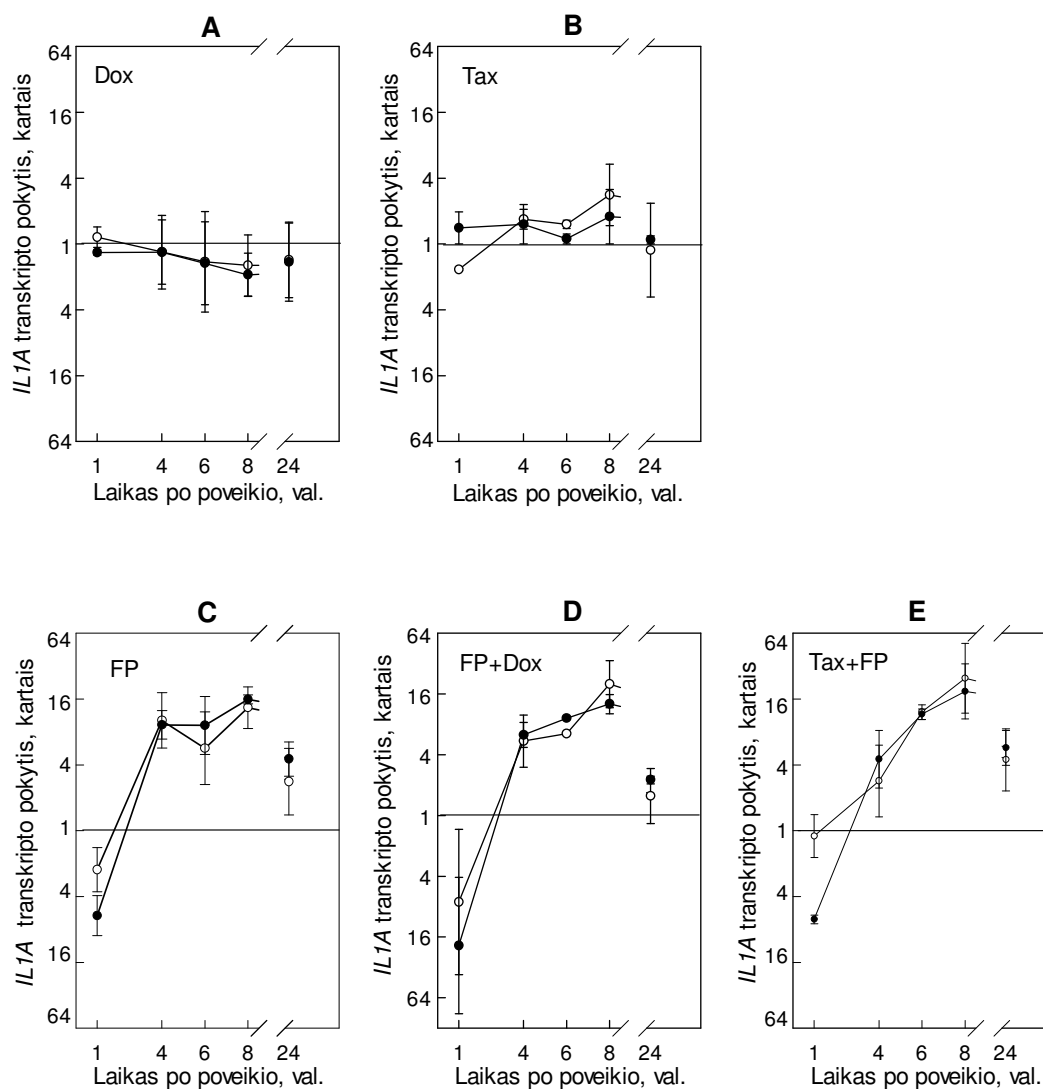
VEGF raiškos tyrimų baltymo lygiu rezultatai iš esmės patvirtino tyrimų iRNR lygiu rezultatus: fotodinaminis poveikis didino VEGF baltymo raišką A-431 ir LLC ląstelėse (iš to sektų, kad prasminga suderinti fotodinaminę terapiją su antiangiogeniniais vaistais). Visais atvejais VEGF baltymas kaupėsi kultivavimo terpėje, ir pagrindinis veiksnys, skatinantis jo biosintezę ir sekreciją, buvo FP. Tačiau vienareikšmiškai negalima atmesti ir mūsų naudotų citostatikų dokсорubicino ir taksotero įtakos šio citokino raiškai. Išsiskyrė didesnioji (2 ng/ml) taksotero koncentracija, kurios derinys su fotodinaminio poveikiu sukėlė didžiausią VEGF baltymo raišką.

3.4 Citokino IL-1 α raiška fotosensibilizuotose ir / arba citostatikais veiktose ląstelėse *in vitro*

Žinojome, kad A-431 ląstelių atsako metu į FP, FP+Dox ir Tax+FP poveikius reikšmingai padidėja ne tik VEGF, bet ir citokino IL-1 α raiška (Mickė, 2004). Kaip jau minėta, šie rezultatai buvo gauti atlikus tyrimus 3,5 val. po švitinimo ir naudojant po vieną vaistų dozę, todėl šiame darbe norėjome detaliau ištirti navikų augimui svarbaus IL-1 α raišką: analogiškai VEGF tyrimams (žiūr. 3.2 sk.), atlikti citokino iRNR raiškos kinetinius tyrimus A-431 ląstelėse, nustatyti IL-1 α raiškos priklausomybę nuo vaistų dozės A-431 ir LLC ląstelėse iRNR ir baltymo lygiu.

3.4.1 IL-1 α iRNR pokyčiai

IL1A raiškos priklausomybės nuo laiko FP, Dox ir Tax bei jų deriniais veiktose ląstelėse tyrimams pasirinkome 1-24 val. laiko tarpą po švitinimo. Kinetinių tyrimų rezultatai parodė, kad Dox (CD25) ir Tax (CD60) nesukelia reikšmingų *IL1A* pokyčių A-431 ląstelėse (3.13 pav., A ir B atitinkamai). Statistiškai patikimas skirtumas (daugiau kaip 2 kartai) palyginus su kontrolinėmis ląstelėmis pastebėtas tik *IL1A/ACTB* atveju praėjus 8 val. po val. trukusios inkubacijos su taksoteru – 2,8 karto.



3.13 pav. *IL-1A* transkripto A-431 ląstelėse pokyčių kinetika po priešvėžinio poveikio.

Transkripto pokyčiai vertinti pagal *ACTB* (baltas apskritimas) ir *GAPDH* (juodas apskritimas).

A – ląstelės inkubuotos 24 val. su 50 ng/ml Dox,

B – ląstelės inkubuotos 24 su 2 ng/ml Tax,

C – ląstelės inkubuotos su 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC; po 18 val. ląstelės švitintos 1 min ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2),

D – iki švitinimo laikytasi FP schemos, tuoj po švitinimo į terpę dėta 50 ng/ml Dox.

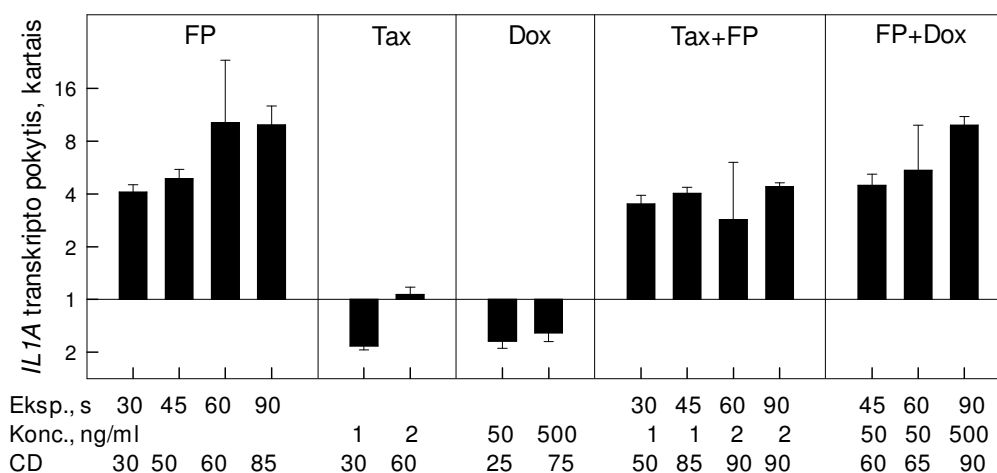
E - ląstelės su 2 ng/ml Tax inkubuotos 24 val. prieš švitinimą (6 val. terpėje su serumu ir 18 val. DMEM be serumo ir su 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC); ląstelės švitintos 1 min ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2).

Brūkšniai, $\pm\text{SN}$.

Tačiau po 24 val. šis skirtumas išnyko – 0,9 karto. FP buvo veiksmingas *IL1A* raiškos induktorius - FP (CD65), FP+Dox (CD70) ir Tax+FP (CD90) sukėlė reikšmingą *IL1A* raiškos padidėjimą (3.13 pav., C, D ir E atitinkamai), o didžiausias raiškos padidėjimas registruotas praėjus 8 val. po švitinimo: FP didino *IL1A* raišką 13/*ACTB* ir 16/*GAPDH* kartų, FP+Dox didino *IL1A* raišką 20/*ACTB* ir 18/*GAPDH* kartų, Tax+FP – 25/*ACTB* ir 13/*GAPD* kartų. Kadangi Tax ir Dox vieni nepadidino *IL1A* raiškos, manome, kad *IL1A* raiškos didėjimui reikšmingos buvo tik FP sukeltos pažaidos ląstelėse.

Ar stipresnis Dox ir Tax poveikis didina *IL1A* raišką? Kaip matyti 3.14 pav., praėjus 4 val. po švitinimo Tax ir Dox veiktose ląstelėse *IL1A* raiškos pokyčiai patikimai nesiskyrė nuo geno raiškos kontrolinėse ląstelėse.

Ar *IL1A* raiškos pokyčius lėmė skirtingos FP dozės? Ar citostatikai derinyje su FP reikšmingai keitė *IL1A* raišką? Ieškant atsakymo į šiuos klausimus, naudojome vienfaktorinės ANOVA metodą, *post hoc* kriterijų. FP ir Tax+FP vertinimo atveju, statistinė išvada buvo nevienareikšmė: vienfaktorinės ANOVA metodo pateiktas bendras atsakymas į šiuos klausimus buvo teigiamas ($p=0,04$), tačiau detalesnė analizė naudojant *post hoc* kriterijų



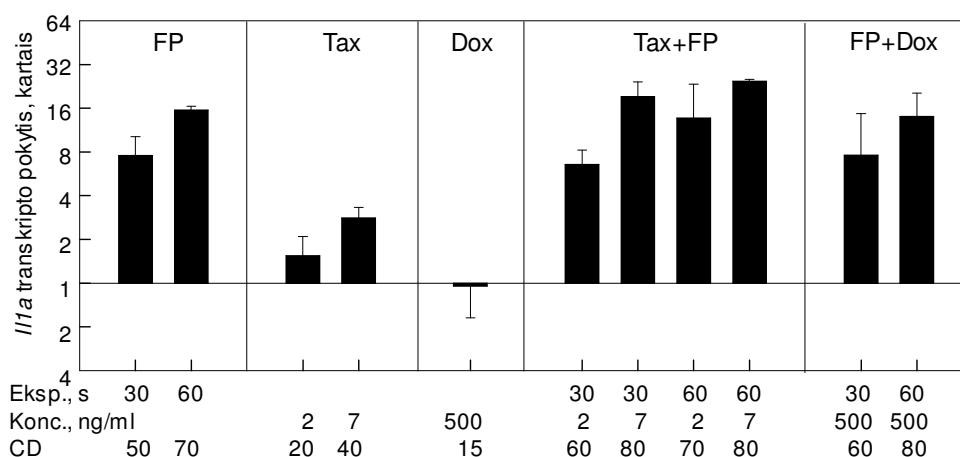
3.14 pav. *IL1A* transkripto A-431 ląstelėse pokyčio priklausomybė nuo poveikio stiprumo praėjus 4 val. po švitinimo.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV.

Brūkšniai, \pm SN.

parodė, kad A-431 ląstelėse skirtingos FP dozės ar skirtingos Tax+FP dozės reikšmingai nekeitė *IL1A* raiškos (visais atvejais $p > \alpha$). Lyginant FP ir Tax+FP, kai buvo naudotos tapačios FP dozės, pokyčiai taip pat nebuvo reikšmingi (visais atvejais $p > \alpha$). FP ir FP+Dox vertinimo atveju, vienfaktorinės ANOVA metodo pateikta bendra statistinė išvada buvo neigiama ($p=0,195$), kas reiškė, kad genų raiškos pokyčiai po poveikio skirtingomis FP+Dox dozėmis, ir lyginant FP su FP+Dox, kai buvo naudotos tapačios FP dozės, buvo nereikšmingi. Reikėtų atkreipti dėmesį, kad fotodinaminio poveikio CD50 *IL1A* raišką stimuliuo 2 kartus stipriau nei mažesnės dozės. Tačiau, kai FP, kurio citotoksinės dozės buvo didesnės nei 50, buvo kombinuotas su Tax (Tax+FP CD90), *IL1A* raiška sumažėjo 2 kartus.

O koks buvo citostatikų poveikis LLC ląstelėms? Ar bus patvirtintas *Il1a* raišką slopinantis Tax poveikis? Kaip matyti 3.15 pav., Tax poveikis priklausė nuo dozės: CD20 poveikis nebuvo reikšmingas, CD40 reikšmingai didino *Il1a* raišką. Tax+FP poveikis taip pat priklausė nuo Tax dozės: mažesnės dozės (CD50) FP derinys su didesne Tax doze (CD40) reikšmingai didino geno raišką lyginant su pavieniu FP ($p=0,003$, $\alpha=0,004$) ir jo derinio su mažesne Tax doze poveikiu ($p=0,002$, $\alpha=0,004$). Tačiau



3.15 pav. *Il1a* transkripto LLC ląstelėse pokytis praėjus 4 val. po FP.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,2 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant MTT.

Brūkšniai, \pm SN.

panašaus gyvybingumo, bet skirtingai veiktų ląstelių lyginimas vertė suabejoti *IIIa* raišką skatinančiu Tax poveikiu: Tax+FP (CD70) ir FP (CD70) veiktose ląstelėse *IIIa* raiška buvo panaši.

Dox nesukėlė reikšmingų *IIIa* raiškos pokyčių LLC ląstelėse tiek veikdamas vienas, tiek derinyje su FP ($p=0,098$).

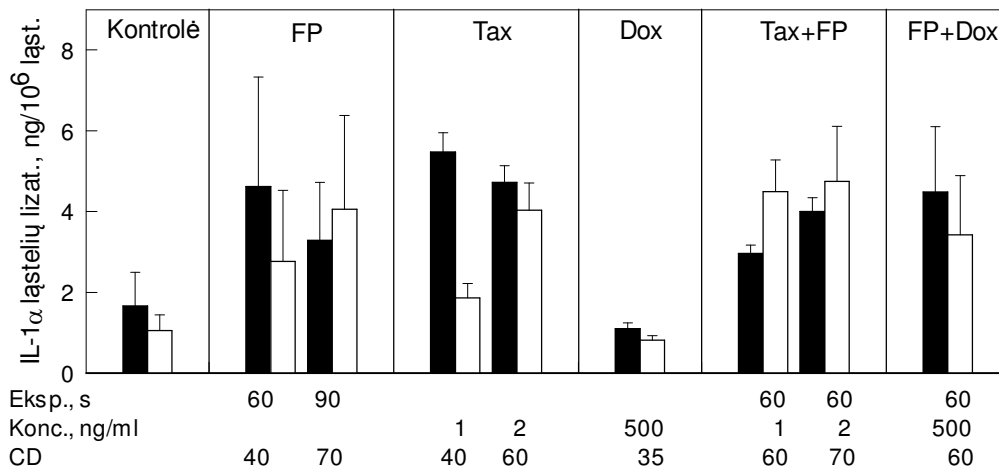
Apibendrinami tyrimų A-431 ir LLC ląstelėse rezultatus, galime pasakyti, kad, kaip VEGF atveju, tik FP reikšmingai indukavo IL-1 α geno raišką abiejų linijų ląstelėse.

3.4.2 IL-1 α baltymo raiška

IL-1 α baltymo raišką A-431 ląstelėse tyrėme imunofermentinės analizės ir fluorescencinės mikroskopijos būdais. Baltymo kiekius ląstelėse ir jų kultivavimo terpėse nustatėme praėjus 6 ir 24 val. po švitinimo.

Naudodami rekombinantinį žmogaus IL-1 α baltymą nustatėme, kad mažiausia IL-1 α koncentracija, kurią galėjome registruoti imunofermentiniu metodu *ELISA*, buvo 8 pg/ml. Eksperimento pakartojimų variacijos koeficientai neviršijo 15%.

Visais atvejais po vien FP, FP+Dox arba Tax+FP ir vien Tax poveikio IL-1 α kiekis ląstelėse buvo didesnis negu neveiktose ląstelėse (3.16 pav.). Beveik visais atvejais šie skirtumai buvo statistiškai reikšmingi, išskyrus mažesnės koncentracijos (1 ng/ml) Tax ir FP derinio poveikį 6 val. po švitinimo (4 priedas, 1 lent.) ir mažesnės koncentracijos (1 ng/ml) Tax poveikį 24 val. po švitinimo (4 priedas, 2 lent.). Įdomu, kad vien Dox poveikis sumažino IL-1 α baltymo raišką, tačiau derinyje su FP, Dox poveikis nekeitė citokino raiškos praėjus 6 val. po švitinimo (4 priedas, 1 lent.), o praėjus 24 val. po švitinimo FP+Dox labiau skatino IL-1 α raišką nei vienas FP (4 priedas, 2 lent.). Reikėtų pažymėti, kad praėjus 6 val. po švitinimo, nebuvo pastebėta statistiškai patikima IL-1 α baltymo kiekio ląstelėse priklausomybė nuo papildomo Dox ar Tax poveikio fotodinamiškai veiktoms ląstelėms. Tačiau praėjus 24 val. po švitinimo, nustatytas statistiškai patikimai didesnis



3.16 pav. IL-1 α baltymo kiekis A431 ląstelių lizatuose praėjus 6 val. (juodi stulpeliai) ir 24 val. (balti stulpeliai) po FP.

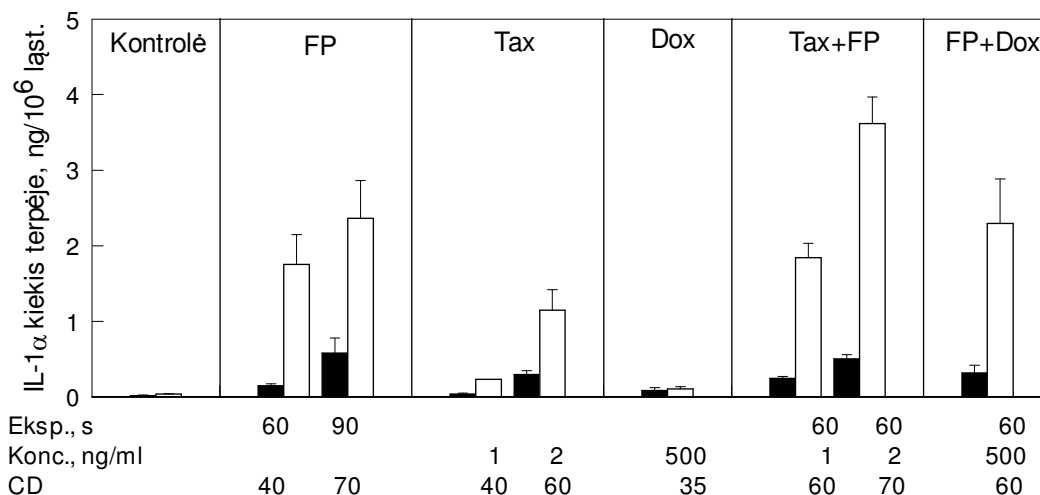
Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV. Brūkšniai, \pm SN.

