

Uniwersytet Jagielloński

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii



Martyna Śniegocka

Monitorowanie wzrostu i przerzutowania czerniaka
zlokalizowanego w gałce ocznej po terapii wiązką
protonów. Badania na modelu zwierzęcym.

Rozprawa doktorska przygotowana
w Zakładzie Biofizyki pod kierunkiem
Prof. dr hab. Krystyny Urbańskiej

Kraków 2018

Spis treści

1. Wykaz skrótów	4
2. Streszczenia	5
3. Wstęp.....	9
3.1 Terapia wiązką protonów	9
3.1.1 Biofizyczne podstawy terapii wiązką protonów	10
3.1.2 Penetracja wiązki protonów w materii w porównaniu z fotonami	11
3.1.3 Uszkodzenia DNA powodowane przez wiązkę protonów	13
3.1.4 Kliniczne zastosowanie terapii wiązką protonów.....	14
3.2 Czerniaki gałki ocznej.....	16
3.2.1 Ogólna charakterystyka	16
3.2.2 Modele zwierzęce czerniaków oka.....	18
3.2.3 Proces przerzutowania.....	20
3.2.4 Rola unaczynienia w rozwoju i rozsiewie nowotworu.....	23
3.2.5 Terapie kliniczne czerniaków oka	24
3.3 Obrazowanie wzrostu guzów pierwotnych i ich unaczynienia	26
3.3.1 Metoda korozyjna	26
3.3.2 Ultrasonografia Dopplerowska.....	27
3.3.3 Mikro-tomografia komputerowa	29
4. Cele pracy	31
5. Materiały i metody	32
5.1. Hodowla in vitro.	32
5.2. Implantacja i obserwacja wzrostu czerniaka w gałce ocznej	34
5.3. Obrazowanie guzów metodą ultrasonografii dopplerowskiej.....	37
5.4. Obrazowanie guzów metodą mikro-tomografii komputerowej.	38
5.5. Witamina D	39
5.6. Terapia wiązką protonów	40

5.8. Alternatywny model zwierzęcy do badania czerniaka gałki ocznej.	42
6. Wyniki	44
6.1. Własności migracyjne komórek BHM Ma.	44
6.2. Obrazowanie unaczynienia guzów pierwotnych.....	49
6.2.1 Wraz z rozwojem objętości nowotworu maleje tempo przepływu krwi.	49
6.2.2 Wraz z rozwojem objętości nowotworu stosunek powierzchni naczyń do objętości guza utrzymuje się na stałym poziomie.	51
6.3. Optymalizacja stężenia witaminy D podawanej chomikom syryjskim	57
6.4. Wzrost guzów po implantacji skrawków BHM Ma do przedniej komory oka....	61
6.5. Odpowiedź czerniaka zlokalizowanego w gałce ocznej chomików na napromienianie wiązką protonów	64
6.6 Analiza średniego czasu przeżycia i lokalizacja przerzutów u zwierząt.....	74
6.6.1 Zwierzęta z guzami S przeżywały dłużej niż zwierzęta z guzami L.....	74
6.6.2 Zwierzęta, u których doszło do wznowy guza w oczodole nie miały przerzutów do płuc	79
6.6.3 Analiza histologiczna pobranych organów	82
6.7 Obrazowanie czerniaka oka na alternatywnym modelu zwierzęcym	84
7. Dyskusja	86
7.1 Aktywność migracyjna komórek BHM Ma.....	86
7.2 Chomik syryjski i inne modele zwierzęce	87
7.3 Obrazowanie unaczynienia czerniaka gałki ocznej.....	90
7.4 Optymalizacja stężenia witaminy D.....	97
7.5. Terapia protonowa	99
7.6. Ocena długofalowej skuteczności zastosowanych procedur terapeutycznych. .	107
8. Wnioski końcowe	110
9. Literatura	112

1. Wykaz skrótów

ALT	aminotransferaza alaninowa
AST	aminotransferaza asparaginianowa
BHM Ma	upigmentowany czerniak skóry Bomirskiego (ang. Bomirski Hamster Melanoma)
CAFs	fibroblasty związane z nowotworem (ang. Cancer Associated Fibroblasts)
CME	współczynnik wydajności ruchu (ang. Coefficient of Movement Efficiency)
DCE-MRI	magnetyczny rezonans jądrowy wzmocniony kontrastem (ang. Dynamic Contrast Enhanced MRI)
DSB	podwójne pęknięcia nici DNA (ang. Double Strand Breaks)
GGTP	transpeptydaza gamma-glutamylowa
Guz S	guz, którego objętość była $\leq 3 \text{ mm}^3$ w momencie wykonywania procedury terapeutycznej
Guz L	guz, którego objętość była $> 3 \text{ mm}^3$ w momencie wykonywania procedury terapeutycznej
LET	Liniowy Transfer Energii (ang. Linear Energy Transfer)
LN229	komórki ludzkiego glejaka wielopostaciowego IV stopnia złośliwości wg. WHO
Micro-CT	mikrotomografia komputerowa
MRI	obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. Magnetic Resonance Imaging)
NMR	Spektroskopia Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (ang. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. Platelet- Derived Growth Factor)
PET	Pozytonowa Tomografia Emisyjna (ang. Positron Emission Tomography)
pMBRT	terapia protonowa mini-wiązką (ang. Proton minibeam radiation therapy)
PAI	obrazowanie fotoakustyczne
RBE	względna skuteczność biologiczna (ang. Relative Biological Effectiveness)
SOBP	poszerzony pik Bragga (ang. Spread Out Bragg Peak)
SSB	pojedyncze pęknięcia nici DNA (ang. Single Strand Breaks)
USG	ultrasonografia
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka (ang. Vascular Endothelial Growth Factor)
VEGFR	receptor VEGF
Witamina D	Kalcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)
4T1	komórki mysiego nowotworu piersi

2. Streszczenia

Terapia protonowa to jedna z najbardziej obiecujących metod leczenia nowotworów zlokalizowanych wewnątrz ciała pacjentów. Dzięki unikatowym własnościom fizycznym wiązki protonów, możliwe jest jej precyzyjne dopasowanie do kształtu guza w celu zniszczenia tkanki nowotworowej przy jednoczesnej ochronie przed promieniowaniem otaczających guz tkanek prawidłowych. Terapia protonowa jest stosowana w praktyce klinicznej, jednak w literaturze brakuje badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych. Celem niniejszej pracy było wypełnienie tej luki. Podjęto również próbę optymalizacji obrazowania tkanek miękkich metodą mikro-tomografii komputerowej (micro-CT) na dwóch modelach zwierzęcych.

Ze skrawków tkanki czerniaka Bomirskiego (Bomirski Hamster Melanoma-BHM Ma) wyprowadzono linię komórkową w celu sprawdzenia tempa proliferacji komórek. Badania na poziomie *in vitro* wykazały, że komórki mają krótki czas podwojenia populacji, a ich aktywność migracyjna wzrasta wraz z gęstością wysiania komórek.

Do przedniej komory lewego oka chomika syryjskiego inokulowano skrawek tkanki guza BHM Ma. W pierwszej fazie obserwowano regresję skrawka, a po około 5 dniach rozpoczął się wzrost guza. Zwierzęta z guzami w przedniej komorze oka napromieniano wiązką protonów w dawkach jednorazowych: 6, 10, 20 i 30 Gy. Dodatkowo, części zwierząt podawano lek antyangiogeny Avastin® lub witaminę D w celu wzmocnienia skuteczności terapii protonowej. Gdy guz wypełnił całą objętość przedniej komory oka zwierzęcia, wykonywano enukleację gałki ocznej. Część z wypreparowanych gałek ocznych wykorzystano w próbach optymalizacji obrazowania tkanek miękkich przy pomocy micro-CT.

Zaobserwowano, że napromienianie guzów wiązką protonów w jednorazowej dawce 10 Gy skutkuje spowolnieniem ich wzrostu, czego nie zaobserwowano przy dawce 6 Gy. Zauważono, że dawka ≥ 20 Gy powoduje uszkodzenia tkanek prawidłowych struktur oka. Istotnym czynnikiem determinującym skuteczność zastosowanej terapii protonowej była wielkość guza w momencie napromieniania. Gdy objętość guza była ≤ 3 mm³ dochodziło do znacznego spowolnienia wzrostu guza, czego nie obserwowano przy napromienianiu guzów o większej objętości (powyżej 3 mm³). Unaczynienie obrazowane przy pomocy USG stanowiło stały odsetek objętości guza na poziomie 25%. Równocześnie obserwowano istotny spadek funkcjonalności naczyń,

przejawiający się zmniejszeniem tempa przepływu krwi w miarę wzrostu objętości nowotworu. Zwierzęta, które napromieniano wiązką protonów, gdy guz w przedniej komorze oka miał objętość $\leq 3 \text{ mm}^3$ przeżywały znacząco dłużej (średnio o 20 dni) niż zwierzęta, których guz był większy niż 3 mm^3 . Żadna z przeprowadzonych procedur terapeutycznych nie zmieniła istotnie masy przerzutów w płucach. Po enukleacji, u niektórych chomików dochodziło do odrostu guza pierwotnego w oczodole. Wznowy guza w oczodole powodowały skrócenie czasu przeżycia zwierząt przy jednoczesnej redukcji masy przerzutów.

Optymalizacja protokołu przygotowania tkanek oka do obrazowania guzów metodą micro-CT umożliwiła uzyskanie wysokorozdzielczych, trójwymiarowych rekonstrukcji gałki ocznej wraz z guzem i jego unaczynieniem. Guzy BHM Ma są gęsto unaczynione w całej objętości guza co może być jedną z przyczyn gwałtownego rozsiewu tego nowotworu.

W ramach powyższej pracy podjęto również próbę ustabilizowania alternatywnego modelu zwierzęcego do badania czerniaków gałki ocznej. W tym celu inokulowano komórki ludzkiego czerniaka 92.1 w ilości 10 tys. komórek do tylnej części gałki ocznej myszy SCID. Zaobserwowano wzrost guzów u 33% zwierząt w okresie do 82 dni od inokulacji. Gdy guz wypełniał całą gałkę lub gdy zauważono pogorszenie stanu zwierzęcia przeprowadzano enukleację. U żadnej myszy nie zaobserwowano przerzutów do płuc ani do wątroby. Obrazy uzyskane dzięki metodzie USG były zbyt niskiej rozdzielczości, aby przeprowadzić wiarygodną analizę ilościową stosunku objętości guza do objętości jego unaczynienia. Obrazowanie metodą micro-CT pokazało, że rozwój unaczynienia w tym modelu znacznie różni się od obserwowanego przy wzroście czerniaka BHM Ma w przedniej komorze oka chomika. Unaczynienie guza 92.1 rozwija się po zewnętrznej stronie guza a następnie przechodzi w duże, martwicze strefy.

W pracy wykazano, że model zwierzęcy czerniaka BHM Ma jest przydatny do badania skuteczności protonoterapii. Obiecującym kierunkiem rozwoju wiedzy o czerniakach gałki ocznej mogą stać się badania na ludzkich komórkach dających guzy w oku u myszy SCID. Terapia wiązką protonów jest skuteczna pod warunkiem podjęcia jej na wczesnym etapie wzrostu guza (do objętości 3 mm^3). Ważnym czynnikiem związanym z procesem przerzutowania jest unaczynienie guzów czerniaka, które różni się znacznie w obu modelach. Znalezienie przerzutów czerniaka u myszy pozwoliłoby na dalsze poszerzenie badań, bo przerzuty są główną przyczyną śmierci pacjentów z czerniakiem oka.

Abstract

Proton therapy is one of the most promising method of treating cancers localized inside of the patient's body. Thanks to unique physical properties of protons beam, it is possible to form a beam which perfectly fits to the shape of the tumor and preserve surrounding healthy tissues. Proton therapy is used in clinical practice, but there is lack of research about this technique based on animal models. The main aim of this thesis is to fill in this gap. An attempt was also made to optimize imaging of soft tissues with micro-computed tomography (micro-CT) with the samples from two animal models.

A cell culture was established from the scrap of Bomirski Hamster Melanoma (BHM Ma) tumor in order to check proliferation ratio of this cells. In vitro experiments proved, that BHM Ma cells have very short doubling time and its migration activity increase with the number of cells in the culture.

A small fragment of BHM Ma tissue was implanted into anterior chamber of the Syrian hamster's left eye. During the first phase the regression of the tissue scrap was observed, and after approximately 5 days tumor started to grow. Animals with the tumors in the anterior chamber of the eyeball were irradiated with the proton beam in a single dose of 6, 10, 20 and 30 Gy. Additionally, to some of the animals antiangiogenic drug (Avastin®) or vitamin D were administrated in order to enhance effectiveness of the proton beam therapy. When the tumor completely filled the anterior chamber of the animal eye, enucleation was performed. Some of the obtained eyeballs were reserved for optimization of micro-CT imaging of soft tissues.

Proton beam irradiation in a single dose of 10 Gy slowed down growth of the primary tumor. This observation was not made with a dose of 6 Gy. Irradiation with the proton beam in a single dose equal or larger than 20 Gy caused severe damage of the healthy tissues of the eyeball. An essential factor which determined effectiveness of the proton beam therapy was the size of the tumor at the time of irradiation. When the volume of the tumor was $\leq 3 \text{ mm}^3$ at the time of irradiation, the speed of tumor growth was reduced. This observation was not valid when the size of the tumor was greater than 3 mm^3 . Vascularization observed through Ultrasonography (US) imaging occupied 25% of the tumor volume during the whole time of tumor development. At the same time the reduction of vessels functionality

was observed, what was manifested with the decrease of speed of the blood flow with the growth of the tumor. Animals, which were irradiated with the proton beam when the size of the tumor was $\leq 3 \text{ mm}^3$ survived significantly longer (for approximately 20 days) than animals irradiated when the tumor was larger than 3 mm^3 . None of the proposed therapeutic procedures reduced the amount of metastasis in the lungs. In some cases, after the enucleation a regrowth of the primary tumor in the orbit was observed. Regrowth of the tumor caused a significant reduction of a mean survival of the animals and lack of metastasis in the lungs.

Optimization of the protocol of preparation eyeballs for micro-CT imaging allowed to obtain a high quality, three- dimensional reconstructions of the eyeball, tumor and its vascularization. BHM Ma tumors are densely vascularized in the whole volume of the tumor what could be a reason for a high metastatic potential of this tumor.

An attempt was made to establish an alternative in vivo model to continue research on ocular melanoma. In order to do this, 10 thousand of human melanoma cells 92.1 were implanted into the eye of SCID mice. The growth of the primary tumor was observed in 33% of animals within 82 days after implantation. Euthanasia was performed when the tumor filled in the eyeball or deterioration of health conditions were observed. There was lack of metastasis to the lungs or livers. Images obtained with US had poor resolution so it was impossible to perform a reliable quantitative analysis of the tumor and vessels volume ratio. However, micro-CT images presented that vascularization in this tumor is significantly different than the one observed in BHM Ma tumors in the hamster eye. Vascularization of the 92.1 tumor is well developed in the outturn parts of the tumor and transform to large, necrotic spheres inside of the tumor.

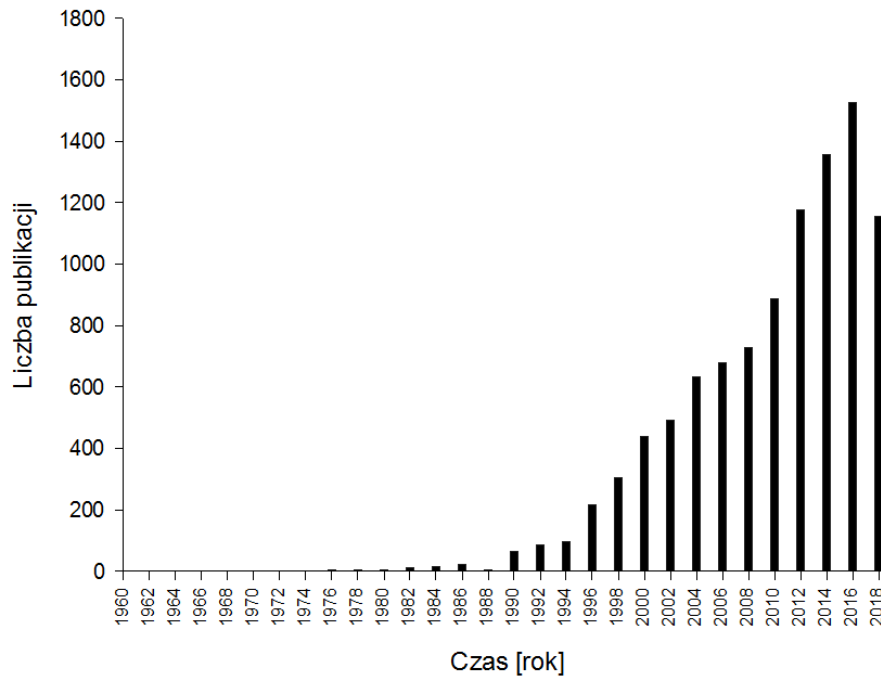
This thesis states that in vivo model of BHM Ma tumor is useful in terms of testing effectiveness of proton beam therapy. An interesting alternative could be research on human cancer cells implanted into an eye of SCID mice. Proton beam therapy is effective if it is performed at early stage of tumor development (volume $\leq 3 \text{ mm}^3$). An important factor which differ this two models is vascularization. A new direction that should be tasted is finding metastasis in mice with human melanoma, because this is the main reason of death of patients with ocular melanoma.

3. Wstęp

3.1 Terapia wiązką protonów

Pierwsze zastosowanie promieniowania jonizującego (a dokładniej promieniowania X) w medycynie miało miejsce w 1895 roku [1]. W następnych dekadach radioterapia stała się wiodącą metodą terapeutyczną w onkologii. Przez cały ten okres technika była udoskonalana pod kątem większej skuteczności biologicznej, redukcji uszkodzeń tkanek prawidłowych czy pozycjonowania pacjenta. Jako pierwszy istotną klinicznie różnicę między powszechnie używanymi fotonami a protonami wykazał R. R. Wilson w 1946 roku [2] co szybko zostało wykorzystane w próbach leczenia wiązką protonów pacjentek z nowotworem piersi [3]. Od tego czasu zainteresowanie tą tematyką nieustannie rośnie - na wykresie poniżej (Ryc.1) zaprezentowano liczbę publikacji na podstawie wyszukania hasła „proton beam therapy” w bazie NCBI PubMed. W porównaniu do terapii promieniowaniem X, rozwój klinicznego zastosowania terapii wiązką protonów był jednakże dość powolny, głównie ze względu na techniczne trudności oraz wysoki koszt.

Ilość publikacji dt. terapii protonowej w latach 1960- 2018



Ryc. 1. Liczba publikacji dotycząca terapii protonowej w latach 1960- 2018. Wyniki na podstawie wyszukania wyrażenia „proton beam therapy” w bazie danych NCBI PubMed dnia 16 października 2018 roku.

3.1.1 Biofizyczne podstawy terapii wiązką protonów

Protony poruszają się prawie po linii prostej. W tym czasie tracą swoją energię kinetyczną przez nieelastyczne, kolumbowskie oddziaływanie z mijanymi elektronami. Jeśli jednak znajdą się w pobliżu jądra atomowego, wówczas dochodzi do ich elastycznego wybicia i zmiany kierunku ruchu. W wyniku nieelastycznej interakcji z jądrem atomu dochodzi do pochłonięcia pierwotnego protonu i wyemitowaniu neutronu, protonu i innych. Promieniowanie hamowania nie ma dużego wpływu na skuteczność ani dokładność terapii wiązką protonów [4]. W Tab. 1 zebrano rodzaje interakcji protonów z materią wraz z ich wpływem na trajektorię ruchu protonów i zmianę energii.

Rodzaj oddziaływania	Cząsteczka, z którą oddziałuje	Wpływ na ruch	Znaczenie w terapii
Nieelastyczne rozpraszanie	Elektron	Quasi- jednolita utrata energii	Determinuje dotarcie do obszaru guza u pacjenta
Elastyczne rozpraszanie	Jądro atomowe	Zmiana trajektorii	Determinuje dokładność napromieniania wybranego obszaru
Nieelastyczna reakcja jądrowa	Jądro atomowe	Usunięcie z wiązki protonu wchodzącego w tą interakcję	Generacja nowych cząstek, które mogą wchodzić w reakcję z otaczającą materia

Tab. 1. Podsumowanie interakcji protonów w materii, ich wpływ na trajektorię ruchu i utratę energii początkowej a także kliniczne implikacje poszczególnych zdarzeń. Opracowano na podstawie pracy Newhauser'a i Zhang'a [4].

Utrata energii w jednostce drogi jest parametrem niezwykle istotnym przy dozymetrii promieniowania przed wykonaniem terapii. Z dobrym przybliżeniem zakłada się, że fantom wodny wystarczająco dobrze imituje zachowanie wiązki protonów w organizmie człowieka. W praktyce klinicznej powszechnie przyjęte jest już stosowanie wodnych fantomów do określenia głębokości penetracji i dokładności wiązki protonów [5]. Parametr, który jest równoważnikiem grubości słupa wody (WET- Water-equivalent thickness) umożliwia dokładne wyliczenie, gdzie zdeponowana zostanie największa dawka energii [6].

3.1.2 Penetracja wiązki protonów w materii w porównaniu z fotonami

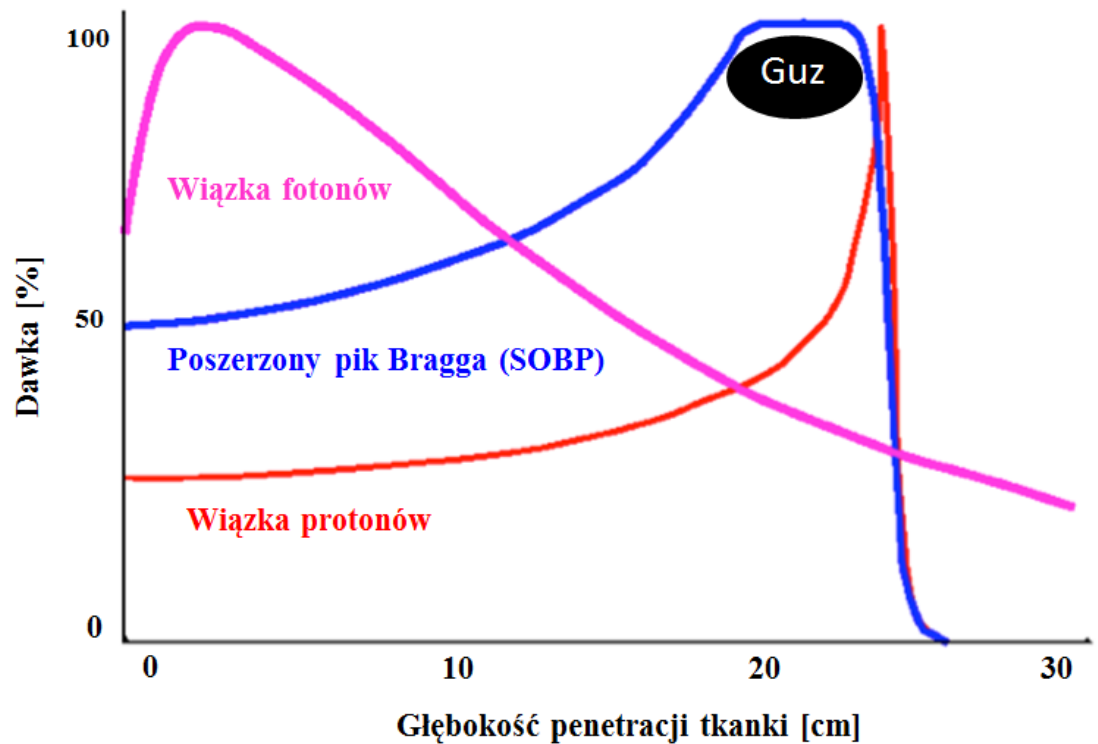
W przypadku wiązki fotonów (promieniowanie X lub γ), największy spadek energii w jednostce drogi obserwuje się w pierwszej fazie oddziaływania z materia, po której dochodzi do dalszego, wykładniczego spadku wraz z głębokością penetracji. Jest to główna i najważniejsza cecha, która odróżnia fotony od protonów, ponieważ wiązka protonów przy wejściu do tkanki zachowuje się zupełnie inaczej - w pierwszej fazie dochodzi do bardzo niskiej

absorpcji energii przez otaczające tkanki, natomiast na samym końcu drogi protonów uwalniana jest bardzo duża ilość energii. Miejsce, w którym dochodzi do wyładowania energii nazywany jest pikiem Bragga [7]. W praktyce onkologicznej oznacza to, że przy naświetlaniu promieniowaniem X dużemu uszkodzeniu ulega nie tylko tkanka nowotworowa, ale również wszystkie tkanki, które znajdują się na drodze promieni Roentgena przed oraz za guzem. W przypadku naświetlania wiązką protonów możliwe jest natomiast dopasowanie energii i kształtu wiązki w taki sposób, aby zniszczeniu uległ tylko guz. Energia początkowa każdego protonu determinuje głębokość penetracji oraz amplitudę piku Bragga [8]. Aby w sposób precyzyjny zniszczyć tkankę nowotworową niezbędne jest dokładne określenie jej lokalizacji, kształtu i grubości. Następnie planuje się taką superpozycję wiązek protonów o różnych energiach początkowych, aby powstały w ten sposób poszerzony pik Bragga (SOBP- Spread Out Bragg Peak), pokrył cały obszar zmiany nowotworowej [7] (Ryc.2).

Dystrybucja dawki energii docierająca do poszczególnych tkanek zależna jest od Liniowego Transferu Energii (LET- Linear Energy Transfer), który określa dawkę energii utraconą w jednostce drogi. Protony charakteryzują się niską wartością LET na początku swojej drogi w tkance, natomiast na samym końcu drogi wartość ta może wzrosnąć ponad 100 krotnie [9]. Dla wiązki fotonów obserwuje się natomiast największą wartość LET w pierwszej fazie oddziaływania z materią i wartość ta eksponencjalnie spada. Nawet przy tej samej wartości LET dla różnych cząsteczek obserwowana jest różna gęstość jonizacji, która w sposób bezpośredni przekłada się na uszkodzenia komórkowe (podrozdział: 3.1.3).

Kolejnym parametrem, który służy do opisu efektywności zastosowanego promieniowania jest Względna Skuteczność Biologiczna (ang. RBE- Relative Biological Effectiveness). RBE opisuje skuteczność zastosowanego promieniowania w porównaniu do promieniowania referencyjnego, którym jest promieniowanie X (250kV). Wielkość RBE nie jest wartością stałą, ponieważ bardzo silnie zależy od utleniania napromienianych tkanek, zdolności naprawczych organizmu czy też sposobu frakcjonowania dawki [7,10]. Zakłada się, że w przybliżeniu wartość RBE dla promieniowania protonowego wynosi

1,1 jednak w rzeczywistości wartość ta może być zarówno większa jak i mniejsza [11–13].



Ryc. 2. Rozkład dawki wraz z głębokością penetracji dla wiązki protonów (kolor czerwony) i fotonów (kolor różowy). Na rysunku zaznaczono również poszerzony pik Bragga (kolor niebieski), który obejmuje cały obszar guza nowotworowego (guz zaznaczony na czarno). Rysunek zmodyfikowano na podstawie ryciny dostępnej on-line dnia 14 grudnia 2018 (<http://gordon.mgh.harvard.edu/gc/wp-content/uploads/therapyPeaks.png>)

3.1.3 Uszkodzenia DNA powodowane przez wiązkę protonów

Uszkodzenia DNA są ściśle związane z indukowaną promieniowaniem jonizującym śmiercią komórkową bądź mutacjami. Najczęstszymi są uszkodzenia spowodowane pojedynczymi (ang. SSB - Single Strand Breaks) lub podwójnymi (DSB - Double Strand Breaks) pęknięciami nici DNA[14]. Do uszkodzeń tych może dojść poprzez bezpośrednie uszkodzenie nici DNA przez

protony lub w sposób pośredni, przez wolne rodniki powstałe np. w procesie radiolizy wody. Podwójne pęknięcie nici DNA bardzo często jest dla komórki letalne, ponieważ może m.in. prowadzić do fragmentacji chromosomu[15]. Aby się przed tym uchronić komórka włącza mechanizmy naprawcze takie jak np. łączenie niehomologicznych zakończeń [16].

Do najpoważniejszych uszkodzeń, do których dochodzi pod wpływem napromieniania protonami są tzw. uszkodzenia klastrowe. Określeniem tym opisuje się miejsce, w którym na jednej lub obu sąsiadujących niciach DNA dochodzi do szeregu nieprawidłowości takich jak np. utlenienie, utrata lub nieprawidłowe sparowanie zasady azotowej[17]. Liczba uszkodzeń klastrowych zależy od gęstość jonizacji promieniowania.

W odpowiedzi na uszkodzenia spowodowane terapią protonową komórki eukariotyczne włączają szereg szlaków, których celem jest opóźnienie cyklu komórkowego oraz naprawa powstałych uszkodzeń. Aktywacji ulegają m.in. kinazy serynowo-treoninowe, które poprzez aktywację kolejnych kinaz i fosforylację docelowych białek (w tym p53) wydłużają cykl komórkowy[18].

Promieniowanie jonizujące wpływa także na całe mikrośrodowisko i komórki prawidłowe, które znajdują się w obrębie nowotworu (takie jak fibroblasty czy komórki układu immunologicznego). Wiadomym jest, że fotony promują proces przerzutowania oraz rozwój naczyń neoangiogennych [19], jednakże wpływ protonów na mikrośrodowisko guza nie jest jeszcze jednoznacznie poznany.

3.1.4 Kliniczne zastosowanie terapii wiązką protonów

Terapia protonowa w leczeniu nowotworów, ze względu na swoje właściwości fizyczne, jest wykorzystywana głównie do niszczenia guzów zlokalizowanych w organach krytycznych. Pojęciem tym opisuje się narządy, które są szczególnie wrażliwe na promieniowanie. Właściwości fizyczne wiązki protonów (opisane w 3.1.2) czynią ją idealną do przeprowadzania terapii guzów wewnątrzczaszkowych, wymagających dawek przekraczających tolerancję tkanek otaczających oraz dla tych, w których kluczowym jest ograniczenie

długofalowych skutków ubocznych klasycznej radioterapii [20]. Wykazano, że w przypadku terapii protonowej obserwuje się większy odsetek pacjentów z pięcioletnim przeżyciem oraz mniejszą liczbę skutków ubocznych, przy terapii wielu nowotworach wewnątrzczaszkowych, w tym struniakach [21], oponiakach [22] czy chrzęstniakomięsakach [23].

Obecne dane kliniczne wskazują, że najczęściej stosowaną metodą leczenia czerniaków wewnątrzgałkowych jest usunięcie gałki ocznej (enukleacja). Jednakże coraz częściej postuluje się, że zarówno brachyterapia naszytymi na gałkę oczną radioaktywnymi płytkami jak i protonoterapia mogą być równie skuteczne. W porównaniu z brachyterapią, terapia protonowa ma wiele zalet:

- nie ma konieczności przeprowadzania jakiejkolwiek interwencji chirurgicznej,
- pacjent nie musi przebywać w szpitalu,
- pracownicy nie są narażeni na dodatkowe promieniowanie [24].

Po terapii protonowej nie tylko czerniaków oka, ale również innych guzów wewnątrzgałkowych obserwuje się mniejsze prawdopodobieństwo wznowy guza pierwotnego w porównaniu do innych powszechnie stosowanych metod leczenia. Dzięki terapii wiązką protonów możliwe jest nie tylko całkowite zniszczenie guza, ale również zachowanie gałki ocznej i funkcji widzenia.

Pacjenci z nowotworami płuc najczęściej poddawani są radioterapii konwencjonalnej, czyli przy użyciu promieniowania X o energii w zakresie 60 do 400 keV. Jednakże wykazano [25], że zastąpienie jej terapią protonową, znacząco ogranicza niepożądane napromienienie prawidłowych struktur pobliskich takich jak przełyk, zdrowe tkanki płuc czy też szpik kostny. Połączenie terapii protonowej z chemioterapią znacząco redukuje toksyczność (w porównaniu do promieniowania X) przy jednoczesnym zachowaniu takiej samej skuteczności leczenia [23,24]. Ta forma terapii, ze względu na minimalną ilość skutków ubocznych zalecana jest zwłaszcza dla pacjentów w zaawansowanym stadium choroby [26].

Bardzo dużą grupą pacjentów, dla której terapia protonowa jest najlepszym i najbezpieczniejszym rozwiązaniem są dzieci. Jest to szczególnie istotne, ponieważ narażanie pacjentów w tak młodym wieku na wysoką dawkę

promieniowania jonizującego, może doprowadzić do rozwoju w późniejszym wieku nowotworów wtórnych [27]. Ponadto młodzi pacjenci poddani radioterapii konwencjonalnej otrzymują o wiele większą dawkę promieniowania do organów otaczających, ze względu na rozmiar i bliskie rozmieszczenie organów u dziecka. Najczęściej do terapii protonowej kwalifikowani są młodzi pacjenci z nowotworami centralnego ośrodka nerwowego [28].

3.2 Czerniaki gałki ocznej

3.2.1 Ogólna charakterystyka

Czerniaki gałki ocznej występują stosunkowo rzadko, ale ze względu na szybki rozwój i tworzenie przerzutów odległych, są bardzo niebezpieczne. Najczęściej występują u mężczyzn rasy kaukaskiej w podeszłym wieku (gwałtowny wzrost liczby rozpoznanych przypadków przypada między 70 a 79 rokiem życia) [29]. W ponad 80% przypadków czerniaki wywodzą się z melanocytów naczyńówki, ale możliwy jest również wzrost z melanocytów tęczówki czy ciała rzęskowego [30]. Olbrzymia większość czerniaków gałki ocznej to guzy pierwotne i tylko sporadycznie pojawiają się przerzuty czerniaka skóry do wnętrza gałki ocznej [31]. Czerniaki błony naczyńowej i ciała rzęskowego nazywane są czerniakami tylnej części oka i różnią się od czerniaków przedniej części oka bardziej agresywnym wzrostem i rozsiewem [29]. Obraz kliniczny czerniaków tylnej części oka jest zależny od ich pochodzenia, lokalizacji i momentu diagnozy. Szacuje się, że około 30% pacjentów z czerniakiem błony naczyńowej nie odczuwa żadnych symptomów choroby a do rozpoznania nowotworu dochodzi przez przypadek [33].

Pomimo rozwoju wielu nowych procedur terapeutycznych czerniaków oka na przestrzeni ostatnich 30 lat, procent pacjentów z 5 letnim czasem przeżycia i odsetek pacjentów z rozsiewem do organów dystalnych utrzymują się nadal na tym samym poziomie (odpowiednio 80 i 50%) [34]. Tylko w 2% przypadków komórki nowotworowe są już rozsiane w momencie wykrycia guza pierwotnego [35]. Czerniak naczyńówki najczęściej daje przerzuty drogą naczyniową do wątroby, rzadziej do płuc, skóry czy kości. Natomiast czerniak

spojówki może rozprzestrzeniać się zarówno drogą naczyniową jak i limfatyczną [36]. Tylko ok. 6% wszystkich czerniaków oka stanowią czerniaki ciała rzęskowego a ok. 4% naczyniówki. Na każdym etapie rozwoju czerniaków może dojść do naciekania twardówki co znacznie pogorsza rokowania i zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju przerzutów w wątrobie. Przerzuty te najczęściej są rozsiane w całym organie dlatego rzadko podejmuje się próby leczenia operacyjnego [37]. W celu podjęcia próby predykcji stopnia złośliwości danego nowotworu, oprócz sprawdzenia obecności określonych aberracji genetycznych, istotny jest obraz kliniczny. Do najistotniejszych parametrów należy wielkość guza pierwotnego, lokalizacja, barwa, obecność krwotoków wewnątrzgałkowych oraz wiek pacjenta [38]. Stan mikrounaczynienia guza jest niezwykle istotny do określenia potencjału do przerzutowania guza pierwotnego: chaotyczne, przeciekające i zapętlone unaczynienie jest złym prognostykiem. Komórki czerniaka naczyniówki mają zdolność do indukowania tzw. "mimikry naczyniowej". W procesie tym komórki nowotworowe upodobniają się do komórek śródbłonna i tworzą sieć, która imituje naczynia krwionośne [39]. Zjawisko mimikry naczyniowej pojawia się u aż 67% guzów z monosomią chromosomu 3 i może być promowane przez podwyższony poziom E-kadheryny [38].

Czerniaki naczyniówki charakteryzują się wieloma nieprawidłowościami w obrębie chromosomów, które spowodowane są niestabilnością genomu. Wśród najważniejszych z nich wymienia się:

- 1) całkowitą lub częściową utratę chromosomu 3 [40],
- 2) izodysomię lub trisomię chromosomu 8q
- 3) dodatkowe fragmenty w obrębie chromosomu 6p [41].

Pierwsze dwie nieprawidłowości świadczą o zwiększonej złośliwości nowotworu, a trzecia w sposób istotny statystycznie wydłuża przeżycie chorego [35]. Biologiczną cechą, która źle prognozuje dla pacjentów jest naciek limfocytów do guza pierwotnego. Komórki CD3+ znajdują się w około 40% guzów czerniaka naczyniówki [42]. Najpowszechniej występujące mutacje w tej grupie nowotworów to wzajemnie wykluczające się mutacje GNAQ i GNA11

[43]. Dodatkowo pojawiają się też innego typu mutacje BAP1, SF3B1 czy EIF1AX. Jeśli chodzi o czerniaki spojówki, to molekularnie ma on więcej cech wspólnych z czerniakiem skóry niż naczyniówki. Najważniejszą mutacją o znaczeniu klinicznym jest tutaj BRAF V600E, której obecność implikuje podatność na terapię z zastosowaniem inhibitorów BRAF [36].

Melanina produkowana w organizmach żywych ma szereg korzystnych funkcji, w tym ochrona przed promieniowaniem UV [44] oraz kamuflaż chroniący przed atakiem drapieżnika [45]. Jednakże w kontekście leczenia czerniaków, melanina, ze względu na swoje właściwości radioprotekcyjne, jest złym prognostykiem. Melanina chroni przed promieniowaniem na trzech niezależnych poziomach:

- pochłania promieniowa zarówno UV [46] jak i jonizujące [47]
- wchodzi w reakcję z produktami foto- i radiolizy wody [48,49]
- zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie tlenu [50] przez co komórka jest mniej wrażliwa na promieniowanie

W czasie procesu melanogenezy akumulowana jest nie tylko melanina, ale również wiele produktów pośrednich, które mogą indukować dodatkowe mutacje. Ponadto, szlak sygnałowy, związany z procesem produkcji melaniny częściowo pokrywa się ze szlakami aktywnymi przy nowotworzeniu [51]. Cechy te są główną przyczyną krótszego czasu przeżycia pacjentów z mocno upigmentowanymi guzami pierwotnymi czerniaka skóry w porównaniu do pacjentów z guzami o mniejszym stopniu melanizacji zwłaszcza, gdy zostały zdiagnozowane dopiero na późniejszych etapach rozwoju klinicznego czerniaka [52].

3.2.2 Modele zwierzęce czerniaków oka

Zwierzęce modele eksperymentalne są niezbędne do badania nowych procedur terapeutycznych, dzięki którym zahamowany byłby wzrost guza oraz jego rozsiew. Celem nadrzędnym jest przełożenie wyników z zakresu badań podstawowych uzyskanych na modelach komórkowych (in vitro) poprzez

przedkliniczne badania na zwierzętach (in vivo) do klinicznych prób 1, 2 i 3 fazy [53]. W badaniu nowotworów najczęściej wykorzystuje się ksenogeniczne przeszczepienie fragmentów ludzkiego guza lub wyprowadzonych z nich linii komórkowych do ciała zwierzęcia o upośledzonej odporności. Ograniczeniem tej techniki jest konieczność badania wzrostu nowotworu bez pełnej aktywności układu immunologicznego, który musi być upośledzony, aby przeszczep nie został odrzucony. Powszechnie wykorzystuje się do tego celu ludzkie linie czerniaków, takie jak Mel290, Mel270, OCM8 czy 92.1 [54], które implantuje się myszom, szczurom lub królikom z niedoborem odporności. U myszy zmodyfikowanych genetycznie, u których spontanicznie pojawia się określony rodzaj nowotworu, nie występuje problem braku odporności. W ortotopowych modelach wzrostu nowotworu, komórki czerniaka inokuluje się do gałki ocznej zwierzęcia. Modele te są używane do badania przebiegu choroby i odpowiedzi na terapię, ze względu na fakt, że nowotwory rozwijające się w swoim naturalnym środowisku najprawdopodobniej będą wykazywać podobne zachowanie jak ich ludzkie odpowiedniki [55]. Często do oka myszy implantowane są mysie komórki czerniaka skóry np. HCmel12, B16F10 lub B16LS9. Najczęściej komórki wstrzykuje się przez spojówkę, rogówkę do tylnej części gałki ocznej [56] lub do przedniej komory oka. W wyniku tego pojawiają się lite, wewnątrzgałkowe czerniaki odpowiednie jako modele badawcze guzów ludzkich. U ludzi czerniaki oka przerzutują głównie do wątroby, a ze wspomnianych modeli cechę tę posiadają np. komórki B16LS9, które zostały specjalnie pod tym kątem wyselekcjonowane [53]. Te syngeniczne mysie modele świetnie nadają się do badania aspektów immunologicznych i angiogenicznych rozwoju nowotworu. Do badania rozsiewu guza pierwotnego najskuteczniejsze są modele, w których po wzroście guza w gałce ocznej, wykonuje się enukleację [54]. Proponowane są również modele, w których komórki bezpośrednio szczepi się do wątroby [57], śledziony [58] bądź podaje do żyły ogonowej [59]. Wzrost czerniaka może być indukowany poprzez ekspozycję zwierząt na różne związki rakotwórcze np. 7,12- dimetylobenzan antracenu [60] lub podawanie im do gałki ocznej wirusów onkogennych [61]. Metody te są jednak mało wydajne a powstałe guzy na tyle różnorodne, że rzadko kiedy wykorzystuje się te techniki w praktyce laboratoryjnej.