IL-1 α baltymo kiekis ląstelėse po kombinuoto poveikio (FP derinio su 2 ng/ml Tax) negu po vieno FP (4 priedas, 2 lent.).

Apibendrinant rezultatus, gautus matuojant IL-1 α baltymo kiekį A-431 ląstelių lizatuose, reikėtų pabrėžti, kad FP didina IL-1 α baltymo kiekį ląstelėse, vienas Dox – mažina, vienas Tax - didina, o deriniuose citostatikai neturi reikšmingos įtakos IL-1 α raiškai.

Kokie buvo IL-1 α baltymo kiekio pokyčiai A-431 ląstelių kultivavimo terpėje? Praėjus 6 val. po švitinimo (3.17 pav.), tik CD70 poveikį patyrusių ląstelių kultivavimo terpėse nustatyta statistiškai patikimai didesnė IL-1 α baltymo koncentracija (4 priedas, 3 lent.). Tuo tarpu praėjus 24 val. po švitinimo, didelė dalis bendro IL-1 α baltymo kiekio aptinkama FP ir kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių kultivavimo tarpėje (4 priedas, 3 lent.).

Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad IL-1 α sekrecija iš A-431 ląstelių yra citotoksinio poveikio indukuojamas procesas. FP buvo stipriausias IL-1 α sekrecijos induktorius. Parodyta, kad dėl oksidacinio streso iš ląstelių išėjęs IL-1 α gali valdyti naviko genezę lemiančius vyksmus (Sakurai et al., 2008).



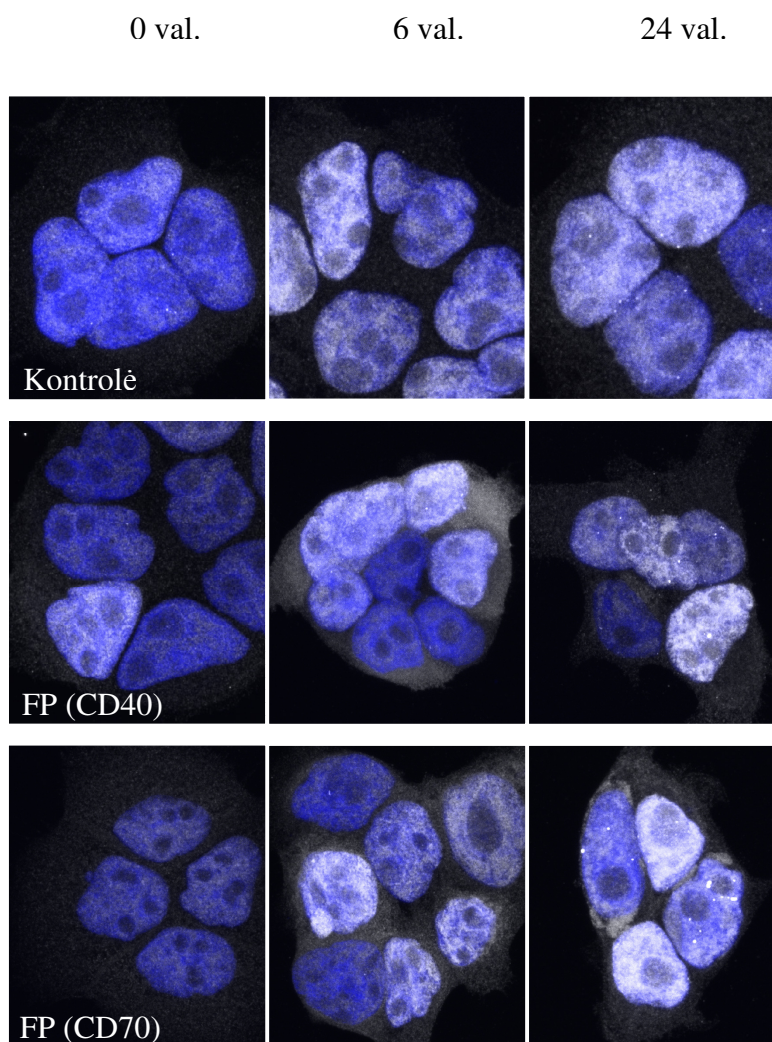
3.17 pav. IL-1 α baltymo kiekis A431 ląstelių terpėje praėjus 6 val. (juodi stulpeliai) ir 24 val. (balti stulpeliai) po FP.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta Tax, po 6 val. – 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2), ir pridėta Dox; gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV.

Brūkšniai, \pm SN.

Kitaip nei VEGF, IL-1 α neturi siuntimo į endoplazminį tinklą sekos ir sekretuojamas alternatyviu keliu (Prudovsky et al., 2008). Kita vertus, šis citokinas retai būna sekretuojamas, ir iš ląstelių jis išeina tik dėl stipraus uždegimo metu sukeltų pažeidimų (apžv. (Dinarello, 1996)).

Be to, žinoma, kad IL-1 α turi kreipimo į branduolį seką. Parodyta, kad žinduolių ląstelių branduolyje esantis IL-1 α gali skatinti ląstelių proliferaciją (Hu et al., 2003) ir piktybėjimą (Stevenson et al., 1997). O kur IL-1 α kaupiasi A-431 ląstelėse, neveiktose ir po FP? Fluorescenciniu mikroskopu buvo matyti, kad A-431 ląstelėse IL-1 α lokalizuojasi ne tik citozolyje, bet ir branduolyje (3.18 pav.). FP veiktų ląstelių citozolyje stebėjome ypač gausų citokino kiekį praėjus 6 val. po švitinimo. Tačiau praėjus 24 val. po švitinimo, stebėjome mažesnę IL-1 α kiekį ląstelių citozolyje. *ELISA* metodu nustatėme, kad IL-1 α kaupėsi ląstelių kultivavimo terpėje, ir po 24 val. jo kiekis buvo didžiausias. Manome, kad dėl šios priežasties stebėjome mažesnę IL-1 α kiekį ląstelių citozolyje praėjus 24 val. po švitinimo, lyginant su 6 val. po švitinimo.



3.18 pav. IL-1 α baltymo lokalizacija A431 ląstelėse praėjus 6 val. ir 24 val. po FP.

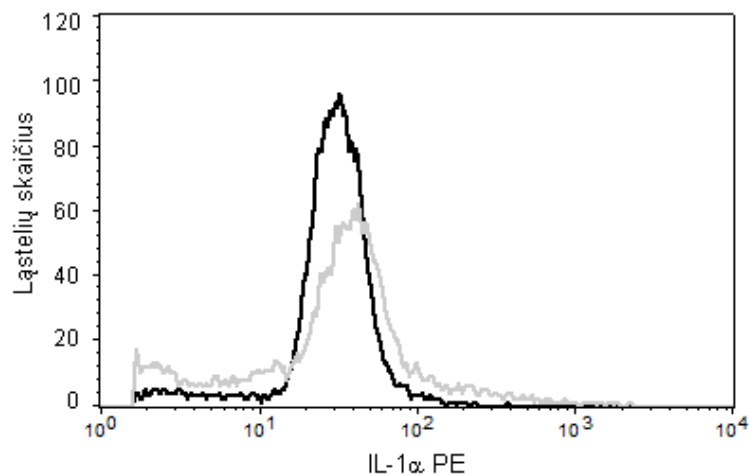
Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta – 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos 60s (CD40) ir 90s (CD70) ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²); gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV. IL-1 α baltymo lokalizacija ląstelėse stebėta 0, 6 ir 24 val. po švitinimo (žiūr. virš paveikslėlių) Leica SP5 mikroskopu. Mėlyna - branduoliai dažyti DAPI ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=405/406\text{-}535$ nm), balta - IL-1 α molekulių žymėtos monokloniniu antikūnu prieš žmogaus IL-1 α , kuris sujungtas su NL637 žymėtu antriniu antikūnu ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=633/640\text{-}700$ nm).

IL-1 α baltymo LLC ląstelėse ir jų kultivavimo terpėse nepavyko apčiuopti imunofermentinės analizės būdu. Naudodami rekombinantinį pelės IL-1 α baltymą nustatėme, kad mažiausia IL-1 α koncentracija, kurią galėjome registruoti imunofermentiniu metodu *ELISA*, buvo 62,5 pg/ml. LLC ląstelės gamina mažiau IL-1 α nei A-431 ląstelės: kiekybinės PGR metodu nustatėme,

kad LLC ląstelėse transkripto kiekio kreivė kirto slenkstinį ciklą 10-12 ciklų vėliau nei A-431 ląstelėse. Be to, *ELISA* metodas žmogaus IL-1 α buvo apie 8 kartus jautresnis nei pelės IL-1 α . Manome, kad dėl šių priežasčių nepavyko apčiuopti IL-1 α baltymo LLC ląstelėse šiuo metodu.

Tėkmės citometrijos metodu, naudojant PE žymėtą antikūną prieš pelės IL-1 α , pavyko užregistruoti citokiną IL-1 α kontrolinėse ir FP veiktose ląstelėse (3.19 pav.). Rezultatų statistinė analizė parodė, kad praėjus 24 val. po švitinimo, FP didina IL-1 α kiekį ląstelėse: kontrolinėse ląstelėse vidutinė PE fluorescencijos santykinų vienetų reikšmė buvo 32, o FP patyrusiose ląstelėse - 59.

Apibendrinant IL-1 α pokyčių po citotoksinių poveikių A-431 ir LLC ląstelėse tyrimų rezultatus, reikėtų pabrėžti, kad baltymo raiškos duomenys iš esmės atitinka anksčiau gautus iRNR kiekio matavimo duomenis.



3.19 pav. IL-1 α baltymo pokyčiai LLC ląstelėse praėjus 24 val. po FP.

Į ląstelių inkubavimo terpę pridėta – 0,2 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos 60s (CD60) ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm²); gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant MTT. IL-1 α baltymo pokyčiai ląstelėse registruoti 24 val. po švitinimo BD FACS Calibur tėkmės citometru. Juoda kreivė - kontrolinės ląstelės, pilka kreivė - FP patyrusios ląstelės. Viduląstelinės IL-1 α molekules žiurkėno monokloniniu antikūnu prieš pelės IL-1 α , kuris sujungtas su fikoeritrino (PE) žyme ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=488/550-600$ nm).

Kaip ir VEGF atveju, FP buvo svarbiausias veiksnys, skatinantis IL-1 α raišką. Apžvelgtos literatūros (žiūr. 1.2.2 sk.) duomenys rodo, kad IL-1 α raiškos padidėjimas gali būti nepalankus naviko augimo po FP prognozei. Iš to sektų, kad prasminga suderinti fotodinaminę terapiją su vaistais, slopinančiais šio citokino funkcijas. Citokinių tyrimai *in vitro* negali patvirtinti ar paneigti šios prielaidos. Šias abejones galėtų išsklaidyti tik tyrimai *in vivo*.

3.4.3 IL-1 α poveikis VEGF raiškai*

Nustatyta, kad VEGF yra susijęs su IL-1 α : stimuliuojant žmogaus hipofizės adenomos ląsteles egzogeniniu IL-1 α , jos gamina daugiau VEGF (Borg et al., 2005). VEGF iRNR koncentracijos didėjimą skatinantis IL-1 α poveikis užregistruotas ir odos ląstelėse (Boivin et al., 2006). Gal būt dėl šios priežasties mūsų gauti VEGF baltymo raiškos pokyčiai labai panašūs į IL-1 α baltymo pokyčius. MH ląstelėse, kurios nesintezuoja IL-1 α baltymo, mūsų nustatyta pastovi VEGF raiška, kurios neveikia terapiniai poveikiai, sukeltys raiškos pokyčius kitose ląstelėse, būtų dar vienas argumentas, patvirtinantis IL-1 α svarbą VEGF raiškai.

Citokino IL-1 α svarbą VEGF baltymo raiškai A-431 ląstelėse tyrėme dviem būdais: mažindami ir didindami IL-1 α kiekį.

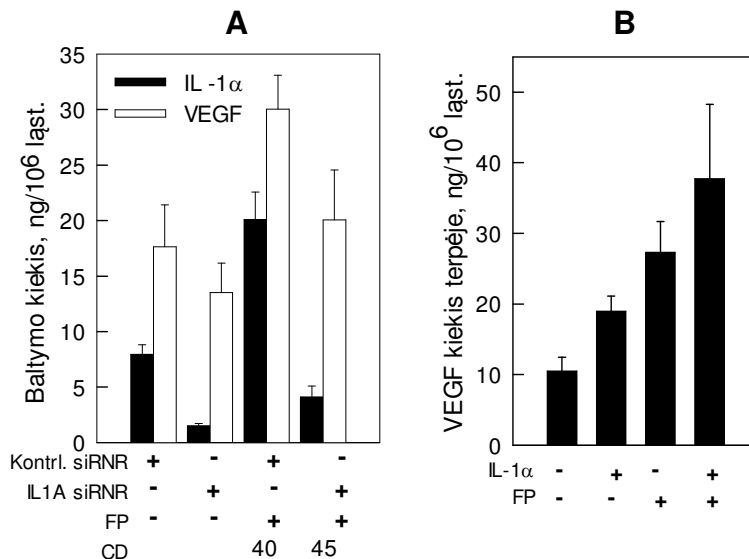
Pirmiausia ląsteles transfekavome chemiškai susintetintomis siRNR ir tokiu būdu nuslopiname *IL1A* raišką. ELISA metodu įvertiname baltymo raišką ląstelėse, transfekuotose *IL1A* slopinančiomis siRNR. Ryškiausias IL-1 α kiekio sumažėjimas nustatytas ląstelėse, transfekuotose IL-1145 siRNR. Šiose ląstelėse IL-1 α baltymo raiška sumažėjo ~ 80%, lyginant su neigiama kontrole (3.20 pav., A).

Nuslopinus *IL1A*, tolesnis mūsų uždavinys buvo nustatyti baltymo IL-1 α kiekį bei VEGF raiškos pokytį po fotodinaminio poveikio ląstelėse su sumažintu IL-1 α kiekiu. VEGF raišką tyrėme praėjus 24 val. po FP (3.20 pav., A). Nustatėme, kad praėjus 24 valandoms po švitinimo ląstelėse su sumažintu IL-

* Transfekciją chemiškai susintetintomis siRNR atliko Neringa Vėželytė

1 α kiekiu VEGF baltymo sekrecija sumažėjo tiek FP nepatyrusiose, tiek FP patyrusiose ląstelėse, tačiau statistiškai reikšmingai VEGF sekrecija sumažėjo tik FP patyrusiose ląstelėse ($p=0,01$).

Ar egzogeninis IL1 α svarbus VEGF raiškai? Vertinome į terpę pridėto (rekombinantinio) rIL-1 α įtaką VEGF kiekiui (3.20 pav., B). Nustatėme, jog rIL-1 α skatino VEGF raiškos padidėjimą kontrolinėse ląstelėse, praėjus 6 val. po poveikio, o skirtumas buvo statistiškai patikimas ($p<0,001$). FP atveju, lyginant VEGF kiekius, praėjus 6 val. po poveikio, egzogeniniu IL-1 α stimuliuotose ir nestimuliuotose ląstelėse, VEGF buvo daugiau stimuliuotose ląstelėse, ir skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,006$).



3.20 pav. Citokino IL-1 α poveikis VEGF baltymo kiekio A431 ląstelių terpėje pokyčiui.

A – IL1A slopinančios siRNR poveikis VEGF baltymo kiekio ląstelių terpėje pokyčiui: į terpę pridėta IL1A slopinančios siRNR, po 4-6 val. į terpę įpilta 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, dar po 18 val. ląstelės švitintos 1 min ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2), VEGF baltymo kiekis terpėje ir IL-1 α kiekis ląstelių lizatuose matuotas ELISA metodu praėjus 24 val. po FP.;

B –rekombinantinio IL-1 α poveikis VEGF baltymo kiekio pokyčiui: ląstelės inkubuotos su 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mTHPC, po 18 val. ląstelės švitintos 1 min ($\lambda=660 \pm 20$ nm, 1,6 mW/cm^2) ir pridėta 5 ng/ml rekombinantinio IL-1 α , VEGFA baltymo kiekis terpėje matuotas ELISA metodu praėjus 6 val. po FP. Gyvybingumas matuotas po 24 val. dažant KV.

Brūkšniai, \pm SN.

Mūsų gauti siRNR tildymo ir inkubacijos su egzogeniniu IL-1 α duomenys patvirtino prielaidą, jog IL-1 α yra vienas iš veiksnių, skatinančių VEGF raišką, kas yra palanku navikų augimui.

3.5 PDT stimuliuota VEGF ir IL-1 α raiška pelių LLC navikuose

Tyrimų *in vitro* metu gauti rezultatai rodė, kad PDT buvo pagrindinis veiksnys skatinantis citokinų VEGF ar IL-1 α raišką. Šių citokinų svarbą navikų augimui galėjome nustatyti tik atlikę eksperimentus *in vivo*.

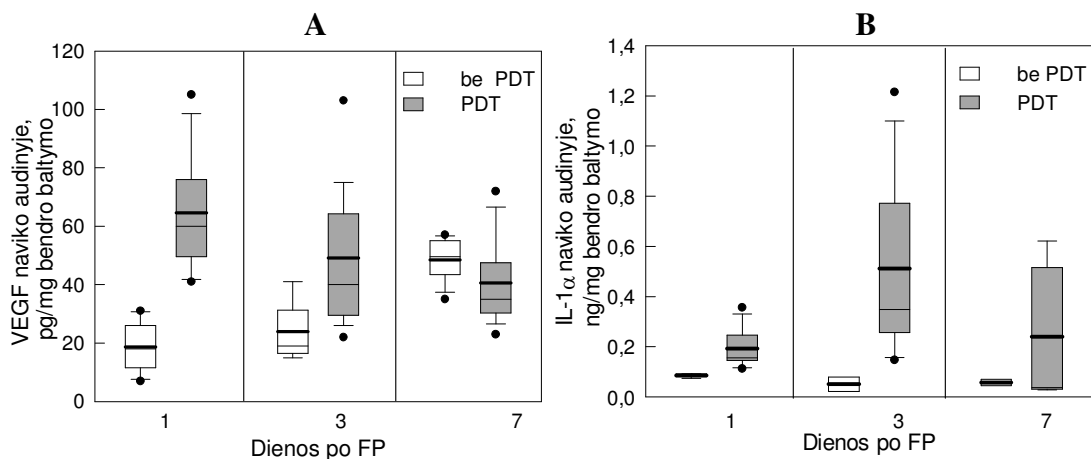
Pirmiausia reikėjo iširti kaip laikui bėgant kinta šių citokinų raiška niekuo negydytų pelių navikuose ir PDT gydytų pelių navikuose. Todėl šiame darbe tyrėme VEGF (3.21 pav., A) ir IL-1 α (3.21 pav., B) pokyčius LLC navikuose praėjus 1, 3 ir 7 dienoms po PDT. Pelėms buvo suleista 0,25 mg/kg mTHPC tirpalo ir po 24 val. navikai buvo švitinti 120 J/cm² doze. Eksperimentų rezultatus vertinome vienfaktorinės ANOVA metodu.

Imunofermenitiniu metodu ELISA nustatėme, jog PDT indukuoja laikiną VEGF raiškos padidėjimą LLC navikuose, o negydytų pelių navikuose VEGF raiška didėja augant navikams (3.21 pav., A).

Praėjus vienai dienai po švitinimo VEGF raiška 4 kartus padidėjo PDT gydytų pelių navikuose (65 ± 6 pg/mg bendro baltymo) lyginant su PDT negydytomis pelėmis (17 ± 3 pg/mg bendro baltymo).

Trečią dieną po terapijos PDT gydytose pelėse citokino raiška mažėjo (49 ± 6 pg/mg bendro baltymo), o PDT negydytuose navikuose VEGF raiška nežymiai padidėjo (24 ± 5 pg/mg bendro baltymo).

Septintą dieną po švitinimo, gydytų ir negydytų pelių navikuose VEGF raiškos lygis suvienodėja ($p=0,19$), t.y. gydytose pelėse VEGF raiškos indukcija reikšmingai sumažėja lyginant su pirmąja diena ($p=0,005$), o negydytose pelėse augant navikui VEGF raiška reikšmingai padidėja lyginat su pirmąja diena po PDT ($p<0,001$).



3.21 pav. VEGF ir IL-1 α pokyčiai po PDT *in vivo*.

A - VEGF raiška LLC navikuose *in vivo* po PDT;

B - IL-1 α raiška LLC1 navikuose *in vivo* po PDT.

Baltymo kiekiai tirti imunofermenitiniu metodu praėjus 1,3 ir 7 dienoms po PDT. Tyrimui naudotos pelės su LLC navikais: balti stačiakampiai – PDT negydytos pelės, pilki stačiakampiai – PDT gydytos pelės. Stačiakampio riba, artimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 25-tą procentilį; stačiakampyje esančios linijos žymi: plona - 50-tą procentilį, stora - vidurkį; stačiakampio riba, tolimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 75-tą procentilį; stačiakampio apačioje ir viršuje brūkšniai žymi 10-tą ir 90-tą procentilius; juodi taškai - už duomenų aibės 10-to ir 90-to procentilių ribos esančios reikšmės.

Šio tyrimo rezultatai parodė, kad praėjus parai po PDT, VEGF baltymo kiekis reikšmingai padidėja naviko ląstelėse ($p < 0,001$), tačiau jau trečią dieną po PDT baltymo indukcija mažėja lyginant su pirmąja diena ($p = 0,08$), bet vis dar reikšmingai skiriasi nuo kontrolinių pelių ($p = 0,04$).

Imunofermenitiniu metodu *ELISA* bandėme registruoti IL-1 α baltymą LLC navikuose. Reikėtų pažymėti, kad naudodami šį metodą LLC ląstelėse *in vitro*, IL-1 α raiškos pokyčių po priešvėžinio poveikio nepastebėjome. *In vivo* citokininų biosintezė vyksta ne tik vėžinėse, bet kitose su naviku susijusiose ląstelėse. Vėžinės ir kitos su naviku susijusios ląstelės gali vienos kitas skatinti gaminti citokinus. Tai galėtų lemti didesnę IL-1 α raišką *in vivo*, ir mes tikėjomės apčiuopti šį baltymą navikuose.

Ir iš tikrųjų, nustatėme, jog PDT reikšmingai didino IL-1 α raišką pelių LLC navikuose, kai negydytų pelių navikuose IL-1 α raiška išliko nepakitusi 1-7 dienas po švitinimo (3.21 pav., B).

Praėjus vienai dienai po švitinimo, IL-1 α raiška maždaug 2 kartus padidėjo PDT gydytose pelėse (193 ± 24 pg/mg bendro baltymo) lyginant su PDT negydytomis pelėmis (86 ± 7 pg/mg bendro baltymo). Trečią dieną po terapijos PDT gydytose pelėse citokino raiška reikšmingai padidėjo (512 ± 116 pg/mg bendro baltymo) lyginant su pirmąja diena ($p=0,009$). Septintą dieną po terapijos PDT gydytose pelėse citokino raiška, lyginant su trečiąja diena, vidutiniškai sumažėjo 2 kartus (iki 239 ± 129 pg/mg bendro baltymo), tačiau dėl didelės duomenų sklaidos šis skirtumas nebuvo statistiškai patikimas ($p=0,069$). PDT negydytuose navikuose IL-1 α kiekis nereikšmingai svyravo ($p=0,102$) praėjus 1, 3, ir 7 dienoms po švitinimo. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad, praėjus vienai ir trimis dienoms po PDT, IL-1 α baltymo kiekis buvo reikšmingai didesnis PDT gydyto naviko ląstelėse ($p=0,002$ ir $p=0,031$) lyginant su negydytais navikais, tačiau septintą dieną po PDT baltymo kiekiai abejuose grupėse statistiškai nesikyrė ($p=0,254$).

3.6 Eksperimentinis PDT derinimas su imunoterapija, slopinančia VEGF ir IL-1 α

Nustatėme, kad mTHPC-PDT veiktuose LLC navikuose padidėja navikų augimui palanki, t.y. gydymui nepalanki citokinų VEGF ir IL-1 α raiška, kas siūlė PDT derinti su VEGF ar IL-1 α slopinančiais veiksniais. Todėl šio darbo metu siekėme įvertinti VEGF ir IL-1 α svarbą navikų augimui.

Fotodinaminė terapija gali sukelti stiprų imuninį atsaką, kuris gali būti žalingas organizmui (Gollnick et al., 2003). Po fotodinaminio poveikio gali padidėti citokinų IL-1, IL-6, IL-10 ir TNF raiška. Yra duomenų, kad IL-1 α gali būti svarbus angiogenezės procesams. IL-1 α raišos pokyčiai po fotodinaminio poveikio labai mažai tirti (žiūr. 1.2.2 sk.).

Kraujagyslių susidarymas yra būtina naviko augimo ir invazijos sąlyga (Folkman, 1995). Normalios organizmo kraujagyslių endotelio ląstelės gali

egzistuoti be VEGF, nes kraujagyslių stabilumą užtikrina pericitai. Naujai susidariusios naviko kraujagyslės dar neturi pericitų ir jų endotelio ląstelėms nuolat būtinas VEGF. Navikuose yra padidėjusi VEGF ir kitų angiogenezės stimuliatorių koncentracija (Ferrara, 1999). Todėl daug dėmesio skiriama VEGF raiškos pokyčių po PDT tyrimams (žiūr. 1.2.1 sk.).

Žinoma, kad VEGF aktyvina VEGF receptorius 1 ir 2 (VEGFR1 ir VEGFR2). VEGFR1 dažniausiai sutinkamas ne endotelio ląstelėse, pavyzdžiui: monocituose, ir gali valdyti šių ląstelių chemotaksį (Barleon et al., 1996). VEGFR1 labiausiai yra giminingas VEGF ir PlGF molekulėms.

Žinoma, kad su VEGFR2 gali jungtis tik 110-165 aminorūgščių ilgio žmogaus VEGF izoformos (Roskoski, 2007). VEGF aktyvintas receptorių skatina endotelio ląstelių migraciją, proliferaciją, išgyvenimą ir didina kraujagyslių pralaidumą.

Nors VEGF yra mažiau giminingas VEGFR2 nei VEGFR1, VEGFR2 veikia kaip labai aktyvi kinazė, todėl manoma, kad šis receptorių yra svarbiausias angiogenezei. Tuo tarpu, VEGFR1 kinazinis aktyvumas yra visa eile mažesnis nei VEGFR2 (Waltenberger et al., 1994). VEGFR1 vaidmuo navikų augimui yra neaiškus, tačiau manoma, kad viena iš VEGFR1 funkcijų yra surišti VEGF ir tokiu būdu neleisti jam jungtis su VEGFR2 (Park et al., 1994; Tanaka et al., 1997).

Taip pat yra duomenų, kad tiek abu receptorių, tiek VEGF ir PlGF gali sieti tarpmolekulinė ar net vidumolekulinė sąveikos, todėl šios molekulės gali sustiprinti viena kitos veikimą (žiūr. 1.3.2 sk.).

3.6.1 PDT derinimas su imunoterapija, slopinančia VEGF

VEGF slopinimo atveju, dvi dienas iš eilės pelėms buvo suleista po 10 µg tirpaus VEGF receptoriaus 1 (tVEGFR1) arba VEGF (164 ir 120 aminorūgščių ilgio izoformas) neutralizuojančio antikūno. Antikūnas prieš VEGF-120 ir VEGF-164 turėtų trukdyti aktyvinti angiogenezei svarbiausią receptorių VEGFR2. Tirpus VEGFR1 turėtų varžytis su VEGFR2 ir VEGFR1 sąveikojant su citokinu.

Citokino raišką slopinančių veiksnių dozės buvo pasirinktos remiantis VEGF raiškos pokyčių LLC navikuose po spindulinės terapijos ir imuninės terapijos tyrimų rezultatais (Gorski et al., 1999). Citokinių slopinimui pasirinkome imunoglobulino G (IgG) izotipo veiksnį, todėl teigiama kontrole buvo pasirinktas citokinams nesavitas IgG.

PDT atveju pelėms buvo suleista 0,25 mg/kg mTHPC ir po 24 val. pelių navikai buvo švitinti 120 J/cm² doze. PDT dozė buvo pasirinkta atlikus eilę pradinių eksperimentų (duomenys nepateikti).

PDT ir imuninės terapijų derinimo atveju, iki navikų švitinimo laikytasi PDT eksperimentų schemas. tVEGFR1 arba VEGF neutralizuojančio antikūno pelėms buvo suleista praėjus 24 val. ir 48 val. po švitinimo. Pelių navikų tūris buvo matuotas tris kartus per savaitę. Eksperimentų rezultatai buvo vertinti vienfaktorinės ANOVA metodu.

Navikų tūrio pokyčius po imuninės terapijos lyginome su IgG veiktų pelių navikų tūriais (3.22 pav.). Navikų tūrių pokyčius po imuninės terapijos ir jos derinio su PDT lyginome su PDT+IgG* veiktų pelių navikų tūriais. Reikėtų pabrėžti, kad IgG veiktų pelių navikų tūriai statistiškai patikimai nesiskyrė nuo niekuo neveiktų pelių navikų tūrių, kaip ir PDT+IgG patyrusių pelių navikų tūriai statistiškai patikimai nesiskyrė nuo PDT patyrusių pelių navikų tūrių.

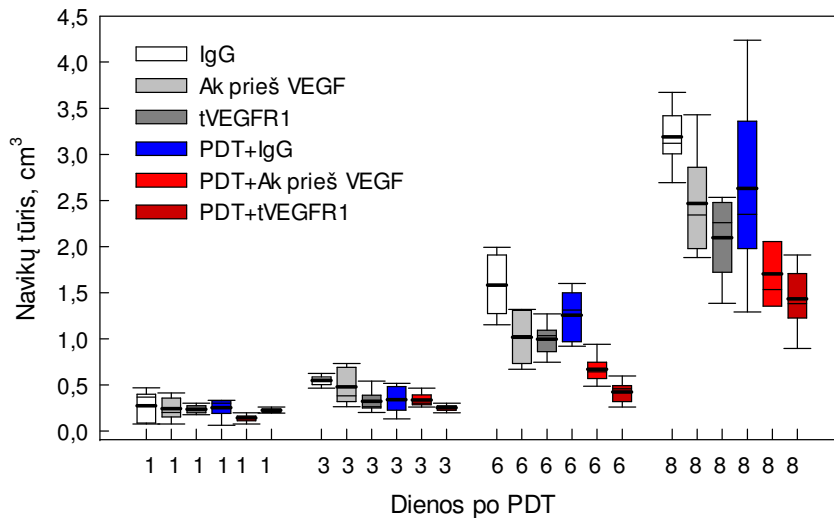
Ryškesni skirtumai tarp eksperimente dalyvavusių pelių grupių stebėti trečią dieną po švitinimo (3.22 pav.): pavienius tVEGFR1 arba antikūno prieš VEGF poveikius patyrusių pelių navikų tūriai buvo mažesni nei IgG grupės, bet navikų tūrio pokyčiai nebuvo statistiškai patikimi ($p=0,135$, kai $\alpha=0,05$). Trejeto iš penkių gyvūnų, patyrusių antikūno prieš VEGF poveikį, navikai buvo vidutiniškai 40% mažesni nei IgG veiktų pelių navikai, o dviejų pelių navikai buvo panašūs į IgG veiktų pelių navikus (5 priedas, 1 lent.). tVEGFR1 vidutiniškai 51% sumažino keturių iš penkių pelių navikus. PDT+tVEGFR1 arba PDT+Ak-VEGF kombinuotus poveikius patyrusių pelių navikų tūriai

* PDT ir IgG derinį toliau žymėsime PDT+IgG, PDT ir tVEGFR1 derinį toliau žymėsime PDT+tVEGFR1, PDT ir antikūno prieš pelės VEGF derinį toliau žymėsime PDT+Ak-VEGF, o PDT ir antikūno prieš pelės IL-1 α derinį - PDT+Ak-IL-1 α

buvo mažesni nei PDT+IgG poveikį patyrusių pelių, bet statistiškai patikimo skirtumo nebuvo ($p=0,445$, kai $\alpha=0,05$). PDT+IgG slopino vidutiniškai 38 % navikų augimą lyginant su IgG, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ($p=0,011$, kai $\alpha=0,002$). Tačiau tVEGFR1 reikšmingai sustiprino PDT poveikį lyginant su IgG veiktų pelių navikais ($p<0,001$, kai $\alpha=0,002$), ir derinio poveikis vidutiniškai 54% slopino navikų augimą (5 priedas, 1 lent.).

Šeštą dieną po švitinimo VEGF slopinančių veiksnių poveikiai buvo panašūs: tVEGFR1 slopino navikų augimą vidutiniškai 37 % ($p=0,006$, kai $\alpha=0,009$), o antikūnas prieš VEGF slopino navikų augimą 36 % ($p=0,007$, kai $\alpha=0,01$) (5 priedas, 1 lent.). Keturių iš penkių pelių navikų tūrius PDT+IgG mažino 26% ($p=0,11$, kai $\alpha=0,004$), tačiau imuninė terapija reikšmingai sustiprino PDT poveikį navikams: PDT+tVEGFR1 ir PDT+Ak-VEGF patyrusių pelių navikai buvo statistiškai patikimai mažesni nei PDT+IgG grupės ($p<0,001$, kai $\alpha=0,009$ ir $p<0,001$, kai $\alpha=0,010$). PDT+tVEGFR1 poveikis buvo didesnis (TGI=73%) nei PDT+Ak-VEGF (TGI=58%), bet šis skirtumas nebuvo reikšmingas ($p=0,058$, kai $\alpha=0,025$).

Aštuntą dieną po PDT, pavieniai tVEGFR1 ir antikūno prieš VEGF poveikiai buvo panašūs: tVEGFR1 poveikis keturių iš penkių pelių navikus slopino 34% ($p=0,007$, kai $\alpha \geq 0,009$), antikūno prieš VEGF poveikis keturių iš penkių pelių navikus slopino 30% ($p=0,06$, kai $\alpha \geq 0,01$) (5 priedas, 1 lent.).



3.22 pav. LLC navikų *in vivo* tūrių dinamika po PDT ir / arba angiogenezės slopinimo.

Imuninei terapijai naudoti tVEGFR1, antikūnas (Ak) prieš VEGF-120 ir VEGF-164. Stačiakampio riba, artimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 25-tą procentilį; stačiakampyje esančios linijos žymi: plona - 50-tą procentilį, stora - vidurkį; stačiakampio riba, tolimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 75-tą procentilį; stačiakampio apačioje ir viršuje brūkšniai žymi 10-tą ir 90-tą procentilius.

PDT+IgG poveikis trijų iš penkių pelių slopino navikų augimą vidutiniškai 39 %. Lyginant PDT+IgG su PDT+tVEGFR1 arba PDT+Ak-VEGF, tarp navikų tūrių statistiškai patikimo skirtumo nebuvo ($p=0,07$, kai $\alpha=0,05$). Lyginant su IgG veiktų pelių navikais, statistiškai patikimas navikų slopinimas išliko po PDT+Ak-VEGF ($p=0,002$, kai $\alpha=0,003$) ir PDT+tVEGFR1 ($p<0,001$, kai $\alpha=0,002$) poveikių: PDT+Ak-VEGF poveikis 47% slopino navikų augimą, o PDT+tVEGFR1 poveikis 55% slopino navikų augimą.

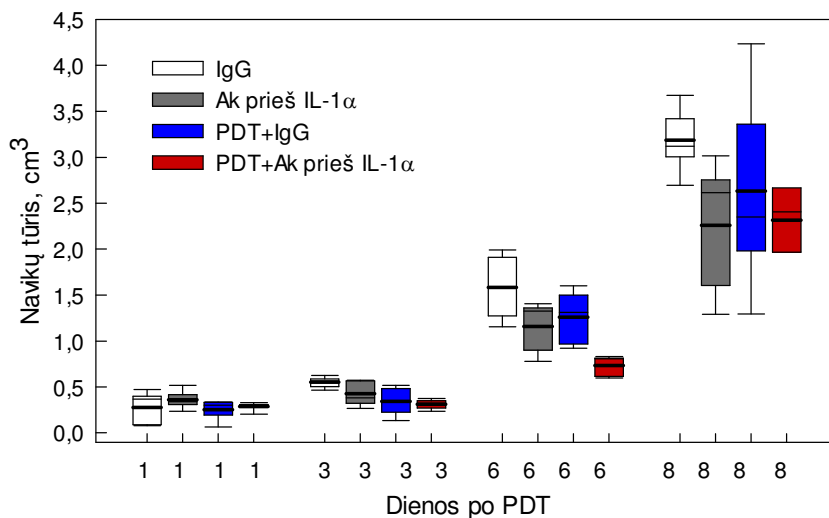
tVEGFR1 poveikis tik vidutiniškai apie 10% stipriau slopino navikų augimą nei antikūnas prieš VEGF-120 ir VEGF-164, kas rodo, jog LLC navikų augimui svarbiausios VEGFR2 aktyvinančios VEGF izoformos.

3.6.2 PDT derinimas su imunoterapija, slopinančia IL-1 α

PDT derinimo su IL-1 α slopinančia imunoterapija *in vivo* tyrimai atlikti analogiškai VEGF slopinimo LLC navikuose po PDT su mTHPC tyrimams

(žiūr. 3.6.1 sk.). IL-1 α slopinimo atveju pelėms buvo suleista po 10 μ g šį citokiną neutralizuojančio antikūno praėjus 24 val. ir 48 val. po švitinimo. Navikų tūrio pokyčius po imuninės terapijos lyginome su IgG veiktų pelių navikų tūriais (3.23 pav.). Pelių navikų tūrių pokyčius po PDT+Ak- IL-1 α lyginome su PDT+IgG veiktų pelių navikų tūriais.