Interesującymi, wciąż mało popularnymi, modelami do badania reakcji nowotworu na radioterapię są chomiki syryjskie (obowiązująca nazwa gatunkowa: Chomiczek syryjski *Mesocricetus auratus* Waterhouse (1839)). Zwierzęta te wykazują w hodowlach niski polimorfizm alleli kodujących antygeny zgodności tkankowej, dzięki czemu przyjmują allogeniczne przeszczepy skrawków nowotworu wywodzącego się od innego chomika. Czerniaki, które spontanicznie pojawiły się u chomików i zostały wyizolowane, to czerniak Greena [62], Fortnera [63] i Bomirskiego [64]. Pierwotnie czerniak Bomirskiego występował tylko w formie upigmentowanej, jednak po kilku latach pasażowania in vivo doszło do spontanicznej mutacji, w wyniku której komórki straciły zdolność do produkcji pigmentu, zwiększyły tempo proliferacji co skutkowało skróceniem czasu przeżycia zwierząt obarczonych guzem nieupigmentowanym przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby przerzutów [65]. W czasie hodowli laboratoryjnej doszło do wyizolowania kolejnego podtypu czerniaka Bomirskiego, MI, który charakteryzował się wyższą aktywnością tyrozynazy, mniejszym upigmentowaniem i zdolnością do produkcji feomelaniny [66]. Czerniaki Bomirskiego różnią się od siebie radiowrażliwością w zależności od stopnia upigmentowania [67].

Nie ulega wątpliwości, że modele zwierzęce czerniaka gałki ocznej, pomimo swoich ograniczeń, w sposób znaczący przyczyniły się do poznania biologii tego nowotworu.

3.2.3 Proces przerzutowania

Wzrost przerzutu jest końcowym efektem wieloetapowego procesu uwalniania komórek z guza pierwotnego i ich adaptacji do życia w nowym mikro-środowisku. Mechanizm tego zjawiska jest złożony i zależy od szeregu czynników - rodzaju komórek nowotworowych, ich różnorodności, zdolności do proliferacji, interakcji z niszą metastatyczną czy też od ogólnego rozwoju choroby i odpowiedzi na zastosowaną terapię. Aby rozwinął się przerzut, komórki uwolnione z guza pierwotnego muszą pokonać przestrzeń międzykomórkową oraz śródbłonek aby dostać się do naczynia krwionośnego

i/lub limfatycznego (tzw. intrawazacja), a następnie przedostać się ze światła naczyń do otaczających tkanek (tzw. ekstrawazacja) gdzie osiedlają się i proliferują. Zdolność komórek nowotworowych do przechodzenia przez poszczególne bariery tkankowe związana jest z wydzielaniem przez nie enzymów proteolitycznych takich jak metaloproteinazy. Dzięki dynamicznemu rozwojowi badań genetycznych, na przestrzeni lat powstało wiele modeli próbujących odtworzyć proces przerzutowania. W klasycznym modelu progresji nowotworu przyjmuje się, że tylko określona subpopulacja komórek guza pierwotnego ulega mutacji, dzięki której komórki nabierają cech zdolnych do przedostania się i zasiedlania innej niszy środowiskowej [68]. Wiele badań potwierdziło poprawność tego modelu, wykazując m.in. ekspresję specyficznych genów określonej grupy komórek nowotworowych, które predysponują je do zasiedlania konkretnych narządów dystalnych [69]. Ten model wzrostu nowotworu zakłada, że aby doszło do utworzenia przerzutu, guz pierwotny musi składać się z wystarczająco dużej liczby komórek. Nie tłumaczy to więc rzadkich, ale znanych przypadków, w których obserwowany jest rozwój przerzutów bez identyfikacji guza pierwotnego [70]. Ponadto, w myśl modelu progresji nowotworów, komórki które nabyły zdolności do przerzutowania mają te cechy utrzymywać i stabilnie przekazywać z pokolenia na pokolenie. Jednakże znane są sytuacje, w których komórki przerzutujące po kilku podziałach tracą te cechy. Ze względu na obserwowane nieścisłości tego modelu, proponuje się nowe, które uwzględniają tzw. „heterogenną dynamiczność” nowotworów [71]. Jeśli prawdą byłoby, że komórki tworzące przerzut mają stabilne genetycznie cechy umożliwiające im stałą ekspansję do innych organów, to guzy wtórne powinny szybciej i z większą wydajnością formować kolejne ogniska nowotworowe w następnych niszach. Brak takich obserwacji klinicznych uwzględnił w swoim modelu Weiss [72], który postuluje, że komórki, z których powstaje przerzut są zaadoptowane do jego formowania tylko w konkretnych warunkach, w danym czasie. Nawet w przypadku tego samego rodzaju nowotworu jego rozwój i ewentualny rozsiew jest zależny od indywidualnego profilu genetycznego pacjenta [73].

Tworem, którego udział w procesie przerzutowania zaczyna być coraz częściej dyskutowany jest interstitium. Interstitium, zwane również

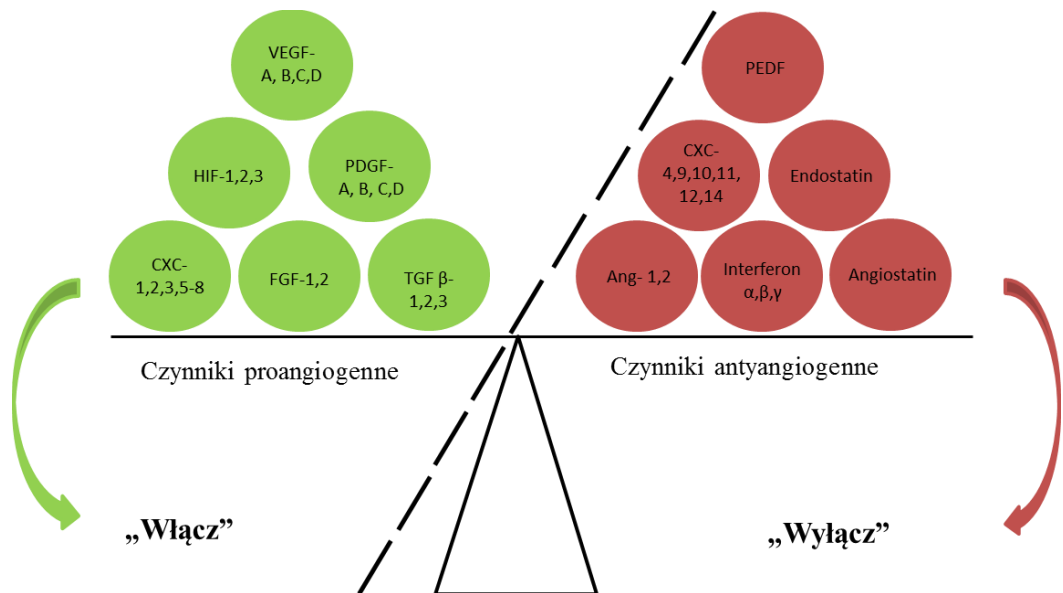
śródmiażdżem, jest organem, który po raz pierwszy dokładnie opisano w 2018 roku [74], choć jego istnienie podejrzewano już wcześniej. Jego najważniejsze i podstawowe funkcje to bycie głównym źródłem limfy i największym magazynem wody w ciele człowieka. Dokładny opis wykonano dopiero obecnie, ponieważ do badania organów i tkanek powszechnie wykorzystywano metody histologiczne. Jednakże po wypreparowaniu organu śródmiażdże się zapada i scala z tkanką łączną. Interstitium zaobserwowano po raz pierwszy dzięki wykorzystaniu konfokalnej endomikroskopii (pCLE), która umożliwia w czasie przeprowadzania badania endoskopowego zobrazowanie tkanek na głębokość 60-70 μm . Benias et al. [74] opisali, że po wstrzyknięciu fluoresceiny w obrazowaniu pCLE zewnątrzwartrowego kanalikula żółciowego ukazała się nieznana dotąd struktura o wzorcu siatkowatym z zatokami wypełnionymi fluoresceiną. Bardzo szybkie zamrożenie tkanki pobranej w czasie biopsji umożliwiło zachowanie anatomii interstitium wykazując, że jest to część podśluzówki z przestrzeniami śródmiażdżowymi wypełnionymi płynem, które wsparte są na sieci grubych wiązek kolagenu. Interstitium obecne jest w wielu miejscach w ciele człowieka, które podlegają przerywanym i rytmicznym kompresjom w tym- w przewodzie żołądkowo-jelitowym, układzie moczowym, w skórze właściwej, tkankach miękkich około-skrzelowych czy okołotętnicznych. Być może interstitium pełni funkcję ochronną i buforuje mechaniczne naciski na delikatniejsze tkanki.

Jest prawdopodobne, że struktura opisana m.in. w pracy Alexander i wsp. [75] jako przestrzenie śródmiażdżowe zidentyfikowane przy badaniach klastrow komórek nowotworowych to właśnie interstitium. Obecność sieci kanałów podśluzówkowych w przewodzie pokarmowym i w drogach moczowych może tłumaczyć znacznie zwiększone prawdopodobieństwo przerzutów, gdy guz pierwotny dotrze do warstwy podśluzówkowej danej tkanki. Obecność kanałów wypełnionych płynem być może jest przyczyną, dla której obserwowana jest dużo większa liczba przerzutów przy czerniakach o większej grubości w skali Breslawa [76]. Dodatkowo postuluje się, że zwiększona ekspozycja tkanek otoczonych interstitium na ucisk może w sposób mechaniczny przepychać komórki nowotworowe dalej co również może zwiększyć ilość przerzutów [74].

3.2.4 Rola unaczynienia w rozwoju i rozsiewie nowotworu

Rola unaczynienia w rozwoju guzów pierwotnych jak i ich rozsiewie do organów dystalnych jest kluczowa. Angiogeneza, czyli proces powstawania nowych naczyń krwionośnych w guzie pierwotnym, jest nie tylko istotnym czynnikiem prognostycznym wzrostu i rozwoju nowotworu, ale również potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowych [77]. Naczynia te zaopatrują nowotwór w składniki niezbędne do przeżycia i dalszego wzrostu oraz umożliwiają komórkom przedostanie się do układu krwionośnego w celu osiedlenia się w niszy metastatycznej. W przypadku nowotworów, których średnica nie przekracza jeszcze kilku milimetrów, hipoksja reguluje proces angiogenezy głównie poprzez czynnik indukowany hipoksją (HIF-1). Przy zbyt niskim stężeniu tlenu dochodzi do zwiększonej produkcji m.in. czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) co zwiększa rekrutację komórek śródbłonna i formowanie nowych naczyń w obrębie objętym hipoksją. Obniżony poziom tlenu skutkuje również aktywacją komórek układu odpornościowego, w tym makrofagów, monocytów czy komórek progenitorowych takich jak mezenchymalne komórki macierzyste [78]. Hipoksja powoduje również zaburzenie poziomu tlenu azotu (NO), ponieważ tlen jest kluczowym substratem w produkcji NO i reguluje aktywność enzymów biorących udział w jego powstawaniu (neuralna, endotelialna i indukowalna syntaza tlenu azotu) [79]. Początkowo angiogeneza spełnia swoją rolę i dostarcza nowotworowi składników odżywczych, jednak jego bardzo szybki wzrost powoduje, że nie w pełni funkcjonalne, dziurawe i chaotycznie zorganizowane naczynia nie spełniają swojej roli efektywnie [80]. W warunkach fizjologicznej angiogenezy (np. przy gojeniu ran) perycyty aktywowane przez płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) stabilizują nowopowstałe naczynia. Jednakże w mikrośrodku nowotworowym ciągła remodelacja sieci naczyń krwionośnych indukowana przez fibroblasty związane z nowotworami (CAFs) czy licznych metaloproteinaz, uniemożliwia im to zadanie. Nieprawidłowa organizacja naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu powoduje też, że tempo przepływu krwi jest znacząco mniejsze, co przekłada się na gorsze utlenienie tkanki [81]. Komórki nowotworowe, komórki mikrośrodowiska czy komórki

układu immunologicznego wydzielają szereg czynników, które wpływają na delikatną równowagę, która jest niezbędna do formowania się prawidłowych naczyń krwionośnych. Na ryc. 3 przedstawiono czynniki zarówno pobudzające jak i hamujące proces angiogenezy.



Ryc. 3. Schemat obrazujący równowagę między czynnikami pro- i antyangiogennymi. Zaburzenie między nimi powoduje rozpoczęcie bądź zahamowanie procesu angiogenezy. VEGF- czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, HIF- Czynniki indukowane hipoksją, PDGF- płytkopochodny czynnik wzrostu, CXC- chemokiny, FGF- czynnik wzrostu fibroblastów, TGF β - transformujący czynnik wzrostu β , PEDF- czynnik pochodzący z upigmentowanego nabłonka, Ang- Angioproteina

3.2.5 Terapie kliniczne czerniaków oka

Terapia czerniaków oka jest bardzo często postrzegana przez pryzmat enukleacji jako radykalna i konserwatywna [82]. Jednak obecnie, zwłaszcza przy czerniakach naczyniówki, częściej stosowana jest brachyterapia [83]. Metoda ta polega na kontaktowym napromienianiu zmian nowotworowych poprzez naszytą w odpowiednim miejscu płytkę z promieniotwórczym

kobaltem, rutenem lub jodem [84]. W terapii czerniaka naczyńiówki najczęściej stosowana jest brachyterapia z wykorzystaniem wysokiej dawki energii (4Gy/h) co skutkuje zmniejszoną liczbą przerzutów i mniejszym prawdopodobieństwem nawrotu guza pierwotnego. Terapia protonowa jest często wykorzystywana w leczeniu nowotworów organów krytycznych, w tym czerniaka oka. W przypadku niewielkich, upigmentowanych czerniaków naczyńiówki stosuje się również termoterapię, której celem jest wywołanie hipertermii przy pomocy laserowej wiązki promieniowania podczerwonego [82]. Coraz większym zainteresowaniem, podobnie jak w przypadku pozostałych chorób onkologicznych, cieszą się tak zwane terapie kombinowane w tym łączenie radioterapii z immunoterapią [85] lub podaniem leków np. antyangiogennych lub cytostatycznych [38,86].

Podjęmowane są także próby podawania egzogennych czynników, które wpływają na zmianę balansu pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi. Na rynku istnieje już szereg leków, które hamują rozwój unaczynienia w wielu rodzajach nowotworów czy też w wysiękowym zwyrodnieniu plamki żółtej [81]. Jednym z takich leków jest bewacizumab, który jest rekombinowanym, humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym łączącym się z VEGF. Wytwarzany jest na drodze rekombinacji DNA w komórkach jajnika chomika chińskiego [87]. Jego użycie znajduje zastosowanie w leczeniu wielu chorób, takich jak nowotwory jelita grubego, niepłaskonabłonkowe nowotwory płuc, raki nerkowokomórkowe czy nowotwory jajników. Bewacizumab w niektórych przypadkach może być stosowany jako lek samodzielny a w innych jako lek wspomagający, ponieważ zwiększa skuteczność innych terapii przeciwnowotworowych (w tym chemioterapii). Wśród innych leków hamujących formowanie naczyń krwionośnych na drodze wiązania VEGF należy wymienić aflibercept oraz pegaptanib stosowane głównie w leczeniu wysiękowego zwyrodnienia plamki żółtej lub nowotworu jelita grubego [81]. Osobną grupę leków antyangiogennych stanowią inhibitory kinazy tyrozynowej, takie jak np. pazopanib, które oddziałują z wieloma receptorami czynników wzrostu, w tym FGF, PDF czy VEGF.

Szacuje się, że około miliard ludzi na całym świecie cierpi na niedobór witaminy D, co niesie ze sobą szereg komplikacji zdrowotnych ze względu na

szerokie spektrum działania witaminy D. Do podstawowych jej funkcji w organizmie człowieka zalicza się nie tylko pomoc w utrzymaniu równowagi gospodarki wapniowo- fosforowej i prawidłowym funkcjonowaniu układu ruchu, ale również udział w regulacji funkcjonowania układu krwionośnego, immunologicznego i nerwowego [88]. Tak wszechstronne działanie witaminy D związane jest z jej oddziaływaniem na płaszczyzn wielu płaszczyznach, w tym na regulację proliferacji komórek, ich różnicowania czy śmierci komórkowej. W literaturze co raz częściej znajduje się doniesienia, mówiące o tym, że witamina D może hamować proliferację komórek czerniaka [89,90] oraz uczulać komórki czerniaka na promieniowanie protonowe [91].

3.3 Obrazowanie wzrostu guzów pierwotnych i ich unaczynienia

Wewnątrzgalkowe czerniaki, bez względu na swoje pochodzenie, charakteryzują się przerzutowaniem tylko i wyłącznie na drodze hematogennej ponieważ w oku nie ma drenażu limfatycznego. Z tego względu wizualizacja skomplikowanej i chaotycznej trójwymiarowej sieci naczyń krwionośnych jest niezbędna, aby dowiedzieć się więcej o rozwoju i rozsiewie czerniaków gałki ocznej. Poniżej przedstawiono trzy wybrane metody, które są stosowane w tym celu w modelach zwierzęcych.

3.3.1 Metoda korozyjna

Uwidacznianie naczyń krwionośnych metodą korozyjną polega na podaniu dożylnym żywicy po uprzednim wyparciu z naczyń krwi (np. poprzez podanie roztworu fizjologicznego). Następnie trawi się guz a naczynia wypełnione Merkoksem pokrywa złotem. Otrzymane w ten sposób odlewy fotografuje się przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego uzyskując quasi- trójwymiarową sieć unaczynienia. Możliwe są do rozróżnienia tętnice, żyły, kapilary, nieprawidłowości charakterystyczne dla naczyń neoangiogennych oraz ich wzajemne rozmieszczenie w przestrzeni [92]. W oparciu o tę metodę

opracowano ilościową klasyfikację opisującą topologię unaczynienia w guzach na przykładzie nowotworu piersi [93]. Dzięki temu możliwe jest numeryczne przedstawienie heterogenności unaczynienia w różnych typach nowotworów. Należy jednak mieć świadomość, że znaczącym ograniczeniem tej metody jest analiza dwuwymiarowych obrazów trójwymiarowych projekcji. Wszystkie informacje związane z analizą przestrzenną są więc bardzo niedokładne [92]. Aby uzyskać informacje o trójwymiarowej strukturze naczyń, niezbędnym jest połączenie metody korozyjnej z inną techniką, np. angiografią. Metoda korozyjna umożliwia precyzyjną charakterystykę naczyń krwionośnych w guzie czerniaka Bomirskiego zlokalizowanego w przedniej komorze oka [94]. Naczynia w tym guzie pochodzą z tęczówki, nie wykazują hierarchicznej organizacji, są nieregularne i nieszczelne. Kapilary obserwowane w środku masy guza miały stosunkowo dużą średnicę (15-25 μm) i nierówne brzegi z miejscowymi przewężeniami. Dzięki zastosowanej metodzie udało się ocenić nieszczelność naczyń, z których miejscami wyciekała żywica. Dziury te miały średnio szerokość 1-5 μm . Kapilary w środku guza były mocno ze sobą połączone, natomiast te na peryferiach masy guza miały strukturę dendrytyczną.

Metoda korozyjna znalazła również zastosowanie w obrazowaniu mikrounaczynienia kory mózgu [95], pęcherza [96] czy nerek [97].

3.3.2 Ultrasonografia Dopplerowska

W celu określenia skuteczności zastosowania wiązki protonów, istotnym jest znajomość morfologicznych parametrów naczyń takich jak długość naczyń krwionośnych, ich powierzchnia, objętość czy poziom rozgałęzienia oraz parametrów funkcjonalnych, takich jak tempo przepływu krwi, hemodynamika, przepuszczalność naczyń krwionośnych, pH czy utlenowanie tkanki [98]. Niestety nadal brakuje metody, która pozwoliłaby w sposób systemowy zmierzyć wszystkie te parametry w sposób nieinwazyjny, powtarzalny i tani. Badanie ultrasonograficzne (USG) jest bardzo wygodną techniką, ze względu na swoją prostotę, szybkość i bezpieczeństwo dla pacjenta. Jest stosowana jako narzędzie diagnostyczne wzrostu nowotworu i jego rozsiewu od lat 60 XX

wieku. Głowica USG wysyła ultradźwięki, które odbijają się na granicy ośrodków a następnie wracają do głowicy. Każdy badany ośrodek ma swoją impedancję co skutkuje odmiennymi współczynnikami odbicia i możliwością rozróżnienia poszczególnych struktur [99]. W rezultacie otrzymany obraz jest echogeniczną mapą badanej tkanki. W kontekście chorób nowotworowych, klasyczna prezentacja B (dwuwymiarowa prezentacja obrazowanego obszaru z różną jaskrawością punktów) umożliwia określenie umiejscowienia guza oraz obliczenie jego objętości. Przy użyciu prezentacji Doppler możliwe jest dodatkowo zobrazowanie naczyń krwionośnych oraz określenie tempa przepływu krwi. Ultradźwięki odbijające się od płynących czerwonych krwinek powodują zmianę częstotliwości fal wysłanych z głowicy co umożliwia obliczenie prędkości przepływu krwi z wykorzystaniem zjawiska Dopplera. Obrazowanie USG jest bardzo praktyczne, jednak należy zdawać sobie sprawę z jego ograniczeń wynikających ze stosunkowo niskiej rozdzielczości. Próbuje się ją zwiększać np. poprzez dożylne podawanie mikropęcherzyków [100]. Standardowo mają one średnicę w zakresie od 1 do 4 μ m i składające się z elastycznej powłoki (np. lipidowej), która tworzy pęcherzyk wypełniony gazem (np. azotem).

Ultrasonografia znajduje także szerokie zastosowanie w okulistyce klinicznej. Dzięki temu badaniu możliwe jest rozróżnienie szeregu prawidłowych struktur, w tym rogówki, tęczówki czy przedniej komory [101]. Najważniejsze jest jednak jej zastosowanie w diagnostyce stanów patologicznych, takich jak katarakta, oderwanie siatkówki czy guzy wewnątrzgałkowe. Niektóre typy nowotworów wewnątrzgałkowych mają swój charakterystyczny „echogeniczny podpis”, który umożliwia ich identyfikację. Największą zaletą zastosowania USG do identyfikacji nowotworów w obrębie gałki ocznej jest możliwość wykonania wirtualnych przekrojów guza w sposób nieinwazyjny i nienarażający pacjenta na promieniowanie. U dorosłych pacjentów dzięki tej metodzie najczęściej diagnozowany jest czerniak naczyńiówki, natomiast u dzieci retinoblastoma. Niektóre stany patologiczne (takie jak np. krwotok do ciała szklistego czy stan zapalny) mogą dawać podobne objawy kliniczne lub maskować obecność zmiany nowotworowej, która widoczna będzie po wykonaniu badania USG .W przypadku czerniaka

skóry badanie USG umożliwia wyznaczenie współczynnika wg. skali Breslow. Określa ona maksymalną grubość nowotworu, która jest istotnym czynnikiem prognostycznym związanym z potencjałem do przerzutowania. Wartość ta określa margines z jakim należy usunąć zmianę nowotworową oraz determinuje sposób postępowania z sąsiadującymi węzłami chłonnymi [102]. Analiza unaczynienia z użyciem trybu Doppler pozwala też z wysoką specyficznością, choć zmienną czułością, określić stopień złośliwości danego czerniaka skóry. Czerniak naczyńówki może nie tylko występować w różnej lokalizacji, ale również przybierać różne kształty - od grzybiastego do kopulastego. W czasie rozwoju ich kształt się zmienia, przez sferyczny, elipsoidalny aż do nieregularnego po przerwaniu błony Brucha [103]. Standardowy pomiar średnicy i wierzchoła wysokości nie będzie więc wystarczający w przypadku guzów o tak zróżnicowanym i zmiennym kształcie. Metoda USG umożliwia wyliczenie niezależnej od kształtu trójwymiarowej objętości guza co może istotnie wpłynąć na prognozy jego rozwoju.

3.3.3 Mikro-tomografia komputerowa

Nową metodą obrazowania guzów pierwotnych i ich unaczynienia jest mikro-tomografia komputerowa. Technika ta opiera się na tworzeniu złożonych projekcji uzyskanych dzięki promieniowaniu X na poszczególnych przekrojach badanego obiektu. W związku z tym, że promieniowanie X oddziałuje z elektronami, jądrami i polami elektrycznymi, najłatwiejsze do uzyskania są obrazy obiektów, które składają się z molekuł o wysokiej liczbie atomowej. Stożkowa wiązka promieniowania X pada na próbkę, przechodzi przez nią i zbierana jest przez detektor. Wiązka taka jest osłabiona, ponieważ w czasie penetracji przez próbkę ulega ona oddziaływaniu z otaczającą materią.

W zależności od układu, albo próbka albo źródło promieniowania obracają się o niewielki kąt i rejestrowana jest kolejna projekcja. Jeśli chodzi o biologiczne obrazowanie tkanek miękkich, które składają się głównie z atomów o niskiej liczbie atomowej (takich jak tlen czy węgiel) niezbędne jest wzmocnienie kontrastu przy pomocy barwników [104]. Na końcu pomiaru

uzyskuje się szereg dwuwymiarowych obrazów, z których tworzy się trójwymiarową rekonstrukcję.

Biomedyczne zastosowania micro-CT w dużym stopniu opierają się na wysoko zmineralizowanych tkankach. Metoda ta znalazła więc swoje zastosowanie w badaniu kamicy nerkowej [105], osteoporozy [106] czy w stomatologii [107]. Na poziomie *ex vivo* metoda ta praktycznie nie ma ograniczeń - odpowiednie wybarwienie tkanki umożliwia jej zobrazowanie z bardzo dużą rozdzielczością (nawet poniżej 1 μ m). Niemniej jednak co raz częściej pojawiają się doniesienia o wykorzystaniu tej metody do przeżyciowego obrazowania rozwoju nowotworów i ich unaczynienia. Dzięki powstawaniu nowych środków kontrastujących, takich jak np. ViscoverExiTron Nano 12,000 [108], możliwe jest obrazowanie nawet najdrobniejszych naczyń krwionośnych, ponieważ związek ten znacząco zwiększa kontrast, jest nietoksyczny i wystarczająco długo utrzymuje się w układzie krwionośnym.

4. Cele pracy

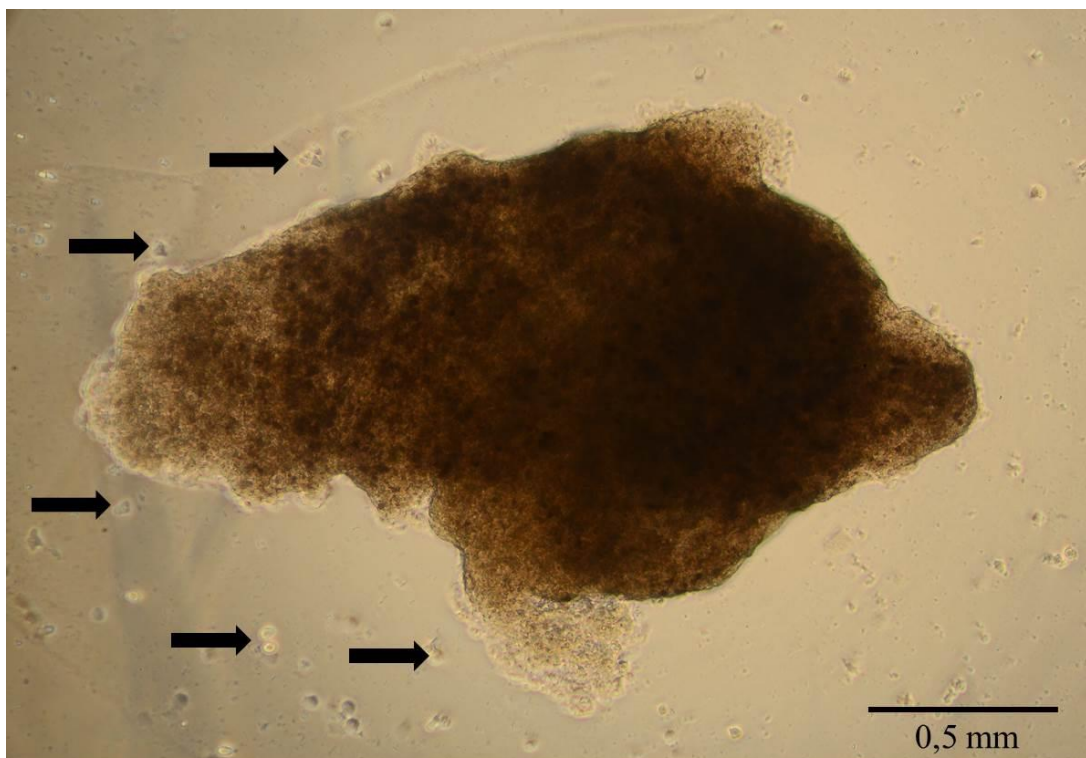
Celem niniejszej pracy jest odpowiedź na pytanie, czy terapia protonowa jest odpowiednią bronią przeciwko czerniakowi rosnącemu w oku. Sformułowano następujące cele szczegółowe:

- 1) Zbadanie aktywności migracyjnej komórek BHM Ma na poziomie in vitro.
- 2) Nieinwazyjne monitorowanie rozwoju i stanu unaczynienia guzów BHM Ma rosnących w przedniej komorze oka w trakcie ich rozwoju.
- 3) Optymalizacja obrazowania tkanek miękkich metodą mikro-tomografii komputerowej na przykładzie guzów BHM Ma wzrastających w przedniej komorze oka chomików syryjskich.
- 4) Analiza zachowania guzów po traktowaniu wiązką protonów w wybranych dawkach, w celu wyznaczenia jednorazowej dawki wiązki protonów, przy której napromienianie guza BHM Ma w przedniej komorze oka chomika syryjskiego będzie hamowało wzrost guza pierwotnego przy jednoczesnym zachowaniu funkcji prawidłowych struktur oka.
- 5) Sprawdzenie czy wsparcie terapii protonowej czynnikami dodatkowymi w postaci leku antyangiogenego Avastin® lub witaminy D w modelu zwierzęcym spowolni lub zatrzyma wzrost guza.
- 6) Analiza czasu przeżycia zwierząt obciążonych guzem BHM Ma w przedniej komorze oka po zastosowaniu terapii protonowej lub terapii protonowej uzupełnionej lekiem Avastin® lub witaminą D.
- 7) Określenie lokalizacji i liczby przerzutów u wszystkich badanych zwierząt eksperymentalnych.

5. Materiały i metody

5.1. Hodowla in vitro.

Hodowlę in vitro komórek BHM Ma założono poprzez pobranie kilku skrawków z tkanki guza rosnącego podskórnie na prawym boku chomika syryjskiego. Skrawki umieszczono w butelkach do hodowli komórkowych (TPP, Szwajcaria) w pożywce RPMI z dodatkiem 20% cielejcej surowicy płodowej (Biological Industries, USA). Komórki wyrosły z pierwotnego eksplantatu (Ryc. 4). Przy użyciu trypsyny przeprowadzono dysagregację komórkową, którą przerwano po 90 sekundach przez dodanie surowicy. Komórki zostały odseparowane poprzez wirowanie i wysiane na nową butelkę do hodowli komórkowych. Komórki trzymano w inkubatorze w temperaturze 37°C w atmosferze składającej się w 5% z CO₂.



Ryc. 4. Skrawek tkanki guza BHM Ma, z którego wychodzą komórki (zaznaczono czarnymi strzałkami). Widoczne jest silne upigmentowanie tkanki. Skrawek jest długości 2mm, zdjęcie wykonane pod mikroskopem Nikon Eclipse TS100, powiększenie 100x

W celu przeprowadzenia testu proliferacji, komórki wysiewane były w ilości 10 tys./dołek na trzech płytkach 6-dołkowych. Komórki z trzech kolejnych dołków zliczane były co 8 godzin przez okres 48 godzin z wykorzystaniem komory Bürkera. Test proliferacji umożliwia wyliczenie czasu podwojenia populacji na podstawie poniższego wzoru:

$$T_d = \frac{h}{[3,32 \times (\log C2 - \log C1)]}$$

;

gdzie h to czas trwania eksperymentu, C1 to gęstość początkowa, C2 gęstość końcowa.

Równolegle wykonywano test rasy zgodnie z protokołem [109]. Komórki wysiano na płytce 6 dołkowej. W momencie gdy doszło do pełnej konfluencji dołka wykonywano rysę przy użyciu sterylnej końcówki do pipety. Oderwane komórki usunięto poprzez przepłukanie roztworem PBS z jonami Ca^{2+} (100 mg/L) i Mg^{2+} (100 mg/L). Zdjęcia wykonywano co 8 godzin do momentu zarośnięcia rany za pomocą mikroskopu Nikon 5000 przymocowanego do mikroskopu Nikon TS100. Ilościową analizę tempa zarastania rasy wykonano w programie ImageJ. Początkowa powierzchnia rasy to 100%, następnie zakreślano wolne od komórek obszary w kolejnych punktach czasowych i wyrażano jako procent wartości początkowej.

Wykonano analizę aktywności migracyjnej komórek BHM Ma. Wysiano je na płytce 12 dołkowej w 4 gęstościach- 10 tys., 20 tys., 40 tys. i 80 tys. w 3 powtórzeniach. Film nagrywający aktywność komórek powstał przy użyciu komory utrzymującej stałe parametry atmosferyczne (37°C i 5% CO_2) z użyciem kamery CCD sprzężonej z odwróconym mikroskopem Leica DMI 6000B z kontrastem IMC, obiektyw o powiększeniu 10×. Zdjęcia wykonywane były przez 8 godzin w odstępach 15 minutowych. W celu analizy ilościowej wyznaczano centroidy 50-ciu losowo wybranych komórek z każdego dołka i określano poszczególne parametry:

- a) Średnia prędkość ruchu, która wyraża stosunek całkowitej trajektorii ruchu komórki do czasu pomiaru ($\mu\text{m/h}$)
- b) Średnia prędkość przemieszczenia, która wyraża stosunek przemieszczenia komórki do czasu pomiaru ($\mu\text{m/h}$)

- c) Dystans, który zlicza sumę odcinków pokonanych przez komórkę w każdym cyklu między wykonywaniem fotografii czyli co 15 min (μm)
- d) Przeszyczenie, czyli odcinek drogi między punktem początkowym a końcowym centroidu komórki (μm)
- e) Współczynnik wydajności ruchu CME, który wyrażany jest jako stosunek przeszczenia komórki do długości jej trajektorii. Na podstawie tego parametru możliwe jest określenie czy komórka porusza się ruchem prostoliniowym (CME=1) czy chaotycznym (CME=0).

Analizy trajektorii komórek dokonywano używając programu Hiro (W. Czapla).

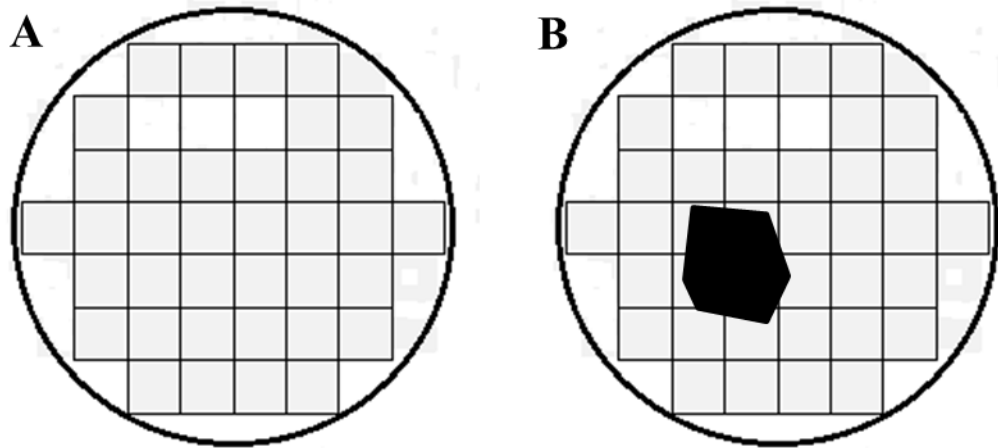
5.2. Implantacja i obserwacja wzrostu czerniaka w galce ocznej

Na wszystkie eksperymenty przeprowadzone w ramach tej pracy uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie nr 90/2014 (dodatkowo dwa aneksy do tej uchwały o numerach 264/2015 i 265/2015).

Dwa chomiki syryjskie (samce) z zaimplementowanymi podskórnice na prawy bok zwierzęcia guzami BHM Ma uzyskano dzięki uprzejmości prof. dr hab. Mirosławy Cichorek, kierownik Zakładu Embriologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zwierzęta przeszły 14-dniową kwarantannę w Zwierzętarni Konwencjonalnej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Po tym okresie, gdy guzy miały ok. 1,5 cm średnicy, zwierzęta poddano eutanazji (mieszanka 0,5 ml ksylazyny i 0,5 ml ketaminy) i w warunkach jałowych pobrano kilka próbek tkanki z różnych fragmentów guza. Tkanę pocięto na niewielkie skrawki o średnicy ok. 1-1,5mm. W celu zachowania tkanki BHM Ma przeżyciowo, wykonano również pasaż guza ze zwierzęcia na kolejne zwierzę poprzez podskórną implantację skrawków na bok chomika. Dzięki temu cały czas dostępna jest żywa tkanka guza. Nie mniej jednak aby nie stracić tego materiału założono również hodowlę pierwotną komórek ze skrawków guza BHM Ma. Komórki te początkowo nie wykazywały adherencji do podłoża jednak po zwiększeniu

zawartości surowicy do 20% zaczęły wykazywać zdolności adherentne. Po trzech pasażach komórki jak i skrawki guza zostały zabankowane.

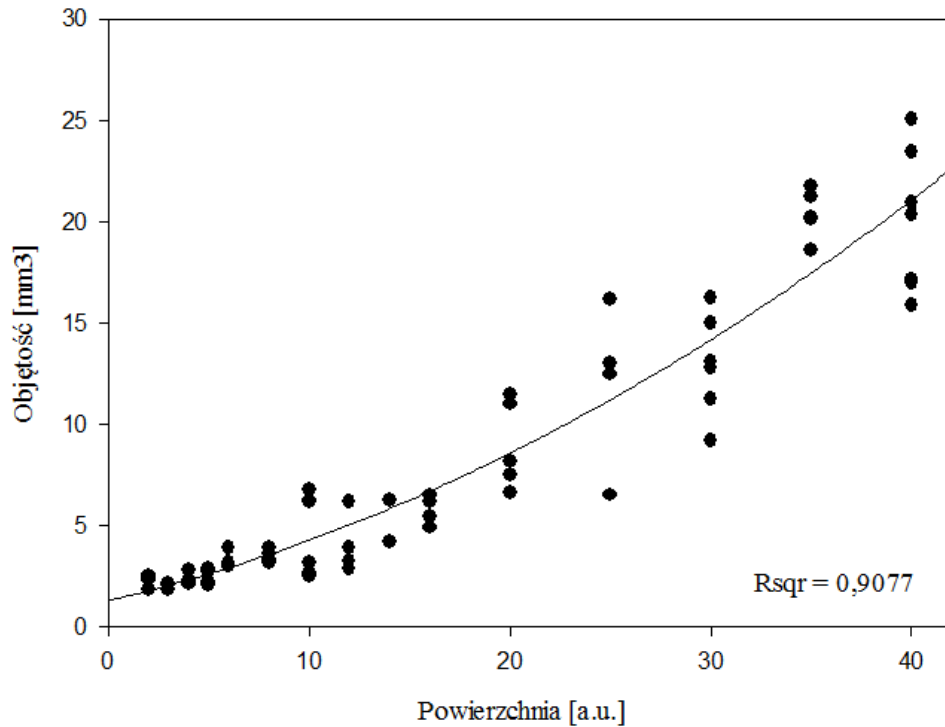
Wszystkie zwierzęta biorące udział w eksperymencie to chomiki syryjskie, samice, w wieku 12-15 tygodni, zakupione w firmie Charles River, Francja. Zwierzęta przed iniekcją skrawków zostały znieczulone (mieszanina 0,1 ml ksylazyny i 0,2 ml ketaminy). Zwierzętom będącym w znieczuleniu umieszczono podskórnice chipy z odpowiednimi numerami identyfikacyjnymi. Przed procedurą implantacji oko było dodatkowo znieczulone poprzez podanie do oka kropli Alcaine® (firma Alcon®). Małe fragmenty tkanki BHM Ma były implantowane do przedniej komory lewego oka pod kontrolą mikroskopu chirurgicznego Möller Wedel. Po wykonaniu procedury oko zwierzęcia było smarowane maścią z antybiotykiem Tobrex® (firma Alcon®). Oczy smarowano tą maścią przez następne trzy dni od implantacji. Od momentu implantacji zwierzęta były codziennie obserwowane pod kątem ich stanu zdrowia, prowadzona była również codzienna obserwacja oka pod mikroskopem chirurgicznym a raz w tygodniu kontrolowana była masa ciała zwierząt. W używanym mikroskopie chirurgicznym zamontowana była w okularze siatka z podziałem na 40 kratek o tym samym rozmiarze, która ułatwiała określanie rozmiaru zaobserwowanego guza. Poniżej przedstawiono poglądowy schemat, który obrazuje jaki obraz widoczny był w mikroskopie chirurgicznym po zamocowaniu siatki umożliwiającej szacowanie wielkości guza– ryc. 5 A to siatka z podziałem na 40 kratek, ryc. 5 B to siatka z zaznaczonym na czarno przykładowym rozmiarem guza BHM Ma, tutaj wielkość oceniona na ok. 4 kratki. Wszystkie oględziny i pomiary były wykonywane przez jednego obserwatora w celu zmniejszenia rozbieżności w ocenie.



Ryc.5. A) Poglądowa prezentacja siatki, na podstawie której oceniano rozmiar guza B) Przykładowy guz rosnący w przedniej komorze oka zajmujący około czterech kratek.