Kaip minėta, ryškesni pelių navikų skirtumai po terapinių poveikių stebėti trečią dieną po švitinimo (3.23 pav.). Trejeto iš penkių gyvūnų, patyrusių antikūno prieš IL-1 α poveikį, navikai buvo vidutiniškai 40% mažesni nei IgG veiktų pelių navikai ($p=0,135$, kai $\alpha=0,05$) (5 priedas, 1 lent.). PDT+Ak- IL-1 α poveikis, panašiai kaip ir PDT+IgG poveikis ($p=0,445$, kai $\alpha=0,05$), vidutiniškai slopino navikų augimą 44%.



3.23 pav. LLC navikų *in vivo* tūrių dinamika po PDT ir / arba IL-1 α slopinimo.

Imuninei terapijai naudoti antikūnai (Ak) prieš IL-1 α . Stačiakampio riba, artimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 25-tą procentilį; stačiakampyje esančios linijos žymi: plona - 50-tą procentilį, stora - vidurkį; stačiakampio riba, tolimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 75-tą procentilį; stačiakampio apačioje ir viršuje brūkšniai žymi 10-tą ir 90-tą procentilius.

Šeštą dieną po švitinimo, antikūnas prieš IL-1 α mažino navikų augimą vidutiniškai 28% ($p=0,035$, kai $\alpha=0,013$) (5 priedas, 1 lent.). PDT+Ak- IL-1 α poveikį patyrusių pelių navikai buvo ženkliai mažesni (TGI=54%) nei

PDT+IgG poveikį patyrusių pelių navikai (TGI=26%) ($p < 0,001$, kai $\alpha = 0,013$).

Aštuntą dieną po švitinimo antikūnas prieš IL-1 α mažino navikų augimą vidutiniškai 35% ($p = 0,017$, kai $\alpha = 0,09$) (5 priedas, 1 lent.). Visų pelių, patyrusių PDT+Ak-IL-1 α poveikį navikų augimas buvo slopinamas (TGI=27%), tačiau reikšmingų skitumų tarp šių pelių navikų ir PDT+IgG poveikį patyrusių pelių navikų nebuvo (keturių iš penkių pelių TGI=39%) ($p = 0,07$, kai $\alpha = 0,05$).

Citokinių VEGF ir IL-1 α raiškos tyrimai pelės plaučių karcinomos LLC navikuose *in vivo* iš esmės patvirtino tyrimų *in vitro* rezultatus: fotodinaminis poveikis didino citokinių raišką pelių navikuose *in vivo*. VEGF slopinimas veiksmingiau stabdė navikų augimą nei IL-1 α slopinimas. Nors antikūnų prieš VEGF ar IL-1 α poveikiai buvo panašūs, tačiau IL-1 α poveikis buvo silpniausias lyginant visus tris citokinių slopinimo būdus.

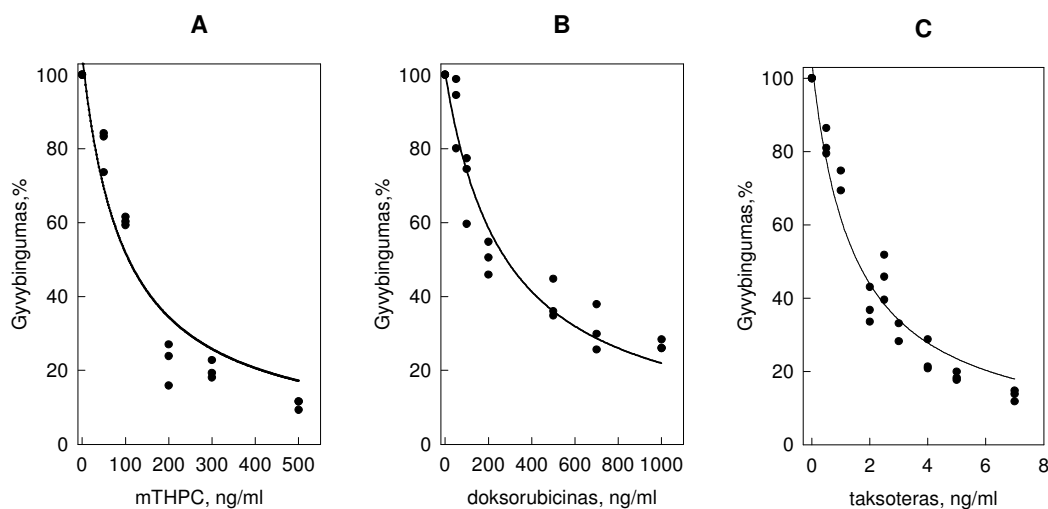
Fotodinaminės terapijos ir imuninės terapijos derinio naudojimas teikia daug vilčių kaip veiksmingas vėžio gydymo būdas, tačiau šios kombinacijos taikymas vis dar yra eksperimentinis. PDT sukelta VEGF raiška yra nustatyta daugelyje navikų, ir šio citokino reikšmė jų augimui toliau intensyviai tiriama. Mūsų tyrimai patvirtina VEGF ir atskleidžia IL-1 α svarbų vaidmenį PDT sensibilizuotų navikų augimui. Reikėtų pabrėžti, kad šių citokinių padidinta raiška navikuose gali susilpninti fotodinaminės terapijos efektą.

IŠVADOS

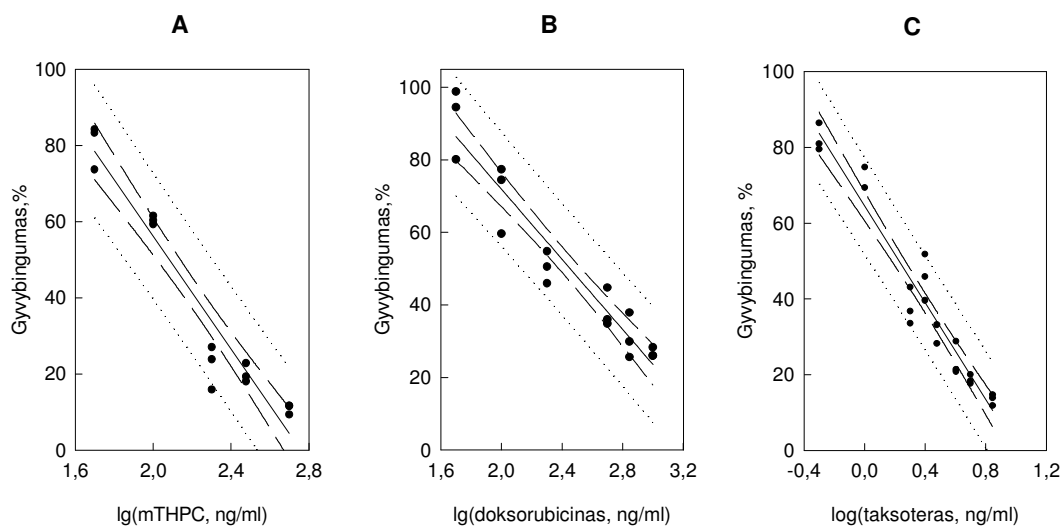
1. mTHPC sukkelto fotodinaminio poveikio ir doksorubicino derinys žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ir pelės plaučių karcinomos LLC1 ląstelių gyvybingumą *in vitro* mažina adityviai.
2. mTHPC sukkelto fotodinaminio poveikio ir taksotero derinys A-431 ir LLC1 ląstelių gyvybingumą *in vitro* mažina adityviai, tačiau mažos citotoksinio poveikio dozės (iki CD20) sukelia A-431 ląstelių atsaką su antagonizmo komponente, o didelės dozės (nuo CD80) – su sinergizmo komponente.
3. mTHPC sukeltas fotodinaminis poveikis, vienas arba kartu su doksorubicinu ar taksoteru, *in vitro* skatina citokinų: kraujagyslių endotelio augimo veiksnio (VEGF) ir interleukino 1 α (IL-1 α), raišką A-431 ir LLC1, bet ne pelių hepatomos MH-22A ląstelėse.
4. Citokinas IL-1 α skatina VEGF raišką A-431 ląstelėse *in vitro*.
5. mTHPC sukeltas fotodinaminis poveikis skatina citokinų VEGF ir IL-1 α raišką LLC1 navikuose.
6. Citokinų VEGF ir IL-1 α slopinimas lėtina tiek mTHPC sukeltą fotodinaminį poveikį patyrusių, tiek kontrolinių LLC1 navikų augimą.

PRIEDAI

1 priedas. Ląstelių gyvybingumo pokyčių po PDT ir citostatikų kombinuto poveikio vertinimas sudėtinės adityvios tiesės metodu



1 pr. 1 pav. Ląstelių gyvybingumo priklausomybės nuo pavienių veiksmų poveikių sklaidos diagramos. A - mTHPC, B - Dox, C - Tax. Poveikio sklaidos diagramos rodo, kad duomenims galima pritaikyti hiperbolinį modelį. Ląstelės su įvairia mTHPC koncentracija švitintos 60 s (660 ± 20 nm, $1,6$ mW/cm²).



1pr. 2 pav. A-431 ląstelių gyvybingumo tiesinė priklausomybė nuo pavienių veiksmų poveikių. A - mTHPC, B - Dox, C - Tax. Ištinė linija - regresijos tiesė, brūkšninė linija - pasikliautiniai intervalai, taškinė linija - prognozės intervalai. Tiesinės regresijos lygtys:

A) $LG = 204,3 - 74,1 \times \lg(\text{mTHPC})$, $\lg(\text{CD50}) = 2,079$; $R^2 = 0,93$.

B) $LG = 168,5 - 48,3 \times \lg(\text{Dox})$, $\lg(\text{CD50}) = 2,463$; $R^2 = 0,92$.

C) $LG = 64,5 - 66,9 \times \lg(\text{Tax})$; $\lg(\text{CD50}) = 0,230$; $R^2 = 0,94$.

LG — ląstelių gyvybingumas, %; $\lg(\text{mTHPC})$ – FS mTHPC logaritmas, ng/ml; $\lg(\text{Dox})$ – dokсорubicino logaritmas, ng/ml; $\lg(\text{Tax})$ – Tax logaritmas, ng/ml.

1 pr. 1 lentelė. FP+Dox poveikio ląstelių gyvybingumui duomenys teorinei sudėtinei adityviai tiesei ir eksperimentinių duomenų tiesei sudaryti

Suminė dozė, ng/ml	$\rho_A=0,97A,$ ng/ml	$\rho_B=0,03B,$ ng/ml	Ląst. gyvyb. po teorinio adityvaus poveikio	Ląst. gyvyb. po eksperimentinio poveikio
Suminė kombinacija skaičiuota pagal (2.8) lygtį				
45,9	32,10	13,80	91	95±2,0
80,4	56,4	24	70	67±5,0
139,3	97,3	46	51	61±2,5
314,2	119,94	94,26	39	—
408,7	286,2	122,6	31	41±2,5
561,9	393,4	168,5	27	—
Suminė kombinacija skaičiuota pagal (2.9) lygtį				
67	46,9	20,10	79	86±3,5
158,9	111,2	47,7	60	70±7,5
639,97	443,01	189,89	20	—
1109,4	776,6	332,8	11	10±1,0

1 pr. 2 lentelė. FP+Dox teorinės sudėtinės adityvios tiesės ir eksperimentinių duomenų sudėtinės tiesės lyginimo statistika (žiūr. 2.14.3 sk.)

Statistika	Vertė
$SS_{res(1)}$	133
$SS_{res(2)}$	700
SS_p	833
S_{xx}	4,9
S_{yy}	17413
S_{xy}	-282,8
SS_t	1009
F	2,11
N_1	2
N_2	20
p	0,147

1 pr. 3 lentelė. Tax+FP poveikio A-431 ląstelių gyvybingumui duomenys teorinei sudėtinei adityviai tiesei ir eksperimentinių duomenų tiesei sudaryti

Suminė dozė, ng/ml	$\rho_A=0,97A,$ ng/ml	$\rho_B=0,03B,$ ng/ml	Ląst. gyvyb. po teorinio adityvaus poveikio	Ląst. gyvyb. po eksperimentinio poveikio
Suminė kombinacija skaičiuota pagal (2.8) lygtį				
15,0	14,5	0,5	79	92±5
32,0	31,0	1,0	60	53±4
106,0	103,0	3,0	20	18±1
181,0	176,0	5,0	11	—
Suminė kombinacija skaičiuota pagal (2.9) lygtį				
12,0	11,5	0,5	82	—
25,0	24,3	0,8	72	71±6
64,0	62,0	2,0	38	24,5±0,5
158,0	153,0	5,0	19	11,5±3,5
158,0	153,0	5,0	19	11,5±3,5
25,0	24,3	0,8	72	71±6
64,0	62,0	2,0	38	24,5±0,5
158,0	153,0	5,0	19	11,5±3,5

1 p. 4 lentelė. Tax+FP teorinės sudėtinės adityvios tiesės ir eksperimentinių duomenų sudėtinės tiesės lyginimo statistika (žiūr. 2.14.3 sk.)

Statistika	Vertė
$SS_{res(1)}$	117
$SS_{res(2)}$	740
SS_p	857
S_{xx}	3
S_{yy}	16573
S_{xy}	-216
SS_t	-1101
F	2,26
N_1	2
N_2	20
p	0,136

2 priedas. Kaspazės 3 aktyvumo pokyčio statistinės analizės rezultatai

2 pr. 1 lentelė. Kaspazės 3 aktyvumo pokyčių po FP ir / ar Dox poveikio statistinės analizės rezultatai. Naudotas neparametrinis q kriterijus pagal Duno metodą.

A-431				MH-22A			
Poveikiai*	Rangų skirtumas	Q	P<0,05	Poveikiai*	Rangų skirtumas	Q	P<0,05
FPDox vs K	25	4,4	Taip	FPDox vs K	17	3,2	Taip
FP vs K	18	3,5	Taip	FP vs K	15	2,9	Taip
K vs Dox	0,0	0,0	Ne	K vs Dox	0,1	0,03	Ne
FPDox vs FP	6	1,2	Ne	FPDox vs FP	2	0,4	Ne

* - Stipriau fermentą aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau fermentą aktyvinančiu veiksnium

2 pr. 2 lentelė. Kaspazės 3 aktyvumo pokyčių po FP ir/ar Tax poveikio statistinės analizės rezultatai. Naudotas neparametrinis q kriterijus pagal Duno metodą.

A-431				MH-22A			
Poveikiai*	Rangų skirtumas	Q	P<0,05	Poveikiai*	Rangų skirtumas	Q	P<0,05
TaxFP vs K	32	5,7	Taip	TaxFP vs K	20	4,0	Taip
FP vs K	18	3,3	Taip	FP vs K	14	2,9	Taip
TaxFP vs FP	15	2,8	Taip	TaxFP vs FP	6	1,4	Ne
Tax vs K	15	2,7	Taip	Tax vs K	4	0,9	Ne

* - Stipriau fermentą aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau fermentą aktyvinančiu veiksnium

3 priedas. VEGF baltymo raiškos pokyčio statistinės analizės rezultatai

3 pr. 1 lentelė. VEGF baltymo raiškos pokyčio A-431 ląstelių terpėje, praėjus 6 val. po švitinimo, statistinės analizės rezultatai. Ląstelės veiktos 1 ng/ml ir 2 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir / arba 0,1 µg/ml mTHPC, švitinta 60s (FP1) arba 90s (FP2); K - kontrolė. Naudota vienfaktorinė ANOVA, *Holm-Sidak post hoc* testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
Tax2FP1 vs. K	11,7	5,6	<0,001	0,006	Taip
Tax2 vs. K	10,4	4,5	<0,001	0,007	Taip
FP2 vs. K	4,8	2,3	0,028	0,009	Ne
FP1 vs. K	4,7	2,2	0,031	0,010	Ne
Tax1 vs. K	5,8	2,0	0,054	0,013	Ne
K vs. Dox	4,0	1,7	0,092	0,017	Ne
Tax1FP1 vs. K	2,0	1,0	0,337	0,025	Ne
FP1Dox vs. K	1,4	0,7	0,514	0,050	Ne
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
Tax2FP1 vs. FP1	7,0	3,60	0,002	0,010	Taip
FP1 vs. Dox	3,3	2,3	0,034	0,025	Ne
FP1 vs. Tax1FP1	2,6	1,4	0,189	0,025	Ne
VEGF baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
Tax2FP1 vs. Tax1FP1	9,6	4,9	<0,001	0,009	Taip
Tax2 vs. Tax1	4,5	0,8	0,490	0,05	Ne
FP2 vs. FP1	0,9	0,04	0,963	0,050	Ne
VEGF baltymo pokyčiai panašaus gyvybingumo, bet skirtingai veiktose ląstelėse					
FP2 vs. FP1Dox	3,4	2,4	0,030	0,017	Ne
Tax2FP1 vs. FP2	6,9	3,5	0,002	0,013	Taip
FP2 vs. Tax1FP1	2,7	1,4	0,174	0,017	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

3 pr. 2 lentelė. VEGF baltymo raiškos pokyčio A-431 ląstelių terpėje, praėjus 24 val. po švitinimo, statistinės analizės rezultatai. Ląstelės veiktos 1 ng/ml ir 2 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir/arba 0,1 µg/ml mTHPC, švitinta 60s (FP1) arba 90s (FP2); K - kontrolė. Naudota vienfaktorinė ANOVA, Holm-Sidak post hoc testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
Tax2FP1 vs. K	4,8	16,9	<0,001	0,006	Taip
Tax1FP1 vs. K	2,6	9,05	<0,001	0,007	Taip
Tax2 vs. K	2,2	6,2	<0,001	0,009	Taip
FP1 vs. K	1,4	4,9	<0,001	0,010	Taip
FP2 vs. K	8,3	2,8	0,006	0,013	Taip
FP1Dox vs. K	6,4	2,3	0,027	0,017	Ne
K vs. Dox	3,2	0,9	0,371	0,025	Ne
Tax1 vs. K	0,2	0,05	0,960	0,050	Ne
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
FP1 vs. FP1Dox	7,7	3,168	0,004	0,017	Taip
Tax2FP1 vs. FP1	3,4	14,616	<0,001	0,01	Taip
Tax1FP1 vs. FP1	1,2	5,131	<0,001	0,025	Taip
VEGF baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
Tax2FP1 vs. Tax1FP1	21,6	9,336	<0,001	0,013	Taip
FP1 vs. FP2	5,9	2,465	0,02	0,05	Taip
Tax2 vs. Tax1	22,1	2,078	0,106	0,05	Ne
VEGF baltymo pokyčiai panašaus gyvybingumo, bet skirtingai veiktose ląstelėse					
Tax2FP1 vs. FP2	39,7	17,153	<0,001	0,009	Taip
Tax1FP1 vs. FP2	18,1	7,596	<0,001	0,017	Taip
FP2 vs. TDox	18,3	0,753	0,459	0,05	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

3 pr. 3 lentelė. VEGF baltymo raiškos pokyčio LLC ląstelių terpėje, praėjus 6 val. po švitinimo, statistinės analizės rezultatai. Ląstelės veiktos 2 ng/ml ir 7 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir/arba 0,2 µg/ml mTHPC, švitinta 30s (FP1) arba 60s (FP2); K - kontrolė. Naudota vienfaktorinė ANOVA, Holm-Sidak post hoc testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
Tax1FP2 vs. K	0,15	17,1	<0,001	0,002	Taip
FP1 vs. K	0,12	13,7	<0,001	0,002	Taip
K vs. Tax2FP1	0,05	5,5	<0,001	0,003	Taip
K vs. FP2	0,04	4,1	<0,001	0,003	Taip
K vs. Tax1	0,04	4,1	<0,001	0,003	Taip
K vs. Tax2	0,02	2,2	0,038	0,006	Ne
Tax1FP1 vs. K	0,01	1,6	0,116	0,009	Ne
K vs. Tax2FP2	0,01	1,5	0,151	0,010	Ne
FP1Dox vs. K	0,1	23,2	<0,001	0,005	Taip
K vs. Dox	0,03	4,3	<0,001	0,013	Taip
FP2Dox vs. K	0,01	1,2	0,268	0,050	Ne
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
Tax1FP2 vs. FP2	0,18	21,3	<0,001	0,001	Taip
FP1 vs. Tax2FP1	0,17	19,2	<0,001	0,002	Taip
FP1 vs. Tax1FP1	0,10	12,1	<0,001	0,002	Taip
Tax2FP2 vs. FP2	0,02	2,6	0,017	0,005	Ne
FP2Dox vs. FP2	0,04	7,0	<0,001	0,007	Taip
FP1Dox vs. FP1	0,02	3,8	0,003	0,017	Taip
VEGF baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
Tax1FP2 vs. Tax2FP2	0,16	18,6	<0,001	0,002	Taip
FP1 vs. FP2	0,15	17,9	<0,001	0,002	Taip
Tax1FP1 vs. Tax2FP1	0,06	7,1	<0,001	0,002	Taip
Tax2 vs. Tax1	0,02	1,9	0,077	0,007	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

3 pr. 4 lentelė. VEGF baltymo raiškos pokyčio LLC ląstelių terpėje, praėjus 24 val. po švitinimo, statistinės analizės rezultatai. Ląstelės veiktos 2 ng/ml ir 7 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir/arba 0,2 µg/ml mTHPC, švitinta 30s (FP1) arba 60s (FP2); K - kontrolė. Naudota vienfaktorinė ANOVA, Holm-Sidak post hoc testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
Tax1FP2 vs. K	0,19	15,8	<0,001	0,001	Taip
Tax1FP1 vs. K	0,19	15,2	<0,001	0,002	Taip
Tax2FP2 vs. K	0,14	11,1	<0,001	0,002	Taip
FP1 vs. K	0,12	10,1	<0,001	0,002	Taip
Tax2FP1 vs. K	0,08	6,8	<0,001	0,003	Taip
FP2 vs. K	0,06	5,2	<0,001	0,003	Taip
Tax2 vs. K	0,03	2,3	0,033	0,010	Ne
K vs. Tax1	0,004	0,3	0,741	0,050	Ne
FP1Dox vs. K	0,19	14,7	<0,001	0,004	Taip
FP2Dox vs. K	0,02	1,9	0,076	0,025	Ne
K vs. Dox	0,01	0,8	0,451	0,050	Ne
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
Tax1FP2 vs. FP2	0,1	10,6	<0,001	0,002	Taip
Tax2FP2 vs. FP2	0,07	5,9	<0,001	0,003	Taip
Tax1FP1 vs. FP1	0,06	5,1	<0,001	0,004	Taip
FP1 vs. Tax2FP1	0,04	3,2	0,004	0,006	Taip
FP1Dox vs. FP1	0,07	5,1	<0,001	0,007	Taip
FP2 vs. FP2Dox	0,04	3,0	0,011	0,013	Taip
VEGF baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
Tax1FP1 vs. Tax2FP1	0,1	8,4	<0,001	0,002	Taip
FP1 vs. FP2	0,06	4,9	<0,001	0,004	Taip
Tax1FP2 vs. Tax2FP2	0,06	4,7	<0,001	0,004	Taip
Tax2 vs. Tax1	0,03	2,6	0,017	0,009	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

3 pr. 5 lentelė. VEGF baltymo raiškos pokyčio LLC ląstelių lizatuose, praėjus 6 val. po švitinimo, statistinės analizės rezultatai. Ląstelės veiktos 2 ng/ml ir 7 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir/arba 0,2 µg/ml mTHPC, švitinta 30s (FP1) arba 60s (FP2); K - kontrolė. Naudota vienfaktorinė ANOVA, Holm-Sidak post hoc testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
Tax2FP2 vs. K	0,14	19,1	<0,001	0,001	Taip
Tax2FP1 vs. K	0,12	15,5	<0,001	0,002	Taip
FP2 vs. K	0,1	13,5	<0,001	0,002	Taip
Tax1FP1 vs. K	0,08	10,4	<0,001	0,002	Taip
Tax1FP2 vs. K	0,07	10,0	<0,001	0,002	Taip
FP1 vs. K	0,06	7,7	<0,001	0,003	Taip
Tax2 vs. K	0,02	2,5	0,022	0,010	Ne
K vs. Tax1	0,0006	0,08	0,935	0,050	Ne
FP2Dox vs. K	0,08	11,9	<0,001	0,004	Taip
FP1Dox vs. K	0,06	9,3	<0,001	0,004	Taip
Dox vs. K	0,02	3,1	0,010	0,013	Taip
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
Tax2FP1 vs. FP1	0,06	7,8	<0,001	0,003	Taip
Tax2FP2 vs. FP2	0,04	5,6	<0,001	0,004	Taip
FP2 vs. Tax1FP2	0,03	3,5	0,003	0,006	Taip
Tax1FP1 vs. FP1	0,02	2,7	0,015	0,007	Ne
FP2 vs. FP2Dox	0,02	2,9	0,012	0,017	Taip
FP1Dox vs. FP1	0,005	0,7	0,473	0,050	Ne
VEGF baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
Tax2FP2 vs. Tax1FP2	0,07	9,1	<0,001	0,002	Taip
FP2 vs. FP1	0,04	5,8	<0,001	0,003	Taip
Tax2FP1 vs. Tax1FP1	0,04	5,1	<0,001	0,005	Taip
Tax2 vs. Tax1	0,02	2,6	0,018	0,009	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

3 pr. 6 lentelė. VEGF baltymo raiškos pokyčio LLC ląstelių lizatuose, praėjus 24 val. po švitinimo, statistinės analizės rezultatai. Ląstelės veiktos 2 ng/ml ir 7 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir/arba 0,2 µg/ml mTHPC, švitinta 30s (FP1) arba 60s (FP2); K - kontrolė. Naudota vienfaktorinė ANOVA, *Holm-Sidak post hoc* testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
Tax1FP2 vs. K	0,07	13,8	<0,001	0,001	Taip
Tax2FP2 vs. K	0,05	10,5	<0,001	0,002	Taip
Tax2FP1 vs. K	0,04	7,8	<0,001	0,002	Taip
Tax1FP1 vs. K	0,03	6,9	<0,001	0,002	Taip
FP2 vs. K	0,03	6,7	<0,001	0,002	Taip
Tax2 vs. K	0,01	2,4	0,028	0,006	Ne
FP1 vs. K	0,005	1,0	0,314	0,010	Ne
Tax1 vs. K	0,002	0,4	0,681	0,025	Ne
FP2Dox vs. K	0,06	10,9	<0,001	0,003	Taip
FP1Dox vs. K	0,05	9,0	<0,001	0,004	Taip
Dox vs. K	0,02	3,8	0,003	0,009	Taip
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
Tax1FP2 vs. FP2	0,03	7,2	<0,001	0,002	Taip
Tax2FP1 vs. FP1	0,03	6,8	<0,001	0,002	Taip
Tax1FP1 vs. FP1	0,03	5,8	<0,001	0,003	Taip
Tax2FP2 vs. FP2	0,02	3,9	0,001	0,004	Taip
FP1Dox vs. FP1	0,04	8,1	<0,001	0,004	Taip
FP2Dox vs. FP2	0,03	5,1	<0,001	0,006	Taip
VEGF baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
FP2 vs. FP1	0,03	5,6	<0,001	0,003	Taip
Tax1FP2 vs. Tax2FP2	0,02	3,3	0,004	0,005	Taip
Tax2 vs. Tax1	0,009	1,9	0,063	0,006	Ne
Tax2FP1 vs. Tax1FP1	0,004	0,9	0,364	0,013	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

4 priedas. IL-1 α baltymo raiškos pokyčio statistinės analizės rezultatai

4 pr. 1 lentelė. IL-1 α baltymo raiškos pokyčio A-431 ląstelių lizatuose, praėjus 6 val. po švitinimo, statistinės analizės rezultatai. Ląstelės veiktos 1 ng/ml ir 2 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir/arba 0,1 μ g/ml mTHPC, švitinta 60s (FP1) arba 90s (FP2); K - kontrolė. Naudota vienfaktorinė ANOVA, *Holm-Sidak post hoc* testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
FP1 vs. K	3,0	5,1	<0,001	0,006	Taip
FP1Dox vs. K	2,8	4,9	<0,001	0,007	Taip
Tax1 vs. K	3,8	3,9	<0,001	0,009	Taip
Tax2 vs. K	3,1	3,9	<0,001	0,009	Taip
FP1Tax2 vs. K	2,0	3,5	<0,001	0,01	Taip
FP2 vs. K	1,6	2,8	0,006	0,013	Taip
FP1Tax1 vs. K	1,2	2,0	0,046	0,017	Ne
K vs. Dox	0,6	0,7	0,48	0,05	Ne
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
FP1 vs. FP1Tax1	1,7	2,804	0,006	0,002	Ne
FP1 vs. FP1Tax2	1,0	1,681	0,096	0,005	Ne
FP1 vs. FP1Dox	0,1	0,23	0,819	0,025	Ne
IL-1 α baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
FP1 vs. FP2	1,3	2,312	0,023	0,003	Ne
FP1Tax2 vs. FP1Tax1	0,8	1,227	0,223	0,006	Ne
Tax1 vs. Tax2	0,8	0,66	0,51	0,009	Ne
IL-1 α baltymo pokyčiai panašaus gyvybingumo, bet skirtingai veiktose ląstelėse					
FP1Dox vs. FP2	1,2	2,082	0,04	0,003	Ne
FP2 vs. FP1Tax1	0,4	0,636	0,527	0,01	Ne
FP1Tax2 vs. FP2	0,4	0,63	0,53	0,013	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

4 pr. 2 lentelė. IL-1 α baltymo raiškos pokyčio A-431 ląstelių lizatuose, praėjus 24 val. po švitinimo, statistinės analizės rezultatai. Ląstelės veiktos 1 ng/ml ir 2 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir/arba 0,1 μ g/ml mTHPC, švitinta 60s (FP1) arba 90s (FP2); K - kontrolė. Naudota vienfaktorinė ANOVA, Holm-Sidak post hoc testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
FP1Tax2 vs. K	3,7	7,1	<0,001	0,006	Taip
FP1Tax1 vs. K	3,4	6,0	<0,001	0,007	Taip
FP2 vs. K	3,0	5,9	<0,001	0,009	Taip
FP1Dox vs. K	2,4	4,6	<0,001	0,01	Taip
Tax2 vs. K	3,0	4,0	<0,001	0,013	Taip
FP1 vs. K	1,7	3,4	0,001	0,017	Taip
Tax1 vs. K	0,8	0,7	0,462	0,025	Ne
K vs. Dox	0,2	0,3	0,756	0,05	Ne
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
FP1Tax2 vs.FP1	2,0	3,9	<0,001	0,002	Taip
FP1Tax1 vs.FP1	1,7	3,0	0,003	0,002	Ne
FP1Dox vs.FP1	0,7	1,3	0,204	0,004	Ne
IL-1 α baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
FP2 vs. FP1	1,3	2,6	0,012	0,003	Ne
Tax2 vs. Tax1	2,2	1,8	0,081	0,003	Ne
FP1Tax2 vs. FP1Tax1	0,3	0,4	0,656	0,017	Ne
IL-1 α baltymo pokyčiai panašaus gyvybingumo, bet skirtingai veiktose ląstelėse					
FP1Tax2 vs. FP2	0,7	1,4	0,176	0,004	Ne
FP2 vs. FP1Dox	0,6	1,2	0,217	0,005	Ne
FP1Tax1 vs. FP2	0,4	0,8	0,441	0,009	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

4 pr. 3 lentelė. IL-1 α baltymo raiškos pokyčio A-431 ląstelių terpėje, praėjus 6 val. po švitinimo, statistinės analizės rezultatai. Ląstelės veiktos 1 ng/ml ir 2 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir/arba 0,1 μ g/ml mTHPC, švitinta 60s (FP1) arba 90s (FP2); K - kontrolė. Naudota vienfaktorinė ANOVA, Holm-Sidak post hoc testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
FP2 vs, K	0,56	4,8	<0,001	0,006	Taip
FP1Tax2 vs, K	0,49	4,4	<0,001	0,007	Taip
FP1Dox vs, K	0,30	2,7	0,009	0,009	Ne
FP1Tax1 vs, K	0,23	1,9	0,058	0,01	Ne
Tax2 vs, K	0,28	1,9	0,061	0,013	Ne
FP1 vs, K	0,13	1,2	0,252	0,017	Ne
Dox vs, K	0,07	0,5	0,608	0,025	Ne
Tax1 vs, K	0,02	0,1	0,894	0,05	Ne
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
FP1Tax2 vs, FP1	0,4	3,0	0,004	0,002	Ne
FP1Tax1 vs, FP1	0,1	0,8	0,446	0,007	Ne
FP1Dox vs, FP1	0,2	1,4	0,155	0,004	Ne
IL-1 α baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
FP2 vs, FP1	0,4	3,4	0,001	0,002	Taip
FP1Tax2 vs, FP1Tax1	0,3	2,1	0,038	0,003	Ne
Tax2 vs, Tax1	0,3	1,3	0,193	0,005	Ne
IL-1 α baltymo pokyčiai panašaus gyvybingumo, bet skirtingai veiktose ląstelėse					
FP2 vs, FP1Tax1	0,3	2,6	0,012	0,002	Ne
FP2 vs, FP1Dox	0,3	2,1	0,037	0,003	Ne
FP2 vs, FP1Tax2	0,1	0,6	0,541	0,01	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

4 pr. 4 lentelė. IL-1 α baltymo raiškos pokyčio A-431 ląstelių terpėje, praėjus 24 val, po švitinimo, statistinės analizės rezultatai, Ląstelės veiktos 1 ng/ml ir 2 ng/ml taksoteru (Tax1 ir Tax2 atitinkamai); 500 ng/ml doksorubicinu (Dox); ir/arba 0,1 μ g/ml mTHPC, švitinta 60s (FP1) arba 90s (FP2); K - kontrolė, Naudota vienfaktorinė ANOVA, Holm-Sidak post hoc testas

Lyginimas*	Vidurkių skirtumas	t	Nepataisyta P	Kritinis lygmuo	Skirtumas reikšmingas?
Poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su kontrolinėmis ląstelėmis					
FP1Tax2 vs, K	3,6	7,0	<0,001	0,006	Taip
FP1Dox vs, K	2,3	4,5	<0,001	0,007	Taip
FP1Tax1 vs, K	1,8	3,2	0,002	0,009	Taip
FP2 vs, K	1,9	3,1	0,003	0,01	Taip
FP1 vs, K	0,8	1,3	0,187	0,013	Ne
Tax2 vs, K	0,5	0,5	0,613	0,017	Ne
Tax1 vs, K	0,2	0,2	0,824	0,025	Ne
Dox vs, K	0,1	0,2	0,87	0,05	Ne
Kombinuotą poveikį patyrusių ląstelių lyginimas su FP veiktomis ląstelėmis					
FP1Tax2 vs, FP1	2,8	4,7	<0,001	0,002	Taip
FP1Dox vs, FP1	1,5	2,5	0,017	0,003	Ne
FP1Tax1 vs, FP1	1,0	1,6	0,123	0,004	Ne
IL-1 α baltymo priklausomybė nuo poveikio stiprio					
FP1Tax2 vs, FP1Tax1	1,8	3,3	0,002	0,002	Taip
FP2 vs, FP1	1,1	1,6	0,118	0,004	Ne
Tax2 vs, Tax1	0,3	0,2	0,828	0,025	Ne
IL-1 α baltymo pokyčiai panašaus gyvybingumo, bet skirtingai veiktose ląstelėse					
FP1Tax2 vs, FP2	1,7	2,9	0,006	0,003	Ne
FP1Dox vs, FP2	0,4	0,6	0,533	0,009	Ne
FP2 vs, FP1Tax1	0,1	0,1	0,896	0,05	Ne

* - Stipriau citokino raišką aktyvinančio veiksnio lyginimas su silpniau citokino raišką aktyvinančiu veiksnium

5 priedas. Pelių navikų augimo slopinimo PDT ir / arba imunine terapija statistinės analizės rezultatai

5 pr. 1 lentelė. Navikų augimo slopinimo (*TGI*) PDT ir / arba imunine terapija veiktose pelėse aprašomoji statistika, N – pelių grupės dydis, Vid. – vidurkis, SN – standartinis nuokrypis, Ak – antikūnai. Terapinį poveikį patyrusių pelių *TGI* skaičiuotas pagal IgG poveikį patyrusių pelių vidutinį navikų tūrį. *TGI* vidurkiai skaičiuoti be išimčių.

Terapinis poveikis	TGI, %, po švitinimo								
	3 dieną			6 dieną			8 dieną		
	N	Vid. ±SN	Išimtys	N	Vid. ±SN	Išimtys	N	Vid. ±SN	Išimtys
Ak-VEGF	5	40±10	2 pelių TGI<0	5	36±19		5	30±11	1 pelės TGI<0
tVEGFR1	5	51±10	1 pelės TGI=1	5	37±12		5	34±15	1 pelės TGI=5
Ak-IL-1α	5	40±10	2 pelių TGI<0	5	28±18		5	35±21	
PDT+IgG	5	38±29		5	26±17	1 pelės TGI<0	5	39±18	1 pelės TGI<0; 1 pelės TGI=4
PDT+Ak-VEGF	5	38±14		5	58±11		4	47±15	
PDT+tVEGFR1	5	54±7		5	73±8		5	55±12	
PDT+Ak-IL-1α	5	44±10		5	54±7		4	27±14	

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Aase, K., G. von Euler, X. Li, A. Ponten, P. Thoren, R. Cao, Y. Cao, B. Olofsson, S. Gebre-Medhin, M. Pekny, K. Alitalo, C. Betsholtz, and U. Eriksson. 2001. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation*. 104:358-64.
2. Abels, C. 2004. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci*. 3:765-71.
3. Achen, M.G., M. Jeltsch, E. Kukk, T. Makinen, A. Vitali, A.F. Wilks, K. Alitalo, and S.A. Stacker. 1998. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:548-53.
4. Adams, R.H., and K. Alitalo. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:464-78.
5. Akhtar, N., M.L. Padilla, E.B. Dickerson, H. Steinberg, M. Breen, R. Auerbach, and S.C. Helfand. 2004. Interleukin-12 inhibits tumor growth in a novel angiogenesis canine hemangiosarcoma xenograft model. *Neoplasia*. 6:106-16.
6. Alam, A., J.P. Herault, P. Barron, B. Favier, P. Fons, N. Delesque-Touchard, I. Senegas, P. Laboudie, J. Bonnin, C. Cassan, P. Savi, B. Ruggeri, P. Carmeliet, F. Bono, and J.M. Herbert. 2004. Heterodimerization with vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) is necessary for VEGFR-3 activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 324:909-15.
7. Alfaro, C., N. Suarez, A. Gonzalez, S. Solano, L. Erro, J. Dubrot, A. Palazon, S. Hervas-Stubbs, A. Gurrpide, J.M. Lopez-Picazo, E. Grande-Pulido, I. Melero, and J.L. Perez-Gracia. 2009. Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes. *Br J Cancer*. 100:1111-9.
8. Allison, B.A., P.H. Pritchard, and J.G. Levy. 1994. Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *Br J Cancer*. 69:833-9.
9. Andersson, J., L. Bjork, C.A. Dinarello, H. Towbin, and U. Andersson. 1992. Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. *Eur J Immunol*. 22:2617-23.
10. Apte, R.N., and E. Voronov. 2008. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev*. 222:222-41.
11. Ara, T., L. Song, H. Shimada, N. Keshelava, H.V. Russell, L.S. Metelitsa, S.G. Groshen, R.C. Seeger, and Y.A. DeClerck. 2009. Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 69:329-37.
12. Arend, W.P., and C.J. Guthridge. 2000. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis*. 59 Suppl 1:i60-4.
13. Ashikari-Hada, S., H. Habuchi, Y. Kariya, and K. Kimata. 2005. Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J Biol Chem*. 280:31508-15.