Metoda ta umożliwia tylko dwuwymiarową ocenę powierzchni guza, jednak jak się okazuje, metoda ta umożliwia otrzymanie komplementarnych wyników do objętości zmierzonej przy pomocy USG. Na rycinie poniżej (Ryc. 6) przedstawiona jest korelacja nieliniowa oceny rozmiarów guzów otrzymanych przy pomocy lupy chirurgicznej oraz obrazowania USG. Współczynnik korelacji $R^2 = 0,9077$ co oznacza, że korelacja jest silna.

Korelacja nieliniowa objętości guza zmierzonej przy pomocy
lupy chirurgicznej i USG
($f = y_0 + a \cdot x + b \cdot x^2$)



Ryc. 6. Korelacja nieliniowa objętości guza zmierzonej przy pomocy lupy chirurgicznej i USG. Dopasowana krzywa pozwala stwierdzić, że współczynnik korelacji R^2 wynosi $\sim 0,91077$.

5.3. Obrazowanie guzów metodą ultrasonografii dopplerowskiej

Do obrazowania guzów zlokalizowanych w przedniej komorze oka chomików syryjskich użyto wysokorozdzielczej ultrasonografii Vevo 2100, FujiFilm, Visual Sonics, Toronto, Ontario, Kanada. Do uzyskania obrazów posługiwano się transduktorem MS550D z zakresem częstotliwości pracy 22- 55 MHz i z rozdzielczością przestrzenną $20 \times 20 \times 170 \mu\text{m}$. Dla początkowego potwierdzenia obecności guza w przedniej komorze posługiwano się projekcją B (w skali szarości) z częstotliwością 40 MHz i gain of 18 dB. Pomiar Kolor i Power Doppler wykonywane były w celu detekcji obecności przepływu krwi, jego kierunku i tempa w naczyniach krwionośnych o średnicy większej niż 30

µm. Ustawione parametry to częstotliwość centralna 32 MHz z impulsem 3-4 kHz. Żel do USG (Hasco- Lek, Wrocław, Polska) przed nałożeniem na gałkę oczną był wirowany w celu pozbycia się pęcherzyków powietrza zakłócających pomiar. Oko z guzem było obrazowane w 40 projekcjach z krokiem co 0,171 mm przy użyciu automatycznego motoru, do którego przymocowany był transducer. Środek oka (określany na podstawie wyznaczenia miejsca o największej średnicy) był miejscem początkowym ustawienia transducera. Podczas wykonywania pomiaru zwierzęta były cały czas w stanie uśpienia poprzez inhalację izofluranu w stężeniu 2-3% (w zależności od masy zwierzęcia). Ponadto przebywały na platformie grzewczej, która monitoruje pracę serca i układu oddechowego zwierzęcia oraz jego temperaturę.

Na podstawie uzyskanych pomiarów uzyskano informację o morfologii guzów (tj. o ich echogeniczności, strukturze, kształcie i objętości) oraz o ich unaczynieniu (tj. o ich ilości w obrębie guza, ich strukturze i tempie przepływu krwi). Mierzony obszar (ang. Region of Interest, ROI) był ręcznie zaznaczany na każdym z 40 obrazów przekroju gałki ocznej. Objętości zarówno guza jak i naczyń były wyliczane na podstawie poniższej formuły:

$$V = \text{ROI} \times \text{grubość przekroju}$$

Całkowite objętości guza i naczyń krwionośnych to suma objętości z poszczególnych przekrojów wyrażona w mm³. Do analizy ilościowej użyto skryptu napisanego w środowisku Matlab (Math Works, USA) napisanego przez mgr Agnieszkę Drzał.

5.4. Obrazowanie guzów metodą mikro-tomografii komputerowej.

Obrazowanie micro-CT wykonano dla dwóch prawidłowych gałek ocznych nieobarczonych zmianą nowotworową, trzech gałek z guzem w średnim stanie rozwoju i dwóch z bardzo zaawansowanym stadium rozwoju guza. Po enukleacji gałki oczne umieszczano w celu utrwalenia w 10% roztworze formaliny (POCH, Gliwice, Polska). Następnie barwione były one 100% płynem Lugola poprzez umieszczenie ich w nim na okres 96 godzin w temperaturze

4°C. Aby uzyskać obrazy wysokiej rozdzielczości, gałki oczne przed pomiarem mocowano na specjalnym wydrukowanym stojaku, którego celem było zapobieganie ruchom gałki w czasie trwania pomiaru. Pomiar micro-CT wykonywano tomografem SkyScann 1172 (SkyScan, Kontich, Belgia). Pomiar dokonywany był przy ustawionych stałych parametrach: energia promieniowania X: 80 keV, krok rotacyjny co 0,2°, rozmiar pixela na obrazie 7µm, każda projekcja uśredniona z 12 skanów. Rekonstrukcja obrazu oraz jego analiza wykonywane były w oprogramowaniu SkyScann (Nrecon v. 1.7.1.0 i CTAnalyser v. 1.16.1.0, Bruker microCT, Kontich, Belgia). Analizę statystyczną pomiarów wykonano w programie OriginPro (OriginLab, v. 2016, Northampton, MA, USA). Gęstość unaczynienia wyliczono na podstawie ilości naczyń krwionośnych na mm² w dziesięciu losowo wybranych dwuwymiarowych projekcjach gałki ocznej.

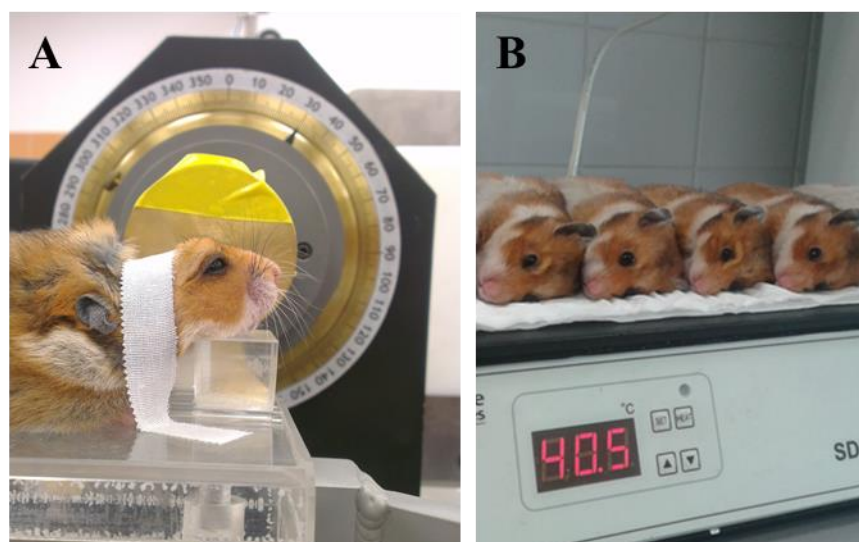
5.5. Witamina D

Kalcitriol (1,25(OH)₂D₃) zakupiono w Sigma-Aldrich®. W pierwszej kolejności witaminę D rozpuszczono w 100% etanolu (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska). Następnie rozcieńczono tak przygotowany roztwór do finalnego stężenia 50 nM (N=4) i 200 nM (N=4) w 2 ml PBS i podawano dootrzewnowo. Ostateczne stężenie alkoholu w roztworach wynosiło więc odpowiednio 0,05% oraz 0,2% co jest wartością zaniedbywalną. Zwierzętom z grupy kontrolnej (N=4) podano dootrzewnowo 0,2% alkoholu w 2 ml PBS. Zachowanie i kondycję zwierząt monitorowano przez 72h od podania odpowiedniego roztworu. Po upływie 72h zwierzęta poddawano eutanazji poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy (dawka 150 mg/kg) i ksylazyny (10 mg/kg). Od każdego zwierzęcia pobrano krew, płuca i wątrobę do dalszego badania. Analizę krwi wykonano w aparacie hematologicznym Cobas e 411 (Roche). Test „The Elecys Vitamin D” (Roche) oraz metoda elektrochemiluminescencyjna były przeprowadzone w celu określenia stężenia witaminy D. Rozmazy krwi analizowane były przy użyciu metody Pappenheim’a z użyciem barwnika May Grunwald- Giemza (Aqua-

Med., Kraków, Polska). Mikroskopowa analiza krwi przeprowadzona była przy pomocy formuły Shilling'a. Fragmenty tkanki przeznaczone do obserwacji pod mikroskopem zostały przygotowane zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Marzella i Glaumann (1980). Tkanę najpierw utrwalono w aldehydzie glutarowym a następnie wybarwiono 2% OsO₄ (SPI Supplies, USA) w celu wzmocnienia kontrastu. Na koniec tkankę zawieszono w żywicy epoksydowej. Skrawki przygotowano na ultramikrotomie Leica EM UC7. Zdjęcia wykonano przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tecnai G2 Spirit (FEI Company, USA).

5.6. Terapia wiązką protonów

Zwierzęta zakwalifikowane do terapii protonowej (tzn. te z guzem zajmującym ¼ komory oka lub więcej) były transportowane do centrum Cyklotronowego Bronowice Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodziczańskiego PAN w Krakowie. Zwierzęta w czasie transportu były zabezpieczone przed gwałtownymi zmianami temperatury, miały stały dostęp do pożywienia i wody. Przed napromienianiem wiązką protonów zwierzęta były usypiane mieszaniną ksylazyny (0,1 ml) i ketaminy (0,2 ml) w celu wyeliminowania ich ruchu. Obie gałki oczne były przed terapią dodatkowo nawilżane kroplami Oftaquix® (firma Anten®). Na ryc. 7A widać zwierzę przygotowane do terapii. Czas napromieniania jest zależny od dawki jednak w żadnym wariantcie terapeutycznym nie przekraczał on 7 minut. W tym czasie zwierzę nie wychłodzi się na tyle mocno by zagrażało to jego życiu. Bezpośrednio po zakończeniu terapii zwierzę było przenoszone na płytę grzewczą w celu utrzymania prawidłowej temperatury (ryc.7B).



Ryc. 7. A) Chomik syryjski przygotowany do rozpoczęcia terapii protonowej. Zwierzę jest odpowiednio spozycjonowane a gałka oczna wyeksponowana do przeprowadzenia eksperymentu. B) Zwierzęta po terapii trzymane na płycie grzewczej w celu utrzymania odpowiedniej temperatury ciała.

Wiązka protonów została wytworzona w cyklotronie Proteus C-235. Ich początkowa energia 230 MeV została zdegradowana do 70 MeV. Tak uformowana wiązka przechodziła dalej przez systemy rozpraszania i modulowania energii. Przed napromienianiem zwierząt wykonano dozymetrię wiązki zgodnie z protokołem rekomendowanym przez Międzynarodową Agencję Energii Atomowej IAEA TRS398 [110]. W tym celu wykorzystany został dozymetr składający się z komory jonizującej PTW TM31010 i z elektrometru PTW UNIDOS. Chomiki pozycjonowane były na specjalnej podstawce z PMMA w odległości 3 centymetrów od snauta (końcowej części dyszy, z której wyprowadzana jest wiązka protonów). Pozycjonowanie wykonywano w ciemności przy pomocy pola świetlnego, które przechodziło przez kolimator o średnicy 7 mm. Wiązka protonów formowana była w taki sposób, aby pik Bragga pokrywał całą objętość gałki ocznej (średnica oka ~ 5mm).

Części zwierząt 24h przed terapią protonową podawany był dogąłkowo lek Avastin® o stężeniu 25mg/ml w objętości 15 μ l. Innym zwierzętom

podawano natomiast witaminę D w dawce 50 nM na 72h przed terapią protonową.

Wszystkie wykresy oraz analizę statystyczną przeprowadzono w programie SigmaPlot 13.0.

5.7. Histologia

Bezpośrednio po enukleacji gałki oczne umieszczano w krioprotektancie (Cryomatrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) i mrożono w ciekłym azocie. Tkanki krojono na skrawki o grubości 6 μm przy pomocy kriostatu Leica CM1850. Tak przygotowane skrawki umieszczano na polilizynowych szkiełkach i barwiono hematoksyliną oraz eozyną (H&E). Barwienie wykonano poprzez kolejno: umieszczenie szkiełek na 1 minutę w malejących stężeniach alkoholu (96%, 95%, 80%, 70%) w celu utrwalenia materiału biologicznego, następnie delikatnie płukano w wodzie destylowanej, barwiono hematoksyliną przez 5 min, nadmiar barwnika odpłukiwano w wodzie destylowanej przez 15 min, następnie na 1 minutę w alkoholu 95% i na 1,5 minuty w eozynie. Wszystkie roztwory uzyskano z odczynników firmy POCh, Gliwice, Polska. Na tak wybarwione preparaty nanoszono klej Aqua-Mount (Thermofisher Scientific, USA) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym (Elektro Med., 24x50 mm). Przygotowane preparaty pozostawiono do całkowitego wyschnięcia i wykonywano zdjęcia przeglądowe struktury, które nie podlegały analizie ilościowej. Zdjęcia robione były aparatem Nikon D7000.

5.8. Alternatywny model zwierzęcy do badania czerniaka gałki ocznej.

Eksperyment przeprowadzono po uzyskaniu zgody od komisji bioetycznej nr 57/2018 Wysiano komórki czerniaka ludzkiego 92.1 do butelki do hodowli komórkowych (powierzchnia wzrostu 75 cm^2 , producent TPP).

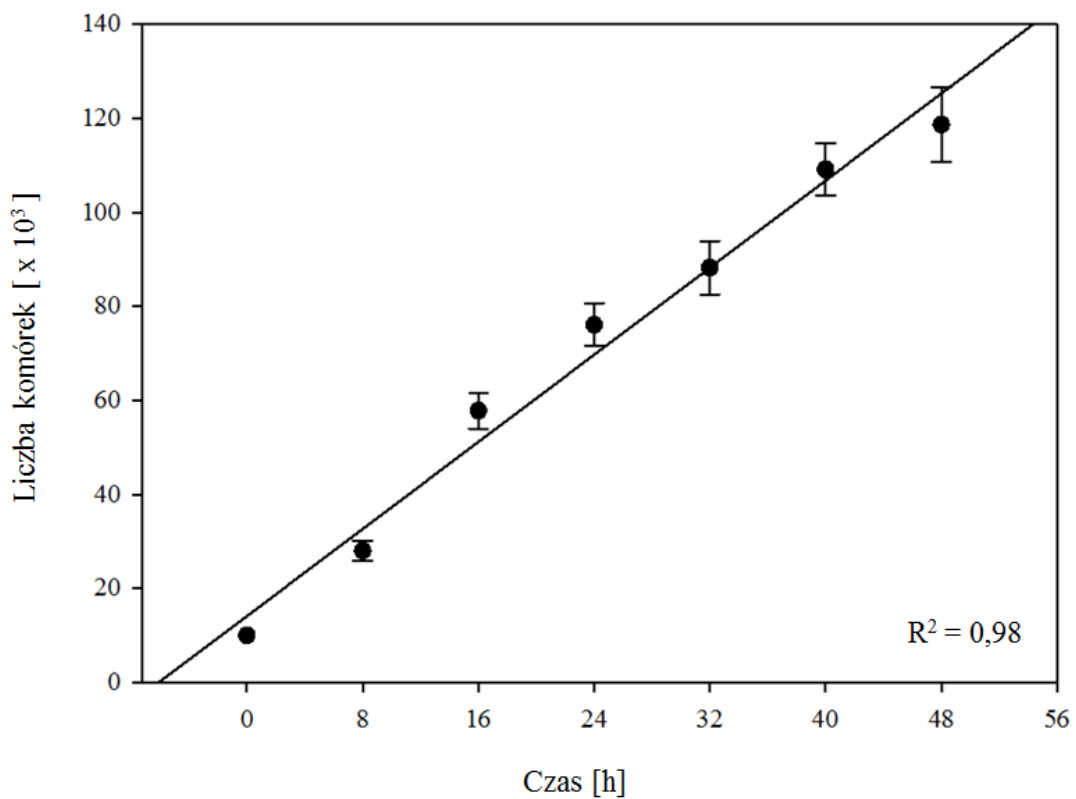
Komórki hodowano w medium RPMI z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej. Gdy komórki narosły, zliczono i zawieszono je w PBS w gęstości 15 tys. / 5 μ l. Tak przygotowane komórki podawano do tylnej części gałki ocznej myszom NCI SCID/NCr (N= 15, samce, 10 tygodni, Charles River). Mysz była unieruchamiana, po czym podawano jej znieczulające miejscowo krople Alcaine® (firma Alcon®) a następnie oko było przepłukiwane zawiesiną komórek. Codziennie monitorowano stan zdrowia zwierząt oraz raz w tygodniu wykonywano pomiary USG (tak samo jak w podrozdziale 4.3) w celu weryfikacji czy inokulacja była skuteczna. Gdy guz wypełniał połowę gałki ocznej zwierzęcia wykonywano eutanazję i pobierano gałkę oczną, płuca oraz wątrobę do dalszej analizy. Wypreparowaną gałkę oczną przygotowywano do obrazowania micro-CT tak samo jak w podrozdziale 5.4.

Pracę wykonano w ramach grantu NCN „Opus 4” pt. „Hamowanie procesu przerzutowania czerniaków po działaniu promieniowania protonowego – poszukiwanie mechanizmów” 2012/07/B/NZ4/01657.

6. Wyniki

6.1. Własności migracyjne komórek BHM Ma.

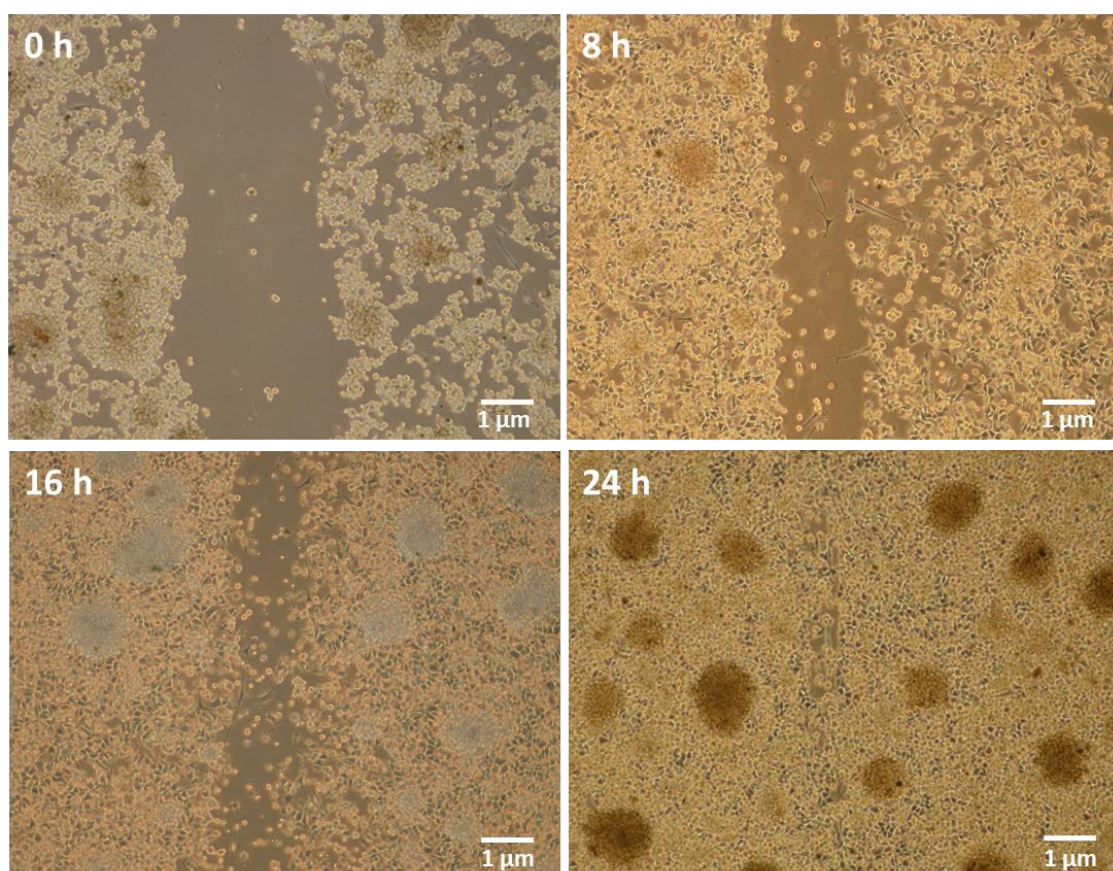
W pierwszym etapie badań przeprowadzono test proliferacji. Komórki wysiano w równych gęstościach (10 tys./dołek) na płytkę. W każdym punkcie czasowym, co 8 godzin liczą komórki z wykorzystaniem komory Burkera z trzech dołków. Tempo namnażania komórek w czasie przedstawiono na Ryc.8.



Ryc. 8. Tempo proliferacji komórek BHM Ma w hodowli komórkowej. W każdym punkcie czasowym zliczane były komórki z trzech dołków, na wykresie przedstawiono wartości średnie \pm odchylenie standardowe. Dopasowano linię trendu z $R^2=0,98$.

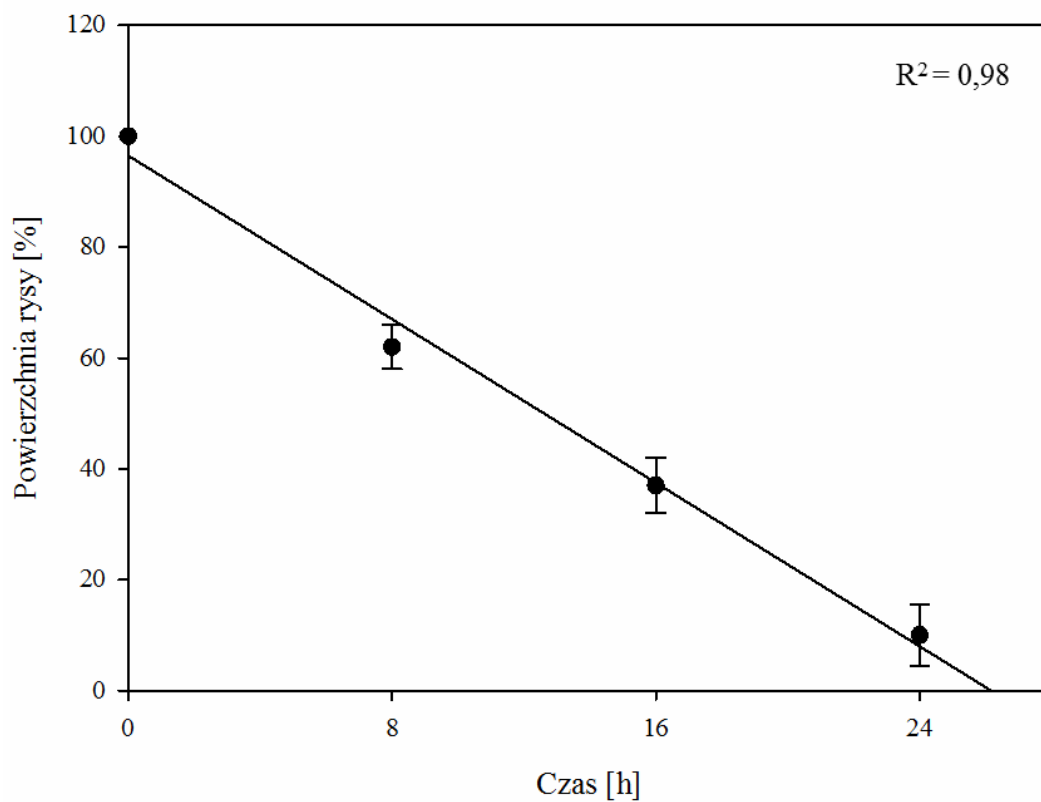
Wykonany test proliferacji umożliwia obliczenie czasu podwojenia populacji komórek, który dla komórek BHM Ma wynosi ok. 13,4h.

Równoległe przeprowadzano test zarastania rysy, dzięki któremu można oszacować aktywność migracyjną hodowanych komórek. Na ryc. 9 przedstawiono wybór zdjęć zarastania rysy w poszczególnych punktach czasowych. Po 24 godzinach rysa jest już praktycznie niewidoczna a komórki agregują w duże kolonie. Komórki BHM Ma wykazują tendencję do życia w skupiskach, co widać na ryc. 9 jako skupiska komórek tym większe im większa ilość komórek.



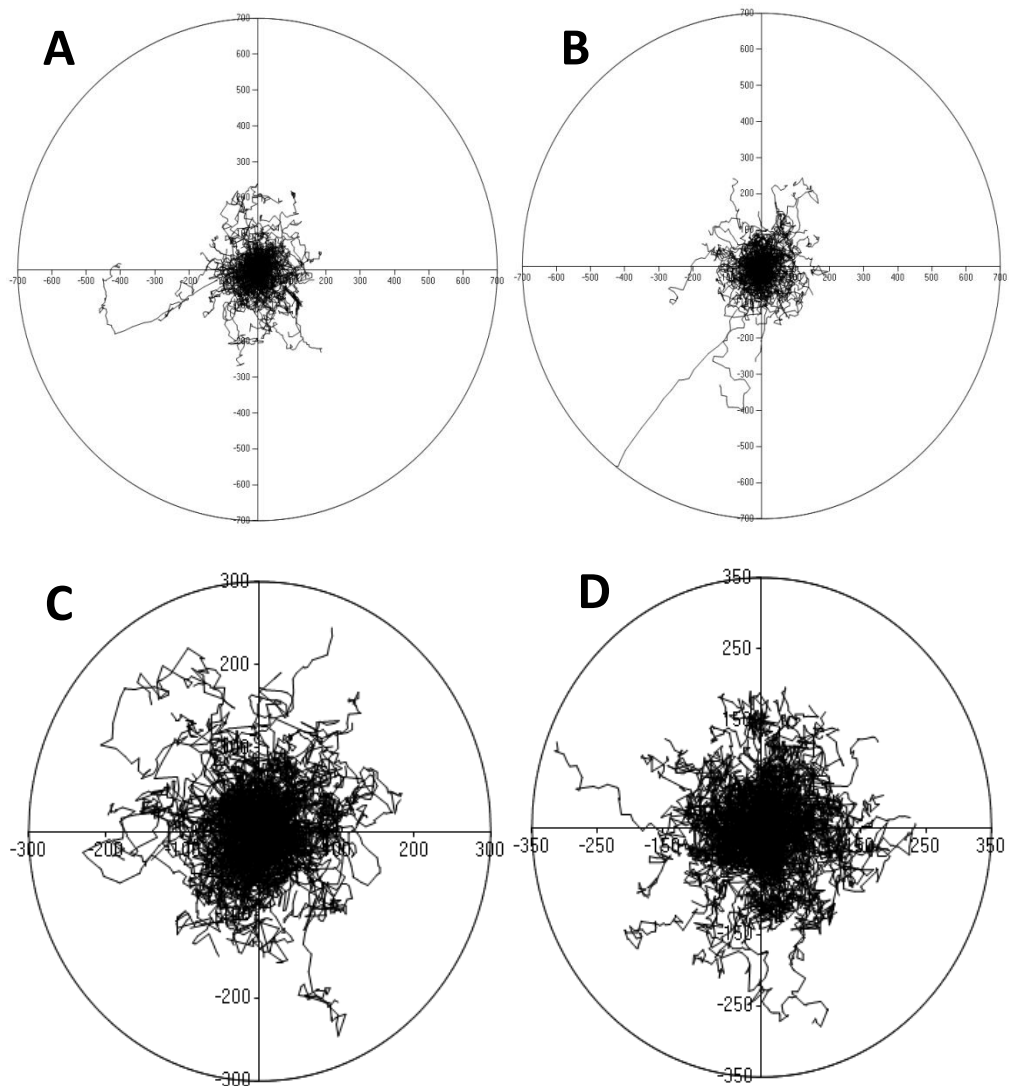
Ryc. 9. Zdjęcia z przebiegu procesu zarastania rysy. Po 24 h rysa jest już całkowicie zarośnięta a komórki agregują w duże kolonie. Powiększenie 40x.

Na Ryc. 10 przedstawiono wykres tempa zarastania rysy w czasie wraz wyznaczoną linią trendu o współczynniku $R^2 = 0,98$. Przy interpretacji tego wyniku należy zachować ostrożność biorąc pod uwagę, że czas podwojenia populacji dla tych komórek wyniósł ponad 13h.



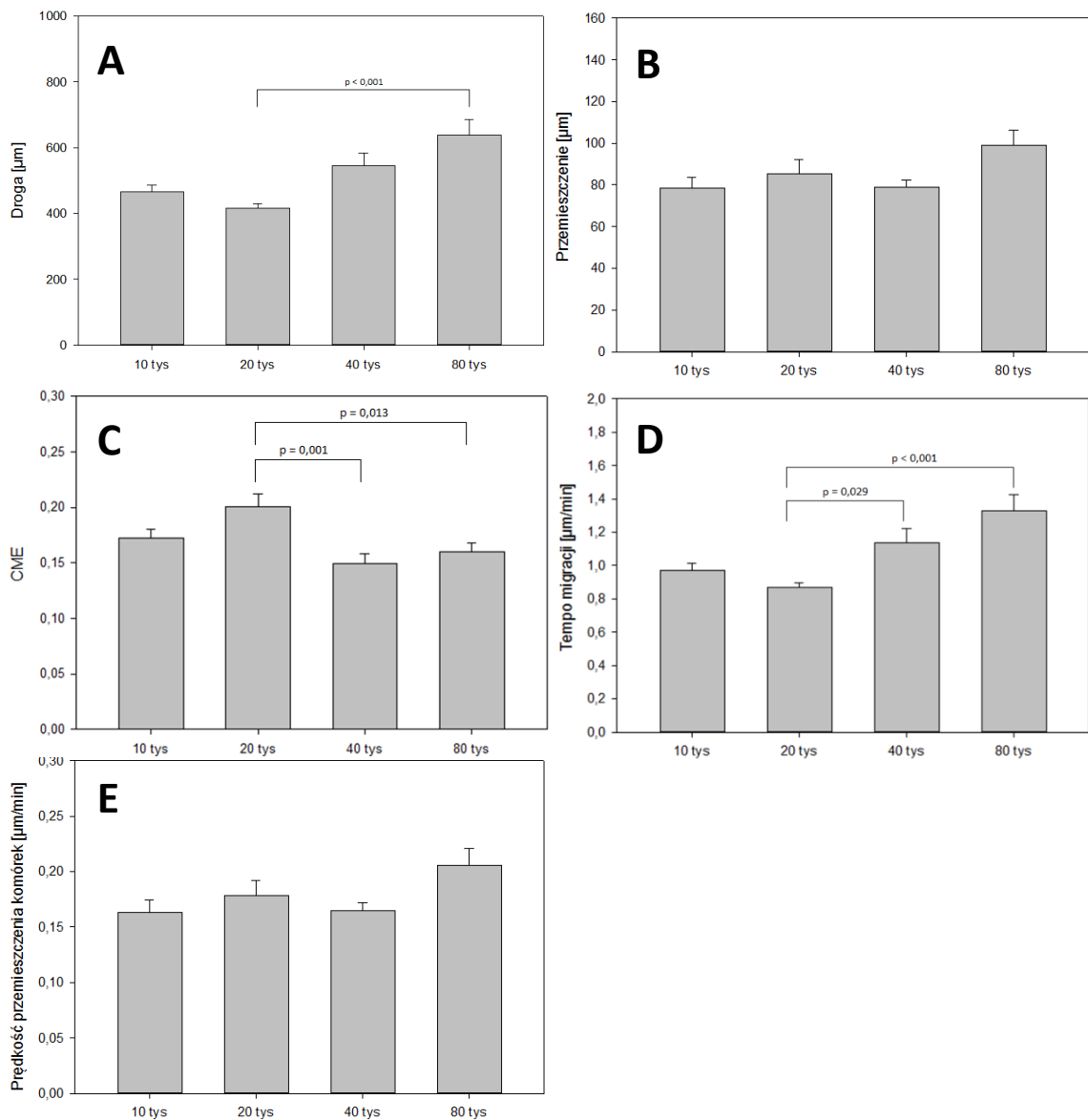
Ryc. 10. *Tempo zarastania powierzchni rysy w czasie. Zaznaczono wartości średnie ± odchylenie standardowe z wyznaczoną linią trendu ($R^2 = 0,98$).*

Na ryc. 11 przedstawiono trajektorie ruchu pojedynczych komórek BHM Ma wyrażone jako diagramy kołowe. Każda linia to ruch jednej komórki. Zanalizowano trajektorię ruchu 50 komórek z każdego dołka dla każdej gęstości.



Ryc. 11. Trajektoria ruchu komórek BHM Ma wysianych w różnych gęstościach A) 10 tys. komórek, B) 20 tys. komórek, C) 40 tys. komórek, D) 80 tys. komórek. Każda linia odpowiada trajektorii ruchu jednej komórki, na każdym diagramie kołowym wykreślono ruch 150 komórek (3 dolki x 50 komórek).

Analiza ilościowa otrzymanych wyników wykazała, że komórki, które są wysiane w gęstości 80 tys. pokonują istotnie statystycznie dłuższą drogę niż komórki o początkowej gęstości wysiania 20 tys. (Ryc. 12 A). Nie ma istotnych różnic pomiędzy grupami jeśli chodzi o średnie przemieszczenie komórek (Ryc. 12 B) i prędkość przemieszczenia (Ryc. 12 E). Zauważono jednak, że tempo migracji komórek (Ryc. 12 D) i współczynnik CME (Ryc. 12 C) różnią się od siebie istotnie w zależności od gęstości wysiania. Komórki wysiane gęściej (40 i 80 tys./dołek) przemieszczają się o wiele szybciej i mniej prostoliniowo niż komórki wysiane rzadziej (20 tys./ dołek).

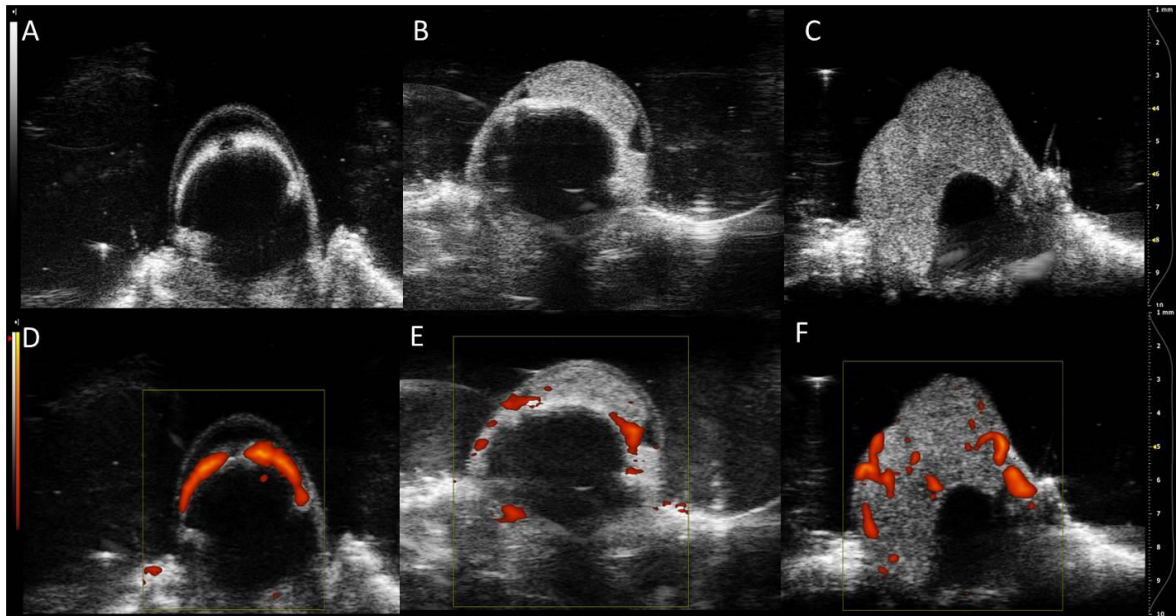


Ryc. 12 Analiza ilościowa parametrów opisujących aktywność migracyjną komórek BHM Ma w zależności od ich gęstości wysiania. A- średnia pokonana droga, B- średnie przemieszczenie, C- Współczynnik wydajności ruchu CME, D- tempo migracji komórek, E- prędkość przemieszczenia komórek. Przedstawiono wartości średnie z analizy ruchu 150 komórek z każdej grupy eksperymentalnej (3 dolki x 50 komórek).

6.2. Obrazowanie unaczynienia guzów pierwotnych

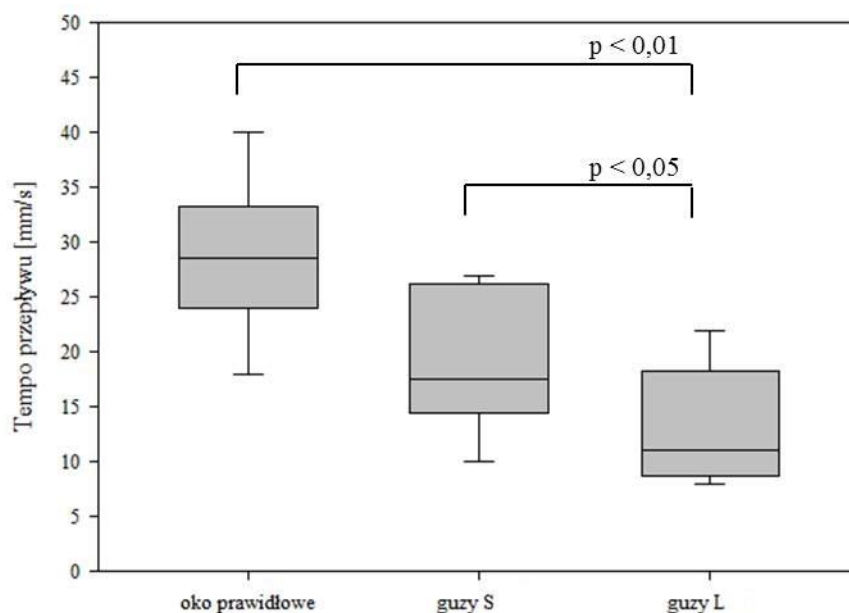
6.2.1 Wraz z rozwojem objętości nowotworu maleje tempo przepływu krwi.

Od dnia rozpoczęcia wzrostu guza codziennie wykonywany był pomiar USG aż do dnia przeprowadzenia enukleacji. Prezentacja w trybie B pokazuje lokalizację guza, jego strukturę oraz rozmiar. Dzięki temu możliwa była ocena, w którym dniu niezbędne jest wykonanie enukleacji. W trybie Power Doppler widoczna jest struktura naczyń krwionośnych. Wykonano analizę rozwoju unaczynienia guza wraz z jego wzrostem. Guzy w początkowej fazie rozwoju, czyli gdy ich objętość była mniejsza niż 3 mm^3 nazwano guzami S (ang. Small) a guzy bardziej rozwinięte ($V \geq 3 \text{ mm}^3$) nazwano guzami L (ang. Large). Ryc. 14 przedstawia obrazy uzyskane przy pomocy obrazowania USG. Na każdym z sześciu obrazów przedstawiony jest środkowy przekrój gałki ocznej. W górnej części panelu znajduje się prezentacja struktury gałki ocznej i guza w trybie B-mode, natomiast w dolnej części panelu pokazane jest unaczynienie w trybie Power Doppler. W pierwszej kolumnie (Ryc.13 A, D) zaprezentowano prawidłową strukturę gałki ocznej z wyraźnie widoczną przednią komorą i źrenicą. W drugiej kolumnie (Ryc. 13 B, E) znajduje się przykład guza S zlokalizowanego w przedniej komorze oka, natomiast w trzeciej kolumnie (Ryc. 13 C, F) znajduje się przykład guza L rozpychającego przednią komorę i naciekającego wewnątrz gałki ocznej.



Ryc. 13 Przekroje gałek ocznych chomików w trybie B (górną część panelu) oraz Power Doppler (dolną część panelu). W pierwszej kolumnie znajdują się przekroje prawidłowej gałki ocznej (A,D), w drugiej gałki z guzem S (B, E), a w trzeciej z guzem L (C,F).

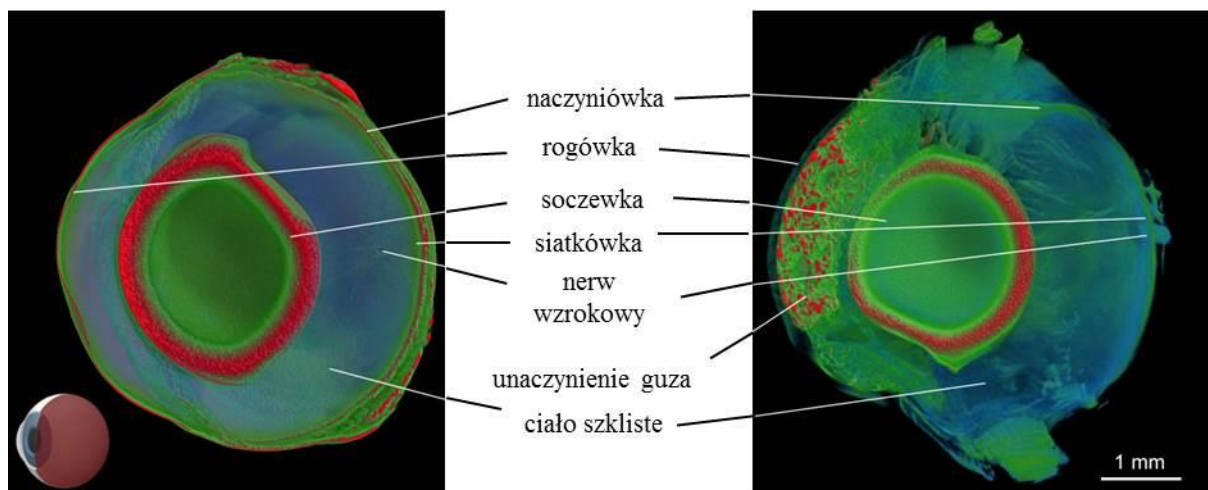
Zmierzono tempo przepływu krwi w oku prawidłowym z w pełni funkcjonalnymi i dobrze zorganizowanymi naczyniami krwionośnymi a otrzymany wynik porównano z tempem przepływu krwi w obrębie guza nowotworowego. Wyniki jednoznacznie wskazują, że **wraz z rozwojem objętości nowotworu maleje tempo przepływu krwi** (Ryc. 14). Nie zaobserwowano różnicy w tempie przepływu pomiędzy guzami S a prawidłowymi gałkami ocznymi. Sugeruje to, że terapia protonowa nie jest odpowiedzialna za spowolnienie przepływu krwi w obrębie guzów. Przyczyną jest zatem najprawdopodobniej coraz gorsza kondycja naczyń wraz ze wzrostem nowotworu - naczynia są chaotyczne, dziurawe i niezorganizowane w sposób hierarchiczny co jest powodem spadku tempa przepływu krwi. Przeprowadzono analizę statystyczną ANOV'a z testem post-hoc Holm-Sidak. Istotności zaznaczono na wykresie.



Ryc. 14. Porównanie tempa przepływu krwi w oku prawidłowym oraz w guzach S i L. Tempo przepływu krwi jest istotnie wolniejsze w guzach L w porównaniu do guzów S i prawidłowych gałek ocznych. Między ramkami pudełka znajduje się 1 i 3 kwartył, linią prostą wewnątrz pudełka oznaczona jest mediana, słupkami błędów zaznaczono odpowiednio maksimum i minimum.

6.2.2 Wraz z rozwojem objętości nowotworu stosunek powierzchni naczyń do objętości guza utrzymuje się na stałym poziomie.

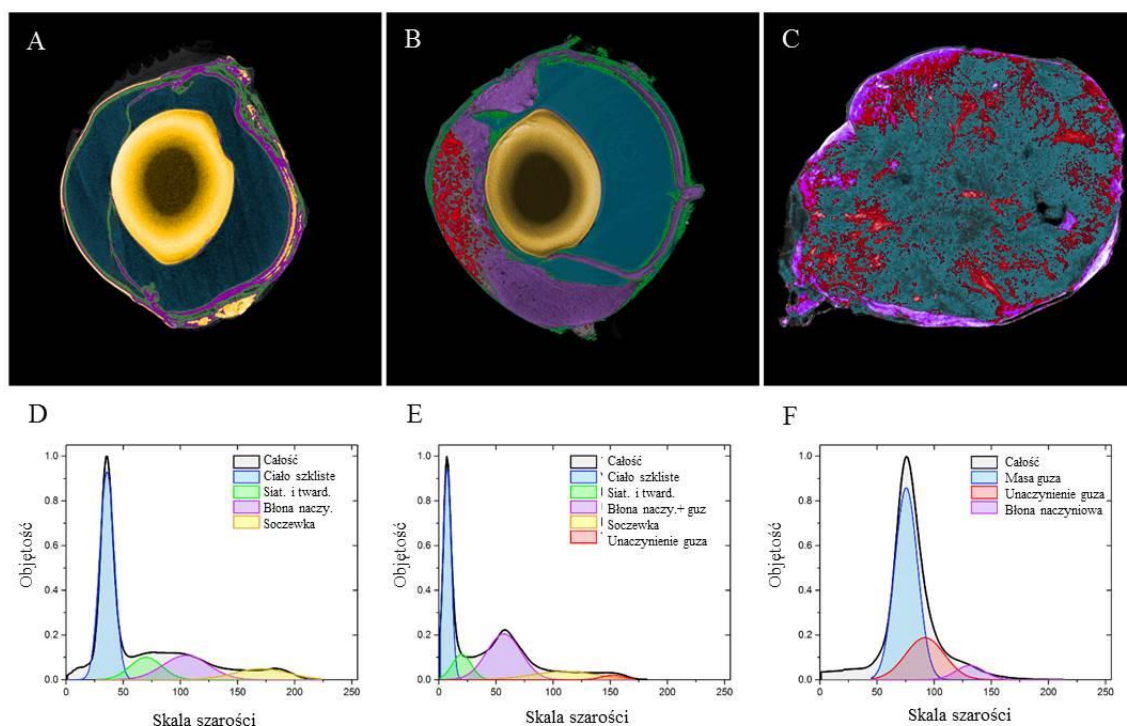
Zastosowana metoda wybarwienia gałek ocznych roztworem płynu Lugola jest wydajną techniką zwiększania kontrastu tkanek miękkich obrazowanych przy pomocy micro-CT. Na ryc. 15 po lewej stronie umieszczono wirtualny przekrój prawidłowej gałki ocznej w miejscu największej średnicy przy cięciu wertykalnym. Połączenie wybarwienia oka z odpowiednią obróbką koloru poprzez transfer koloru funkcją RGB, umożliwia rozróżnienie poszczególnych struktur anatomicznych oka tak jak zaznaczono na ryc. 15. Po prawej stronie ryciny widoczny jest przykład guza S rosnącego w przedniej komorze oka, w obrębie którego można wyróżnić sieć naczyń krwionośnych.



Ryc. 15. Reprezentatywne obrazy przekroju gałek ocznych uzyskanych dzięki micro-CT. Po lewej stronie ryciny znajduje się prawidłowe oko chomika syryjskiego, po prawej oko z guzem S zlokalizowanym w przedniej komorze. Kolor niebieski reprezentuje małe osłabienie promieniowania X, kolor zielony średnie osłabienie, natomiast kolor czerwony duże osłabienie promieniowania X przy przejściu przez gałkę oczną. Modele są wirtualnie przecięte w płaszczyźnie strzałkowej, jak zaznaczono w lewym dolnym rogu.

Porównano obrazy micro-CT prawidłowej gałki ocznej chomika (ryc. 16 A), gałki z guzem BHM Ma typu S (ryc. 16 B) oraz typu L (ryc. 16 C) w przedniej komorze oka. Obrazowanie umożliwia rozróżnienie wszystkich prawidłowych struktur oka (ryc. 16 A) a także tkanki nowotworowej wraz z jej unaczynieniem (ryc. 16 B). W większości przypadków odległość między naczyniami krwionośnymi w obrębie nowotworu wynosiła między 10 a 90 μm . W jednej ze zmierzonych gałek odległości między naczyniami były zdecydowanie większe i wynosiły do 180 μm . Na ryc. 16 C wyraźnie widoczne są olbrzymie masy guza, które rozrosły się w głębi gałki ocznej. W przeciwieństwie do ryc. 16 A i 16 B nie jest widoczna soczewka, która prawdopodobnie wypłynęła z gałki ocznej w wyniku jej uszkodzenia. **Sieć unaczynienia zarówno w guzie S jak i L jest bardzo gęsta zwłaszcza w zewnętrznych regionach guza. Unaczynienie zajmuje średnio 38% objętości guzów.** W guzach wyróżnić można również znaczne obszary nieunaczynione. Naczynia znajdujące się w obrębie guzów BHM Ma są bardzo nieregularne i niezorganizowane w sposób hierarchiczny- ich długość i szerokość zmienia się chaotycznie

a funkcjonalność jest zaburzona z powodu obecności przeciekających regionów w naczyniach. Zakres szerokości zmierzonych naczyń krwionośnych waha się w zakresie od 10 do 120 μm . Górna wartość może być jednak zaburzona poprzez zakwalifikowanie dwóch oddzielnych nieprawidłowych naczyń krwionośnych położonych bardzo blisko siebie jako jedno. Odległość między poszczególnymi naczyniami krwionośnymi była również bardzo heterogenna - od 10 aż do 720 μm w skrajnych przypadkach. Jednakże w większości odległość pomiędzy poszczególnymi naczyniami krwionośnymi wynosiła od 100 do 300 μm . Histogramy poziomej szerokości (ryc. 16 D-F) pokazują udział poszczególnych struktur w całej objętości próbek. Wyraźnie widoczne są różnice w histogramach dla prawidłowej gałki ocznej (ryc. 16 D), gałki z guzem S (ryc. 16 E) oraz gałki z guzem L (ryc. 16 F). Istotną statystycznie różnicę potwierdzono nieparametrycznym testem U'Manna-Whitney'a ($p = 0,005$). Do histogramów dopasowane są funkcje Gaussa, których parametry znajdują się w Tab. 7. Każda dopasowana krzywa odpowiada poszczególnym strukturom zidentyfikowanym w próbkach.



Ryc. 16. Analiza ilościowa obrazów uzyskanych przy pomocy micro-CT. W pierwszym wierszu ryciny przedstawione są pojedyncze przekroje trójwymiarowych obrazów dla: gałki prawidłowej (A), gałki z guzem S (B) oraz L (C). W wierszu dolnym znajdują się korespondujące z nimi histogramy. Dopasowane krzywe Gaussa umożliwiają identyfikację poszczególnych struktur takich jak ciało szkliste, siatkówka (siat.), twardówka (tward.) czy guz oraz jego unaczynienie.

Na ryc. 16 D obserwujemy szeroką dystrybucję skali szarości w zakresie od 20 do 200 jednostek. Wyraźnie można jednak oddzielić trzy obszary: ciało szkliste (kolor niebieski), soczewkę (kolor żółty) i pozostałe prawidłowe tkanki oka (na zielono zaznaczono pik pochodzący od siatkówki i twardówki natomiast na różowo pik od błony naczyniowej). Analiza ilościowa obrazu uzyskanego dzięki micro-CT guza S (ryc. 16 E) wykazała mniejszy zakres skali szarości (od 0 do 170 jednostek) z nieco mniejszą ilością ciała szklistego za to z wyraźnie powiększoną objętością guza i błony naczyniowej (pik pochodzący od obu struktur zaznaczono na różowo). Kształt histogramu guza L (ryc. 16 F) jest odmienny od histogramu wykreślonego dla guza S. Zakres skali szarości jest jeszcze mniejszy (od 50 do 150 jednostek) i nie widać struktur prawidłowych, które były widoczne zarówno w gałce prawidłowej jak i w gałce z guzem S. Dopasowanie funkcji Gaussa do histogramów umożliwia ilościowe

porównanie procentu powierzchni zajmowanego przez ciało szkliste, siatkówkę, twardówkę, błonę naczyniową, soczewkę, masę guza i jego unaczynienie (Tab. 2).

Wyliczony na podstawie obrazów micro-CT procent naczyń krwionośnych w objętości guza wynosi odpowiednio 6,42 % (w guzach S) i 37,28% (w guzach L). Liczba naczyń krwionośnych waha się w zakresie od 35 do 46 na mm² w guzach S i od 13 do 17 na mm² w guzach L. Ilościowe wyniki zebrano w Tab. 3. Porównano je z wynikami otrzymanymi przy pomocy USG. Przy pomocy tej metody procent naczyń krwionośnych w objętości guza wynosi odpowiednio 30,21 % (w guzach S) i 19,24 % (w guzach L). Liczba naczyń krwionośnych waha się w zakresie od 9 do 21 na mm² w guzach Si od 2 do 10 na mm² w guzach L.

	Ciało szkliste		Siatkówka i twardówka		Błona naczyniowa		Soczewka		Unaczynienie guza		Masa guza	
	$x_c \pm SD$ [g.l.]	Powierzchnia względna [%]	$x_c \pm SD$ [g.l.]	Powierzchnia względna [%]	$x_c \pm SD$ [g.l.]	Powierzchnia względna [%]	$x_c \pm SD$ [g.l.]	Powierzchnia względna [%]	$x_c \pm SD$ [g.l.]	Powierzchnia względna [%]	$x_c \pm SD$ [g.l.]	Powierzchnia względna [%]
Prawidłowa gałka oczna	36 ± 6	56	70 ± 14	13	105 ± 20	20	171 ± 24	11	-	-	-	-
Guzy S	7 ± 4	39	20 ± 8	11	57 ± 15	36	110 ± 28	12	153 ± 10	2	-	-
Guzy L	75 ± 10	68	-	-	-	-	-	-	92 ± 17	26	131 ± 12	6

Tab. 2. Parametry funkcji Gaussa dopasowane do histogramów skali szarości dla prawidłowej gałki ocznej oraz gałki z guzami S i L. Wyniki przedstawione są jako wartości średnie (x_c) ± odchylenie standardowe (SD). Powierzchnia względna była wyliczona jako procent danego piksu do całkowitej powierzchni. (*) oznaczają jednakowe wybarwienie błony naczyniowej i masy guza przez co niemożliwe było ich rozróżnienie.

	Gęstość unaczynienia obliczona na podstawie:		Objętość unaczynienia guza wyrażona jako procent całego guza	
	micro- CT	USG	micro-CT	USG
Guzy S	35 - 46 / mm ²	9 - 21 / mm ²	6,42 %	30,21 %
Guzy L	13 - 17 / mm ²	2 - 10 / mm ²	37,28 %	19,24 %

Tab.3. Porównanie gęstości unaczynienia i jej objętości w guzach S i L przy pomocy micro-CT komputerowej oraz USG.

6.3. Optymalizacja stężenia witaminy D podawanej chomikom syryjskim

Wszystkie zwierzęta, którym dootrzewnowo podano wysoką dawkę witaminy D zachowywały się nadpobudliwie i agresywnie. Zwierzęta przebywały w zwierzętarni od ponad 18 miesięcy przed rozpoczęciem eksperymentu, opiekowały się nimi zawsze te same osoby i nigdy nie zauważono agresywnego zachowania wobec opiekunów. Zmieniło się to po podaniu 200 nM (0,717 $\mu\text{g}/\text{kg}$) witaminy D. Waga zwierząt nie uległa zmianie przez cały okres trwania eksperymentu (Tab. 4).

Przeprowadzane badanie post mortem wykazało, że zarówno u zwierząt z grupy kontrolnej jak i u zwierząt, którym podano 50 nM (0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$) witaminy D nie ma widocznych makroskopowo zmian w organach wewnętrznych. Jednakże u zwierząt, którym podano 200 nM kalcytriolu, na wątrobie widoczne były cysty. Nie zaobserwowano różnic w masie wątrób pomiędzy poszczególnymi grupami eksperymentalnymi (Tab. 4).

Witamina D [nM]	Numer zwierzęcia	Masa [g]	Zmiana zachowania	Zmiany na wątrobach	Masa wątroby [mg]
0	8516	111,9	0	0	5950,3
	2866	138,5	0	0	7195,6
	8550	121,5	0	0	6109,7
	3160	118,4	0	0	5839,0
50	3153	114,7	0	0	5515,5
	8580	122,0	0	0	7151,8
	2795	117,7	0	0	5036,9
	8214	108,2	0	0	6311,4
200	3158	122,4	1	1	5641,4
	8572	117,8	1	1	5970,0
	3157	109,9	1	1	6358,7
	3152	115,2	1	1	5248,2

Tab. 4. Zebrane informacje na temat wagi i zachowania zwierzęcia oraz zmiany w wyglądzie i wadze wątrób pobranych w czasie badania post mortem. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w masie zwierząt pomiędzy poszczególnymi grupami eksperymentalnymi. Wyraźnie widoczna jest zależność między zachowaniem zwierzęcia a obecnością cyst na wątrobie- zwierzęta, którym podano 200 nM kalcytriolu stawały się bardziej agresywne oraz miały obecne na wątrobie cysty. Obecność cyst nie wpłynęła na średnią masę wątrób w poszczególnych grupach eksperymentalnych (ANOVA jednoczynnikowa).

Wykonano również analizę biochemiczną pobranej od zwierząt krwi. Nie wykazano zmian pomiędzy grupami w poziomie wapnia, magnezu oraz fosforu. Przeprowadzono także badanie morfologiczne - wszystkie oznaczone parametry miały wartości prawidłowe. Standardowy test na określenie stężenia witaminy D w organizmie, który polega na wyznaczeniu stężenia kalcyfediolu (25(OH)D₃) nie wykazał istotnych statystycznie różnic u chomików po jednorazowym podaniu witaminy D bez względu na dawkę (Tab. 3). Sprawdzono toksyczny efekt kalcytriolu na

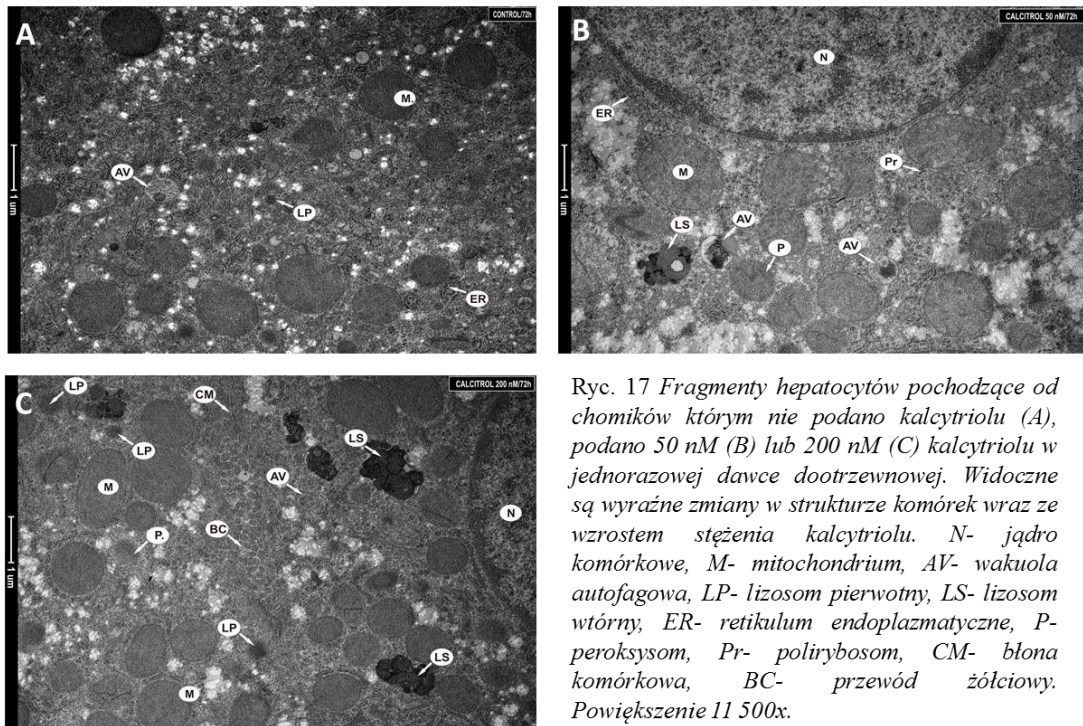
wątrobę poprzez określenie stężenia trzech enzymów wątrobowych: aminotransferazy alaninowej (ALT), aminotransferazy asparaginianowej (AST) oraz transpeptydazy gamma-glutamylowej (GGTP). Zaobserwowano istotny statystycznie, podwyższony poziom AST u zwierząt po podaniu witaminy D w dawce 200 nM. Widoczna jest również tendencja do wzrostu poziomu ALT, jednak nie w sposób istotny statystycznie (Tab. 5). Otrzymane wyniki wskazują na zwiększoną pracę wątroby chomików, którym podano witaminę D. Jednorazowe podanie nawet wysokiej dawki witaminy D nie wpływa natomiast na wzrost stężenia poziomu wapnia.

Witamina D [nM]	Kalcyfediol [ng/ml]	ALT [U/l]	AST [U/l]	GGTP [U/l]	Wapń [mg/dl]
0	16,33 ± 1,49	38,00 ± 2,04	41,5 ± 5,61	1,25 ± 0,47	13,97 ± 0,47
50	14,96 ± 1,11	42,75 ± 10,11	55,5 ± 9,45	0,75 ± 0,75	13,80 ± 0,42
200	15,23 ± 2,34	43,25 ± 4,76	99,25 ± 28,4 (*)	0,5 ± 0,29	14,53 ± 0,61

Tab. 5. Analiza poziomu kalcyfediolu oraz enzymów wątrobowych w poszczególnych grupach eksperymentalnych. W tabeli przedstawiono średnie ± odchylenie standardowe. Wartości istotnie różne od kontroli oznaczono (*) (ANOVA, $p < 0,05$). ALT- aminotransferaza alaninowa, AST- aminotransferaza asparaginianowa, GGTP- transpeptydaza gamma-glutamylowa.

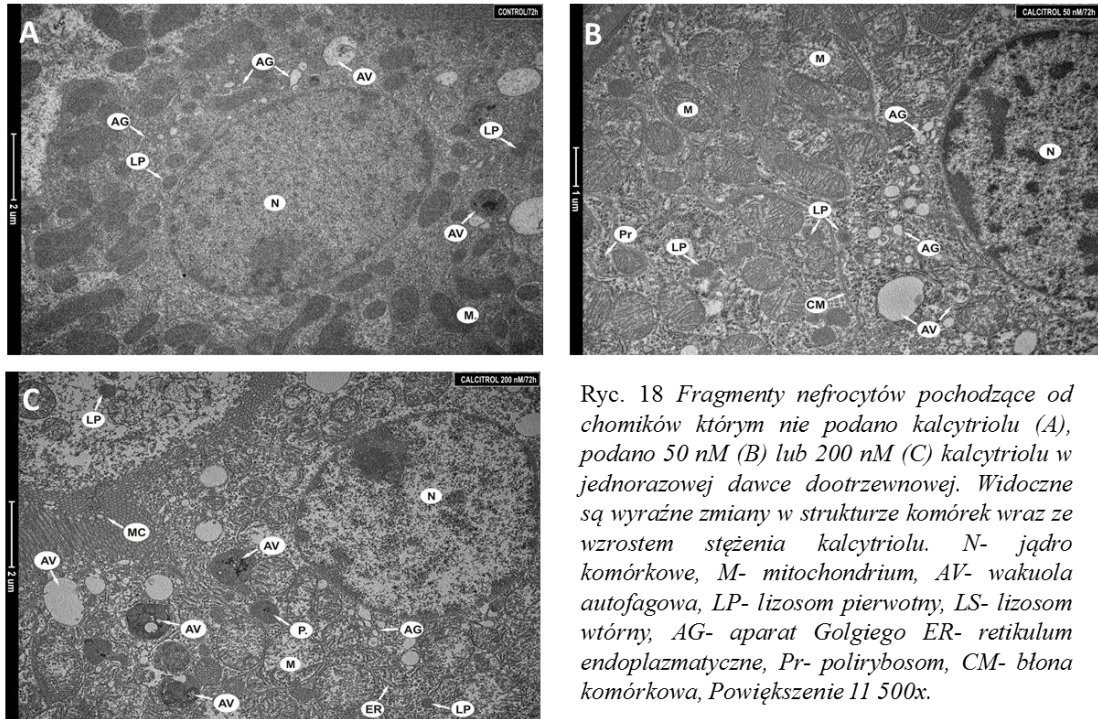
Pobrane podczas sekcji tkanki oglądano pod mikroskopem elektronowym. Nie zaobserwowano żadnych zmian w strukturze organelli hepatocytów zwierząt z grupy kontrolnej. Jądra komórkowe, cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, lizosomy, wakuła i mitochondria miały prawidłową wielkość i strukturę (Ryc. 17 A). Hepatocyty zwierząt, którym podano 50 nM witaminy D, wyglądały inaczej niż te pochodzące z grupy kontrolnej. Zaobserwowano wyraźny wzrost rozmiaru i liczby mitochondriów, a także rozrost pęcherzyków lizosomalnych. Ponadto pojawiły się pojedyncze wakuole autofagowe (Ryc. 17 B). Do jeszcze większych zmian doszło w obrębie hepatocytów zwierząt, którym podano 200 nM witaminy D. Ich mitochondria były nie tylko liczniejsze i większe, ale również zmieniona była ich struktura. Często mitochondria były otoczone błoną retikulum endoplazmatycznego, co wskazuje na

postępującą wakuolizację. Widoczny był również wzrost ilości lizosomów oraz liczne wakuole autofagowe (Ryc. 17 C).



Ryc. 17 Fragmenty hepatocytów pochodzące od chomików którym nie podano kalcytriolu (A), podano 50 nM (B) lub 200 nM (C) kalcytriolu w jednorazowej dawce dootrzewnowej. Widoczne są wyraźne zmiany w strukturze komórek wraz ze wzrostem stężenia kalcytriolu. N- jądro komórkowe, M- mitochondrium, AV- wakuola autofagowa, LP- lizosom pierwotny, LS- lizosom wtórny, ER- retikulum endoplazmatyczne, P- peroksyosom, Pr- polirybosom, CM- błona komórkowa, BC- przewód żółciowy. Powiększenie 11 500x.

Dootrzewnowe podanie witaminy D wpłynęło również na strukturę nerek. Struktura komórek nerkowych, którym nie podano kalcytriolu była prawidłowa, tzn. rozmiar i struktura jądra, aparatu Golgiego, mitochondriów, pęcherzyków lizosomalnych i wakuoli nie odbiegała od normy (Ryc. 18 A). Po podaniu małej dawki witaminy D (50 nM) zaobserwowano wzrost liczby i rozmiaru mitochondriów oraz rybosomów. Pojawiły się również pojedyncze wakuole autofagowe (Ryc. 18 B). Największe zmiany w strukturze komórek nerkowych zaobserwowano po podaniu dużej dawki witaminy D (200 nM). Liczne mitochondria, wakuole autofagowe oraz pęcherzyki lizosomalne były znacząco powiększone w porównaniu do zarówno grupy kontrolnej jak i grupy eksponowanej na małą dawkę witaminy D (Ryc. 18 C).



Ryc. 18 Fragmenty nefrocytów pochodzące od chomików którym nie podano kalcytriolu (A), podano 50 nM (B) lub 200 nM (C) kalcytriolu w jednorazowej dawce dootrzewnowej. Widoczne są wyraźne zmiany w strukturze komórek wraz ze wzrostem stężenia kalcytriolu. N- jądro komórkowe, M- mitochondrium, AV- wakuola autofagowa, LP- lizosom pierwotny, LS- lizosom wtórny, AG- aparat Golgiego ER- retikulum endoplazmatyczne, Pr- polirybosom, CM- błona komórkowa, Powiększenie 11 500x.

6.4. Wzrost guzów po implantacji skrawków BHM Ma do przedniej komory oka.

Wzrost guza po implantacji skrawka tkanki BHM Ma do przedniej komory oka chomików obserwowano u 49% zwierząt. Zwierzęta przypisano losowo do poszczególnych grup eksperymentalnych. Grupę oznaczoną jako „kontrola” stanowią zwierzęta, które nie były poddawane żadnej procedurze terapeutycznej. Zwierzęta z grup 6, 10, 20, 30 Gy miały guzy napromieniane wiązką protonów o określonej energii. Chomiki przypisane do grupy „Avastin” miały podawany lek antyangiogeny (bewacizumab, Avastin®) bezpośrednio do przedniej komory. Zwierzęta przed tą procedurą były usypiane mieszaniną ketaminy (0,1ml) i ksylazyny (0,2 ml). W grupie „Avastin + 10 Gy” zwierzętom podawano lek antyangiogeny, jak zwierzętom z grupy „Avastin”, natomiast po 24h dodatkowo napromieniano je wiązką protonów w dawce 10 Gy. Części zwierząt podawano dootrzewnowo 50nM witaminy D (grupa „Witamina D”), a następnie po 24h napromieniano je wiązką protonów w dawce 10 Gy (grupa „Witamina D + 10 Gy”).

W czasie trwania eksperymentu zauważono, że kinetyka wzrostu guzów jest zmienna. W pierwszych dniach od implantacji skrawków obserwowano ich pozorny

zanik, a dopiero później rozpoczęcie wzrostu guza. Zauważono duży rozrzut dni, w których rozpoczynał się wzrost guza, dlatego wykluczono z dalszej analizy chomiki, u których guz wzrastał wyjątkowo wcześniej tj. szybciej niż w piątym dniu od implantacji lub później niż w czternastym dniu.

Wzrost guzów był na tyle dynamiczny, że pojawiła się również duża zmienność w wielkości guza w momencie wykonywania procedury terapeutycznej. Dokonano więc dalszego podziału ze względu na wielkość guza w dniu wykonywania terapii (guzy S i guzy L). W tabeli poniżej (Tab.6) zebrano podsumowanie podziału i kwalifikacji poszczególnych zwierząt.

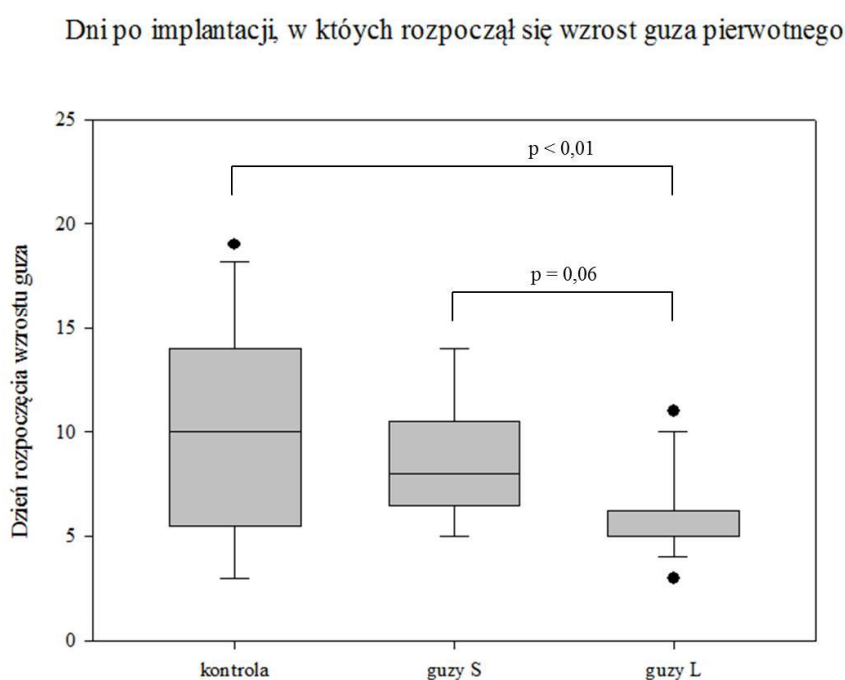
Grupa eksperymentalna	Liczba (N)	Wielkość guza w momencie terapii	
		S ($V < 3 \text{ mm}^3$)	L ($V \geq 3 \text{ mm}^3$)
kontrola	17	ND ^(*)	ND ^(*)
6 Gy	6	5	1
10 Gy	11	3	6
20 Gy	6	1	5
30 Gy	8	0	8
Avastin	9	6	2
Avastin + 10 Gy	7	4	3
Witamina D	7	5	2
Witamina D + 10 Gy	1	1	0

Tab. 6. Podział zwierząt do poszczególnych grup eksperymentalnych ze względu na rodzaj terapii oraz wielkość guza w momencie wykonywania terapii. Zwierzęta przydzielano do grup losowo. Średnia wydajność implantacji wyniosła 49%. S- guz, którego objętość wynosiła mniej niż 3 mm^3 w momencie przeprowadzania terapii, L- guz, którego objętość wynosiła więcej lub równo 3 mm^3 , ^(*) ND- nie dotyczy.

Całkowita liczba guzów nie zawsze jest równa sumie liczb guzów podzielonych na wielkość w momencie wykonania terapii, ponieważ zdarzały się przypadki,

w których niezbędne było wykonanie enukleacji przed przeprowadzeniem terapii lub zwierzęta nie wybudzały się z anestezji niezbędnej do przeprowadzenia terapii.

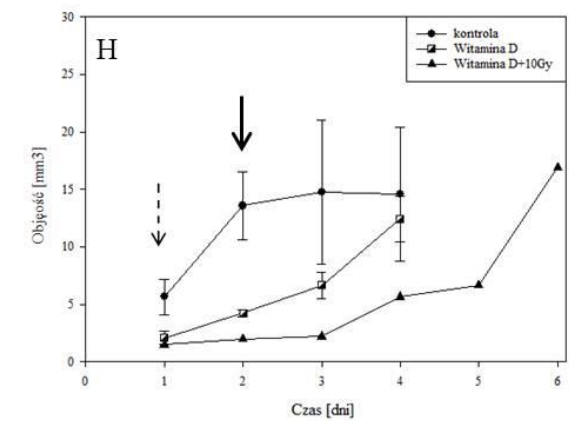
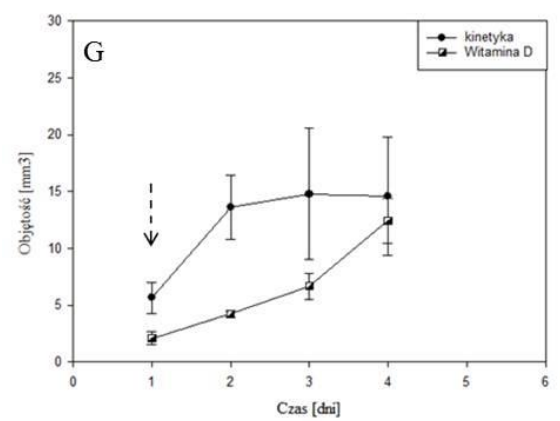
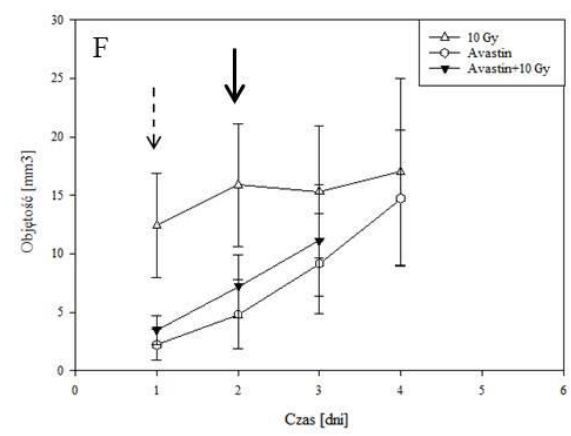
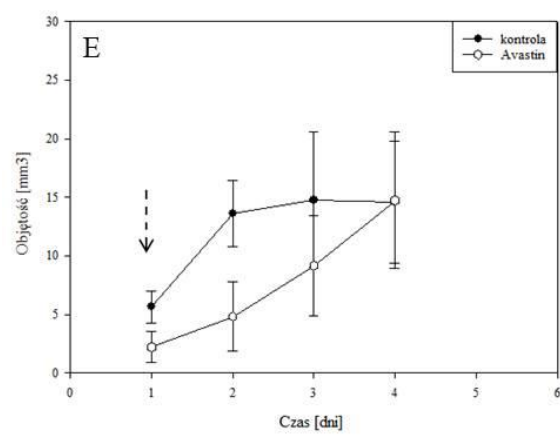
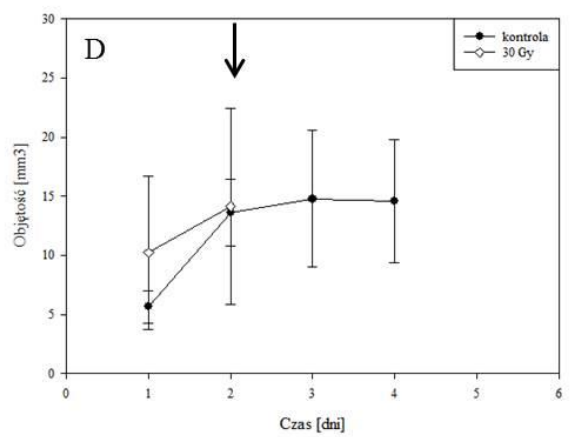
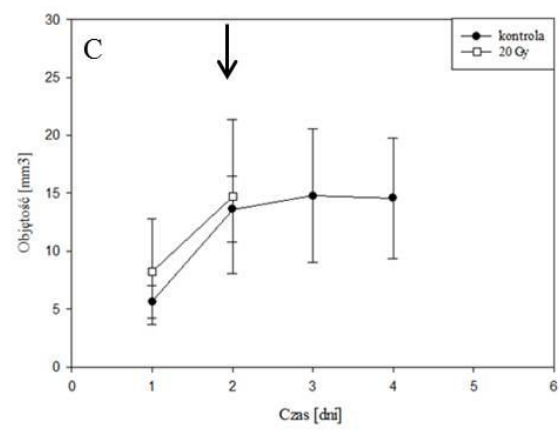
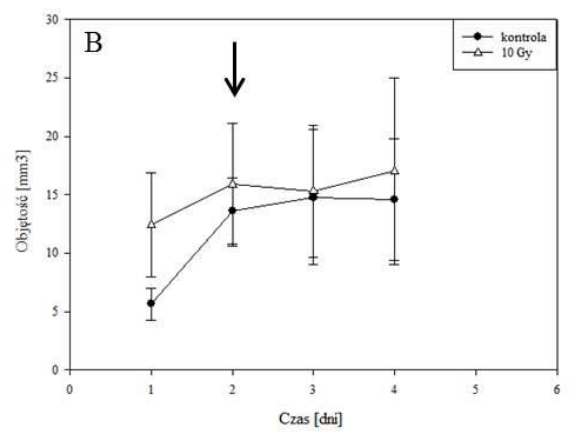
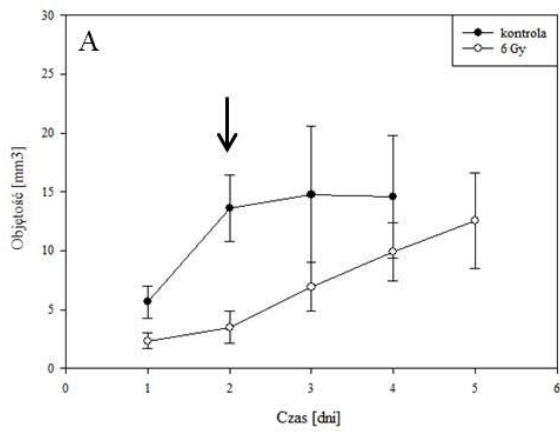
Zaobserwowano, że guzy, które zakwalifikowano jako duże w momencie terapii (guzy L), pojawiają się o wiele szybciej, niż guzy nietraktowane oraz niż guzy S. Sugeruje to, że guzy te wyrastały ze skrawków, w których większy był odsetek żywych komórek nowotworowych. Na Ryc.19 przedstawiono rozrzut dni, w których doszło do rozpoczęcia wzrostu guzów z podziałem na guzy kontrolne, guzy S i L. Przeprowadzono analizę statystyczną ANOVA z testem post-hoc Dunn's. Istotności zaznaczono na wykresie.



Ryc. 19. Rozrzut dni, w których obserwowano rozpoczęcie wzrostu guzów kontrolnych oraz guzów S i L. Guzy L pojawiały się szybciej niż guzy kontrolne i guzy S. Między ramkami pudełka znajduje się 1 i 3 kwartył, linią prostą wewnątrz pudełka oznaczona jest mediana, słupkami błędów zaznaczono odpowiednio maksimum i minimum a kropki to skrajne wartości odstające.