14. Auron, P.E., A.C. Webb, L.J. Rosenwasser, S.F. Mucci, A. Rich, S.M. Wolff, and C.A. Dinarello. 1984. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:7907-11.
15. Autiero, M., J. Waltenberger, D. Communi, A. Kranz, L. Moons, D. Lambrechts, J. Kroll, S. Plaisance, M. De Mol, F. Bono, S. Kliche, G. Fellbrich, K. Ballmer-Hofer, D. Maglione, U. Mayr-Beyrle, M. Dewerschin, S. Dombrowski, D. Stanimirovic, P. Van Hummelen, C. Dehio, D.J. Hicklin, G. Persico, J.M. Herbert, D. Communi, M. Shibuya, D. Collen, E.M. Conway, and P. Carmeliet. 2003. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med.* 9:936-43.
16. Azizuddin, K., K. Kalka, S.M. Chiu, N. Ahmad, H. Mukhtar, and D. Separovic. 2001. Recombinant human tumor necrosis factor alpha does not potentiate cell killing after photodynamic therapy with a silicon phthalocyanine in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Int J Oncol.* 18:411-5.
17. Bakouche, O., J.L. Moreau, and L.B. Lachman. 1991. Acylation of cell-associated IL-1 by palmitic acid. *J Immunol.* 147:2164-9.
18. Baldwin, M.E., M.M. Halford, S. Roufail, R.A. Williams, M.L. Hibbs, D. Grail, H. Kubo, S.A. Stacker, and M.G. Achen. 2005. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol.* 25:2441-9.
19. Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H.A. Weich, A. Mantovani, and D. Marme. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* 87:3336-43.
20. Barr, M.P., A.M. Byrne, A.M. Duffy, C.M. Condrón, M. Devocelle, P. Harriott, D.J. Bouchier-Hayes, and J.H. Harmey. 2005. A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br J Cancer.* 92:328-33.
21. Barton, J.L., R. Herbst, D. Bosisio, L. Higgins, and M.J. Nicklin. 2000. A tissue specific IL-1 receptor antagonist homolog from the IL-1 cluster lacks IL-1, IL-1ra, IL-18 and IL-18 antagonist activities. *Eur J Immunol.* 30:3299-308.
22. Bernatchez, P.N., S. Soker, and M.G. Sirois. 1999. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem.* 274:31047-54.
23. Bhuvanewari, R., Y.Y. Gan, K.K. Yee, K.C. Soo, and M. Olivo. 2007a. Effect of hypericin-mediated photodynamic therapy on the expression of vascular endothelial growth factor in human nasopharyngeal carcinoma. *Int J Mol Med.* 20:421-8.
24. Bhuvanewari, R., Y.Y. Gan, S.S. Lucky, W.W. Chin, S.M. Ali, K.C. Soo, and M. Olivo. 2008. Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. *Mol Cancer.* 7:56.
25. Bhuvanewari, R., Y.Y. Gan, K.C. Soo, and M. Olivo. 2009. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 66:2275-83.
26. Bhuvanewari, R., G.Y. Yuen, S.K. Chee, and M. Olivo. 2007b. Hypericin-mediated photodynamic therapy in combination with Avastin (bevacizumab) improves tumor response by downregulating angiogenic proteins. *Photochem Photobiol Sci.* 6:1275-83.
27. Bielenberg, D.R., C.A. Pettaway, S. Takashima, and M. Klagsbrun. 2006. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res.* 312:584-93.
28. Boivin, W.A., H. Jiang, O.B. Utting, and D.W. Hunt. 2006. Influence of interleukin-1alpha on androgen receptor expression and cytokine secretion by cultured human dermal papilla cells. *Exp Dermatol.* 15:784-93.

29. Boyle, R.W., and D. Dolphin. 1996. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol.* 64:469-85.
30. Bonnett, R. 1995. Studies on 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin, m-THPC (Temoporfin). In 5th International Photodynamic Association Biennial Meeting. SPIE Proc. 2371: 31-38.
31. Borg, S.A., K.E. Kerry, J.A. Royds, R.D. Battersby, and T.H. Jones. 2005. Correlation of VEGF production with IL1 alpha and IL6 secretion by human pituitary adenoma cells. *Eur J Endocrinol.* 152:293-300.
32. Born, T.L., E. Thomassen, T.A. Bird, and J.E. Sims. 1998. Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem.* 273:29445-50.
33. Bourre, L., N. Rousset, S. Thibaut, S. Eleouet, Y. Lajat, and T. Patrice. 2002. PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. *Apoptosis.* 7:221-30.
34. Bourre, L., G. Simonneaux, Y. Ferrand, S. Thibaut, Y. Lajat, and T. Patrice. 2003. Synthesis, and in vitro and in vivo evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 69:179-92.
35. Breider, M.A., X. Lu, M. Panjehpour, and D.L. Frazier. 1993. Cytokine modulation of endothelial cell sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 13:305-11.
36. Bristulf, J., S. Gatti, D. Malinowsky, L. Bjork, A.K. Sundgren, and T. Bartfai. 1994. Interleukin-1 stimulates the expression of type I and type II interleukin-1 receptors in the rat insulinoma cell line Rinm5F; sequencing a rat type II interleukin-1 receptor cDNA. *Eur Cytokine Netw.* 5:319-30.
37. Buryiskova, M., M. Pospisek, A. Grothey, T. Simmet, and L. Burysek. 2004. Intracellular interleukin-1alpha functionally interacts with histone acetyltransferase complexes. *J Biol Chem.* 279:4017-26.
38. Cao, Y., W.R. Ji, P. Qi, A. Rosin, and Y. Cao. 1997. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun.* 235:493-8.
39. Carmeliet, P., L. Moons, A. Lutun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, F. Bono, L. Devy, H. Beck, D. Scholz, T. Acker, T. DiPalma, M. Dewerchin, A. Noel, I. Stalmans, A. Barra, S. Blacher, T. Vandendriessche, A. Ponten, U. Eriksson, K.H. Plate, J.M. Foidart, W. Schaper, D.S. Charnock-Jones, D.J. Hicklin, J.M. Herbert, D. Collen, and M.G. Persico. 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 7:575-83.
40. Casadio, R., E. Frigimelica, P. Bossu, D. Neumann, M.U. Martin, A. Tagliabue, and D. Boraschi. 2001. Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. *FEBS Lett.* 499:65-8.
41. Castro-Rivera, E., S. Ran, P. Thorpe, and J.D. Minna. 2004. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11432-7.
42. Cebo, C., T. Dambrouck, E. Maes, C. Laden, G. Strecker, J.C. Michalski, and J.P. Zanetta. 2001. Recombinant human interleukins IL-1alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, and IL-7 show different and specific calcium-independent carbohydrate-binding properties. *J Biol Chem.* 276:5685-91.
43. Cecic, I., and M. Korbelik. 2002. Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Lett.* 183:43-51.

44. Chen, H., A. Bagri, J.A. Zupicich, Y. Zou, E. Stoeckli, S.J. Pleasure, D.H. Lowenstein, W.C. Skarnes, A. Chedotal, and M. Tessier-Lavigne. 2000. Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron*. 25:43-56.
45. Connolly, D.T., D.M. Heuvelman, R. Nelson, J.V. Olander, B.L. Eppley, J.J. Delfino, N.R. Siegel, R.M. Leimgruber, and J. Feder. 1989. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*. 84:1470-8.
46. Cooper, K.D., C. Hammerberg, O. Baadsgaard, J.T. Elder, L.S. Chan, R.S. Taylor, J.J. Voorhees, and G. Fisher. 1990. Interleukin-1 in human skin: dysregulation in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 95:24S-26S.
47. Coutier, S., L. Bezdetnaya, S. Marchal, V. Melnikova, I. Belitchenko, J.L. Merlin, and F. Guillemin. 1999. Foscan (mTHPC) photosensitized macrophage activation: enhancement of phagocytosis, nitric oxide release and tumour necrosis factor-alpha-mediated cytolytic activity. *Br J Cancer*. 81:37-42.
48. Davids, L.M., B. Kleemann, D. Kacerovska, K. Pizinger, and S.H. Kidson. 2008. Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. *J Photochem Photobiol B*. 91:67-76.
49. de Vries, C., J.A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, and L.T. Williams. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 255:989-91.
50. Deininger, M.H., T. Weinschenk, M.H. Morgalla, R. Meyermann, and H.J. Schluesener. 2002. Release of regulators of angiogenesis following Hypocrellin-A and -B photodynamic therapy of human brain tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 298:520-30.
51. Dellinger, M. 1996. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol*. 64:182-7.
52. Dikov, M.M., J.E. Ohm, N. Ray, E.E. Tchekneva, J. Burlison, D. Moghanaki, S. Nadaf, and D.P. Carbone. 2005. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol*. 174:215-22.
53. Dinarello, C.A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 87:2095-147.
54. Dinarello, C.A. 1999. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol*. 103:11-24.
55. Dinarello, C.A. 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 20:S1-13.
56. Dinarello, C.A. 2003. Inteleukin-1 family (IL-1F1, F2) London.
57. Dinarello, C.A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 27:519-50.
58. Dive, C., and J.A. Hickman. 1991. Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer*. 64:192-6.
59. Dixelius, J., T. Makinen, M. Wirzenius, M.J. Karkkainen, C. Wernstedt, K. Alitalo, and L. Claesson-Welsh. 2003. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem*. 278:40973-9.
60. Dougherty, T.J., C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng. 1998. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 90:889-905.

61. Du, H., B.H. Bay, R. Mahendran, and M. Olivo. 2006. Hypericin-mediated photodynamic therapy elicits differential interleukin-6 response in nasopharyngeal cancer. *Cancer Lett.* 235:202-8.
62. Ebos, J.M., G. Bocci, S. Man, P.E. Thorpe, D.J. Hicklin, D. Zhou, X. Jia, and R.S. Kerbel. 2004. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res.* 2:315-26.
63. Eichholz, A., S. Merchant, and A.M. Gaya. 2010. Anti-angiogenesis therapies: their potential in cancer management. *Onco Targets Ther.* 3:69-82.
64. Eisenberg, S.P., M.T. Brewer, E. Verderber, P. Heimdal, B.J. Brandhuber, and R.C. Thompson. 1991. Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5232-6.
65. Ellis, L.M. 2006. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther.* 5:1099-107.
66. Evans, R., M. Fong, J. Fuller, S. Kamdar, J. Meyerhardt, and G. Strassmann. 1992. Tumor cell IL-6 gene expression is regulated by IL-1 alpha/beta and TNF alpha: proposed feedback mechanisms induced by the interaction of tumor cells and macrophages. *J Leukoc Biol.* 52:463-8.
67. Evans, R.J., J. Bray, J.D. Childs, G.P. Vigers, B.J. Brandhuber, J.J. Skalicky, R.C. Thompson, and S.P. Eisenberg. 1995. Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta by site-directed mutagenesis. Identification of a single site in IL-1ra and two sites in IL-1 beta. *J Biol Chem.* 270:11477-83.
68. Fairbrother, W.J., M.A. Champe, H.W. Christinger, B.A. Keyt, and M.A. Starovasnik. 1998. Solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor. *Structure.* 6:637-48.
69. Fantin, A., C.H. Maden, and C. Ruhrberg. 2009. Neuropilin ligands in vascular and neuronal patterning. *Biochem Soc Trans.* 37:1228-32.
70. Favier, B., A. Alam, P. Barron, J. Bonnin, P. Laboudie, P. Fons, M. Mandron, J.P. Hérault, G. Neufeld, P. Savi, J.M. Herbert, and F. Bono. 2006. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood.* 108:1243-50.
71. Ferlini, C., I. Ojima, M. Distefano, D. Gallo, A. Riva, P. Morazzoni, E. Bombardelli, S. Mancuso, and G. Scambia. 2003. Second generation taxanes: from the natural framework to the challenge of drug resistance. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 3:133-8.
72. Ferrara, N. 1999. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237:1-30.
73. Ferrara, N. 2000. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 55:15-35; discussion 35-6.
74. Ferrara, N., and W.J. Henzel. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161:851-8.
75. Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R.M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* 176:3877-83.
76. Ferrario, A., C.F. Chantrain, K. von Tiehl, S. Buckley, N. Rucker, D.R. Shalinsky, H. Shimada, Y.A. DeClerck, and C.J. Gomer. 2004. The matrix metalloproteinase inhibitor

- prinomastat enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse tumor model. *Cancer Res.* 64:2328-32.
77. Ferrario, A., A.M. Fisher, N. Rucker, and C.J. Gomer. 2005. Celecoxib and NS-398 enhance photodynamic therapy by increasing in vitro apoptosis and decreasing in vivo inflammatory and angiogenic factors. *Cancer Res.* 65:9473-8.
 78. Ferrario, A., and C.J. Gomer. 2006. Avastin enhances photodynamic therapy treatment of Kaposi's sarcoma in a mouse tumor model. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 25:251-9.
 79. Ferrario, A., and C.J. Gomer. 2010. Targeting the 90kDa heat shock protein improves photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 289:188-194.
 80. Ferrario, A., K. Von Tiehl, S. Wong, M. Luna, and C.J. Gomer. 2002. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Res.* 62:3956-61.
 81. Ferrario, A., K.F. von Tiehl, N. Rucker, M.A. Schwarz, P.S. Gill, and C.J. Gomer. 2000. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* 60:4066-9.
 82. Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1:27-31.
 83. Gagnon, M.L., D.R. Bielenberg, Z. Gechtman, H.Q. Miao, S. Takashima, S. Soker, and M. Klagsbrun. 2000. Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2573-8.
 84. Gharehbaghi, K., A. Kubin, M. Grusch, E. Gharehbaghi-Schnell, F. Wierrani, H.N. Jayaram, W. Grunberger, and T. Szekeres. 2000. Photodynamic action of meta-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) on an ovarian cancer cell line. *Anticancer Res.* 20:2647-52.
 85. Gille, H., J. Kowalski, B. Li, J. LeCouter, B. Moffat, T.F. Zioncheck, N. Pelletier, and N. Ferrara. 2001. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem.* 276:3222-30.
 86. Gluzman-Poltorak, Z., T. Cohen, Y. Herzog, and G. Neufeld. 2000. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]. *J Biol Chem.* 275:18040-5.
 87. Golab, J., G. Wilczynski, R. Zagozdzon, T. Stoklosa, A. Dabrowska, J. Rybczynska, M. Wasik, E. Machaj, T. Olda, K. Kozar, R. Kaminski, A. Giermasz, A. Czajka, W. Lasek, W. Feleszko, and M. Jakobisiak. 2000. Potentiation of the anti-tumour effects of Photofrin-based photodynamic therapy by localized treatment with G-CSF. *Br J Cancer.* 82:1485-91.
 88. Gollnick, S.O., S.S. Evans, H. Baumann, B. Owczarczak, P. Maier, L. Vaughan, W.C. Wang, E. Unger, and B.W. Henderson. 2003. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer.* 88:1772-9.
 89. Gollnick, S.O., X. Liu, B. Owczarczak, D.A. Musser, and B.W. Henderson. 1997. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res.* 57:3904-9.
 90. Gollnick, S.O., B. Owczarczak, and P. Maier. 2006. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Lasers Surg Med.* 38:509-15.

91. Gollnick, S.O., L. Vaughan, and B.W. Henderson. 2002. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res.* 62:1604-8.
92. Gonzalez, S., M.R. Arnfield, B.E. Meeker, J. Tulip, W.H. Lakey, J.D. Chapman, and M.S. McPhee. 1986. Treatment of Dunning R3327-AT rat prostate tumors with photodynamic therapy in combination with misonidazole. *Cancer Res.* 46:2858-62.
93. Gorski, D.H., M.A. Beckett, N.T. Jaskowiak, D.P. Calvin, H.J. Mauceri, R.M. Salloum, S. Seetharam, A. Koons, D.M. Hari, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum. 1999. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res.* 59:3374-8.
94. Grant, D.S., T.L. Williams, M. Zahaczewsky, and A.P. Dicker. 2003. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int J Cancer.* 104:121-9.
95. Greenfeder, S.A., P. Nunes, L. Kwee, M. Labow, R.A. Chizzonite, and G. Ju. 1995. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem.* 270:13757-65.
96. Hacham, M., S. Argov, R.M. White, S. Segal, and R.N. Apte. 2000. Distinct patterns of IL-1 alpha and IL-1 beta organ distribution--a possible basis for organ mechanisms of innate immunity. *Adv Exp Med Biol.* 479:185-202.
97. Hacham, M., S. Argov, R.M. White, S. Segal, and R.N. Apte. 2002. Different patterns of interleukin-1alpha and interleukin-1beta expression in organs of normal young and old mice. *Eur Cytokine Netw.* 13:55-65.
98. Harper, S.J., and D.O. Bates. 2008. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer.* 8:880-7.
99. Hatz, S., J.D. Lambert, and P.R. Ogilby. 2007. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochem Photobiol Sci.* 6:1106-16.
100. Hatz, S., L. Poulsen, and P.R. Ogilby. 2008. Time-resolved singlet oxygen phosphorescence measurements from photosensitized experiments in single cells: effects of oxygen diffusion and oxygen concentration. *Photochem Photobiol.* 84:1284-90.
101. Heguy, A., C.T. Baldari, G. Macchia, J.L. Telford, and M. Melli. 1992. Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction. *J Biol Chem.* 267:2605-9.
102. Henderson, B.W., S.O. Gollnick, J.W. Snyder, T.M. Busch, P.C. Kousis, R.T. Cheney, and J. Morgan. 2004. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res.* 64:2120-6.
103. Herrera-Ornelas, L., N.J. Petrelli, A. Mittelman, T.J. Dougherty, and D.G. Boyle. 1986. Photodynamic therapy in patients with colorectal cancer. *Cancer.* 57:677-84.
104. Holmqvist, K., M.J. Cross, C. Rolny, R. Hagerkvist, N. Rahimi, T. Matsumoto, L. Claesson-Welsh, and M. Welsh. 2004. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem.* 279:22267-75.
105. Houck, K.A., N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li, and D.W. Leung. 1991. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 5:1806-14.