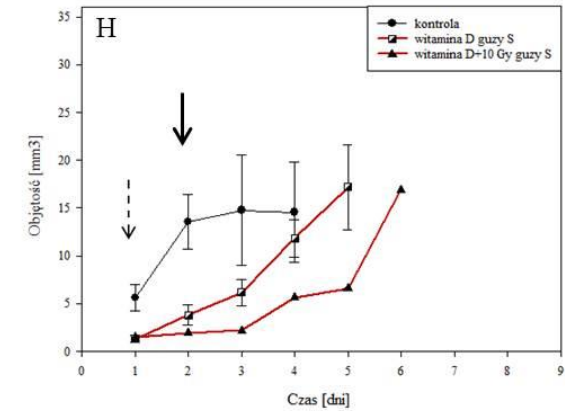
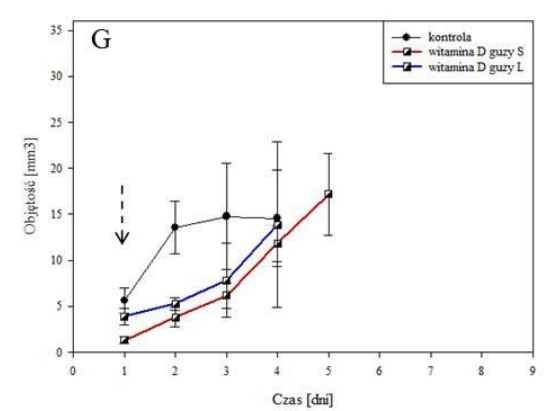
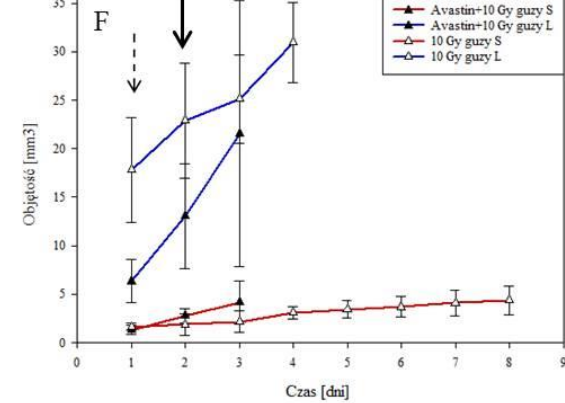
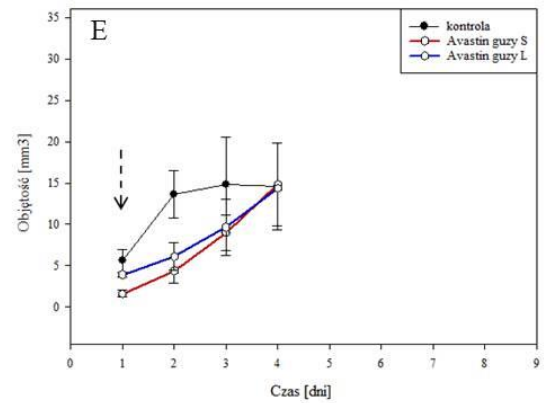
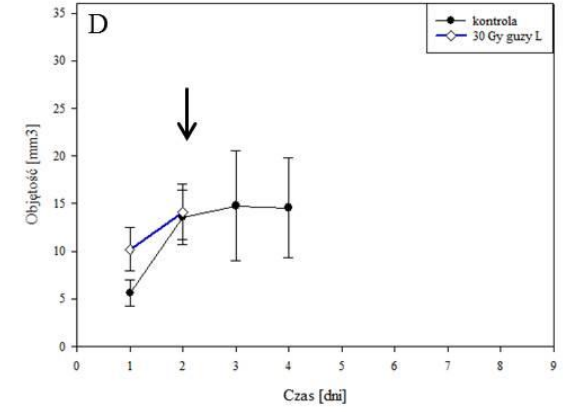
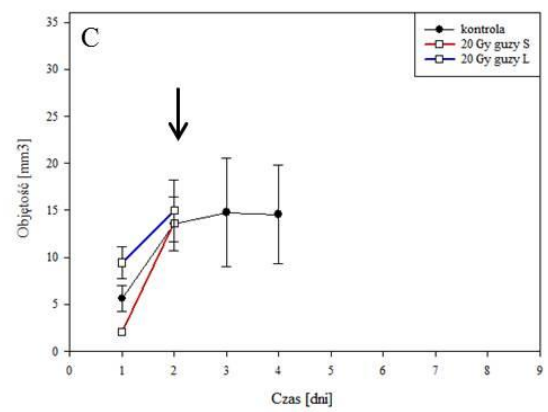
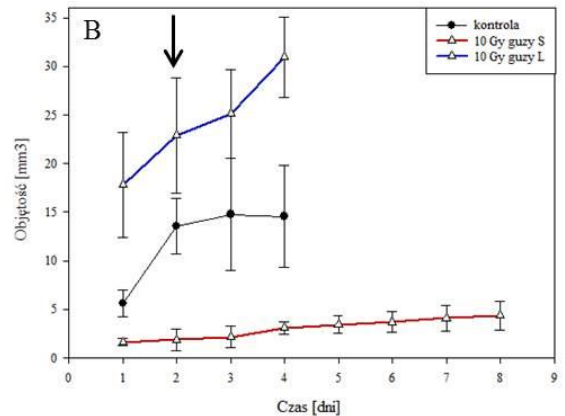
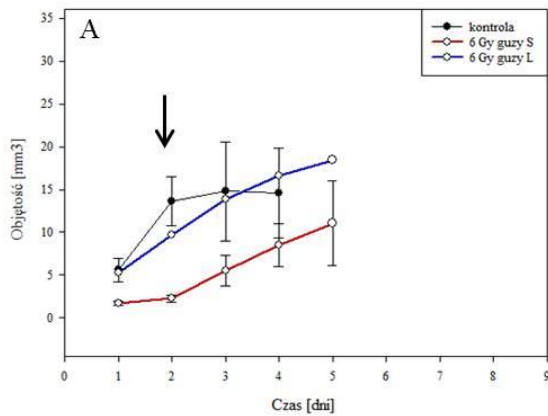
6.5. Odpowiedź czerniaka zlokalizowanego w gałce ocznej chomików na napromienianie wiązką protonów

Kinetyki wzrostu guzów przedstawiono na podstawie pomiarów USG. Guzy kontrolne uzyskiwały objętość 15 mm^3 , co jest w przybliżeniu równe objętości przedniej komory oka chomika, w czwartym dniu od rozpoczęcia wzrostu guza. Gdy przednia komora była wypełniona guzem, wykonywano enukleację. Na ryc. 20 przedstawiono zbiór kinetyk wzrostu guzów dla poszczególnych grup eksperymentalnych. Ciągłą strzałką zaznaczono dzień, w którym wykonywana była terapia protonowa, natomiast przerywaną strzałką zaznaczono dzień, w którym podano odpowiednio lek antyangiogeny (Avastin) lub witaminę D. Na ryc. 20A przedstawiona jest kinetyka wzrostu guza po terapii 6 Gy a na ryc. 20 B po terapii dawką 10 Gy. Po terapii wiązką protonów w jednorazowej dawce 20 i 30 Gy dochodziło do uszkodzenia prawidłowych struktur oka. W związku z tym niezbędne było wykonanie wcześniejszej enukleacji, co tłumaczy obecność tylko dwóch punktów pomiarowych (ryc. 20 C, D). Wynika z tego, że **jednorazowe napromienianie gałki ocznej wiązką protonów w dawce większej lub równej 20 Gy powoduje uszkodzenie prawidłowych struktur oka co wiąże się z bólem i koniecznością przeprowadzenia enukleacji**. Dodatkowo, przerwanie ciągłości struktur prawidłowych zwiększa prawdopodobieństwo przedostania się komórek nowotworowych do krwioobiegu i ich rozsiew do organów dystalnych. Na ryc. 20 E przedstawiono kinetykę wzrostu guzów BHM Ma po podaniu do gałki ocznej leku Avastin. Pomiary guzów po terapii wiązką protonów w dawce 10Gy wzmocnionej Avastinem (ryc. 20 F) kończą się na trzecim pomiarze, pomimo nie osiągnięcia jeszcze zadanej maksymalnej objętości (15mm^3). Jest to spowodowane tym, że chomiki nie przeżywały 4 anestezyj w przeciągu 48 godzin (1× podanie Avastinu, 1× terapia protonowa, 2× USG). Na ryc. 20 H przedstawiono studium przypadku wzrostu guza po terapii wiązką protonów po uprzednim dootrzewnowym podaniu witaminy D. Na rysunku widoczne jest spowolnienie wzrostu guza w porównaniu do kontroli, jednak już po dwóch dniach guz osiągnął objętość maksymalną, dlatego niezbędne było wykonanie enukleacji.



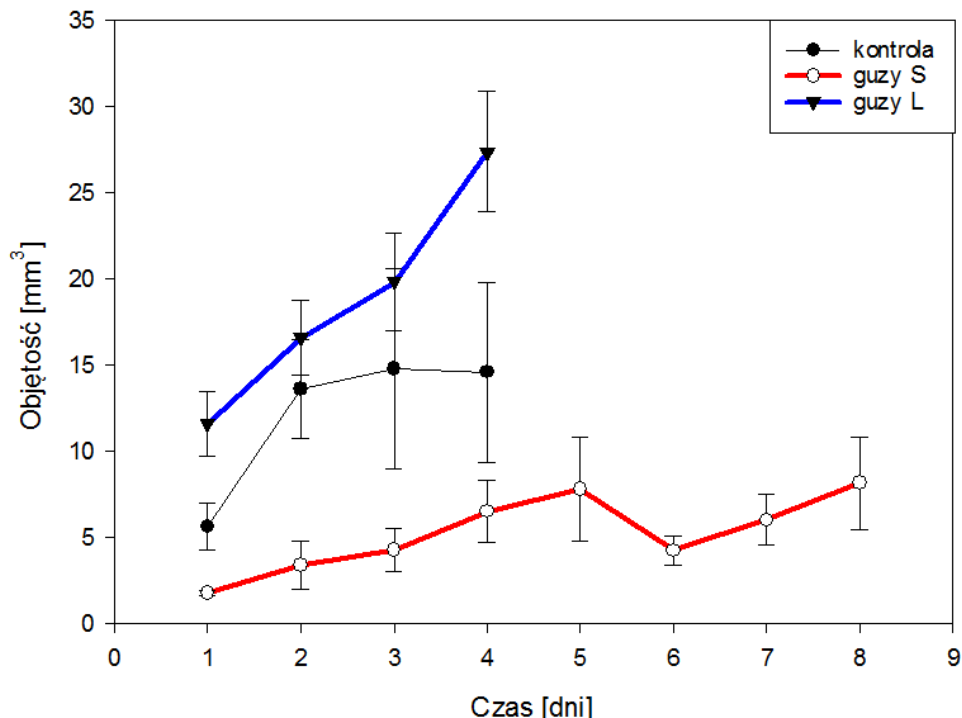
Ryc.20. *Kinetyki wzrostu guzów BHM Ma po terapii protonowej w dawce 6 Gy (A), 10 Gy (B), 20 Gy (C), 30 Gy (D), po terapii lekiem antyangiogennym (E), lekiem antyangiogennym i terapią protonową w dawce 10 Gy (F) oraz po terapii witaminą D (G) i terapii protonowej w dawce 10 Gy wzmocnionej witaminą D (H). Ciągłą strzałką zaznaczono dzień, w którym wykonywano terapię protonową, przerywaną strzałką zaznaczono dzień, w którym podawano lek antyangiogenny lub witaminę D.*

Zauważono, że guzy różniły się wielkością w obrębie każdej grupy eksperymentalnej. Czynnikiem ten miał duży wpływ na odpowiedź guza na zastosowaną terapię. W panelu poniżej (Ryc.21) zebrano kinetyki wzrostu guzów z podziałem na guzy S i L. **Widoczne jest wyraźne zahamowanie wzrostu guzów S dla terapii wiązką protonów w dawce 10 Gy, zarówno samodzielnej jak i wzmocnionej lekiem antyangiogennym** (Ryc. 21 B, F). Słabszy, ale również widoczny efekt spowolnienia wzrostu guza S obserwowano dla terapii protonowej w dawce 6 Gy (Ryc. 21 A). Terapia wiązką protonów w dawce 20 i 30 Gy uszkadza prawidłowe struktury oka chomika, dlatego spowolnienie wzrostu guza pierwotnego nie jest istotne klinicznie (Ryc. 21 C, D). Jednorazowe podanie leku antyangiogennego do przedniej komory oka (Ryc. 21 E) oraz witaminy D dootrzewnowo (Ryc. 21 G) spowolniło wzrost guzów S i L w porównaniu do kontroli. Na Ryc. 21 H przedstawiono studium przypadku, w którym to zwierzęciu z guzem S najpierw dootrzewnowo podano witaminę D a następnie napromieniano wiązką protonów w dawce 10 Gy. U zwierzęcia zaobserwowano spowolnienie wzrostu guza pierwotnego w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak ze względu na zbyt małą liczebność w grupie, wynik nie jest istotny statystycznie.



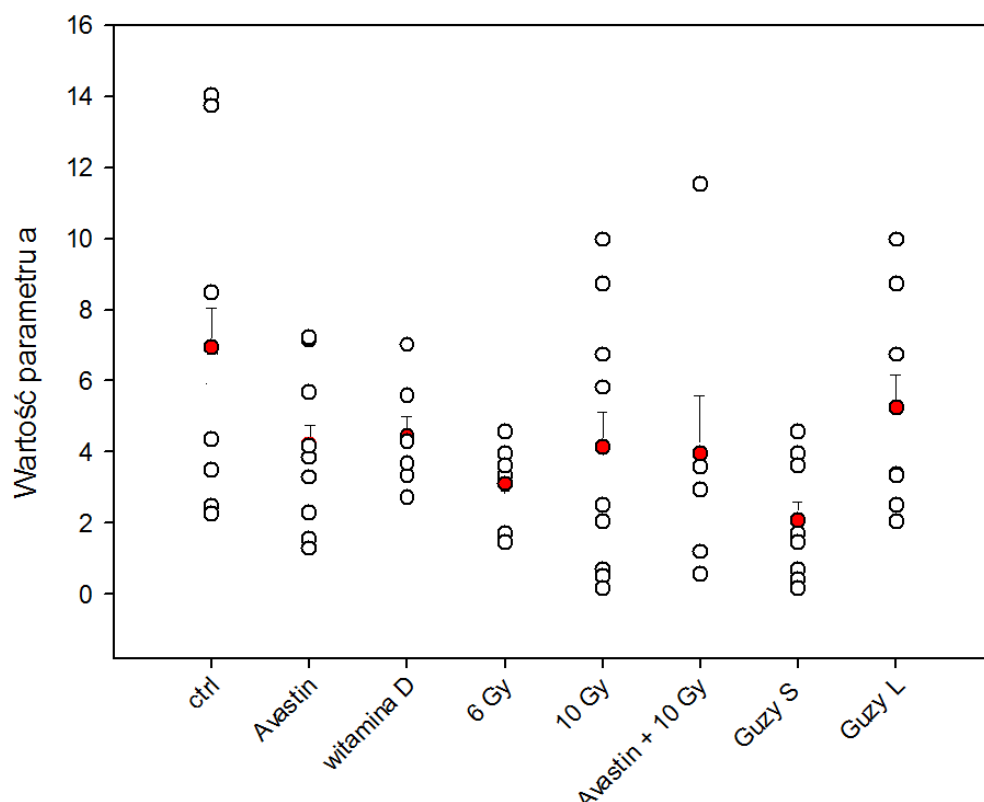
Ryc. 21. Kinytyki wzrostu guzów BHM Ma z podziałem na wielkość guzów w momencie przeprowadzania terapii. Zwierzęta poddano terapii protonowej w dawce 6 Gy (A), 10 Gy (B), 20 Gy (C), oraz 30 Gy (D), terapii lekiem antyangiogennym (E), lekiem antyangiogennym a następnie protonami w dawce 10 Gy (F), witaminą D (G) oraz witaminą D a następnie protonami w dawce 10 Gy (H). Ciąglą strzałką zaznaczono dzień, w którym wykonywano terapię protonową, przerywaną strzałką zaznaczono dzień, w którym podawano lek antyangiogenny lub witaminę D. Guzy S: $V < 3\text{mm}^3$; guzy L: $V \geq 3\text{mm}^3$; N w tab. 4.

Wyniki te ewidentnie wskazują, że wielkość guza w momencie przeprowadzenia terapii ma większe znaczenie niż wariant zastosowanej terapii. Z tego względu, zdecydowano się wyodrębnić grupę z guzami S i guzami L bez względu na rodzaj przeprowadzanej terapii jako osobną kategorię do analizy ilościowej otrzymanych kinytyk wzrostu. Na ryc. 22 Widać, że guzy S rosną zdecydowanie wolniej niż guzy kontrolne oraz guzy L.



Ryc. 22. Guzy S, które poddano terapii protonowej w różnych dawkach rosną zdecydowanie wolniej niż nietraktowane guzy kontrolne i napromieniane guzy L (guzy S zaznaczono czerwoną linią, guzy L niebieską a guzy kontrolne czarną linią).

W celu ilościowego porównania kinetyk wzrostu dla każdej grupy dopasowano do nich linię prostą oraz eksponentę dwuczynnikową. Na ryc. 23 umieszczono rozrzut wartości opisujących tempo wzrostu guzów z poszczególnych grup eksperymentalnych. Na tym etapie z analizy ilościowej zostały wykluczone zwierzęta po terapii 20 i 30 Gy ze względu na zbyt małą liczbę punktów pomiarowych. Wartość średnią dla każdej z analizowanych grup eksperymentalnych zaznaczono czerwonym kółkiem. W celu zwiększenia czytelności wykresu zaznaczono tylko górne słupki błędów od odchylenia standardowego. Na wykresie widoczna jest tendencja do spowolnienia wzrostu guzów po zaproponowanych protokołach terapeutycznych co najmocniej manifestuje się w guzach S, gdzie tempo wzrostu guzów było najmniejsze. Średnia wartość współczynnika dopasowania R^2 wynosiła 0,904.



Ryc.23. Rozkład wartości parametru a po dopasowaniu liniowym do kinetyk wzrostu. Wartość średnią dla każdej z grup oznaczono czerwonym kółkiem + SD (odchylenie standardowe). Widoczna jest tendencja do zmniejszenia szybkości tempa wzrostu guzów.

Dopasowanie liniowe jest jednak sporym uproszczeniem, a co ważniejsze nie bierze pod uwagę zależności od wielkości początkowej. Z tego względu dopasowano do kinetyk wzrostu również funkcję:

$$y = a * \exp (b * x)$$

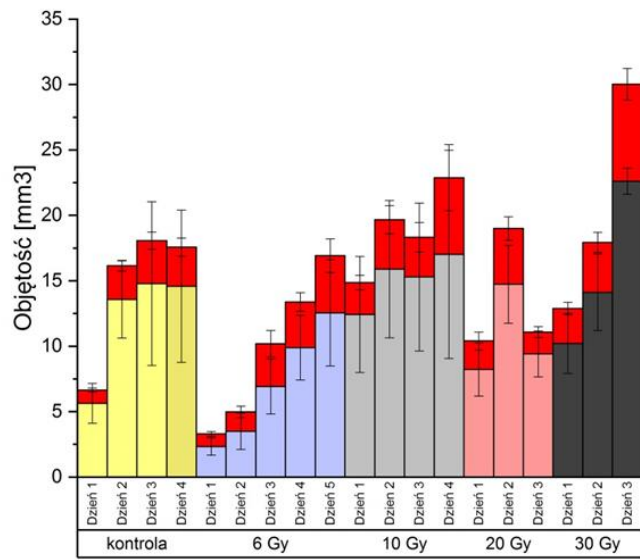
gdzie y to objętość [mm³], x to czas wzrostu guza. Na tej podstawie w programie Matlab wykorzystując nieliniową metodę najmniejszych kwadratów wyznaczono współczynniki a i b opisujące krzywe. Współczynnik a informuje o początkowych warunkach w poszczególnych grupach eksperymentalnych natomiast współczynnik b o tempie wzrostu. W tab. 7 zebrano różnice w parametrze a dla poszczególnych grup eksperymentalnych. Wykazano, że warunki początkowe wzrostu guza pierwotnego były inne dla każdej grupy eksperymentalnej w porównaniu do kontroli. Jest to kolejną przyczyną, która uprawnia nas do podziału guzów na guzy S i L. Analiza parametru b (Tab. 7) wykazała, że guzy po terapii 10 Gy, Avastin + 10 Gy oraz po samodzielnym podaniu witaminy D lub leku Avastin rosną wolniej niż guzy z grupy kontrolnej.

Grupa	$a \pm [SD]$	$b \pm [SD]$
Kontrola	0,124 ± 0,026	0,425 ± 0,019
6 Gy	0,681 ± 0,061	0,440 ± 0,014
10 Gy	2,569 ± 0,123	0,099 ± 0,006
Avastin	0,839 ± 0,108	0,618 ± 0,008
Avastin + 10 Gy	0,895 ± 0,111	0,613 ± 0,035
Witamina D	1,542 ± 0,048	0,618 ± 0,008
Guzy S	0,968 ± 0,054	0,186 ± 0,007
Guzy L	8,723 ± 0,311	0,094 ± 0,008

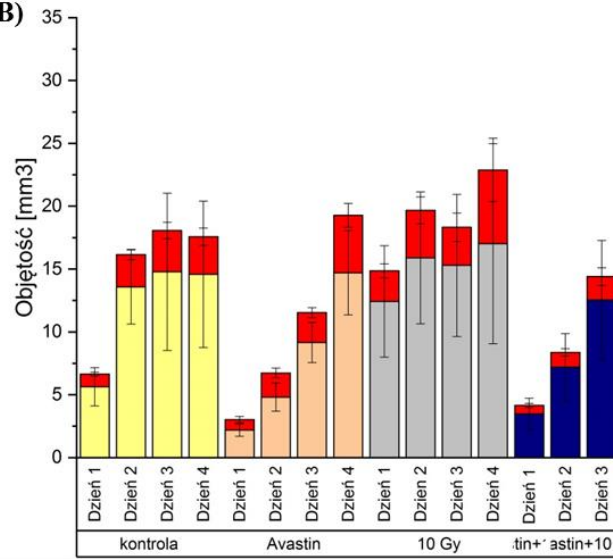
Tab. 7. Analiza wartości parametru a i b obliczonych na podstawie dopasowania eksponent do kinetyk wzrostu dla poszczególnych grup eksperymentalnych. Na czerwono zaznaczono parametry, które różniły się w sposób istotny statystycznie od analogicznych parametrów grupy kontrolnej. SD- odchylenie standardowe.

Wykonane pomiary USG umożliwiły ilościowe zmierzenie tempa wzrostu guza pierwotnego oraz zmiany w rozwoju jego unaczynienia. Na ryc. 24 przedstawiono kinetyki wzrostu guzów dla poszczególnych grup eksperymentalnych- 6, 10, 20 i 30 Gy, z zaznaczoną (na czerwono) częścią powierzchni całkowitej guza, którą tworzą naczynia. Procent jaki stanowią naczynia w całej objętości guza jest niezmienny bez względu na dawkę zastosowanej procedury terapeutycznej i wynosi 24,72 %.

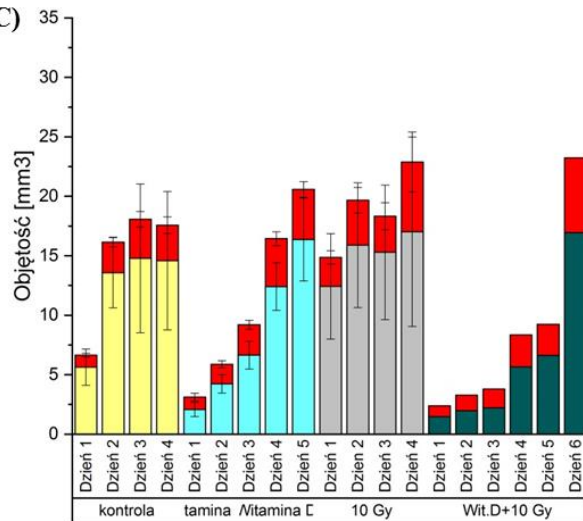
A)



B)

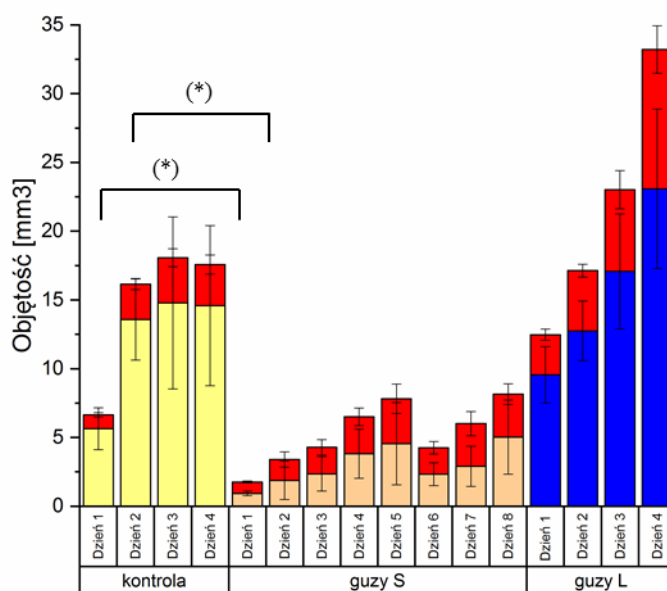


C)



Ryc. 24. Rozwój guzów oraz ich unaczynienia w czasie dla poszczególnych grup terapeutycznych. Czerwoną część każdego ze słupków stanowi unaczynienie nowotworu. Nie ma istotnie statystycznie różnicy w procencie jaki stanowią naczynia w całej objętości guza. A) guzy po terapii protonowej w dawce 6, 10, 20 i 30 Gy; B) guzy po terapii Avastinem i terapią protonową w dawce 10 Gy; C) guzy po terapii witaminą D i terapią protonową w dawce 10 Gy.

Podobną analizę wykonano z uwzględnieniem wielkości guza w momencie wykonywania terapii (Ryc. 25). W pierwszych dwóch dniach po terapii w guzach S unaczynienie zajmowało większy procent objętości guza niż miało to miejsce w grupie kontrolnej. Procent unaczynienia guzów L nie różni się w sposób istotny statystycznie od grupy kontrolnej.



Ryc. 25. Rozwój guzów oraz ich unaczynienia w czasie, z uwzględnieniem wielkości guza w momencie wykonywania terapii. Na czerwono zaznaczono objętość guza, którą stanowią naczynia. (*) $p < 0,05$.

6.6 Analiza średniego czasu przeżycia i lokalizacja przerzutów u zwierząt

6.6.1 Zwierzęta z guzami S przeżywały dłużej niż zwierzęta z guzami L

Zwierzęta po wykonaniu enukleacji były codziennie monitorowane pod kątem ich kondycji. Decyzję o eutanazji zapadała, gdy zwierzę straciło na wadzę więcej niż 20% od dnia implantacji guza, zauważono przyspieszenie oddechu sugerujące przerzuty do płuc lub gdy zwierzę wykazywało oznaki odczuwania bólu. W Tab. 8 zebrano informacje odnośnie obserwacji, które przyczyniły się do decyzji o przeprowadzeniu enukleacji. U zwierząt z odrostem guza w oczodole dochodziło do spadku masy ciała oraz dodatkowo zwierzęta pokazywały oznaki bólu co przyczyniało się do wykonania eutanazji. W pozostałych grupach eksperymentalnych zwierzęta zaczynały szybciej oddychać, co sugerowało obecność przerzutów w płucach.

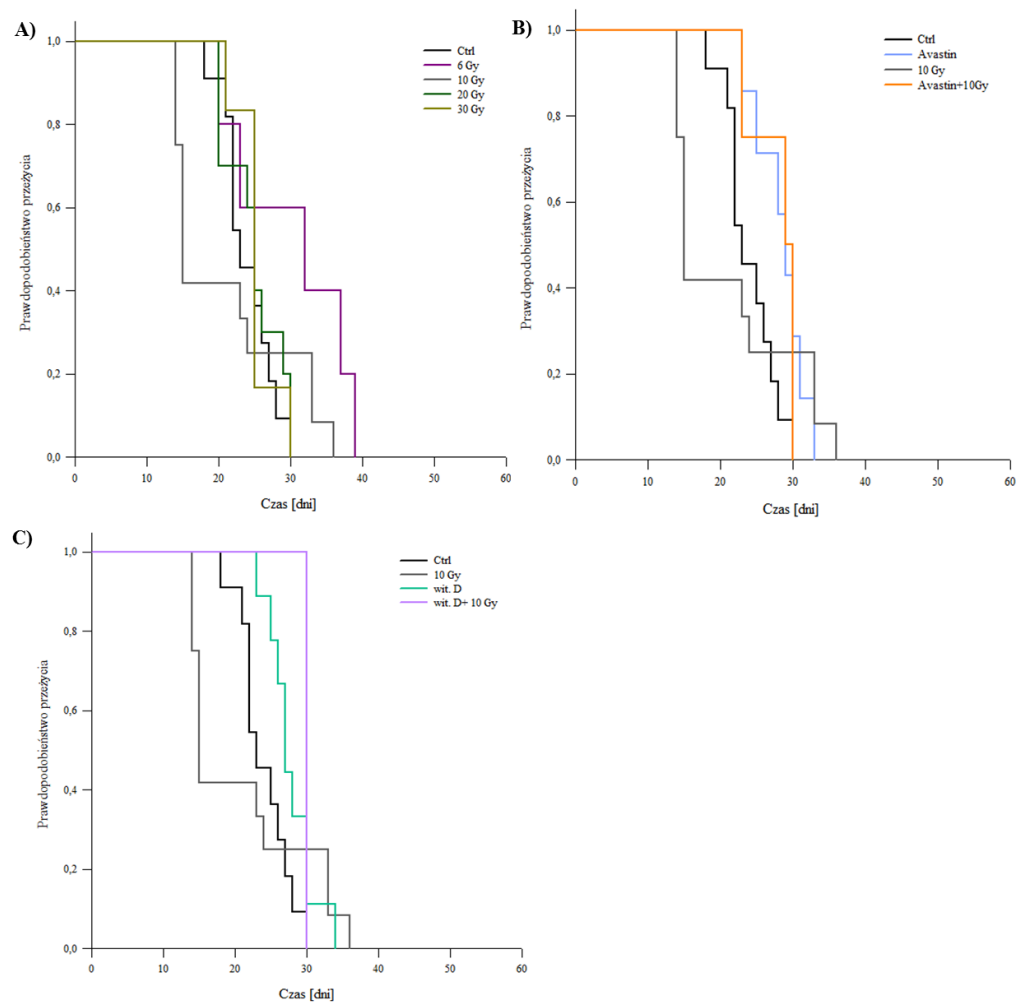
Grupa eksperymentalna	Masa zwierzęcia ± SD[g]	Zmiana tempa oddechu [tak (+), nie (-)]	Oznaki dyskomfortu/bólu [tak (+), nie (-)]
Kontrola	123,23 ± 7,83	+	-
6 Gy	118,51 ± 13,16	+	-
10 Gy	131,01 ± 7,73	+	-
20 Gy	131,6 ± 12,77	+	-
30 Gy	132,4 ± 13,44	+	-
Avastin	128,33 ± 6,92	+	-
Avastin + 10 Gy	132,14	+	-
Wit. D	120,01 ± 6,46	+	-
Wit. D + 10 Gy	129	+	-
Guzy S	121,15 ± 6,48	+	-
Guzy L	121,82 ± 7,90	+	-
Wznowy	107,65 ± 3,36	-	+

Tab. 8. Zbiór informacji podsumowujących kondycję zwierząt z poszczególnych grup eksperymentalnych w dniu podjęcia decyzji o eutanazji. Na czerwono zaznaczono czynnik decydujący w danej grupie. Zwierzęta, u których zaobserwowano wznowę guza w oczodole traciły na wadze oraz pokazywały oznaki bólu i dyskomfortu co było powodem przeprowadzenia eutanazji. Zwierzęta z pozostałych grup eksperymentalnych nie zmieniały w sposób istotny statystycznie wagi ciała, ale zauważalne było przyspieszenie i spłylenie oddechu.

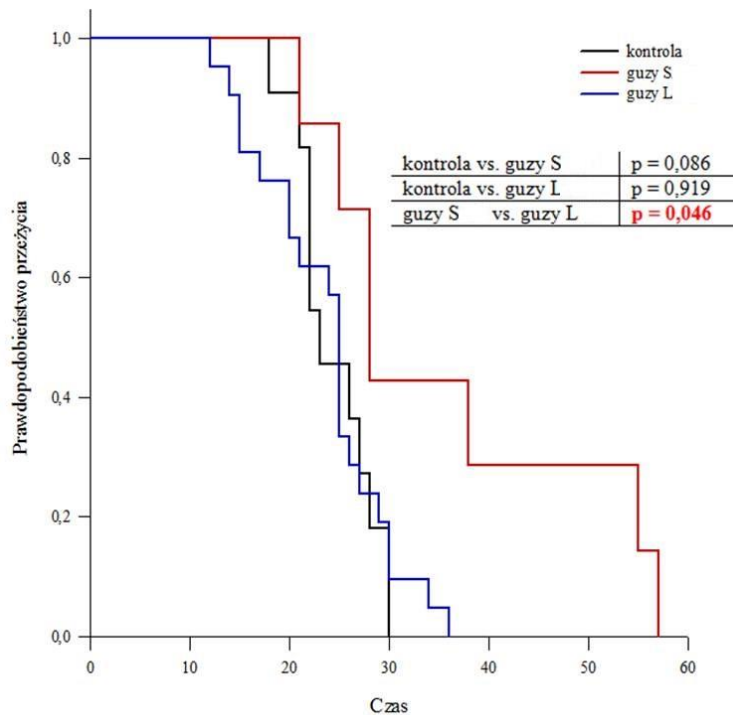
Wykreślone krzywe przeżycia przedstawiają ilość dni, które zwierzęta przeżyły od momentu wykonania enukleacji (ryc. 26). **Nie zaobserwowano zmiany długości przeżycia dla zwierząt z poszczególnych grup eksperymentalnych** (6 Gy, 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy ryc. 26 A; Avastin, Avastin + 10 Gy ryc. 26 B; witamina D, witamina D + 10 Gy ryc. 26 C) w porównaniu do kontroli (analiza statystyczna testem log-rank, $p > 0,05$).

Wykonano również analogiczną analizę z podziałem na guzy S oraz L (Ryc. 27). **Zwierzęta z guzami S przeżywały znacząco dłużej niż zwierzęta z guzami L** (test log rank, $p < 0,05$). Maksymalny czas przeżycia dla zwierząt z guzami S został wydłużony prawie dwukrotnie w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej. Nie ma różnicy w długości czasu przeżycia między zwierzętami z guzami L a zwierzętami z guzami niepoddanymi żadnej formie terapii (kontrola).

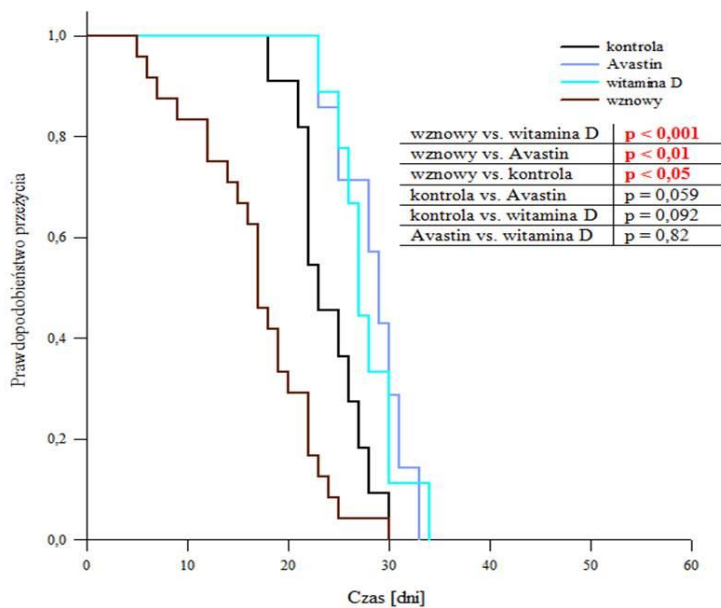
W czasie prowadzenia obserwacji stanu zwierząt po enukleacji zauważono, że u niektórych zwierząt doszło do wznowy wzrostu guza w oczodole. Guz wypełniał stopniowo oczodół, a widoczny dla obserwatora stawał się dopiero gdy wypychał od środka powiekę lub wyciekał przez powiekę. Zwierzęta w tym czasie traciły również na wadze i gdy schudły więcej niż 20 % wyjściowej masy ciała były poddawane eutanazji. Na ryc. 28 przedstawiona jest analiza przeżycia Kaplana-Meiera dla zwierząt, u których zaobserwowano wznowę wzrostu guza pierwotnego w oczodole. **Zwierzęta ze wznową żyły istotnie statystycznie krócej niż zwierzęta z grupy kontrolnej, zwierzęta, którym podano Avastin oraz te, którym podano witaminę D** (test log-rank, $p < 0,05$).



Ryc. 26. Analiza przeżycia Kaplana- Meiera. Wykresy przedstawiają długość przeżycia zwierząt od wykonania enukleacji dla poszczególnych grup eksperymentalnych: A) zwierzęta napromieniane wiązką protonów w dawce 6, 10, 20 i 30 Gy; B) zwierzęta, którym podano Avastin z lub bez późniejszego napromieniania protonami w dawce 10 Gy; C) zwierzęta, którym podano witaminę D z lub bez późniejszego napromieniania protonami w dawce 10 Gy. Nie ma istotnie statystycznych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami (tes log-rank, $p > 0,05$).



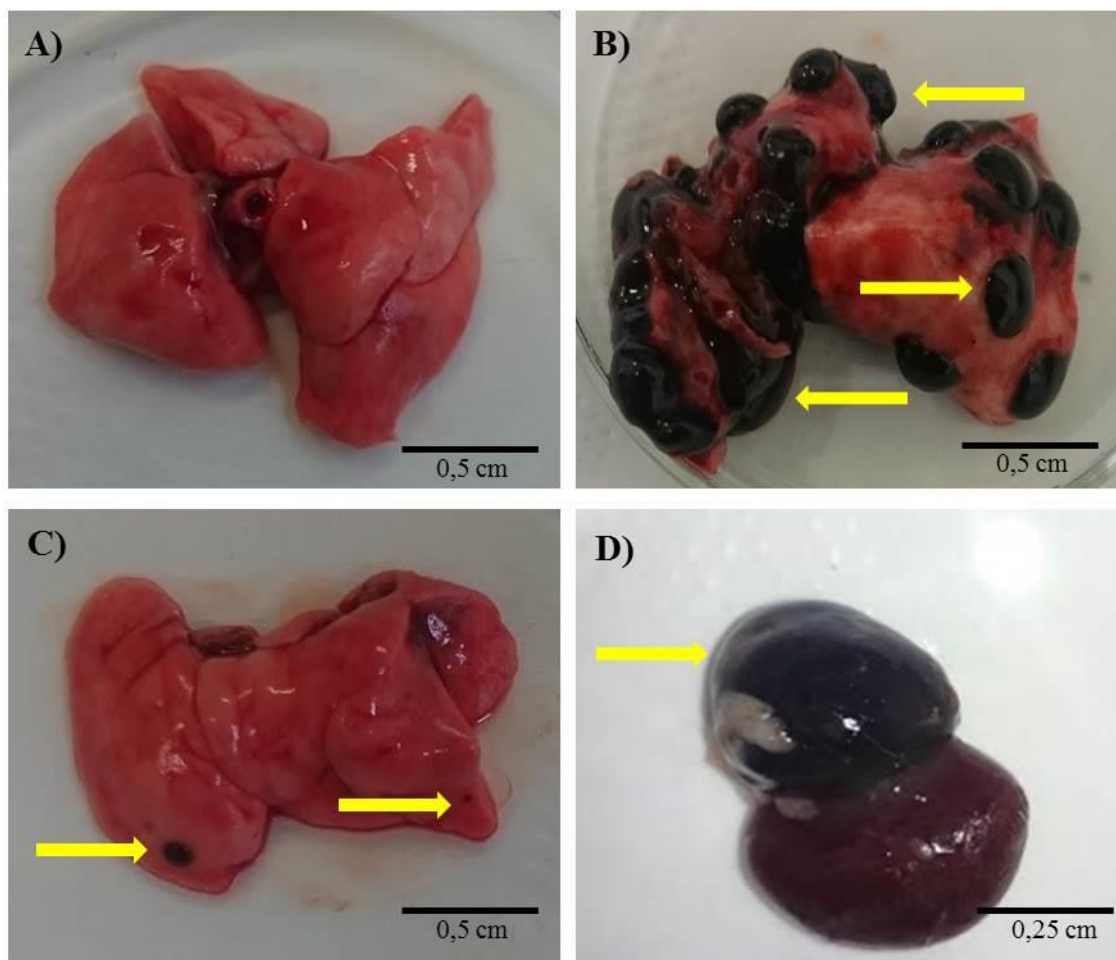
Ryc.27. Analiza przeżycia Kaplana- Meiera. Wykres przedstawia długość przeżycia zwierząt od wykonania enukleacji z podziałem na guzy S i L. Zwierzęta z guzami S żyły istotnie dłużej niż zwierzęta z guzami L. Test log- rank.



Ryc.28 Analiza przeżycia Kaplana- Meiera. Wykres przedstawia długość przeżycia zwierząt, u których doszło do wznowy wzrostu guza w oczodole. Zwierzęta te żyją krócej niż zwierzęta, którym podano samą witaminę D i Avastin.

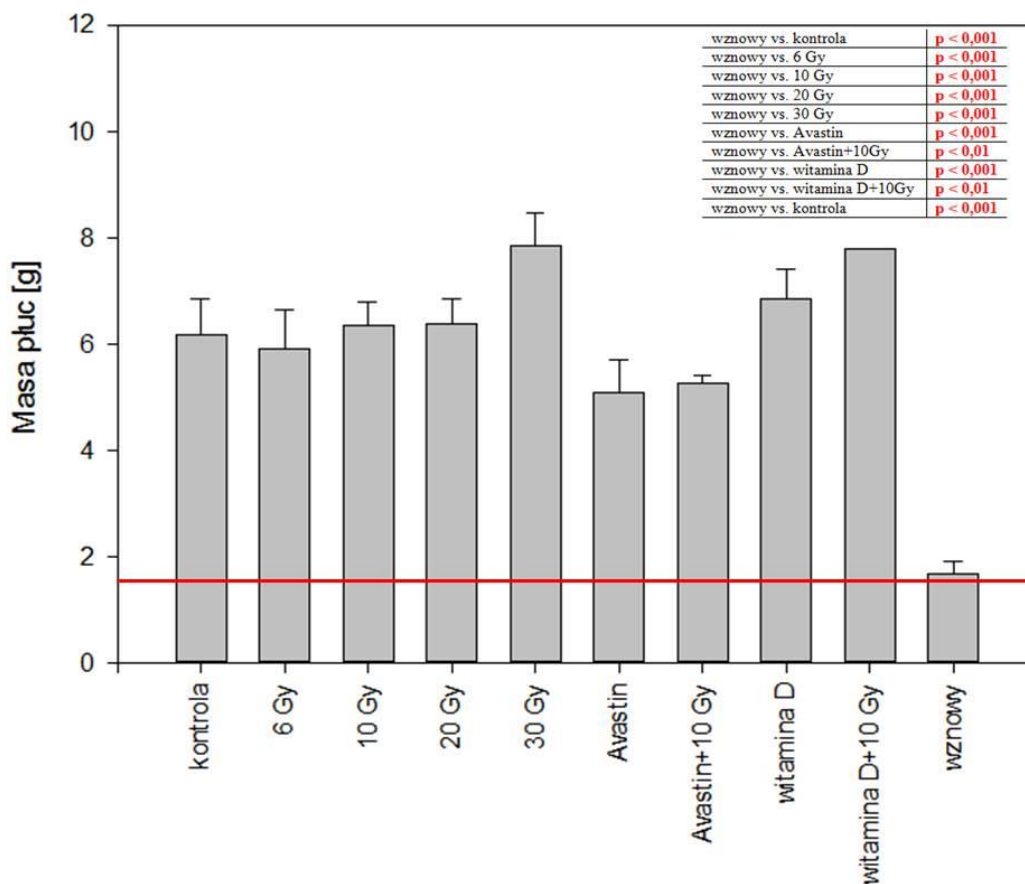
6.6.2 Zwierzęta, u których doszło do wznowy guza w oczodole nie miały przerzutów do płuc

Wszystkie zwierzęta poddane były sekcji zwłok. Prawidłowe płuca chomika syryjskiego, w których nie zaobserwowano żadnych zmian nowotworowych, są gąbczaste, jasnoróżowe i ważą ok. 1,8 g (ryc. 29 A). **U wszystkich zwierząt, w których przedniej komorze oka wzrastał guz BHM Ma, widoczne były duże, upigmentowane przerzuty do płuc** (ryc. 29 B, przykładowe skupiska przerzutów zaznaczono żółtymi strzałkami). Regiony tkanki płuc nie objętej rozrostem przerzutów są silniej ukrwione niż w płucach prawidłowych. **Zaobserwowano, że zwierzęta u których doszło do wznowy guza w oczodole nie miały przerzutów w ogóle, lub było ich bardzo niewiele** (ryc. 29 C). Pojawił się również jeden przypadek, w którym doszło do przerzutu guza BHM Ma do kory nadnerczy (ryc. 29 D). Nie zaobserwowano żadnego przypadku przerzutu do wątroby, mózgu czy innych organów dystalnych.



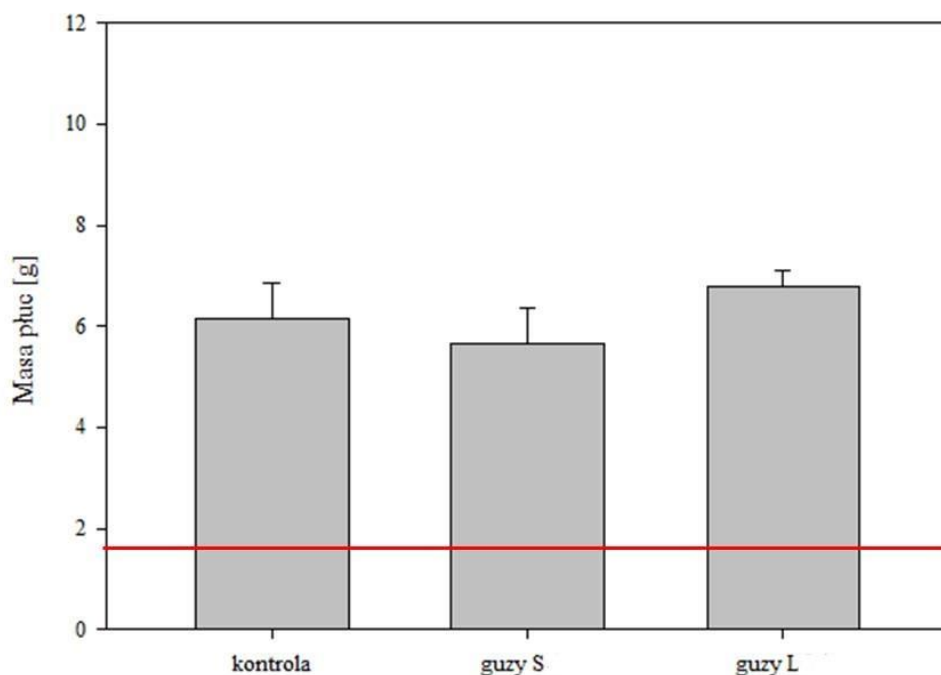
Ryc. 29. Makroskopowe zdjęcia organów wypreparowanych podczas sekcji. A) prawidłowe płuca chomika syryjskiego; B) płuca z przerzutami BHM Ma; C) płuca zwierzęcia, u którego doszło do wznowy wzrostu guza w oczodole; D) przerzut do kory nadnerczy. Przykładowe ogniska przerzutowe zaznaczono na rycinach żółtymi strzałkami.

Wszystkie płuca były ważone, w celu ilościowego określenia masy przerzutów. Zwierzęta z grupy kontrolnej miały płuca blisko 3 razy cięższe niż masa płuc prawidłowych. **Żaden z zaproponowanych protokołów terapeutycznych nie skutkowało zahamowaniem rozsiewu komórek nowotworowych**, ponieważ nie doszło do zmniejszenia masy płuc w żadnej z grup terapeutycznych w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 30). Płuca zwierząt, u których doszło do wznowy guza w oczodole, były wolne od przerzutów lub miały ich bardzo niewiele. Istotności statystyczne zaznaczone na wykresie powstały w oparciu o analizę ANOVA z testem post-hoc Holm-Sidak.



Ryc. 30. Ilościowa analiza masy przerzutów do płuc. Płuca prawidłowe ważą ok. 1,8 g (wartość referencyjna zaznaczona jako czerwona linia) natomiast płuca zwierząt z grupy kontrolnej ok. 6 g. Nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic pomiędzy poszczególnymi protokołami terapeutycznymi. Wyjątkiem są zwierzęta, u których doszło do wznowy wzrostu guza w oczodole- w tych przypadkach ilość przerzutów do płuc była znacznie zmniejszona. Istotności statystyczne zebrano w tabeli w górnym prawym rogu ryciny.

Stwierdzono również brak różnic w redukcji masy przerzutów przy podziale na wielkość guza w momencie wykonania terapii (Ryc. 31). Nie ma istotnie statystycznie różnic z masie płuc guzów S i L w porównaniu do grupy kontrolnej.

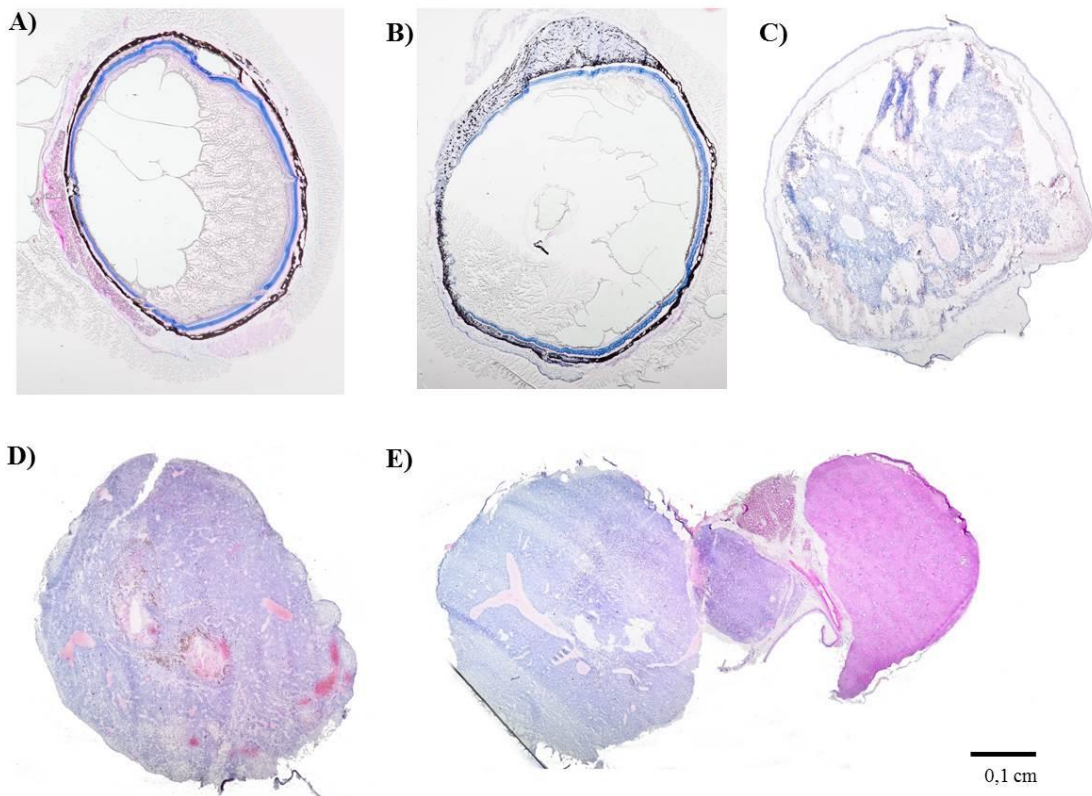


Ryc. 31. Analiza ilościowa masy płuc zwierząt z podziałem na zwierzęta z guzami S i L. Nie zaobserwowano żadnej różnicy w ilości przerzutów między poszczególnymi grupami. Czerwoną linią zaznaczono masę prawidłowych płuc chomika syryjskiego.

6.6.3 Analiza histologiczna pobranych organów

Wypreparowane organy poddano analizie histologicznej. Na ryc. 32 przedstawiono wybrane preparaty obrazujące strukturę narządu oraz zmianę nowotworową wybarwione metodą hematoksylina- eozyna. Na ryc. 32 A znajduje się prawidłowa gałka oczna z wyraźnie widoczną twardówką i naczyniówką. Oko jest nieznacznie zdeformowane, nie jest widoczna przednia komora, ponieważ przed cięciem na mikrotomie nie została wypreparowana soczewka, która jest gąbczasta i trudna w krojeniu. Wewnątrz gałki znajdują się artefakty pochodzące od kleju. Ryc. 32 B przedstawia reprezentatywny przekrój gałki ocznej, w której w przedniej komorze znajduje się guz S. Wypełnia on całą wolną przestrzeń przedniej komory, ale jeszcze nie nacieka do wnętrza gałki. Podobnie jak na zdjęciu A wyraźnie widoczna jest twardówka oraz naczyniówka. Na ryc. 32 C przedstawione jest zdjęcie przekroju gałki ocznej z guzem L. Oko jest wyraźnie zdeformowane, w dużym stopniu spowodowane jest to guzem rozpychającym ciało szkliste gałki ocznej. Wykonano również zdjęcie

przekroju tkanki płuc (ryc. 32 D) z widocznymi brunatnymi złożami melaniny pochodzącymi od przerzutu czerniaka do płuc. W miejscach niezajętych przez tkankę nowotworową widoczna jest charakterystyczna, dendrytyczna tkanka płuc. U jednego zwierzęcia pojawił się przerzut do kory nadnerczy (ryc. 32 E).



Ryc. 32. Skrawki histologiczne wybarwione metodą hematoksyliny- eozyna. A) oko prawidłowe; B) oko z guzem S; C) oko z guzem L; D) płuco z przerzutami BHM Ma; E) nerka z przerzutem BHM Ma do kory nadnerczy. W prawym dolnym rogu ryciny zaznaczono skalę. Zdjęcia wykonał Ś.P. dr Tomasz Oleś.

6.7 Obrazowanie czerniaka oka na alternatywnym modelu zwierzęcym

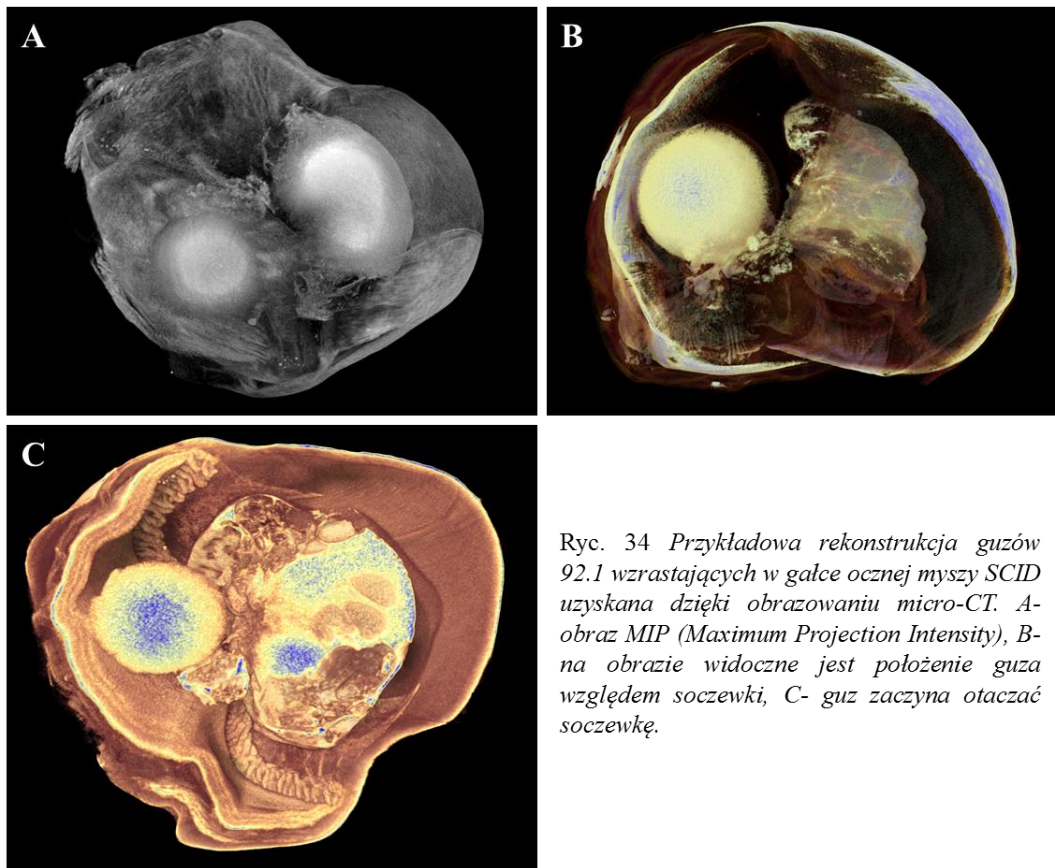
Inokulacja komórek ludzkiego czerniaka 92.1 do gałki ocznej skutkowała wzrostem guzów z wydajnością na poziomie 33%. Trzy guzy wyrosły 21 dni po inokulacji a następne 77 i 82 dni po implantacji. Guzy 92.1 rosły przez 14 dni od momentu ich zauważenia do momentu wykonania eutanazji.

Obrazowanie guzów wewnątrz gałki mysiej dało obrazy znacznie gorszej jakości niż miało to miejsce w przypadku obrazowania guzów w przedniej komorze oka chomika. Na ryc. 33 umieszczono przykładowe obrazy w prezentacji w trybie Power Doppler. Granatową linią zaznaczono obrys trzech różnych guzów. Na żółto zaznaczono schematycznie obrys gałki ocznej myszy. Oko mysie jest około 3 razy mniejsze niż oko chomika syryjskiego, i trudniejsze do obrazowania co dodatkowo pogarsza jakość uzyskanych obrazów. Ze względu na zbyt małą rozdzielczość uzyskanych obrazów oraz zbyt małą ilość guzów w grupie analiza ilościowa nie była możliwa.



Ryc. 33 *Wirtualny przekrój mysich gałek ocznych (obrysowane na żółto) z wzrastającymi w środku guzami 92.1 (obrysowane na granatowo). Obrazy przedstawiają prezentację w trybie Power Doppler. Obrazowanie trzech różnych zwierząt w dniu zauważenia wzrostu guza w oku.*

Wykonano również obrazowanie micro-CT komputerową po uprzednim wybarwieniu gałek ocznych roztworem Lugola (Ryc. 34). Guzy i ich unaczynienie rozwijały się inaczej niż guzy BHM. Ma wzrastające w oku chomika. Guz inokulowany do tylnej części gałki ocznej rośnie w kierunku soczewki i ją otacza. Guz jest dobrze unaczyniony w zewnętrznej części a naczynia przechodzą w niefunkcjonalne obumarłe regiony wewnątrz guza.



Ryc. 34 Przykładowa rekonstrukcja guzów 92.1 wzrastających w gałce ocznej myszy SCID uzyskana dzięki obrazowaniu micro-CT. A- obraz MIP (Maximum Projection Intensity), B- na obrazie widoczne jest położenie guza względem soczewki, C- guz zaczyna otaczać soczewkę.

7. Dyskusja

7.1 Aktywność migracyjna komórek BHM Ma

Komórki BHM Ma wyprowadzono ze skrawków tkanki guza pierwotnego. Wszystkie eksperymenty *in vitro* przeprowadzone były na komórkach pochodzących z czwartego pasażu. Nie są więc to eksperymenty przeprowadzone na czysto pierwotnej linii, jednak było to niemożliwe, ponieważ komórki przy pierwszym pasażu nie wykazywały właściwości adherentnych. Aby to zmienić należałoby np. prowadzić hodowlę na plastiku opłaszczonym fibroblastami. Sarna i wsp. [111] prowadzili hodowlę z wykorzystaniem komórek BHM Ma i przy pomocy mikroskopii konfokalnej potwierdzili tę obserwację, że komórki z pierwszego pasażu są okrągłe i rozplaszczają się na dnie naczynia dopiero przy kolejnych pasażach.

Komórki BHM Ma mają bardzo krótki czas podwojenia populacji (13,4h). Wynik ten jest zgodny z obserwacjami *in vivo*- wzrost guzów w oku chomika był tak szybki, że już po 4 dniach od rozpoczęcia wzrostu wypełniona była cała przednia komora. Jednakże inni autorzy [111] donoszą, że czas podwojenia populacji dla komórek BHM Ma przy czwartym pasażu wynosi 58h. Rozbieżność otrzymanych rezultatów jest bardzo duża, jednak należy mieć na uwadze, że hodowle były wyprowadzane z różnych skrawków guzów rosnących podskórnie, co może odzwierciedlać heterogenność guzów BHM Ma. Ponadto, obie prace były wykonywane na liniach niestabilizowanych, co również uzasadnia rozbieżność otrzymanych rezultatów.

Przeprowadzony test rysy wykazał, że po 24 h dochodzi do jej zarośnięcia. W zamierzeniu na podstawie tego wyniku można oszacować tempo migracji komórek BHM Ma. Jednakże biorąc pod uwagę uzyskany czas podwojenia populacji, nie możemy wyciągnąć takiego wniosku, ponieważ komórek na tym etapie jest ponad dwa razy więcej niż na początku eksperymentu. Często używanym w takich wypadkach testem jest zliczenie komórek, które przejdą przez komorę Boydena. Przy użyciu tej metody opisujemy jednak tylko zachowanie pojedynczych komórek, a nie, tak jak ma to miejsce w teście rysy, zachowanie komórek w grupie. Oddziaływanie międzykomórkowe znacznie wpływa na aktywność poszczególnych komórek -

znaczenie ma nie tylko oddziaływanie między komórkami nowotworowymi a komórkami niszy, ale również oddziaływanie pomiędzy samymi komórkami nowotworowymi [112]. Przeprowadzone eksperymenty aktywności migracyjnej komórek BHM Ma w zależności od gęstości ich wysiania wykazały, że komórki, które rosły w otoczeniu wielu innych komórek, ruszają się o wiele szybciej i pokonują większe odległości niż komórki, które żyły w środowisku o mniejszym zagęszczeniu. Jest to zgodne z danymi literaturowymi, w których coraz częściej oddziela się potencjał migracyjny pojedynczej komórki od potencjału migracyjnego całej grupy komórek [111]. Migracja w grupie jest bowiem o wiele bardziej wydajna niż migracja tej samej sumy pojedynczych komórek. Na diagramach kołowych analizy migracyjnej (ryc. 31 A i B) widać pojedyncze komórki, które przemieszczają się o wiele dalej niż większość komórek. Być może komórki te mają jeszcze wyższy potencjał metastatyczny, niż pozostałe komórki. Aby to sprawdzić należałoby je wyselekcjonować i stworzyć z nich oddzielną kolonię. Postuluje się, że zdolności do formowania przerzutów są również związane z elastycznością komórek, która w dużym stopniu zależy od upigmentowania komórek. Sarna et al. [111] opisali, że komórki BHM Ma tracą pigment wraz z kolejnymi pasażami, a tym samym maleje ich moduł Younga. W celu zachowania pigmentacji komórek na stałym poziomie należałoby zastosować hodowlę w medium bogatym w tyrozynę [113].

7.2 Chomik syryjski i inne modele zwierzęce

Modele zwierzęce są ważnym narzędziem w badaniu patobiologii nowotworów, identyfikowaniu istotnych klinicznie szlaków sygnałowych czy znajdowaniu nowych czynników terapeutycznych [53]. Do tej pory nie udało się opisać modelu *in vivo* czerniaka oka, który spełniałby wszystkie z pożądanых cech odzwierciedlających obraz kliniczny u pacjentów. W obecnej chwili wydaje się więc najrozsądniejsze stosowanie równoległych modeli, z których każdy odpowiada na postawione pytanie badawcze. Pomimo oczywistych ograniczeń jakie niosą ze sobą eksperymenty na modelach *in vivo*, a przede wszystkim brak jednoznacznego przełożenia otrzymanych w ten sposób wyników na praktykę kliniczną [114], nie ulega wątpliwości, że dzięki nim jesteśmy w stanie spojrzeć na chorobę nowotworową i jej terapię w sposób systemowy. Model

zastosowany do przeprowadzenia opisanych w pracy eksperymentów model to implantacja skrawków czerniaka Bomirskiego do przedniej komory oka chomika syryjskiego. Jest to rodzaj allotransplantu, ponieważ pierwotna tkanka BHM Ma pochodzi ze spontanicznie powstałego czerniaka skóry u chomika syryjskiego. Wśród największych zalet tego modelu wymieniana jest jego bardzo wysoka wydajność (wzrost nowotworu po inokulacji aż w 96% przypadków [94]), zdolność do formowania przerzutów dystalnych i utrzymanie upigmentowania zarówno tkanki guza pierwotnego jak i przerzutu na stałym poziomie. Dodatkową zaletą tego modelu jest to, że gałka oczna chomika jest około 3 razy większa niż oko myszy, dlatego możliwa jest obserwacja skuteczności zastosowanej terapii w zależności od wielkości nowotworu jak również monitorowanie zmian w unaczynieniu guza w trakcie jego rozwoju [115]. Jest to bardzo istotne, ponieważ uzyskuje się wtedy dodatkowe informacje, takie jak: przy jakiej wielkości guza dochodzi do formowania nowych naczyń krwionośnych lub jak hipoksja, która najczęściej jest obecna w dużych guzach nowotworowych, wpływa na skuteczność zastosowanej terapii [116]. Ponadto, zaproponowany model badawczy jest też bardzo skuteczny w badaniach nad terapią fotodynamiczną, ponieważ światło wzbudzające fotouczulacz dochodzi do guza, nie penetrując głębiej położonych struktur. Należy jednak być również świadomym wad zastosowanego modelu. Najbardziej pożądane są modele ortotopowe, ponieważ wówczas rośnie prawdopodobieństwo, że komórki nowotworowe w swoim naturalnym środowisku będą zachowywać się w sposób najbardziej zbliżony do tego, co obserwuje się w klinice [55]. W dyskutowanym tutaj modelu inokulujemy natomiast skrawki czerniaka skóry do gałki ocznej. Nie jest więc to naturalne środowisko wzrostu dla komórek BHM Ma. Ponadto chomiki syryjskie są stosunkowo rzadko wykorzystywane w badaniach laboratoryjnych, dlatego istnieje na rynku ograniczony dostęp do przeciwciał umożliwiających dokładne badania na poziomie molekularnym. W literaturze znaleziono tylko dwa artykuły opisujące przypadki spontanicznie powstałego czerniaka gałki ocznej u chomików. W pierwszej pracy z 1977 roku [117] był to złośliwy czerniak gałki ocznej chomika syryjskiego, nowotwór rozwijał się powoli, a zwierzę zdechło po 1,5 roku z powodu kacheksji i przerzutów do płuc. W drugiej pracy z 2012 roku [118] u chomika chińskiego zaobserwowano złośliwego czerniaka w oku, podjęto decyzję o enukleacji gałki ocznej a zwierzę żyło jeszcze prawie 2,5 roku. Nie zachowano materiału biologicznego z żadnego z tych nowotworów. W badaniach przedklinicznych dotyczących poszerzaniu wiedzy o czerniakach naczyńiówki wykorzystywane są

również inne modele zwierzęce, w tym m.in. bezgrasicze szczury WAG/RijHs-rnu, którym inokuluje się ludzkie komórki czerniaka naczyńki OCM-1 [119]. Co raz większym zainteresowaniem cieszy się również implantowanie nowotworów nie w postaci zawiesiny komórek czy skrawków, a w postaci sferoidów. Podejście takie zastosowali m.in. Braun i wsp. [120], którzy podawali nie w pełni immunokompetentnym szczurom WAG/Nij-rnu do przestrzeni nadnaczyniówkowej sferoidy z komórek ludzkiego czerniaka naczyńki C918. Wśród innych najbardziej popularnych modeli czerniaka gałki ocznej wymienia się również myszy SCID, którym można inokulować m.in. komórki ludzkiego czerniaka OCM8, OCM-1 i C918 [54,121].

W diskutowanym eksperymencie otrzymano wydajność wzrostu nowotworu po inokulacji na poziomie 49%. Jest to więc prawie dwukrotny spadek w porównaniu do rezultatów otrzymanych przez Romanowska- Dixon i wsp. w 2001 roku [94]. Możliwe są dwie przyczyny tej zmiany. Pierwszym i najbardziej prawdopodobnym jest fakt, że chomiki pochodziły z dwóch różnych źródeł. Eksperymenty z 2001 roku przeprowadzono na chomikach pochodzących z prywatnej hodowli p. Janiny Ogorzałek w Puławach, podczas gdy eksperymenty przeprowadzone w ramach obecnej pracy opierały się na chomikach z hodowli firmy CharlesRiver we Francji. Wielce prawdopodobnym jest więc, że chomiki te mają różne tła genetyczne. Drugim możliwym czynnikiem odpowiedzialnym za spadek wzrostu nowotworu po inokulacji jest mutacja genetyczna w linii BHM Ma. Aspekt ten wydaje się jednak mniej prawdopodobny, ponieważ linię otrzymaliśmy dzięki uprzejmości prof. dr hab. Mirosławy Cichorek z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, która nie zaobserwowała żadnych zmian w prowadzonych na tej linii eksperymentach na przestrzeni ostatnich lat.

W ramach diskutowanej pracy inokulowano również do myszy SCID komórki ludzkiego czerniaka oka 92.1. Wzrost guzów wystąpił u 33% zwierząt i u żadnego z nich nie zaobserwowano przerzutów ani do wątroby, ani do płuc. W literaturze [55] można znaleźć informacje, że inokulacja tych komórek do oka albinotycznego królika skutkuje wzrostem guzów u 89% zwierząt. Już po 4 tygodniach zaczęły pojawiać się przerzuty do płuc a u prawie co piątego królika rozwijały się również przerzuty do wątroby. Inna grupa [122], która również inokulowała komórki 92.1 do oka albinotycznego królika donosi jednak, że przerzuty do płuc obserwowano tylko u 43% zwierząt. Ding Ma i wsp. [123] Inokulowali te same komórki myszy nude. Uzyskano

w ten sposób przerzuty do wątroby u 4 z 5 zwierząt. Na tej podstawie spodziewano się zobaczyć przerzuty do wątroby lub płuc u myszy SCID. Nie zdecydowano się przeprowadzać enukleacji gałki ocznej, ponieważ czas wzrostu guza (nawet do 82 dni od inokulacji guz rozpoczynał wzrost i się przez kolejne 14 dni) uznano za wystarczająco długi, aby zaobserwować przerzuty. Przyczyn ich braku można również dopatrywać się w nieprzeprowadzeniu enukleacji. W jednej z prac [124], zmierzona była ekspresja angiostatyny przez komórki 92.1 . Wykazano, że komórki te produkują bardzo duże ilości angiostatyny, co hamuje formowanie przerzutów.

7.3 Obrazowanie unaczynienia czerniaka gałki ocznej.

Angiogeneza, czyli proces formowania nowych naczyń krwionośnych, odgrywa kluczową rolę w wielu stanach patologicznych takich jak retinopatia cukrzycowa, reumatoidalne zapalenie stawów, endometrioza czy łuszczyca [125]. Z punktu widzenia tej pracy najważniejszą rolą angiogenezy jest jej udział we wzroście nowotworu oraz powstawaniu przerzutów. Wszystkie te choroby byłyby o wiele mniej niebezpieczne i łatwiejsze do wyleczenia, gdyby znany był sposób zapanowania nad zjawiskiem angiogenezy, dlatego tak istotne jest aby rozwijać wiedzę w kierunku jej obrazowania i monitorowania. Możliwość obserwowania zmian w unaczynieniu nowotworu jest kluczowa dla kontrolowania skuteczności terapii przeciwnowotworowych [101]. W tej pracy przedstawiono dwie metody obrazowania unaczynienia guzów wzrastających w przedniej komorze oka chomika- USG oraz micro-CT

Ultrasonografia jest obecnie powszechnie stosowaną metodą diagnostyczną w wielu obszarach medycyny takich jak chirurgia, kardiologia, urologia, ginekologia czy okulistyka [126]. Cieszy się dużą popularnością ze względu na to, że jest metodą nieinwazyjną i łatwą do wykonania. Wynik jest dostępny już w czasie wykonywania badania a stosunek skuteczności do kosztów jest zadowalający. Dodatkową zaletą jest to, że możliwe jest obrazowanie nie tylko tkanek miękkich, ale również ich unaczynienia. Tryb Power Doppler umożliwia wizualizację naczyń krwionośnych, rozróżnienie żył od tętnic oraz określenie tempa przepływu krwi. W optymalnych warunkach wykonywania pomiaru możliwe jest uzyskanie na tyle dobrej rozdzielczości i jakości obrazu, aby określić morfologię i tempo przepływu krwi w naczyniach

o średnicy 15 μm [99]. Informacja taka jest niezwykle istotna nie tylko z naukowego punktu widzenia pod kątem poszerzania wiedzy o biologii nowotworów, ale również z klinicznego punktu widzenia, ponieważ można w ten sposób oceniać skuteczność zastosowanej terapii jak również prognozować średni czas przeżycia. Pomiar USG w trybie Power Doppler daje wszystkie informacje niezbędne do oceny potencjału metastatycznego wielu typów ludzkich nowotworów. Wykonywanie pomiarów USG, pomimo rozlicznych zalet, ma również swoje ograniczenia. Do najważniejszego z nich jest stosunkowo niska rozdzielczość, która nie zawsze umożliwia uzyskanie obrazów o zadowalającej jakości co pozwoliłoby na wyciągnięcie pewnych i jednoznacznych wniosków klinicznych. Podejmuje się więc próby zwiększenia rozdzielczości obrazów uzyskanych przy pomocy USG. Jedną z takich metod jest podawanie kontrastu w postaci mikropęcherzyków [127]. Małe bąbelki gazu (takiego jak np. C₃H₈) zamknięte są w lipidowej lub albuminowej powłoce o średnicy mniejszej niż 5 μm . Mikropęcherzyki podawane są dożylnie i rozchodzą się wraz z krwią po całym organizmie. Puls ultradźwięków wysyłanych z głowicy podczas pomiaru ma w założeniu częstotliwość zbliżoną do częstotliwości własnej mikropęcherzyków, dzięki czemu pęcherzyki zmniejszają i zwiększają swoją średnicę, wywołując echo pochodzące od otaczających tkanek [128]. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie obrazów USG o ponad trzykrotnie wyższej rozdzielczości. Użycie mikropęcherzyków byłoby zasadnym podejściem umożliwiającym zwiększenie jakości obrazów zarówno guza BHM Ma w przedniej komorze oka chomika jak i guzów 92.1 w oku myszcy SCID. Dzięki temu podejściu prawdopodobnie możliwe byłoby rozróżnienie naczyń krwionośnych, które położone są bardzo blisko siebie a ze względu na techniczne ograniczenia klasycznego USG traktowane są jako jedno większe naczynie. Dodatkowo, mikropęcherzyki mogą pełnić rolę nośników dla leków. Mikropęcherzyki mogą być również opłaszczane specyficznymi markerami umożliwiającymi bezpośrednie śledzenie procesu angiogenezy, takimi jak np. VEGFR-2, integryna $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, czy endoglina. Ze względu na swój rozmiar, mikropęcherzyki nie wyciekają do przestrzeni zewnątrzkomórkowej a przy wyznakowaniu markerami angiogennymi o wiele wydajniej lokują się w obrębie guzów nowotworowych [101]. USG, choć uważane za najszybsze i najtańsze narzędzie do przeżyciowej oceny unaczynienia nowotworów u ludzi i zwierząt, nie jest oczywiście jedyną znaną metodą obrazowania procesu angiogenezy. Alternatywną metodą obrazowania rozwoju unaczynienia jest m.in. PET (ang. Positron Emission Tomography). Wykorzystanie tej techniki z użyciem

^{64}Cu -NODAGA-RGD umożliwia detekcję bardzo wczesnych etapów rozwoju angiogenezy biorącej udział w naprawie ubytków kostnych u myszy C57Bl/6J [129]. PET wykorzystywany jest również klinicznie do obrazowania m.in. nowotworu przełyku i jego unaczynienia. Pomiar te mogą się w niedalekiej przyszłości okazać kluczowe w kontekście planowania neoadiuwantowej chemioradioterapii. Coraz większym zainteresowaniem cieszy się obrazowanie fotoakustyczne (PAI), które również umożliwia obrazowanie nowotworu i jego unaczynienia. Metoda ta umożliwia wykrycie naczyń neoangiogennych dzięki różnicy w absorpcji hemoglobiny w tkance nowotworowej i w otaczających tkankach prawidłowych [130]. Hemoglobina pełni więc w tym układzie rolę endogennego kontrastu. PAI bywa już klinicznie stosowana m.in. do wykrycia i oceny skuteczności terapii nowotworu prostaty [131]. W listopadzie 2018 roku pojawiła się pierwsza praca opisująca wykorzystanie PAI do obrazowania czerniaka gałki ocznej na modelu zwierzęcym [132]. Melanina w komórkach B16F10 pełniła rolę kontrastu, dzięki czemu możliwe była korelacja intensywności sygnału melaniny z objętością guza. Nadal jednak najczęściej wykorzystywaną metodą obrazowania angiogenezy nowotworów, obok USG, jest magnetyczny rezonans jądrowy (MRI). Przy zastosowaniu kontrastu, którym najczęściej są chelaty gadolinu, mamy do czynienia z tzw. DCE-MRI. Metoda polega na tym, że kontrast wycieka przez dziurawe, nieprawidłowo zbudowane naczynia neoangiogenne. Ilość kontrastu, który znajdzie się poza światłem naczynia umożliwia określenie obecności i stanu naczyń neoangiogennych [133]. W praktyce laboratoryjnej stosuje się specjalne komory okienkowe na fałd grzbietowy zwierzęcia, co w połączeniu na przykład z mikroskopią fluorescencyjną, również umożliwia obrazowanie rozwoju unaczynienia [125].

Do dnia 28 listopada 2018 roku w bazie publikacji Pubmed.gov znaleziono tylko jedną publikację, która opisywała obrazowanie USG czerniaka zlokalizowanego w oku chomika. W pracy tej [118] opisano przypadek chomika chińskiego, u którego zdiagnozowano czerniaka komórek sygnetycznych. Spontanicznie pojawiające się nowotwory u chomików nie są rzadkością, jednak tylko w 0,5% są to zmiany złośliwe a jeszcze mniejszy odsetek stanowią złośliwe zmiany w obrębie gałki ocznej. Zastosowano tylko obrazowanie w trybie B, które umożliwiło identyfikację zmiany neoplastycznej oraz określenie jej rozmiaru, jednak nie została wykonana analiza unaczynienia guza. Obrazowanie i analiza ilościowa unaczynienia czerniaka

zlokalizowanego w gałce oka chomika syryjskiego opisane w tej pracy są więc unikatowe, a brak prac w tym temacie uniemożliwia skonfrontowanie otrzymanych wyników z doniesieniami innych autorów. Przeprowadzone pomiary USG umożliwiły wizualizację naczyń, których średnica miała co najmniej 70 μm . Unaczynienie było nieregularne, chaotyczne i bez charakterystycznej hierarchicznej struktury. Średnica naczyń była różnorodna, widoczne były miejscowe przewężenia i następujące po nich poszerzenia, a sieć naczyń składała się z lokalnych i nieregularnych węzłów i rozgałęzień. We wszystkich grupach eksperymentalnych stosunek objętości unaczynienia do objętości nowotworu utrzymywał się przez cały okres rozwoju guza na poziomie 25%. Przeprowadzono analizę porównawczą guzów na różnym stadium rozwoju (guzy S i guzy L). Guzy S w pierwszych dwóch punktach pomiarowych miały procentowo większy stosunek objętości naczyń do objętości guza. Należy jednak mieć tu na uwadze, że wynik ten może być fałszywie dodatni, ponieważ stosunkowo niska rozdzielczość uniemożliwia w sposób jednoznaczny oddzielenie naczyń nowotworowych od naczyń prawidłowych znajdujących się w obrębie gałki ocznej. Unaczynienie w guzach L było mniej wydajne co manifestowało się w postaci znacznie zmniejszonego tempa przepływu krwi w porównaniu do guzów S i do prawidłowych naczyń krwionośnych gałki ocznej. Najprawdopodobniej jest to spowodowane tym, że nowotwór BHM Ma rozwijał się bardzo gwałtownie i proces angiogenezy nie przebiegał wystarczająco szybko aby zapewnić formowanie nowych naczyń krwionośnych. Powyższe obserwacje są spójne z rezultatami uzyskanymi na tym samym modelu zwierzęcym, ale z wykorzystaniem innej techniki przez Romanowska-Dixon et al. [91]. Chomikom z guzem BHM w przedniej komorze oka podawano dożylnie żywicę o małej lepkości (Mercoks). Dzięki specjalnie przeprowadzonej procedurze trawienia guza możliwa była obserwacja kapilar o średnicy nawet 15 μm . Kształt naczyń w skaningowym mikroskopie elektronowym był chaotyczny, średnica wahała się między 40 a 110 μm , identyfikowane były nieregularne węzły i pętle a naczynia znajdowały się w całej objętości guza bez widocznych obszarów nekrotycznych. Obrazowanie unaczynienia z wykorzystaniem tej samej techniki ale na nieobarczonych zmianą nowotworową oczach myszy pokazało, że prawidłowa i funkcjonalna struktura unaczynienia w oku gryzonia jest hierarchiczna, regularnie zorganizowana a ściany naczyń są szczelne [162]. Jest to dodatkowym potwierdzeniem, że obserwowana zmiana w budowie naczyń jest konsekwencją gwałtownego rozrostu guza BHM Ma.

Obrazowanie USG unaczynienia myszy SCID z guzem 92.1 nie było techniką skuteczną, ponieważ uzyskane obrazy były zbyt niskiej rozdzielczości, aby obserwować rozwój unaczynienia w guzie. W zaproponowanym modelu eksperymentalnym metoda ta jest zatem tylko skuteczna do weryfikacji czy guz jest obecny w gałce ocznej. Aspektem, który należałoby sprawdzić w przyszłości, jest zastosowanie wyższych częstotliwości, tak jak to opisano w pracy Braun i wsp. [121].

Obrazowanie gałek ocznych wybarwionych jodyną przy użyciu micro-CT jest bardzo dobrą metodą obrazowania czerniaka rosnącego w przedniej komorze oka chomika. Jest to o tyle nietypowe, że najczęściej technika ta stosowana jest do obrazowania struktur wysoko zmineralizowanych, takich jak kości czy zęby. Do tej pory opublikowano tylko kilka prac opisujących obrazowanie gałki ocznej przy pomocy micro-CT [109,163,164]. Metoda ta umożliwia trójwymiarową rekonstrukcję gałki ocznej z dokładnością zbliżoną do tej uzyskanej na dwuwymiarowych preparatach histologicznych. Analiza jakościowa oraz ilościowa gałek z guzem oraz gałek prawidłowych dała możliwość przestrzennej obserwacji rozwoju unaczynienia w obrębie guza BHM Ma. Na podstawie obrazów micro-CT możliwe jest wyliczenie szeregu parametrów morfotycznych. Do najważniejszych zaliczany jest rozkład dystrybucji średnicy naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu oraz odstępów między poszczególnymi naczyniami. Parametry te dostarczają w sposób pośredni informacji o stopniu złośliwości zmiany nowotworowej. W obrazowanych próbkach odległość między naczyniami mieściła się w zakresie 10 do 90 μm . Tylko w jednej ze zmierzonych gałek ocznych odległości te były prawie dwukrotnie większe. Najprawdopodobniej było to spowodowane przebarwieniem próbki, co uniemożliwiło oddzielenie i rozróżnienie dwóch naczyń położonych blisko siebie. W prawidłowo wybarwionych regionach gałek ocznych uzyskiwana była rozdzielczość na poziomie mikrometra co gwarantuje poprawność wyliczonych parametrów opisujących strukturę unaczynienia w guzie BHM Ma. Ogólna struktura sieci unaczynienia była bardzo podobna do rezultatów uzyskanych przez Romanowska- Dixon i wsp. [94] – naczynia były chaotyczne, przeciekające, nieregularne i kręte, co było widoczne zwłaszcza w żyłach i żyłkach. Żyły i kapilary były sinusoidalne i wykazywały dużą gęstość wewnątrznaczyniową. Rozdzielczość uzyskanych obrazów z wykorzystaniem kastów oraz mikroskopu elektronowego jest podobna do rozdzielczości obrazów micro-CT, jednak należy mieć na uwadze kilka kwestii. Po pierwsze, żywica podawana jest

dożylnie pod pewnym ciśnieniem, aby miała ona szansę dotrzeć do odległych części od miejsca podania. W wyniku tego sztucznego, mechanicznego zwiększenia ciśnienia w żyłę jej ścianki są rozpychane co rozszerza szczeliny obecne w ścianie nieprawidłowego naczynia nowotworowego. Przez szczeliny te wypływa żywica i może prowadzić do zafałszowanych wniosków sugerujących większą przepuszczalność naczyń krwionośnych niż miało to faktycznie miejsce. Przy wykorzystaniu metody micro-CT popełnienie takiego błędu nie jest możliwe. Drugą cechą przemawiającą na korzyść zastosowania metody micro-CT jest to, że obrazowana jest cała próbka zarówno z jej fragmentami prawidłowymi jak i patologicznymi a wirtualna rekonstrukcja obrazu umożliwia zanalizowanie zadanych parametrów w dowolnie wybranej płaszczyźnie lub przestrzeni. Metoda korozyjna natomiast polega na robieniu odlewów, a naczynia stanowią tylko swego rodzaju „rusztowanie”, które na jednym z końcowych etapów powstawania kastów jest usuwane. Nie ma więc możliwości zobaczenia pozostałych tkanek czy to prawidłowych czy patologicznych. Istotny jest również czynnik etyczny- wykonanie pomiaru gałki ocznej ex vivo metodą micro-CT wydaje się być o wiele bardziej humanitarne niż dożylnie podawanie żywicy żywym zwierzętom, tym bardziej, że rozdzielczość uzyskanych obrazów jest zbliżona. Zastosowana procedura barwienia jodyną przed wykonaniem pomiaru micro-CT była optymalizowana pod kątem gałek ocznych wypreparowanych z ciała zwierzęcia i utrwalonych w formalinie. Technika ta jest jednak na tyle mało destrukcyjna, że nie wyklucza ponownego wykorzystania tej samej gałki do innego rodzaju obrazowania np. z wykorzystaniem metod histologicznych. Dzięki temu każde oko może być zobrazowane wielokrotnie w innych celach z wykorzystaniem różnorodnych metod.