106. Houck, K.A., D.W. Leung, A.M. Rowland, J. Winer, and N. Ferrara. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 267:26031-7.
107. Hu, B., S. Wang, Y. Zhang, C.A. Feghali, J.R. Dingman, and T.M. Wright. 2003. A nuclear target for interleukin-1alpha: interaction with the growth suppressor necdin modulates proliferation and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10008-13.
108. Iyer, S., D.D. Leonidas, G.J. Swaminathan, D. Maglione, M. Battisti, M. Tucci, M.G. Persico, and K.R. Acharya. 2001. The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem.* 276:12153-61.
109. Iyer, S., P.D. Scotney, A.D. Nash, and K. Ravi Acharya. 2006. Crystal structure of human vascular endothelial growth factor-B: identification of amino acids important for receptor binding. *J Mol Biol.* 359:76-85.
110. Ito, N., C. Wernstedt, U. Engstrom, and L. Claesson-Welsh. 1998. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem.* 273:23410-8.
111. Yamazaki, Y., K. Takani, H. Atoda, and T. Morita. 2003. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem.* 278:51985-8.
112. Yang, W., H. Ahn, M. Hinrichs, R.J. Torry, and D.S. Torry. 2003. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol.* 60:53-60.
113. Yee, K.K., K.C. Soo, and M. Olivo. 2005. Anti-angiogenic effects of Hypericin-photodynamic therapy in combination with Celebrex in the treatment of human nasopharyngeal carcinoma. *Int J Mol Med.* 16:993-1002.
114. Yom, S.S., T.M. Busch, J.S. Friedberg, E.P. Wileyto, D. Smith, E. Glatstein, and S.M. Hahn. 2003. Elevated serum cytokine levels in mesothelioma patients who have undergone pleurectomy or extrapleural pneumonectomy and adjuvant intraoperative photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 78:75-81.
115. Jain, S., G. Chakraborty, R. Raja, S. Kale, and G.C. Kundu. 2008. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Res.* 68:7750-9.
116. Jee, S.H., S.C. Shen, H.C. Chiu, W.L. Tsai, and M.L. Kuo. 2001. Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. *Oncogene.* 20:198-208.
117. Jiang, F., X. Zhang, S.N. Kalkanis, Z. Zhang, H. Yang, M. Katakowski, X. Hong, X. Zheng, Z. Zhu, and M. Chopp. 2008. Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing U87 glioblastoma. *Photochem Photobiol.* 84:128-37.
118. Jiang, F., Z.G. Zhang, M. Katakowski, A.M. Robin, M. Faber, F. Zhang, and M. Chopp. 2004. Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brains. *Photochem Photobiol.* 79:494-8.
119. Jingjing, L., Y. Xue, N. Agarwal, and R.S. Roque. 1999. Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:752-9.
120. Joukov, V., K. Pajusola, A. Kaipainen, D. Chilov, I. Lahtinen, E. Kukk, O. Saksela, N. Kalkkinen, and K. Alitalo. 1996. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C,

- is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J.* 15:1751.
121. Joukov, V., T. Sorsa, V. Kumar, M. Jeltsch, L. Claesson-Welsh, Y. Cao, O. Saksela, N. Kalkkinen, and K. Alitalo. 1997. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *Embo J.* 16:3898-911.
 122. Kaipainen, A., J. Korhonen, T. Mustonen, V.W. van Hinsbergh, G.H. Fang, D. Dumont, M. Breitman, and K. Alitalo. 1995. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:3566-70.
 123. Kaler, P., L. Augenlicht, and L. Klampfer. 2009. Macrophage-derived IL-1beta stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene.* 28:3892-902.
 124. Kaplanski, G., C. Farnarier, S. Kaplanski, R. Porat, L. Shapiro, P. Bongrand, and C.A. Dinarello. 1994. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood.* 84:4242-8.
 125. Karkkainen, M.J., P. Haiko, K. Sainio, J. Partanen, J. Taipale, T.V. Petrova, M. Jeltsch, D.G. Jackson, M. Talikka, H. Rauvala, C. Betsholtz, and K. Alitalo. 2004. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 5:74-80.
 126. Karkkainen, M.J., A. Saaristo, L. Jussila, K.A. Karila, E.C. Lawrence, K. Pajusola, H. Bueler, A. Eichmann, R. Kauppinen, M.I. Kettunen, S. Yla-Herttuala, D.N. Finegold, R.E. Ferrell, and K. Alitalo. 2001. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:12677-82.
 127. Karpanen, T., C.A. Heckman, S. Keskitalo, M. Jeltsch, H. Ollila, G. Neufeld, L. Tamagnone, and K. Alitalo. 2006. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *Faseb J.* 20:1462-72.
 128. Karrer, S., A.K. Bosserhoff, P. Weiderer, M. Landthaler, and R.M. Szeimies. 2004. Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts. *Br J Dermatol.* 151:776-83.
 129. Keck, R.G., L. Berleau, R. Harris, and B.A. Keyt. 1997. Disulfide structure of the heparin binding domain in vascular endothelial growth factor: characterization of posttranslational modifications in VEGF. *Arch Biochem Biophys.* 344:103-13.
 130. Keyt, B.A., L.T. Berleau, H.V. Nguyen, H. Chen, H. Heinsohn, R. Vandlen, and N. Ferrara. 1996a. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem.* 271:7788-95.
 131. Keyt, B.A., H.V. Nguyen, L.T. Berleau, C.M. Duarte, J. Park, H. Chen, and N. Ferrara. 1996b. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 271:5638-46.
 132. Kendall, R.L., R.Z. Rutledge, X. Mao, A.J. Tebben, R.W. Hungate, and K.A. Thomas. 1999. Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues. *J Biol Chem.* 274:6453-60.
 133. Kendall, R.L., and K.A. Thomas. 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10705-9.
 134. Kessel, D., and J.J. Reiners, Jr. 2007. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol.* 83:1024-8.

135. Kick, G., G. Messer, A. Goetz, G. Plewig, and P. Kind. 1995. Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF-kappa B DNA binding. *Cancer Res.* 55:2373-9.
136. Kiesslich, T., K. Plaetzer, C.B. Oberdanner, J. Berlanda, F.J. Obermair, and B. Krammer. 2005. Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction. *FEBS Lett.* 579:185-90.
137. Kim, J.W., T.D. Kim, B.S. Hong, O.Y. Kim, W.H. Yoon, C.B. Chae, and Y.S. Gho. 2010. A serum-stable branched dimeric anti-VEGF peptide blocks tumor growth via anti-angiogenic activity. *Exp Mol Med.* 42:514-23.
138. Kimura, Y.N., K. Watari, A. Fotovati, F. Hosoi, K. Yasumoto, H. Izumi, K. Kohno, K. Umezawa, H. Iguchi, K. Shirouzu, S. Takamori, M. Kuwano, and M. Ono. 2007. Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci.* 98:2009-18.
139. Kirveliėne, V., G. Grazeleėne, D. Dabkeviėiene, I. Micke, D. Kirvelis, B. Juodka, and J. Didziapetriėne. 2006. Schedule-dependent interaction between Doxorubicin and mTHPC-mediated photodynamic therapy in murine hepatoma in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol.* 57:65-72.
140. Kirveliėne, V., A. Sadauskaite, J. Kadziauskas, S. Sasnauskiėne, and B. Juodka. 2003. Correlation of death modes of photosensitized cells with intracellular ATP concentration. *FEBS Lett.* 553:167-72.
141. Konan, Y.N., R. Gurny, and E. Allemann. 2002. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 66:89-106.
142. Korbelik, M., G. Krosł, J. Krosł, and G.J. Dougherty. 1996. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Res.* 56:5647-52.
143. Korbelik, M., G. Krosł, P.L. Olive, and D.J. Chaplin. 1991. Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages. *Br J Cancer.* 64:508-12.
144. Kosharsky, B., N. Solban, S.K. Chang, I. Rizvi, Y. Chang, and T. Hasan. 2006. A mechanism-based combination therapy reduces local tumor growth and metastasis in an orthotopic model of prostate cancer. *Cancer Res.* 66:10953-8.
145. Kostron, H., E. Fritsch, and V. Grunert. 1988. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: a phase I/II trial. *Br J Neurosurg.* 2:241-8.
146. Kowanetz, M., and N. Ferrara. 2006. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 12:5018-22.
147. Krilleke, D., A. DeErkenez, W. Schubert, I. Giri, G.S. Robinson, Y.S. Ng, and D.T. Shima. 2007. Molecular mapping and functional characterization of the VEGF164 heparin-binding domain. *J Biol Chem.* 282:28045-56.
148. Krilleke, D., Y.S. Ng, and D.T. Shima. 2009. The heparin-binding domain confers diverse functions of VEGF-A in development and disease: a structure-function study. *Biochem Soc Trans.* 37:1201-6.
149. Kuk, E., A. Lymboussaki, S. Taira, A. Kaipainen, M. Jeltsch, V. Joukov, and K. Alitalo. 1996. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development.* 122:3829-37.
150. Kurt-Jones, E.A., D.I. Beller, S.B. Mizel, and E.R. Unanue. 1985. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:1204-8.

151. Lagercrantz, J., F. Farnebo, C. Larsson, T. Tvrdik, G. Weber, and F. Piehl. 1998. A comparative study of the expression patterns for vegf, vegf-b/vrf and vegf-c in the developing and adult mouse. *Biochim Biophys Acta*. 1398:157-63.
152. Lang, D., J. Knop, H. Wesche, U. Raffetseder, R. Kurrle, D. Boraschi, and M.U. Martin. 1998. The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol*. 161:6871-7.
153. Lange, T., N. Guttman-Raviv, L. Baruch, M. Machluf, and G. Neufeld. 2003. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem*. 278:17164-9.
154. Lazic, R., and N. Gabric. 2007. Verteporfin therapy and intravitreal bevacizumab combined and alone in choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 114:1179-85.
155. Lee, S., S.M. Jilani, G.V. Nikolova, D. Carpizo, and M.L. Iruela-Arispe. 2005. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*. 169:681-91.
156. Levine, R.J., S.E. Maynard, C. Qian, K.H. Lim, L.J. England, K.F. Yu, E.F. Schisterman, R. Thadhani, B.P. Sachs, F.H. Epstein, B.M. Sibai, V.P. Sukhatme, and S.A. Karumanchi. 2004. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 350:672-83.
157. Li, B., E.E. Sharpe, A.B. Maupin, A.A. Teleron, A.L. Pyle, P. Carmeliet, and P.P. Young. 2006. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *Faseb J*. 20:1495-7.
158. Liao, D., Y. Luo, D. Markowitz, R. Xiang, and R.A. Reisfeld. 2009. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One*. 4:e7965.
159. Lieblein, J.C., S. Ball, B. Hutzen, A.K. Sasser, H.J. Lin, T.H. Huang, B.M. Hall, and J. Lin. 2008. STAT3 can be activated through paracrine signaling in breast epithelial cells. *BMC Cancer*. 8:302.
160. Liew, F.Y., N.I. Pitman, and I.B. McInnes. 2010. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol*. 10:103-10.
161. Lilge, L., M. Portnoy, and B.C. Wilson. 2000. Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue. *Br J Cancer*. 83:1110-7.
162. Lin, H., A.S. Ho, D. Haley-Vicente, J. Zhang, J. Bernal-Fussell, A.M. Pace, D. Hansen, K. Schweighofer, N.K. Mize, and J.E. Ford. 2001. Cloning and characterization of IL-1HY2, a novel interleukin-1 family member. *J Biol Chem*. 276:20597-602.
163. Lisnjak, I.O., V.V. Kutsenok, L.Z. Polyschuk, O.B. Gorobets, and N.F. Gamaleia. 2005. Effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis and metastasis in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Exp Oncol*. 27:333-5.
164. Liu, W., A.R. Oseroff, and H. Baumann. 2004. Photodynamic therapy causes cross-linking of signal transducer and activator of transcription proteins and attenuation of interleukin-6 cytokine responsiveness in epithelial cells. *Cancer Res*. 64:6579-87.
165. Lomedico, P.T., U. Gubler, C.P. Hellmann, M. Dukovich, J.G. Giri, Y.C. Pan, K. Collier, R. Semionow, A.O. Chua, and S.B. Mizel. 1984. Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in Escherichia coli. *Nature*. 312:458-62.

166. Ma, J., H. Sawai, Y. Matsuo, N. Ochi, A. Yasuda, H. Takahashi, T. Wakasugi, H. Funahashi, M. Sato, Y. Okada, H. Takeyama, and T. Manabe. 2008. Interleukin-1 α enhances angiogenesis and is associated with liver metastatic potential in human gastric cancer cell lines. *J Surg Res.* 148:197-204.
167. Ma, L.W., K. Berg, H.E. Danielsen, O. Kaalhus, V. Iani, and J. Moan. 1996. Enhanced antitumour effect of photodynamic therapy by microtubule inhibitors. *Cancer Lett.* 109:129-39.
168. Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, and M.G. Persico. 1991. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:9267-71.
169. Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, M.G. Ferraro, O. Aprelikova, K. Alitalo, S. Del Vecchio, K.J. Lei, J.Y. Chou, and M.G. Persico. 1993. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene.* 8:925-31.
170. Makinen, T., B. Olofsson, T. Karpanen, U. Hellman, S. Soker, M. Klagsbrun, U. Eriksson, and K. Alitalo. 1999. Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem.* 274:21217-22.
171. Mamluk, R., Z. Gechtman, M.E. Kutcher, N. Gasiunas, J. Gallagher, and M. Klagsbrun. 2002. Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J Biol Chem.* 277:24818-25.
172. Matar, P., L. Alaniz, V. Rozados, J.B. Aquino, M. Malvicini, C. Atorrasagasti, M. Gidekel, M. Silva, O.G. Scharovsky, and G. Mazzolini. 2009. Immunotherapy for liver tumors: present status and future prospects. *J Biomed Sci.* 16:30.
173. Matsumoto, T., S. Bohman, J. Dixelius, T. Berge, A. Dimberg, P. Magnusson, L. Wang, C. Wikner, J.H. Qi, C. Wernstedt, J. Wu, S. Bruheim, H. Mugishima, D. Mukhopadhyay, A. Spurkland, and L. Claesson-Welsh. 2005. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *Embo J.* 24:2342-53.
174. Matthews, Y.J., and D.L. Damian. 2009. Topical photodynamic therapy is immunosuppressive in humans. *Br J Dermatol.*
175. McMahan, C.J., J.L. Slack, B. Mosley, D. Cosman, S.D. Lupton, L.L. Brunton, C.E. Grubin, J.M. Wignall, N.A. Jenkins, C.I. Brannan, and et al. 1991. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *Embo J.* 10:2821-32.
176. Melisi, D., J. Niu, Z. Chang, Q. Xia, B. Peng, S. Ishiyama, D.B. Evans, and P.J. Chiao. 2009. Secreted interleukin-1 α induces a metastatic phenotype in pancreatic cancer by sustaining a constitutive activation of nuclear factor- κ B. *Mol Cancer Res.* 7:624-33.
177. Miao, H.Q., P. Lee, H. Lin, S. Soker, and M. Klagsbrun. 2000. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *Faseb J.* 14:2532-9.
178. Mickè, I. 2004. Fotosensibilizuoto citotoksiškumo moduliacijos citostatikais molekuliniai aspektai. Vilniaus universitetas, Vilnius.
179. Mickè, I., D. Dabkevičienė, V. Kirvelienė, and B. Juodka. 2005. Caspase-3 but not caspase-8 is activated by mTHPC-PDT and m-THPC-PDT / Doxorubicin in murine hepatoma MH22 cells. *Biologija.* 1:51-54.
180. Migdal, M., B. Huppertz, S. Tessler, A. Comforti, M. Shibuya, R. Reich, H. Baumann, and G. Neufeld. 1998. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem.* 273:22272-8.

181. Mignatti, P., and D.B. Rifkin. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73:161-95.
182. Mitra, S., and T.H. Foster. 2005. Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin vs Photofrin. *Photochem Photobiol.* 81:849-59.
183. Muller, Y.A., H.W. Christinger, B.A. Keyt, and A.M. de Vos. 1997a. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure.* 5:1325-38.
184. Muller, Y.A., B. Li, H.W. Christinger, J.A. Wells, B.C. Cunningham, and A.M. de Vos. 1997b. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:7192-7.
185. Nasarre, P., B. Constantin, L. Rouhaud, T. Harnois, G. Raymond, H.A. Drabkin, N. Bourmeyster, and J. Roche. 2003. Semaphorin SEMA3F and VEGF have opposing effects on cell attachment and spreading. *Neoplasia.* 5:83-92.
186. Neiva, K.G., Z. Zhang, M. Miyazawa, K.A. Warner, E. Karl, and J.E. Nor. 2009. Cross talk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling. *Neoplasia.* 11:583-93.
187. Nikkels, A.F., C. Pierard-Franchimont, N. Nikkels-Tassoudji, R. Bourguignon, and G.E. Pierard. 2005. Photodynamic therapy and imiquimod immunotherapy for basal cell carcinomas. *Acta Clin Belg.* 60:227-34.
188. Niu, J., Z. Li, B. Peng, and P.J. Chiao. 2004. Identification of an autoregulatory feedback pathway involving interleukin-1 α in induction of constitutive NF- κ B activation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem.* 279:16452-62.
189. Novick, D., S.H. Kim, G. Fantuzzi, L.L. Reznikov, C.A. Dinarello, and M. Rubinstein. 1999. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity.* 10:127-36.
190. Nowis, D., M. Makowski, T. Stoklosa, M. Legat, T. Issat, and J. Golab. 2005. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol.* 52:339-52.
191. O'Connor, A.E., W.M. Gallagher, and A.T. Byrne. 2009. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 85:1053-74.
192. Oleinick, N.L., R.L. Morris, and I. Belichenko. 2002. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci.* 1:1-21.
193. Olofsson, B., E. Korpelainen, M.S. Pepper, S.J. Mandriota, K. Aase, V. Kumar, Y. Gunji, M.M. Jeltsch, M. Shibuya, K. Alitalo, and U. Eriksson. 1998. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11709-14.
194. Olofsson, B., K. Pajusola, G. von Euler, D. Chilov, K. Alitalo, and U. Eriksson. 1996. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem.* 271:19310-7.
195. Olsson, A.K., A. Dimberg, J. Kreuger, and L. Claesson-Welsh. 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:359-71.