Unaczynienie guza, zwykle wyrażane jako procent objętości guza, maleje wraz ze wzrostem nowotworu. Tendencja ta została potwierdzona w obliczonym na podstawie obrazów USG spadku gęstości unaczynienia oraz zmniejszeniu stosunku objętości naczyń do objętość tkanki guza. Analogiczna analiza została wykonana dla pomiarów wykonanych metodą micro-CT. Gęstość unaczynienia również maleje ale wartości liczbowe są zdecydowanie większe niż przy obrazowaniu USG. Jest to spowodowane o wiele większą rozdzielczością micro-CT, co umożliwiło rozdzielenie naczyń położonych blisko siebie, które przy pomiarach USG były traktowane jako jedno większe zadanie. Przy procencie wyrażającym stosunek objętości unaczynienia do objętości tkanki nowotworowej zauważalna jest pewna rozbieżność. Przy pomiarach

USG stosunek ten jest coraz mniejszy, natomiast przy pomiarach micro-CT wartość ta zdecydowanie rośnie. Możliwe są dwa źródła tej zmienności. Po pierwsze, przy pomiarach USG guzów S prawidłowe naczynia krwionośne gałki ocznej prawdopodobnie zostały błędnie zakwalifikowane jako naczynia neoangiogenne. Skutkiem tego byłoby pozorne zwiększenie stosunku objętości naczyń do guza, podczas gdy rzeczywista wartość powinna być o wiele mniejsza. Po drugie, w niewielkich guzach obecne są dość duże obszary awaskularne, ponieważ dyfuzja jest głównym i wystarczającym sposobem transportu substancji odżywczych w guzach S [134], dlatego też procent unaczynienia wyliczony na podstawie micro-CT jest tak niewielki.

Tempo przepływu krwi w naczyniach nowotworowych jest bardzo istotnym parametrem, ponieważ charakteryzuje mikro-środowiska guza a także umożliwia ocenę odpowiedzi guza na zastosowaną procedurę terapeutyczną. Przepływ krwi w guzie jest niezbędny, aby dotarły do niego leki np. chemioterapeutyczne [135]. W naturalnych warunkach fizjologicznych obserwowana jest duża zmienność w unaczynieniu gałki ocznej [102], dlatego nic dziwnego, że w różnych stanach patologicznych zmienność ta może być jeszcze większa. Przepływ krwi w gałce ocznej jest pulsacyjny, jego natężenie zwiększa się przy czerniaku oka. Wielu autorów wskazuje, że po radioterapii czerniaka gałki ocznej dochodzi do zmniejszenia ilości naczyń krwionośnych oraz do zmniejszenia w nich tempa przepływu krwi [136,137]. W ramach tej pracy nie zauważono zmian w procencie unaczynienia guzów przed i po terapii ani nie zmieniło się tempo przepływu krwi. Stwierdzono jednak dużą różnicę w tempie przepływu krwi w zależności od wielkości guza. W guzach L krew płynęła wolniej niż w kontroli i guzach S. Powszechnie wiadomo [138], że im większy guz, tym większe prawdopodobieństwo zaobserwowania w jego środku nieodżywionego, nekrotycznego rdzenia. Naczynia krwionośne w obrębie guza tworzą chaotyczną i dziurawą sieć, co powoduje spowolnienie tempa przepływu krwi w guzach L.

Unaczynienie guza 92.1 rosnącego w gałce ocznej myszy SCID różniło się znacznie od guza BHM Ma. Najważniejszą różnicą było to, że naczynia w guzie 92.1 rosły tylko i wyłącznie powierzchniowo, natomiast w głębi guza tworzyły duże, martwicze sfery. Być może słabsze unaczynienie tych guzów (w porównaniu do BHM Ma) jest jedną z przyczyn braku przerzutów do płuc i wątroby u myszy.

7.4 Optymalizacja stężenia witaminy D.

Najważniejszym wnioskiem płynącym z przeprowadzonego eksperymentu pilotowego jest toksyczny efekt wysokiego stężenia witaminy D przy jednorazowym podaniu dootrzewnowym. Teza ta została udowodniona poprzez obserwacje behawioralne zwierząt poparte zmianami w organach wewnętrznych na poziomie makro- i mikroskopowym.

Zaobserwowano wyraźną zmianę w zachowaniu zwierząt po podaniu dużej dawki kalcytriolu [139]. Przed iniekcją zwierzęta były spokojne i przyzwyczajone do opiekunów, natomiast po podaniu witaminy D przez kolejne 72h zachowywały się agresywnie i niespokojnie. Było to prawdopodobnie spowodowane bólem, który zwierzęta odczuwały, z powodu uszkodzeń wątroby. Uszkodzenia wątroby widoczne były już na poziomie makroskopowym w czasie przeprowadzania badania post mortem co dowodzi hepatotoksycznego efektu wysokiego stężenia witaminy D.

W czasie kilku etapów metabolizmu witaminy D, magnez działa jako kofaktor zachodzących reakcji. Z tego względu możliwy jest spadek poziomu magnezu po podaniu wysokich dawek witaminy D [140]. Nie zaobserwowano powyższej zależności w przeprowadzonym eksperymencie. Należy jednak mieć na uwadze, że powszechnie wykorzystywane testy pomiaru stężenia magnezu opierają się na badaniu jego ilości w osoczu. Nie wyklucza to możliwości spadku wewnątrzkomórkowego stężenia magnezu.

Poziom kalcyfediolu był taki sam we wszystkich grupach eksperymentalnych. Oznacza to, że po 72h nie ma już podwyższonego jego stężenia, ponieważ podana biologicznie aktywna forma witaminy D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) została do tego czasu zmetabolizowana. Najprawdopodobniej dopiero regularne podawanie niższych dawek witaminy D wpłynęłoby na wzrost stężenia kalcyfediolu jak i wapnia w osoczu. Podawanie 5 razy w tygodniu przez okres 5 tygodni analogu witaminy D ($1 \alpha\text{-OH-D}_2$) myszom transgenicznym rozwijającym spontanicznie czerniaka oka skutkowało zmniejszeniem rozmiaru guzów oraz wzrostem stężenia wapnia w osoczu [141].

Zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost stężenia AST u chomików, którym podano 200 nM witaminy D w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej. Biorąc pod

uwagę funkcję AST, sugeruje to uszkodzenie wątroby ze względu na toksyczne stężenie kalcytriolu. Podwyższony poziom zarówno AST jak i ALT był już obserwowany u chomików z martwicą lub neoplazją wątroby [142]. Klinicznie bardziej istotny jest współczynnik wyznaczony przez stosunek AST do ALT. Jeśli wartość ta jest wyższa od 1 sugeruje to chorobę wątroby natomiast wyższa niż 2 oznacza toksyczne uszkodzenie wątroby [143]. U zwierząt z grupy kontrolnej stosunek ten był bliski 1 natomiast u zwierząt po podaniu wysokiego stężenia witaminy D- bliski 2. O ile po podaniu 200nM kalcytriolu wynik AST/ALT potwierdza jej toksyczność, to wartość otrzymana dla grupy kontrolnej może budzić pewne wątpliwości. Można to jednak wytłumaczyć dwojako. Po pierwsze zwierzęta przeznaczone do tego eksperymentu były w podeszłym wieku (blisko 2 lata) co rzutuje na sprawność wątroby [142]. Jednakże wszystkie zwierzęta były w tym samym wieku, dlatego założono, że nawet jeśli stosunek AST/ALT był podwyższony na początku eksperymentu to był on podwyższony na tym samym poziomie u wszystkich zwierząt. Drugą przyczyną takiej obserwacji może być fakt, że kalcytriol musiał być rozpuszczony w alkoholu, dlatego grupie kontrolnej podano również odpowiednie stężenie alkoholu. Chomiki metabolizują alkohol bardzo sprawnie, ponieważ gdy żyły na wolności, musiały zjadać sfermentowane nasiona przechowywane w wilgotnych norach [139]. Najczęściej przy toksycznym uszkodzeniu wątroby obserwuje się również podwyższony poziom transpeptydazy gamma-glutamylowej [143]. W wyniku przeprowadzonego eksperymentu nie doszło do podwyższenia stężenia GGTP z powodu uszkodzenia innych regionów wątroby niż drogi żółciowe.

Problem toksyczności witaminy D nie może być bagatelizowany, ponieważ już w 2010 roku opublikowano wyniki badań wskazujące, że podawanie wysokich dawek 25(OH)D dwukrotnie zwiększa ryzyko rozwoju nowotworu trzustki [144]. Najczęściej dyskutowanym skutkiem ubocznym podawania witaminy D jest hiperkalcemia [145,146]. Dane literaturowe mówią, że stężenie witaminy D powinno mieścić się w zakresie 5,3 – 12 mg/dl [142]. U wszystkich zwierząt, które brały udział w eksperymencie widoczne było przekroczenie tej normy. Najprawdopodobniej przyczyną był podeszły wiek samic biorących udział w eksperymencie. U zwierząt, podobnie jak u ludzi, powszechnie obserwuje się zaburzenia metabolizmu wapnia, które związane są z zaburzoną gospodarką hormonalną zwierząt w podeszłym wieku [147].

Badania ultrastrukturalne wątroby i nerek uzyskane przy pomocy mikroskopii elektronowej wykazała, prawidłową budowę obu organów, pomimo podeszłego wieku zwierząt. Po podaniu kalcytriolu pojawiły się pęcherzyki lizosomalne oraz wakuole autofagowe, których ilość wzrastała wraz ze stężeniem kalcytriolu. Spowodowane było to toksycznym wpływem kalcytriolu na metabolizm komórkowy, co manifestowało się również powiększeniem mitochondriów. Powyższe zmiany w wyglądzie komórek zarówno w wątrobie jak i w nerkach są spójne z obronnymi mechanizmami komórkowymi przeciwko czynnikowi toksycznemu. Zmiany w nerkach są najprawdopodobniej wynikiem nieprawidłowego metabolizmu kalcytriolu przez uszkodzoną wątrobę.

7.5. Terapia protonowa

Terapia protonowa od lat cieszy się dużym zainteresowaniem, zwłaszcza jeśli chodzi o leczenie nowotworów organów krytycznych, do których zaliczana jest gałka oczna. W literaturze opisywany jest szereg czynników, którymi próbuje się wzmacniać skuteczność terapii protonowej. To wzmocnienie skuteczności powinno manifestować się nie tylko zahamowaniem lub regresją wzrostu nowotworu, ale również zminimalizowaniem liczby przerzutów, redukcją skutków ubocznych i wydłużeniem średniego czasu przeżycia. Podejmuje się próby wspomaganie terapii protonowej poprzez zwiększanie radioczułości komórek nowotworowych podając nanocząsteczki $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TaO}_x$ [148] czy PtNPs [149]. Wykazano również [150], że inhibicja polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP-1), która reguluje wymianę zasad po uszkodzeniu DNA, zwiększa cytotoksyczność promieniowania protonowego w szerokim zakresie LET.

W przeprowadzonym eksperymencie przebadano 4 różne dawki wiązki protonów: 6, 10, 20 i 30 Gy, jak również zaproponowano wzmocnienie tej terapii dwoma czynnikami: lekiem antyangiogennym oraz witaminą D. Powszechnie wiadomo, że terapia protonowa per se powoduje nie tylko niszczenie komórek nowotworowych ale również oddziałuje na całą niszę i mikro-środowisko nowotworu. W literaturze można znaleźć wiele danych sugerujących, że protony (w przeciwieństwie np. do promieniowania gamma) hamują proces angiogenezy poprzez zmniejszenie ekspresji czynników proangiogennych, takich jak VEGF, IL-8 czy HIF-1 α [151,152]. Dzięki

temu guz pierwotny jest gorzej odżywiony i maleje prawdopodobieństwo rozsiewu komórek do organów odległych. Z drugiej jednakże strony, komórki w stanie hipoksji są bardziej promieniooporne, co skutkuje zmniejszeniem skuteczności radioterapii [153]. Podejmuje się próby leczenia lub wspomaganie terapii przeciwko czerniakowi oka u pacjentów poprzez podanie leku antyangiogenego bewacizumabu (Avastin®). Doniesienia na temat skuteczności tej metody są ostrożne. Francis i wsp. [154] przedstawili, że dogłokowe podanie leku bewacizumab nie zmniejsza rozmiaru czerniaka oka. Logan et al. [155] przebadali odpowiedź trzech linii czerniaka oka (92.1, OCM-1 oraz UW-1) na hodowlę bez oraz z 100 µg/ml bewacizumabu. We wszystkich liniach obserwowano spadek VEGF-A oraz ufosforylowanego receptora VEGF-R2. Jednocześnie zauważono jednak aktywację mechanizmów kompensacyjnych (w tym wzrost produkcji MMP-9 i CCL-3) dzięki czemu nie zaobserwowano istotnych zmian funkcjonalnych w żadnej z linii komórkowych. W pierwszej połowie 2018 roku pojawiło się doniesienie, w którym autorzy sprawdzali skuteczność podanego dogłokowo bewacizumabu w kontekście terapii jaskry neowaskularnej [156]. Analiza wykazała, że po podaniu leku doszło co prawda do zmniejszenia ciśnienia wewnątrzgałkowego, jednakże nie wpłynęło to na odsetek pacjentów, których zakwalifikowano do enukleacji pomimo terapii protonowej. Połączenie terapii protonowej z terapią antyangiogeną jest często wskazywanym podejściem w leczeniu wielu schorzeń, jednakże brakuje bezspornych danych zarówno na poziomie badań przedklinicznych jak i klinicznych, które wskazywałyby na skuteczność tego połączenia. Próba odpowiedzi na to pytanie w ramach niniejszej pracy jest więc zasadna. We wcześniejszych badaniach [157] udowodniono, że komórki BHM Ma produkują VEGF, dlatego możliwe jest sprawdzenie skuteczności zastosowania leku, który wiąże VEGF uniemożliwiając jego przyłączenie do odpowiedniego receptora. Podjęto również próbę zbadania czy podanie witaminy D może zmienić tempo wzrostu guza pierwotnego oraz czy zwiększy skuteczność terapii protonowej. Badania na poziomie komórkowym wykazały [91], że komórki BHM Ma są bardziej czułe na promieniowanie protonowe po hodowli z kalcitriolem oraz z kalcyfediolem a efekt ten jest tym większy im większe stężenie pochodnych witaminy D. Nie znaleziono informacji na temat podobnych badań na poziomie in vivo, dlatego przeprowadzono pilotowy eksperyment, który pozwolił na wyznaczenie optymalnego stężenia biologicznie aktywnej witaminy D, którą podawano na 72 h przed przeprowadzeniem terapii protonowej.

Guzy BHM Ma w przedniej komorze oka wyrastały w długim przedziale czasowym po implantacji. Zdecydowana większość guzów (91%) pojawiała się między 5 a 14 dniem od implantacji, co jest zgodne z wcześniejszymi eksperymentami przeprowadzonymi na tym samym modelu zwierzęcym [158]. Jednak zdarzały się przypadki, w których to guz wyrósł zdecydowanie szybciej lub z dużym opóźnieniem. Nie jest to cechą pożądaną, ponieważ zmniejsza to jednorodność użytego modelu badawczego. Niemniej jednak przy zwierzęcych modelach nowotworowych taki rozrzut jest dość często spotykany. Jannasch i wsp. opisali, że nawet u pojedynczej myszy z kilkoma ogniskami nowotworu guzy różniły się tempem wzrostu [159].

Zwierzęta transportowano do Centrum Cyklotronowego Bronowice IFJ PAN na terapię protonową 24 godziny po pojawieniu się w przedniej komorze oka guzów. Przetestowano skuteczność następujących dawek wiązki protonów: 6, 10, 20 i 30 Gy. Wybór tych dawek nie był przypadkowy. Wcześniejsze badania przeprowadzone w naszej grupie badawczej na tym samym modelu zwierzęcym [158] wskazywały, że zastosowanie dawki 10 Gy spowalnia wzrost guza pierwotnego oraz redukuje ilość przerzutów do płuc. Dawka ta została więc przyjęta jako punkt wyjścia. W celu wyznaczenia dawki optymalnej, dzięki której dochodziłoby do całkowitego zahamowania wzrostu guza pierwotnego oraz zatrzymania jego rozsiewu, sprawdzono skuteczność większej liczby dawek. W praktyce klinicznej najczęściej stosuje się dawkę w zakresie 53 do 70 Gy dostarczaną w 4 frakcjach dzień po dniu [160]. Niestety, niemożliwe było przetestowanie procedur stosowanych klinicznie, ponieważ zwierzęta do przeprowadzenia terapii muszą być poddane anestezji farmakologicznej. Chomiki syryjskie źle znoszą uśpienie mieszaniną ketaminy i ksylazyny, z wcześniejszych eksperymentów pilotażowych wiemy, że zwierzęta poddane powtórnej anestezji farmakologicznej w krótkim odstępie czasu (około 24 godzin) często nie wybudzały się, najprawdopodobniej na skutek depresji krążeniowo-oddechowej [161]. Z tego względu zdecydowano się na zastosowanie dwóch wysokich dawek (20 i 30 Gy) aplikowanych pojedynczo. Za wyborem wysokich dawek przemawia również fakt, że pojedyncze dostarczenie wysokiej dawki radioterapii skutkuje przedłużonym średnim przeżyciem oraz lepszą lokalną kontrolą niż przy zastosowaniu dawki o niższej energii [162]. Wybór najniższej dawki protonów, czyli 6 Gy, był podyktowany chęcią porównania jej efektu z wcześniej opisanymi i opublikowanymi [158] wynikami napromieniania tych samych guzów traktowanych promieniowaniem γ i β w dawce 6 Gy.

Otrzymane wyniki pokazują, że jednorazowe napromienianie wiązką protonów w dawce 6 Gy nie spowalnia wzrostu guza BHM Ma. Wyniki *in vitro* [91] przeprowadzone z wykorzystaniem linii BHM Ma wskazują, że frakcja komórek przeżywających napromienianie wiązką protonów w dawkach 1, 3 i 5 Gy jest najmniejsza przy zastosowaniu dawki 5 Gy. Inne badania *in vitro* [163] przeprowadzone na komórkach czerniaka sugerują, że zastosowanie wiązki protonów w dawce 5 Gy skutecznie zmniejsza ich ruchliwość aż o 71-79% co sugeruje możliwą redukcję przerzutów w układzie *in vivo*. Brakuje literatury opisującej odpowiedź guzów na terapię protonową niskimi dawkami w modelu *in vivo*. W jednej z odnalezionych publikacji [164] opisano eksperyment, w którym napromieniano wiązką protonów w dawkach 3,9 i 7,9 Gy ludzkiego raka płaskonabłonkowego inokulowanego do małżowiny usznej myszy NMRI. Po zastosowaniu niższej dawki promieniowania protonowego doszło do opóźnienia rozpoczęcia wzrostu guzów o 7 dni, a po zastosowaniu wyższej dawki - o 15 dni w porównaniu do kontroli. Otrzymane wyniki porównano z wynikami terapii protonowej ludzkiej glioblastomy wielopostaciowej LN229 implantowanej również do małżowiny usznej myszy NMRI. Przetestowano dawki 3,5 Gy; 7,0 Gy; 10,5 Gy oraz 14 Gy. W tym układzie eksperymentalnym również doszło do przesunięcia w czasie wzrostu guzów pierwotnych i przesunięcie to było tym większe, im wyższa była dawka protonów. Autorzy zwracają jednak uwagę, że dla ludzkiego raka płaskonabłonkowego skuteczne są dawki niższe niż dla LN229 oraz, że na podstawie przeprowadzonych badań *in vivo* rekomendowane jest inne okno czasowe wykonywania terapii dla tych dwóch nowotworów. Oznacza to, że niezbędna jest dokładna optymalizacja zastosowanej dawki dla poszczególnych typów nowotworów wzrastających w różnych miejscach organizmu żywego.

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu wykazano, że terapia protonowa w dawce 10 Gy skierowana przeciwko BHM Ma rosnącemu w przedniej komorze oka, spowalnia wzrost guza pierwotnego. W eksperymencie przeprowadzonym na tym samym modelu, widoczne jest także zahamowanie wzrostu guzów pierwotnych po zastosowaniu wiązki protonów w dawce 10 Gy [158]. Należy jednak zauważyć znaczną rozbieżność pomiędzy kinetyką wzrostu guzów nietraktowanych zaprezentowaną przez Romanowską-Dixon i wsp. a kinetyką wzrostu guzów z grupy kontrolnej przedstawionej w tej pracy. W publikacji [158] pokazano, że guzy nietraktowane promieniowaniem potrzebują około 15 dni aby wypełnić przednią komorę oka

w całości, natomiast w eksperymencie przeprowadzonym w ramach tej pracy trwało to tylko 4 dni, czyli prawie 4 razy krócej. Zmienność ta może wynikać z faktu, że eksperyment przeprowadzony był na zwierzętach pochodzących od innego hodowcy.

Tak szybki rozwój nowotworów spowodował, że do analizy ilościowej należy podejść z dużą rozważą. Każdy model matematyczny ma swoje zalety i ograniczenia, ale prawdopodobieństwo wykonania nieprawidłowego dopasowania maleje wraz ze wzrostem liczby punktów eksperymentalnych. Ilość obserwacji rozwoju objętości guza w czasie była w poniższej pracy niewielka, ze względu na gwałtowny rozwój guza pierwotnego i konieczność wykonania enukleacji. Zaproponowane dopasowanie liniowe dało współczynnik determinacji R^2 rzędu 0,9 co oznacza, że wybranie tej metody nie jest błędne z matematycznego punktu widzenia. Jednakże z biologicznego punktu widzenia o wiele większy sens ma dopasowanie eksponenty. Typowa krzywa wzrostu nowotworu ma kształt sigmoidalny. W zaproponowanym modelu badawczym, nie obserwujemy jednak punktu przegięcia sigmoidy, ze względu na znaczne ograniczenia przestrzenne środowiska, w którym rozwijały się guzy. Z tego względu pierwszy odcinek sigmoidy jest traktowany jako eksponenta. Nie we wszystkich krzywych kinetyki wzrostu widać kształt eksponencjalny (zwłaszcza w kontroli). Jest to spowodowane tym, że pojawiały się zwierzęta, u których kinetyka wzrostu guza znacznie odbiegała od pozostałych, co manifestuje się w zmienionym kształcie uśrednionej kinetyki. Jednak przy dopasowywaniu eksponent dla każdego pojedynczego guza, waga tych z guzów, które znacznie odbiegały od pozostałych wynosiła 0 lub blisko 0 (w zależności od wyznaczonego współczynnika R^2) a tym samym nie miała znaczącego wpływu na wartości wyznaczonych parametrów opisujących dopasowanie.

Przy użyciu jednorazowej dawki w wysokości 20 lub 30 Gy lub więcej obserwowano znaczne uszkodzenia prawidłowych struktur oka. Najprawdopodobniej było to spowodowane tym, że napromieniona była cała gałka oczna, a nie tylko komórki nowotworowe, wysoką dawką energii. Interesującą i nową techniką, która być może pozwoliłaby w przyszłości uniknąć takiej sytuacji, jest tzw. terapia protonowa miniwiązką (ang. Proton minibeam radiation therapy, pMBRT). Przeprowadzono eksperyment [165], w którym napromieniano mózgi szczurów wiązką protonów w dawce 25Gy. Przy zastosowaniu klasycznego sposobu napromieniania szeroką wiązką protonów u zwierząt obserwowano ciężkie łuszczenie skóry, trwały alopecję oraz poważne uszkodzenia tkanki mózgu. Natomiast przy użyciu pMBRT nie

dochodziło do uszkodzeń skóry, depilacja była tylko czasowa a co najważniejsze zmiany w mózgu były znacznie zredukowane. Wyniki te wskazują, że zastosowanie pMBRT prowadzi do zwiększenia oporności tkanek prawidłowych. Zastosowanie pMBRT do napromieniania delikatnego płata ucha myszy BALB/c również skutkowało znaczną redukcją opuchlizny, rumienia oraz złuszczenia skóry. Dodatkowo podejście to wyeliminowało nieodwracalne zniszczenie płata małżowiny usznej obserwowane przy zastosowaniu klasycznej szerokiej wiązki protonów [166]. Doniesienia te sugerują, że przy napromienianiu wiązką protonów tak delikatnej struktury jaką jest oko, warto jest rozważyć w przyszłości zastosowanie pMBRT zamiast klasycznej protonoterapii.

Terapia wiązką protonów w dawce 20 i 30 Gy w dyskutowanym w pracy modelu badawczym mogła być również nieskuteczna ze względu na jej wpływ na zmianę transkrypcji szeregu czynników genetycznych. W 2016 roku Yun-Suk Kwon i wsp. [167] opisali doświadczenie, w którym napromieniano wiązką protonów guza 4T1 u myszy Balb/c. Zastosowano jednorazowe napromienianie wiązką w dawce 10, 20 i 30 Gy. Wszystkie guzy napromieniano przy zadanej objętości a ich odpowiedź była podobna - doszło do takiego samego spowolnienia wzrostu guza bez względu na zastosowaną dawkę. Co ciekawe, przy 20 Gy obserwowano zwiększenie ekspresji urokinazy, metaloproteinazy 2 i 9, które to odgrywają istotną rolę w progresji nowotworu. Dodatkowo, u zwierząt napromienianych wiązką protonów w dawce 30 Gy zauważono zmniejszenie ekspresji VEGF przy jednoczesnej redukcji przerzutów do płuc. Zarówno dawka 10 jak i 20 Gy nie powodowała zmniejszenia masy przerzutów. Wyniki te również potwierdzają, że niezbędna jest dokładna optymalizacja zastosowanej dawki dla poszczególnych typów nowotworów wzrastających w różnych lokalizacjach.

W pracy dokonano podziału guzów ze względu na rozmiar w momencie wykonywania terapii. Wyodrębniono dwie grupy, w których:

- guzy S miały objętość mniejszą niż 3 mm^3 ,
- guzy L miały objętość większą lub równą 3 mm^3 ,

w dniu przeprowadzania terapii. Podział taki wydaje się zasadny z kilku powodów. Po pierwsze guzy L wyrastały szybciej niż guzy S, być może ze względu na większą ilość

żywych komórek w implantowanym skrawku. Po drugie, po dopasowaniu eksponent do krzywych wzrostu parametr a informujący o początkowych warunkach potwierdzał matematycznie różnicę między guzami S i L. Podział taki jest również uzasadniony z punktu widzenia klinicznego. W drugiej połowie 2018 roku Bellocq i wsp. [168] opisali 20-letnie badanie liczby i lokalizacji przerzutów oraz długość czasu przeżycia po terapii protonowej czerniaków naczyniówki. Z przeprowadzonej przez nich metaanalizy wynika, że pacjenci, których poddawano terapii protonowej w momencie, gdy guz był duży (czyli miał średnicę większą niż 11 mm) mieli 40,5% szansy na 10 letnie przeżycie bez przerzutów a tym samym ich średnia długość przeżycia była krótsza. Natomiast pacjenci, którzy byli napromieniani wiązką protonów, gdy guz miał średnicę mniejszą lub równą 11 mm mieli 76,7% szansy na 10 letnie przeżycie bez przerzutów a tym samym ich średnia długość przeżycia była dłuższa. Wnioski te są bardzo istotne klinicznie, ponieważ obserwację prowadzono dwukrotnie dłużej niż jest to przyjęte w praktyce- najczęściej mówi się bowiem o współczynniku 5- letniego przeżycia. Rozmiar guza w momencie jego wykrycia i planowania terapii ma kliniczne znaczenie również z tego względu, że uważa się, że duże guzy zlokalizowane w głębi gałki ocznej, blisko nerwu wzrokowego o wiele lepiej jest poddać terapii protonowej, natomiast małe guzy zlokalizowane w przedniej terapii lepiej reagują na brachyterapię [169]. Zasadność podziału guzów na ich rozmiar potwierdza również metaanaliza wykonana przez Damato i Coupland [170], w której to przedstawiono, że istnieje zależność między wielkością guza w momencie przeprowadzania terapii a liczbą przerzutów. Pacjenci poddani radioterapii, terapii protonowej lub radykalnej enukleacji w momencie, gdy guz miał średnicę mniejszą niż 10mm, w 75% przeżyli ponad 20 lat bez przerzutów, natomiast pacjenci leczeni, gdy czerniak oka miał średnicę większą niż 18mm - w 25%.

Enukleacja gałki ocznej w momencie, gdy guz wypełniał całą przednią komorę oka, miała na celu prowadzenie długofalowej obserwacji rozwoju przerzutów dystalnych. Usunięcie guza pierwotnego w celu badania rozwoju przerzutów oraz długoterminowych skutków przeprowadzonej procedury terapeutycznej jest metodą skuteczną, jednak możliwości jej zastosowania są ograniczone. Najczęściej technikę tę stosuje się przy nowotworach piersi, prostaty, trzustki [171] czy gałki ocznej [158], ponieważ organy te są stosunkowo łatwo dostępne do chirurgicznego usunięcia. Usunięcie gałki ocznej jest procedurą łatwą do wykonania pod względem technicznym. Przy prawidłowym jej wykonaniu krwawienia nie ma praktycznie w ogóle lub jest

minimalne, a zwierzęta bardzo szybko odzyskują dobrą kondycję [172]. Istnieją również inne metody badania przerzutów w tym podawanie komórek nowotworowych bezpośrednio do żyły ogonowej zwierzęcia [173], jednakże w układzie takim omija się pierwsze etapy procesu formowania przerzutu, w którym to komórka przerzutująca musi odseparować się od pozostałych komórek nowotworowych, które są ze sobą połączone macierzą zewnątrzkomórkową oraz musi przejść przez błonę podstawną i dostać się do światła naczynia krwionośnego. Alternatywnym sposobem badania przerzutów jest wykorzystanie zwierząt modyfikowanych genetycznie, u których spontanicznie rozwijają się nowotwory o dużym potencjale do przerzutowania. Jednym z przykładów opisanych w literaturze są eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem myszy Pdx1-Flp [174], u których dodatkowo można wyciszyć gen *Kras*, który w warunkach fizjologicznych odpowiedzialny jest za kontrolowanie proliferacji komórkowej. Często dyskutowanym minusem pracy ze zwierzętami genetycznie zmodyfikowanymi są sztucznie narzucone warunki rozwoju nowotworu oraz duża rozbieżność czasowa rozwoju zarówno guzów pierwotnych jak i przerzutów [171].

W praktyce klinicznej leczenie czerniaka gałki ocznej nazywane jest radykalnym gdy wykonywana jest enukleacja i zachowawczym gdy podejmuje się próbę zachowania funkcjonalnej gałki ocznej [175]. Przez długi czas powszechnie przyjmowano, że enukleacja jest skuteczną metodą ograniczającą rozwój przerzutów. W dzisiejszych czasach enukleacja jest wykonywana coraz rzadziej, ze względu na opisywaną w literaturze skuteczność brachyterapii, protonoterapii, radioterapii czy laserowej fotonoterapii. Liczne badania wieloośrodkowe, wśród których najpopularniejsze są badania COMS (ang. Collaborative ocular melanoma studies), wskazują, że brachyterapia i radioterapia są równie skuteczne jak enukleacja, a zapewniają możliwość zachowania funkcji wzroku [82].

Skuteczność terapii protonowej jest wciąż dyskutowana, ponieważ pomimo wielu obiecujących doniesień nadal brakuje kompleksowego badania klinicznego IV fazy, które w sposób bezsporny udzieliłby odpowiedzi na pojawiające się wątpliwości [176]. Stale pojawiają się jednak nowe ośrodki, które budują centra terapii protonowej, dzięki czemu możliwe będzie szybkie uzupełnienie tej luki.

7.6. Ocena długofalowej skuteczności zastosowanych procedur terapeutycznych.

Chomiki syryjskie biorące udział w eksperymencie uśmiercano, gdy straciły na wadze, zaczęły szybciej oddychać lub gdy wykazywały oznaki dyskomfortu i/lub bólu. We wszystkich grupach eksperymentalnych zwierzęta zachowywały swoją początkową masę ciała, jednak między 20 a 35 dniem od wykonania enukleacji ich oddech ulegał przyspieszeniu i spłyceniu. W tym okresie u 17 chomików zauważono również wznowę wzrostu guza w oczodole. Zwierzęta te oddzielono jako osobną grupę, ponieważ tylko u nich dochodziło do spadku początkowej masy ciała i pogorszenia ich ogólnej kondycji. Pierwsze eutanazje przeprowadzano już po kilkunastu dniach od enukleacji a średni czas przeżycia nie uległ wydłużeniu po żadnej z przeprowadzonych procedur terapeutycznych. Okazało się jednak, że chomiki obciążone guzami S żyły istotnie statystycznie dłużej po wykonanej enukleacji niż chomiki z guzami L. Oznacza to, że terapia protonowa guzów S nie tylko spowolniła wzrost guza pierwotnego, ale również spowolniła rozsiew przerzutów do płuc, co skutkowało dłuższym przeżyciem zwierząt w dobrej kondycji. Wielu autorów również wskazuje, że im guz mniejszy w momencie przeprowadzenia terapii, tym lepsze jej efekty manifestujące się m.in. dłuższym czasem przeżycia [82,175]. Zwierzęta, u których doszło do wznowy guza pierwotnego, żyły natomiast znacznie krócej niż zwierzęta z grupy kontrolnej oraz te, którym podano witaminę D i Avastin. Najprawdopodobniej spowodowane było to ogólnym wyniszczeniem organizmu związanym z długotrwałym rozwojem nowotworu. Wznowę wzrostu guza w oczodole można uznać za kolejny etap rozwoju guza pierwotnego, ponieważ obserwowaliśmy je tylko i wyłącznie u zwierząt, u których enukleacja była wykonana za późno, lub gdy doszło do uszkodzenia oka. Dlatego nie powinno określać się jej mianem „przerzutu do oczodołu”. Rozwój nowotworu był codziennie monitorowany przy pomocy USG, jednak guzy BHM Ma rosły bardzo gwałtownie i nierówno, co doprowadziło do kilku sytuacji, w których enukleacja była wykonana za późno. U kilku zwierząt zaobserwowano, że guz wyrastał na zewnątrz gałki ocznej, co mogło być spowodowane mechanicznym uszkodzeniem rogówki lub jej zniszczeniem przez zbyt dużą dawkę protonów. Sporadycznie dochodziło również do pęknięcia oka w trakcie wykonywania enukleacji. Przyczyną może być tutaj duży wzrost ciśnienia w gałce ocznej w której rośnie czerniak [177]. We wszystkich tych przypadkach komórki nowotworowe mogły osiedlić się w oczodole bez konieczności przejścia

mezenchymalno-epitelialnego. Wznowy były możliwe do zaobserwowania dopiero gdy guz wypełnił już cały oczodół i zaczynał wyrastać przez powieki. Długotrwały rozwój guza pierwotnego doprowadzał u zwierząt do kacheksji. Kacheksja jest wielonarządowym, wieloczynnikowym i często nieodwracalnym zespołem wyniszczającym związanym z obecnością nowotworu, ale również z innymi chorobami przewlekłymi, takimi jak AIDS czy przewlekłą niewydolnością serca. Leczenie pacjentów z objawami kacheksji opiera się obecnie na niwelowaniu dwóch nadrzędnych przyczyn tego stanu: zaburzeń łaknienia i zaburzeń metabolicznych [178]. Istotnie statystyczny spadek wagi u chomików, u których doszło do wznowy, potwierdzają podejrzenie kacheksji. W klinice również obserwowane są wznowy różnych nowotworów ludzkich a ich leczenie jest z reguły bardzo trudne, dlatego niezbędne jest dalsze prowadzenie badań w tym kierunku. Przeprowadzona metaanaliza wśród pacjentów z czerniakiem gałki ocznej wykazała, że u 5,1% pacjentów po brachyterapii dochodziło do wznowy guza. Wówczas przeprowadzana była enukleacja, przerzuty pojawiły się u 18,75% pacjentów, a średni czas przeżycia był krótszy niż u pacjentów u których nie doszło do wznowy [179].

Średnia masa płuc chomika syryjskiego wynosi 1,8g. U wszystkich zwierząt poddanych terapii przeciwnowotworowej doszło do rozwoju przerzutów w płucach. Obserwowano duże, groniaste wysoce upigmentowane guzki w całej objętości płuc, co skutkowało zwiększeniem średniej wagi narządu ponad trzykrotnie. U pacjentów z czerniakiem gałki ocznej najczęściej obserwuje się rozwój przerzutów do wątroby, płuc, kości i skóry [180]. Czerniak BHM Ma, który był inokulowany do oka chomika syryjskiego jest jednak czerniakiem skóry, dlatego w tym eksperymencie obserwowano rozwój typowych dla niego przerzutów do płuc. Spłylenie i przyspieszenie oddechu u zwierząt było więc konsekwencją rozwoju przerzutów i zmniejszeniem powierzchni prawidłowej tkanki płucnej, gdzie dochodzi do wymiany gazowej. Co ciekawe, u zwierząt ze wznową oczodołową guza inokulowanego pierwotnie w przedniej komorze oka przerzutów nie było w ogóle lub było ich bardzo niewiele. Chomiki ze wznową żyły krócej niż zwierzęta w pozostałych grupach eksperymentalnych, jednak nie na tyle krótko, żeby dopatrywać się w tym przyczyny braku przerzutów. Wznowa rozrasta się z fragmentu guza pierwotnego pochodzącego ze skóry, który zaczyna rosnać w bardziej naturalnym dla niego środowisku tkanki łącznej wyściełającej oczodół. W takiej sytuacji guz wydobywa się ze środowiska immunologicznie

uprzywilejowanego, jakim jest gałka oczna [181]. Komórki BHM Ma we wznowie są wówczas atakowane przez komórki układu immunologicznego, co być może ogranicza formowanie przerzutów. Odmienne zachowanie tego samego nowotworu na tym samym modelu zwierzęcym ale inokulowanego w innych miejscach jest obserwowane np. w mysim modelu raka okrężnicy CT26 [182]. Przy implantacji tych komórek w okolicę barku guzy rosły 4 razy szybciej niż przy implantacji takiej samej ilości komórek w okolicę biodra. Drugim czynnikiem, który wydaje się prawdopodobny, jest wydzielanie przez guz pierwotny czynników hamujących rozsiew komórek nowotworowych. Hamowanie takie może zachodzić m.in. poprzez produkowanie przez komórki guza pierwotnego np. angiostatyny [124,183]. Angiostatyna hamuje proces angiogenezy, jak również zmniejsza aktywność i zdolność migracyjną neutrofilii [184]. Aby w sposób jednoznaczny sprawdzić, co jest przyczyną braku przerzutów u chomików ze wznową guza pierwotnego należałoby wykonać szereg oznaczeń pod kątem zmian w stężeniu czynników prozapalnych i czynników wzrostu na kilka dni przed i kilka dni po wykonaniu enukleacji.

Doświadczenia przeprowadzone w ramach tej pracy dały wiele odpowiedzi na zadane pytania badawcze, ale również otworzyły drzwi do dalszego zgłębienia poruszonych problemów. Wykazano, że inokulacja skrawków BHM Ma do oka chomika syryjskiego skutkuje rozwojem bardzo agresywnego guza, który przerzutuje do płuc. Terapia protonowa skutecznie wydłuża życie tych zwierząt, ale tylko wtedy, gdy zostanie zastosowana wystarczająco szybko. Niezbędna jest jednak dalsza praca z wykorzystaniem modeli zwierzęcych m.in. w celu zbadania mechanizmu, który kryje się za brakiem przerzutów u zwierząt ze wznową guza pierwotnego w oczodole. Również ciekawym kierunkiem, którym należy podążać w celu rozwoju wiedzy nad omawianą w pracy tematyką jest próba uzyskania przerzutów do wątroby u myszy nie w pełni immunokompetentnych z inokulowanymi komórkami ludzkiego czerniaka do tylnej części gałki ocznej.

8. Wnioski końcowe

Po dokonaniu analizy uzyskanych wyników i ich przedyskutowaniu, sformułowano następujące odpowiedzi na postawione w pracy cele szczegółowe (rozdz. 4, str. 31):

- 1) Komórki BHM Ma mają w hodowli bardzo krótki czas podwojenia populacji oraz wykazują wzrost aktywności migracyjnej wraz z gęstością wysiania.
- 2) Objętość unaczynienia guzów przez cały czas okres ich rozwoju (zarówno przed jak i po terapii) stanowiło stały odsetek objętości guza (24,71%). Wraz ze wzrostem objętości guza malała jednak funkcjonalność naczyń krwionośnych, obserwowana jako spadek tempa przepływu krwi.
- 3) Optymalizacja protokołu przygotowania tkanek miękkich do pomiaru guzów metodą mikro-tomografii komputerowej umożliwiła uzyskanie wysokorozdzielczych, trójwymiarowych rekonstrukcji gałki ocznej wraz z guzem w przedniej komorze i jego unaczynieniem.
- 4) Zbadano odpowiedź guzów BHM Ma zlokalizowanych w przedniej komorze oka chomika syryjskiego na terapię wiązką protonów w dawkach 6, 10, 20 i 30 Gy. Napromienianie guzów, których objętość była $\leq 3\text{mm}^3$ w jednorazowej dawce 10 Gy skutkowało spowolnieniem wzrostu guza pierwotnego. Napromienianie guzów BHM Ma wiązką protonów w dawce jednorazowej większej lub równej 20 Gy powodowało uszkodzenia prawidłowych struktur oka.
- 5) Nie można jednoznacznie potwierdzić czy podanie leku Avastin® lub witaminy D zwiększa skuteczność terapii protonowej w badanym modelu. Konieczne są dalsze badania w tym kierunku.
- 6) Zaobserwowano znaczące wydłużenie czasu przeżycia zwierząt z guzami, których objętość w momencie wykonywania terapii była $\leq 3\text{mm}^3$, w porównaniu do guzów, których objętość była większa niż 3mm^3 . Wznowy guza w oczodole powodują skrócenie czasu życia w porównaniu do zwierząt nie napromienianych z grupy kontrolnej i po podaniu leku Avastin® lub witaminy D.
- 7) U wszystkich zwierząt z guzem BHM Ma w przedniej komorze oka doszło do rozwoju przerzutów w płucach. Żadne z zastosowanych podejść

terapeutycznych nie skutkowało zmianą umiejscowienia przerzutów ani ich masy w płucach.