196. Pan, G., P. Risser, W. Mao, D.T. Baldwin, A.W. Zhong, E. Filvaroff, D. Yansura, L. Lewis, C. Eigenbrot, W.J. Henzel, and R. Vandlen. 2001. IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp. *Cytokine*. 13:1-7.
197. Park, J.E., H.H. Chen, J. Winer, K.A. Houck, and N. Ferrara. 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. 269:25646-54.
198. Park, S., S.P. Hong, T.Y. Oh, S. Bang, J.B. Chung, and S.Y. Song. 2008. Paclitaxel augments cytotoxic effect of photodynamic therapy using verteporfin in gastric and bile duct cancer cells. *Photochem Photobiol Sci*. 7:769-74.
199. Pazos, M.C., and H.B. Nader. 2007. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Braz J Med Biol Res*. 40:1025-35.
200. Peretz, D., H. Gitay-Goren, M. Safran, N. Kimmel, D. Gospodarowicz, and G. Neufeld. 1992. Glycosylation of vascular endothelial growth factor is not required for its mitogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 182:1340-7.
201. Peters, K.G., C. De Vries, and L.T. Williams. 1993. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:8915-9.
202. Pietrzak, A., A. Zalewska, G. Chodorowska, P. Nockowski, A. Michalak-Stoma, P. Osemlak, and D. Krasowska. 2008. Genes and structure of selected cytokines involved in pathogenesis of psoriasis. *Folia Histochem Cytobiol*. 46:11-21.
203. Plouet, J., F. Moro, S. Bertagnolli, N. Coldeboeuf, H. Mazarguil, S. Clamens, and F. Bayard. 1997. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem*. 272:13390-6.
204. Poesen, K., D. Lambrechts, P. Van Damme, J. Dhondt, F. Bender, N. Frank, E. Bogaert, B. Claes, L. Heylen, A. Verheyen, K. Raes, M. Tjwa, U. Eriksson, M. Shibuya, R. Nuydens, L. Van Den Bosch, T. Meert, R. D'Hooge, M. Sendtner, W. Robberecht, and P. Carmeliet. 2008. Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration. *J Neurosci*. 28:10451-9.
205. Poltorak, Z., T. Cohen, R. Sivan, Y. Kandelis, G. Spira, I. Vlodavsky, E. Keshet, and G. Neufeld. 1997. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem*. 272:7151-8.
206. Potgens, A.J., N.H. Lubsen, M.C. van Altena, R. Vermeulen, A. Bakker, J.G. Schoenmakers, D.J. Ruiter, and R.M. de Waal. 1994. Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations. *J Biol Chem*. 269:32879-85.
207. Price, M., J.J. Reiners, A.M. Santiago, and D. Kessel. 2009. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 85:1177-81.
208. Priebe, W. 1995. Anthracycline antibiotics. New analogues, methods of delivery and mechanisms of action. American Chemical Society, Washington. 380.
209. Prudovsky, I., F. Tarantini, M. Landriscina, D. Neivandt, R. Soldi, A. Kirov, D. Small, K.M. Kathir, D. Rajalingam, and T.K. Kumar. 2008. Secretion without Golgi. *J Cell Biochem*. 103:1327-43.

210. Quinn, T.P., K.G. Peters, C. De Vries, N. Ferrara, and L.T. Williams. 1993. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:7533-7.
211. Rapidis, A.D., and G.T. Wolf. 2009. Immunotherapy of head and neck cancer: current and future considerations. *J Oncol.* 2009:346345.
212. Redmond, R.W., and I.E. Kochevar. 2006. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 82:1178-86.
213. Reigstad, L.J., J.E. Varhaug, and J.R. Lillehaug. 2005. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *Febs J.* 272:5723-41.
214. Robertson, C.A., D.H. Evans, and H. Abrahamse. 2009. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B.* 96:1-8.
215. Robinson, C.J., and S.E. Stringer. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci.* 114:853-65.
216. Ronn, A.M., M. Nouri, L.A. Lofgren, B.M. Steinberg, A. Westerborn, T. Windahl, M.J. Shikowitz, and A.L. Abramson. 1996. Human tissue levels and plasma pharmacokinetics of temoporfin (Foscan®, mTHPC). *Lasers in Medical Science.* 11:267-272.
217. Roskoski, R., Jr. 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 62:179-213.
218. Sagong, M., J. Lee, and W. Chang. 2009. Application of intravitreal bevacizumab for circumscribed choroidal hemangioma. *Korean J Ophthalmol.* 23:127-31.
219. Sakurai, T., G. He, A. Matsuzawa, G.Y. Yu, S. Maeda, G. Hardiman, and M. Karin. 2008. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell.* 14:156-65.
220. Salven, P., A. Lymboussaki, P. Heikkila, H. Jaaskela-Saari, B. Enholm, K. Aase, G. von Euler, U. Eriksson, K. Alitalo, and H. Joensuu. 1998. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol.* 153:103-8.
221. Sasnauskiene, A., J. Kadziauskas, N. Vezelyte, V. Jonusiene, and V. Kirveliene. 2009. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis.* 14:276-86.
222. Sawai, H., H. Funahashi, Y. Okada, Y. Matsuo, M. Sakamoto, M. Yamamoto, H. Takeyama, and T. Manabe. 2005. Interleukin-1alpha enhances IL-8 secretion through p38 mitogen-activated protein kinase and reactive oxygen species signaling in human pancreatic cancer cells. *Med Sci Monit.* 11:BR343-50.
223. Sawano, A., T. Takahashi, S. Yamaguchi, and M. Shibuya. 1997. The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 238:487-91.
224. Senger, D.R., D.T. Connolly, L. Van de Water, J. Feder, and H.F. Dvorak. 1990. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res.* 50:1774-8.
225. Shibuya, M., and L. Claesson-Welsh. 2006. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* 312:549-60.

226. Shibuya, M., S. Yamaguchi, A. Yamane, T. Ikeda, A. Tojo, H. Matsushime, and M. Sato. 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. 5:519-24.
227. Siegfried, G., A. Basak, J.A. Cromlish, S. Benjannet, J. Marcinkiewicz, M. Chretien, N.G. Seidah, and A.M. Khatib. 2003. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest*. 111:1723-32.
228. Siemeister, G., M. Schirner, P. Reusch, B. Barleon, D. Marme, and G. Martiny-Baron. 1998. An antagonistic vascular endothelial growth factor (VEGF) variant inhibits VEGF-stimulated receptor autophosphorylation and proliferation of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:4625-9.
229. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150:76-85.
230. Spencer, C.M., and D. Faulds. 1994. Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs*. 48:794-847.
231. Stacker, S.A., K. Stenvers, C. Caesar, A. Vitali, T. Domagala, E. Nice, S. Roufail, R.J. Simpson, R. Moritz, T. Karpanen, K. Alitalo, and M.G. Achen. 1999. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem*. 274:32127-36.
232. Stauffer, M.E., N.J. Skelton, and W.J. Fairbrothe. 2002. Refinement of the solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor using residual dipolar couplings. *J Biomol NMR*. 23:57-61.
233. Stevenson, F.T., S.L. Bursten, C. Fanton, R.M. Locksley, and D.H. Lovett. 1993. The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:7245-9.
234. Stevenson, F.T., J. Turck, R.M. Locksley, and D.H. Lovett. 1997. The N-terminal propiece of interleukin 1 alpha is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:508-13.
235. Streckyte, G., J. Didziapetriene, G. Grazeliene, G. Prasmickiene, D. Sukeliene, N. Kazlauskaite, D. Characiejus, L. Griuciute, and R. Rotomskis. 1999. Effects of photodynamic therapy in combination with Adriamycin. *Cancer Lett*. 146:73-86.
236. Su, J.L., P.C. Yang, J.Y. Shih, C.Y. Yang, L.H. Wei, C.Y. Hsieh, C.H. Chou, Y.M. Jeng, M.Y. Wang, K.J. Chang, M.C. Hung, and M.L. Kuo. 2006. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell*. 9:209-23.
237. Subramaniam, S., C. Stansberg, and C. Cunningham. 2004. The interleukin 1 receptor family. *Dev Comp Immunol*. 28:415-28.
238. Sun, J., I. Cecic, C.S. Parkins, and M. Korbelik. 2002. Neutrophils as inflammatory and immune effectors in photodynamic therapy-treated mouse SCCVII tumours. *Photochem Photobiol Sci*. 1:690-5.
239. Sun, P.D., and D.R. Davies. 1995. The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 24:269-91.
240. Sund, M., Y. Hamano, H. Sugimoto, A. Sudhakar, M. Soubasakos, U. Yerramalla, L.E. Benjamin, J. Lawler, M. Kieran, A. Shah, and R. Kalluri. 2005. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:2934-9.

241. Takahashi, H., S. Hattori, A. Iwamatsu, H. Takizawa, and M. Shibuya. 2004. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. *J Biol Chem.* 279:46304-14.
242. Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida, and M. Shibuya. 2001. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *Embo J.* 20:2768-78.
243. Takahashi, T., F. Nakamura, Z. Jin, R.G. Kalb, and S.M. Strittmatter. 1998. Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci.* 1:487-93.
244. Tallarida, R.J. 2000. Drug synergism and dose-effect data analysis. Chapman&Hall/CRC, Boca Raton. 82, 83 pp.
245. Tallarida, R.J. 2001. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther.* 298:865-72.
246. Tanaka, K., S. Yamaguchi, A. Sawano, and M. Shibuya. 1997. Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1 tyrosine kinase). *Jpn J Cancer Res.* 88:867-76.
247. Teiten, M.H., L. Bezdetnaya, P. Morliere, R. Santus, and F. Guillemin. 2003. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer.* 88:146-52.
248. Telford, J.L., G. Macchia, A. Massone, V. Carinci, E. Palla, and M. Melli. 1986. The murine interleukin 1 beta gene: structure and evolution. *Nucleic Acids Res.* 14:9955-63.
249. Terman, B.I., M.E. Carrion, E. Kovacs, B.A. Rasmussen, R.L. Eddy, and T.B. Shows. 1991. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 6:1677-83.
250. Thomas, K.A. 1996. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem.* 271:603-6.
251. Tischer, E., R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J.C. Fiddes, and J.A. Abraham. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 266:11947-54.
252. Triesscheijn, M., M. Ruevekamp, R. Out, T.J. Van Berkel, J. Schellens, P. Baas, and F.A. Stewart. 2007. The pharmacokinetic behavior of the photosensitizer meso-tetrahydroxyphenyl-chlorin in mice and men. *Cancer Chemother Pharmacol.* 60:113-22.
253. Uefuji, K., T. Ichikura, and H. Mochizuki. 2005. Increased expression of interleukin-1alpha and cyclooxygenase-2 in human gastric cancer: a possible role in tumor progression. *Anticancer Res.* 25:3225-30.
254. Uehara, M., T. Inokuchi, K. Sano, and W. ZuoLin. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor in mouse tumours subjected to photodynamic therapy. *Eur J Cancer.* 37:2111-5.
255. Usuda, J., T. Okunaka, K. Furukawa, T. Tsuchida, Y. Kuroiwa, Y. Ohe, N. Saijo, K. Nishio, C. Konaka, and H. Kato. 2001. Increased cytotoxic effects of photodynamic therapy in IL-6 gene transfected cells via enhanced apoptosis. *Int J Cancer.* 93:475-80.
256. van Duijnhoven, F.H., R.I. Aalbers, J.P. Rovers, O.T. Terpstra, and P.J. Kuppen. 2003. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. *Immunobiology.* 207:105-13.

257. Vergoten, G., and J.P. Zanetta. 2007. Structural differences between the putative carbohydrate-recognition domains of human IL-1 alpha, IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist obtained by in silico modeling. *Glycoconj J.* 24:183-93.
258. Vincenti, V., C. Cassano, M. Rocchi, and G. Persico. 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* 93:1493-5.
259. Wada, J., H. Suzuki, R. Fuchino, A. Yamasaki, S. Nagai, K. Yanai, K. Koga, M. Nakamura, M. Tanaka, T. Morisaki, and M. Katano. 2009. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer Res.* 29:881-8.
260. Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, and C.H. Heldin. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 269:26988-95.
261. Wang, J.C. 1996. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* 65:635-92.
262. Weaver, J.L., P.S. Pine, A. Aszalos, P.V. Schoenlein, S.J. Currier, R. Padmanabhan, and M.M. Gottesman. 1991. Laser scanning and confocal microscopy of daunorubicin, doxorubicin, and rhodamine 123 in multidrug-resistant cells. *Exp Cell Res.* 196:323-9.
263. Wilson, B.C., and M.S. Patterson. 2008. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.* 53:R61-109.
264. Winters, U., S. Daayana, J.T. Lear, A.E. Tomlinson, E. Elkord, P.L. Stern, and H.C. Kitchener. 2008. Clinical and immunologic results of a phase II trial of sequential imiquimod and photodynamic therapy for vulval intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res.* 14:5292-9.
265. Wyld, L., M.W. Reed, and N.J. Brown. 2001. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer.* 84:1384-6.
266. Wolf, S.F., D. Sieburth, and J. Sypek. 1994. Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells.* 12:154-68.
267. Wong, T.W., E. Tracy, A.R. Oseroff, and H. Baumann. 2003. Photodynamic therapy mediates immediate loss of cellular responsiveness to cytokines and growth factors. *Cancer Res.* 63:3812-8.
268. Woolard, J., W.Y. Wang, H.S. Bevan, Y. Qiu, L. Morbidelli, R.O. Pritchard-Jones, T.G. Cui, M. Sugiono, E. Waine, R. Perrin, R. Foster, J. Digby-Bell, J.D. Shields, C.E. Whittles, R.E. Mushens, D.A. Gillatt, M. Ziche, S.J. Harper, and D.O. Bates. 2004. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 64:7822-35.
269. Wu, Y., and B.P. Zhou. 2009. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle.* 8:3267-73.
270. Zhang, F., Z. Tang, X. Hou, J. Lennartsson, Y. Li, A.W. Koch, P. Scotney, C. Lee, P. Arjunan, L. Dong, A. Kumar, T.T. Rissanen, B. Wang, N. Nagai, P. Fons, R. Fariss, Y. Zhang, E. Wawrousek, G. Tansey, J. Raber, G.H. Fong, H. Ding, D.A. Greenberg, K.G. Becker, J.M. Herbert, A. Nash, S. Yla-Herttuala, Y. Cao, R.J. Watts, and X. Li. 2009. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:6152-7.
271. Zhang, X., F. Jiang, S.N. Kalkanis, Z. Zhang, X. Hong, H. Yang, and M. Chopp. 2007. Post-acute response of 9L gliosarcoma to Photofrin-mediated PDT in athymic nude mice. *Lasers Med Sci.* 22:253-9.

272. Zhang, X., F. Jiang, Z.G. Zhang, S.N. Kalkanis, X. Hong, A.C. deCarvalho, J. Chen, H. Yang, A.M. Robin, and M. Chopp. 2005. Low-dose photodynamic therapy increases endothelial cell proliferation and VEGF expression in nude mice brain. *Lasers Med Sci.* 20:74-9.
273. Zhou, Q., M. Olivo, K.Y. Lye, S. Moore, A. Sharma, and B. Chowbay. 2005. Enhancing the therapeutic responsiveness of photodynamic therapy with the antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 in murine nasopharyngeal carcinoma models. *Cancer Chemother Pharmacol.* 56:569-77.

Publikacijų disertacijos tema sąrašas

1. **D. Dabkevičienė**, V. Kirvelienė, D. Kirvelis. Combination of Doxorubicin and photodynamic treatment in murine hepatoma MH-22A cells *in vitro*: biostatistical evaluation // *Biologija*. ISSN 1392-0146. Lietuvos mokslų akademijos leidykla, **2004**; 2:121-4.
2. I. Mickė, **D. Dabkevičienė**, V. Kirvelienė, B. Juodka. Caspase-3 but not caspase-8 is activated by mTHPC-PDT and mTHPC-PDT / Doxorubicin in murine hepatoma MH22 cells // *Biologija*. ISSN 1392-0146. Lietuvos mokslų akademijos leidykla, **2005**; 1:51-4.
3. V. Kirveliėne, G. Graželiėne, **D. Dabkeviėiene**, I. Micke, D. Kirvelis, B. Juodka, J. Didziapetriėne. Schedule-dependent interaction between Doxorubicin and mTHPC-mediated photodynamic therapy in murine hepatoma *in vitro* and *in vivo* // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. ISSN 0344-5704. Springer, **2006**; 57(1):65-72. Epub 2005, DOI: 10.1007/s00280-005-0006-7.
4. **D. Dabkeviėienė**, V. Stankeviėius, G. Graželiėnė, A. Markuckas, J. Didziapetriėnė, V. Kirvelienė. mTHPC-mediated photodynamic treatment of Lewis lung carcinoma *in vitro* and *in vivo* // *Medicina*, **2010**; 46(5):345-350.

Pristatymai konferencijose

1. A. Sadauskaite, **D. Dabkeviėiene**, E. Leman, V. Jurgelevicius, V. Kirveliėne. Apoptosis and expression of IL1A and VEGF following photodynamic treatment *in vitro* // GREMI meeting „Apoptose, Caspases et Inflammation“. 2005, Paris, p.16.
2. E. Leman, A. Sadauskaite, **D. Dabkeviėiene**, V. Jurgelevicius, V. Kirveliėne. Expression of VEGF and IL1A *in vitro* following PDT and treatment with cytostatic drugs// European Life Science Organization. 2005 Conference, Dresden, p. 187
3. **D. Dabkeviėiene**, A. Sadauskaite, R. Kvietkauskaite, V. Jurgelevicius, V. Kirvelienė. Combination of photodynamic treatment with cytostatic drugs: expression of cytokines *in vitro*// European Life Science Organization. 2007 Conference, Dresden, p. 62.
4. **D. Dabkeviėienė**. Kai kurių citokinų raiška pažeistose navikinėse ląstelėse// KMU nacionalinė mokslinė konferencija „Mokslas - žmonių sveikatai“. 2009, Kaunas, žodinis pranešimas
5. **D. Dabkeviėiene**, A. Sasnauskienė, V. Stankeviėius, V. Kirveliėne. Expression of VEGF and IL-1 in photodynamically treated cells *in vitro*// LBS meeting “LBS 50”. 2010, Tolieja, p. 25.

PADĖKA

Esu labai dėkinga darbo vadovei prof. dr. Vidai Kirvelienei už suteiktą galimybę dirbti mokslinį darbą ir puikų vadovavimą.

Dėkoju Vilniaus Universiteto darbuotojams: Vidai Piskarskienei už pagalbą dirbant su ląstelėmis, prof. Dobilui Kirveliui už vertingus patarimus planuojant eksperimentus, prof. Jurgiui Kadziauskui ir dr. Lidai Bagdonienei už skirtą laiką mano darbui ir vertingas pastabas, Aušrai Sasnauskienei už pagalbą atliekant iRNR raiškos tyrimus, dr. Violetai Jonušienei už pagalbą dirbant su tĕkmes citometru, Neringai Vėželytei už atliktus *ILIA* tildymo eksperimentus, Vaidotui Stankevičiui už pagalbą eksperimentuojant. Dėkoju visiems kolegoms už pagalbą ir gerą nuotaiką fakultete.

Ačiū dr. Raimondai Kvietkauskaitei iš Inovatyviosios Medicinos Centro už pagalbą atliekant tyrimus *ELISA* metodu ir perduotą patirtį.

Norėčiau išreikšti savo padėką žmonėms iš Vilniaus Universiteto Onkologijos Instituto, kurių darbas leido man atlikti eksperimentus *in vivo*: dr. Janinai Didžiapetrienei už sėkmingą projektą ir konsultavimą, prof. Ričardui Rotomskiui už suteiktą galimybę naudotis laboratorine įranga, dr. Gražinai Graželienei ir Danutei Bulotienei už pagalbą atliekant *in vivo* eksperimentus. Dėkoju Daliai Akramienei iš Kauno Medicinos Universiteto už nuoširdų bendradarbiavimą.

Dėkoju prof. Raymond Bonnett iš Londono Universiteto už padovanotą mTHPC fotosensibilizatorių.

Dėkoju dr. Vaclovui Jurgelevičiui iš Nacionalinės Veterinarijos Laboratorijos už suteiktą galimybę naudotis ABI Prism 7900HT prietaisu.

Už finacinę paramą dėkoju LVMSF.

Labai ačiū visiems draugams už atvirą ir nuoširdų bendravimą. Mano padėka ir pagarba tėvams už jų supratingumą ir palaikymą. Ypatingai dėkoju vyrui Mariui ir dukrelei Girstautei.

Be visų Jūsų šio darbo nebūtų...