Podsumowując, terapia protonowa jest dobrą bronią przeciwko czerniakowi oka, rosnącemu w przedniej komorze oka chomika, jeśli zostanie użyta w odpowiednim czasie. Pomimo braku zmniejszenia rozsiewu nowotworu do płuc, dochodzi do znaczącego wydłużenia średniego czasu życia zwierząt.

9. Literatura

1. Mould, R.F. The early history of x-ray diagnosis with emphasis on the contributions of physics 1895-1915. *Phys. Med. Biol.* 1995, *40*, 1741–1787.
2. Wilson, R.R. Radiological Use of Fast Protons. *Radiology* **1946**, *47*, 487–491.
3. Tobias, C.A.; Lawrence, J.H.; Born, J.L.; Mccombs, R.K.; Roberts, J.E.; Anger, H.O.; Low-Beer, B.V.A.; Huggins, C.B. Pituitary Irradiation with High-Energy Proton Beams A Preliminary Report. *Cancer Res.* **1958**, *18*, 121–134.
4. Newhauser, W.D.; Zhang, R. The physics of proton therapy. *Phys. Med. Biol.* 2015, *60*, R155–R209.
5. Kacperek, A. Clinical Proton Dosimetry Part I: Beam Production, Beam Delivery and Measurement of Absorbed Dose (ICRU Report 59). *Phys. Med. Biol.* **2000**, *45*, 3123–3124.
6. Zhang, R.; Taddei, P.J.; Fitzek, M.M.; Newhauser, W.D. Water equivalent thickness values of materials used in beams of protons, helium, carbon and iron ions. *Phys. Med. Biol.* **2010**, *55*, 2481–2493.
7. Girdhani, S.; Sachs, R.; Hlatky, L. Biological Effects of Proton Radiation: What We Know and Don't Know. *Radiat. Res.* **2013**, *179*, 257–272.
8. Krämer, M.; Weyrather, W.K.; Scholz, M. The Increased Biological Effectiveness of Heavy Charged Particles: From Radiobiology to Treatment Planning. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2003**, *2*, 427–436.
9. Raju, M.R. Proton radiobiology, radiosurgery and radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 1995, *67*, 237–259.
10. Belli, M.; Bettega, D.; Calzolari, P.; Cera, F.; Cherubini, R.; Dalla Vecchia, M.; Durante, M.; Favaretto, S.; Gialanella, G.; Grossi, G.; et al. Inactivation of human normal and tumour cells irradiated with low energy protons. *Int. J. Radiat. Biol.* **2000**, *76*, 831–9.
11. Mohan, R.; Grosshana, D. Proton Therapy- Present and Future. *Adv Drug Deliv Rev* **2017**, *109*, 26–44.
12. Jones, B. Proton radiobiology and its clinical implications. *Ecancermedicalscience* 2017.
13. Jones, B. Towards achieving the full clinical potential of proton therapy by inclusion of LET and RBE models. *Cancers (Basel)*. 2015.
14. Santivasi, W.L.; Xia, F. Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *21*, 251–259.
15. Sui, L.; Wang, Y.; Wang, X.; Kong, F.Q.; Liu, J.C.; Zhou, P.K. Clustered DNA damage induced by protons radiation in plasmid DNA. *Chinese Sci. Bull.* **2013**, *58*, 3217–3223.

16. Kakarougkas, A.; Jeggo, P.A. DNA DSB repair pathway choice: An orchestrated handover mechanism. *Br. J. Radiol.* 2014.
17. HADA, M.; GEORGAKILAS, A.G. Formation of Clustered DNA Damage after High-LET Irradiation: A Review. *J. Radiat. Res.* **2008**, *49*, 203–210.
18. Lakin, N.D.; Jackson, S.P. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* **1999**, *18*, 7644–7655.
19. Moeller, B.J.; Cao, Y.; Li, C.Y.; Dewhirst, M.W. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 429–441.
20. Ahmed, S.K.; Brown, P.D.; Foote, R.L. Protons vs Photons for Brain and Skull Base Tumors. *Semin. Radiat. Oncol.* 2017.
21. Ares, C.; Hug, E.B.; Lomax, A.J.; Bolsi, A.; Timmermann, B.; Rutz, H.P.; Schuller, J.C.; Pedroni, E.; Goitein, G. Effectiveness and Safety of Spot Scanning Proton Radiation Therapy for Chordomas and Chondrosarcomas of the Skull Base: First Long-Term Report. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2009**, *75*, 1111–1118.
22. Harrabi, S.B.; Bougatf, N.; Mohr, A.; Haberer, T.; Herfarth, K.; Combs, S.E.; Debus, J.; Adeberg, S. Dosimetric advantages of proton therapy over conventional radiotherapy with photons in young patients and adults with low-grade glioma. *Strahlentherapie und Onkol.* **2016**, *192*, 759–769.
23. Weber, D.C.; Badiyan, S.; Malyapa, R.; Albertini, F.; Bolsi, A.; Lomax, A.J.; Schneider, R. Long-term outcomes and prognostic factors of skull-base chondrosarcoma patients treated with pencil-beam scanning proton therapy at the Paul Scherrer Institute. *Neuro. Oncol.* **2016**, *18*, 236–243.
24. Tian, X.; Liu, K.; Hou, Y.; Cheng, J.; Zhang, J. The evolution of proton beam therapy: Current and future status (Review). *Mol. Clin. Oncol.* **2017**, *15*–21.
25. Berman, A.; James, S.; Rengan, R. Proton Beam Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer: Current Clinical Evidence and Future Directions. *Cancers (Basel)*. **2015**, *7*, 1178–1190.
26. Takada, A.; Nakamura, T.; Takayama, K.; Makita, C.; Suzuki, M.; Azami, Y.; Kato, T.; Tsukiyama, I.; Hareyama, M.; Kikuchi, Y.; et al. Preliminary treatment results of proton beam therapy with chemoradiotherapy for stage I-III esophageal cancer. *Cancer Med.* **2016**, *5*, 506–515.
27. Leroy, R.; Benahmed, N.; Hulstaert, F.; Van Damme, N.; De Ruyscher, D. Proton Therapy in Children: A Systematic Review of Clinical Effectiveness in 15 Pediatric Cancers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2016, *95*, 267–278.
28. Lim, D.H. Radiation Therapy against Pediatric Malignant Central Nervous System Tumors : Embryonal Tumors and Proton Beam Therapy. **2018**, *61*, 386–392.
29. McLaughlin, C.C.; Wu, X.C.; Jemal, A.; Martin, H.J.; Roche, L.M.; Chen, V.W. Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. *Cancer* **2005**, *103*, 1000–1007.

30. Damato, B. Progress in the management of patients with uveal melanoma. the 2012 Ashton Lecture. *Eye* **2012**, *26*, 1157–1172.
31. Rosenberg, C.; Finger, P.T. Cutaneous Malignant Melanoma Metastatic to the Eye, Lids, and Orbit. *Surv. Ophthalmol.* 2008, *53*, 187–202.
32. Jovanovic, P.; Mihajlovic, M.; Djordjevic-Jocic, J.; Vlajkovic, S.; Cekic, S.; Stefanovic, V. Ocular melanoma: An overview of the current status. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013, *6*, 1230–1244.
33. Damato, E.M.; Damato, B.E. Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: An evaluation of 2384 patients. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 1582–1589.
34. Carvajal, R.D.; Schwartz, G.K.; Tezel, T.; Marr, B.; Francis, J.H.; Nathan, P.D. Metastatic disease from uveal melanoma: Treatment options and future prospects. *Br. J. Ophthalmol.* 2017, *101*, 38–44.
35. Damato, B.E.; Coupland, S.E. Ocular melanoma. *Saudi J. Ophthalmol.* **2012**, *26*, 137–144.
36. Wong, J.R.; Nanji, A.A.; Galor, A.; Karp, C.L. Management of conjunctival malignant melanoma: A review and update. *Expert Rev. Ophthalmol.* 2014, *9*, 185–204.
37. Rospond-Kubiak, I.; Kinga, S.; Kocięcki, J. Leczenie przerzutów czerniaka naczyniówki – dostępne metody z przeglądem piśmiennictwa. *Okul. po dyplomie* **2012**, *2*, 34–37.
38. Leyvraz, S.; Keilholz, U. Ocular melanoma: What’s new? *Curr. Opin. Oncol.* 2012, *24*, 162–169.
39. Su, F.; Li, B.; Wang, J.; Xu, X.; Ren, R.; Li, L.; Gao, F.; Liu, X. Molecular regulation of vasculogenic mimicry in human uveal melanoma cells: Role of helix-loop-helix Id2 (inhibitor of DNA binding 2). *Graefe’s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2009**, *247*, 411–419.
40. Prescher, G.; Bornfeld, N.; Hirche, H.; Horsthemke, B.; Jöckel, K.H.; Becher, R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* **1996**, *347*, 1222–1225.
41. Damato, B.; Dopierala, J.A.; Coupland, S.E. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 6083–6092.
42. Lagouros, E.; Salomao, D.; Thorland, E.; Hodge, D.O.; Vile, R.; Pulido, J.S. Infiltrative T regulatory cells in enucleated uveal melanomas. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **2009**, *107*, 223–8.
43. Luke, J.J.; Triozzi, P.L.; McKenna, K.C.; Van Meir, E.G.; Gershenwald, J.E.; Bastian, B.C.; Gutkind, J.S.; Bowcock, A.M.; Streicher, H.Z.; Patel, P.M.; et al. Biology of advanced uveal melanoma and next steps for clinical therapeutics. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015, *28*, 135–147.

44. Slominski, A.; Pawelek, J. Animals under the sun: Effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin. Dermatol.* **1998**, *16*, 503–515.
45. Kang, D.Y.; Kim, H.C. Functional characterization of two melanin-concentrating hormone genes in the color camouflage, hypermelanosis, and appetite of starry flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2013**, *189*, 74–83.
46. Kobayashi, N.; Nakagawa, A.; Muramatsu, T.; Yamashina, Y.; Shirai, T.; Hashimoto, M.W.; Ishigaki, Y.; Ohnishi, T.; Mori, T. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **1998**, *110*, 806–810.
47. Schweitzer, A.D.; Howell, R.C.; Jiang, Z.; Bryan, R.A.; Gerfen, G.; Chen, C.C.; Mah, D.; Cahill, S.; Casadevall, A.; Dadachova, E. Physico-chemical evaluation of rationally designed melanins as novel nature-inspired radioprotectors. *PLoS One* **2009**, *4*.
48. Sarna, T.; Pilas, B.; Land, E.J.; Truscott, T.G. Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *BBA - Gen. Subj.* **1986**, *883*, 162–167.
49. Clarke, K.; Edge, R.; Johnson, V.; Land, E.J.; Navaratnam, S.; Truscott, T.G. The carbonate radical: Its reactivity with oxygen, ammonia, amino acids, and melanins. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 10147–10151.
50. Sarna, T.; Dulęba, A.; Korytowski, W.; Swartz, H. Interaction of melanin with oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *200*, 140–148.
51. Sniegocka, M.; Podgórska, E.; Płonka, P.M.; Elas, M.; Romanowska-Dixon, Z.; Szczygieł, M.; Cichorek, M.; Markiewicz, A.; Bro, A.A.; Słominski, A.T.; et al. Transplantable Melanomas in Hamsters and Gerbils as Models for Human Melanoma. Sensitization in Melanoma Radiotherapy—From Animal Models to Clinical Trials. *Int. J. Mol. Sci. Int. J. Mol. Sci. Int. J. Mol. Sci* **2018**, *19*.
52. Brożyna, A.A.; Jóźwicki, W.; Carlson, J.A.; Slominski, A.T. Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma. *Hum. Pathol.* **2013**, *44*, 2071–2074.
53. Stei, M.M.; Loeffler, K.U.; Holz, F.G.; Herwig, M.C. Animal Models of Uveal Melanoma: Methods, Applicability, and Limitations. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*.
54. Yang, H.; Cao, J.; Grossniklaus, H.E. Uveal Melanoma Metastasis Models. *Ocul. Oncol. Pathol.* **2015**, *1*, 151–160.
55. Blanco, P.L.; Marshall, J.C.A.; Anteck, E.; Callejo, S.A.; Souza Filho, J.; Saraiva, V.; Burnier, M.N. Characterization of ocular and metastatic uveal melanoma in an animal model. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, *46*, 4376–4382.
56. Dithmar, S.; Rusciano, D.; Grossniklaus, H.E. A new technique for implantation of tissue culture melanoma cells in a murine model of metastatic ocular melanoma. *Melanoma Res.* **2000**, *10*, 2–8.
57. Folberg, R.; Leach, L.; Valyi-Nagy, K.; Lin, A.Y.; Apushkin, M.A.; Ai, Z.;

- Barak, V.; Majumdar, D.; Pe'er, J.; Maniotis, A.J. Modeling the behavior of uveal melanoma in the liver. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 2967–2974.
58. Kuruppu, D.; Christophi, C.; Bertram, J.F.; O'Brien, P.E. Characterization of an animal model of hepatic metastasis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **1996**, *11*, 26–32.
 59. Yang, H.; Fang, G.; Huang, X.; Yu, J.; Hsieh, C.L.; Grossniklaus, H.E. In-vivo xenograft murine human uveal melanoma model develops hepatic micrometastases. *Melanoma Res.* **2008**, *18*, 95–103.
 60. Pe'er, J.; Folberg, R.; Massicotte, S.J.; Baron, J.; Ginderdeuren, R.P. Van; Zimmerman, B.; Meyer, M.L.; Worsey, H. Clinicopathologic Spectrum of Primary Uveal Melanocytic Lesions in an Animal Model. *Ophthalmology* **1992**, *99*, 977–986.
 61. Albert, D.M.; Shaddock, J. a; Craft, J.L.; Niederkorn, J.Y. Feline uveal melanoma model induced with feline sarcoma virus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1981**, *20*, 606–24.
 62. Greene, H.S.N. A Spontaneous Melanoma in the Hamster with a Propensity for Amelanotic Alteration and Sarcomatous Transformation during Transplantation. *Cancer Res.* **1958**, *18*, 422–425.
 63. Fortner, J.G. Spontaneous tumors, including gastrointestinal neoplasms and malignant melanomas, in the syrian hamster. *Cancer* **1957**, *10*, 1153–1156.
 64. BOMIRSKI, A.; DOMINICZAK, T.; NOWINSKA, L. Spontaneous transplantable melanoma in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Unio Int. Contra Cancrum* **1962**, *18*, 178–80.
 65. Bomirski, A. Biological properties of transplantable melanomas in the Syrian hamster during 16 years of maintenance by serial passages. *Acad Med Ged* **1977**.
 66. Slominski, A.; Paul, R. Bomirski melanomas: A versatile and powerful model for pigment cell and melanoma research. (Review). *Int. J. Oncol.* **1993**, *2*, 221–228.
 67. Śniegocka, M.; Podgórska, E.; Plonka, P.M.; Elas, M.; Romanowska-Dixon, B.; Szczygiel, M.; Żmijewski, M.A.; Cichorek, M.; Markiewicz, A.; Brożyna, A.A.; et al. Transplantable melanomas in hamsters and gerbils as models for human melanoma. Sensitization in melanoma radiotherapy—From animal models to clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*.
 68. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **1976**, *194*, 23–8.
 69. Minn, a J.; Kang, Y.; Serganova, I.; Gupta, G.P.; Giri, D.D.; Doubrovin, M.; Ponomarev, V.; Gerald, W.L.; Blasberg, R.; Massague, J. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J.Clin.Invest.* **2005**, *115*, 44–55.
 70. Hunter, K.W.; Crawford, N.P.; Alsarraj, J. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res.* **2008**, *10*.

71. Harris, J.F.; Chambers, a F.; Hill, R.P.; Ling, V. Metastatic variants are generated spontaneously at a high rate in mouse KHT tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 5547–5551.
72. Weiss, L. Metastatic Inefficiency. *Adv. Cancer Res.* **1990**, *54*, 159–211.
73. Wan, L.; Pantel, K.; Kang, Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1450–1464.
74. Benias, P.C.; Wells, R.G.; Sackey-Aboagye, B.; Klavan, H.; Reidy, J.; Buonocore, D.; Miranda, M.; Kornacki, S.; Wayne, M.; Carr-Locke, D.L.; et al. Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4947.
75. Alexander, S.; Weigelin, B.; Winkler, F.; Friedl, P. Preclinical intravital microscopy of the tumour-stroma interface: Invasion, metastasis, and therapy response. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2013**, *25*, 659–671.
76. Pereira, A.; Colosimo, E.; Bittencourt, F.; Wainstein, A.; Goulart, E. Prognostic factors for metastasis in cutaneous melanoma. **2018**, *93*, 19–26.
77. Shahneh, F.Z.; Baradaran, B.; Zamani, F.; Aghebati-Maleki, L. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies. *Hum. Antibodies* **2013**, *22*, 15–19.
78. Roorda, B.D.; ter Elst, A.; Kamps, W.A.; de Bont, E.S.J.M. Bone marrow-derived cells and tumor growth: Contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2009**, *69*, 187–198.
79. Ho, J.J.D.; Man, H.S.J.; Marsden, P.A. Nitric oxide signaling in hypoxia. *J. Mol. Med.* **2012**, *90*, 217–231.
80. Weis, S.M.; Cheresh, D.A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* **2011**, *17*, 1359–1370.
81. Logsdon, E.A.; Finley, S.D.; Popel, A.S.; MacGabhann, F. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18*, 1491–1508.
82. Damato, B. Does ocular treatment of uveal melanoma influence survival. *Br. J. Cancer* **2010**, *103*, 285–290.
83. Singh, A.D.; Turell, M.E.; Topham, A.K. Uveal melanoma: Trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* **2011**, *118*, 1881–1885.
84. Fili, M.; Lundell, G.; Lundell, M.; Seregard, S. High dose rate and low dose rate ruthenium brachytherapy for uveal melanoma. No association with ocular outcome. *Br. J. Ophthalmol.* **2014**, *98*, 1349–1354.
85. Barker, C.A.; Postow, M.A. Combinations of radiation therapy and immunotherapy for melanoma: A review of clinical outcomes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2014**, *88*, 986–997.
86. Jessica Yang, Daniel K. Manson, Brian P. Marr, R.D.C. Treatment of uvealm

- melanoma: where are we now? *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2018**, *10*, 1–17.
87. Keating, G.M. Bevacizumab: A review of its use in advanced cancer. *Drugs* 2014, *74*, 1891–1925.
 88. Holick, M.F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 266–281.
 89. Slominski, A.T.; Brozyna, A.; Jozwicki, W.; Tuckey, R.C. Vitamin D as an adjuvant in melanoma therapy. *Melanoma Manag.* **2015**, *2*, 1–4.
 90. Bolerázská, B.; Ďurovcová, E.; Mareková, M. Potential of Using Vitamin D as an Adjuvant Treatment of Malignant Melanoma. *Klin. Onkol.* **2017**, *30*, 327–336.
 91. Podgorska, E.; Drzal, A.; Matuszak, Z.; Swakon, J.; Slominski, A.; Elas, M.; Urbanska, K. Calcitriol and calcidiol can sensitize melanoma cells to low-LET proton beam irradiation. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*.
 92. Konerding, M.A.; Malkusch, W.; Klapthor, B.; Van Ackern, C.; Fait, E.; Hill, S.A.; Parklins, C.; Chaplin, D.J.; Presta, M.; Denekamp, J. Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: Quantitative studies using corrosion casts. *Br. J. Cancer* **1999**, *80*, 724–732.
 93. Sevick, E.M.; Jain, R.K. Microvascular Architecture in a Mammary Carcinoma: Branching Patterns and Vessel Dimensions. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 265–273.
 94. Romanowska-Dixon, B.; Urbanska, K.; Elas, M.; Pajak, S.; Zygulska-Mach, H.; Miodonski, A. Angiomorphology of the pigmented Bomirski melanoma growing in hamster eye. *Ann. Anat.* **2001**, *183*, 559–565.
 95. Scala, G. Microvasculature of the cerebral cortex: A vascular corrosion cast and immunocytochemical study. *Microsc. Res. Tech.* **2014**, *77*, 257–263.
 96. Hossler, F.E.; Lametschwandtner, A.; Kao, R.; Finsterbusch, F. Microvascular architecture of mouse urinary bladder described with vascular corrosion casting, light microscopy, SEM, and TEM. *Microsc. Microanal.* **2013**, *19*, 1428–1435.
 97. Wagner, R.; Van Loo, D.; Hossler, F.; Czymmek, K.; Pauwels, E.; Van Hoorebeke, L. High-resolution imaging of kidney vascular corrosion casts with Nano-CT. *Microsc. Microanal.* **2011**, *17*, 215–219.
 98. Stuart Foster, F.; Burns, P.N.; Simpson, D.H.; Wilson, S.R.; Christopher, D.A.; Goertz, D.E. Ultrasound for the visualization and quantification of tumor microcirculation. *Cancer Metastasis Rev.* 2000, *19*, 131–138.
 99. O'Brien, W.D. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2007, *93*, 212–255.
 100. Deshpande, N.; Pysz, M.A.; Willmann, J.K. Molecular ultrasound assessment of tumor angiogenesis. *Angiogenesis* 2010, *13*, 175–188.
 101. Gonzalez, E.M.; Rodriguez, A.; Garcia, I. Review of ocular ultrasonography. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2001**, *42*, 485–495.
 102. Chami, L.; Lassau, N.; Chebil, M.; Robert, C. Imaging of melanoma: Usefulness of ultrasonography before and after contrast injection for diagnosis and early

- evaluation of treatment. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2011**, *4*, 1–6.
103. Zhang, Q.; Yang, H.; Kang, S.J.; Wang, Y.; Wang, G.D.; Coulthard, T.; Grossniklaus, H.E. In vivo high-frequency, contrast-enhanced ultrasonography of uveal melanoma in mice: Imaging features and histopathologic correlations. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 2662–2668.
 104. Mizutani, R.; Suzuki, Y. X-ray microtomography in biology. *Micron* **2012**, *43*, 104–115.
 105. Williams, J.C.; McAteer, J.A.; Evan, A.P.; Lingeman, J.E. Micro-computed tomography for analysis of urinary calculi. In Proceedings of the Urological Research; 2010; Vol. 38, pp. 477–484.
 106. Arlot, M.E.; Jiang, Y.; Genant, H.K.; Zhao, J.; Burt-Pichat, B.; Roux, J.-P.; Delmas, P.D.; Meunier, P.J. Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. *J. Bone Miner. Res.* **2008**, *23*, 215–222.
 107. Mei, M.L.; Ito, L.; Cao, Y.; Lo, E.C.M.; Li, Q.L.; Chu, C.H. An ex vivo study of arrested primary teeth caries with silver diamine fluoride therapy. *J. Dent.* **2014**, *42*, 395–402.
 108. Lalwani, K.; Giddabasappa, A.; Li, D.; Olson, P.; Simmons, B.; Shojaei, F.; Van Arsdale, T.; Christensen, J.; Jackson-Fisher, A.; Wong, A.; et al. Contrast agents for quantitative MicroCT of lung tumors in mice. *Comp. Med.* **2013**, *63*, 482–490.
 109. Liang, C.C.; Park, A.Y.; Guan, J.L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 329–333.
 110. Musolino, S. V. Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy: An International Code of Practice for Dosimetry Based on Standards of Absorbed Dose to Water; Technical Reports Series No. 398,. *Health Phys.* **2001**, *81*, 592–593.
 111. Sarna, M.; Zadło, A.; Czuba-Pelech, B.; Urbanska, K. Nanomechanical Phenotype of Melanoma Cells Depends Solely on the Amount of Endogenous Pigment in the Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*.
 112. Herst, P.M.; Dawson, R.H.; Berridge, M. V. Intercellular Communication in Tumor Biology: A Role for Mitochondrial Transfer. *Front. Oncol.* **2018**, *8*.
 113. Skoniecka, A.; Zauszkiewicz-Pawlak, A.; Tyminska, A.; Cichorek, M. Melanization of Bomirski hamster amelanotic melanoma cells (Ab line) depends on the type of culture medium. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2015**.
 114. Hackam, D.G.; Redelmeier, D.A. Translation of research evidence from animals to humans [9]. *J. Am. Med. Assoc.* **2006**, *296*, 1731–1732.
 115. Leszczyński, B.; Śniegocka, M.; Wróbel, A.; Pędrys, R.; Szczygieł, M.; Romanowska-Dixon, B.; Urbańska, K.; Elas, M. Visualization and quantitative 3D analysis of intraocular melanoma and its vascularization in a hamster eye. *Int.*

116. Brown, J.M. Tumor Hypoxia in Cancer Therapy. *Methods Enzymol.* 2007, *435*.
117. Kim, J.C.S.; Fulton, S. Malignant melanoma metastatic to the lung in a pet hamster. **1977**, 125–127.
118. Lima, L.; Montiani-Ferreira, F.; Sousa, R.; Langohr, I. Intraocular signet-ring cell melanoma in a hamster (*Cricetulus griseus*). *Vet. Ophthalmol.* **2012**, *15*, 53–58.
119. Braun, R.D.; Abbas, A.; Bukhari, S.O.; Wilson, W. Hemodynamic parameters in blood vessels in choroidal melanoma xenografts and rat choroid. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 3045–3052.
120. Braun, R.D.; Gadianu, M.; Vistisen, K.S.; Roberts, R.L.; Berkowitz, B.A. Manganese-enhanced MRI of human choroidal melanoma xenografts. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 963–967.
121. Braun, R.D.; Vistisen, K.S. Modeling human choroidal melanoma xenograft growth in immunocompromised rodents to assess treatment efficacy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 2693–2701.
122. Marshall, J.C.A.; Fernandes, B.F.; Di cesare, S.; Maloney, S.C.; Logan, P.T.; Anteck, E.; Burnier, M.N. The use of a cyclooxygenase-2 inhibitor (Nepafenac) in an ocular and metastatic animal model of uveal melanoma. *Carcinogenesis* **2007**.
123. Ma, D.; Luyten, G.P.; Luider, T.M.; Jager, M.J.; Niederhorn, J.Y. Association between NM23-H1 gene expression and metastasis of human uveal melanoma in an animal model. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1996**.
124. Apte, R.S.; Niederhorn, J.Y.; Mayhew, E.; Alizadeh, H. Angiostatin produced by certain primary uveal melanoma cell lines impedes the development of liver metastases. *Arch. Ophthalmol.* **2001**.
125. Makale, M. Chapter 8 Noninvasive Imaging of Blood Vessels. *Methods Enzymol.* 2008, *444*, 175–199.
126. Carovac, A.; Smajlovic, F.; Junuzovic, D. Application of Ultrasound in Medicine. *Acta Inform. Medica* **2011**, *19*, 168.
127. Unnikrishnan, S.; Klivanov, A.L. Microbubbles as ultrasound contrast agents for molecular imaging: Preparation and application. *Am. J. Roentgenol.* 2012, *199*, 292–299.
128. Wen, Q.; Wan, S.; Liu, Z.; Xu, S.; Wang, H.; Yang, B. Ultrasound Contrast Agents and Ultrasound Molecular Imaging. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 190–209.
129. Collignon, A.-M.; Lesieur, J.; Anizan, N.; Azzouna, R. Ben; Poliard, A.; Gorin, C.; Letourneur, D.; Chaussain, C.; Rouzet, F.; Rochefort, G.Y. Early angiogenesis detected by PET imaging with ⁶⁴Cu-NODAGA-RGD is predictive of bone critical defect repair. *Acta Biomater.* **2018**, *82*, 111–121.

130. Valluru, K.S.; Willmann, J.K. Clinical photoacoustic imaging of cancer. *Ultrasonography* **2016**, *35*, 267–280.
131. Horiguchi, A.; Shintchi, M.; Nakamura, A.; Wada, T.; Ito, K.; Asano, T.; Shinmoto, H.; Tsuda, H.; Ishihara, M. Pilot Study of Prostate Cancer Angiogenesis Imaging Using a Photoacoustic Imaging System. *Urology* **2017**, *108*, 212–219.
132. Khattak, S.; Gupta, N.; Zhou, X.; Pires, L.; Wilson, B.C.; Yucel, Y. Non-invasive dynamic assessment of conjunctival melanomas using photoacoustic imaging. *Exp. Eye Res.* **2018**, *179*, 157–167.
133. Mischi, M.; Turco, S.; Lavini, C.; Kompatsiari, K.; De La Rosette, J.J.M.C.H.; Breeuwer, M.; Wijkstra, H. Magnetic resonance dispersion imaging for localization of angiogenesis and cancer growth. *Invest. Radiol.* **2014**, *49*, 561–569.
134. Reitan, N.K.; Thuen, M.; Goa, P.E.; de Lange Davies, C. Characterization of tumor microvascular structure and permeability: comparison between magnetic resonance imaging and intravital confocal imaging. *J. Biomed. Opt.* **2010**, *15*, 36004.
135. Nagy, J.A.; Chang, S.-H.; Dvorak, A.M.; Dvorak, H.F. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br. J. Cancer* **2009**, *100*, 865–869.
136. Wolff-Kormann, P.G.; Kormann, B.A.; Riedel, K.G.; Hasenfratz, G.C.; Stefani, F.H.; Spengel, F.A.; Lund, O.E. Quantitative color Doppler imaging in untreated and irradiated choroidal melanoma. In Proceedings of the Investigative Ophthalmology and Visual Science; 1992; Vol. 33, pp. 1928–1933.
137. Regan, S.; Egan, K.M.; Hart, L.; Gragoudas, E.S. Color Doppler imaging of untreated and irradiated choroidal melanomas. *Eur. J. Ophthalmol.* **2001**, *11*, 150–155.
138. Forster, J.; Harriss-Phillips, W.; Douglass, M.; Bezak, E. A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. *Hypoxia* **2017**, *Volume 5*, 21–32.
139. Podgorska, E.; Sniegocka, M.; Mycinska, M.; Trybus, W.; Trybus, E.; Kopacz-Bednarska, A.; Wiechec, O.; Krzykawska-Serda, M.; Elas, M.; Krol, T.; et al. Acute hepatologic and nephrologic effects of calcitriol in Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Biochim. Pol.* **2018**, *65*, 351–358.
140. Reddy, P.; Edwards, L.R. Magnesium Supplementation in Vitamin D Deficiency. *Am. J. Ther.* **2017**, *1*.
141. Albert, D.M.; Kumar, A.; Strugnell, S.A.; Darjatmoko, S.R.; Lokken, J.M.; Lindstrom, M.J.; Damico, C.M.; Patel, S. Effectiveness of 1 α -hydroxyvitamin D₂ in inhibiting tumor growth in a murine transgenic pigmented ocular tumor model. *Arch. Ophthalmol.* **2004**, *122*, 1365–1369.
142. Suckow, M.; Stevens, K.; Wilson, R. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*; 2012; ISBN 9780123809209.

143. Gowda, S.; Desai, P.B.; Hull, V. V; Math, A.A.K.; Vernekar, S.N.; Kulkarni, S.S. A review on laboratory liver function tests. *Pan Afr. Med. J.* **2009**, *3*, 17.
144. McCullough, M.L.; Weinstein, S.J.; Freedman, D.M.; Helzlsouer, K.; Flanders, W.D.; Koenig, K.; Kolonel, L.; Laden, F.; Le Marchand, L.; Purdue, M.; et al. Correlates of circulating 25-hydroxyvitamin D: Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers. *Am. J. Epidemiol.* **2010**, *172*, 21–35.
145. Slominski, A.T.; Kim, T.-K.; Janjetovic, Z.; Tuckey, R.C.; Bieniek, R.; Yue, J.; Li, W.; Chen, J.; Nguyen, M.N.; Tang, E.K.Y.; et al. 20-Hydroxyvitamin D₂ is a noncalcemic analog of vitamin D with potent antiproliferative and prodifferentiation activities in normal and malignant cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2011**, *300*, C526–C541.
146. Wang, J.; Slominski, A.; Tuckey, R.C.; Janjetovic, Z.; Kulkarni, A.; Chen, J.; Postlethwaite, A.E.; Miller, D.; Li, W. 20-Hydroxyvitamin D₃ inhibits proliferation of cancer cells with high efficacy while being non-toxic. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 739–746.
147. Yeh, M.W.; Ituarte, P.H.G.; Zhou, H.C.; Nishimoto, S.; In-Lu Amy Liu; Harari, A.; Haigh, P.I.; Adams, A.L. Incidence and prevalence of primary hyperparathyroidism in a racially mixed population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 1122–1129.
148. Ahn, S.H.; Lee, N.; Choi, C.; Shin, S.W.; Han, Y.; Park, H.C. Feasibility study of Fe₃O₄/TaOx nanoparticles as a radiosensitizer for proton therapy. *Phys. Med. Biol.* **2018**, *63*, 1–11.
149. Schlathölder, T.; Eustache, P.; Porcel, E.; Salado, D.; Stefancikova, L.; Tillement, O.; Lux, F.; Mowat, P.; Biegun, A.K.; Van Goethem, M.J.; et al. Improving proton therapy by metal-containing nanoparticles: Nanoscale insights. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 1549–1556.
150. Hirai, T.; Saito, S.; Fujimori, H.; Matsushita, K.; Nishio, T.; Okayasu, R.; Masutani, M. Radiosensitization by PARP inhibition to proton beam irradiation in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *478*, 234–240.
151. Girdhani, S.; Sachs, R.; Hlatky, L. Biological effects of proton radiation: an update. *Radiat. Prot. Dosimetry* **2015**, *166*, 1–5.
152. Girdhani, S.; Lamont, C.; Hahnfeldt, P.; Abdollahi, A.; Hlatky, L. Proton Irradiation Suppresses Angiogenic Genes and Impairs Cell Invasion and Tumor Growth. *Radiat. Res.* **2012**, *178*, 33–45.
153. Dewhirst, M.W. A potential solution for eliminating hypoxia as a cause for radioresistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115*, 10548–10550.
154. Francis, J.H.; Kim, J.; Lin, A.; Folberg, R.; Iyer, S.; Abramson, D.H. Growth of Uveal Melanoma following Intravitreal Bevacizumab. *Ocul. Oncol. Pathol.* **2017**, *3*, 117–121.
155. Logan, P.; Burnier, J.; Burnier, M.N. Vascular endothelial growth factor expression and inhibition in uveal melanoma cell lines. *Ecancermedicalscience* **2013**, *7*.

156. Mahdjoubi, A.; Najean, M.; Lemaitre, S.; Dureau, S.; Dendale, R.; Levy, C.; Rouic, L.L. Le; Desjardins, L.; Cassoux, N. Intravitreal bevacizumab for neovascular glaucoma in uveal melanoma treated by proton beam therapy. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2018**, *256*, 411–420.
157. Romanowska-Dixon, B.; Urbanska, K.; Elas, M.; Cichocki, T. The histology of pigmented Bomirski melanoma growing in the hamster eye - preliminary results. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2003**, *8*, 849–856.
158. Romanowska-Dixon, B.; Elas, M.; Swakoń, J.; Sowa, U.; Ptaszkiewicz, M.; Szczygieł, M.; Krzykawska, M.; Olko, P.; Urbańska, K. Metastasis inhibition after proton beam, β - and γ -irradiation of melanoma growing in the hamster eye. *Acta Biochim. Pol.* **2013**, *60*, 307–311.
159. Jannasch, K.; Dullin, C.; Heinlein, C.; Krepulat, F.; Wegwitz, F.; Deppert, W.; Alves, F. Detection of different tumor growth kinetics in single transgenic mice with oncogene-induced mammary carcinomas by flat-panel volume computed tomography. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 62–70.
160. Damato, B.; Kacperek, A.; Errington, D.; Heimann, H. Proton beam radiotherapy of uveal melanoma. *Saudi J. Ophthalmol.* **2013**, *27*, 151–157.
161. Gargiulo, S.; Greco, A.; Gramanzini, M.; Esposito, S.; Affuso, A.; Brunetti, A.; Vesce, G. Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part II: Anesthetic Considerations in Preclinical Imaging Studies. *ILAR J.* **2012**, *53*, E70–E81.
162. Liu, H.; Chang, J.Y. Proton therapy in clinical practice. *Chin. J. Cancer* **2011**, *30*, 315–326.
163. Jasińska-Konior, K.; Pochylczuk, K.; Czajka, E.; Michalik, M.; Romanowska-Dixon, B.; Swakoń, J.; Urbańska, K.; Elas, M. Proton beam irradiation inhibits the migration of melanoma cells. *PLoS One* **2017**, *12*.
164. Beyreuther, E.; Brüchner, K.; Krause, M.; Schmidt, M.; Szabo, R.; Pawelke, J. An optimized small animal tumour model for experimentation with low energy protons. *PLoS One* **2017**, *12*.
165. Prezado, Y.; Jouvion, G.; Hardy, D.; Patriarca, A.; Nauraye, C.; Bergs, J.; Gonzalez, W.; Guardiola, C.; Juchaux, M.; Labiod, D.; et al. Proton minibeam radiation therapy spares normal rat brain: Long-Term Clinical, Radiological and Histopathological Analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*.
166. Girst, S.; Greubel, C.; Reindl, J.; Siebenwirth, C.; Zlobinskaya, O.; Walsh, D.W.M.; Ilicic, K.; Aichler, M.; Walch, A.; Wilkens, J.J.; et al. Proton Minibeam Radiation Therapy Reduces Side Effects in an in Vivo Mouse Ear Model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *95*, 234–241.
167. Kwon, Y.S.; Lee, K.S.; Chun, S.Y.; Jang, T.J.; Nam, K.S. Suppressive effects of a proton beam on tumor growth and lung metastasis through the inhibition of metastatic gene expression in 4T1 orthotopic breast cancer model. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 336–342.
168. Bellocq, D.; Roy, P.; Kodjikian, L.; Mathis, T.; Nguyen, A.-M.; Herault, J.; Rivoire, M.; Négrier, S.; Thariat, J.; Grange, J.-D. 20-Year Assessment of

- Metastatic Latency and Subsequent Time To Death After Proton Therapy for Uveal Melanomas. *Melanoma Res.* **2018**, 1.
169. Dendale, R.; Lumbroso-Le Rouic, L.; Noel, G.; Feuvret, L.; Levy, C.; Delacroix, S.; Meyer, A.; Nauraye, C.; Mazal, A.; Mammar, H.; et al. Proton beam radiotherapy for uveal melanoma: Results of Curie Institut-Orsay Proton Therapy Center (ICPO). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2006**, 65, 780–787.
 170. Damato, B.; Coupland, S.E. A reappraisal of the significance of largest basal diameter of posterior uveal melanoma. *Eye* **2009**, 23, 2152–2162.
 171. Gómez-Cuadrado, L.; Tracey, N.; Ma, R.; Qian, B.; Brunton, V.G. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis. Model. Mech.* **2017**, 10, 1061–1074.
 172. Aerts, J.; Nys, J.; Arckens, L. A Highly Reproducible and Straightforward Method to Perform In Vivo Ocular Enucleation in the Mouse after Eye Opening. *J. Vis. Exp.* **2014**.
 173. Hwang, S.H.; Lee, B.H.; Kim, H.J.; Cho, H.J.; Shin, H.C.; Im, K.S.; Choi, S.H.; Shin, T.J.; Lee, S.M.; Nam, S.W.; et al. Suppression of metastasis of intravenously-inoculated B16/F10 melanoma cells by the novel ginseng-derived ingredient, gintonin: Involvement of autotaxin inhibition. *Int. J. Oncol.* **2013**, 42, 317–326.
 174. Schönhuber, N.; Seidler, B.; Schuck, K.; Veltkamp, C.; Schachtler, C.; Zukowska, M.; Eser, S.; Feyerabend, T.B.; Paul, M.C.; Eser, P.; et al. A next-generation dual-recombinase system for time- and host-specific targeting of pancreatic cancer. *Nat. Med.* **2014**, 20, 1340–1347.
 175. Damato, B. Treatment of primary intraocular melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2006**, 6, 493–506.
 176. Mohan, R.; Held, K.D.; Story, M.D.; Grosshans, D.; Capala, J. Proceedings of the National Cancer Institute Workshop on Charged Particle Radiobiology. In Proceedings of the International Journal of Radiation Oncology Biology Physics; 2018.
 177. Shields, C.L.; Materin, M.A.; Shields, J.A.; Gershenbaum, E.; Singh, A.D.; Smith, A. Factors associated with elevated intraocular pressure in eyes with iris melanoma. *Br. J. Ophthalmol.* **2001**, 85, 666–669.
 178. Graul, A.I.; Stringer, M.; Sorbera, L. Cachexia. *Drugs of Today* 2016, 52, 519–529.
 179. Sánchez-Taberner, S.; García-Alvarez, C.; Muñoz-Moreno, M.F.; Diezhandino, P.; Alonso-Martínez, P.; de Frutos-Baraja, J.M.; López-Lara, F.; Saornil, M.A. Pattern of Local Recurrence After I-125 Episcleral Brachytherapy for Uveal Melanoma in a Spanish Referral Ocular Oncology Unit. *Am. J. Ophthalmol.* **2017**, 180, 39–45.
 180. Maheshwari, A.; Finger, P.T. Cancers of the eye. *Cancer Metastasis Rev.* 2018.
 181. Zhou, R.; Caspi, R.R. Ocular immune privilege. *Biol. Reports* **2010**, 2, 1885–1889.

182. Zaslavsky, A.; Chen, C.; Grillo, J.; Baek, K.-H.; Holmgren, L.; Yoon, S.S.; Folkman, J.; Ryeom, S. Regional Control of Tumor Growth. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 1198–1206.
183. Chen, C.; Parangi, S.; Tolentino, M.J.; Folkman, J.; Chen, C.; Parangi, S.; Tolentino, M.J.; Folkman, J.; Folkman, J. A Strategy to Discover Circulating Angiogenesis Inhibitors Generated by Human Tumors. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4230–4233.
184. Aulakh, G.K.; Balachandran, Y.; Liu, L.; Singh, B. Angiostatin inhibits activation and migration of neutrophils. *Cell Tissue Res.* **2014**, *355*, 375–396.